بسم الله الرحمن الرحيم

**دانشگاه شهید چمران اهواز**

**دانشکده علوم**

۹۲۳۴۲۴۱

**پایان نامه کارشناسی ارشد زیست‌شناسی**

**گرایش میکروبیولوژی**

عنوان :

# تهیه‌ی کانژوگه پراکسیداز آنتی‌بادی مونوکلونال ضد IgG مرغ و ارزیابی آن به وسیله‌ی الیزا

اساتید راهنما:

**دکترحسین معتمدی**

**دکتر مسعود رضا صیفی آباد شاپوری**

نگارنده :

**ندا مهرآور**

بهمن ماه ۹۲

تقدیم به دو بال پرواز پر گشودنم

آنان که یگانه غمخوار لحظات تنهایم بودند

و عشق را ایثارگونه برایم معنا بخشیدند

پدرم و مادرم

و هم بازی های کودکیم، مشاور و غمخوار امروزم و پشتوانه های فردایم

خواهران عزیزم، نجمه و نسیم

از استاد راهنمای بزرگوار، جناب آقای دکتر مسعود رضا صیفی آبادشاپوری که، همواره پرتور، نمودهای ارزشمندشان روشنگر مسیر این تحقیق بوده است، سپاسگزارم.

از استاد راهنمای محترم، جناب آقای دکتر حسین معتمدی که در مسیر این تحقیق همراهیم نمودند، تشکر می کنم.

از سرکار خانم دکتر سیده الهام رضا توفیقی و جناب آقای دکتر منوچهر مکوندی که داوری این پایان نامه را بر عهده داشتند، کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از ناظر محترم تحصیلات تکمیلی سرکار خانم دکتر مهناز کسمتی سپاسگزاری می کنم.

از کارشناس آزمایشگاه ویروس شناسی سرکار خانم داغری و دوستان مهربانم خانم هارامش، واثقی و عزیزی بسیار سپاسگزارم.

و سپاس از همراهی همکلاسی ها و هم اتاقی های عزیزم.

## فهرست

**عنوان** _____ **صفحه**


فصل اول : مقدمه و هدف ..... ۱
۱-۱- مقدمه ..... ۲
۱-۲- هدف ..... ۴
فصل دوم : مروری بر منابع ..... ۵
۲-۱- مقدمه‌ای بر سیستم ایمنی ..... ۶
۲-۲- مهم‌ترین عملکردهای آنتی‌بادی ..... ۹
۲-۳- ساختار آنتی‌بادی ..... ۱۰
۲-۴- آنتی‌بادی‌های پرندگان ..... ۱۳
۲-۵- خالص‌سازی آنتی‌بادی ..... ۱۵
۲-۶- روش‌های خالص‌سازی ..... ۱۵
۲-۶-۱- روش‌های رسوب دهی ..... ۱۵
۲-۶-۲- کروماتوگرافی میل ترکیبی ..... ۱۷
۲-۶-۲-۱- کروماتوگرافی میل ترکیبی با استفاده از پروتئین A – سفارز ..... ۱۸
۲-۶-۲-۲- کروماتوگرافی میل ترکیبی با استفاده از پروتئین G – سفارز ..... ۱۹
۲-۶-۳- کروماتوگرافی تمایل ایمنی ..... ۱۹
۲-۶-۴- کروماتوگرافی تعویض یونی ..... ۲۰
۲-۶-۵- کروماتوگرافی میل ترکیبی فلزات غیر متحرک (IMAC) ..... ۲۱
۲-۶-۶- کروماتوگرافی ممانعت اندازه(SEC) ..... ۲۲
۲-۶-۷- کروماتوگرافی با استفاده از هیدروکسی آپاتیت ..... ۲۳
۲-۶-۸- کروماتوگرافی میانکنش هیدروفوب (HIC) ..... ۲۳
۲-۷- تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال ..... ۲۴
۲-۸- تولید آنتی‌بادی مونوکلونال ..... ۲۵
۲-۹- کاربردهای آنتی‌بادی مونوکلونال ..... ۲۷

۲-۱۰- ویژگی‌های آنتی‌بادی‌های درمانی ..... ۲۸
۲-۱۰-۱- اختصاصیت بالا ..... ۲۸
۲-۱۰-۲- پایداری بالا در بدن ..... ۲۹
۲-۱۰-۳- سم زایی پایین ..... ۲۹
۲-۱۰-۴- آسان بودن نسبی دستیابی به آنتی‌بادی ..... ۲۹
۲-۱۰-۵- استفاده از روش‌های متداول در تولید و خالص‌سازی ..... ۲۹
۲-۱۱- تاریخچه استفاده درمانی از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال ..... ۳۰
۲-۱۲- مکانیسم‌های اثر آنتی‌بادی‌های دارویی ..... ۳۲
۲-۱۳- کانژوگاسیون ..... ۳۳
۲-۱۳-۱- نشانگرهای رادیوایزوتوپی آنتی‌بادی‌های مونوکلونال ..... ۳۳
۲-۱۳-۱-۱- ید ۱۲۵ ..... ۳۴
۲-۱۳-۱-۲- اندیم ۱۱۱ ..... ۳۵
۲-۱۳-۱-۳- ید ۱۳۱ ..... ۳۵
۲-۱۳-۲- نشانگرهای آنتی‌بادی غیر رادیواکتیو ..... ۳۶
۲-۱۳-۲-۱- شرایط نشان‌دار کردن ..... ۳۷
۲-۱۳-۲-۱-۱- واکنش های نشان‌دار کردن ..... ۳۷
۲-۱۳-۲-۱-۲- آنتی‌بادی‌های مونوکلونال ..... ۳۸
۲-۱۳-۲-۱-۳- مقیاس و نسبت ..... ۳۸
۲-۱۳-۲-۱-۴- خالص‌سازی و ذخیره آنتی‌بادی‌های نشان‌دار شده ..... ۳۸
۲-۱۳-۲-۲- انواع نشان‌دار کردن ..... ۳۹
۲-۱۳-۲-۲-۱- نشان‌دار کردن با آنزیم ..... ۳۹
۲-۱۳-۲-۲-۱-۱- کانژوگاسیون با آنزیم‌ها به وسیله‌ی گلوتارآلدئید ..... ۳۹
۲-۱۳-۲-۲-۱-۲- کانژوگاسیون با آنزیم‌ها به وسیله‌ی پریودات ..... ۴۰
۲-۱۳-۲-۲-۱-۳- کانژوگاسیون با آنزیم‌ها به وسیله‌ی معرف‌های مالیمید ..... ۴۱
۲-۱۳-۲-۲-۲- نشان‌دار کردن با فلوروکروم‌ها ..... ۴۲
۲-۱۳-۲-۲-۳- نشان‌دار کردن با بیوتین ..... ۴۲

۲-۱۳-۲-۴- نشان‌دار کردن با Digoxigenin (DIG) ..... ۴۳
۲-۱۴- مروری بر مطالعاتی که کانژوگاسیون آنتی‌بادی را انجام داده‌اند..... ۴۳
فصل سوم : مواد و روش‌ها..... ۴۶
۳-۱- مواد و وسایل..... ۴۶
۳-۱-۱- مواد مصرفی..... ۴۶
۳-۱-۲- وسایل و تجهیزات مورد نیاز..... ۴۸
۳-۲- بافرها و محلول‌های مورد استفاده..... ۴۹
۳-۲-۱- بافر جهت فعال‌سازی کیسه دیالیز..... ۴۹
۳-۲-۲- محلول‌های لازم برای SDS-PAGE ..... ۴۹
۳-۲-۲-۱- آکریلامید ۳۰ درصد..... ۴۹
۳-۲-۲-۲- محلول‌های تریس..... ۴۹
۳-۲-۲-۳- محلول ۱۰ درصد SDS ..... ۵۰
۳-۲-۲-۴- بافر حرکت کننده..... ۵۰
۳-۲-۲-۵- بافر نمونه..... ۵۰
۳-۲-۲-۶- محلول رنگ کوماسی..... ۵۱
۳-۲-۲-۷- محلول رنگ‌بر..... ۵۱
۳-۲-۲-۸- طرز تهیه‌ی ژل جدا کننده SDS -PAGE..... ۵۱
۳-۲-۲-۹- طرز تهیه‌ی ژل متراکم کنندهSDS -PAGE ..... ۵۲
۳-۲-۳- طرز تهیه‌ی بافر پوشاننده..... ۵۲
۳-۲-۴- طرز تهیه‌ی استوک TMB (۱درصد) ..... ۵۳
۳-۲-۵- طرز تهیه‌ی استوک آب اکسیژنه‌ی ۳ درصد..... ۵۳
۳-۲-۶- طرز تهیه‌ی بافر استات سدیم..... ۵۳
۳-۲-۷- طرز تهیه‌ی محلول سوبسترای کروموژن برای الیزا..... ۵۳
۳-۲-۸- طرز تهیه‌ی بافر اتصال دهنده..... ۵۴

۳-۲-۹- طرز تهیه‌ی بافر PBS ..... ۵۴
۳-۲-۱۰- طرز تهیه‌ی بافر شستشو دهنده ..... ۵۵
۳-۲-۱۱- طرز تهیه‌ی بافر Glycine-CL ..... ۵۵
۳-۲-۱۲- طرز تهیه‌ی بافر خنثی کننده ..... ۵۶
۳-۳- مراحل و روش انجام آزمایش ..... ۵۶
۳-۳-۱- روش تحقیق ..... ۵۶
۳-۳-۲- خالص‌سازی IgG از سرم مرغ ..... ۵۷
۳-۳-۳- بررسی خلوص IgG خالص شده با SDS-PAGE ..... ۵۸
۳-۳-۳-۱- طرز تهیه‌ی ژل پلی آکریلامید ..... ۵۸
۳-۳-۳-۲- آماده سازی نمونه‌ها ..... ۵۹
۳-۳-۳-۳- آماده‌سازی تانک الکتروفورز و بارگذاری نمونه‌ها ..... ۵۹
۳-۳-۳-۴- رنگ آمیزی پروتئین‌های الکتروفورز شده با آبی کوماسی ..... ۶۰
۳-۳-۴- تولید آنتی‌بادی مونوکلونال 5B8 توسط سلول‌های هیبریدوما ..... ۶۰
۳-۳-۵- خالص‌سازی آنتی‌بادی 5B8 با استفاده از کروماتوگرافی میل ترکیبی ..... ۶۱
۳-۳-۶- بررسی واکنش رقت‌های متوالی آنتی‌بادی 5B8 با IgG خالص شده مرغ با استفاده از الیزا ..... ۶۳
۳-۳-۷- بررسی عدم آلودگی آنتی‌بادی مونوکلونال به IgG مرغ با استفاده از ایمونودات ..... ۶۴
۳-۳-۸- کانژوگه کردن آنتی‌بادی مونوکلونال خالص‌سازی شده با پراکسیداز ..... ۶۴
۳-۳-۹- ارزیابی فعالیت آنتی‌بادی 5B8 نشان‌دار شده با پراکسیداز با استفاده از الیزا مستقیم ..... ۶۵
۳-۳-۹-۱- بررسی واکنش رقت‌های متوالی آنتی‌بادی 5B8 نشان‌دار شده با IgG خالص شده‌ی مرغ در الیزا ..... ۶۵
۳-۳-۹-۲- بررسی واکنش آنتی‌بادی 5B8 نشان‌دار شده با IgG مرغ، انسان و گاو ..... ۶۶
۳-۳-۱۰- ارزیابی فعالیت آنتی‌بادی 5B8 نشان‌دار شده با پراکسیداز با استفاده از الیزای غیرمستقیم ..... ۶۷
۳-۳-۱۱- بررسی پایداری کانژوگه تهیه شده پس از ۳ ماه نگه‌داری ..... ۶۸
فصل چهارم : نتایج ..... ۷۰
۴-۱- خالص‌سازی IgG مرغ ..... ۷۱

۴-۲- کشت سلول‌های هیبریدومای تولید کننده‌ی آنتی‌بادی مونوکلونال.....۷۲
۴-۳- بررسی خالص‌سازی آنتی‌بادی مونوکلونال تولید شده با استفاده از الیزا.....۷۲
۴-۴- بررسی عدم آلودگی آنتی بادی مونوکلونال به IgG مرغ با استفاداه از ایمونودات.....۷۳
۴-۵- بررسی کانژوگه شدن آنتی‌بادی 5B8 با آنزیم پراکسیداز به وسیله‌ی الیزا.....۷۴
۴-۶- بررسی واکنش آنتی‌بادی 5B8 نشان‌دار شده با IgG مرغ ، انسان و گاو در الیزا.....۷۵
۴-۷- بررسی قابلیت استفاده از کانژوگه آنتی‌بادی 5B8 در الیزای غیرمستقیم برای جستجوی آنتی-بادی ضد نوکلئوپروتئین (NP) ویروس آنفلوانزای پرندگان H9N2 در ۱۴ سرم طیور گوشتی آلوده به آنفلوانزا.....۷۶
۴-۸- بررسی قابلیت استفاده از کانژوگه آنتی‌بادی 5B8 در الیزای غیرمستقیم برای جستجوی آنتی بادی ضد نوکلئوپروتئین (NP) ویروس آنفلوانزای پرندگان H9N2 در ۱۴ سرم طیور تخم‌گذار آلوده به آنفلوانزا.....۷۸
۴-۹- بررسی پایداری کانژوگه تهیه شده .....۸۰
فصل پنجم : بحث و پیشنهادات.....۸۲
۵-۱-بحث و نتیجه گیری .....۸۳
۵-۲-پیشنهادات .....۹۱
منابع.....۹۲

## فهرست شکل‌ها

**عنوان** _____ **صفحه**


شکل۲-۱- شکل شماتیک مولکول آنتی‌بادی..... ۱۳
شکل ۲-۲- مقایسه‌ی ساختار آنتی‌بادی‌های IgG و IgY ..... ۱۴
شکل۲-۳- مکانیسم‌های اثر آنتی‌بادی‌های دارویی..... ۳۲
شکل ۲-۴- نشان‌دار کردن غیرمستقیم با اندیم..... ۳۵
شکل۲-۵- مسیر تشکیل یک کانژوگه‌ی آنزیم – آنتی‌بادی با استفاده از روش پریودات..... ۴۱
شکل۴-۱- الکتروفورز IgG خالص شده در ژل پلی آکریلامید(آزمایش SDS-PAGE)..... ۷۱
شکل ۴-۲- سلول‌های هیبریدومای تولید کننده‌ی آنتی‌بادی مونوکلونال 5B8 با بزرگ نمایی ۱۰۰..... ۷۲
شکل ۴-۳- بررسی عدم آلودگی آنتی‌بادی خالص شده‌ی 5B8 به IgG مرغ با آزمایش ایمونو دات..... ۷۴

## فهرست نمودارها

**عنوان _____ صفحه**

نمودار۴-۱- بررسی واکنش رقت‌های متوالی آنتی‌بادی خالص شده با IgG مرغ در الیزا.....۷۳
نمودار۴-۲- بررسی کانژوگه شدن آنتی‌بادی 5B8 با آنزیم پراکسیداز.....۷۵
نمودار ۴-۳- بررسی واکنش آنتی‌بادی نشان‌دار شده با IgG مرغ،انسان و گاو.....۷۶
نمودار ۴-۴- مقایسه‌ی واکنش کانژوگه‌ی تجاری و تهیه شده با ۱۴ سرم مرغ گوشتی.....۷۷
نمودار ۴-۵- هم‌بستگی بین نتایج کانژوگه‌ی تجاری و تولیدی با سرم مرغ‌های گوشتی.....۷۸
نمودار ۴-۶- مقایسه‌ی واکنش کانژوگه‌ی تجاری و تهیه شده با ۱۴ سرم مرغ تخم‌گذار.....۷۹
نمودار۴-۷- هم‌بستگی بین نتایج کانژوگه‌ی تجاری و تولیدی با سرم مرغ‌های تخم‌گذار.....۸۰
نمودار ۴-۸- بررسی پایداری کانژوگه‌ی تهیه شده در ۳ حالت متفاوت.....۸۱

## فهرست جداول

**عنوان** _____ **صفحه**


جدول ۲-۱- نشان‌گرهای رادیوایزوتوپی ..... ۳۳

جدول۳-۱- فهرست مواد مصرفی..... ۴۶

جدول۳-۲- تجهیزات مورد استفاده..... ۴۸

جدول ۳-۳- مواد لازم جهت تهیه‌ی بافر نمونه..... ۵۰

جدول ۳-۴- مواد لازم جهت ساخت ژل جداکننده SDS-PAGE ۱۰ درصد..... ۵۱

جدول ۳-۵- مواد لازم جهت ساخت ژل متراکم کننده SDS-PAGE ۱۰ درصد ..... ۵۲

جدول ۳-۶- مواد لازم جهت تهیه‌ی بافر پوشاننده..... ۵۲

جدول۳-۷- مواد لازم برای تهیه‌ی PBS..... ۵۴

## چکیده


| | | |
|---|---|---|
| **نام خانوادگی :** مهرآور | **نام** : ندا | **شماره دانشجویی** :۹۰۳۴۲۰۹ |
| **عنوان پایان نامه** : تهیه‌ی کانژوگه پراکسیداز آنتی‌بادی مونوکلونال ضد IgG مرغ و ارزیابی آن به وسیله‌ی الیزا | | |
| **اساتیدراهنما:** دکتر حسین معتمدی – دکتر مسعود رضا صیفی آباد شاپوری | | |
| **درجه تحصیلی:** کارشناسی ارشد | **رشته:** زیست شناسی | **گرایش:** میکروبیولوژی |
| **دانشگاه** : شهید چمران اهواز | **دانشکده:** علوم | **گروه** : زیست شناسی |
| **تاریخ فارغ التحصیلی** : **۹۲/۱۱/۱۹** | | **تعداد صفحه:۹۹** |



**کلید واژه‌ها** : آنتی‌بادی مونوکلونال، کانژوگاسیون، پریودات، پراکسیداز



میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا از عوامل اصلی تلفات و خسارت‌های اقتصادی در صنعت طیور هستند. به دلیل تأثیر این عوامل بر صنعت طیور کیت‌های آزمایشگاهی مختلفی بر پایه الیزا برای تشخیص عفونت‌های حاصل از این عوامل طراحی شده‌اند. در این کیت‌ها اغلب از یک آنتی‌بادی ثانویه‌ی کانژوگه شده با آنزیم به منظور شناسایی IgG مرغ استفاده می‌شود. هدف از مطالعه‌ی حاضر نشان‌دار کردن یک آنتی‌بادی مونوکلونال ضد IgG مرغ با آنزیم پراکسیداز و ارزیابی آن در الیزای غیر مستقیم به عنوان آنتی‌بادی ثانویه می‌باشد. برای این منظور یک تیره سلول هیبریدومای تولید کننده‌ی آنتی‌بادی مونوکلونال (5B8) ضد IgG مرغ در محیط RPMI 1640 کشت داده شده و مایع روی سلول‌ها جهت خالص‌سازی آنتی‌بادی 5B8 جمع آوری گردید. خالص‌سازی این آنتی-بادی از محیط کشت با استفاده از یک ستون حاوی سفارز حساس شده با IgG مرغ انجام شد. برای آماده کردن این ستون ابتدا IgG مرغ با استفاده از اسیدکاپریلیک و سولفات آمونیوم خالص‌سازی و نتیجه خالص‌سازی با استفاده از SDS- PAGE بررسی شد. سپس طبق روش‌های استاندارد IgG خالص شده مرغ به رزین سفارز فعال شده با سیانور بروهیدرید اتصال داده شد. پس از خالص-سازی آنتی‌بادی 5B8 با ستون سفارز، واکنش آنتی‌بادی خالص شده با IgG مرغ در الیزای غیرمستقیم بررسی شد. براساس نتایج به دست آمده آنتی‌بادی مونوکلونال خالص شده تا رقت ۱/۲۰۴۸۰۰ قادر به شناسایی IgG مرغ با غلظت یک میکروگرم در حفره بود. پس از اطمینان از عملکرد آنتی‌بادی و نیز بررسی عاری بودن آن از آلودگی با IgG مرغ (با آزمایش ایمونودات) واکنش کانژوگاسیون با آنزیم پراکسیدار به وسیله پریودات سدیم انجام گردید. عملکرد کانژوگه تهیه شده برای شناسایی IgG مرغ در الیزای مستقیم مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج نشان داد که کانژوگه تهیه شده تا رقت ۱/۳۲۰۰۰ قادر به شناسایی IgG مرغ با غلظت یک میکروگرم درحفره بود. در نهایت، توانایی کانژوگه‌ی پراکسیداز تجاری و تهیه شده برای شناسایی آنتی‌بادی‌های ضد نوکلئوپروتئین ویروس آنفلوآنزا در سرم مرغ‌های آلوده به ویروس آنفلوآنزا بررسی شد. OD بدست آمده از آزمایش انتهایی همبستگی قوی و معناداری ( r =0.95 ,P<0.001) را بین کانژوگه‌ی تجاری و تهیه شده نشان داد. در نتیجه از کانژوگه‌ی تهیه شده می‌توان برای طراحی کیت‌های تشخیصی سرم‌شناسی طیور استفاده نمود.

# فصل اول

## مقدمه و هدف

## ۱-۱- مقدمه

علی‌رغم پیشرفت‌های بسیار در تشخیص و درمان بیماری‌های عفونی، میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا مهم‌ترین تهدید برای صنعت پرورش طیور هستند. تشخیص این عوامل معمولاً شامل آزمایش‌های سرم‌شناسی است که با استفاده از آن‌ها آنتی‌بادی‌های اختصاصی این عوامل بیماری‌زا مورد ردیابی قرار می‌گیرند. در حال حاضر آزمایش‌های ارزیابی ایمنی آنزیمی، در قالب کیت‌های تجاری الیزا، رایج‌ترین آزمایش‌های سرم‌شناسی برای تشخیص عوامل بیماری‌زای طیور می‌باشند. در تمام این کیت‌ها از یک آنتی‌بادی ثانویه که قادر به شناسایی IgG (IgY) مرغ است و با یک آنزیم نشان‌دار شده است استفاده می‌گردد (۵۵، ۴۳).

آنتی‌بادی‌ها گلیکوپروتئین‌هایی هستند که به طور عمده در بخش گاما سرم یافت می‌شوند و یکی از اعضای خانواده‌ی پروتئین‌های کروی سرم هستند که به وسیله‌ی لنفوسیت‌های B تولید می‌شوند (۲۶). آنتی‌بادی‌ها به فرم غشایی و ترشحی تولید می‌شوند. فرم غشایی به صورت پروتئین‌های متصل به غشا سلول‌های B و فرم ترشحی در پلاسما، ترشحات مخاطی و مایعات خارج سلولی وجود دارد (۴). آنتی‌بادی‌های نشان‌دار شده با آنزیم‌هایی مانند پراکسیداز ترب کوهی در طیف وسیعی از فرآیندهای سنجش ایمنی، ایمونوهیستوشیمی و ایمنی درمانی استفاده می‌شوند. این آنتی‌بادی‌ها که آنزیم به طور کوالان به آن‌ها وصل می‌شود، می‌توانند مونوکلونال یا پلی‌کلونال باشند (۳).

آنتی‌بادی‌های مونوکلونال آنتی‌بادی‌هایی هستند که تنها توسط یک کلون لنفوسیت B تولید می‌گردند اما آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال توسط مخلوطی از کلون‌های لنفوسیت B مختلف تولید می‌شوند

(۳۲). آنتی‌بادی‌های مونوکلونال ویژه‌ی یک اپی‌تاپ هستند و این امر اختصاصیت آن‌ها را بالا می‌برد. اختصاصیت یک آنتی‌بادی توانایی آن در شناسایی یک اپی‌تاپ خاص در حضور اپی‌تاپ‌های دیگر است و آنتی‌بادی که اختصاصیت بالایی داشته باشد واکنش‌های متقاطع کم‌تری می‌دهد. سلول‌های تولید کننده‌ی آنتی‌بادی مونوکلونال می‌توانند به عنوان منبع پایدار و تجدید پذیر آنتی‌بادی را تولید کنند در صورتی که میزان آنتی‌بادی پلی‌کلونال تولید شده بر ضد همان آنتی‌ژن بسته به حیوان ایمن شده و میل پیوندی تام[1] متغییر خواهد بود. خلوص و غلظت آنتی‌بادی مونوکلونال بالاتر است. غلظت یک آنتی‌بادی ویژه‌ی پلی‌کلونال در سرم معمولاً ۲۰۰-۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر است و غلظت ایمونوگلوبولین کلی در سرم ۲۰- ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر است. در مقایسه غلظت آنتی‌بادی مونوکلونال تولیدی در مایع صفاقی یا در محیط کشت سلولی ۱۰ برابر است و خلوص بسیار بالاتری دارد (۳۳).

آنتی‌بادی‌ها با وجود این‌که ابزار بسیار مفیدی برای تشخیص اختصاصی آنتی‌ژن‌ها هستند، اما تعیین تشکیل کمپلکس آنتی‌ژن-آنتی‌بادی معمولاً دشوار است. با این حال استفاده از یک نشان‌گر[2] کانژوگه شده به آنتی‌بادی این مشکل را آسان می‌کند. در گذشته به طور عمده از نشان‌گرهایی مثل رادیوایزوتوپ‌ها همانند ید ۱۲۵ استفاده می‌شد، اما در حال حاضر این فلوروکروم‌ها و آنزیم‌ها هستند که به طور وسیع استفاده می‌شوند. راه حل دیگر نشان‌دارکردن آنتی‌بادی‌ها با لیگاندهای کوچکی است که به ما اجازه می‌دهد با استفاده از معرف‌های اختصاصی لیگاند آن‌ها را مشخص کنیم. از روش‌های

[1] - Avidity
[2] - Lable

کانژوگاسیون ایمونوگلوبولین‌ها می‌توان به کانژوگه کردن ایمونوگلوبولین‌ها با فلوروکروم‌ها، آنزیم‌ها و بیوتین اشاره کرد. کانژوگاسیون با آنزیم‌ها شامل روش‌های استفاده از گلوتارآلدئید، پریودات و معرف‌های مالیمید[1] می‌باشد (۳).

## ۱-۲- هـدف

هدف از تحقیق حاضر کانژوگاسیون آنتی‌بادی مونوکلونال تولید شده بر ضد IgG مرغ (آنتی-بادی مونوکلونال 5B8) با آنزیم پراکسیداز و بررسی قابلیت استفاده از این کانژوگه در الیزای غیر مستقیم در مقایسه با یک کانژوگه تجاری می‌باشد.

[1] - Maleimid

# فصل دوم

## مروری بر منابع

## ۲-۱- مقدمه‌ای بر سیستم ایمنی

محیط اطراف ما دارای انواع کثیری از عوامل بیماری‌زا از قبیل باکتری‌ها، ویروس‌ها، قارچ‌ها و انگل‌های تک سلولی و پرسلولی است که قادرند وارد بدن شده و تولید بیماری نمایند و در صورتی‌که تکثیرشان کنترل نشود نهایتاً منجر به مرگ میزبان شوند. عملکرد اصلی سیستم ایمنی، حذف عامل عفونی و به حداقل رساندن آسیب وارده توسط عامل بیماری‌زا است. در نتیجه می‌توان اطمینان داشت که اکثر عفونت‌ها در افراد عادی دوره‌ی کوتاهی داشته و آسیب قابل توجهی به جا نمی‌گذارند. عوامل عفونی آسیب‌رسان پاتوژن[1] نامیده می‌شوند. پاتوژن‌ها از راه‌های مختلف وارد بدن شده و تکثیر می یابند. در همین راستا سیستم ایمنی نیز با استفاده از روش‌های متعدد به آن‌ها پاسخ می‌دهد (۲). سیستم ایمنی مجموعه‌ای از مکانسیم‌های قدرتمندی است که جهت حفاظت از میزبان مهره‌دار در مقابل عوامل مهاجم شکل گرفته و در صورت فقدان این سیستم عامل مهاجم به منبع غنی از مواد غذایی در بدن میزبان تسلط می‌یابد. در عین حال سیستم ایمنی باید به قدر کافی تخصص یافته باشد که بین سلول‌های خودی و ارگانیسم مهاجم را تمایز دهد و بر ضد فلور نرمال روده، پوست و بسیاری از بافت‌های دیگر حمله نکند. از طرف دیگر از دفع بافتی که کاملاً بیگانه است، به خصوص جنین، پرهیز کند (۴).

در کل پاسخ‌های ایمنی به دو گروه تقسیم می‌شوند: یک دسته آن‌ها که پس از برخوردهای بعدی با یک آنتی‌ژن خاص با قدرت بیشتری انجام می‌شوند (پاسخ‌های ایمنی اکتسابی) و دسته دوم

[1] - Pathogen

آن‌ها که طی برخوردهای متعدد با همان آنتی‌ژن هیچ تغییری نمی‌یابند (پاسخ‌های ایمنی ذاتی). پاسخ های ایمنی ذاتی ساده هستند و در عین حال در همه حیوانات به طور قابل ملاحظه‌ای تخصص یافته-اند و به عنوان خط دفاعی اولیه بر ضد پاتوژن‌ها محسوب شده و واکنش سریعی به عامل مهاجم می-دهند. گستره سیستم‌های پاسخ ایمنی ذاتی از سدهای خارجی (پوست، سطوح مخاطی، مژک‌ها، ترشحات و مایعات بافتی دارای عوامل ضد میکروبی) تا گیرنده‌های تخصص یافته‌ای که قادرند کلاس‌های وسیعی از ارگانیسم‌های پاتوژن را شناسایی کنند، می‌باشد. به عنوان مثال گیرنده‌های ایمنی ذاتی بر روی برخی لکوسیت‌ها الگوهای مولکولی همراه با پاتوژن[1] را شناسایی می‌کنند که در بین بسیاری از ارگانیسم‌های مهاجم بیگانه مشترک بوده و به طور طبیعی در بدن میزبان حضور ندارد (۲).

سدهای دفاع طبیعی در ارتباط تنگاتنگ با پاسخ‌های ایمنی اکتسابی هستند. پاسخ‌های سیستم ایمنی اکتسابی توسط گروه خاصی از لکوسیت‌ها، به نام لنفوسیت‌ها واسطه‌گری می‌شود که شامل لنفوسیت‌های B و T می‌باشند. این دو گروه لنفوسیت عملکردهای حفاظتی مختلفی را اعمال می‌کنند. سلول‌های B به عنوان بازوی هومورال سیستم ایمنی اکتسابی بر ضد پاتوژن‌های خارج سلولی عمل می‌کنند. سلول‌های T مسئول بازوی ایمنی سلولی سیستم ایمنی اکتسابی بوده و به خصوص در پاسخ-های ایمنی سلولی بر ضد پاتوژن‌های داخل سلولی نظیر ویروس‌ها و همچنین تنظیم سلول‌های B وارد عمل می‌شوند. لنفوسیت‌ها مسئول اصلی شناسایی اختصاصی پاتوژن‌ها هستند و به همین دلیل آغازگر پاسخ‌های ایمنی اکتسابی به شمار می‌روند. همه‌ی لنفوسیت‌های B مراحل تکامل خود را در مغز استخوان می‌گذرانند، لنفوسیت‌های T برای این منظور به تیموس مهاجرت می‌کنند. انواع مختلفی

[1] - Pathogen associated molecular patterns (PAMPs)