Original Article

Introduction of a New Method for Mono-specific Antibody Production by Sequential use of Recombinant Proteins and Synthetic Peptides (PrIPeP model)

Mehdi Alikhani[1], Samane Adib[2], Shahab Mirshahvaladi[1], Abolfazl Kheimeh[3], Tahereh Modarresi[4], Marjan Sabbaghian[5*]

1- Ph.D. Candidate, Department of Molecular Systems Biology at Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran
2- Ph.D. Candidate, Department of Anatomy, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3- M.Sc., Animal Core Facility of Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Tehran, Iran
4- M.Sc., Department of Andrology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran
5- Assistant Professor, Department of Andrology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran

**Corresponding Address: Postal Code: 1665659911, Department of Andrology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran*
Email: marjan.sabbaghian@gmail.com

Received: 10/Jul/2015, Accepted: 05/Jan/2016

Abstract

Objective: This study attempted to generate monospecific antibodies through immunization with recombinant proteins and subsequent purification by synthetic peptides (the PrIPeP model).

Methods: The SRY gene was cloned on a pet-28a vector and the recombinant protein was expressed in the *Escherichia coli* (*E.coli*) BL21 strain. The purified antigen was emulsified in Freund's adjuvant and injected into rabbits according to a standard time table. Then, a specific peptide was designed, synthesized, and conjugated to sepharose 4B to generate an affinity purification column. As a control, the peptide was conjugated to KLH and used for immunization, as above. Antisera against the conjugated peptide (Pep-antisera) and SRY recombinant protein (Pro-antisera) were evaluated by ELISA and subsequently subjected to the affinity purification column. Sensitivity and specificity of the purified antibodies against SRY recombinant protein as well as negative controls (recombinant HSFY, RBMY, and RPSFY) were assessed by Western blot analysis.

Results: Titration by ELISA confirmed proper immunization and specificity of both antigens. Western blot analysis validated the specificity and sensitivity of the IgG class purified antibodies.

Conclusion: By applying the PrIPeP model, it is possible to develop antibodies against the native structure of a protein whilst avoiding challenges of peptide-carrier protein conjugation.

Keywords: Antigen design, Peptide and recombinant protein antigens, Mono-specific antibody production, PrIPeP model

Pathobiology Research, Vol. 18 (2015-2016), No.4, Pages: 33-44

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-19]

مقاله اصیل

ارایه روشی نوین در تولید آنتی‌بادی اختصاصی با استفاده ترتیبی از پروتئین نوترکیب و پپتید (مدل PrIPeP)

مهدی علیخانی[1]، سمانه ادیب[2]، شهاب میرشاه ولدی[1]، ابوالفضل خیمه[3]، طاهره مدرسی[4]، مرجان صباغیان[5*]

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه زیست شناسی سامانه‌های مولکولی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، پژوهشکده زیست شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاددانشگاهی، تهران، ایران

۲- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه علوم تشریحی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- کارشناسی ارشد، بخش حیوانات آزمایشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، پژوهشکده زیست فناوری جهاددانشگاهی، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران

۴- کارشناسی ارشد، گروه آندرولوژی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، پژوهشکده زیست شناسی و علوم پزشکی تولید مثل جهاددانشگاهی، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران

۵- استادیار، گروه آندرولوژی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، پژوهشکده زیست شناسی و علوم پزشکی تولید مثل جهاددانشگاهی، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۶۶۵۶۵۹۹۱۱، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست شناسی و علوم پزشکی تولید مثل جهاددانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه آندرولوژی
Email: marjan.sabbaghian@gmail.com

دریافت مقاله: ۹۴/۰۴/۲۰ پذیرش مقاله: ۹۴/۱۰/۱۶

چکیده

هدف به‌دست آوردن آنتی‌بادی اختصاصی با ایمن‌سازی توسط پروتئین نوترکیب و خالص‌سازی به کمک پپتید مصنوعی به‌عنوان روشی جدید (مدل PrIPeP).

مواد و روش‌ها: آنتی‌ژن پروتئینی با همسانه‌سازی ژن کامل SRY روی ناقل pET28a و بیان پروتئین نوترکیب آن در سویه Bl21 باکتری اشریشیا کلی تولید شد. پپتیدی اختصاصی از این پروتئین نیز طراحی و پس از سنتز برای ساخت ستون خالص‌سازی استفاده شد. پروتئین نوترکیب در ادجوانت فروند به‌صورت امولسیون در آمد و طبق جدول زمانی استاندارد برای ایمن‌سازی در خرگوش به‌کار رفت. به‌عنوان شاهد، پپتید سنتز شده به پروتئین حامل KLH کونژوگه و مانند پروتئین نوترکیب برای ایمن‌سازی استفاده شد. برای بررسی نتایج، ابتدا درستی ایمن‌سازی به‌وسیله روش الایزا بررسی شد. سپس آنتی‌سرم حاصل از تزریق پروتئین نوترکیب (Pro-antisera) با استفاده از ستون خالص‌سازی شامل پپتید کونژوگه به سفارز خالص‌سازی شد (مدل PrIPeP). آنتی‌سرم حاصل از تزریق پپتید کونژوگه به KLH (Pep-antisera) نیز با همین ستون خالص‌سازی شد. در نهایت، اختصاصیت و حساسیت آنتی‌بادی‌های خالص شده نسبت به پروتئین نوترکیب SRY و همچنین چند شاهد منفی (پروتئین نوترکیب HSFY، RBMY و RPS4Y) با استفاده از روش لکه‌گذاری وسترن بررسی شد.

نتایج: تیتراسیون با روش الایزا نشان داد که ایمن‌سازی برای هر ۲ نوع آنتی‌ژن به‌خوبی و به‌طور اختصاصی انجام شد. همچنین تجزیه و تحلیل آنتی‌بادی‌های خالص کلاس IgG با روش لکه‌گذاری وسترن نشان داد که اختصاصیت و حساسیت آنتی‌بادی در هر دو گروه مناسب است.

نتیجه‌گیری: نتایج بررسی حاضر نشان داد که با استفاده از مدل PrIPeP می‌توان از یک سو به آنتی‌بادی‌های اختصاصی دست یافت که علیه ساختار طبیعی پروتئین تولید شده‌اند و از سوی دیگر از چالش‌های کونژوگاسیون پپتید به پروتئین حامل اجتناب کرد.

کلیدواژگان: طراحی آنتی‌ژن، آنتی‌ژن‌های پپتیدی و پروتئین نوترکیب، تولید آنتی‌بادی اختصاصی، مدل PrIPeP

پژوهش‌های آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۸، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۴، صفحات: ۳۳-۴۴

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-19]

مقدمه

آنتی‌بادی‌ها همان ایمونوگلوبین سرم است که توسط سلول‌های ایمنی نوع B ترشح می‌شوند و قابلیت اتصال اختصاصی به یک مولکول خاص به‌ویژه پروتئین‌ها و پپتیدها را دارد. به دلیل همین ویژگی منحصر به فرد، آنتی‌بادی‌ها دارای جایگاه و اهمیت ویژه‌ای در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی حوزه زیست‌شناسی و پزشکی است [۱]. آنتی‌بادی‌ها به دو نوع پلی‌کلونال و مونوکلونال تقسیم می‌شوند که هر کدام از آن‌ها ویژگی‌های مربوط به خود را دارند. به‌عنوان مثال احتمال شناسایی آنتی‌ژن با استفاده از آنتی‌بادی پلی‌کلونال به دلیل شناسایی اپی‌توپ‌های فراوان از یک آنتی‌ژن، بالاتر است. توانایی این آنتی‌بادی‌ها در اتصال به چندین اپی‌توپ مختلف روی یک پروتئین خاص باعث شده مشکل پوشیده شدن اپی‌توپ‌ها کمرنگ شود. مشکل پوشیده شدن اپی‌توپ در روش ایمونوهیستوشیمی (Immunohistochemistry) دیده می‌شود. ضمن این‌که مشکل تغییر اپی‌توپ در لکه‌گذاری وسترن (Western Blotting) به دلیل واسرشت شدن (Denaturation) پروتئین‌ها پس از SDS-PAGE (Sodium dodecylsulphate-Polyacrylamide gel electrophoresis) بسیار شایع است [۲]. در مقابل آنتی‌بادی‌های مونوکلونال به سبب شناسایی تنها یک اپی‌توپ خاص، اختصاصی‌تر عمل می‌کنند [۳]. برای به‌دست آوردن آنتی‌بادی پلی‌کلونال، حیوانات آزمایشگاهی مانند موش و خرگوش با استفاده از آنتی‌ژن ایمن‌سازی می‌شوند و پس از خونگیری، آنتی‌سرم از خون جدا می‌شود. تولید آنتی‌بادی مونوکلونال با پیچیدگی بیشتری همراه است. برای این منظور ابتدا باید حیوان مورد نظر ایمن‌سازی و سپس سلول‌های ایمنی نوع B از طحال و یا غدد لنفاوی جدا شوند. در مرحله بعد سلول‌های جمع‌آوری شده با سلول میلوما (Myeloma) دورگه (Hybrid) و نامیرا می‌شوند. مرحله نهایی انتخاب کلونی سلولی با حساسیت و اختصاصیت بالا است. سپس کلونی سلول انتخابی در سیستم لوله آزمایش یا در موجود زنده (صفاق موش یا خرگوش) رشد داده می‌شود. در صورت کشت، محیط کشت و در صورت رشد در صفاق، مایع آسیتی حاوی آنتی‌بادی است [۳، ٤].

اولین و مهم‌ترین گام در تولید آنتی‌بادی تهیه آنتی‌ژن مناسب است. تهیه آنتی‌ژن از چند نظر دارای اهمیت است. نخست خالص بودن آن و عدم وجود پروتئین‌های دیگر است، به‌ویژه زمانی که پروتئین از بافت یا سلول (پروکاریوت و یا یوکاریوت) خالص‌سازی می‌شود. دومین مورد استریل بودن آنتی‌ژن است. بدین ترتیب که آنتی‌ژن آماده تزریق فاقد آلودگی‌های میکروبی باشد. وجود آلودگی باعث می‌شود سیستم ایمنی بیشترین پاسخ را به عوامل میکروبی بدهد و در نتیجه بخش بیشتر آنتی‌بادی‌های تولید شده به جای آنتی‌ژن مورد نظر با عوامل میکروبی واکنش می‌دهد. همچنین آنتی‌ژن‌ها باید فاقد سموم و دارای اسیدیته نرمال باشد [۱، ٤]. آخرین و مهم‌ترین بخش، طراحی آنتی‌ژن است که شامل انتخاب توالی‌هایی از پروتئین مورد نظر است که مختص همان پروتئین باشد و با پروتئین‌های دیگر شباهت نداشته باشد. چنانچه توالی انتخابی با سایر پروتئین‌ها دارای شباهت باشد، آنتی‌بادی حاصل فزون بر پروتئین مورد نظر با پروتئین‌های دیگر نیز واکنش می‌دهد که موجب بی اعتبار شدن نتایج می‌شود [۱]. میزان توالی اختصاصی در پروتئین‌های مختلف متفاوت است. گاهی کل توالی پروتئین منحصر به‌فرد است و گاهی تعداد توالی‌های اختصاصی یک پروتئین کمتر از ۱۰ تا ۱۵ اسید آمینه است. پروتئین‌هایی نیز وجود دارد که در مقایسه با پروتئین هومولوگ خود تنها در یک اسید آمینه اختلاف دارد [مانند پروتئین‌های EIF1AY (Eukaryotic translation initation factor 1A, Y chromosomal) و EIF1AX (EIF1A, X chromosomal)] که امکان تولید آنتی‌بادی اختصاصی علیه این پروتئین‌ها میسر نیست [۵].

در صورتی که طول بخش اختصاصی پروتئینی بیش از ۱۰ کیلودالتون باشد می‌توان قسمت اختصاصی را با استفاده از فنآوری پروتئین نوترکیب تولید و برای ایمن‌سازی استفاده کرد. برای این کار ابتدا توالی مورد نظر روی ناقل بیانی

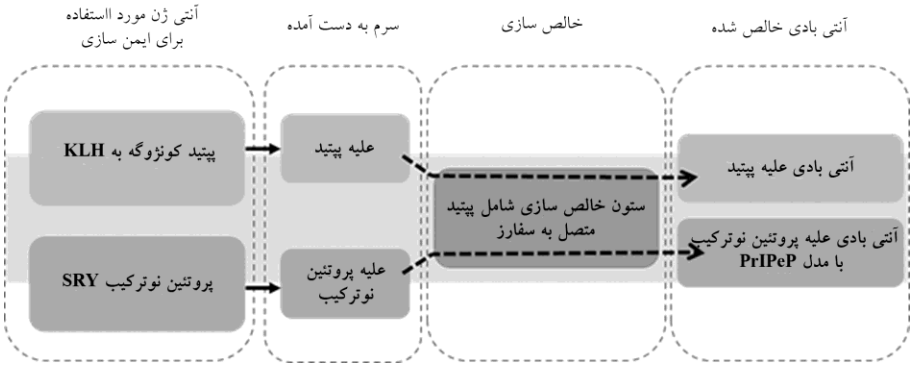
[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-19]

همسانه‌سازی شده و سپس پروتئین نوترکیب [به‌طور عمده در باکتری اشریشیا کلی (*Escherichia coli*)] تولید می‌شود. چنانچه توالی اختصاصی کمتر از ۱۰ کیلودالتون باشد آنتی‌ژن با پروتئینی حامل کونژوگه می‌شود تا ایمن‌سازی به خوبی انجام شود [۱]. امروزه پپتیدهای مورد استفاده که معمولاً بین ۱۰ تا ۲۰ اسید آمینه هستند، به‌طور مصنوعی سنتز می‌شود. این روش سبب اجتناب از چالش‌های تولید و خالص‌سازی پروتئین نوترکیب، به‌ویژه پروتئین‌های آب‌گریز می‌شود [٦-۸].

برای ایمن‌سازی حیوانات آزمایشگاهی میزان پروتئین یا پپتید بایستی در یک محدوده خاص از غلظت استفاده شود. عدم رعایت این بازه استاندارد می‌تواند منجر به سرکوب سیستم ایمنی، عدم ایمن‌سازی یا تنها بروز پاسخ سلولی و عدم ترشح آنتی‌بادی شود. گستره غلظت آنتی‌ژن در خرگوش ۵۰ تا ۱۰۰۰ میکروگرم و در موش ۱۰ تا ۲۰۰ میکروگرم است [۱، ٤].

برای ایمن‌سازی با پروتئین نوترکیب برای حداقل ۲ خرگوش حدود ۱-۲ میلی گرم پروتئین و برای ایمن‌سازی با پپتید و ساخت ستون خالص‌سازی برای حداقل ۲ خرگوش ۱۵ تا ۲۰ میلی‌گرم پپتید با خلوص حداقل ۷۵ درصد مورد نیاز است [٤]. چنانچه ایمن‌سازی با پروتئین نوترکیب به خوبی انجام گیرد؛ معمولاً نیاز به خالص‌سازی وجود ندارد ولی در صورت نیاز می‌توان از ستون خالص‌سازی عمومی (مانند ستون پروتئین A, G) استفاده کرد. همچنین از خود پروتئین نوترکیب نیز می‌توان برای ساخت ستون خالص‌سازی استفاده کرد [۹].

انتخاب پپتید یا پروتئین نوترکیب به‌عنوان آنتی‌ژن برای تولید آنتی‌بادی با چالش‌های مختلفی روبرو است [۱۰]. با توجه به این‌که هر پروتئین ویژگی‌های شیمیایی و فیزیکی مخصوص به خود را دارد، پیش از انتخاب نوع آنتی‌ژن باید شرایط مختلف مورد بررسی قرار گیرد [۱۱]. به‌طور کلی برای ایمن‌سازی با توجه به شرایط و ملاحظات یا از پروتئین نوترکیب یا از پپتید مصنوعی استفاده می‌شود. در این مطالعه در روشی ابداعی از هر دو نوع آنتی‌ژن برای تولید آنتی‌بادی علیه پروتئین SRY (Sex-determining region Y protein) انسان استفاده شد. این پروتئین، عامل تعیین جنسیت مردانه در انسان است و ژن مربوط به آن در بازوی کوتاه کروموزوم Y قرار دارد. اختلالات مربوط به این پروتئین منجر به معکوس شدن جنسیت می‌شود [۵]. در این روش ابتدا ایمن‌سازی با پروتئین نوترکیب انجام شد، سپس از پپتید مصنوعی برای خالص‌سازی آنتی‌بادی‌های اختصاصی استفاده شد. این کار برای اولین بار توسط محققان حاضر انجام و با نام مدل PrIPeP (Protein immunization followed by peptide purification) معرفی شد (شکل ۱). نتایج این تحقیق می‌تواند مورد استفاده محققینی قرار گیرد که در راستای تحقیقات خود نیاز به تولید آنتی‌بادی دارند یا تصمیم به تولید تجاری آنتی‌بادی می‌گیرند.



شکل ۱ شمای مراحل تولید آنتی‌بادی اختصاصی با استفاده از پپتید و مدل PrIPeP؛ در مدل PrIPeP، ابتدا ایمن‌سازی با استفاده از پروتئین نوترکیب صورت می‌گیرد سپس خالص‌سازی با استفاده از پپتید کونژوگه به سفارز انجام می‌شود.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-19]

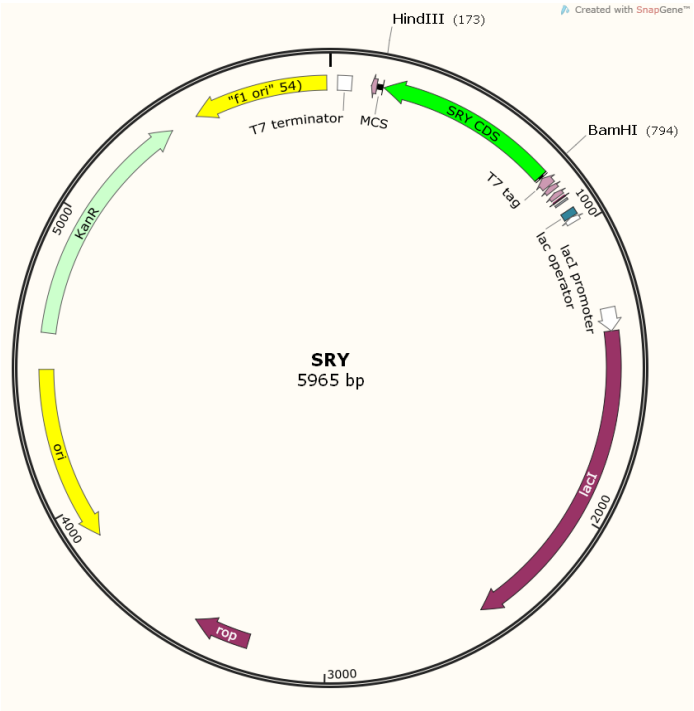
مواد و روش‌ها

طراحی آنتی‌ژن

توالی پروتئین SRY از پایگاه اطلاعاتی NeXtProt.org گرفته شد. سپس با استفاده از ابزار بلاست (BLAST) همین پایگاه و نیز از ابزار بلاست پایگاه NCBI (بلاست پروتئین، ارگانیسم: انسان و انتخاب UniProtKB/SwissProt به‌عنوان پایگاه داده مرجع) شباهت توالی این پروتئین با سایر پروتئین‌های انسانی بررسی شد. پس از تجزیه و تحلیل ضریب آب‌دوستی، با استفاده از پایگاه اطلاعاتی innovagen.se و در نظر گرفتن میزان اختصاصی بودن توالی، پپتیدی شامل اسید آمینه‌های ٤٧ تا ٥٩ برای ایمن‌سازی انتخاب و به‌طور مصنوعی ساخته شد (جدول ١). در سمت آمین پپتید انتخابی اسید آمینه سیستئین قرار داده شد. از این اسید آمینه برای انجام کونژوگاسیون با اتصال دهنده MBS (m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester) که قادر است از دو جهت با دو گروه مختلف متصل شود (Heterobifunctional) استفاده شد.

جدول ١ توالی طراحی شده پپتیدی پروتئین SRY انسانی شامل توالی ٤٧ تا ٥٩ پروتئین مورد نظر؛ سیستئین در ابتدای توالی به منظور کونژوگاسیون با اتصال دهنده با دو عملکرد متفاوت اضافه شده است.

نام پروتئین	توالی پروتئینی	شماره اسید آمینه
SRY	CETGENSKGNVQDR	٤٧ تا ٥٩



شکل ٢ نقشه ژنتیکی ناقل حاوی ژن SRY؛ بخش کد شونده ژن SRY با آنزیم‌های برشی *Bam*HI و *Hind*III برش خورده و در ناقل +Pet-28a همسانه‌سازی شد.

همسانه‌سازی و تولید پروتئین نوترکیب

ابتدا با استفاده از نرم افزار Gene Runner برای توالی ژن SRY آغازگر اختصاصی طراحی شد (جدول ٢). سپس با استفاده از آنزیم Pfx (Platinum® Pfx DNA Polymerase) قطعه مورد نظر تکثیر و به دنبال آن با استفاده از آنزیم‌های برشی *Bam*HI و *Hind*III عمل هضم انجام و سپس با استفاده از آنزیم T4 DNA ligase درون ناقل pET28a وارد شد (شکل ٢). پس از توالی‌یابی سازه و تأیید توالی ژن، ناقل حامل ژن

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-19]

SRY با استفاده از روش شیمیایی به باکتری اشریشیا کلی سویه BL21 تراریزش شد. پس از رشد باکتری‌ها و رسیدن چگالی نوری به حدود ۰/۸در طول موج ۶۰۰ نانومتر، القا با استفاده از IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) (نیم میلی‌مولار) انجام شد. باکتری‌ها ۵ ساعت پس از القا جمع‌آوری و پروتئین کل که شامل پروتئین نوترکیب نیز بود با استفاده از بافر لیز کننده واسرشته (اوره ۸ مولار، فسفات سدیم ۰/۱ مولار، اسیدیته ۸/۸) و ۵ پالس ۱ دقیقه‌ای سونیکاسیون (Sonication) استخراج شد. پروتئین استخراج شده با استفاده از ژل خالص‌سازی His-Select® Nickel Affinity Gel [۱۲]، خالص‌سازی و پس از جداسازی با SDS-PAGE با استفاده از روش MALDI-TOF/TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight) تعیین توالی و تأیید هویت شد. سه پروتیئن نوترکیب HSFY (Heat-shock transcription factor Y-linked)، RBMY (RNA-binding motif gene on Y chromosom) و RPS4Y (Ribosomal protein S4, Y linked) نیز از آزمایشگاه نوترکیب پژوهشگاه رویان دریافت شد.

جدول ۲ توالی آغازگرهای مورد استفاده برای همسانه‌سازی ژن؛ نواحی مربوط به آنزیم برشی به شکل زیر خط نشان داده شده است.

نام ژن	توالی آغازگر
SRY	F: ATTAGGATCCATGCAATCATATGCTTCTGC. R: ATTAAAGCTTCTACAGCTTTGTCCAGTGGC

کونژوگاسیون پپتید به پروتئین حامل KLH

برای کونژوگاسیون از Sulfo-MBS (m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysulfosuccinimide ester) که اتصال دهنده‌ای با دو عملکرد متفاوت (Heterobifunctional) است استفاده شد. این اتصال دهنده از یک سمت قابلیت اتصال به گروه آمین اولیه (NH2) و از طرف دیگر قابلیت اتصال به گروه تیول (SH–) را دارد. برای اتصال پپتید به پروتئین حامل مراحل زیر انجام شد: ابتدا ۵ میلی‌گرم از پروتئین حامل (Keyhole limpet hemocyanin: KLH) در PBS (Phosphate Buffered Saline) حل شد. سپس ۱ میلی‌گرم اتصال دهندهٔ sulfo-MBS (Thermo Scientific، آمریکا) در آب مقطر حل شد. محلول حاوی اتصال دهنده به محلول حاوی پروتئین حامل اضافه شد و به‌مدت ٤ ساعت در دمای اتاق روی شیکر (Shaker) قرار داده شد. سپس مخلوط حامل و sulfo-MBS (حامل فعال شده) به ستون نمک‌زدایی (Amicon، ۵۰ کیلودالتون) منتقل و با استفاده از سانتریفیوژ و جایگزینی با بافر PBS اتصال دهندهٔ اضافی حذف شد. سپس به محلول حاصل ۵ میلی‌گرم پپتید SRY اضافه شد. مخلوط حامل فعال شده و پپتید به‌مدت ٦ ساعت در دمای اتاق روی راکر (Rocker) قرار گرفت. سپس کونژوگه‌ها در دمای ۷۰- نگهداری شدند. به‌طور همزمان از BSA (Bovine Serum Albumin) نیز به‌عنوان پروتئین حامل استفاده شد و کونژوگاسیون با روش شرح داده شده انجام شد [۱۳]. از آن‌جایی که پروتئین KLH دارای زیرواحدهای مختلفی است و همچنین وزن مولکولی آن بسیار بالاست، تأیید کونژوگاسیون پپتید به این پروتئین با روش SDS-PAGE امکان‌پذیر نیست؛ به همین دلیل تأیید آن با بررسی و تأیید کونژوگاسیون پپتید SRY به پروتئین BSA (که همزمان با کونژوگاسیون به KLH انجام شد) با استفاده از الکتروفورز عمودی (SDS-PAGE) صورت گرفت.

الکتروفورز عمودی (SDS-PAGE)

برای انجام الکتروفورز عمودی از ژل اکریل آمید ۱۰ درصد استفاده شد. برای این کار به نمونه‌های پروتئینی بافر نمونه (حاوی ۱۰ درصد گلیسرول، ۲ درصد SDS، ۵۰ میلی‌مولار DDT (Dichlorodiphenyltrichloroethane)، ۱۲۵ میلی‌مولار تریس، مقدار کمی برومونفول بلو (Bromophenol blue)، اسیدیته ٦/۸) اضافه شد و محلول حاصل به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس نمونه‌ها به همراه نشانگر پروتئینی بر روی ژل

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-19]

بارگذاری و الکتروفورز به‌مدت ۲ ساعت با ولتاژ ۱۰۰ ولت انجام شد. در نهایت ژل‌ها با رنگ کوماسی بلو (Coomassie blue)، رنگ‌آمیزی شدند. کلیه مواد از شرکت Sigma (آلمان) و دستگاه‌ها از شرکت Bio Rad (آمریکا) تهیه شد.

لکه‌گذاری وسترن

ابتدا SDS-PAGE با روش توضیح داده شده در قسمت قبل انجام شد، سپس پروتئین‌ها با روش انتقال مرطوب به‌صورت شبانه با ولتاژ ۱۵ ولت به غشای PVDF (Polyvinylidene difluoride) (GE، آمریکا) منتقل شدند. در مرحله بعد غشاها با شیر خشک بدون چربی ۲ درصد به‌مدت یک ساعت پوشانده شدند. پس از ۵ دقیقه شستشو با بافر TBST (Tris-buffered saline and tween 20)، آنتی‌بادی اولیه شامل آنتی‌بادی تخلیص شده (۱ میکروگرم در ۱۰ میلی‌لیتر) به غشا اضافه شد. پس از گذشت ۱ ساعت، غشاها ۳ مرتبه (هر بار ۲۰ دقیقه) با محلول TBST شستشو داده شدند. پس از این مرحله آنتی‌بادی ثانویه (آنتی‌بادی بز علیه خرگوش که کونژوگه به HRP (Horseradish peroxidase) بود) با رقت ۱:۱۰۰۰۰۰ به‌مدت یک ساعت به غشاها اضافه شد. غشاها پس از ۳ مرتبه شستشو (هر بار ۱۵ دقیقه) با محلول TBST برای ظهور باندهای پروتئینی به اتاق تاریک برده شد. ۲۵۰ میکرولیتر محلول ECL (Thermo، آمریکا) به روی غشاها ریخته شد و سپس فیلم اشعه ایکس (Hyperfilm ECL, GE) روی غشا که با پوشش پلاستیکی پوشانده شده بود قرار داده شد. پس از ۲ تا ۳ دقیقه فیلم‌ها داخل محلول ظهور (GBX، Sigma، آلمان) برده شد و پس از شستشو با آب، تثبیت و توسط دنسیتومتر (Gs800، Bio Rad، آمریکا) اسکن و توسط نرم‌افزار ImageJ تجزیه و تحلیل شد.

ایمن‌سازی خرگوش‌ها

برای تولید آنتی‌بادی از خرگوش‌های ماده جوان (سفید نیوزلندی) استفاده شد. پیش از شروع تزریق‌ها ابتدا مقدار کمی خون برای به‌دست آوردن سرم کنترل از طریق سیاهرگ گوش جمع‌آوری شد. در اولین مرحله تزریق برای پروتئین نوترکیب ٤٠٠ میکروگرم و برای پپتید کونژوگه ۵۰۰ میکروگرم در آجووانت کامل فروند (Complete Freund's adjuvant) به‌صورت امولسیون در آمده و به‌صورت زیرجلدی تزریق شد. پس از گذشت یک ماه اولین تزریق یادآور (مقدار آنتی‌ژن نصف شد و از آجووانت ناقص فروند استفاده شد) انجام شد. دومین و سومین تزریق یادآور نیز به فاصله دو هفته از یکدیگر انجام شد. ۱۰ روز پس از آخرین تزریق خونگیری انجام و سرم جدا شد [٤].

تیتراسیون (Titration) با الایزا

سه آزمون الایزا (Enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA) برای بررسی آنتی‌سرم‌ها انجام شد. سرم‌های مورد بررسی عبارت بودند از سرم علیه پپتید کونژوگه (Pep-antisera)، سرم علیه پروتئین نوترکیب SRY (Pro-antisera) و سرم قبل از ایمن‌سازی (کنترل: Control). در آزمون اول ابتدا پروتئین نوترکیب SRY در بافر اتصال (کربنات و بی‌کربنات ۱۰۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۹/٦) حل و به میزان ۳ میکروگرم در هر چاهک پلیت ۹٦ خانه اضافه شدند. پلیت به‌طور شبانه در یخچال قرار داده شد، سپس با PBST (Phosphate buffered saline with tween 20) شستشو داده شد. در مرحله بعد چاهک‌ها با BSA (۳ درصد) به‌مدت دو ساعت مسدود شدند. هر سه سرم نام برده از نسبت ۱:۲۰ تا ۱:۲۰۰۰۰۰ با ضریب رقت ۱۰ برابر با PBST رقیق شدند و به چاهک‌ها اضافه شدند. به چاهک آخر هر ردیف فقط PBST اضافه شد. سرم‌های رقیق شده به‌مدت ۱/۵ ساعت در معرض پروتئین‌های متصل به چاهک قرار داده شدند. پس از انجام شستشو با PBST، آنتی‌بادی کونژوگه HRP علیه خرگوش (A0545, Sigma) با نسبت ۱:۳۰۰۰۰ به چاهک‌ها اضافه شد. پس از یک ساعت شستشوی دیگری انجام شد و در نهایت به چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر محلول TMB (3,3',5,5'tetramethyl

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-19]

benzidine) (Sigma، آلمان) در تاریکی اضافه شد. واکنش پس از ۱۰ دقیقه با ۱۰۰ میکرولیتر محلول اسید سولفوریک نیم مولار متوقف شد و نتایج با قرائت‌گر میکروپلیت (Microplate reader) (Thermo، آمریکا) در طول موج ٤٥٠ خوانده شد. آزمون دوم به منظور بررسی اختصاصیت آنتی‌سرم‌های تولیدی انجام شد. برای این کار واکنش سرم‌های Pro-antisera و Pep-antisera نسبت به پروتئین نوترکیب HSFY سنجش شد. در آزمون سوم، پپتید کونژوگه به BSA به چاهک‌های پلیت ELISA متصل شد. در این مورد نیز واکنش آنتی‌سرم‌های Pro-antisera و Pep-antisera با رقت‌های ذکر شده بررسی شد. کلیه مراحل و غلظت‌ها همانند آزمون اول بود.

ساخت ستون خالص‌سازی آنتی‌بادی

برای ساخت ستون خالص‌سازی اختصاصی یک گرم پودر سفارز (CNBR activated) در بشر ۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد، سپس ۵ میلی‌لیتر اسید هیدروکلریدریک ۱ میلی‌مولار به آن اضافه شد. مخلوط حاصل به‌مدت یک دقیقه تکان داده شد تا همگن شود. مخلوط همگن شده به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد تا سفارز متورم شود. سفارز حاصل با ۲۰۰ میلی‌لیتر اسید هیدروکلریدریک ۱ میلی‌مولار سرد شستشو داده شد. سپس ۵ میلی‌گرم از پپتید SRY در ۲ میلی‌لیتر بافر متصل کننده (۱۰۰ میلی‌مولار بی‌کربنات سدیم با اسیدیته ۸/۳) حل شد. ۲ میلی‌لیتر بافر متصل کننده به سفارز نیز اضافه شد. بلافاصله محلول پپتید به سفارز اضافه شد و مخلوط حاصل به‌مدت یک ساعت در دمای اتاق به‌وسیله دستگاه تکان داده شد. برای اطمینان از تکمیل واکنش این فرآیند در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به‌طور شبانه ادامه یافت. در ادامه فاز مایع از سفارز جدا شد و ۱۰ میلی‌لیتر تریس ۱۰۰ میلی‌مولار با pH ۸/۰ به سفارز اضافه شد تا مناطق فعال باقیمانده مسدود شود. مخلوط حاصل به‌مدت ۳ ساعت در دمای اتاق تکان داده شد و سپس به ستون کروماتوگرافی (Green، آمریکا) منتقل شد. ستون به حالت عمودی قرار داده شد تا مایع اضافی خارج شود. در ادامه ۸ مرتبه محلول ۱ (۵۰ میلی‌مولار تریس و یک مولار نمک با اسیدیته ۸/۰) و محلول ۲ (۵۰ میلی‌مولار گلایسین و یک مولار نمک با اسیدیته ۳/۵) به‌صورت یک در میان، هر بار ٦ میلی‌لیتر به ستون اضافه شد [١٤]. در نهایت ستون ۸ مرتبه با PBS حاوی سدیم آزید ۰/۰۱ درصد شستشو داده شد و به آن الکل ۲۰ درصد اضافه و تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شد.

خالص‌سازی آنتی‌بادی

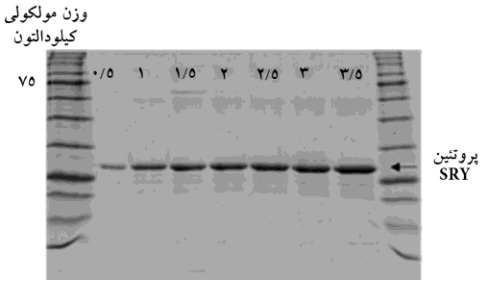
برای خالص‌سازی ۵ میلی‌لیتر از سرم ایمن شده به ۲۰ میلی‌لیتر محلول PBS اضافه شد. ستون خالص‌سازی به دستگاه پمپ پریستالتیک (Peristaltic pump) متصل شد و خالص‌سازی آنتی‌بادی با سرعت ۱ میلی‌لیتر در دقیقه انجام شد. پس از شستشو با بافر PBS، آنتی‌بادی‌های متصل به ستون با استفاده از گلایسین ۱۰۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۲/۸ از ستون فروشویی شد. به منظور حفظ فعالیت آنتی‌بادی، ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر بافر تریس یک مولار با اسیدیته ۸/۰ به ویال‌های ۲ میلی‌لیتری اضافه شد. در این حالت محلول گلایسین که حاوی آنتی‌بادی بود بلافاصله پس از خروج از ستون به این محلول اضافه شد که این امر موجب تنظیم آنی اسیدیته محلول حاوی آنتی‌بادی فروشویی شده شد. آنتی‌بادی های خالص شده با روش BCA (Bicinchoninic acid assay) تعیین غلظت شد.

نتایج

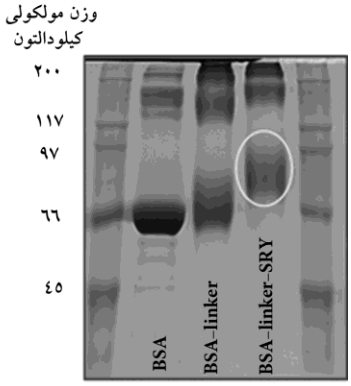
تولید و تأیید آنتی‌ژن‌ها

توالی‌یابی ژنومی و نیز توالی‌یابی پروتئینی با روش MALDI TOF/TOF درستی توالی ژن و پروتئین SRY، انسانی را تأیید کرد. همچنین الکتروفورز عمودی پروتئین SRY و رنگ‌آمیزی آن با کوماسی بلو نشان داد پروتئین تولید شده خالص است (شکل ۳). از سوی دیگر کارآیی کونژوگاسیون پپتید SRY به پروتئین حامل از طریق الکتروفورز عمودی به اثبات رسید (شکل ٤).

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-19]



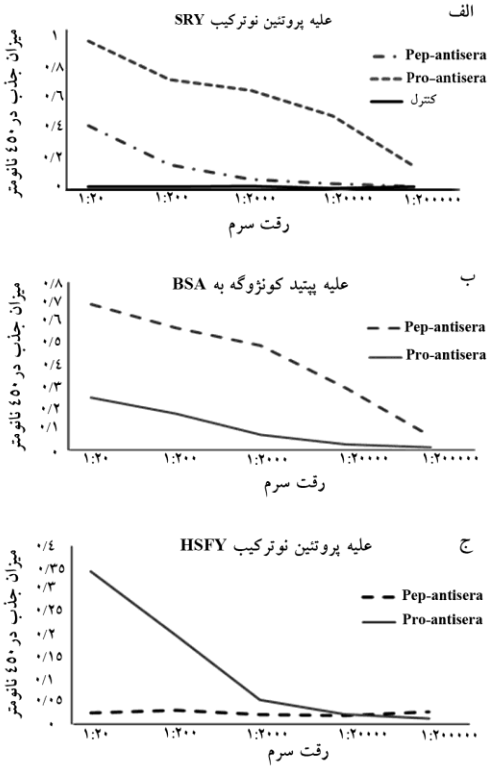
شکل ۳ تصویر SDS-PAGE از غلظت‌های مختلف پروتئین نوترکیب SRY؛ شیبی از غلظت‌های مختلف پروتئین SRY (برحسب میکروگرم) پس از تخلیص روی ژل SDS-PAGE برده شد. تصویر نشان می‌دهد این پروتئین نوترکیب خالص است.



شکل ٤ تصویر SDS-PAGE از مراحل کونژوگاسیون پپتید SRY به پروتئین حامل BSA؛ ابتدا BSA به اتصال دهنده متصل شد که افزایش وزن آن نسبت به پروتئین – BSA در شکل مشاهده می‌شود. در مرحله بعد پپتید SRY به BSA فعال شده (متصل به اتصال دهنده) متصل شد. افزایش وزن آن تأییدی بر انجام کونژوگاسیون است. وجود اسمیر در شکل به دلیل اتصال تعداد متفاوت اتصال دهنده به هر پروتئین BSA است.

تأیید ایمن‌سازی با تکنیک ELISA

خونگیری از خرگوش‌ها ده روز پس از آخرین تزریق انجام شد. خون داخل لوله فاکون به‌طور شبانه در یخچال قرار داده شد و سپس سرم از خون جدا و با فیلتر ۰/٤٥ میکرومتر فیلتر شد. از سرم‌های فیلتر شده برای تأیید ایمن‌سازی و تولید آنتی‌بادی استفاده شد. نتایج آزمون ELISA در شکل ۵ آورده شده است. در بخش الف این شکل واکنش کلیه سرم‌ها علیه پروتئین SRY به تصویر کشیده شده است. طبق نتایج سرم Pro-antisera واکنش بیشتری به پروتئین SRY نسبت به سرم Pep-antisera نشان داد. ضمن این‌که سرم کنترل واکنشی با پروتئین SRY نداشت. در قسمت ب، واکنش سرم‌های Pro-antisera و Pep-antisera علیه SRY کونژوگه به BSA به نمایش در آمده است. پاسخ سرم Pep-antisera نسبت به Pro-antisera بالاتر بود. در قسمت پ، که اختصاصیت سرم‌ها بررسی شد، واکنش سرم‌ها نسبت به پروتئین نوترکیب HSFY ارزیابی شد. Pep-antisera نسبت به پروتئین HSFY واکنشی نشان نداد. Pro-antisera نسبت به این پروتئین واکنشی نسبی نشان داد که این امر احتمالاً به دلیل وجود توالی پروتئینی شامل برچسب هیستیدینی (his tag) و ناحیه ترومبین (Thrombin) در ابتدای ناقل pET28a است که میان پروتئین‌های نوترکیب حاصل از این ناقل مشترک است.

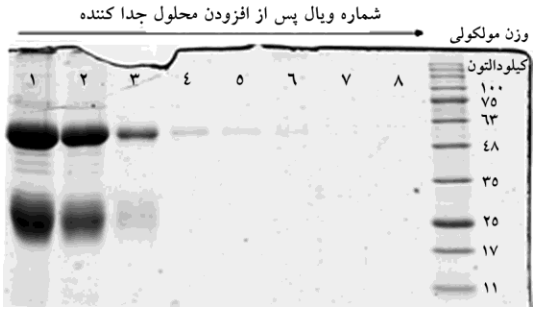


شکل ۵ تصویر نمودار خطی تیتراسیون آنتی‌بادی های تولید شده؛ الف) واکنش رقت‌های مختلف سرمی Pep-antisera، Pro-antisera و همچنین رقت‌های مختلف سرم کنترل علیه پروتئین نوترکیب SRY، ب) واکنش Pep-antisera و Pro-antisera علیه پپتید کونژوگه به BSA، ج) واکنش Pep-antisera و Pro-antisera نسبت به پروتئین نوترکیب HSFY

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-19]

خالص‌سازی آنتی‌بادی با روش PrIPeP

محلول رقیق شده Pro-antisera از ستون خالص‌سازی شامل پپتید متصل به سفارز با شدت یک میلی‌لیتر در دقیقه با استفاده از پمپ پریستالتیک عبور داده شد. پس از شستشو با عبور ۲۰ میلی‌لیتر از محلول PBS از ستون، ۲۰ میلی‌لیتر محلول جدا کننده به ستون اضافه شد و آنتی‌بادی‌ها در ویال‌های ۲ میلی‌لیتری حاوی ۲۰۰ میکرولیتر بافر تریس ۱ مولار جمع‌آوری شد. SDS-PAGE نشان داد ویال‌های اول و دوم دارای بیشترین میزان آنتی‌بادی بودند. میزان آنتی‌بادی جمع‌آوری شده در ویال پنجم بسیار پایین بود که نشان دهنده جدا شدن تقریبی اکثر آنتی‌بادی‌ها از ستون خالص‌سازی بود (شکل ٦).



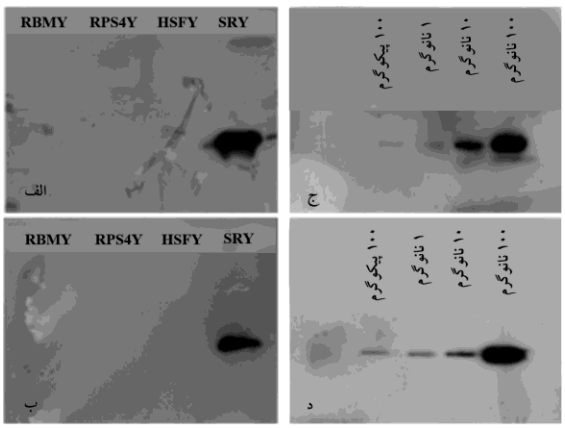
شکل ٦ تصویر SDS-PAGE آنتی‌بادی‌های خالص شده با ستون پروتئین G؛ ۱۰ میکرولیتر آنتی‌بادی خالص شده از هر ویال برای انجام SDS-PAGE استفاده شد.

خالص‌سازی آنتی‌بادی از سرم Pep-antisera

۵ میلی‌لیتر از سرم حاصل از تزریق پروتئین نوترکیب به ۲۰ میلی‌لیتر PBS اضافه شد و از ستون خالص‌سازی پپتید متصل به سفارز عبور داده شد. شستشو و جداسازی آنتی‌بادی مانند مراحل قبل انجام شد. با این روش نیز در مراحل اول (ویال اول ودوم) میزان آنتی‌بادی‌ها زیاد و در ویال پنجم میزان آنتی‌بادی بسیار کم بود. در نهایت آنتی‌بادی‌های تخلیص شده در هر گروه توسط ستون‌های نمک‌زدایی [آمیکون (Amicon)، ۳۰ کیلودالتون]، با بافر PBS جایگزین و به حجم ۲ میلی‌لیتر تغلیظ شد. سپس با استفاده از کیت BCA تعیین غلظت آنتی‌بادی‌ها انجام شد.

تأیید آنتی‌بادی‌های خالص‌سازی شده با روش لکه‌گذاری وسترن

برای تأیید حساسیت و اختصاصیت آنتی‌بادی‌های تخلیص شده از روش لکه‌گذاری وسترن استفاده شد. این کار نیز در دو مرحله انجام شد. در آزمایش نخست، از نیم میکروگرم پروتئین نوترکیب SRY و نیز سه پروتئین نوترکیب غیر مرتبط شامل HSFY، RBMY و RPS4Y استفاده شد. نتایج به‌دست آمده، نتایج ELISA را تأیید کرد و هر دو نوع آنتی‌بادی خالص شده تنها پروتئین SRY را شناسایی کردند (شکل ۷ قسمت الف و ب). در آزمایش دوم، دامنه‌ای از غلظت پروتئین نوترکیب SRY (۱۰۰ پیکوگرم تا ۱۰۰ نانوگرم) با روش وسترن به غشای PVDF منتقل شد. برای هر بلات (غشایی که به آن پروتئین منتقل شده)، یک میکروگرم آنتی‌بادی به ۱۰ میلی‌لیتر TBST اضافه شد. پس از انجام کلیه مراحل، هر دو نوع آنتی‌بادی خالص شده شامل آنتی‌بادی حاصل از Pro-antisera (مدل PrIPeP) (شکل ۷-پ) و آنتی‌بادی حاصل از Pep-antisera (شکل ۷ -ت) تا غلظت ۱۰۰ پیکوگرم شناسایی شدند.



شکل ۷ تصویر لکه‌گذاری وسترن آنتی‌بادی‌های تولید شده علیه پروتئین نوترکیب SRY؛ تعیین اختصاصیت آنتی‌بادی خالص شده از Pro-antisera (مدل PrIPeP) (الف) و Pep-antisera (ب) و نمایش میزان حساسیت در آنتی‌بادی خالص شده از Pro-antisera (مدل PrIPeP) (پ) و Pep-antisera (ت)

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-19]

بحث

همان‌طور که پروتئین‌ها دارای خواص شیمیایی و فیزیکی متفاوتی نسبت به یکدیگر هستند، تولید آنتی‌بادی علیه یک پروتئین خاص نیز به انتخاب روشی خاص مبتنی بر خواص نام برده و نیز شرایط آن پروتئین نیاز دارد. به‌عنوان یک اصل، هر چه پروتئینی آب‌دوست‌تر و از نظر توالی منحصر به فردتر باشد، ساخت آنتی‌بادی برای آن آسان‌تر خواهد بود [٤]. ولی در مورد بسیاری از پروتئین‌ها این شرایط ایده‌آل به‌صورت یک جا وجود ندارد. به‌عنوان مثال، پروتئین‌های غشایی ضریب آب‌دوستی بسیار پایینی دارد. از طرفی پروتئین‌هایی که عضوی از یک خانواده پروتئینی است، دارای مناطق و توالی‌های منحصر به فرد کمتری است. در نتیجه برای تولید آنتی‌بادی برای یک پروتئین، ابتدا بایستی تمامی شرایط و خواص شرح داده شده بررسی و با توجه به ارزیابی به عمل آمده روش تولید آنتی‌بادی (مونوکلونال باشد و یا پلی‌کلونال و نیز نوع آنتی‌ژن پپتید باشد یا پروتئین نوترکیب) مشخص شود [٣، ٤، ٦، ١٣].

در این مطالعه امکان تلفیق مزایای پپتید و پروتیئن نوترکیب بررسی شد و منجر به معرفی مدل PrIPeP شد. به این ترتیب که ابتدا آنتی‌سرم با استفاده از پروتئین نوترکیب که ساختاری تقریباً مشابه با پروتئین طبیعی دارد، تولید شد و در مرحله بعد آنتی‌بادی اختصاصی با عبور از ستونی که در آن پپتید دارای توالی اختصاصی پروتئین SRY تعبیه شده بود، خالص‌سازی شد. نتایج به‌دست آمده موفقیت عملی مدل PrIPeP را تأیید کرد و نشان داد آنتی‌بادی خالص شده توسط این روش همانند آنتی‌بادی به‌دست آمده از پپتید کونژوگه به KLH از اختصاصیت و حساسیت مناسبی نیز برخوردار است. با وجود این‌که این روش همیشه بهترین روش برای تولید آنتی‌بادی نیست و برای همه پروتئین‌ها کاربرد ندارد، دارای مزایای قابل توجهی است. از جمله این‌که از ناقل حاوی توالی ژن مورد نظر می‌توان به‌طور نامحدود پروتئین نوترکیب تولید کرد و برای ایمن‌سازی‌های متعدد استفاده کرد. مزیت دیگر این روش اینست که از مشکل تأیید کونژوگاسیون هنگام استفاده از پپتید به‌عنوان آنتی‌ژن اجتناب می‌شود. امکان تأیید کونژوگاسیون به‌ویژه هنگامی که از KLH به‌عنوان پروتئین حامل استفاده شود، بسیار پایین است. ویژگی استفاده از پروتئین نوترکیب زمانی نمایان‌تر می‌شود که پروتئین نوترکیبی در آزمایشگاه برای انجام پروژه‌های دیگر از جمله ترانسداکشن (Transduction) پروتئین یا استفاده از پروتئین به‌عنوان عامل رشد به‌صورت روزمره تولید شود. در این موارد در صورت اختصاصی بودن توالی پروتئین می‌توان از آن به‌طور مستقیم برای ایمن‌سازی استفاده کرد. همچنین در صورت اختصاصی نبودن کل توالی، می‌توان پس از ایمن‌سازی با استفاده از مدل PrIPeP معرفی شده در این مطالعه، آنتی‌بادی‌های اختصاصی را خالص‌سازی کرد.

امروزه شرکت‌های تجاری فرآورده‌های زیستی متنوع‌تری عرضه می‌کنند که در بسیاری از موارد موجب تسهیل و حتی صرفه‌جویی در انجام کارهای آزمایشگاهی می‌شود. از جمله این مواد می‌توان به پروتئین حامل آبی (Blue carrier) اشاره کرد که در واقع شکل تغییر یافته پروتئین حامل KLH با ضریب آب‌دوستی بالاتر است. استفاده از این پروتئین به‌عنوان پروتئین حامل کارآیی کونژوگاسیون و در نتیجه شانس تولید آنتی‌بادی با کیفیت و کمیت بالاتر را افزایش می‌دهد. همچنین زمانی که قرار است پپتید متصل به سفارز برای خالص‌سازی آنتی‌بادی استفاده شود، بهتر است از سفارز فعال شده حاوی فاصله دهنده (Spacer) استفاده شود تا پپتید بهتر در دسترس آنتی‌بادی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این پروژه بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب پژوهشگاه رویان با عنوان تولید آنتی‌بادی اختصاصی برای پروتئین‌های کروموزوم Y است و نویسندگان از مسئولین این پژوهشگاه کمال قدردانی را دارند.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-19]

منابع

[1] Leenaars M, Hendriksen CF. Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations. ILAR J 2005; 46(3): 269-79.

[2] Sompuram SR1, Vani K, Messana E, Bogen SA. A molecular mechanism of formalin fixation and antigen retrieval. Am J Clin Pathol 2004; 121(2): 190-9.

[3] Liu JK. The history of monoclonal antibody development - Progress, remaining challenges and future innovations. Ann Med Surg (Lond) 2014; 3(4): 113-6.

[4] Hanly WC, Artwohl JE, Bennett BT. Review of polyclonal antibody production procedures in mammals and poultry. ILAR J 1995; 37(3): 93-118.

[5] Jangravi Z, Alikhani M, Arefnezhad B, Sharifi Tabar M, Taleahmad S, Karamzadeh R, Jadaliha M, Mousavi SA, Ahmadi Rastegar D, Parsamatin P, Vakilian H, Mirshahvaladi S, Sabbaghian M, Mohseni Meybodi A, Mirzaei M, Shahhoseini M, Ebrahimi M, Piryaei A, Moosavi-Movahedi AA, Haynes PA, Goodchild AK, Nasr-Esfahani MH, Jabbari E, Baharvand H, Sedighi Gilani MA, Gourabi H, Salekdeh GH. A fresh look at the male-specific region of the human Y chromosome. J Proteome Res 2013; 12(1): 6-22.

[6] Geysen HM, Rodda SJ, Mason TJ, Tribbick G, Schoofs PG. Strategies for epitope analysis using peptide synthesis. J Immunol Methods 1987; 102(2): 259-74.

[7] Haste Andersen P, Nielsen M, Lund O. Prediction of residues in discontinuous B-cell epitopes using protein 3D structures. Protein Sci 2006; 15(11): 2558-67.

[8] Tam JP. Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. Proc Natl Acad Sci U S A 1988; 85(15): 5409-13.

[9] Huse K, Böhme HJ, Scholz GH. Purification of antibodies by affinity chromatography. J Biochem Biophys Methods 2002; 51(3): 217-31.

[10] Van Regenmortel MH. Antigenicity and immunogenicity of synthetic peptides. Biologicals 2001; 29(3-4): 209-13.

[11] Wilson IA, Stanfield RL. Antibody-antigen interactions: new structures and new conformational changes. Curr Opin Struct Biol 1994; 4(6): 857-67.

[12] Alikhani M, Sharifi Tabar M, Mirshahvaladi S, Kheimeh A, Sadighi Gilani MA, Sabbaghian M. Expression analysis of RNA-binding motif gene on Y chromosome (RBMY) protein isoforms in testis tissue and a testicular germ cell cancer-derived cell line (NT2). Iran Biomed J 2013; 17(2): 54-61.

[13] Hancock DC, O'Reilly NJ. Synthetic peptides as antigens for antibody production. Methods Mol Biol 2005; 295: 13-26.

[14] Hermanson GT. Immobilization of Ligands on Chromatography Supports. In: Hermanson GT. Bioconjugate Techniques. Chapter 15, Third edition, Boston: Academic Press, 2013; p: 589-740.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-19]