

تهیه و خالص سازی آنتی بادی پلی کلونال بر علیه انسولین انسانی

حسن روان سالار *

دکتر جلیل توکل افشاری †

دکتر عبدالرضا وارسته †

دکتر سید محمد سیدین †

هورمون انسولین پلی پپتیدی است دو زنجیره‌ای با وزن مولکولی ۵/۷ کیلودالتون و دارای ۵۱ اسید آمینه می‌باشد. این دو زنجیره توسط پیوندهای دی سولفیدی به یکدیگر متصل می‌شوند. یکی از مهمترین بیماری‌های مرتبط با انسولین بیماری دیابت می‌باشد که در آن سلول‌ها قادر به جذب گلوکز نبوده و میزان گلوکز خون افزایش یافته و بافت‌های بدن با کمبود انرژی مواجه می‌شوند. این عمل باعث ایجاد عوارض حاد و دیررس متعددی می‌گردد. در حال حاضر جهت اندازه‌گیری این هورمون از روش RLA استفاده می‌شود که این کیت‌ها نیز از خارج وارد می‌شود. هدف از این تحقیق، در نهایت طراحی کیت الیزا جهت اندازه‌گیری انسولین می‌باشد. اولین گام جهت طراحی این کیت نیز تهیه و تخلیص آنتی انسولین انسانی است. که طی مراحل زیر انجام گرفت. جهت تولید آنتی بادی از خوکچه‌های هندی به عنوان میزبان استفاده شد. پس از ایمونیزاسیون این حیوانات با انسولین نو ترکیب انسانی به همراه ادجوانت، از آنها خونگیری به عمل آمد و سرم آنها نیز جداسازی گردید. جهت ارزیابی و تشخیص آنتی انسولین تولید شده در حیوان از سه روش RIA, Dot blot و DID استفاده شد. پس از اطمینان از وجود آنتی انسولین در سرم، توسط دو مرحله تخلیص یعنی سولفات آمونیوم اشباع و کروماتوگرافی تعویض یونی، مولکول‌های IgG جداسازی و تخلیص گردید. جهت ارزیابی میزان خلوص آنتی بادی از تکنیک SDS - PAGE استفاده شد. در نهایت جهت اطمینان از عدم وجود باندهای غیر اختصاصی از تکنیک وسترن بلات استفاده شد که آنتی بادی‌های خالص شده از درجه خلوص بالایی برخوردار بود و باندهای غیر اختصاصی مشاهده نشد.

واژه‌های کلیدی: انسولین؛ دیابت؛ خوکچه هندی؛ آنتی انسولین؛ کروماتوگرافی تعویض یونی؛ DID, Blot, SDS- PAGE

* کارشناس ارشد ایمونولوژی

† استادیار ایمونولوژی و عضو هیات علمی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

* دکترای دامپزشکی - مرکز تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی مشهد

مقدمه

دیابت یکی از بیماری‌های شایع جهان به شمار می‌آید و با میزان بالای مرگ و میر، در حدود ۵۴ هزار نفر در سال، هفتمین علت مرگ و میر در کشور آمریکا محسوب می‌گردد (۹ و ۱۰). در صورت تشخیص و درمان بموقع این بیماری، ابتلا به عوارض دیررس ناشی از آن که شامل کوری، قطع اندام، برداشتن کلیه و دیگر عوارض می‌باشد به حداقل خواهد رسید. همچنین تشخیص نوع دیابت نیز راه را برای درمان هموارتر خواهد نمود.

یکی از مراحل تشخیص این بیماری، اندازه‌گیری سطح انسولین خون بیماران می‌باشد. از روش‌های مرسوم و دقیق اندازه‌گیری انسولین نیز روش رادیو ایمنواسی (RIA) و الیزا (ELISA) می‌باشد که در حال حاضر، این کیت‌ها از خارج خریداری و وارد ایران می‌شود و این مسأله موجب بروز مشکلاتی می‌شود. با ساخت و تولید این کیت‌ها در داخل کشور، بسیاری از مشکلات مرتفع خواهد شد. لذا اولین و مهم‌ترین گام در ساخت این کیت‌ها، تولید آنتی‌بادی علیه انسولین انسانی می‌باشد. هدف از این تحقیق نیز تهیه و خالص سازی این آنتی‌بادی می‌باشد به نحوی که بتوان از آن برای تهیه کیت استفاده نمود.

روش پژوهش

تانک الکتروفوز عمودی، پاور سوپلای و گرادیان میکسر مورد استفاده ساخت شرکت پایا پژوهش توس (ایران)، سانتریفوژ ساخت شرکت اونیورسال (ایران) و انکوباتور ساخت شرکت ایران خودساز از جمله دستگاه‌های مورد نیاز بود. جهت اندازه‌گیری جذب پروتئین‌ها از اسپکتروفتومتر اولتراویوله (UV) ساخت شرکت سکومام فرانسه استفاده شد. جهت تولید آنتی‌بادی، آنتی‌ژن مورد استفاده انسولین نوترکیب انسانی محصول شرکت بورینگر مانهایم به همراه ادجوانت کامل فروند محصول شرکت سیگما (آمریکا) و همچنین ادجوانت ناقص فروند محصول شرکت بیوژن (ایران) استفاده شد.

استاندارد وزن مولکولی، چهار کلرو - یک نفتول، کاغذ نیتروسولوز و کیسه دیالیز محصول شرکت سیگما (آمریکا)، آکریل آمید و بیس آکریل آمید، تریس، گلیسین، سولفات آمونیوم، سدیم آزید و همچنین کیت اندازه‌گیری پروتئین به روش برادفورد محصول شرکت بیوژن (ایران) بود. ایزوبوتانول، متانول، آب اکسیژنه، کوماسی بلو $\text{NaH}_2\text{PO}_4, \text{Na}_2\text{HPO}_4, \text{KCl}, \text{NaCl}, \text{G-250}$ و SDS محصول شرکت مرک (آلمان) بود. همچنین کیت اندازه‌گیری انسولین به روش IRMA نیز محصول شرکت بیوسورس (آمریکا) بود. روش کار شامل چند مرحله به شرح ذیل می‌باشد:

الف) ایمونیزاسیون و تولید آنتی‌بادی: در این تحقیق از شش رأس خوکچه هندی به وزن تقریبی ۱/۵-۲ کیلوگرم به عنوان میزبان استفاده شد. آنتی‌ژن مصرفی نیز انسولین نوترکیب انسانی محصول شرکت بورینگر مانهایم بود. تزریق آنتی‌ژن در سه نوبت به فواصل زمانی سه هفته از یکدیگر و بصورت عضلانی انجام شد. غلظت انسولین در تزریق نوبت اول 1.5 mg/ml معادل 40 IU/ml بود که به همراه ادجوانت کامل فروند تزریق شد. در دو مرحله بعدی غلظت انسولین 1mg/ml معادل 26 IU/ml بود که به همراه ادجوانت ناقص فروند تزریق شد. همچنین به منظور بررسی آنتی‌بادی تولید شده، یک روز قبل از هر تزریق خونگیری انجام می‌شد و سه روز بعد از تزریق نوبت سوم خونگیری نهایی صورت گرفت.

ب) تشخیص آنتی‌بادی: به منظور تشخیص آنتی‌بادی تولید شده در سرم خوکچه‌ها از سه روش استفاده شد. اولین روش آزمایش DID به روش اشترو لونی (البته با کمی تغییرات) بود. در این روش از آگارز ۱/۵ درصد در بافر باریتال $\text{PH} = ۸/۶$

و قدرت یونی ۰/۰۵ مولار) استفاده شد. آگارز درون پلیت های میکروبیولوژی به ارتفاع تقریبی ۴ میلی متر ریخته شد. حفره های ایجاد شده در ژل به اندازه ای بود که گنجایش حدود ۲۰۰ میکرولیتر از آنتی ژن و یا آنتی بادی را داشته باشد. بهترین غلظت انسولین در این روش نیز ۲۰۰ $\mu\text{g/ml}$ معادل ۵,۲ IU/ml بود. انسولین در حفره مرکزی و سرم های مراحل مختلف خونگیری نیز در حفرات اطراف ریخته شد. جهت پدیدار شدن خطوط رسوبی، ابتدا پلیت ها را مدت ۴۸ ساعت در اتو ۳۷ درجه سانتی گراد و در شرایط مرطوب قرار داده شد و سپس مدت ۴ روز در حرارت ۴ درجه سانتی گراد و پس از طی این مراحل خطوط رسوبی باریک و نسبتاً واضحی پدیدار شد. سپس جهت مشاهده بهتر خطوط رسوبی و همچنین امکان نگهداری ژل، به روش کوماسی برلیانت بلو رنگ آمیزی گردید.

آزمایش DOT-BLOTTING: یکی دیگر از روش های مورد استفاده جهت تشخیص آنتی انسولین در سرم خوکچه ها استفاده از تکنیک بلاتینگ بود. در این روش، پس از لکه گذاری کاغذ نیترو سلولز بوسیله انسولین، محل های خالی نیتروسلولز توسط محلول یک درصد BSA، اشباع و پس از شستشو، نیتروسلولز در مجاورت سرم خوکچه ها قرار داده شد که پس از طی آنکو باسیون و شستشو، آنتی بادی اختصاصی کونزوگه (ANTI - G.P-HRP) اضافه شد و در نهایت با اضافه کردن محلول سوپسترا (آب اکسیژنه) و واکنشگر رنگزا (چهار کلرو یک نفتول) ردیابی انجام شد.

آزمایش رادیو ایمنواسی (RIA): جهت مطالعه و ردیابی دقیق تر آنتی انسولین موجود در سرم خوکچه ها از روش استاندارد RIA نیز استفاده شد. در این روش از کیت بیوسورس استفاده شد که یک روش رقابتی محسوب می شد. بر اساس این روش، ابتدا مقدار مشخصی انسولین و آنتی انسولین های کونزوگه و همچنین سرم خوکچه به داخل لوله هایی که قبلاً توسط آنتی انسولین پوشیده شده اند ریخته شد، پس از آنکو باسیون و شستشوی لوله ها توسط دستگاه گاما کانتیر شمارش گردید. در این آزمایش کاهش شمارش، نشان دهنده افزایش میزان آنتی انسولین در سرم می باشد.

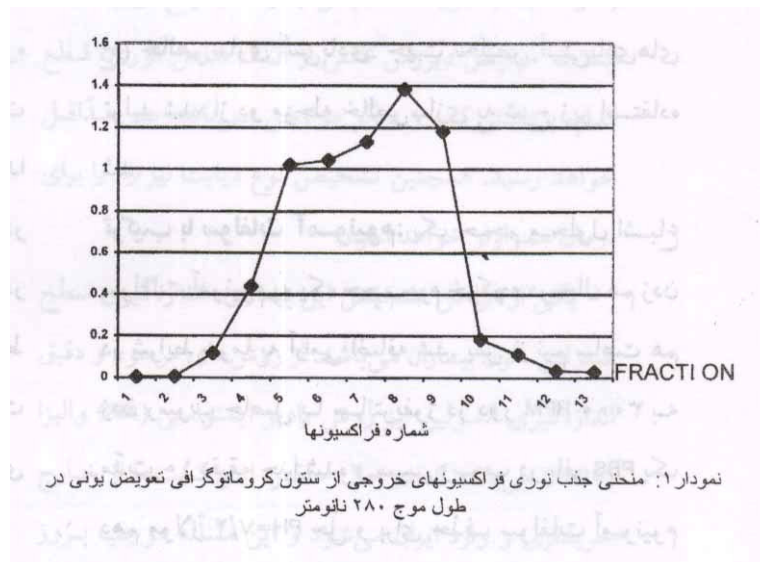
ج) خالص سازی آنتی بادی: جهت تخلیص آنتی بادی های تولید شده از دو مرحله خالص سازی به شرح زیر استفاده شد.

توکیب با سولفات آمونیوم: یک حجم محلول اشباع سولفات آمونیوم به یک حجم سرم خوکچه در حال هم زدن در شرایط سرما به آرامی اضافه شد. پس از نیم ساعت هم زدن رسوب حاصل با سانتریفوژ در دور ۳۰۰۰ RPM به مدت ۱۰ دقیقه جدا شده و سپس رسوب در بافر PBS یک دهم مولار $\text{pH} = 7/4$ حل و برای حذف سولفات آمونیوم باقیمانده در برابر همین بافر دیالیز شد.

کروماتوگرافی تعویض یونی: نمونه تخلیص شده به روش فو، پس از دیالیز با بافر آغازگر به روش کروماتوگرافی تعویض یونی نیز خالص سازی گردید. برای این منظور، از بستر DEAE - سلولز استفاده شد. در این روش، نسبت سرم به حجم ژل ۱۲۰ و بافر آغازگر فسفات سدیم ۲۰ میلی مولار با $\text{pH} = 7/5$ بود. سرعت جریان نیز ۰/۲ میلی لیتر در دقیقه بود. در این روش با افزودن بافر آغازگر به ستون حاوی نمونه، تمامی پروتئین ها جذب ستون شده و فقط مولکول های IgG از ستون خارج می شوند. پس از جمع آوری فراکسیون های خارج شده از ستون و قرائت جذب نوری فراکسیون ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر، نمودار جذب در برابر حجم فراکسیون ها رسم گردید.

سپس فراکسیون های مربوط به پیک نمودار با هم مخلوط و برای بررسی میزان خلوص آنتی بادی بدست آمده در فریزر ۱۸- درجه سانتی گراد ذخیره گردید.

د) تعیین خلوص آنتی بادی: برای بررسی خلوص نمونه حاصل از مراحل مختلف تخلیص از تکنیک SDS-PAGE استفاده شد. در این روش، ابتدا از ژل ۱۲/۵ درصد تحت شرایط دنا توره کننده و سیستم ناپیوسته انجام و ژل حاصل



باکوماسی برلیانت بلو G250 رنگ آمیزی شد. همچنین برای تعیین وزن مولکولی باندهای حاصل از نمونه تخلیص شده، از استاندارد وزن مولکولی استفاده شد. جهت تفکیک بهتر باندهای سنگین تر از تکنیک SDS-PAGE به روش گرایان غلظت استفاده شد. در این روش، غلظت ژل در ابتدای مسیر ۵ درصد بود و به تدریج غلظت آن افزایش می یابد به طوری که غلظت آن در انتهای مسیر حدود ۱۵ درصد می باشد. الکتروفورز تحت ولتاژ ثابت ۱۲۰ ولت در ژل تغلیظ کننده و ۱۰۰ ولت در ژل جداکننده انجام شد.

ه) بررسی وجود یا عدم وجود باندهای غیر اختصاصی:

جهت این بررسی از تکنیک وسترن بلا تینگ استفاده شد. برای انجام این تست نیاز به آنتی انسولین کونژوگه شده بود. لذا در این تحقیق، ابتدا آنتی انسولین را به روش ویلسون و ناگان (۱۹۷۸) (۱) با HRPO کونژوگه نموده و سپس وسترن بلا تینگ انجام شد. برای انجام این آزمایش، ابتدا نمونه سرم حاوی انسولین و همچنین سرم فاقد انسولین و همچنین انسولین نوترکیب انسانی تحت SDS - PAGE قرار گرفت. باندهای حاصل با روش انتقال مرطوب در ولتاژ ثابت ۴۵ ولت مدت یک شب (۱۲ ساعت) به غشاء نیتروسولوز منتقل شد. پس از اشباع محلهای نیتروسولوز با محلول یک درصد BSA، نمونه آنتی انسولین خالص شده و کونژوگه شده با HRPO اضافه شد و در نهایت با اضافه کردن سوپسترا (آب اکسیژنه) و واکنشگر رنگزا (چهار کلرویک نفتول)، از نظر وجود باندهای غیر اختصاصی بررسی شد.

یافته‌ها

همانگونه که توضیح داده شد جهت تشخیص آنتی بادی تولید شده در خوکیچه‌ها از سه روش استفاده شد که نتایج حاصل از آن به شرح زیر می‌باشد.

۱ - آزمایش DID: تصویر شماره ۱، نتایج حاصل از آزمایش DID را نشان می‌دهد. در این روش انسولین با غلظت ۲۰۰ میکروگرم در حفره مرکزی و سرم‌های حاصل از خونگیری نهایی و همچنین نمونه حاصل از گامافرکشن، خط رسوبی واضحی در نزدیکی حفرات کناری مشاهده شد که خط رسوبی حفره‌های سرم حاصل از خونگیری نهایی واضح‌تر از بقیه به نظر می‌رسید.

۲ - آزمایش DOT-BLOT: با توجه به تصویر شماره ۲، در کاغذهایی که در مجاورت سرم حاصل از خونگیری نوبت صفر و همچنین سرم حاصل از خوکیچه کنترل منفی قرار گرفته بودند، رنگی ایجاد نشد که نشان‌دهنده عدم وجود آنتی انسولین در سرم می‌باشد. ولی در کاغذهایی که در مجاورت سرم حاصل از خونگیری نهایی و همچنین محصول بدست آمده از ترکیب با سولفات آمونیوم قرار گرفته بودند، نقاط بنفش رنگی در محل قرار گرفتن قطرات انسولین ایجاد شد که نشان‌دهنده وجود آنتی انسولین در سرم این حیوانات می‌باشد.

۳ - آزمایش RIA: در این آزمایش که به روش رقابتی و در فاز جامد انجام گرفت، کاهش CPM نشان‌دهنده افزایش آنتی بادی می‌باشد. طبق جدول شماره ۱ و نمودار شماره ۲، در خونگیری نوبت نهایی کمترین شمارش و در نتیجه بیشترین تولید آنتی انسولین قابل مشاهده می‌باشد.

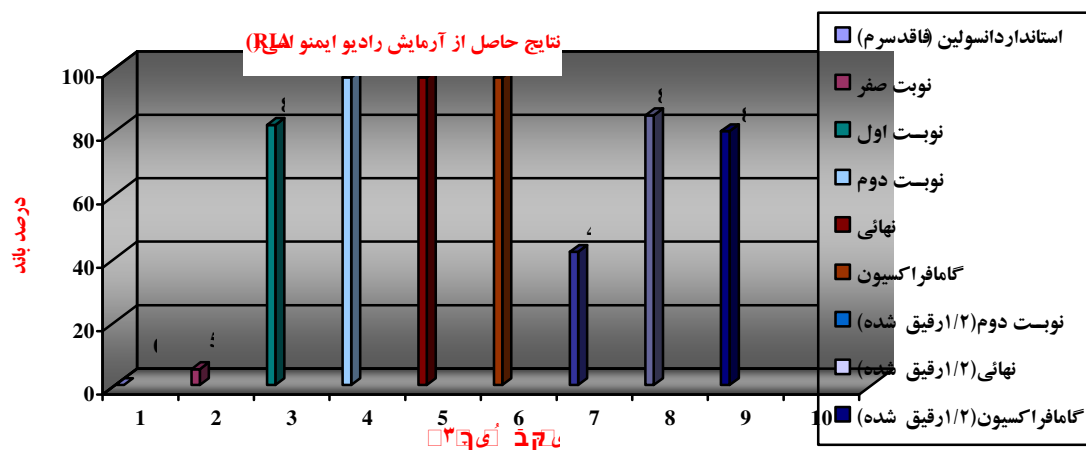
۴ - آزمایش SDS-PAGE: این آزمایش برای بررسی خلوص نمونه‌های حاصل از مراحل مختلف تخلیص انجام شد و همانگونه که در تصویر شماره ۳ مشاهده می‌گردد، در ستون شماره یک که مربوط به سرم خوکیچه قبل از تخلیص می‌باشد، باندهای اضافی زیادی مشاهده می‌شود ولی در ستون شماره ۲ که نمونه حاصل از تخلیص به روش سولفات آمونیوم اشباع می‌باشد، باندهای ناخالص کمتر شده است. همچنین در ستون شماره ۳ که مربوط به نمونه تخلیص شده با روش کروماتوگرافی تعویض یونی است فقط دو باند قابل تشخیص می‌باشد که با توجه به استاندارد وزن مولکولی، وزن مولکولی این دو باند حدود ۵۷ و ۲۷ کیلو دالتون و مربوط به زنجیره‌های سنگین و سبک IgG می‌باشد.

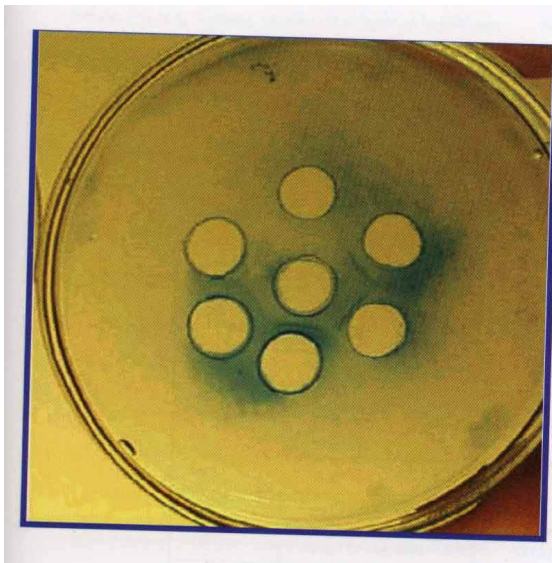
در تصویر شماره ۴ که مربوط به آزمایش SDS-PAGE به روش گرادیان غلظت می‌باشد، باندهای ناخالص ابتدای مسیر کاملاً تفکیک شده‌اند و خلوص آنتی بادی در ستون شماره ۳ کاملاً قابل مشاهده می‌باشد. برای بررسی وجود باندهای غیراختصاصی، آزمایش وسترن بلاتینگ انجام شد. در این آزمایش، پس از انجام SDS-PAGE و انتقال باندهای پلی پپتیدی به غشاء نیتروسولوز، ردیابی با استفاده از آنتی انسولین نشاندار شده با HRPO انجام شد. همانگونه که در تصویر شماره ۶ مشاهده می‌شود، در سرم حاوی انسولین و همچنین نمونه کنترل مثبت در ناحیه ۵/۷ کیلو دالتون، باند مشخصی دیده می‌شود که مربوط به انسولین می‌باشد؛ این باند در سرم فاقد انسولین قابل مشاهده نیست. همچنین در سایر قسمت‌های نیتروسولوز نیز هیچگونه واکنش رنگی مشاهده نمی‌شود. از آنجایی که آنتی بادی کونژوگه شده مورد استفاده، همان آنتی انسولین تخلیص شده می‌باشد. لذا این دو آنتی بادی به طور اختصاصی با باند انسولین واکنش داده ولی با سایر باندهای حاصل از الکتروفورز سرم واکنش نشان نمی‌دهد که دلیل بر عدم وجود واکنش‌های غیراختصاصی می‌باشد.

جدول ۱: نتایج حاصل از آزمایش رادیو ایمنواسی (RIA)

شماره لوله	نوبت خونگیری	شمارش CPM	%CPM	درصد باند
۱	استاندارد انسولین	۳۴۱۷۳	%۱۰۰	٪۰
۲	نوبت صفر	۳۲۴۶۲	%۹۵	٪۵
۳	نوبت اول	۶۲۳۴	%۱۸	٪۸۲
۴	نوبت دوم	۱۰۲۵	%۳	٪۹۷
۵	نوبت نهایی	۱۰۳۲	%۳	٪۹۷
۶	گاما فراکسیون	۱۰۴۸	%۳	٪۹۷
۷	نوبت دوم (۱/۲ رقیق شده)	۱۹۸۲۱	%۵۸	٪۴۲
۸	نهایی (۱/۲ رقیق شده)	۵۱۲۶	%۱۵	٪۸۵
۹	گاما فراکسیون (۱/۲ رقیق شده)	۶۸۳۴	%۲۰	٪۸۰

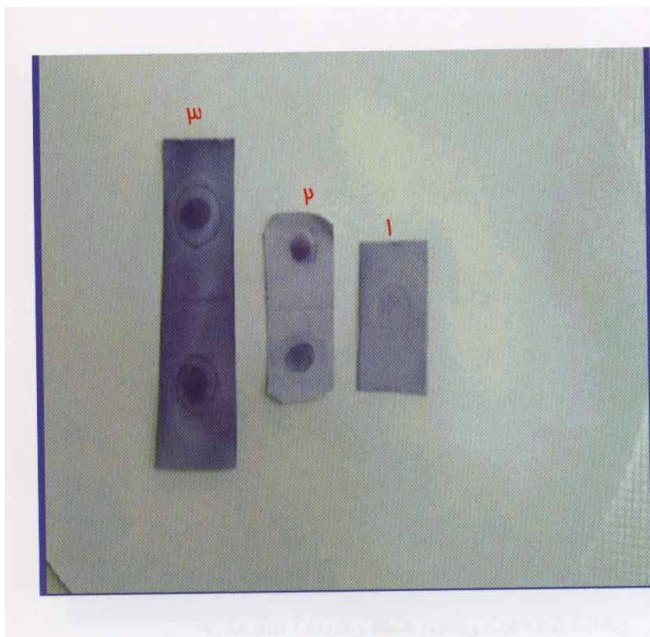
نمودار شماره ۲





تصویر شماره ۱
نتایج حاصل از آزمایش DID

- ۱- سرم حاصل از فونگیری نوبت سوم
- ۲- گاما فراکسیون
- ۳- سرم حاصل از فونگیری نهائی
- ۴- سرم حاصل از فونگیری نهائی (۱/۲ رقیق شده)
- ۵- سرم حاصل از فونگیری نهائی (۱/۴ رقیق شده)



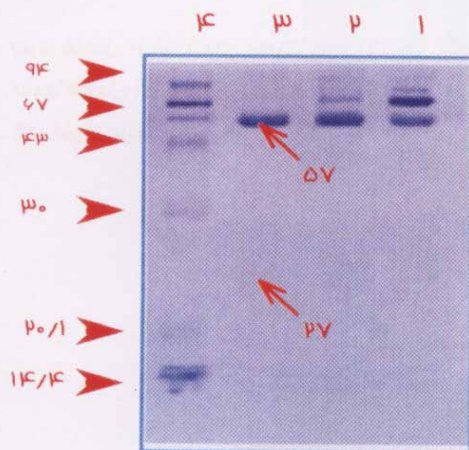
تصویر شماره ۲
نتایج حاصل از آزمایش دات بلات

- ۱- سرم حاصل از فونگیری نوبت صفر (کنترل منفی)
- ۲- سرم حاصل از فونگیری نهائی
- ۳- گاما فراکسیون

نمونه های خون تهیه شده از فوکچه های هندی



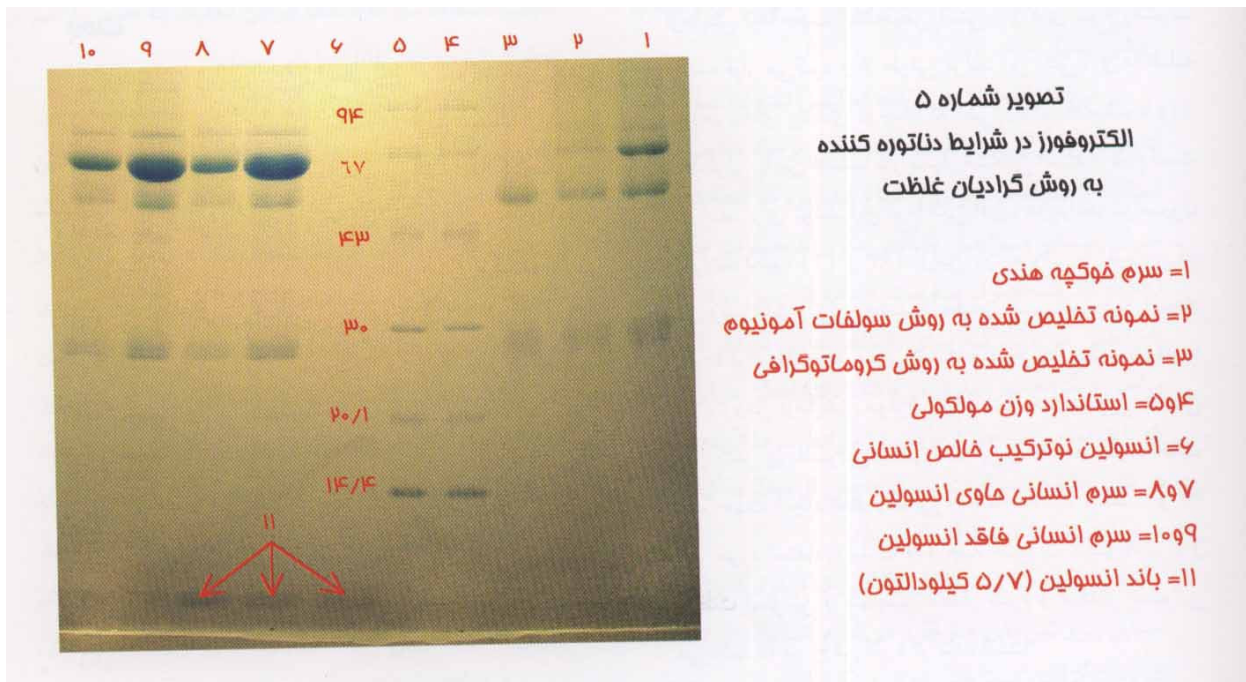
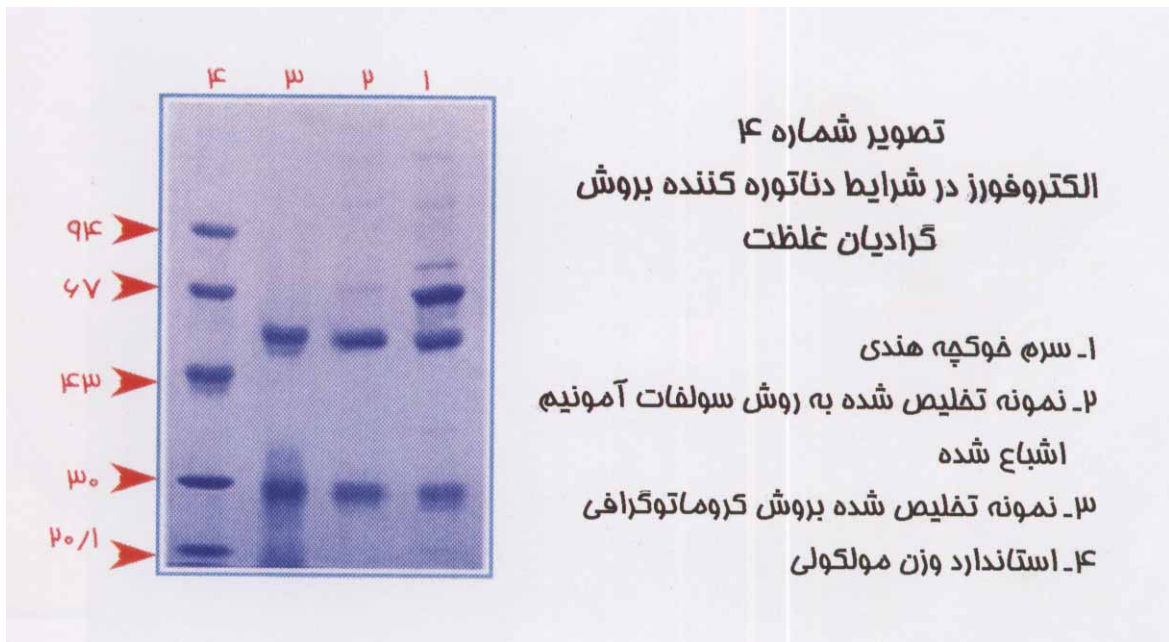
نتایج حاصل از آزمایش الکتروفورز در شرایط دناتوره کننده

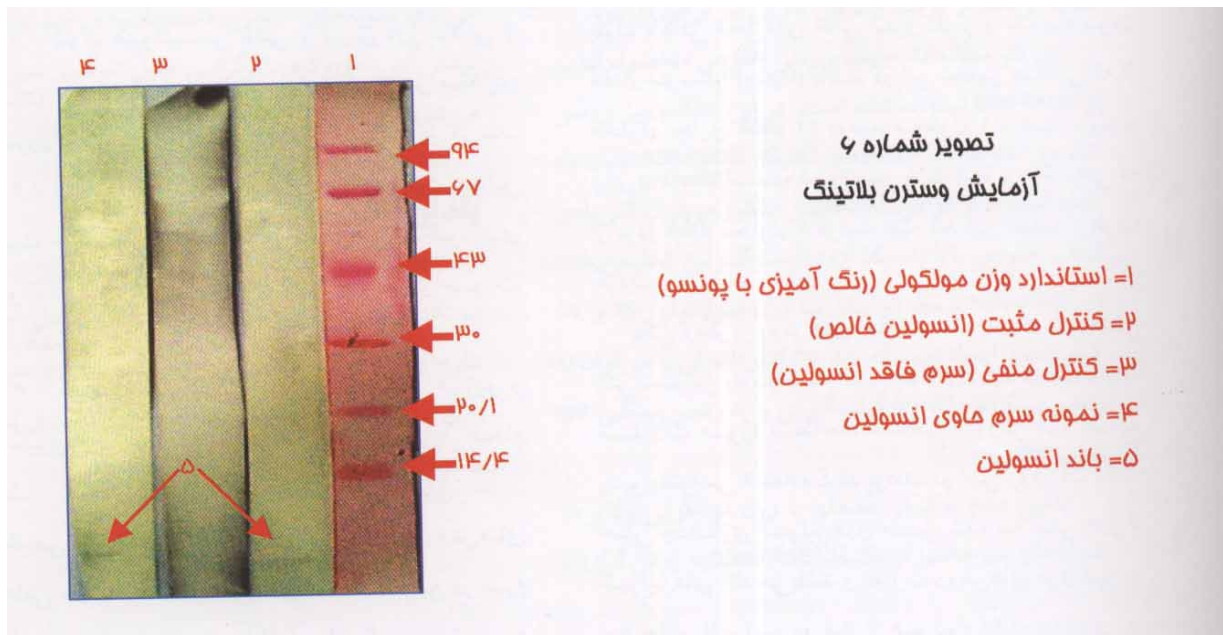


تصویر شماره ۳

الکتروفورز در شرایط دناتوره کننده

- ۱- سرم فوکچه هندی
- ۲- نمونه تفلیص شده به روش سولفات آمونیم اشباع شده
- ۳- نمونه تفلیص شده بروش کروماتو گرافی
- ۴- استاندارد وزن مولکولی





بحث

مطالعات زیادی درباره ایمنی زایی و تولید آنتی بادی علیه انسولین صورت گرفته است (۲). اولین مسأله در تولید آنتی بادی، انتخاب آنتی ژن مناسب می باشد. عامل اصلی در ایمنی زایی انسولین، هترولوگ بودن آن می باشد و مطالعات گذشته اثبات می کند که هورمون های هترولوگ به طور قوی تر، باعث تحریک آنتی بادی می شوند (۳ و ۴) لذا با توجه به هترولوگ بودن انسولین انسانی با نوع خوکچه ای، تحریک تولید آنتی انسولین در این حیوان بالاست. از طرفی بدلیل پایین بودن وزن مولکولی انسولین جهت تحریک سیستم ایمنی و تولید انبوه آنتی بادی استفاده از ادجوانت نیز ضروری به نظر می رسد (۵). همچنین خصوصیات ژنتیکی میزبان نیز یکی از عوامل مؤثر در تولید آنتی بادی می باشد (۶).

در این تحقیق نیز با توجه به موارد فوق، از خوکچه هندی به عنوان میزبان استفاده شد و برای تزریقات و ایمونیزاسیون نیز از ادجوانت کامل فروند در اولین تزریق و ادجوانت ناقص فروند در تزریقات یادآور استفاده شد که نتایج قابل قبولی نیز حاصل شد. مشکلات مرحله ایمونیزاسیون و خونگیری در این حیوانات به قرار زیر بود.

۱ - شوک هیپوگلیسمی ناشی از تزریق دوز بالایی از انسولین، جهت رفع این مشکل، قبل از هر تزریق مقداری دکستروز هیپرتونیک به صورت داخل جلدی تزریق می شد.

۲ - آسیب به عضله قلب در حین خونگیری بدلیل فعالیت حیوان، جهت پیشگیری از آن، قبل از خونگیری حیوان توسط اتر بیهوش و سپس خونگیری صورت می گرفت.

۳ - جهت جلوگیری از عفونت در محل تزریق و خونگیری، این عملیات در شرایط کاملاً استریل انجام می‌شد.

تشخیص آنتی بادی: از گذشته تا به امروز از روش‌های مختلفی جهت تشخیص آنتی بادی علیه انسولین در سرم استفاده شده است (۷، ۸ و ۱۱) که ما در این تحقیق از سه روش RIA, DOT, BLOT, DID استفاده نمودیم. از آنجا که آزمایش DID جهت تشخیص آنتی بادی‌های نوع رسوب دهنده قرار می‌گیرد و از طرفی تولید این آنتی بادی‌ها علیه هورمون‌های پپتیدی کوچک که آنتی ژن‌های ضعیف با وزن مولکولی پایین هستند کار بسیار مشکلی است و لازم است که ابتدا برای تولید این نوع آنتی بادی، هاپیرایمونیزاسیون صورت بگیرد (۱۲ و ۱۳). اولین بار مولونی با تغییراتی که در روش اشترو لونی جهت تشخیص آنتی انسولین ایجاد نمود، توانست خط رسوبی نسبتاً واضحی را ببیند (۸) که ما نیز با روش آزمایشی مولونی توانستیم خط رسوبی حاصل از واکنش بین انسولین و آنتی انسولین را مشاهده کنیم. نکات مهم جهت ایجاد خط رسوبی و مشاهده آن، غلظت و PH بافر مورد استفاده، مدت و درجه حرارت انکوباسیون و غلظت انسولین و همچنین مقدار سرم و مقدار انسولین می‌باشد که در روش کار ذکر شده است.

یکی دیگر از روش‌های تشخیص آنتی انسولین در سرم که روش حساس‌تر و ساده‌تری نسبت به DID می‌باشد، روش Dot-Blot بود که با این روش جواب بهتر و واضح‌تر بدست آمد. در این تکنیک موفقیت روش تا حد زیادی وابسته به تجربه فرد می‌باشد. یکی از نکات اصلی در این روش تیره شدن زمینه بلات می‌باشد که می‌تواند بدلیل بلوک ناکافی محل‌های خالی نیتروسولوز و یا زیاد بودن مقدار سوبسترا (H_2O_2) باشد. در این تحقیق هنگامی که از محلول تجاری BSA، ۲۲ درصد محلول ۱ درصد تهیه و برای blocking استفاده شد، زمینه بلات تیره بود اما وقتی که از پودر BSA، محلول ۱ درصد تهیه شد این نقیصه برطرف گردید.

یکی دیگر از روش‌های استفاده شده جهت تشخیص آنتی انسولین رادیوایمنواسی بود (۲) که در مجموعه مقالات مورد مطالعه، همگی از روش فاز مایع رادیوایمنواسی استفاده کرده بودند. در این روش‌ها نکته اصلی جداسازی انسولین‌های متصل شده به آنتی بادی از انسولین‌های آزاد می‌باشد و تفاوت روش‌های فوق نیز در نوع جداسازی این دو فاز از هم بود (۱۴-۱۸) ولی در روشی که ما استفاده کردیم آزمایش در فاز جامد انجام شد و روش جداسازی فقط با شستشوی لوله‌ها انجام می‌گرفت که روشی بسیار ساده بود.

در این مطالعه، از دو مرحله تخلیص استفاده نمودیم که نتایج قابل قبولی نیز بدست آمد. اولین مرحله خالص سازی استفاده از سولفات آمونیوم اشباع شده بود که نقطه شروعی برای سایر مراحل خالص سازی محسوب می‌گردد (۱۹، ۲۰). محصول بدست آمده از این روش دارای ناخالصی می‌باشد که برای خالص سازی بیشتر نیاز به مراحل دیگر خالص سازی می‌باشد. نکته اصلی در این است که باید تمامی مراحل آزمایش در شرایط سرما انجام شود و در ثانی غلظت سولفات آمونیوم پس از مخلوط شدن با سرم باید به ۵۰ درصد اشباع برسد.

بدلیل تفاوت زیاد PH ایزوالکتریک ایمونوگلوبولین‌ها با سایر پروتئین‌های موجود در سرم استفاده از تکنیک کروماتوگرافی تعویض یونی، تکنیک مناسبی جهت جداسازی ایمونوگلوبولین‌ها در سرم خوکچه‌های هندی استفاده شده است (۲۱). در این تحقیق نیز بدلیل اینکه از بستر DEAE سلولز استفاده شده است روش مناسبی جهت جداسازی IgG محسوب می‌گردد. لذا از این بستر جهت جداسازی آنتی انسولین استفاده شد و همانگونه که نتایج نشان می‌دهد از درصد خلوص بالایی نیز برخوردار بود.

در اکثر مطالعات جهت بررسی خلوص محصول نهایی از SDS-PAGE استفاده شده است. در این مطالعه نیز بررسی خلوص نمونه‌ها با استفاده از تکنیک SDS-PAGE نشان داد که با استفاده از دو مرحله تخلیص مذکور می‌توان آنتی بادی IgG با خلوص بالا بدست آورد. ایمنوگلوبولین تخلیص شده در SDS-PAGE فقط دو باند با وزن مولکولی ۲۷ و ۵۷ کیلودالتون ایجاد نمود که باند ۲۷ کیلودالتونی را می‌توان به زنجیر سبک و باند ۵۷ کیلودالتونی را به زنجیر سنگین IgG نسبت داد.

بدلیل عدم تفکیک باندهای با وزن مولکولی بالاتر در نمونه‌های غیرخالص از تکنیک SDS-PAGE به روش گرایان غلظت استفاده شد که باندها در این تکنیک به خوبی از هم تفکیک شده و بهتر قابل ارزیابی بودند.

جهت بررسی احتمال ایجاد واکنش غیراختصاصی بین آنتی انسولین تولید شده با سایر پروتئین‌های بدن و همچنین ایجاد واکنش اختصاصی با انسولین انسانی از تکنیک وسترن بلاتینگ استفاده شد. ایجاد رنگ در محل باند ۵/۷ کیلودالتون و عدم ایجاد باندهای رنگی در بقیه قسمت‌های غشای نیتروسولوز، می‌توان به این نتیجه رسید که آنتی بادی تولید شده فقط با انسولین واکنش داده و با سایر پروتئین‌های بدن انسان، واکنش‌های غیراختصاصی ایجاد نمی‌کند. در این تحقیق مشخص شد که در میلی آمپر ثابت ۵۲۰ میلی آمپر، مدت ۳ ساعت و در صورتی که بخوایم ولتاژ را ثابت بگیریم در ولتاژ ۴۵ ولت، مدت ۱۲ ساعت برای انتقال کامل باندهای پروتئینی از ژل به غشای نیتروسولوز کافی است.

در نهایت می‌توان گفت که جهت تشخیص آنتی بادی تولید شده، روش RIA توصیه می‌گردد و همچنین جهت خالص سازی آنتی بادی در صورت استفاده از دو تکنیک آنتی بادی با سولفات آمونیوم اشباع و سپس انجام کروماتوگرافی تعویض یون با استفاده از بستر DEAE سلولوز می‌توان نمونه‌های خالص بدست آورد و جهت خلوص بیشتر آنتی بادی، کروماتوگرافی میل ترکیبی نیز توصیه می‌شود.

تقدیر و تشکر

از دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی و ایمنوژنتیک پژوهشکده بوعلی دانشگاه علوم پزشکی مشهد و مرکز تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی مشهد که در اجرای این تحقیق ما را یاری نمودند، صمیمانه قدردانی می‌نمایم.

Abstract

Production and Purification of Polyclonal Antibody to Human Insulin

Insulin is a two-chain polypeptide hormone with molecular weight of 5.7 KD , which has 51 AA . By some disulfide bounds , these two chains are connected to each other . One of the most important diseases associating insulin is diabetes . In these patients , in the absence of insulin , cells cannot absorb glucose and glucose level of blood will increase and finally body tissues encounter a great energy shortage causing different acute and chronic implications . Nowadays for measuring this hormone , RIA methods are used . The aim of this research is designing of ELISA kit for measuring of insulin and the first step in designing such kits consists of providing and purifying antibody against human insulin . In order to provide and purify polyclonal antibody to insulin some practical fulfilled as

follows . For produce antibody , we immunized Guinea pigs and after immunization stages , they were bled and their serum was separated . In order to assess and diagnose the produce anti-insulin by these pigs , RIA , DID and Dot blot methods were used . After making sure of the presence of insulin antibody in the serum , we purified antibody with saturated ammonium sulfate and then ion exchange chromatography . Also for the assessment of the antibody purification rate , the SDS-PAGE technique was used . Finally Western Blotting technique was used to make sure that there is not any unspecified bound .

Key Words : *Insulin ; Diabetes ; Guinea Pig ; Anti-insulin ; DID ; Blot ; Ion Exchange ; Chromatography ; SDS ; PAGE.*

منابع

1. Tigsesen.P.Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology practice and theory of enzyme immuno assays. Elsevier science publishers. 1985.
2. Pope, C. G. The immunology of insulin. *Adv Immunology*. 1966, (5): 209-44. 3. Dean. H. Lockwood and Thaddeus E. Prout. Antigenicity of heterologous and homologous insulin. *Metabolism*. 1965, 14(4): 530-38
4. Horst Paul Neubaver, Hans, Hermann Schone: The immunogenicity of different insulin in several animal species. *Diabetes*, 1978, 27(1).
5. Peter H. Wright et al. Some factors affecting insulin antibody production in guinea pigs. *Diabetes*. 1966, 15(9): 578-65.
6. Lockwood, D. H. and Prout, T. E. Ceska M. Detection. *Clin Res* (10).
7. Ceska M. Detection of insulin Precipitating antibodies. *Nature*. 1968, 217 .
8. Moloney, P. J. and Aprile M. A. On the antigenicity of insulin: Flocculation of insulin anti-insulin. *Can. J. Physiol*. 1959, 37.
9. Issel Bacher K. J. et al. *Harrisons: Principles of internal medicine* (14th ed). 1998. Plum. Cecil Essentials of Medicine. 1999.
11. Masaharu Horino, M.D. et al. Studies on experimental insulin immunity. *Diabetes*, 1966, 15(11): 812-22 .
12. Valeriee Jones, Cunliffe A. C. A Precipitating antibody to insulin. *Nature*. 192(14): 1961.
13. Moloney, P. J. Coval, M. Antigenicity of insulin diabetes induced by specific antibodies. *Biochem J*. 1955, (59): 85.
14. Christansen, A. H. Radioimmuno electrophoresis in the determination of insulin binding to IgG methodological studies. *Horm. Metab. Res*. 1973, (5): 172-76.
15. Mitchek, M. L. Whitehead, W. O. Orouke M. E. Diferential resin binding of insulin in serum. *Endocrinology*. 1959, (53): 322.
16. Bacster, R. C. Yue D. K. and Turle. Equilibrium binding studies of insulin antibodies in diabetic subjects. *Clin. Chem*. 1976, (22): 1089.
17. Grodsky, G. M. and Forsham P. H. An immunochemical assay of total extractable insulin in man. *J Clin Invest*. 1968, (39): 1070.
18. Desbuquois B. Arbuch, G. D. Use of polyethylene glycol to separate free and antibody-bound peptide hormone in radioimmuno assays. *J Clin Endocrinol*. 1971, (33): 732.
19. Jonston, A. Thorpe, R. *Immunochemistry in practice* (2nd Ed). Blackwell scientific publication. 1990.
20. Valker, J. M. *The protein protocols handbook*. Human press, INC. 1996.
21. Jackson, P. A. and Dixon, K. Preparation of human antibodies to insulin. *J. of immunological methods*. 1977, (14): 201-11.
22. Towbin H. Stachelin T. Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and Some application. *Proc. Natl Acad Sci*. 1979, (76): 4350-54.