

تعيين خصائص ثبات الغلوبولينات المناعية IgGs لجمل مُمُنَّع تجاه سم العقرب وتنقيتها وكشفها
Purification, detection, and stability characterization of IgG from camel immunized with scorpion venom

محمد كرم قصاص¹، عبد القادر عبادي²، عبد الحكيم نتوف¹

Mohamed Karam Qassas¹, Abdul Qader Abbady² and Abdul Hakim Natouf¹

¹ كلية الصيدلة، جامعة دمشق، قسم الصيدلانيات والتكنولوجيا الصيدلانية، سورية

² هيئة الطاقة الذرية، قسم التقانة الحيوية، سورية

الملخص Abstract:

تدخل الغلوبولينات المناعية في صلب الكثير من التطبيقات الحيوية، بما فيها معالجة الأمراض. فقد أنتجت واستخدمت لاستقصاء العديد من المستضدات والممرضات المدروسة عالمياً ومحلياً. حالياً وباستخدام البيولوجيا الجزيئية والهندسة الوراثية الحديثة يُسعى لاستثمار نوع معين من الأضداد الخاصة بالجمال لإنتاج مصول فعالة ضد ممرضات لاستخدامها ترياقاً مضاداً لسموم الكائنات الخطرة، خاصةً سم العقرب. في هذا العمل، عزلت صفوف الأضداد من مصل جمل ممنوع بالترسيب بسلفات الأمونيوم، من ثم الكروماتوغرافيا السائلة السريعة للبروتين (FPLC). ومن أجل التخلص من ثملات سلفات الأمونيوم استخدم إزالة الاستملاح بالعمود. ومن ثم نقيت IgGs باستخدام عمود بروتين A وعزلت أنماط IgGs باستخدام عمود Superdex. اختبرت IgGs الجمل المنقاة وحددت خصائصها بمقاييسه الممتز المناعي المرتبط بالإنزيم ELISA الذي أثبت بدوره فعالية ونوعية أنماط IgGs ضد سم العقرب. شكلت هذه الموجودات خطوة مهمة باتجاه دراسات الصياغة الصيدلانية لهذه الأضداد الواعدة.

- Immunoglobulins are at the heart of many biological applications, including the treatment of diseases. They have been produced and used to investigate many antigens and pathogens that are studied globally and locally. Currently, using the methods of molecular biology and genetic engineering, it is sought to invest a specific type of antibodies that is characteristic of camels to produce effective sera against pathogens or to be used as toxins antidote of dangerous creatures, especially scorpion venom. In this work, antibody classes were isolated from immunized camel serum by ammonium sulfate precipitation and fast protein liquid chromatography (FPLC). In order to get rid of ammonium sulfate residues, desalting column was used. Then IgGs were purified using protein A column and IgGs types were separated using a Superdex column. Purified camel IgGs were tested and characterized using ELISA, which in turn proved the efficacy and quality of the isolated IgGs types against scorpion venom. These findings constitute an important step towards conducting pharmaceutical formulation studies for these promising antibodies.

الكلمات المفتاح Key words:

أضداد الجمل، سم العقرب، ترياق، سلفات الأمونيوم، FPLC، ثبات الأضداد

Camel antibodies, scorpion venom, antidote, ammonium sulfate, FPLC, IgG stability

المقدمة Introduction:

يعد التسمم بلدغة العقرب من مشاكل الصحة العامة الخطيرة في العديد من بلدان العالم. يفصح سنويا عما يقارب 100000 حادثة في شمال إفريقيا، كما يتعرض 30000-45000 شخص سنوياً في تونس لللدغة العقرب، يعاني نحو 1000 من المصابين أعراضاً حادة، ويصل عدد الوفيات إلى 70 شخصاً، ويكون الأطفال أكثر عرضة للتأثر بالسّم من البالغين [1, 2]. تنتشر العقارب من جنس *Leiurus* في المناطق الجنوبية من سوريا في الأراضي الصخرية غير المأهولة بالسكان، كما تم اكتشاف نوع جديد من هذا الجنس من العقارب السامة في محافظتي حمص والحسكة [3].

تعد المعالجة المناعية هي الخيار النوعي الوحيد لمعالجة حالات التسمم، وعادة ما تكون هذه العلاجات مكونة من أضداد عديدة النسيلة $F(ab)_2$ محضرة ومنقاه بطرائق معيارية مطورة. طورت طريقة جديدة حديثاً لتنقية شدف $F(ab)_2$ من الأضداد دون استخدام كروماتوغرافيا التنقية ودون وجود ربيطة نوعية، وذلك باستخدام مذيلات العوامل الفعالة على السطح [4]، إلا أن تلك الطريقة بحاجة للمزيد من الأبحاث لإثبات كفاءتها، حيث إن الأضداد وحيدة النسيلة وعديدها التي استخدمت في تلك الدراسة لا تمتلك أي فعالية دوائية ما أعاق التأكد من فعالية الأضداد بعد التنقية باستخدام تقانة تبرهن ثبات الإلفة بين الضد والمستضد مثل ELISA.

اتجهت أنظار الباحثين في علم المناعة مؤخراً نحو عائلة الجمليات لتمكن ضد سموم خطيرة مثل سم العقرب ودراسة مدى ارتباط الغلوبولينات المناعية بالسّم وقدرتها على تعديل السم في المختبر، تتميز الجمال بأن مصلها يحتوي على الأضداد التقليدية فضلاً عن احتوائه على أضداد ثقيلة السلسلة مجردة من السلسلة الخفيفة، تمتلك ميزات الأضداد التقليدية ذاتها إلى جانب ميزات أخرى متعلقة بإمكانية تحضير أضداد نانوية من القسم المتغير variable الموجود على السلاسل الثقيلة بوزن جزيئي منخفض (حوالي 15 كيلودالتون) [1, 5]. وللحصول على الفائدة المرجوة من هذه الأضداد كان لا بد من فصلها وتنقيتها، إذ طورت طريقة لفصل تحت صفوف الأضداد المختلفة من فريق البحث المكتشف للأضداد ثقيلة السلسلة بالاعتماد على أعمدة فصل protein A و protein G [6].

هدف هذا البحث هو الوصول إلى طريقة تنقية للغلوبولينات المناعية للجمل الممنع بسم العقرب وفصلها للوصول إلى مردود

عالٍ من هذه الغلوبولينات بشكلها المطوي الفعال بعد التخلص من بروتينات المصل الأخرى، بما يخدم أهداف الصياغة الصيدلانية، ومن ثم فصل الأضداد ثقيلة السلسلة عن الأضداد التقليدية ومقارنة ثبات الأنماط المختلفة من الأضداد تجاه شروط التخريب القسري.

المواد والطرائق Materials and Methods**سم العقرب**

استخدم سم العقرب المحضر بالطريقة الكيميائية، إذ تطبق سلسلة من التيارات الكهربائية لصدم العقرب وإخراج السم. يغمر جسم العقرب في محلول ملحي من أجل توصيل كهربائي أفضل وصدمه بالقطب، وذلك باستعمال بطارية بسيطة 12 فولت [7, 8].

اختبار ترسيب الأضداد من المصل الدموي باستخدام التركيز الأمثل من سلفات الأمونيوم:

يزداد ذوبان البروتين بشكله الكروي عند إضافة ملح بتركيز أقل من 0.15 M، وتسمى هذه العملية بالتمليح *Salting-in*، في حين أن التركيز الأعلى من الأملاح تؤدي إلى تناقص ذوبان البروتين بعملية تسمى الترسيب بالتمليح *Salting-out* وتؤدي إلى ترسيبه [9]. تحفز الأملاح التي رسبت البروتين ثباته من الناحية الشكلية، على عكس الأملاح التي أسهمت في زيادة ذوبانه الذي يكون عادة ممسحاً *Denaturants* للبروتين [10]. رسبت الأضداد باستخدام تراكيز متزايدة من سلفات الأمونيوم تحت خيمة أمان حيوي نظيفة ومعقمة، إذ بدئ في كل خطوة بحجم 10 مل ضمن أنبوب 50 مل ويضاف ملح سلفات الأمونيوم شيئاً فشيئاً مع التحريك، حسب كمية سلفات الأمونيوم الواجب إضافتها للحصول على درجة الإشباع المطلوبة بالاعتماد على برنامج *Ammonium sulfate calculator* by ©EnCor Biotechnology Inc. بإدخال الحجم البدئي للمصل ونسبة إشباع سلفات الأمونيوم البدئية، والنهائية، ودرجة حرارة الترسيب للحصول على كمية سلفات الأمونيوم الواجب إضافتها مقدرة بالغرام، والحجم النهائي الذي سنحصل عليه بعد ذوبان كامل كمية سلفات الأمونيوم المضافة، يعتمد البرنامج لحساب عدد غرامات سلفات الأمونيوم الواجب إضافتها على المعادلة التالية:

وتركها لمدة 5 دقائق بدرجة حرارة المخبر وقرئت الامتصاصية بجهاز thermos-scientific multiskan go على موجة طولها 595 نم.

الرحلان الكهربائي للبروتينات

حضرت العينات البروتينية بما يكافئ 5 مكغ من كل عينة للترحيل، من إضافة سدس حجم العينة من دائرة تحضير العينة (Sample Loading buffer 6X) المحتوي على الملح الصودي لأزرق البروموفينول وبيتا-مركابتو إيتانول الذي يسهم في تمسخ البروتينات لتسهيل ترحيلها، سخنت أنابيب العينات في حوض من الماء المغلي لمدة 10 دقائق. حقن 20 ميكرو لتر من كل عينة في آبار الهلامية، مع استعمال واسم بروتيني معياري معروف الوزن الجزيئي في أول بئر للمقارنة. حيث حضرت الهلامات باستخدام هلامية عليا بتركيز 4% لتكديس العينات وهلامية سفلى بتركيز 12% لترحيل العينات. رحلت العينات عبر الهلامية بتطبيق حقل كهربائي بفولطية 90 V، حتى دخول العينات في هلامية الفصل، بعدها رفعت الفولطية إلى 120 V باستخدام نظام BioRad mini-Protein II system وفق تعليمات الشركة المنتجة حتى نهاية الرحلان.

بعد الانتهاء من الرحلان الكهربائي صبغت الهلامية staining بالطريقة السريعة، بزيادة الحساسية، برفع درجة الحرارة في أثناء الصبغ وإزالة الصباغ [13]. غمرت الهلامية في الصباغ مدة 5 دقائق باستخدام 50 مل أزرق الكوماري coomassie blue بعد التسخين لمدة 30 ثانية في المايكرويف ومن ثم أزيل الصباغ destaining بغمر الهلامية في حوض يحوي 100 مل محلول إزالة الصباغ الحاوي على حمض الخل 5% وميتانول 10% والتسخين في المايكرويف لمدة دقيقة، ثم تترك ساعة مع الرج إلى حين ظهور العصابت بعد زوال اللون عن باقي الهلامية.

الكشف عن الأضداد بتقنية لطخة ويسترن western blot للعينات البروتينية بعد ترحيلها

تعد لطخة ويسترن طريقة مفيدة جداً للكشف النوعي عن البروتينات بعد فصلها على هلامية الأكريلاميد تبعاً لأوزانها الجزيئية، فضلاً عن إمكانية الكشف الكمي اعتماداً على سماكة العصابة التي تعبر عن كمية البروتين [14]. رُحلت العينات في اختبار لطخة ويسترن على هلامية الأكريلاميد، وقصت أطراف الهلامية بعد نهاية الترحيل، ومن ثم وضعت على غشاء لطخة ويسترن بين طبقات من أوراق الترشيح المشبعة بدائرة النقل

$$G = \frac{Sat(M_2 - M_1)}{(SatM - (SpecVol/1000 * 132.14 * SatM * M_2))}$$

G: كمية سلفات الأمونيوم لواجب إضافتها لكل 1 لتر
Sat: عدد الغرامات لكل لتر الموجودة في محلول مشبع لسلفات الأمونيوم
M2: المولارية المراد الحصول عليها
M1: المولارية البدئية
SatM: المولارية لمحلول مشبع من سلفات الأمونيوم
SpecVol: حجم نوعي الذي تسبب إضافة 1 غ من سلفات الأمونيوم زيادته لمحلول ≈ 0.54 مل يأخذ البرنامج ضمن حساباته تغير كل من SatM، Sat و SpecVol بتغير درجة حرارة الحوض.

يحضن الأنبوب لمدة ساعة في الدرجة 10 °C مع الرج ثم ينبذ بسرعة $10000 \times g$ لمدة 20 دقيقة في درجة حرارة 4 °C. توزن الرسابة في كل خطوة من خلال طرح وزن الأنبوب الفارغ من وزن الأنبوب المحتوي على الرسابة وتحل باستخدام دائرة PBS pH=7.4 بمقدار 1-2 مل لكل 1 غ راسب، ويسحب الطافي لينقل 10 مل منه إلى أنبوب جديد ويعاد ترسيب البروتينات المتبقية في المصل وفق تدرج إشباع لسلفات الأمونيوم [11].

مقاييس تراكيز العينات البروتينية بطريقة برادفورد

استخدمت طريقة برادفورد المميزة بالسرعة والحساسية العالية لمقاييس البروتينات بتراكيز من رتبة ميكروغرام/مل بعد كل عملية تنقية [12]، بهدف معرفة المردود الكامل من البروتينات وحساب الحجم المناسب الواجب ترحيله على هلامية الأكريلاميد لمعرفة مكونات كل عينة، بعد كل عملية تنقية، حيث حضر كاشف برادفورد Roti@-quant من تمديد حجم من المحلول المركز بأربعة أمثال هذا الحجم من الماء المقطر، حضرت سلسلة معيارية من خمسة محاليل من الألبومين البقري BSA معلومة التراكيز (0، 0.2، 0.4، 0.6، 0.8 مغ/مل)، وضع 5 ميكرو لتر من كل من هذه المحاليل في بئرين متجاورين ضمن صفيحة 96 بئراً، من التركيز الأقل حتى التركيز الأعلى، صفر القياس على محلول تمديد العينات البروتينية PBS، استخدم أيضاً 5 مكل من محلول كل عينة مجهولة التركيز في بئرين متجاورين وبتمديدات مختلفة يمكن أن تصل حتى 100/1 بهدف الوصول إلى مجال الخطية لطريقة المقاييس المعتمدة، ثم أضيف 160 مكل من الكاشف في كل بئر ويمزج بنقر الصفيحة

فلترت الدوائى والمحاليل المستخدمة بما في ذلك العينات الحاوية على البروتين عبر غشاء نتروسلولوز 0.45 ميكرومتر. وهى العمود بدائرة المبادلة (دائرة فسفات 20mM pH=7.4 + كلوريد الصوديوم 150 mM)، مررت العينة بحجم 5 مل عبر العمود بواسطة الجهاز بسرعة تدفق 20 مل/دقيقة وتتبع مرور الأضداد عبر النظام وعمود المبادلة من قياس الامتصاصية في موجة طولها 280 nm، جمعت الأضداد بعد عملية المبادلة وركزت باستخدام أنابيب التركيز 10000 kDa vivaspin.

تنقية الغلوبولينات المناعية باستخدام كروماتوغرافيا الألفة

Affinity chromatography

استخدم عمود الفصل 5 ml HiTrap Protein A column (Pharmacia) بغية التخلص من البروتينات الأخرى التي رُسبت بسفلات الأمونيوم مع الغلوبولينات المناعية لكون العمود مميزاً بإلفته للغلوبولينات المناعية IgG، إذ إنها ترتبط مع البروتين A من خلال ثلم كاره للماء بين المنطقتين الثانية CH2 والثالثة CH3 على الجزء الثابت من السلسلة الثقيلة [15]، غسل العمود بداية بالماء المقطر والمعقم، ومن ثم مرر 25 مل من دائرة الارتباط وحقن 5 مل من العينة بوجود دائرة الارتباط Binding buffer (phosphate pH = 7.0 20 mM sodium) بحيث أتاح ارتباط الغلوبولينات المناعية ذات الألفة للبروتين A بالعمود وسمح لباقي البروتينات بالتدفق لتجمع في أنبوب للترحيل في خطوة لاحقة، ومن ثم استخدمت دائرة الشطف elution buffer (acid pH = 0.15 M NaCl, 0.58 % acetic) التي تضمن فك ارتباط الغلوبولينات المناعية بالعمود. أخذت عينات للترحيل من كل عينة جُمعت عند ظهور قمة على كروماتوغرام الامتصاصية (280 nm) بهدف كشف محتوى هذه العينات من بروتينات مصل الجمل وكشف كفاءة التنقية لأضداد الجمل.

فصل أنماط الغلوبولينات المناعية للجمل بتقنية كروماتوغرافيا

الاستبعاد الحجمي chromatography (SEC)

استخدم عمود Superdex 200 لفصل أضداد الجمل ذات السلسلة الثقيلة عن الأضداد التقليدية، إذ جرى اعتماد دائرة غسل washing buffer (20 mM sodium phosphate + 150 mM sodium chloride pH = 7.4) بعد أن غُسل العمود بضعفي حجمه بالماء المقطر بمعدل تدفق 1 مل/دقيقة ومن ثم

transfer buffer (25 mM tris – base, 200 mM glycine, 0.1% SDS and 20% methanol) وضع القالب بين صفيحتي جهاز النقل الكهربائي TE 77 PWR (GE lifescience) semi-dry transter unit بهدف نقل العصابات من الهلامية إلى غشاء نتروسلولوز 0.45 ميك (Bio-Rad) باستخدام تيار كهربائي، طبق حقل كهربائي 100 أمبير لمدة ساعة لضمان تمام الانتقال، بعد انتهاء الوقت حرر الغشاء من القالب وغسل بدائرة الغسل.

حُضن الغشاء في محلول الإحصار Blocking (حليب منزوع الدسم 5%) لمدة ساعتين ثم غسل مراراً بمحلول الغسل (pH=7.4 PBS المحتوي على توين 20 بتركيز 0.05%). اختبرت ثلاثة أضداد مختلفة بالتمديدات المناسبة للكشف عن الغلوبولينات المناعية على الغشاء وهي أضداد الأرنب الممنع بمصل الجمل (Bethyl Laboratories R-a-camel (Inc.)، وأضداد الأرنب الممنع بمزيج أضداد الجمل النانوية محضر في المخبر R-a-Nb Home-made وأضداد الأرنب الممنع بالغلوبيولينات ثقيلة السلسلة من مصل الجمل محضر في المخبر (R-a-IgG2,3)، إذ حُضن غشاء النتروسلولوز في خطوة لاحقة بأضداد الماعز الممنع بمصل الأرنب والمدمجة مع إنزيم البيروكسيداز (Bethyl G-a-R-HRP (Laboratories Inc.) ومن ثم أضيفت ركازة البيروكسيداز 3-أمينو-9-إيثيل كاربازول (AEC) المحضرة ضمن دائرة سترات الفسفات pH=5 مع الماء الأكسجيني بتركيز نهائي 0.015% لإظهار العصابات.

المبادلة الدائرية باستخدام كروماتوغرافيا مبادلة دائرية

Buffer exchange chromatography

تستخدم المبادلة الدائرية بهدف التخلص من بقايا سفلات الأمونيوم في البروتين الذي رسب وغيرت الدائرة المحتوية على الغلوبولينات المناعية [10]، استخدم جهاز AKTA™ Pure 150 بعد تركيب عمود HiPrep 26/10 Desalting محشو بحييات السيفادكس sephadex G-25 fine ذات القدرة على فصل البروتينات بخاصية الاستبعاد الحجمي عن الشوارد والمكونات غير المرغوب بها التي قد تؤثر سلباً على طي البروتين وثباته وكفاءة الفصل في الخطوات التالية. حيث غسل العمود بالماء المقطر والمفلتر كما هو الحال بالنسبة إلى جميع الدوائى المستخدمة في تقنيات كروماتوغرافيا التنقية للبروتينات،

مواقع ارتباط البروتينات الأخرى على سطح الأبار بمحلول الإحصار المكون من حليب مقشود 5% في دائرة فسفات ملحية (5% skimmed milk in PBS pH=7.4) مع الحضانة لمدة ساعة بدرجة حرارة المختبر. بعد غسل الأبار من بقايا محلول الإحصار أضيفت ثلاث مكررات بتركيز (10000:1) من كل من العينات المراد اختبارها مع الشواهد وحُضنت لمدة ساعة في درجة حرارة المختبر. كشف عن ارتباط المستضدات بالأضداد باستخدام المصل الموافق وهو مصل الأرنب الحاوي على أضداد نوعية للأضداد ثقيلة السلسلة Rabbit anti-IgG_{2,3} بتركيز (200:1) التي أثبتت نوعيتها في اختبار التبصيم المناعي. أضيفت أمصال محتوية على أضداد ماعز منع بمصل الأرنب موسومة بالبيروكسيداز بتمديد (3000:1) Gout anti rabbit-HRB (Bethyl Laboratories Inc.) مع الحضانة مدة ساعة في درجة حرارة المختبر. في الخطوة الأخيرة أضيف المداد الخاص بالبيروكسيداز -3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) (Sigma) بعدها أوقف التفاعل باستعمال حمض الكبريت 0.5 M ثم قيست المطيافية الناتجة وذلك في موجة طولها 450 نانومتر باستخدام قارئ صفائح Thermo Scientific, Multiskan Go. اعتمد اختبار one-way ANOVA لمقارنة ثبات أنماط أضداد الجمل IgG باستخدام Prism v7.0 software (GraphPad باستخدام Statistics, USA) *p<0.05.

النتائج Results

ترسيب أضداد الجمل بملح سلفات الأمونيوم

انطلقنا في هذه الدراسة من عينة مصل دم من جمل منع بسم العقرب، إذ اختبرت الشروط المثلى من درجة إشباع بملح سلفات الأمونيوم الضرورية لترسيب أضداد الجمل بنوعيتها التقليدية والثقيلة السلسلة، وقد استخدمت لهذه الغاية عدة نسب من الإشباع. رُسم الخط المستقيم لقراءات السلسلة المعيارية لألبومين مصل البقر BSA ضمن مجال خطي من التراكيز بوحدة مغ/مل الذي عبر عنه بمعادلة يمكن منها معرفة التركيز المجهول للأضداد لكل عينة بعد معرفة وسطي قراءات الامتصاصية للمكررين وضرب الناتج بمعامل التمديد الخاص بالعينة (كما هو موضح في الشكل 1، a)، كما حسب وزن الراسب الناتج في كل مرحلة وحله باستخدام PBS، ومن ثم حسب تركيز البروتين عن

مررت دائرة الغسل لمدة ساعتين بمعدل التدفق ذاته، ثم مررت عينة الغلوبولينات المناعية النقية الناتجة عن عملية التنقية السابقة بعد أن ركزت باستخدام أنبوب vivaspin 10000 kDa إلى حين وصول العينة إلى حجم 500 مكل وبتكريز لا يزيد عن 10 مغ/500 مكل، حقنت العينة بعد تمريرها على فلتر 0.22 ميكرومتر وجمعت عينات عند كل قمة امتصاصية تظهر على كروماتوغرام الامتصاصية لترجيلها في خطوة لاحقة. استخدم لهذه النقطة AKTA explorer FPLC system. رُجّل 5 ميكروغرام من كل عينة جمعت بالتزامن مع ظهور قمة على كروماتوغرام الفصل بعمود Superdex 200 على هلامة الأكريل أميد، وذلك بعد أن حضرت العينات كما هو موضح سابقاً ومن ثم صبغت باستخدام أزرق الكومازي وأزيل الصباغ لتظهر العصابات الدالة على الأضداد.

اختبار ثبات أنماط أضداد الجمل IgG تجاه الحرارة والأكسدة

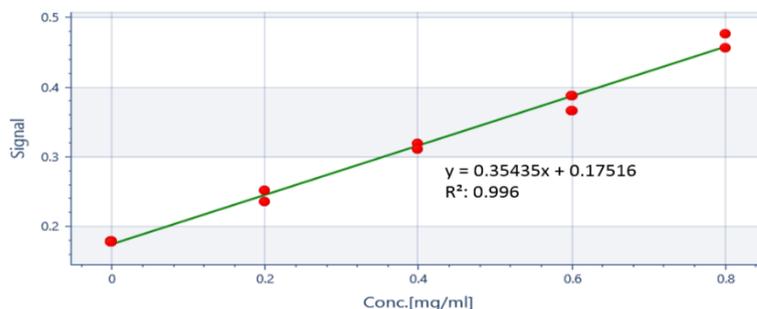
تعد دراسات الثبات ذات أهمية خاصة للأضداد ذات الفعالية الدوائية ضمن مدة التخزين، كما أن لها دوراً في تعرف الطرائق التي يسلكها الضد في تخريبه، فضلاً عن المعلومات التي قد تجمع عن المواد الناتجة عن التخريب [16]، حضرت عينات بتركيز 100/1 من كل من العينات التي جمعت عند ظهور كل قمة على الكروماتوغرام في أثناء تجربة فصل أنماط غلوبولينات الجمل المناعية باستخدام تقنية الاستبعاد الحجمي بهدف مقارنة أنماط أضداد الجمل ثقيلة السلسلة بالتقليدية. عرضت هذه العينات لشروط تخريب قسري باستخدام درجات مختلفة من الحرارة (60, 75, 90) °C لمدة ساعة، واستخدم الماء الأوكسجيني بتركيز (0.1, 0.3, 1%) لمدة ساعة أيضاً بوصفه شرطاً آخر للتخريب القسري ومقارنة ثبات الأضداد تجاه الأكسدة. قورنت فعالية الأضداد بعد التعرض لشروط التخريب بتقانة المقايسة المناعية واستخدمت الأضداد غير المعرضة لشروط التخريب القسري بوصفه شاهداً مرجعياً للمقارنة بالعينات المخربة.

المقايسة المناعية الإنزيمية:

تُبت سم العقرب في أبار صفيحة إليزا (BRAND plates®- immunograd™) بتركيز 2 مكغ/بئر باستخدام دائرة كربونات الصوديوم لليوم التالي، إذ غسلت الصفيحة ثلاث مرات بدائرة PBS باستخدام جهاز Thermo Scientific, Wellwash وكررت عملية الغسل بعد كل خطوة حضانة. في حين غطيت

طريق المعادلة آنفة الذكر (كما هو موضح في الشكل 1، b)

a



b

تركيز البروتين المنحل (مغ/مل) باستخدام برادفورد	وزن الراسب (غ)	الحجم النهائي (مل)	الكمية المضافة من أمونيوم سلفات (غ)	نسبة إشباع سلفات الأمونيوم النهائية %	نسبة إشباع سلفات الأمونيوم البدئية %	الحجم البدئي من المصل (مل)
2.15	0.8	10.62	1.14	20	0	10
68.5	0.97	10.66	1.21	40	20	10
36	2.98	10.7	1.3	60	40	10
38.5	0.64	10.76	1.4	80	60	10
33.2	1.17	10.83	1.51	100	80	10

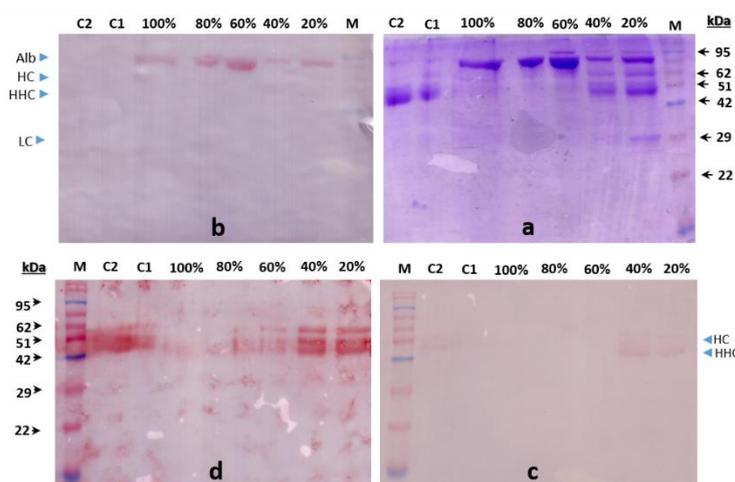
الشكل (1) المنحني المعياري لمقايسة البروتينات بطريقة برادفورد ونتائج الترسيب بسلفات الأمونيوم

(a) يظهر الشكل خطية ضمن مجال تراكيز من ألبومين المصل البقري BSA مع معامل تصحيح $R^2 = 0.996$ ، حيث استخدمت صفيحة زراعة خلوية 96 بئراً ووضع 5 مكل ضمن بئرين متجاورين من كل من تراكيز السلسلة (0، 0.2، 0.4، 0.6، 0.8 مغ/مل) مع استخدام دائرة الفوسفات الملحي PBS المستخدم لتمديد العينات البروتينية كشاهد، أضيف 160 مكل من كاشف برادفورد وقرنت الامتصاصية بجهاز thermos-scientific multiskan go في موجة طولها 595 نم ورسم الخط المستقيم المعبر عن خطية الطريقة بواسطة برنامج SkanIt software 4.1 for microplate readers، جدول مراحل إضافة سلفات الأمونيوم للمصل للوصول إلى درجات الإشباع المراد اختبارها بوصفها مراحل ترسيب لمصل الجمل في درجة حرارة 10 °C، ووزن الراسب الناتج في كل مرحلة، فضلاً عن التركيز النهائي بعد حل الرسابة باستخدام PBS والمحسوب باستخدام معادلة الخطية لسلسلة تراكيز الألبومين باستخدام كاشف برادفورد.

التبصيم المناعي قدرات متفاوتة على كشف العصابات الخاصة بكل مكون لمصل الجمل الممنع بسم العقرب، إذ أبدت أضعاف الأرنب الممنع بأضعاف الجمل ثقيلة السلسلة R-a-IgG 2,3 نوعية لكشف السلاسل الثقيلة من الأضعاف التقليدية أو الأضعاف ثقيلة السلسلة، دون أن تكشف عن الأضعاف خفيفة السلسلة في الأضعاف التقليدية، كذلك الأمر أبدت أضعاف الأرنب الممنع بالأضعاف النانوية التي تمثل المنطقة المتغيرة من الأضعاف ثقيلة السلسلة نوعية للكشف عن ذات السلاسل الثقيلة مع حساسية أقل. من ناحية أخرى أبدت أضعاف الأرنب الممنع بمصل الجمل الكامل نوعية وحساسية عالية لألبومين الجمل المصلي دون أن تبدي أية الفة لغلوبولينات الجمل المناعية. تؤكد هذه النتيجة نوعية أضعاف الأرنب الممنع بالأضعاف ثقيلة السلسلة R-a-IgG 2,3 تجاه غلوبولينات الجمل IgG (الشكل 2، c، d)، ما يوجه نحو استخدامها في اختبارات المقايسة المناعية الإنزيمية للمقايسة النوعية لهذه الأضعاف.

الرحلان الكهربائي للبروتينات والتبصيم المناعي

ظهرت على هلامة الأكريلاميد بعد صبغها بأزرق الكومازي العصابات الخاصة بكل من الأضعاف التقليدية وثقيلة السلسلة بما يتوافق أكثر مع الشاهد الإيجابي الأول المحتوي على مزيج من الغلوبولينات المناعية المنقاة من مصل الجمل عند الترسيب بتركيز إشباعي 20% من سلفات الأمونيوم، وعصابات خاصة بالأضعاف ثقيلة السلسلة فقط للعينات التي خضعت لرفع التركيز الإشباعي من سلفات الأمونيوم من 20% إلى 40%، بما يتوافق مع الشاهد الإيجابي الثاني المحتوي على الأضعاف ثقيلة السلسلة IgG2,3 النقية المحضرة في دراسات سابقة [17]، كما لوحظ ظهور العصابة الخاصة بألبومين مصل الجمل بطول ≈ 90 كيلو دالتون عند كل التراكيز الإشباعية المجربة مع ملاحظة زيادة كثافة العصابة بالتراكيز الإشباعية العالية (60-80-100%) مقارنة بالتركيزين (20-40%) (الشكل 2، a). بينت الأضعاف النانوية المختلفة والتي استخدمت في اختبار



الشكل (2) نتائج ترحيل العينات المرسبة بسلفات الأمونيوم بعد الصبغ بكومازي ولطخة ويسترن

(a) صبغة كومازي بعد ترحيل العينات المرسبة بنسب إشباع متزايدة من سلفات الأمونيوم بعد الواسم العياري (M) مع شاهد إيجابي بحوي مزيج أضعاف الجمل كاملة (C1) و شاهد إيجابي ثان بحوي أضعاف الجمل ثقيلة السلسلة (C2) IgG2,3. يمكن تمييز 3 عصابات لأضعاف الجمل في العينة المرسبة بتركيز إشباعي 20% وتمثل كل من السلسلة الثقيلة للضد التقليدي (HC) والسلسلة الثقيلة للضد التقليدي (HHC) والسلسلة الخفيفة للضد التقليدي (LC) بشكل متوافق مع الشاهد C1. عند رفع التركيز الإشباعي إلى 40% تظهر عصابة دالة على ترسب المزيد من الأضعاف ثقيلة السلسلة بشكل متوافق مع الشاهد الثاني (b). (c) و (d) صور غشاء نترات السليلوز بعد التنصيم المناعي العينات الخاضعة لرحلان كهربائي نفسها كما في a وبدلاً عن الصبغ بكومازي تم نقل العينات إلى الغشاء والكشف عن العصابات بإضافة 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) بوصفها ركازة لإنزيم البيروكسيدز المدمج مع الضد المضافي في الخطوة الأخيرة (3000/1) G-a-R-HRP. إذ اختبر في R-a-Camel (b) للكشف عن أضعاف الجمل غير أن العصابات التي ظهرت تمثل الألبومين مصل الجمل في جميع مراحل الترسيب دون ظهور أي عصابة على الشواهد الإيجابية، في (c) اختبر R-a-Nb (500/1) الذي أظهر العصابات الخاصة بالسلاسل الثقيلة لأضعاف الجمل التقليدية وثقيلة السلسلة. في (d) R-a-IgG 2,3 (200/1) أظهر العصابات الخاصة بالسلاسل الثقيلة لكامل أضعاف الجمل.

العينات فضلاً عن بقايا سلفات الأمونيوم الشكل (3)، (a).

تنقية غلوبولينات الجمل المناعية باستخدام كروماتوغرافيا الألفة

أظهرت نتائج الرحلان الكهربائي وجود أضعاف الجمل المناعية عند الترسيب بسلفات الأمونيوم بتركيز إشباعي حتى 40% كما أظهرت وجود ألبومين مصل الجمل في العينات التي رُسبت بهذا التركيز. وبهدف الحصول على الغلوبولينات المناعية IgG نقياً استخدم عمود Protein A ذو الألفة لهذا النوع من الأضعاف، إذ ارتبط الجزء الأكبر من الأضعاف بالعمود في أثناء تمرير محلول الارتباط في حين تدفقت باقي البروتينات وظهرت القمة الأولى المعبرة عن هذا التدفق (Flow throw (Ft)، بعد مراحل مستقيضة من الغسل شُطف الأضعاف Pure المرتبطة بالعمود باستخدام محلول الشطف وجمعت العينات المرافقة لظهور قمة على الكروماتوغرام. قويس مردود الأضعاف بعد تنقيتها بطريقة برادفورد، ليُرخل ما يعادل 5 مكغ من كل عينة على هلامة الأكريلاميد وصبغت بعد ذلك بملون كومازي، ظهرت العصابات

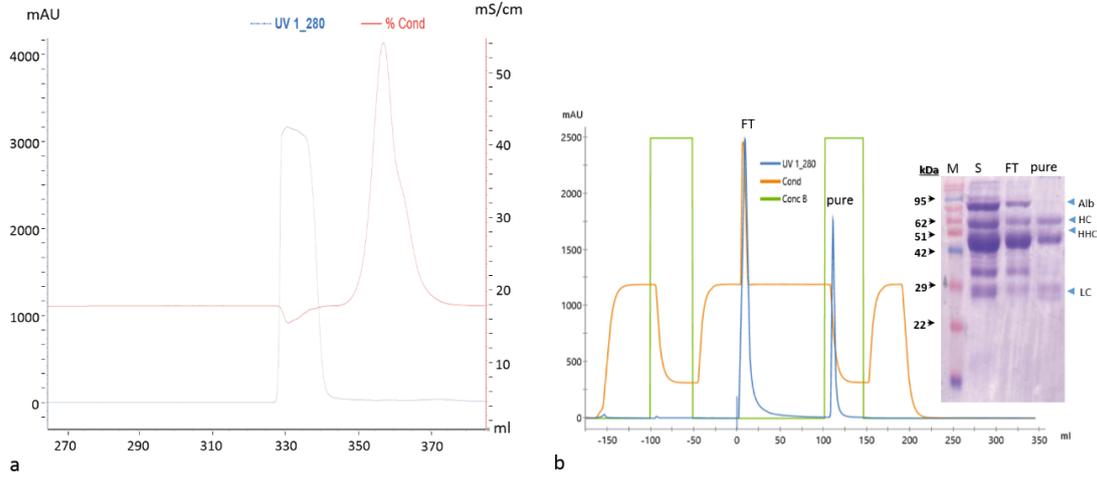
المبادلة الدائرية باستخدام كروماتوغرافيا المبادلة الدائرية

Buffer exchange chromatography

اعتمد تركيز الإشباع 40% للحصول على أكبر مردود ممكن من أضعاف IgG للجمل دون ترسيب البروتينات الأخرى المرافقة كالألبومين بكميات كبيرة. بعد ترسيب أضعاف الجمل كان لا بد من التخلص من بقايا سلفات الأمونيوم والشوارد والأملاح التي قد تؤثر في طي البروتين وذوبانه، كما أنها قد تؤثر تأثيراً سلبياً في أعمدة التنقية المراد استخدامها في خطوات تالية. استخدم عمود HiPrep 26/10 Desalting، حيث جمعت العينة المحتوية على البروتينات والمرافقة لظهور القمة الأولى المتعلقة بالامتصاصية absorbance في موجة طولها 280 nm وهو طول موجة القياس الخاص بالبروتينات مع الدائرة الجديدة المستخدمة للمبادلة، في حين لوحظ ظهور القمة الخاصة بالمكونات المرافقة للعينة من شوارد وأملاح استدل عليها بتبدل في الناقلية الكهربائية ما يؤكد التخلص من هذه المكونات الحاوية على العديد من الشوارد الخاصة بدائرة PBS المستخدم في حل

من مردود الأضداد إلى جانب الألبومين مع التدفق الخاص بالقيمة الأولى FT ما قد يفسر بالتركيز العالي للأضداد في العينة المراد تنقيتها الشكل (3، b).

الخاصة بالسلاسل الثقيلة HC والخفيفة LC الخاصة بأضداد الجمل التقليدية وكذلك ظهرت عصابة ثخينة للأضداد ثقيلة السلسلة HHC تشير إلى مردود أعلى من الأضداد التقليدية بشكل نقي في العينة Pure مع اختفاء تام للعصابة الخاصة بالألبومين مصال الجمل Alb، في حين لوحظ هروب جزء كبير



الشكل (3) تنقية غلوبولينات الجمل المناعية باستخدام عمود البروتين A بعد التخلص من بقايا سلفات الأمونيوم بالمبادلة الدائرية

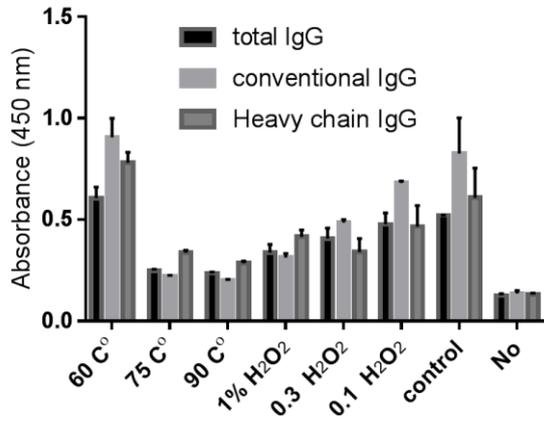
(a) المسح الطيفي وتغيرات الناقلية خلال المبادلة الدائرية باستخدام جهاز تنقية البروتينات (AKTA pure 150) المجهز بعمود HiPrep 26/10 Desalting، ضبط الحد الأعلى للضغط قبل وبعد العمود عند 0.5 و 0.15 ميلي باسكال على الترتيب، حقنت عينة بحجم 5 مل وضبط معدل التدفق في أثناء عملية التنقية عند 10 مل/د. تمثل القمة الأولى الامتصاصية عند 280 nm مشيرة إلى خروج البروتين مع دائرة الفسفات المستخدمة بوصفها دائرة مبادلة عند ناقلية 18 ميلي سيمينز/سم. تمثل القمة الثانية تغير الناقلية عند مرور مكونات الدائرة الخاصة بالعينة المحقونة والمحتوية على بقايا سلفات الأمونيوم مع بقايا المكونات الملحية المرافقة عند ناقلية 54 ميلي سيمينز/سم، (b) يظهر المسح الطيفي للبروتينات عند طول موجة 280 nm خلال التنقية باستخدام جهاز AKTA Pure 150 protein purification system المزود بعمود protein A. حيث استخدم دائرة الفوسفات كدائرة ارتباط binding واستخدم محلول حمض الليمون 0.1 M، pH= 3 بوصفه محلول شطف elution، وضبط الحد الأعلى للضغط قبل العمود وبعده على 0.5 و 0.7 على الترتيب، ومعدل التدفق خلال التدفق عبر العمود على 10 مل/د. حقنت عينة بحجم 5 مل في أثناء تمرير دائرة الارتباط حيث ظهرت القمة الأولى التي تمثل خروج البروتينات غير المرتبطة، ومن ثم مرر محلول الشطف لتظهر القمة الثانية التي تمثل خروج البروتينات ذات الالفة للعمود. (inset) توضح الصورة المدخلة هلامة الأكريل أميد نتيجة الصبغ بكمزاي بعد ترحيل كل من العينة الأساسية المحقونة قبل التنقية (S)، والبروتينات المتدفقة دون أن ترتبط بالعمود (FT) خلال تمرير دائرة الارتباط حيث تظهر عصابة الألبومين Alb بشكل أساسي، والغلوبولينات المناعية النقية التي خرجت مع دائرة الشطف (Pure) حيث ظهرت العصابات الدالة على السلسلة الثقيلة للأضداد التقليدية HC والعصابة الدالة على السلسلة الثقيلة للأضداد ثقيلة السلسلة HHC، والعصابة الدالة على السلسلة الخفيفة للأضداد التقليدية LC دون أي أثر لعصابة الألبومين. يظهر في الخط الأول الواسم العياري (M) من (Vivantis).

من كل من العينات المجموعة عند كل قمة وصبغ هلامة الأكريلاميد بأزرق الكومازي تبين أن القمة الأولى تمثل فائض من العينة يحوي مزيج مكونات مماثلة للعينة الأساسية المحقونة ضمن العمود، في حين كان مردود الأضداد التقليدية أكبر من مردود الأضداد ثقيلة السلسلة في القمة الثانية، وظهرت الأضداد ثقيلة السلسلة نقيّة في القمة الثالثة ما يؤكد كفاءة عملية الفصل

فصل أنماط الغلوبولينات المناعية IgG للجمل باستخدام تقنية الاستبعاد الحجمي Superdex 200

استخدم عمود Superdex 200 لفصل مكونات أضداد الجمل ذات الأوزان الجزيئية المختلفة بتقنية الاستبعاد الحجمي، لوحظ في الكروماتوغرام ظهور ثلاث قمم متتالية، بعد ترحيل 5 مكغ

أعلى في درجات الحرارة 75 و 90 °C، وكذلك الأمر كان ثبات الأضداد ثقيلة السلسلة أفضل من ثبات الأضداد التقليدية عند التراكيز الأعلى من الماء الأكسجيني 1%، في حين كانت الأفضلية للأضداد التقليدية في التركيز 0.3%. تشير النتائج إلى مقاومة أعلى لشروط التخریب للأضداد ثقيلة السلسلة في الشروط الأكثر قساوة في حين كان ثبات الأضداد التقليدية أعلى في الشروط الأقل قساوة، وتبقى اختبارات الثبات طويلة الأمد في شروط الحفظ الأمثل هي المحدد الأكثر دقة لثبات أنماط الأضداد المختلفة في أثناء الزمن (الشكل 5).



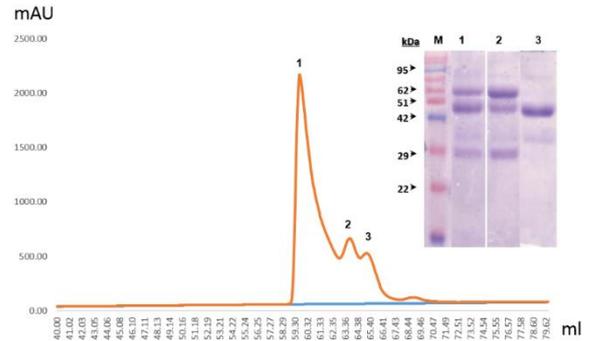
الشكل (5) المقايسة المناعية الإنزيمية لعينات أضداد الجمل المعرضة لشروط تخریب قسري

يوضح الشكل نتائج المقايسة المناعية الإنزيمية لأضداد الجمل IgG الكاملة والتقليدية وثقيلة السلسلة قبل وبعد تطبيق ستة شروط تخریب قسري باستخدام ثلاث درجات حرارة مرتفعة وثلاث تراكيز مختلفة من الماء الأكسجيني، حيث ثبت في الصفحة 2مكغ/بئر سم العقرب (3 مكررات لكل شرط) مع وجود شاهد سلبي دون تثبيت أي مستضد. في الخطوة اللاحقة لإضافة أضداد الجمل بتمديد (1/10000) تم استخدام R-a-IgG 2,3 بوصفه ضد نوعي للكشف عن أضداد الجمل، ومن ثم أضيف ضد النهائي المدمج مع إنزيم البيروكسيدياز G-a-R-HRP، واستخدمت ركازة TMP الخاصة بإنزيم البيروكسيدياز في الخطوة الأخيرة ثم أضيف حمض الكبريت 0.5 مول/لتر لإنهاء التفاعل وقرئت الامتصاصية في موجة طولها 450 نم.

المناقشة Discussion:

تختلف نسبة إشباع سلفات الأمونيوم المستخدمة في أثناء فصل المصل إلى مكوناته Fractionation لترسيب الأضداد بين نوع حيوان تجربة وآخر، وعادة ما يتم تحديد نسبة الإشباع الأمثل المناسبة تجريبياً [20, 21]. هدف هذا العمل إلى تحديد نسبة إشباع سلفات الأمونيوم الأمثل لترسيب كامل أضداد IgG متعددة

بتقنية الاستبعاد الحجمي التي أسهمت في تنقية هذا النوع المميز من أضداد الجمل (الشكل 4).



الشكل (4) فصل أنماط أضداد الجمل باستخدام عمود superdex 200

جرى حقن 0.5 مل من العينة الناتجة عن التنقية بعمود بروتين A بعد أن جرى تركيزها باستخدام vivaspin 10000 kDa ليصبح تركيزها ≈ 20 مغ/مل، حيث مررت قبل الحقن على فلتر 0.22 ميكرومتر، مرر الماء بمدة ساعتين بتدفق 1 مل/د، ومن ثم مررت دائرة الغسل washing buffer أيضا لمدة ساعتين ومن ثم حقنت العينة وجمعت العينات المرافقة لظهور كل قمة. (inset) تبين الصورة المدخلة نتيجة الصبغ بكموازي بعد ترحيل ما يعادل 5 مكغ من كل عينة ناتجة عن القمم (1، 2، 3) إلى جانب الواسم العياري، إذ تمثل القمة الأولى (1) مكونات العينة الأساسية التي ظهرت معبرة عن فائض في تركيز العينة، إذ تحتوي العصابت الدالة على كافة أنماط أضداد الجمل، في حين يلاحظ في القمة الثانية (2) ظهور العصابتين الداليتين على السلسلة الثقيلة والخفيفة لأضداد الجمل التقليدية تقريباً عند 60 و 27 كيلودالتون على الترتيب بشكل أوضح من عصابة الأضداد ثقيلة السلسلة، في حين ظهرت عند القمة الثالثة (3) العصابة الدالة على السلسلة الوحيدة المميزة للأضداد ثقيلة السلسلة بشكل نقي عند تقريباً 45 كيلودالتون.

اختبار ثباتية أنماط أضداد الجمل تجاه الحرارة والأكسدة

أبدت أنماط أضداد الجمل المختلفة قدرة كل منها على تعرف المستضد النوعي (سم العقرب) المثبت على صفيحة الإليزا دون وجود فوارق يعتد بها بين كل من النمطين والمزيج الكامل بينهما، ما يؤكد نتائج دراسات سابقة [18, 19]. لدى مقارنة أنماط أضداد الجمل التقليدية وثقيلة السلسلة والمزيج الكامل للأضداد والناتجة عن التنقية بالاستبعاد الحجمي بعمود Superdex 200 من حيث ثباتها تجاه درجات حرارة مختلفة وتراكيز متفاوتة من H₂O₂ تبين انعدام فوارق يعتد بها إحصائياً بين الأنماط الثلاثة بالمجمل. حافظت الأضداد التقليدية على ثبات أعلى في درجة الحرارة 60 °C، في حين أبدت الأضداد ثقيلة السلسلة ثباتاً

وتعرف المستضد [23]. أكدت هذه المقارنة انعدام فوارق يعتد بها بين الأضداد ثقيلة السلسلة والأضداد التقليدية والمزيج الكامل لهذه الأضداد، ما يتيح الاستفاد من المردود الكامل للأضداد في تحضير منتج صيدلاني تريباقاً لعلاج لدغة القرب.

الاستنتاجات Conclusions:

طورت طريقة لترسيب كافة أضداد اسم العقرب باستخدام محلول سلفات الأمونيوم ذو تركيز إشباعي نهائي 40%، ومن ثم حُل البروتين والتخلص من بقايا سلفات الأمونيوم بالمبادلة الدائرية ليتخلص في خطوة لاحقة من جميع البروتينات المصلية غير المرغوبة من خلال تنقية أضداد سم العقرب، باستخدام عمود بروتين A ذات الألفة لهذه الأضداد، وبذلك حصلنا على مردود عال من أضداد الجمل النوعي لسم العقرب بما يخدم أهداف دراسة الصياغة الصيدلانية. أثبتت أنماط الأضداد فعاليتها في الارتباط بالمستضد على صفيحة المقايسة المناعية الإنزيمية، كما أظهرت صفات ثبات متشابهة تجاه شروط التخريب القسري بالحرارة والأكسدة، وهذا يؤكد أهمية الاستفاد من كامل مردود الأضداد في الدراسات الصيدلانية.

الشكر والاعتراف Acknowledgment:

فريق البحث يتقدم بجزيل الشكر للسيد حسام الدين خلف (قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية، هيئة الطاقة الذرية) لتزويدنا بعينات من مصل الجمل الممنوع بسم العقرب. جزيل الشكر للسيد مالك العرفي (هيئة الطاقة الذرية) لتزويدنا بعينات من سم العقرب. جزيل الشكر للدكتور بسام البلعة (قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية، هيئة الطاقة الذرية) لمساعدته الكريمة وإشرافه على عملية التنقية باستخدام عمود Suerdex 200.

المراجع References:

1. Meddeb-Mouelhi, F., et al. Immunized camel sera and derived immunoglobulin subclasses neutralizing *Androctonus australis* hector scorpion toxins, *Toxicon*, 42(7),785-91, 2003.
2. Goyffon, M., M. Vachon, and N. Broglio, Epidemiological and clinical characteristics of the scorpion envenomation in Tunisia, *Toxicon*, 20(1), 337-44,1982.

النسيلة بمختلف الأنماط للجمل الممنوع بسم العقرب للحصول على أكبر مردود ممكن من الأضداد الفعالة وصياغتها صيدلانياً علاجاً مضاداً لسم العقرب، لم يلاحظ أي وجود للغلوبولينات المناعية بعد النسبة 40%، في حين ظهرت العصابات الدالة عليها في التراكيز حتى 40%، لم تكن هذه النتائج مطابقة لنتائج الدراسة التي هدفت إلى عزل أضداد الجمل الممنوع بسم أفعى من نوع *Naja Naja Oxiana* لغايات علاجية أيضاً، حيث وجد الباحثون في هذه الدراسة أن نسبة إشباع سلفات الأمونيوم 55% هي الأمثل للحصول على أعلى مردود من الأضداد IgG في مصل الجمل. حيث تابعت هذه الدراسة تنقية الأضداد باستخدام كروماتوغرافيا المبادلة الشاردية باستخدام عمود DEAE- Sepharose CL-6B وفقاً لنقطة التعادل الكهربائي للبروتين لهذه الأضداد وأثبتت بعد المقارنة بأضداد الحصان $F(Ab)_2$ تفوق أضداد الجمل بما يعادل أربعة أضعاف بفعالية الارتباط بالمستضد ضمن صفيحة المقايسة المناعية الإنزيمية [22]، في حين جرى الاعتماد اعتماداً أساسياً في هذا العمل على عمود بروتين A نظراً إلى نوعيته ولألفة الأضداد له وسهولة شطفها بعد ارتباطها بالعمود. فصلت ثميطات أضداد الجمل IgG في دراسات سابقة بواسطة التنقية التفاضلية باستخدام عمودي بروتين A وبروتين G بعدة خطوات [6, 17]. بعد الحصول على مردود عال من أضداد الجمل فصلت أنماط أضداد الجمل التقليدية وثقيلة السلسلة بخطوة واحدة من خلال حقن كمية محددة من أضداد الجمل التي نقيت مسبقاً بعمود بروتين A باستخدام عمود Superdex 200 ذات القدرة العالية على فصل البروتينات تبعاً لوزنها الجزيئي، وقورنت من حيث فعالية الارتباط بالمستضد وثباتها تجاه شروط التخريب بالحرارة والأكسدة، حيث أن وجود أو عدم وجود فوارق من حيث الفعالية والثبات يجب أن يؤخذ بالحسبان في الصياغة الصيدلانية لهذه الأضداد، لا سيما أن فعالية البروتينات عموماً متعلقة بوجودها بشكلها المطوي محافظة على المستوى الرابع من بنيتها، ورغم أن الأضداد تعد من أكثر البروتينات ثباتاً إلا أن فعاليتها مرتبطة بالجزء المتغير variable وبشكل أكثر تحديداً بالعري في المناطق المحددة للمتممة Complementarity determining regions (CDRs)، حيث إن أي تغيير في تسلسل الأحماض الأمينية على هذه المناطق سيؤثر تأثيراً مباشراً شكل السطح في المنطقة المتغيرة وما يليه من نقص في النوعية والقدرة على الارتباط

- Taylor & Francis Online, 9(8), 1217-1230, 2017.
17. Muhammad Haddad, C.S., Houssam Eddin Khalaf and Abdul Qader Abbady, Purification of polyclonal IgG specific for Camelid's antibodies and their recombinant nanobodies. *Open Life Sciences*, 2(1), 1-9, 2016.
 18. Van der Linden, R., et al., Induction of immune responses and molecular cloning of the heavy chain antibody repertoire of Lama glama. *J Immunol Methods*, 240(1-2), 185-95, 2000.
 19. Arbabi Ghahroudi, M., et al., Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. *FEBS Lett*, 414(3), 521-6, 1997.
 20. Hebert, G.A., P.L. Pelham, and B. Pittman, Determination of the optimal ammonium sulfate concentration for the fractionation of rabbit, sheep, horse, and goat antisera. *Appl Microbiol*, 25(1), 26-36, 1973.
 21. Hebert, G.A., Ammonium sulfate fractionation of sera: mouse, hamster, guinea pig, monkey, chimpanzee, swine, chicken, and cattle. *Appl Microbiol*, 27(2), 389-93, 1974.
 22. Khamsehchian, S., et al., Study on camel IgG purification: a new approach to prepare Naja Naja Oxiana antivenom as passive immunization for therapy. *Hum Vaccin Immunother*, 10(6), 1633-8, 2014.
 23. Laptos, T. and J. Omersel, The importance of handling high-value biologicals: Physico-chemical instability and immunogenicity of monoclonal antibodies. *Exp Ther Med*, 15(4), 3161-3168, 2018.
 3. Khalil, N.Y., E. A., Leirus abduallahbayrami. (Scorpiones: Buthidae,(a new species for the scorpion fauna of Syria. *Journal of Animal Diversity*, 12(1), 1-6, 2010.
 4. Dhandapani, G., et al., Purification of antibody fragments via interaction with detergent micellar aggregates. *Sci Rep*,11(1), 11697, 2021.
 5. Krifi, M.N., et al. Improvement and standardization of antivenoms sera, *Arch Inst Pasteur Tunis*, 69(3-4), 253-61, 1992.
 6. Hamers-Casterman, C., et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*, 363(6428), 446-8, 1993.
 7. Oukkache, N., et al. Comparison between two methods of scorpion venom milking in Morocco. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*,. 19(1), ., 2013.
 8. Tobassum, S., et al. Effect of Milking Method, Diet, and Temperature on Venom Production in Scorpions. *J Insect Sci*, 18(4), 2018.
 9. Green, A. and W. Hughes, [10] Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents. *Methods in Enzymology*, 1, 67-90, 1955.
 10. Wingfield, P., Protein precipitation using ammonium sulfate. *Curr Protoc Protein Sci*, Appendix 3: p. Appendix 3F., , 2001
 11. Ammonium Sulfate Calculator ;Available from: <https://www.encorbio.com/protocols/AM-SO4.htm>, 2021.
 12. M.Bradford, M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(2-1), 248-254, 1976.
 13. Simpson, R.J., Rapid coomassie blue staining of protein gels. *Cold Spring Harb Protoc*,(4), 5413, 2010.
 14. Mahmood, T. and P.C. Yang, Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci*, 4(9), 429-34, 2012.
 15. Gagnon, P. and R. Nian, Conformational plasticity of IgG during protein A affinity chromatography. *J Chromatogr A*, 1433, 98-105, 2016.
 16. Christine Nowak, J.K.C., Shara M. Dellatore,Amit Katiyar,Ram Bhat,Joanne Sun,Gomathinayagam Ponniah,Alyssa Neill,Bruce Mason,Alain Beck &Hongcheng Liu, Forced degradation of recombinant monoclonal antibodies: A practical guide.