نشریه آموزشی- پژوهشی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور
فصلنامه تحقیقات کاربردی در علوم دامی
شماره ۴۲، بهـار ۱۴۰۱
ص‌ص: ۵۵~۶۲

تولید آنتی بادی اختصاصی ضد لاکتوفرین شتر با استفاده از ادجوانت های فروند و کیتوزان

- **سعید زیبائی** (نویسنده مسئول)

دانشیار موسسه تحقیقات واکسن وسرم سازی رازی شعبه شمال شرق ، بخش تحقیق و توسعه فرآورده های بیولوژیک ، سازمان تحقیقات ، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد ، ایران

- **محدثه فرهنگ**

دانش آموخته فوق لیسانس ،دانشگاه پیام نور مشهد ،آموزگار ۶۹، مشهد، ایران

تاریخ دریافت : فروردین ۱۴۰۱ تاریخ پذیرش : خرداد ۱۴۰۱

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۵۳۰۳۵۹۱۹

Email: S.zibaee@rvsri.ac.ir

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ aasrj.2022.126942

چکیده:

لاکتوفرین کاربردهای بالینی و تجاری دارد.در مطالعه حاضر جهت خالص سازی لاکتوفرین از کروماتوگرافی تعویض یونی توسط CM sephadex C-50 استفاده و برای تایید ، از آزمایش SDS-PAGE و نیز عدم ایجاد رنگ در حضور ترامتیل بنزدین استفاده شد. بمنظور تولید آنتی بادی اختصاصی بر علیه لاکتوفرین شتر، خرگوش های سفید نر نیوزلندی با µg/ml ۱۲۰ لاکتوفرین و با استفاده از ادجوانت های فروند و کیتوزان به مدت ٦ هفته ایمن شدند. جهت تایید و مقایسه میزان آنتی بادی تولیدی از آزمایش‌های دات بلات والایز استفاده گردید. درآزمایش دات بلات، ایجاد لکه‌های قهوه‌ای تایید کننده اتصال آنتی ژن باآنتی بادی بوده که شدت ایجاد رنگ قهوه‌ای با میزان آنتی‌بادی ارتباط دارد .نتایج الایزا نیز وجود غلظت‌های بالایی از آنتی بادی را ثابت نمود. نتایج نشان داد که میزان تولید آنتی بادی اختصاصی با استفاده از ادجوانت کیتوزان نسبت به ادجوانت فروند بااختلاف معنی دار $\alpha<5\%$ بیشتر می باشد.

واژه‌های کلیدی: لاکتوفرین، کروماتوگرافی تمایلی

Applied Animal Science Research Journal No 42 pp: 55-62

Production of camel-specific lactoferrin antibodies using Freund and chitosan adjuvants

By: Zibaee,S*[1]. Farhank,M [2]
1-Associate professor Razi Vaccine and Serum Research *Institute, Agricultural* Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, Iran
2-Master postgraduate, Payame Noor University of Mashhad, Amozegar 96, Mashhad, Iran

Received: April 2022 **Accepted: June 2022**

Lactoferrin has clinical and commercial applications. In the present study, ion exchange chromatography by CM Sephadex C-50 was used to purify lactoferrin and SDS-PAGE test was performed to confirm the absence of dye in the presence of tetramethyl benzene (TMB). In order to production of camel-specific lactoferrin antibodies, New Zealand white male rabbits were immunized with 120 µg/ml lactoferrin using Freund's and chitosan adjuvants for 6 weeks. Dot-blot tests were used to confirm and compare the amount of antibody produced. In the dot blot test, the formation of brown spots confirmed the binding of the antigen to the antibody, and the intensity of the brown color was related to the amount of antibody. ELISA results also showed the presence of high concentrations of antibodies. The results showed that the production of specific antibodies using chitosan adjuvant was higher than Freund's adjuvant with a significant difference of α <5%.

Key words: Lactoferrin, Camel milk, camel-specific antibodies

مقدمه

لاکتوفرین پروتئینی با وزن مولکولی ۸۰ کیلودالتون می باشد .غلظت این پروتئین آهن‌دار در شیر شتر ۴۸ ساعت بعد از زایمان به (۲/۳ g/l) می‌رسد(۶) لاکتوفرین فعالیت‌های ضدمیکروبی و ضد ویروسی داشته ودر تنظیم و جذب آهن و پاسخ‌های ایمنی نقش دارد. هم‌چنین دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطانی و ضدالتهابی می باشد(۲). به علت افزایش غلظت لاکتوفرین در تمام مایعات بیولوژیک بدن هنگام واکنش‌های التهابی و بروز عفونت های ویروسی، محققین این پروتئین را acute-phase protein (پروتئین مرحله‌ی حاد) می‌نامند(۱).لاکتوفرین می‌تواند کاندید مناسبی جهت کاربردهای بالینی و تجاری باشد. اثبات گردیده که تغذیه خوراکی لاکتوفرین اثرات مفیدی از جمله افزایش عملکرد سیستم ایمنی و افزایش سلامت نوزادان و بزرگسالان ، بهبود فلور طبیعی روده، افزایش فریتین سرم، افزایش سطح هماتوکریت و کاهش بیماری‌های تنفسی داشته است. علاوه بر این لاکتوفرین مانع اکسیداسیون لیپید در فرمول غذایی کودکان می‌گردد (۹).

با توجه به اینکه لاکتوفرین پروتئین زیست فعال مهمی است خالص سازی لاکتوفرین از منابع مختلف ازجمله شیر گاو، شتر و انسان انجام می‌گیرد. جهت خالص سازی لاکتوفرین از روش‌های متنوعی استفاده شده است که عبارتند از: کروماتوگرافی تبادل یونی ، ژل فیلتراسیون و کروماتوگرافی تمایلی و کروماتوگرافی جدیدبا استفاده از کیتوزان (۴) .با توجه به طبیعت کاتیونی لاکتوفرین یکی از رایج‌ترین روش خالص سازی استفاده از ستون تبادل کاتیونی ازجمله کربوکسی متیل سفادکس است (۹) . برای جدا سازی و خالص سازی لاکتوفرین با خلوص و عملکرد بالا، استفاده از ستون تمایلی(خالص سازی تمایلی)انجام می شود.که برای استفاده از این روش نیاز به آنتی بادی ضد لاکتوفرین می باشد.در پژوهش حاضر بمنظور تولید آنتی بادی اختصاصی کارا بر ضد لاکتوفرین ازدواجوانت مهم فروند وکیتوزان استفاده گردید.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱-مواد

شیر از شتر داری های اطراف مشهد تهیه شد. تریپسین، سفادکس، کلرور سدیم، سولفات آمونیوم، پراکسید هیدروژن ۳٪، تترامتیل بنزیدین، NaH2PO4 2H2O و Na2HPO4 12H2O، Na2co3، NaHco3، Kcl، استونیتریل ، تریس، استات سدیم، گلیسین، سدیم دودسیل سولفات، نیترات نقره، کربنات سدیم، متانول از شرکت مرک (آلمان) تهیه گردید. آلبومین سرم گوساله (BSA)، Sepharose 6B، CM Sephadex C-50 ، آکریل‌آمید، بیس‌آکریل‌آمید از شرکت سیگما و کونژوکه خرگوش از شرکت بیو تک و ادجوانت ناقص و کامل فروند ، و کیتوزان از شرکت بیوژن خریداری گردید.

۲-۲- روش ها

۲-۲-۱- خالص سازی لاکتوفرین ، تأیید وجود و تعیین غلظت لاکتوفرین در فراکسیون های جمع آوری شده:

خالص سازی لاکتوفرین بر اساس روش راعی و همکاران (Raei et al., 2015) (روش تغییر یافته یوشیدا)(Yoshida) 1991,. انجام گرفت (۱۱،۱۳)بدین منظور شیر شتر تک کوهانه ی از استان گلستان جمع آوری و به آزمایشگاه منتقل وپس از چربی زدایی توسط سانتریفوژ (۴۵۰۰g-۲۰ دقیقه) ، کازئین شیر با افزودن تدریجی اسید استیک ۱۰٪ و استات سدیم یک مولار سوب و به PH ۴/ ۶ رسید سپس سانتریفیوژ (۳۰۰۰۰g به مدت ۳۰ دقیقه) گردید وپس ازعبور ازکاغذ واتمن(N 7) تا زمان انجام آزمایش در ۸۰°C- نگهداری شد.برای انجام کروماتوگرافی تعویض یونی، نمونه با بافر فسفات سدیم ۱۰ mM با pH=۶/۸ متعادل و سپس روی ستون CM sephadex C-50 برده شد. پس از ورود نمونه، برای تفکیک اجزای پروتئینی از جریان بافر فسفات سدیم ۱۰ mM با pH=۶/۸ وفراکسیون‌های جمع آوری شده از شستشوی رزین توسط بافر فسفات حاوی غلظت های مختلف نمکی (۰/۱ تا یک مولار) و سپس اندازه گیری میزان پروتئین در این فراکسیون‌ها با استفاده از اسپکتروفوتومتری با طول موج ۲۶۰ nm، انجام گرفت.

جهت بررسی وجود لاکتوفرین در فراکسیون های جمع آوری شده از الکتروفورز SDS-PAGE استفاده وبرای تأیید وجود لاکتوفرین از آزمایش عدم واکنش رنگی لاکتوفرین با سوبسترای تترامتیل بنزیدین(TMB) استفاده گردید. لاکتوپراکسیداز در حضور پراکسیدهیدروژن با TMB واکنش رنگی نشان می دهد. بطوریکه سبب اکسیداسیون TMB و ظهور رنگ آبی می گردد اما لاکتوفرین این واکنش را نشان نمی دهدمخلوط واکنش شامل H_2O_2 ۳۰٪، TMB ۸۸mM و بافر فسفات سدیم بود. جهت انجام آزمایش مخلوط واکنش به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۸°C انکوبه گردید. در این آزمایش از horseradish peroxidase (HRP) به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. همچنین غلظت پروتئین‌های خالص شده با استفاده از روش برادفورد تعیین گردید(۹و۱۱).

۲- ۲-۲- تولید آنتی بادی اختصاصی بر علیه لاکتوفرین در خرگوش:

۲-۲-۲-۱- تولید آنتی بادی اختصاصی بر علیه لاکتوفرین در خرگوش با استفاده از ادجوانت فروند:

دو سر خرگوش سفید نیوزلندی دو ماهه نر با استفاده از روش تغیر یافته پوارتا ایمن شدند(۱).جهت ایمن سازی برای هر خرگوش ۱۲۰µg/ml لاکتوفرین هراه با یک میلی لیتر ادجوانت کامل فروند مخلوط و به روش زیر جلدی در چهار نقطه از زیر پوست ناحیه پشت، تزریق گردید.سپس برای هر خرگوش سه تزریق یادآوربا لاکتوفرین و ادجوانت به فاصله دو هفته انجام و در هفته هشتم پس از خونگیری، سرم جدا گردید. برای تزریق های دوم و سوم از ادجوانت ناقص فروند استفاده شد.

۲-۲-۲-۲- تولید آنتی بادی اختصاصی بر علیه لاکتوفرین در خرگوش با استفاده از ادجوانت کیتوزان:

بدین منظور ازدو سر خرگوش سفید نیوزلندی دو ماهه ن استفاده شد ایمن سازی با استفاده از روش تغیر یافته پوارتا انجام گرفت(۱).جهت ایمن سازی برای هر خرگوش ۱۲۰µg/ml لاکتوفرین هراه با یک میلی لیتر ادجوانت کیتوزان مخلوط و روش

زیر جلدی در چهار نقطه از زیر پوست ناحیه پشت، تزریق گردید.برای آماده سازی ادجوانت کیتوزان از روش میرتاج الدینی و همکاران ۲۰۰۹استفاده شد(۷).متعاقبا برای هر خرگوش سه تزریق یادآوربا لاکتوفرین و ادجوانت کیتوزان (به همان میزان و روش تهیه شد) به فاصله دو هفته انجام و در هفته هشتم پس از خونگیری، سرم جدا گردید.

۳-۲-۲- خالص سازی آنتی بادی اختصاصی

سرم خرگوش با استفاده از PBS بمیزان یک دوم ر قیق ، آمونیوم سولفات ۴۰٪ سرد افزوده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد.رسوب پروتئین با استفاده از اولترا سانتریوفوژ (با دور ۱۷۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه) جمع آوری و به رسوب به دست آمده، ۲/۵ برابر حجم اولیه سرم PBS اضافه گردید.جهت رسوب‌دهی مجدد، آمونیوم سولفات ۴۰٪ به محلول و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد اضافه،رسوب پروتئین با استفاده از اولترا سانتریوفوژ جمع آوری گردید،به رسوب به دست آمده، نصف حجم اولیه سرم PBS اضافه ودیالیز انجام و سپس آنتی بادی در دمای ۲۰- نگه‌داری گردید. جهت تایید خالص سازی از الکتروفورز به روش SDS-PAGE وجهت تعیین میزان آنتی بادی از روش برادفورد استفاده شد.

۴-۲-۲- آزمایش‌های تاییدی برای تولید آنتی بادی اختصاصی بر علیه لاکتوفرین

۲-۲-۴-۱- تایید تولیدآنتی بادی اختصاصی بر علیه لاکتوفرین با استفاده از آزمایش دات بلات

این روش یک روش کیفی و نیمه کمی است واکنش بین آنتی ژن و آنتی بادی با استفاده از روش رنگ سنجی با دی آمینو بنزوئیک اسید (DAB) قابل رویت می‌گردد. جهت انجام آزمایش ،دومیکرو لیتر از لاکتوفرین خالص (۹۵ میکروگرم) رقیق شده با بافر فسفات در یک نقطه از کاغذ نیتروسلولز و دو میکرولیتر از بافرفسفات(PBS) (کنترل منفی) با فاصله دو سانتیمتر از لاکتوفرین قرار داده، کاغذ با استفاده از انکوباتور ۳۷ درجه به مدت ۱۵ دقیقه خشک ، داخل BSA غوطه‌ور وبا استفاده از شیکر در ۳۷ درجه به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری گردید.آنگاه یک بار با PBS حاوی توئین ودو بار با PBS شستشه و داخل ظرف حاوی آنتی بادی اختصاصی(سرم خرگوش با رقت یک به ۱۰۰) غوطه ور وبا استفاده از شیکر در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ دقیقه نگهداری گردید . شستشو یک بار با PBS حاوی توئین ودو بار با PBS ، غوطه‌ور نمودن داخل محلول آنتی آنتی بادی کونژوگه خرگوش (با رقت یک به ۱۰۰۰)، شستشو دو بار با PBS ، غوطه ور نمودن داخل محلول DAB و خشک کردن کاغذ، انجام گرفت.

۲-۲-۴-۲- تایید تولیدآنتی بادی اختصاصی بر علیه لاکتوفرین با استفاده از آزمایش الایزا:

جهت تاییداز آزمایش الایزای غیر مستقیم به روش ذیل استفاده شد : افزودن ۱۰۰ میکرولیتر لاکتوفرین خالص (۷۵ میکروگرم) رقیق شده با بافر فسفات و نیز افزودن PBS به عنوان کنترل منفی (کنترل منفی آنتی ژن و کنترل منفی آنتی بادی) داخل چاهک-های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ،انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت یک ساعت با استفاده از همزن شیکر،شستشو دو بار با PBS حاوی توئین ویک بار با PBS ،افزودن ۲۰۰ میکرولیتر BSA یک درصد ،قرار دادن در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت یک ساعت با استفاده از همزن شیکر، شستشو دو بار با PBS حاوی توئین ویک بار با PBS،افزودن ۱۰۰ میکرولیترآنتی بادی‌های ضد لاکتوفرین(سرم خرگوش با رقت های یک به ۱۰ ، یک به ۵۰، یک به ۱۰۰ و یک به ۵۰۰) در هر چاهک ، انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت یک ساعت با استفاده از همزن شیکر، شستشو دو بار با PBS حاوی توئین ویک بار با PBS،افزودن ۱۰۰ میکرولیتر آنتی آنتی بادی خرگوش (با رقت یک به ۱۰۰۰)کونژوگه با پروکسیداز(HRP) ، قرار دادن در ۳۷ درجه - سانتی‌گراد به مدت یک ساعت با استفاده از همزن شیکر، شستشو دو بار با PBS حاوی توئین ویک بار با PBS،افزودن ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترای رنگ‌زا OPD[1] ،قرار دادن در محل تاریک به مدت ۱۵ دقیقه , ،و سپس قرائت جذب نوری در طول

[1] O-PheNYLENEDIAMIN

موج ۴۹۲ نانومتر با دستگاه قرائت کننده الایزا ، استفاده شد.برای محاسبه نتایج ابتدا انحراف معیار محاسبه و سپس Cut off بدست آمده، جهت محاسبه Cut Off از فرمول انحراف معیار ضربدر ۲ بعلاوه کنترل منفی(کنترل سرم) استفاده گردید. ،آنگاه Cut off بدست آمده از جذب نوری حاصل شده کم می گردد.

۲-٤-۲-۲ روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

نتایج حاصل از بررسی آماری به روش آزمایشات فاکتریل۲ در قالب طرح کاملا تصادفی در سه تکرار با استفاده از نرم افزار MSTATC انجام گردید و میانگین تیمارها به روش دانکن مقایسه شدند.

۳- نتایج

۱-۳- نتایج حاصل از خالص سازی، تایید خالص سازی و میزان لاکتوفرین:

نتایج حاصل از SDS-PAGE نشان داد که فراکسیون‌های ۰/۶، ۰/۷، ۰/۸، ۰/۹ دارای تک باند با وزن مولکولی حدود ۸۰ کیلو دالتون می باشند.همچنین نتایج حاصل از تایید وجود لاکتوفرین با استفاده از واکنش رنگی با تترا متیل بنزیدین (TMB) تاییدی بر وجود لاکتوفرین در فراکسیون‌های۰/۷، ۰/۸، ۰/۹ می‌باشد.ونیز پروتئین سنجی با استفاده از آزمایش برادفورد نشان داد که در فراکسیون‌های، ۰/۸ و۰/۹به ترتیب دارای مقادیر ۲۵۶/۷۳، ۹ /۹۲، ۱۰۳/۸۱ میکروگرم بر میلی لیتر می باشند.

۲-۳- نتایج حاصل ازتولید آنتی بادی اختصاصی بر علیه لاکتوفرین در خرگوش:

۱-۲-۳- نتایج حاصل ازتولید آنتی بادی اختصاصی بر علیه لاکتوفرین در خرگوش با آزماش دات بلات:

نتایج بیانگر اتصال اختصاصی آنتی ژن-آنتی بادی بوده و شدت ایجاد رنگ قهوه‌ای با میزان آنتی بادی ارتباط دارد.

[2] Factorielle

الف

کنترل منفی لاکتوفرین ۶۰ µg/ml لاکتوفرین

ب

کنترل منفی لاکتوفرین ۶۰ µg/ml لاکتوفرین

تصویر۱- نتایج حاصل از دات بلات جهت تایید تولید آنتی بادی اختصاصی بر علیه لاکتوفرین شتر

الف- تولیدی آنتی بادی اختصاصی در خرگوش تلقیح شده با لاکتوفرین همراه ادجوانت فروند.

ب- تولیدی آنتی بادی اختصاصی در خرگوش تلقیح شده با لاکتوفرین همراه ادجوانت کیتوزان.

۲-۲-۳- نتایج حاصل از تولید آنتی بادی اختصاصی بر علیه لاکتوفرین در خرگوش با آزماش الایزا:

نتایج نشان دهنده وجود آنتی بادی اختصاصی در سرم خرگوش می باشد(جدول ۱) نتایج نشان داد که میزان تولید آنتی بادی اختصاصی با استفاده از ادجوانت کیتوزان نسبت به ادجوانت فروند بطور کلی بااختلاف معنی دار $\alpha<5\%$ بیشتر می باشد.

جذب نوری پس از کسر Cut off سرم با ادجوانت فروند	جذب نوری پس از کسر Cut off سرم با ادجوانت کیتوزان	جذب نوری، انحراف معیار و Cut off سرم با ادجوانت فروند	جذب نوری، انحراف معیار و Cut off سرم با ادجوانت کیتوزان	رقت های آنتی ژن
۰/۹۴۹	۱/۲۱۲	۱/۴۵۷	۱/۶۷۷	لاکتوفرین با رقت یک به ده
۰/۷۹۱	۱/۰۷۲	۱/۲۹۹	۱/۵۳۷	لاکتوفرین با رقت یک به پنجاه
۱/۰۹۲	۱/۳۹۵	۱/۶۰۰	۱/۸۶۰	لاکتوفرین با رقت یک به صد
۰/۶۰۴	۰/۹۶۷	۱/۱۱۲	۱/۴۳۲	لاکتوفرین با رقت یک به پانصد
		۰/۱۳۲	۰/۱۳۲	
		۰/۱۴۴	۰/۱۴۴	کنترل منفی آنتی بادی (سرم)
		۰/۱۸۲	۰/۱۶۰۴	
		۰/۵۰۸	۰/۴۶۵	

جدول ۲-۲-۳- نتایج جذب نوری در آزمایش الایزا با استفاده از آنتی ژن‌ها وآنتی بادی‌های اختصاصی بر علیه لاکتوفرین خالص همراه با رقت های مختلف و سرم خرگوش تهیه شده با ادجوانت کیتوزان و فروند با رقت یک به ۱۰۰ (با میانگین دو بار تکرار)

۴-بحث

لاکتوفرین در شیر شتر ۴۸ ساعت بعد از زایمان به حداکثر مقدار خود می‌رسد(۶). پروتئین‌های شیر شتر به دو بخش عمده‌ی کازئین و پروتئین‌های آب‌پنیرتقسیم می‌شود. این پروتئین ها یکی از منابع اصلی پپتیدهای فعال زیستی شامل آلفالاکتالبومین، آلبومین ، لاکتوفرین، ایمونوگلوبولین ها می‌باشند(۲).لاکتوفرین دارای خاصیت ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطانی و ضدالتهابی و تنظیم کننده پاسخ‌های ایمنی است(۹).خالص سازی لاکتوفرین از منابع مختلف ازجمله شیر گاو، شتر و انسان انجام می‌گیرد. جهت خالص سازی لاکتوفرین از روش‌های متنوعی استفاده شده که عبارتند از: کروماتوگرافی تبادل یونی ، ژل فیلتراسیون و کروماتوگرافی تمایلی و کروماتوگرافی جدیدبا استفاده از کیتوزان (۹)یکی از رایج‌ترین روش خالص سازی لاکتوفرین استفاده از ستون تبادل کاتیونی است. از آنجائیکه مولکول لاکتوفرین دارای بار الکتریکی مثبت می باشد به گروه های کربوکسیلات دارای بار منفی متصل شده و در غلظت های مختلف نمکی می توان آن را جدا نمود(۱۱).Almehdar وهمکاران ۲۰۱۹ اعتقاد دارند که میزان خلوص لاکتوفرین با استفاده از CM sephadex C-50 حدودا ۷۰ درصد و با استفاده از Heparin-Sepharose حدودا ۹۹ درصد می باشد (۳).یکی از روش های خالص سازی لاکتوفرین با عملکرد بالا، استفاده از ستون تمایلی (شامل آنتی بادی اختصاصی ضد لاکتوفرین) ، می باشد.Broxmeyer و همکاران، ۱۹۸۶ لاکتوفرین را از نوتروفیل انسان با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی ، پرداختند (۵).در مطالعه حاضر جهت تولید و مقایسه آنتی بادی اختصاصی تولید شده ضد لاکتوفرین در خرگوش، از ادجوانت های فروند و کیتوزان استفاده گردید.ابتدا لاکتوفرین با استفاده از روش کروماتوگرافی تبادل یونی ، خالص ،تایید و تعیین غلظت شد.سپس ، ایمن سازی با استفاده از روش تغیر یافته پوارتا انجام و بمنظور تایید و مقایسه میزان آنتی بادی تولیدی از آزمایش‌های دات بلات والایز استفاده گردید. درآزمایش دات بلات، ایجاد لکه‌های قهوه‌ای تایید کننده اتصال آنتی ژن باآنتی بادی بوده که شدت ایجاد رنگ قهوه‌ای با میزان آنتی‌بادی ارتباط دارد .نتایج الایزا نیز وجود غلظت‌های بالایی از آنتی بادی را ثابت نمود،که نتایج اورتاسان و همکاران ۲۰۱۷ را تایید می نماید(۱۰). نتایج نشان داد که میزان تولید آنتی بادی اختصاصی با استفاده از ادجوانت کیتوزان نسبت به ادجوانت فروند بااختلاف معنی دار $\alpha<5\%$ بیشتر می باشد.

Almehdar وهمکاران ۲۰۱۹ جهت تولید آنتی بادی اختصای ضد لاکتوفرین شتر در خرگوش از ادجوانت فروند استفاده کرده و میزان بالائی از آنتی بادی اخصاصی را تولید نمودند این محققین اعتقاد دارند که واکنش متقاطع بین آنتی بادی اختصاصی بر علیه لاکتوفرین شتر و لاکتوفرین انسان و نیز لاکتوفرین گاو کم می باشد (۳).

منابع

1-Adlerova L, Bartoskova A, Faldyna M (2008). Lactoferrin: a review. Veterinarni Medicina, 53, pp: 457–468.

2-Aly E, Ros G & Frontela C (2013).Structure and Functions of Lactoferrin as Ingredient in Infant Formulas. Journal of Food Research; Vol. 2, No. 4.

3-Almehdar, H. A., N. A. El-Baky, A. A. Alhaider, and E. M. Redwan. 2019. Immunogenicity comparison of lactoferrin purified from Saudi Arabia camel clans milk. Hum. Antibodies 27:85–90. https://doi .org/10.3233/HAB-180351.

4-Berlutti F, Pantanella F, Natalizi T, Frioni A, Paesano R, Polimeni N and Valenti P. (2011). Antiviral Properties of actoferrin—A Natural Immunity Molecule. Molecules, 16, pp: 6992-7018.

5-Broxmeyer, H E. Bicknell, D C. Gillis, S. Harris,EL . Pelus,LM. Sledge Jr,G W. Lactoferrin: affinity purification from human milk and polymorphonuclear neutrophils

using monoclonal antibody (II 2C) to human lactoferrin, development of an immunoradiometric assay using II 2C, and myelopoietic regulation and receptor-binding characteristics. Blood cells, 1986. 11(3): p. 429

6-El-Hatmi H, Girardet J, Gaillard J.L, Khorchani T, Hamadi A. (2006). Terapeutic potential of whey proteins of camel colostrums; Microbiol. Hyg. Alim; 18(53), pp: 70-76

7-Mirtajaddini, S,A. Fathi Najafi,M. Vaziri Yazdi ,S,A. Kazemi Oskuee ,R. Majidi,B.2009. Preparation of Chitosan Nanoparticles as a Capable Carrier for Antigen Delivery and Antibody Production.Iranian Gournal of Biotechnology-Manuscript ID: IJB-2009-2871

8-Rascón-Cruz,Q.. Espinoza-Sánchez,EA. Siqueiros-Cendón ,TS . Nakamura-Bencomo,SI. Sigifredo Arévalo-Gallegos,S. Iglesias-Figueroa,BF.(2021). Lactoferrin: A Glycoprotein Involved in Immunomodulation Anticancer, and Antimicrobial Processes. Molecules 2021, 26, 205.https://dx.doi.org/10.3390/molecules26010205,

9-Raei, M., Rajabzadeh, G., Zibaei, S., Jafari, S.M., & Sani, A.M. 2015. Nano-encapsulation of isolated lactoferrin from camel milk by calcium alginate and evaluation of its release. International Journal of Biological Macromolecules, 79:669-673.

10-Urtasun, N., Baieli, M. F., Hirsch, D. B., Martínez-Ceron, M. C., Cascone, O., & Wolman, F. J. (2017).Lactoperoxidase purification from whey by using dye affinity chromatography. Food and Bioproducts Processing, 103, 58–65

11-Yoshida, S., Isolation of lactoperoxidase and lactoferrins from bovine milk acid whey by carboxymethyl cation exchange chromatography. Journal of Dairy Science, 1991. 74(5): p. 1439-1444.