نشریه میکروبیولوژی دامپزشکی
دوره هفدهم، شماره دوم، پاییز و زمستان ۱۴۰۰،
پیاپی ۴۳ : ۴۴-۳۵

JVM Journal of Veterinary Microbiology

مقاله پژوهشی

خالص سازی لاکتوفرین جداشده از شیرگاو بوسیله کرماتوگرافی تمایل

محدثه فرهنگ[۱]، سعید زیبائی*[۲]

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

۲-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

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۰۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۰۱

چکیده

لاکتوفرین یک پروتئین چند عملکردی با خاصیت ضدمیکروبی است که خواص متنوع و شگفت آوری داردو می‌تواند کاندید مناسبی جهت کاربردهای بالینی و تجاری باشد. دربررسی حاضر، ابتدا لاکتوفرین توسط کروماتوگرافی تعویض یونی با استفاده از CM Sephadex C-50 خالص و جهت تایید خالص سازی ، از آزمایش های SDS-PAGE و نیز عدم ایجاد رنگ در حضور تترامتیل بنزدین استفاده گردید. در ادامه خرگوش سفید نر نیوزلندی با ۱۲۰ µg/ml لاکتوفرین و با استفاده از ادجوانت کامل و ناقص فروند به مدت ۶ هفته ، ایمن شد وپس از جدا سازی سرم با آزمایش های دات بلات و الایزا آنتی بادی اختصاصی تایید گردید. جهت خالص سازی آنتی بادی اختصاصی از روش رسوب دهی با سولفات آمونیوم ۴۰ درصد استفاده گردیدکه پس از تایید به سفارز فعال شده با سیانوژن متصل گردید، قسمت آب پنیری آغوز گاو از ستون کروماتوگرافی تمایلی عبورداده شد.بمنظور خالص نمودن لاکتوفرین، برای تشکیل کمپلکسی از آنتی ژن آنتی بادی واکنش داده و در نهایت سایر ترکیباتی که اتصال نیافته‌اند شسته وخارج شدند.خالص سازی لاکتوفرین تایید و غلظت آن با آزمایش برادفورد محاسبه گردید.نتایج تحقیق نشان داد که روش ایمن نمودن، جهت تولید آنتی بادی اختصاصی بر علیه لاکتوفرین روشی مناسب بوده و خالص سازی لاکتوفرین ازشیرگاو با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی دارای بازده ۶۴ درصد می باشد.

کلمات کلیدی: لاکتوفرین، کروماتوگرافی تمایلی

*نویسنده مسئول: سعید زیبائی

آدرس: بخش تحقیق و توسعه فرآورده های بیولوژیک، موسسه تحقیقات واکسن وسرم سازی رازی شعبه شمال شرق ، مشهد ،ایران

پست الکترونیک: S.zibaee@rvsri.ac.ir

مقدمه

شیر بعنوان کامل ترین غذایی است که جدای از نقش معمولی آن در تغذیه انسان، می تواند بعنوان غذای فراسودمند باشدکه برای سلا مت انسان بسیار اهمیت دارد .شیر دارای ترکیبات فعال زیستی (بیو اکتیو ها) مهمی است. بیو اکتیو های شیر به چهار گروه عمده زیر تقسیم می شوند:

۱-بیو اکتیو هایی که موجب فعالیت بهتر سیستم گوارشی بخصوص در بچه ها می شوند. نظیر: β-کازئین – α-کازئین – κ-کازئین ولاکتو فرین

۲-بیو اکتیو هایی که سبب رشد نوزاد می گردند. نظیر :α-لاکتو گلوبولین – β-لاکتوگلوبولین – پاراتورمونP و هورمون رشد- لاکتو فرین-الیکو ساکارید ها

۳- بیو اکتیو هایی که سبب تقویت سیستم ایمنی شده و نقش ایمونولویکی مهمی دارند. نظیر: ایمونوگلوبولین های GوA – لاکتو فرین-پرولاکتین –سایتوکائین ها

۴- بیو اکتیو هایی که نقش ضد میکروبی داشته و نیز قادرند بعنوان پروبیوتیک عمل نمایند. نظیر:لاکتوفرین-الیکو ساکارید ها-لیزوزیم-لاکتوپراکسیداز (۴،۹) .

لاکتوفرین یک گلیکوپروتئین باند شونده به آهن از اعضای خانواده ترانسفرین است که وزن مولکولی آن حدوداً ۸۰ کیلودالتون میباشد .

لاکتوفرین یک پروتئین چند عملکردی با خواص متنوع و شگفت آوری است که می‌تواند کاندید مناسبی جهت کاربردهای بالینی و تجاری باشد. اخیراً مشخص شده که تغذیه خوراکی لاکتوفرین اثرات مفیدی از جمله تعدیل عملکرد سیستم ایمنی، فعالیت ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی در سلامت نوزادان و بزرگسالان در انسان و حیوانات داشته است(۱۰،۱۱). از این محصول فراوری شده کاربردهای صنعتی در فراورده های غذایی؛ دارویی؛ بهداشتی و آرایشی را می توان تولید و تجاری نمود. به طوری که امروزه لاکتوفرین به عنوان مکمل غذایی انسان و حیوانات به کار می‌رود.

شواهدی که تعیین کننده سودمندی لاکتوفرین در فرمول غذایی می باشد از جمله بهبود فلور طبیعی روده، افزایش فریتین سرم، افزایش سطح هماتوکریت و کاهش بیماری‌های تنفسی وجود دارد علاوه بر این لاکتوفرین مانع اکسیداسیون لیپید در فرمول غذایی کودکان می‌گردد. این پروتئین در اکثر ترشحات از جمله شیر، اشک، بزاق و به میزان زیاد در گرانول های اختصاصی نوتروفیل‌ها یافت می‌شود خواص بیولوژیکی آن شامل تنظیم جذب آهن در روده، محرک رشد سلول‌های حیوانی، خواص ضد التهابی، تعدیل کننده فعالیت سیستم ایمنی بدن و فعالیت ضد باکتریایی، ویروسی و توموری می‌باشد لاکتوفرین به عنوان جزئی از سیستم ایمنی ذاتی معرفی شده است و در عین حال در واکنش‌های ایمنی اختصاصی نیز به طور غیر مستقیم دخالت می‌کند. به علت موقعیت استراتژیک لاکتوفرین در سطح مخاط یکی از اولین سیستم‌های دفاعی است که از ورود عوامل تهاجمی میکروبی از راه مخاط جلوگیری می‌کند.). لاکتوفرین دارای خواصی ویژه ای همچون خاصیت ضد باکتریایی؛ ضد ویروسی؛ ضد انگلی و ضد سرطان می باشد ؛ بعلاوه سبب افزایش فعالیت سیستم ایمنی در بدن نیز می گردد.

با توجه به ارزش خوراکی-دارویی لاکتوفرین،گستردگی اثرات تنظیم کنندگی سیستم ایمنی توسط آن و استفاده جهانی، مطالعات گسترده ای در مورد لاکتوفرین صورت گرفته است(۱۰،۱۱،۲)

بنابراین با توجه به اهمیت فراوان بیو اکتیو مهم شیر (لاکتوفرین) و لزوم استفاده از آن برای افزایش سطح ایمنی و مبارزه با پاتوژن‌ها خالص سازی مناسب این پروتئین زیست فعال مهم اهمیت ویژه‌ای دارد.

مواد و روش‌ها

مواد

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

روش ها

خالص سازی لاکتوفرین

جهت کروماتوگرافی تمایلی نیاز به تهیه آنتی بادی اختصاصی بر علیه لاکتوفرین می باشد لذا در ابتدا لاکتوفرین خالص گردید .خالص سازی لاکتوفرین بر اساس روش راعی و همکاران (Raei et al., 2015) (روش تغییر یافته یوشیدا)

(Yoshida .,1991) انجام گرفت (۱۱،۱۳). جهت انجام تحقیق،آغوز شیر گاو از گاوداری معتبر اطراف مشهد تهیه گردید.

پس از چربی زدایی توسط سانتریفوژ (۳۰۰۰g-۳۰ دقیقه) وعبور دادن از کاغذ واتمن(N 7) ، کازئین شیر توسط سانتریفوژ دور بالا (۳۰۰۰۰g-۱۵۰ دقیقه) از آب پنیر جدا شده و پس از عبور از صافی توسط کروماتوگرافی تعویض‌یونی با استفاده از رزین CM Sephadex C-50 خالص گردید. فراکسیون‌های حاصل از شستشوی رزین توسط بافر فسفات حاوی غلظت های مختلف نمکی (۰/۳ تا ۰/۹ مولار) و سپس اندازه گیری میزان پروتئین در این فراکسیون‌ها با استفاده از اسپکتروفوتومتری با طول موج nm ۲۶۰ انجام گرفت، از آنجا که لاکتوفرین پروتئین کاتیونی با PH ایزوالکتریک مثبت حدود ۹ می‌باشد. PH ایزوالکتریک بالا در لاکتوفرین باعث ایجاد بار مثبت در PH خنثی می‌گردد حال آنکه اکثر پروتئین‌های شیر اسیدی هستند بنابراین ستون تبادل کاتیونی در PH خنثی روشی معمول برای جداسازی لاکتوفرین از آب پنیر حاصل از شیر است.

در ادامه با استفاده از SDS- PAGE وزن مولکولی و وجود تک باند با وزن مولکولی در محدوده ۸۰ کیلودالتون در آن‌ها مشخص شد. سپس با استفاده از آزمایش برادفورد غلظت پروتئین‌ها تعیین و با استفاده از آزمایش تولید رنگ در حضور ترا متیل بنزیدین(TMB) وجود لاکتوفرین و یا لاکتو پراکسیداز در فراکسیون‌های جمع آوری شده مورد بررسی قرار گرفت.

تایید وجود لاکتوفرین در فراکسیون‌ها با استفاده از واکنش رنگی با ترا متیل بنزیدین (TMB).

مخلوط واکنش شامل H2O2 ۳۰ درصد، TMB 88 mM و بافر سیترات 10 mM، PH=6 به نسبت‌های ۱:۱۰:۱۰۰ می‌باشد. شروع واکنش در حضور آنزیم لاکتوپراکسیداز و پر اکسید هیدروژن سبب اکسیداسیون ترامتیل بنزیدین و ظهور رنگ آبی در فراکسیون‌های حاوی این آنزیم می‌شود(۸).

لاکتوفرین خالص شده با استفاده از کیسه دیالیز تغلیظ و در ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

خالص سازی لاکتوفرین به روش کروماتوگرافی تمایلی:

بدلیل نیاز به آنتی بادی اختصاصی بر علیه لاکتوفرین در ابتدا آنتی بادی در خرگوش نهیه گردید بدین منظور ایمن سازی با استفاده از روش تغیر یافته پوارتا انجام شد(۱).بدین منظوربه خرگوش سفید نیوزلندی دو ماهه نر دو کیلو گرمی یک میلی لیتر آنتی ژن(لاکتوفرین خالص شده) به میزان ۱۲۰µg/ml 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 سه تزریق یادآور به فاصله دو هفته انجام و در هفته هشتم پس از خونگیری، سرم جدا گردید. در تزریق اول از ادجوانت کامل فروند و در تزریق های دوم و سوم به جای ادجوانت کامل فروند از ادجوانت ناقص فروند استفاده گردید. آزمایش‌های تاییدی برای تولید آنتی بادی اختصاصی بر علیه لاکتوفرین با استفاده از روش های دات بلات (انتقال بر روی صفحه کاغذ نیتروسلولزی و واکنش با آنتی ژن لاکتوفرین) و الایزا انجام شدند.

جهت خالص سازی آنتی بادی ، سرم خرگوش با PBS رقیق و جهت رسوب پروتئین، آمونیوم سولفات ۴۰٪ قطره قطره به محلول اضافه شد .جهت تایید خالص سازی و تعیین میزان خلوص آنتی بادی از الکتروفورز به روش SDS-PAGE استفاده گردید.

پس از آماده سازی بید(به یک میلی لیتر از بید Sepharose 6B، ۱۲/۵ml آب دیونایز اضافه و بمدت۲۴ ساعت در۲۵ درجه سنتی گراد نگهداری شد) پنج بار متناوبا با ۱۲/۵ ml محلول کربنات-بیکربنات شستشو و خشک گردید. و سپس ۴/۴ml کربنات-بیکربنات سرد اضافه وروی یخ قرار گرفته و به مدت ۳۰ دقیقه هم زده شد ۱۳ میکرولیتر از سیانوژن بروماید محلول دراستونیتریل افزوده وروی یخ قرار گرفته و به مدت ۳۰ دقیقه هم زده ،و در ادامه با ۱۲/۵ml از کربنات –بیکربنات سرد سه بار با ۱۲/۵ml از آب دیونایز شتشوانجام و خشک گردید.

به بید شسته و خشک شده، ۵ میلی لیتر آنتی بادی دیالیز شده(با استفاده ازکربنات-بیکربنات) با غلظت ۱mg/mlاضافه گردید و سپس همزده شد (به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد).جهت تایید اتصال آنتی بادی به بید،طول موج محلول 280nm حاوی آنتی بادی قبل وبعد از بارگذاری بر روی بید توسط نانو دراپ اندازه گیری شد.آنگاه با ۱۲/۵ ml کربنات-بیکربنات سرد و آب دیونایز سه بار شتشو و خشک گردید به بیدهای خشک شده ۱۲/۵ml از بافر بلاکینگ (گلایسین و اتانول امین) افزوده و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق هم زده شد(مرحله مسدود سازی).در ادامه با ۱۲/۵ml از محلول PBS/NaN3 ۵ بار شتشو گردید . ذخیره در ۱۲/۵ml محلول PBS/NaN3 در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت.

بدین منظورژل آماده شده، به ستون منتقل و با ml ۵ محلول PBS/NaN3 و سپس با ۵ml از اسید سیتریک ۰/۱ مولار شستشو داده شد و با PBS به تعادل رسید. نمونه (لاکتوفرین خالص شده با روش کروماتوگرافی تعویض یونی) متعادل شده با ۰/۲Na2HPO4 مولار با PH=۷ وارد ستون گردید. تا لاکتوفرین به آنتی بادی پلی‌کلونال متصل گردد. در ادامه جهت جدا کردن پروتئین مورد نظر با PH های مختلف (۷/۳، ۶/۸، ۴/۹، ۳/۳، ۱/۸ شستشو داده و فراکسیون‌ها مختلف جمع آوری گردید. و در ادامه ml ۵ از محلول PBS10X به همه فراکسیون ها اضافه و بربا استفاده ازPBS/NaN3 دیالیز گردید (۲۴ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد) .پس از کروماتوگرافی تمایلی به منظور تعیین میزان

خلوص پروتئین و مشخص کردن محدوده وزن مولکولی آن، از روش الکتروفورز SDS-PAGE استفاده گردید.

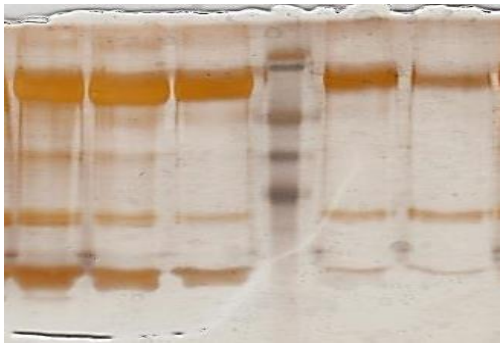
سپس لاکتوفرین آغوز گاو با روش کروماتوگرافی تمایلی خالص گردید .بدین منظو پس از مراحل چربی زدایی و حذف کازئین میزان ۲ میلی لیتر از آب پنیر حاصله (متعادل شده با Na2HPO4 0.2M، PH = 7) همراه ۵ml اسید سیتریک ۰/۱M و ۵ml بافرPBS پس از شستشوستون با PBS/NaN3 واردستون کروماتوگرافی تمایلی آماده شده (آماده سازی بید، بارگذاری آنتی بادی بر روی بید) گردید. در ادامه جهت جدا کردن پروتئین مورد با PH های مختلف به ترتیب (۷/۳، ۶/۸، ۴/۹، ۳/۳، ۱/۸) شستشو داده شد. فراکسیون‌های حاصل در لوله‌های آزمایش مجزا جمع آوری شدند.پس از کروماتوگرافی تمایلی به منظور تعیین میزان خلوص پروتئین و مشخص کردن محدوده وزن مولکولی آن، از الکتروفورز SDS-PAGE و سپس رنگ آمیزی با نیترات نقره استفاده گردید.

نتایج

نتایج حاصل از خالص سازی لاکتوفرین:

نتایج نشان داد که فراکسیون‌های۰/۴، ۰/۵، ۰/۶، ۰/۷، ۰/۸ مولار NaCl در ۵۹۵ نانومتر بیشترین جذب را داشته و نتایج حاصل از SDS-PAGE فراکسیون‌های حاصله، وجود تک باند با وزن مولکولی حدود ۸۰ کلیو دالتون درغلظت‌های ۰/۶، ۰/۷، ۰/۸، ۰/۹مولار را نشان داد. (تصویر۱).

همچنین نتایج حاصل از تایید وجود لاکتوفرین با استفاده از واکنش رنگی با تترا متیل بنزیدین (TMB) تاییدی بر وجود لاکتوفرین در فراکسیون‌های۰/۴، ۰/۵، ۰/۶، ۰/۷، ۰/۸ می‌باشد.ونیز پروتئین سنجی با استفاده از آزمایش برادفورد نشان داد که در فراکسیون‌های۰/۴، ۰/۵، ۰/۶، ۰/۷، ۰/۸ به ترتیب دارای مقادیر ۳۳۲/۹۱– ۱۹۷/۰۸–۵۴۶/۵۸ -:۵۰۹/۵۸–۹۲/۹۱ میکروگرم بر میلی لیتر می باشند.



تصویر۱- نتایج حاصل از تایید وجود لاکتوفرین در فراکسیون‌های حاصل از ستون تعویض یونی با استفاده از الکتروفورز به روشSDS-PAGE
شماره ۱- فراکسیون ۰/۷ - شماره ۲- فراکسیون۰/٦- شماره ۳- فراکسیون۰/٥- شماره ٤- مارکر- شماره ٥- فراکسیون ۰/۸ – شماره ٦- فراکسیون ۰/۸

نتایج حاصل ازتولید آنتی بادی اختصاصی بر علیه لاکتوفرین:

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

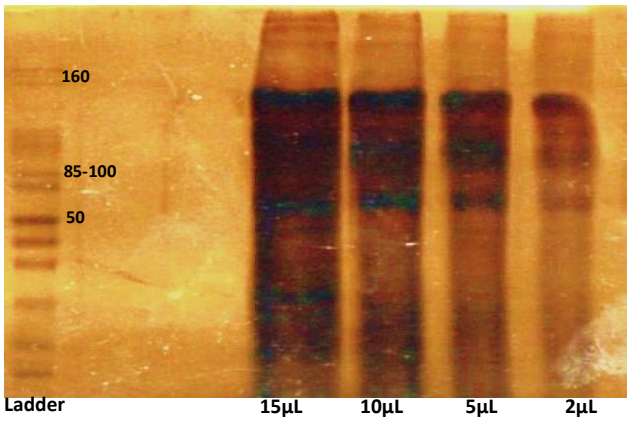
تصویر ۲- تصویر نتایج حاصل از دات بلات تایید آنتی بادی اختصاصی بر علیه لاکتوفرین گاو

آنتی بادی سرم خرگوش تلقیح شده با لاکتوفرین به همراه ادجوانت کامل و ناقص فروند نتایج حاصله تایید کننده وجود آنتی بادی اختصاصی در سرم خرگوش می باشد(جدول ۱)

جدول ۱. نتایج(دو بار تکرار) پلیت کوت شده با آنتی ژن‌ها وآنتی بادی‌های اختصاصی بر علیه لاکتوفرین خالص شده از آغوز گاو که با نسبت ۱:۱۰۰ رقیق شده است.

	OD1	OD2
تلقیح لاکتوفرین با ادجوانت کامل و ناقص روند	1.677	1.537
کنترل منفی	0.144	0.156

آنتی بادی سرم خرگوش تلقیح شده با لاکتوفرین گاوی همراه با اجوانت فروند با نسبت ۱:۲۰ رقیق شده است. نتایج حاصل از الکتروفورز آنتی بادی خالص شده با استفاده ازرسوب دهی با سولفات آمونیوم نشان دهنده باند پروتئینی ۱۶۰ کیلو دالتونی (دال بر خلوص **IgG** می باشد.

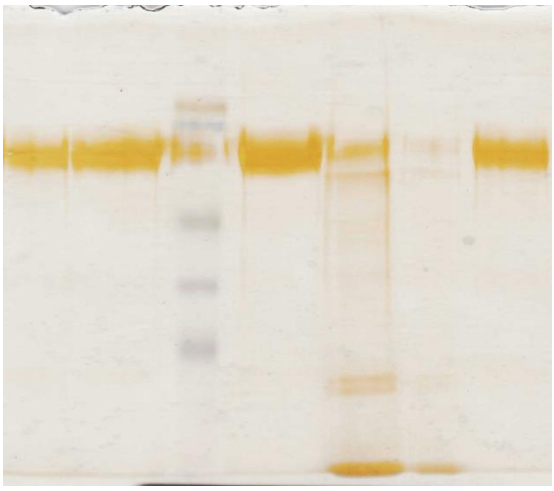


تصویر۳-تصویر آنتی بادی خالص شده با سولفات آمونیوم با استفاده از الکتروفورز به روش SDS-PAGE نشان دهنده باند پروتئینی ۱۶۰ کیلو دالتونی است که تایید کننده خلوص IgG می باشد.

پروتئین سنجی با استفاده از آزمایش برادفورد میزان۱۴۱۱/۵۷ µg/ml را نشان می دهد

نتایج حاصل از کروماتوگرافی تمایلی:

نتایج حاصل از بررسی حضور لاکتوفرین در گرادیان‌های مختلف به دست آمده از کروماتوگرافی تمایلی به روش الکتروفورز SDS-PAGE ، وجود تک باند با وزن مولکولی حدود ۸۰ کیلو دالتون را در فراکسیون هایی با PHهای ۷/۳، ۶/۸، ۳/۴،۳/۹، ۱/۸ را نشان داد. همچنین نتایج حاصل ازواکنش رنگی با تترا متیل بنزیدین (TMB) تاییدی بر وجود لاکتوفرین درفراکسیون هایاد شده می باشد. همچنین غلظت پروتئین در فراکسیون‌هایی با PH ۷/۳، ۶/۸، ۳/۴،۳/۹، ۱/۸ به ترتیب ۱۶۷۹/۷۵ ، ۸۵۲/۲۵، ۱۱۰۳/۵، ۱۶، ۵/۲۵ بوده و بازده خلوص لاکتوفرین ۶۴ درصد محاسبه گردید.



تصویر٤- نتایج حاصل ازالکتروفورز SDS-PAGE فراکسیون‌های حاصله، وجود تک باند با وزن مولکولی حدود ۸۰ کیلو دالتون را در فراکسیون‌هایی(۱و۲و٤و٥و۷) به ترتیب با PHهای ۷/۳، ٦/۸، ۳/٤،۳/۹، ۱/۸ نشان می‌دهد.شماره ۳ مارکر می باشد.

بحث

با توجه به اینکه لاکتوفرین پروتئین زیست فعال مهمی است خالص سازی لاکتوفرین از منابع مختلف ازجمله شیر گاو، شتر و انسان انجام می گیرد. 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 (۳،۵) .با توجه به طبیعت کاتیونی لاکتوفرین یکی از رایج‌ترین روش خالص سازی استفاده از ستون تبادل کاتیونی ازجمله کربوکسی متیل سفادکس است که مرتبه خالص سازی لاکتوفرین با استفاده از ستون تبادل کاتیونی کم است (۱۱) . بدین ترتیب پژوهش بمنظور بدست آوردن روشی برای جدا سازی و خالص سازی لاکتوفرین با خلوص و عملکرد بالا، انجام شد که با استفاده از ستون تمایلی (شامل آنتی بادی ضد لاکتوفرین)، موفق به خالص سازی لاکتوفرین گاوی با خلوص بالا گردید.

بدین منظور جهت تهیه لاکتوفرین ابتدا لاکتوفرین با استفاده از روش کروماتوگرافی تبادل یونی جدا سازی، تایید ،خالص و تعیین غلظت گردید.

در ادامه پس از تهیه آنتی ژن (لاکتوفرین) با استفاده از کروماتوگرافی تعویض یونی و قبل از تهیه ستون

تمایلی، ایمن سازی با استفاده از روش تغیر یافته آکویلا انجام شد(۱).

آزمایش‌های دات بلات والایزا بمنظور تاییدحضور آنتی‌بادی پلی‌کلونال اختصاصی در سرم حیوان آزمایشگاهی ایمن شده انجام گرفت. در تصویر دات بلات، ایجاد لکه‌های قهوه‌ای بیانگر اتصال اختصاصی آنتی ژن-آنتی بادی می‌باشد و شدت ایجاد رنگ قهوه‌ای با میزان آنتی‌بادی ارتباط دارد و نتایج الایزا نیز وجود آنتی بادی اختصاصی را ثابت نمود که می‌توان گفت غلظت‌های بالایی از آنتی بادی پس از ایمن نمودن خرگوش حاصل شده است . نتیجه به دست آمده، نتایج سایر محققین را تایید می نماید(۱۲).

در ادامه خالص سازی آنتی بادی با استفاده از روش رسوب با سولفات آمونیوم، دیالیز در بافر PBS ، بر اساس مطالعه هدی و سچاویک،۱۹۷۸ و نئو و همکاران، ۱۹۸۶ انجام گرفت(۲،۳) . تیتر بالایی از آنتی بادی(۱۴۱۱/۵۷ میکروگرم در میلی لیتر) برعلیه لاکتوفرین بدست آمد. مشاهده باند در محدوده 160KD در آزمایش الکتروفورز به روش SDS-PAGE تاییدی برای خالص سازی آنتی بادی اختصاصی(تایید شده با دات بلات و الایزا) می باشد . نتایج حاصل از الکتروفورز SDS-PAGE خلوص بالای این پروتئین بعد از تنها یک مرحله خالص سازی را تایید می‌نماید. این نتایج با مطالعات سایر محققین (کاواکامی و همکاران ، ۱۹۸۷ و مد ، ۱۹۹۲) مطابقت دارد(۶،۷).

آماده سازی ستون کروماتوگرافی تمایلی با استفاده از روش تغییر یافته ایوان و همکاران انجام گرفت. برای شناسایی لاکتوفرین به دست آمده از آزمایش الکتروفورزSDS-PAGE استفاده گردید. Paul Evanجهت خالص سازی آنتی بادی ضد لاکتوفرین از کروماتوگرافی تمایلی استفاده نمود و آنتی بادی خالص شده به روش تمایلی، به ماتریکس (CL 6B فعال شده با آمینو کاپروئیک اسید) ، متصل و آغوز چربی زدایی شده گاو از ستون عبور داد شد سپس با KCNS، ۰/۳ مولار لاکتوفرین را شستشو داد و میزان خلوص لاکتوفرین ارزیابی گردید (۷).

در پژوهش حاضر آنتی بادی خالص شده، به ماتریکس (6B فعال شده با سیانوژن بروماید)، متصل شد، و آغوز چربی زدایی شده گاو از ستون عبور داده شد و سپس با اسید سیتریک ۰/۱ مولار و Na2HPO4, ۰/۲ مولار ، شستشو گردید .نتایج نشان داد که از ۴ میلی لیتر شیر ۱میلی گرم لاکتوفرین به دست آمده است بنابراین بازده خلوص لاکتوفرین ۶۴ درصد محاسبه گردید.بایلی و همکاران، ۲۰۱۴ و اورتاسان،۲۰۱۷ اعتقاد دارند که با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی قدرت خالص سازی افزایش خواهد یافت(۲،۱۲).

کاویی و همکاران، ۱۹۹۹ با استفاده از بافر استات ۰/۰۰۱ موار وNacl ۰/۱۵ مولار با PH=۴/۳، از ۱۹ میلی لیتر شیر بدون چربی گاو ۴میلی گرم لاکتوفرین به دست آوردند(۶).

بروکسیمرو همکاران، ۱۹۸۶ به توصیف جدا سازی لاکتوفرین از نوتروفیل انسانی که با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی پرداختند. لاکتوفرین متصل شده به آنتی بادی با بافر فسفات ۰/۱ مولار با PH=۲/۷، شستشو داده شد(۳).

نتیجه گیری نهایی

به طور کلی دست آورد پژوهش حاضر ،ایمن سازی خرگوش جهت تولید آنتی بادی اختصاصی بر علیه لاکتوفرین وافزایش بازده خالص سازی لاکتوفرین استخراج شده از آغوز گاو با استفاده از روش کروماتوگرافی تمایلی (۶۴ درصد) می‌باشد.

منابع

1. Aguila La O, A. Herrera Puerta,A C. Velázquez,WT.(2000). Isolation and structure-functional characterization of human colostral lactoferrin. *Biotecnología Aplicada*, ***17***: 177-182.
2. Baieli, M. F., Urtasun, N., Miranda, M. V., Cascone, O., & Wolman , F. J. (2014). Bovine lactoferrin purification from whey using Yellow HE-4R as the chromatographic affinity ligand. *Journal of Separation Science, **37***:484–487.
3. Broxmeyer, H E. Bicknell , D C . Gillis ,S. Harris,EL . Pelus,LM. Sledge Jr,G W.(1986). 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*, ***11***: 429-439
4. Gobbetti , M. , Minervini , F. , and Rizzello , C.G.(2007) . Bioactive peptides in dairy products . In: Handbook of Food Products Manufacturing Y.H. Hui (ed). *John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ*, **2**:489 – 517.
5. Hirsch,DB. Martínez Álvarez,LM. Urtasun, N. Baieli,MF. Lázaro-Martínez,JM. Glisoni,RJ. Miranda, MV. Cascone,O . Wolman,FJ.(2020). Lactoferrin purification and whey protein isolate recovery from cheese whey using chitosan mini-spheres . *International Dairy Journal*, **19**:4764-4771
6. Kawi, K,Hagiwara,S.Anri,A.Nagahatg,H. (1999). Lactoferrin concentration in milk of bovine clinical mastitis. *Veterinary research communications*, **23**: 391-398.
7. Mead, P.E.(1992). Cloning and sequencing of the cDNA for bovine lactoferrin: *Doctor of Philosophy in Biochemistry Thesis, Massey University*,**4**:59-61
8. Morrison, M. and P.Z. Allen.(1982). Lactoperoxidas: Identification and Isolation from Harderian and Lacrimal Glands. *Science,* **17**:1626-1628
9. Park, Y.W.(2009).Bioactive Components in Milk and Dairy Products: *B lackwell Publishers, 2121 State Avenue, Ames, Iowa, USA* **.50014-8300**
10. 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.
11. 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*, **26**:205
12. 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
13. Yoshida, S. (1991). Isolation of lactoperoxidase and lactoferrins from bovine milk acid whey by carboxymethyl cation exchange chromatography. *Journal of Dairy Science,* **74**: 1439-1444.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 17, Issue 2,
Autumn & Winter 2021

Purification of lactoferrin isolated from cow's milk by affinity chromatography

Mohadeseh Farhank [1], Saied Zibaee*[2]
1-Master postgraduate, Payame Noor University of Mashhad, Amozegar 96, Mashhad, Iran
2-Associate professor Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, Iran
Received: 28 October2021 *Accepted: 20 February2022*

Abstract
Lactoferrin is a multifunctional protein that has various and amazing properties with antimicrobial properties ,can be a good candidate for clinical and commercial applications. Lactoferrin was purified by ion exchange chromatography using CM sephadex C-50 and to confirm the purification, SDS-PAGE tests and the absence of dye in the presence of tetramethylbenzene were used In this study, in order to isolate lactoferrin, first the whey proteins of milk using ion exchange chromatography by Sephadex C-50 was purified and SDS-PAGE test was performed to confirm the purification as well as no dye in the presence of tetramethyl benzidine. New Zealand white male rabbits were immunized with 120 µg / ml lactoferrin and using complete and incomplete Freund's adjuvant for 6 weeks and after serum isolation were confirmed specific antibodies by dot blot and ELISA. To purify of the specific antibody, the precipitation method with 40% ammonium sulphate was used. After confirmation, it was attached to cyanogen-activated Sepharoz. The whey portion of bovine colostrum was passed through the affinity chromatographic column. In order to purify lactoferrin, it reacts to form a complex of antibody antigens, and eventually other unbound compounds are washed and removed. Purification of lactoferrin was confirmed and its concentration was calculated by Bradford test. The results showed that the immunization method was used to produce specific antibodies against Lactoferrin is a suitable method and purification of lactoferrin from bovine milk using affinity chromatography has an efficiency of 64%.

Keywords: Lactoferrin, Cow milk, Affinity chromatographic

**Corresponding author: Saied Zibaee*
Address: Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, Iran
E. mail: S.zibaee@rvsri.ac.ir