بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده علوم زیستی

پایان نامه دوره کارشناسی ارشد

رشته بیوشیمی

عنوان

تولید و خالص سازی آنتی بادی مونوکلونال موشی بر ضد فعال کننده بافتی پلاسمینوژن

نگارش

سینا ساری‌خانی

استادراهنما

دکتر منوچهر میرشاهی

شهریور ۱۳۸۸

تقدیم به:

پدر و مادر بزرگوارم که اولین حامیان من در تحصیل علم بودند
به پاس زحمات بیدریغشان

به اساتید گرامی, بهترین مشوقین من,
به پاس الطاف بی کرانشان

به برادران و خواهر عزیزم که صمیمانه دوستشان دارم

و

به شیفتگان راه علم و به همه کسانی که عطش دانستن در وجودشان موج می زند و آنانکه رنج آموختن را به رنج زیستن می افزایند تا سرافراز زندگی کنند.

واما،

تشکر می کنم از استاد راهنمای بزرگوارم جناب آقای دکتر منوچهر میرشاهی، که در طی این چند سال مرا همراهی کردند. با سپاس از ایشان و آرزوی بهترین ها برای شان.

از داور محترم داخلی استاد کلهر و داور محترم خارجی استاد مینایی، تشکر می کنم که وقت با ارزشان را در اختیار اینجانب قرار دادند و زحمت داوری این پایان نامه را پذیرفتند.

از تک تک دوستان عزیزم در گروه بیوشیمی- بیوفیزیک- ژنتیک و به خصوص دوستانم در آزمایشگاه آقای دکتر میرشاهی، که تمامی آن لحظات به یادماندنی و خاطرات شیرینی را برایم خلق کردند تشکر و قدردانی می کنم.

از جناب آقای محمدرضا قرائتی دانشجوی دکتری بیوشیمی تشکری ویژه دارم که در این سال ها از تجارب ایشان نهایت استفاده را کردم و در مسیر پیشرفت این پایان نامه کمک زیادی به این بنده حقیر کردند.

با تشکر فراوان از سرکار خانم فضل زرندی کارشناس آزمایشگاه بیوشیمی و بیوفیزیک

و در نهایت از به پدر و مادر عزیزم که بیشتر از جان دوستشان دارم و از تمام زحمات و حمایت های بی دریغشان سپاسگزاری می کنم. و امیدوارم که روزی بتوانم اندکی از محبت هایشان را جبران نمایم.

چکیده:

فعال کننده بافتی پلاسمینوژن (t-PA) یک سرین پروتئازاست که زایموژن غیر فعال پلاسمینوژن را به فرم فعال آن یعنی پلاسمین تبدیل می کند که آنزیم اصلی حل شبکه های فیبرینی تشکیل شده در عروق می باشد.در برخی از پاتولوژی ها غلظت این آنزیم در خون افزایش یا کاهش می یا بد و اندازه گیری آن در خون می تواند در تشخیص نوع پاتولوژی کمک کند. به علاوه این مولکول تا به امروز تنها داروی تایید شده توسط FDA برای درمان افراد مبتلا به سکته های مغذی حاد می با شد. اما استفاده از این دارو بسیار کم می باشد. زیرا درصدی هر چند ناچیز از افراد تحت درمان با آن دچار خونریزی های مغذی می گردند. گروه های زیادی در تلاشند تا به نحوی با مطالعه مکانیزم های درگیر، مانع از اثرات جانبی این داروی ارزشمند گردند.همچنین در سال های اخیر گزارش های بسیاری مبنی بر حضور فعال این ترکیب در بخش های مشخصی از مغز داده شده است و عملکرد ها و سوبستراهای متفاوتی برای آن ارائه شده است. در این مطالعه به تولید آنتی بادی های مختلفی بر ضد اپی توپ های مختلف مولکول t-PA پرداخته شده است .از چنین آنتی بادی هایی می توان در طراحی کیت های آزمایشگاهی برای اندازه گیری میزان این ترکیب در مایعات مختلف زیستی سود جست.کاربرد دیگر این آنتی بادی ها تسهیل در شناسایی مکانیزم ها و خصوصیات ناشناخته این دارو می باشد. به علاوه در صورت انسانی شدن، می توان از این دسته آنتی بادی ها در جهت مهار و خنثی سازی اثرات نا مطلوب t-PA در بیماران استفاده نمود. در این مطالعه پس از ایمونیزاسیون موش ها و انجام هیبریداسیون سلولی تعداد ۵۸ کلونی به دست آمد که از میان آن ها ۳ کلونی مثبت بودند . پس از کلونینگ سلولی و خالص سازی آنتی بادی ها اثرات آن ها بر روی سیستم فیبرینولیز بررسی شد . از بین آنتی بادی های

حاصله ، ۲ آنتی بادی به نام های S1D8 و S3F9 باعث مهار این سیستم شده و آنتی بادی سوم به نام S3E5 هیچگونه اثری بر روی فیبرینولیز نداشت . آزمایش های الایزای رقابتی نشان داد که هر سه آنتی بادی قادرند t -PA را در حالت محلول شناسایی کنند . از طرفی هر ۳سه در میان کنش t -PA و سوبسترای کروموژنیک آن اختلالی ایجاد نمی کردند . با توجه به این مشاهدات مشخص شد که آنتی بادی S3E5 اپی توپی غیر کانفورماسیونی را می شناسد که نقشی در کمپلکس سه گانه فیبرین- پلاسمینوژن- t -PA ندارد . اما ۲ آنتی بادی دیگر محتملا مانع از اتصال t -PA به فیبرین و یا پلاسمینوژن می گردند .

لغات کلیدی : فعال کننده بافتی پلاسمینوژن ، فیبرینولیز ، ترومبوز ، آنتی بادی منوکلونال

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: کلیات موضوع ،مروری بر مطالعات انجام شده

۱-۱- آنتی بادی ها ۱

۱-۲- خصوصیات کلی ساختار آنتی‌بادیها ۳

۱-۲-۱- ساختار نواحی متغیر و چگونگی اتصال به آنتی‌ژن ۵

۱-۲-۲- ویژگی‌های نواحی ثابت و نقش آنها در فعالیتهای عملکردی ۶

۱-۳-ایمونوگلوبولین G ۷

۱-۴-اصول شیمیایی و ساختاری اتصال به آنتی‌ژن ۸

۱-۵- ویژگیهای شناسایی آنتی‌ژن ۹

۱-۵-۱-اختصاصی بودن (specificity) ۹

۱-۵-۲- تنوع (Diversity) ۹

۱-۵-۳- بلوغ میل ترکیبی (Affinity maturation) ۱۰

۱-۶- ایجاد ترومبوز ۱۰

۱-۷- فیبرینولیز ۱۲

۱-۸- پلاسمینوژن ۱۶

۱-۸-۱- فعال شدن پلاسمینوژن و تبدیل آن به پلاسمین ۱۹

۱-۸-۲- مکانیسم فعال شدن پلاسمینوژن ۲۰

۱-۹- فعال کننده های پلاسمینوژن ۲۲

۱-۹-۱-فعال کننده های فیزیولوژیک پلاسمینوژن ۲۲

۱-۹-۱-۱- فعال کننده بافتی پلاسمینوژن (t-PA) ۲۲

۱-۹-۱-۲- فعال کننده ادراری پلاسمینوژن ۲۸

۱-۹-۲-فعال کننده های فارماکولوژیک پلاسمینوژن ۲۹
۱-۹-۲-۱- استرپتوکیناز ۲۹
۱-۹-۲-۲- استافیلوکیناز ۳۰
۱-۹-۲-۳- فعال کننده های پلاسمینوژن مشتق شده از دسمودوس رتوندوس ۳۰
۱-۹-۳- فعال کننده های جدید پلاسمینوژن ۳۲
۱-۱۰- تنظیم فیبرینولیز داخلی ۳۵

فصل دوم: مواد و روش ها

۲-۱- طرز تهیه بافرها ۳۸
۲-۱-۱- طرز تهیه بافر PBS ۳۸
۲-۱-۲- روش تهیه بافر بی کربنات سدیم ۳۹
۲-۱-۳- روش تهیه بافر Tris-HCI ۳۹
۲-۲- فاز ۱: تولید سلول های هیبریدومای مولد آنتی بادی ۴۰
۲-۲-۱- ایمونیزاسیون ۴۰
۲-۲-۲- خونگیری و تعیین تیتر آنتی بادی در سرم موش های ایمونیزه ۴۱
۲-۳- روش تهیه محیط کشت RPMI-1640 استریل ۴۱
۲-۴- رنگ‌آمیزی حیاتی سلولها ۴۲
۲-۴-۱-روش تهیه رنگ تریپان بلو ۴۲
۲-۵-کشت سلول های منجمد شده ۴۲
۲-۶- روش تولید سلول های هیبریدوما ۴۴
۲-۶-۱- فیوژن یا ادغام سلولی ۴۴
۲-۶-۲-روش تهیه لایه مغذی (Feeder layer) ۴۶
۲-۶-۳-کلونینگ سلولی ۴۷
۲-۶-۴- انجماد سلول (Cryopreservation) ۴۸
۲-۷- فاز ۲: تولید انبوه آنتی بادی منوکلونال در مایع آسیت ۴۹
۲-۷-۱-کشت سلولهای هیبریدومای تولید کننده آنتی بادیهای منوکلونال ۴۹

۲-۷-۲- تزریق سلولهای هیبریدوما به صفاق موش و جمع آوری مایع آسیت ۵۰
۲-۷-۳- تخلیص آنتی‌بادیهای مونوکلونال موجود در آسیت به روش کروماتوگرافی تمایلی بوسیله پروتئین G ۵۱
۲-۷-۳-۱-بررسی تاثیر محیط اسیدی بر فعالیت آنتی بادی های موجود در آسیت..... ۵۳
۲-۷-۴- تغلیظ آنتی بادی ها با استفاده از سولفات آمونیوم ۵۳
۲-۷-۵- آماده‌سازی کیسه دیالیز ۵۴
۲-۷-۶- تعیین خلوص آنتی‌بادیها به روش الکتروفورز ۵۵
۲-۷-۷- رنگ آمیزی ژل SDS-PAGE با کوماسی بلو ۵۸
۲-۸- فاز سوم: تعیین خصوصیات مختلف آنتی بادی ها ۵۹
۲-۸-۱- بررسی احتمال وجود واکنش های متقاطع (Cross reactivity) ۵۹
۲-۸-۲- بررسی اثر آنتی بادی ها بر سیستم فیبرینولیز ۵۹
۲-۸-۲-۱- تهیه پلاسما از خون ۵۹
۲-۸-۲-۲- مشخص کردن غلظت مناسب ترومبین جهت ایجاد لخته ۶۰
۲-۸-۲-۳- پیدا کردن غلظت مناسب t -PA جهت حل لخته..... ۶۰
۲-۸-۳- سنجش کیفی اثر آنتی بادی ها بر زمان حل لخته..... ۶۱
۲-۸-۴- سنجش کمی اثر آنتی بادی ها بر زمان حل لخته..... ۶۱
۲-۸-۵- بررسی احتمال اتصال آنتی بادی ها به جایگاه فعال t-PA..... ۶۳
۲-۸-۶- متصل کردن آنتی بادی ها به بیوتین..... ۶۳
۲-۸-۷- بررسی کارایی کانژوکاسیون ۶۴
۲-۸-۸- بررسی احتمال شناسایی آنتی ژن در حالت محلول توسط آنتی بادی های حاصله .. ۶۴

فصل سوم: نتایج

فاز ۱: تولید سلول های هیبریدومای مولد آنتی بادی ۶۶
۳-۱- ایمونیزاسیون و تعیین تیتر آنتی بادی در سرم موش های ایمونِیزه..... ۶۶
۳-۲- روش تولید سلول های هیبریدوما ۶۷
۳-۲-۱- کشت و آماده سازی سلول های SP2/0 برای ادغام سلولی ۶۷
۳-۲-۲- تهیه لایه مغذی (Feeder layer)..... ۶۸

۳-۲-۴- کلونینگ سلولی ۷۱
۳-۳- فاز ۲: تولید انبوه آنتی بادی منوکلونال در مایع آسیت ۷۲
۳-۳-۱- تزریق سلولهای هیبریدوما به صفاق موش و جمع آوری مایع آسیت ۷۲
۳-۳-۲- تخلیص وتغلیظ آنتی بادیهای مونوکلونال موجود در آسیت ۷۳
۳-۳-۳- تعیین خلوص آنتی‌بادیها به روش SDS-PAGE ۷۴
۳-۴- فاز سوم: تعیین خصوصیات مختلف آنتی بادی های بدست آمده ۷۵
۳-۴-۱- بررسی احتمال وجود واکنش های متقاطع ۷۵
۳-۴-۲- بررسی اثر آنتی بادی ها بر سیستم فیبرینولیز ۷۶
۳-۴-۲-۱- مشخص کردن غلظت مناسب ترومبین جهت ایجاد لخته ۷۶
۳-۴-۲-۲- پیدا کردن غلظت مناسب t -PA جهت حل لخته ۷۷
۳-۴-۲-۳- سنجش کیفی اثر آنتی بادی ها بر زمان حل لخته ۷۷
۳-۴-۲-۴- سنجش کمی اثر آنتی بادی ها بر زمان حل لخته ۷۷
۳-۴-۳- بررسی احتمال اتصال آنتی بادی ها به جایگاه فعال t-PA ۷۸
۳-۴-۴- بررسی کارایی کانژوکاسیون ۷۹
۳-۴-۵- بررسی احتمال شناسایی آنتی ژن در حالت محلول توسط آنتی بادی های حاصله .. ۸۰

فصل چهارم: بحث

۴-۱- بحث ۸۲

فهرست جدول ها

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۱) تاریخچه پیشرفت هیبریدوما..... ۲
جدول ۱-۲) ویژگی‌های گروههای اصلی ایمونوگلوبولین‌ها..... ۶
جدول۱-۳) ویژگیهای زیرکلاسهای ایمونوگلوبولین G انسانی..... ۸
جدول ۱-۴)فعال کننده های پلاسمینوژن ۳۲
جدول ۱-۵) عوامل ترومبولیتیک درمانی ۳۳
جدول ۱-۶) مهار کننده های پلاسمینوژن..... ۳۷
جدول۲-۱) تهیه ۱۲ میلی‌لیتر محلول ژل پایین با غلظتهای مختلف ۵۶
جدول۲-۲) تهیه محلول ژل بالا ۵۷
جدول ۲-۳) محاسبه سرعت حل لخته ۶۰
جدول 2-4) سنجش کیفی اثر آنتی بادی ها بر زمان حل لخته ۶۱
جدول 2-5) سنجش کمی اثر آنتی بادی ها بر زمان حل لخته ۶۲
جدول 2-6) بررسی احتمال اتصال آنتی بادی ها به جایگاه فعال t-PA ۶۳
جدول ۳-۱) جذب نوری کلون های ایجاد شده در ۴۵۰ نانومتر ۷۱
جدول ۳-۲) مطالعه اثر محیط اسیدی بر پایداری و حفظ فعالیت آنتی بادی های حاصله ۷۳

فهرست عکس ها و نمودار ها

عنوان **صفحه**

شکل۱-۱) خصوصیات کلی ساختار آنتی‌بادی ها.....۵
شکل ۱-۲) اجزای سیستم فیبرینولیز ۱۳
شکل ۱-۳) فعال شدن پلاسمینوژن توسط t-PA در سطح لخته ۱۵
شکل ۱-۴) ساختمان مولکول پلاسمینوژن ۱۸
شکل۱- ۵) دومین های موجود در t-PA ۲۴
شکل۱-۶) خفاش خون آشام ۳۱
شکل ۳-۱)شمایی از سلول های sp2/0 در کشت ۶۷
شکل ۳-۲)عکس میکروسکوپی از سلول های ماکروفاژ ۶۸
شکل ۳-۳)مشاهده سلول ها در زمان های مختلف پس از فیوژن.....۷۰
شکل ۳-۴) نحوه تزریق درون صفاقی به موش ۷۳
شکل ۳-۵) SDS-PAGE نمونه ها ۷۵
نمودار۳-۱) تیتر آنتی بادی های موجود در سرم موش های ایمونیزه.....۶۶
نمودار ۳-۲) بررسی واکنش متقاطع میان آنتی بادی های حاصله و مولکول های مشابه ۷۶
نمودار ۳-۳) مطالعه کمی اثر آنتی بادی های حاصله بر فیبرینولیز ۷۸
نمودار ۳-۴) مطالعه اثر آنتی بادی ها بر واکنش t-PA و سوبسترای کروموژنیک آنزیم ۷۹
نمودار ۳-۵) اثر اتصال بیوتین بر کارایی شناسایی t-PA توسط آنتی بادیها ۸۰
نمودار ۳-۶) احتمال شناسایی t-PA در حالت محلول توسط آنتی بادی های تولید شده ۸۰

فصل اول

مقدمه و مروری بر مطالعات انجام شده

۱-۱- آنتی بادی ها

آنتی بادی ها از دیرباز کاربردهای وسیعی داشته اند و به عنوان ابزارهایی در جهت تشخیص ،تخلیص و در نهایت به عنوان فاکتورهای درمانی به کار گرفته شده اند.این مولکول ها قادرند با قدرت اتصالی بالا به انواع مختلفی از ترکیبات بیولوژیکی مانند کربوهیدرات ها، پروتئین ها، متابولیت‌های حد واسط ساده ، لیپیدها، اسید های نوکلئیک و پپتید ها متصل شوند و آنها را شناسایی کنند [۳-۱] .

آنتی بادیها ، پروتئین های اختصاصی هستند که بوسیله لنفوسیت های *B* تولید شده و بطور اختصاصی به مواد بیگانه متصل می شوند. وقتی لنفوسیت های *B* در بدن تحریک شوند وارد مراحل تکثیر (*Proliferation*) ، تمایز (*Differentiation*) و بلوغ (*Maturation*) می شوند [۴].

سرم خون شامل مجموعه ای از آنتی بادیهای متفاوت می باشند که توسط کلون های مختلف تولید شده ، و باعث می شوند که آنتی بادیهای موجود در کل سرم ، پلی کلونال باشند .

بدنبال اعلام نظریه انتخاب کلون «*Clonal Selection*» بوسیله *Talmage Jerne & Burnet (1950)* و *Lederberg* مبنی بر این که هر لنفوسیت از قبل برای ساخت فقط یک نوع آنتی بادی اختصاصی که در سطح آن بارز می شود ، تخصص می یابد ، روزنه امیدی برای محققین در یافتن آنتی بادی هایی که به طور اختصاصی تنها یک اپی توپ را شناسایی کنند (آنتی بادی های منوکلونال) گشوده شد .

لنفوسیت های *B* در مقابل آنتی ژن ارائه شده به آن ها در بدن بصورت کلونی تکثیر می یابند . بنابراین ، کشت آن بصورت *in vitro* می تواند تامین کننده نیاز به آنتی بادی مربوطه باشد ولی به دلیل عمر کوتاه ، امکان رشد مداوم این سلول ها در خارج از بدن وجود ندارد .

تا این که نتیجه یک سلسله تحقیقات (جدول ۱) منجر به ابداع جنجالی و انقلابی *Milstein & Kohler* در سال ۱۹۸۵ گردید [۵] . آن ها با پیوند لنفوسیت های حیوان ایمونیزه شده با آنتی ژن هدف با رده

ای از سلول های پایدار با رشد مداوم (میلوما) ، هیبریدی بدست آوردند که خصوصیت تولید آنتی بادی اختصاصی بر ضد آنتی ژن مورد نظر را از لنفوسیت ، و پایداری و رشد مداوم را از میلوما به ارث برده بود (هیبریدوما) [۶]. به این ترتیب آنتی بادی منوکلونال که خود زمینه ساز تحقیقات گسترده ای شده و جایزه نوبل را برای محققین مزبور به ارمغان آورد ، صدرنشین محافل علمی جهان پزشکی و بیولوژی گشت .

جدول ۱-۱) تاریخچه پیشرفت هیبریدوما

1962	*Potter & Boyce*	انتقال تومورهای میلومائی در میزبان موشی
1973	*Cotton & Milstein*	گزارش ادغام دو سلول ترشح کننده ایمونوگلوبولین ، میلوما و لنفوسیت و تولید هیبریدی با ترشح هر دو ایمونوگلوبولین
1975	*Kohler & Milstein*	گزارش ادغام سلول های طحال موش ایمن شده با میلومای موشی و تولید هیبرید ترشح کننده آنتی بادی ضد آنتی ژن مورد نظر (هیبریدوما)
1980	*Oissen &Kaplan*	ادغام سلول طحالی انسان با میلومای انسانی برای تولید هیبریدومای انسانی – انسانی
1980	*Croce et al*	ادغام لنفوسیت انسانی با سلول های خون محیطی ` *Subacuta Sclerosing PanencepH alitis* برای ایجاد هیبریدومای انسانی – انسانی

استفاده از فعال کننده های پلاسمینوژن (*PA*) در بیمارانی که دچار ترومبوز سرخرگ های کرونر ، انسداد سرخرگ های محیطی و ترومبوز سیستم سیاهرگی هستند با بهبود عوارض بیمار همراه بوده است . بر اساس مطالعات آنژیوگرافی [۱۱-۷] ، ترومبولیز تحت شرایطی محدود، جایگاهی در درمان فوری سکته های ایسکمیک[1] پیدا کرده است [۱۴-۱۲].

در حال حاضر، استفاده از فعال کننده بافتی پلاسمینوژن نوترکیب (*rt-PA*) در آمریکا و بسیاری از کشورهای دیگر ، برای درمان سکته های انسدادی در طی ۳ ساعت از شروع عوارض بیماری، تایید شده است [۱۵] .

از لحاظ کلینیکی ، وجود فیبرین اضافی در درون رگ ها و یا بیش از حد بودن تجزیه فیبرین ممکن است به ترتیب منجر به ترومبوز و خونریزی گردد . فعال کننده های پلاسمینوژن به طور بالینی برای حل لخته های ایجاد شده استفاده می شوند ، اما با این حال تمامی موادی که موجب پدید آمدن پلاسمین می گردند این پتانسیل را دارند که خطر ابتلا به خونریزی را افزایش دهند .

۱-۲- خصوصیات کلی ساختار آنتی‌بادیها

آنتی‌بادیها یا ایمونوگلوبولین‌ها, خانواده‌ای از گلیکوپروتئین‌ها با ساختمان مشابه می‌باشند که بصورت غشایی یا ترشحی توسط لنفوسیتهای *B* تولید می‌شوند.

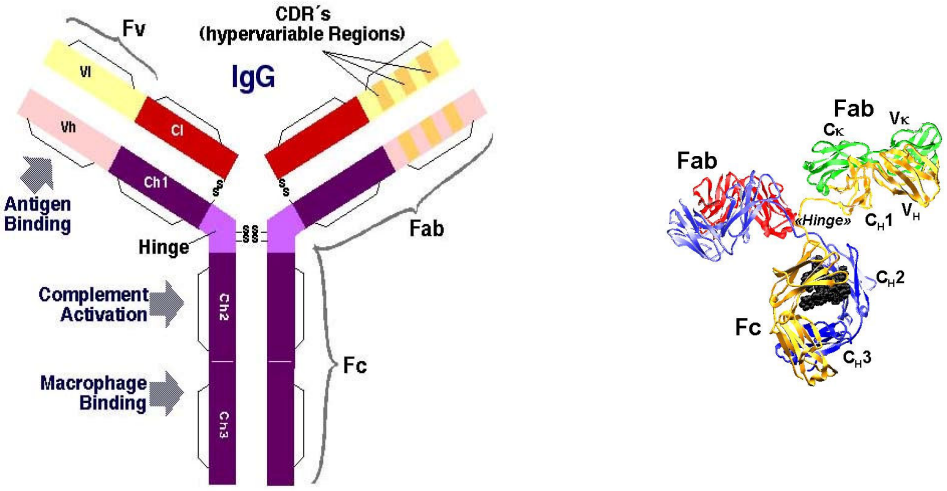
همه مولکولهای آنتی‌بادی ساختار پایه یکسانی دارند اما بر اساس محل اتصال به آنتی‌ژن، تنوع قابل ملاحظه‌ای نشان می‌دهند. در هر فرد $۱۰^{۷}$ تا $۱۰^{۹}$ آنتی بادی مختلف وجود دارد که هر کدام توالی اسیدهای آمینه متفاوتی در جایگاه اتصال به آنتی‌ژن اختصاصی خود دارند.

[1] . Ischemic Stroke

هر آنتی بادی دارای بنیاد ساختمانی متقارن، متشکل از دو زنجیره سبک (۲۵ کیلودالتون) و دو زنجیره سنگین (۷۵-۵۵ کیلودالتون) مشابه می‌باشد که با پیوندهای دی سولفیدی بین زنجیره‌ای بهم متصل هستند. زنجیره‌های سبک و سنگین هر دو حاوی اجتماعی از واحدهای تکرار شونده و مشابه ۱۱۰ اسید آمینه‌ای هستند که ترتیب توالی آن تقریباً ثابت است که به آن دومین *(Domain)* ایمونوگلوبولینی گفته می‌شود.

هر دو زنجیره سبک و سنگین دارای نواحی متغیر در پایانه آمینی *(N-Terminal)* و نواحی ثابت در پایانه کربوکسیلی *(C-Terminal)* می‌باشند. زنجیره سنگین دارای یک دمین در ناحیه متغیر و سه یا چهار دمین در ناحیه ثابت و زنجیره سبک نیز دارای یک دمین در ناحیه متغیر و فقط یک دمین در ناحیه ثابت است. علت نامگذاری نواحی متغیر, وجود نواحی با توالی اسیدهای آمینه‌ای متفاوت در مولکولهای مختلف آنتی‌بادی می‌باشد که شاخص خوبی برای تشخیص آنتی بادی‌های تولید شده از کلونهای متفاوت سلولهای B می‌باشد.

نواحی متغیر در زنجیره‌های سبک و سنگین در مجاورت یکدیگر قرار گرفته و جایگاه اتصال به آنتی‌ژن را تشکیل می‌دهند. نواحی ثابت زنجیره‌های سنگین با مولکولها و سلولهای اجرایی دیگر سیستم ایمنی, واکنش می‌دهند و بنابراین می‌توان گفت که عمل شناسایی آنتی‌ژن توسط نواحی متغیر *(V)* و عمل اجرایی مولکولهای آنتی‌بادی از طریق نواحی ثابت *(C)* صورت می‌گیرد(شکل۱).



شکل۱-۱) خصوصیات کلی ساختار آنتی‌بادی ها

۱-۲-۱- ساختار نواحی متغیر و چگونگی اتصال به آنتی‌ژن

نواحی متغیر زنجیره سبک و سنگین دارای سه ناحیه بسیار متغیر *(hyper variable segment)* می‌باشند که هر یک شامل ۱۰ اسید آمینه است که در بین نواحی ثابت‌تر داربست *(Frame work)* ناحیه متغیر جای می‌گیرند.

از آنجایی که این توالی ها ساختاری مکمل با شکل فضایی هر آنتی‌ژن را می‌سازند به آنها نواحی تعیین کننده شکل مکمل *CDRs (Complementarity Determining Regions)* نیز می‌گویند که از پایانه آمینی به ترتیب شامل *CDR1*، *CDR2*، *CDR3* می‌باشند و نواحی *CDR3* متغیرترین آنهاست. مطالعات کریستالوگرافی نشان می‌دهد که نواحی *CDR* حلقه‌هایی هستند که در سطح مولکول آنتی‌بادی قرار می‌گیرند و برای واکنش با آنتی‌ژن در دسترس هستند.

اختلاف توالی اسیدهای آمینه در قطعه‌های *CDR* آنتی‌بادیهای مختلف، منجر به پدید آمدن ساختارهای شیمیایی منحصر به فردی در سطح حلقه‌ها شده و باعث اختصاصی بودن آنتی‌بادی ها برای اتصال به آنتی‌ژن می‌گردد.

اتصال مولکول های آنتی‌بادی به آنتی‌ژن بطور اساسی مربوط به فعالیت نواحی بسیار متغیر زنجیره‌های سبک و سنگین است. بررسی های کریستالوگرافی حاصل از کمپلکس‌های آنتی‌بادی-آنتی‌ژن نشان می‌دهد که اسیدهای آمینه نواحی بسیار متغیر، پیوندهای فراوانی را با آنتی‌ژنها برقرار می‌سازند و در این بین CDR_3 بیشترین اتصال را با آنتی‌ژن بر قرار می‌سازد. علاوه بر آن بنیانهای اسید آمینه نواحی داربستی نیز ممکن است به آنتی‌ژن اتصال یابند.

۱-۲-۲- ویژگی‌های نواحی ثابت و نقش آنها در فعالیتهای عملکردی

آنتی‌بادیها بر اساس تفاوت در ساختار اولیه، میزان کربوهیدرات و خواص آنتی‌ژنیک زنجیره‌های سنگین‌شان به پنج ایزوتایپ طبقه‌بندی می‌شوند که عبارتند از: IgA ، IgG ، IgD , IgM و IgE (جدول ۲).

جدول ۱-۲) ویژگی‌های گروههای اصلی ایمونوگلوبولین‌ها

	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
نام زنجیره سنگین	γ منومر	α منومر- دایمر	μ پنتامر	δ منومر	ε منومر
زیر کلاسها	$\gamma 1-4$	$\alpha 1-2$	-	-	-
وزن مولکولی (کیلودالتون)	۱۵۰	۱۶۰	۹۵۰	۱۸۰	۱۹۰
درصد کربوهیدرات	۳	۷/۵	۱۲	۱۲	۱۲
سطح سرمی *(mg/ml)*	~ ۱۰	~۲	~۱/۲	~۰,۰۴	~۳×۱۰۴
نیمه عمر (روز)	۲۳	۵-۶	۵	۲/۸	۲/۶

عبور از جفت	+	-	-	-	-
اتصال به سلولها	ماکروفاژها	-	-	-	ماست سل, بازوفیل

زنجیره‌های سبک تنها دو ایزوتایپ بنامهای کاپا (κ) و لامبدا (λ) دارند. در انسان ایزوتایپهای *IgA* و *IgG* به زیر کلاسهایی با شباهت بسیار بنامهای *IgA1*، *IgA2*، *IgG1*، *IgG2*، *IgG3* و *IgG4* تقسیم می‌شوند.

ایزوتایپها و زیرگروههای آنتی‌بادیهای مختلف، فعالیتهای عملکردی متفاوتی دارند زیرا اغلب فعالیتهای عملکردی با واسطه آنتی‌بادیها در اثر اتصال نواحی ثابت *(C)* زنجیره سنگین به گیرنده‌های سطح سلول یا ماکرومولکولهایی از قبیل پروتئینهای کمپلمان ایجاد می‌شوند[۱۷-۱۶].

۱-۳-ایمونوگلوبولین G (IgG)

IgG دسته اصلی ایمونوگلوبولین‌ها می‌باشد. تقریباً سه چهارم ایمونوگلوبولین‌های سرم در این دسته قرار دارند. *IgG* شامل دو زنجیره سنگین گاما (γ) و دو زنجیره سبک می‌باشد و دارای دو جایگاه اتصال به آنتی‌ژن است. بر اساس الکتروفورز در شرایط قلیایی، *IgG* آهسته‌تر از سایر پروتئین‌های سرم حرکت می‌کند و در حوزه گاما گلوبولین‌های سرم قرار می‌گیرد. هر مولکول *IgG* دارای سه درصد ترکیبات قندی است و بر خلاف سایر ایمونوگلوبولین‌ها می‌تواند از جفت عبور کرده و به محیط خارج رگی نفوذ کند.

پس از دوره ایمونیزاسیون، لنفوسیتهای *B* غالباً مولکول *IgG* را ترشح می‌کنند. در انسان چهار زیرکلاس از *IgG* وجود دارند که در ساختار زنجیره سنگین متفاوتند(جدول۳).