نشریه آموزشی- پژوهشی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور

فصلنامه تحقیقات کاربردی در علوم دامی

شماره ۳۸، بهـار ۱۴۰۰

ص‌ص: ۶۷~۷۴

خالص سازی نانو بادی تولید شده بر علیه باکتری سودوموناس آئروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*) با استفاده از کروماتوگرافی تعویض یونی

ساناز پاشنایار [۱]، رضا عصاران دربان [۲]، سعید زیبایی* [۳]

۱-دانش آموخته کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد،دانشکده علوم،گروه زیست شناسی،مشهد،ایران

۲-استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد،دانشکده علوم،گروه زیست شناسی،مشهد، ایران

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

تاریخ دریافت : دی ۱۳۹۹ تاریخ پذیرش : اردیبهشت ۱۴۰۰

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۵۳۰۳۵۹۱۹

Email: S.zibaee@rvsri.ac.ir

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ aasrj.2021.124293

چکیده:

شتر سانان دارای آنتی بادی ها می باشند که تنها شامل زنجیره ی سنگین بوده و به آن نانوبادی گفته می شود. از مزایای نانوبادی ها می توان به ، حلالیت بالا،مقاومت بیشتر در برابر شرایط نامناسب محیطی ،تمایل و اختصاصیت زیادبه آنتی ژن اشاره نمود . سودوموناس آئروژینوزا یکی ازمهمترین پاتوژن های فرصت طلب و سومین عامل عفونت های بیمارستانی بوده که مقاومت آنتی یوتیکی رو به افزایش دارد.

جهت خالص سازی نانوبادی تولید شده بر علیه سودوموناس آئروژینوزا از کروماتوگرافی تعویض یونی در دو بستر DEAE- سلولز و CM-Sephadex c50 همراه با چهار PH استفاده شد برای تعیین میزان خلوص از الکتروفورز پلی اکریل آمید سدیم دودسیل سولفات استفاده و میزان پروتئین با تکنیک برافورد مورد سنجش قرار گرفت . نتایج نشان داد که استفاده ازکروماتوگرافیCM-Sephadex c50 جهت خالص سازی مناسب تر بوده و نانوبادی تهیه شده با استفاده از کیتوزان بعنوان ادجوانت در فراکسیون با غلظت کلرید سدیم ۰/٤مولار واجد تک باند ٤۰ کیلودالتونی در PH های ۵و٦و۷ می باشد. همچنین نانوبادی تهیه شده با استفاده از آلژینات کلسیم بعنوان ادجوانت در فراکسیون با غلظت کلرید سدیم ۰/۵مولار تنها در PH ٦ تک باند ٤۰ کیلو دالتونی دارد .

واژه‌های کلیدی: سودوموناس آئروژینوزا ، شتر ،کروماتوگرافی تعویض یونی ، نانوبادی

Applied Animal Science Research Journal No 38 pp: 67-74

Purification of nanobody produced against Pseudomonas aeruginosa using ion exchange chromatography

By: Sanaz Pashnayar[1], Reza Assaran Darban[2], Saeid Zibaee[3*]
1-MSc graduate Mashhad Branch, Islamic Azad University, Department of Biology, Faculty of Sciences, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran
2- Associate Professor. Mashhad Branch , Islamic Azad University, Department of Biology , Faculty of Sciences , Mashhad Branch , Islamic Azad University , Mashhad ,Iran
3 -Associate professor Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO) .Mashhad

Received: December 2020 **Accepted: April 2021**

Camelids have antibodies that contain only a heavy chain and are called nanobodies. Advantages of nanobodies include high solubility, greater resistance to adverse environmental conditions, high tendency and specificity to antigen. Pseudomonas aeruginosa is one of the most important opportunistic pathogens and the third leading cause of nosocomial infections with increasing antibiotic resistance. To purify the nanobodies produced against Pseudomonas aeruginosa, ion exchange chromatography was used in DEAE-cellulose and CM-Sephadex c50 substrates with four PH evaluated. The results showed that the use of CM-Sephadex c50 chromatography was more suitable for purification and the nanobody prepared using chitosan as an adjuvant in a fraction with a concentration of 0.4 M sodium chloride had a 40 kDa single band at pH 5, 6 and 7. Also, nanobodies prepared using calcium alginate as an adjuvant in the fraction with a concentration of sodium chloride of 0.5 M only at pH 6 have a single band of 40 kDa.

Key words: Nanobody, Pseudomonas aeruginosa, Ion-exchange chromatography

۱-مقدمه:

گونه های شترسانان آنتی بادی هایی دارند که فاقد زنجیره سبک بوده و فقط زنجیره سنگین دارند که به آنها آنتی بادی های *Heavy Chain Antibody (HCAb)* می گویندو به نانو بادی ها معروف بوده و در نانوتکنولوژی استفاده های فراوان دارند.این آنتی بادی ها و به دلیل کوچکی، پایدارتر از آنتی بادی های متداول هستند، حلالیت بالایی دارند و دارای تمایل و اختصاصیت زیادی به آنتی ژن خود میباشند، بنابراین دارای پتانسیل بالایی برای تشخیص و درمان سرطان می باشند امروزه نانو بادی های مونوکلونال را در باکتری ها می توان تولید کرد (۲).

سیستم آنزیمی باکتری دارای قابلیت مقاومت به آنتی بیوتیک ها و ایجاد مقاومت جدید می باشد به کار گیری نانو بادی علیه عوامل بیماری زا مانند آنزیم های ترشحی یا توکسین های باکتریایی است که سبب مهار مقاومت انتی بیوتیکی می گردد.

روش دیگر به کارگیری نانو بادی علیه عفونت های باکتریایی از طریق فیوژن پروتئین ها است.جهت استفاده از نانو بادی در مطالعه *Kruger* و همکاران علیه *Streptococcus mutans* مولد پوسیدگی دندان بیان شد که می تواند به عنوان عامل پیشگیری کننده پوسیدگی دندان به کار گرفته شود (۸) از دیگر ویزگی های نانوبادی ها ، استفاده از آن به عنوان یک ابزار تشخیصی در بیوسنسور ها و برای شناسایی بتالاکتامازهایی که مقاومت آنتی بیوتیکی را در برابر پاتوژن های بیماری زایی منتقل می کنند، می باشد (۷) .

باکتری سودوموناس آئروژینوزا، از خانواده *Pseudomonadaceae* ، باسیل گرم منفی، هوازی اجباری، غیرتخمیری متحرک با تک تاژه قطبی با نیازهای غذایی حداقل است .تمایل برای رشد در محیط های مرطوب، به موفقیت اکولوژی و اهمیت آن به عنوان یک بیماری زای مهم در عفونت های کسب شده بیمارستانی کمک می کند. توانایی کلونیزه شدن این باکتری در مکان های مختلف، به خصوص در محیط بیمارستان بر اهمیت این باکتری در ایجاد عفونت های بیمارستانی افزوده است(۱۰،۳).

سودوموناس آئروژینوزا یکی از مهمترین پاتوژن های فرصت طلب است و به عنوان سومین عامل عفونت های بیمارستانی بعد از استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلی محسوب می شود عفونت های سودوموناسی غالباً در سوختگیها، عفونت های ادراری و بیماریهای ریوی مثل سیستیک فیبروزیس گزارش شده اند. میزان مرگ ومیر در بیماران دچار نقص ایمنی توسط پنومونی های ناشی از سودوموناس آئروژینوزای بیمارستانی در حدود ۷۹ درصد می باشد(۱).

کروماتوگرافی تعویض یونی به طور گسترده در بیوتکنولوزی برای خالص سازی آنتی بادی ها و سایر پروتئین هااستفاده می شود این کروماتوگرافی مولکول ها را بر اساس تفاوت بار جدا می کند . پروتئین های دارای بار به ماتریکس دارای بار مخالف متصل می شوند ، سپس به وسیله ی تغیر بار با استفاده از تغییر *PH* یا افزایش غلظت نمکی جدا می گردند . این کروماتوگرافی دارای ظرفیت بالا ، تکنیک بالا ، بازده مناسب ، غلظت موثر و قوی و ارزان است ترکیبات باردار آنیونی و کاتیونی بر اساس ویژگی های آنتی بادی ها می توانند استفاده شوند(۹) کروماتوگرافی تعویض یونی برای تلخیص آنتی بادی ها به کار رفته است این روش به دلیل ظرفیت اتصال بالا و هزینه کم آن برای تلخیص پروتئین ها به کار می رود (۱۲) در این روش برای از میان برداشتن هرچه بیشتر ناخالصی ها ابتدا سرم را با روش رسوب دهی در نمک تا حدی خالص کرده و سپس آن را از ستون کروماتوگرافی تعویض یونی عبور می دهند (۲).

رزین های کروماتوگرافی برای خالص سازی آنتی بادی های منوکلونال و سایر پروتئین ها استفاده می شود. برای خالص سازی بیشتر وبهتر نانوبادی ها از روش کروماتوگرافی تعویض یونی استفاده می کنند که نانوبادی کاملا کاربردی برای مصارف بالینی به کار برده می شود ، به طوری که بیش از ۹۹ درصد از سایر پروتئین های سلول میزبان حذف شده در نتیجه جدایی نانوبادی ها از سایر پروتئین ها تحقق می یابد (۲)

۲-مواد و روش ها:

۱-۲-مواد:

مولر هینتون آگار ، TSI، سیمون سیترات آگار ، لیزین آیرون آگار ، محیط پایه OF ، SIM . کریستال ویوله ، لوگل ، الکل استون ، فوشین ، PBS ، فرمالین ۲ در صد ، سولفات آمونیوم ، رزین Sephadex c-50 (Merck) ، DEAE-سلولز(Sigma) ، تریس (Merck) ، سدیم کلراید(Merck) ، کاغذ PH، بیس آکریل آمید (Sigma) ،سدیم دو دسیل سولفات (Merck) ، گلایسین (Merck) ، رنگ کوماسی برلیانت بلو G250 (Merck) ، مارکر پروتئینی (CMG)، متانول (Merck) ، آلژینات کلسیم و کیتوزان، باکتری سودوموناس آئروژینوزا (ATCC:27853)

۲-۲-روش ها :

۱-۲-۲-آزمایش های تاییدی سودوموناس آئروژینوزا و تعیین حداقل دوز کشندگی :

جهت تایید باکتری سودوموناس آئروژینوزا ابتدا باکتری سودوموناس آئروژینوزا (ATCC:27853) از موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه شمال شرق تهیه شد و سپس آزمایش هایی از قبیل تست اکسیداز ، سیترات ، لیزین ، اندول وحرکت، ژلاتین ،OF ، تست تحریک تولید رنگدانه ی پیووردین در محیط مولر هینتون آگار و رنگ آمیزی گرم صورت گرفت.

برای تعیین حداقل دوز کشندگی در سرم فیزیولوژی سوسپانسیونی از باکتری تهیه شد و بعد از رقت سازی آن و شمارش کلنی از

رقت ها برای تعیین CFU ، رقت های خالص و 10^{-1} و 10^{-2} را به سه گروه ۵ تایی موش BALB/c تزریق شد.

۲-۲-۲-تهیه نانو بادی :

جهت تهیه نانو بادی، باکتری سودوموناس آئروژینوزا همراه باادجوانت های کیتوزان وآلژینات کلسیم به شتر یک ساله تزریق شد. پس از خونگیری سرم حاوی آنتی بادی می باشد.

۳-۲-۲-خالص سازی نانو بادی :

ترکیب با سولفات آمونیوم : یک حجم محلول سولفات آمونیوم اشباع تهیه شد با حجم مشخصی از سرم حاوی نانو بادی در شرایط سرما اضافه وبه مدت ۲۰ دقیقه با دورRPM ۴۰۰۰ سانتریفیوژ انجام شد و سپس مایع رویی حذف ورسوب حاصله با۱۰ میلی لیترآب دیونیزه محلول گردید .

کروماتوگرافی تعویض یونی : بعد از ترکیب سرم حاوی نانو بادی با سولفات آمونیوم به منظور خالص سازی از روش کروماتوگرافی تعویض یونی در دو بستر DEAE- سلولز و CM-Sephadex c50 استفاده شد . در این روش مقدار حجم سرم و حجم ژل به یک نسبت در نظر گرفته شد و بافر آغازگر تریس mM ۱۰ با سه رنج PH (PH:5 PH:6 PH:7) برای CM-Sephadex c50 و همچنین سه رنج PH (PH:7 PH:8 PH:9) برای DEAE- سلولزدر نظر گرفته شد و بعد از ۱۰ دقیقه هم زدن، نمونه ها به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰ سانتریفیوژ صورت گرفت و بعد از حذف ماده ی روئی ستون ها را با بافر های تریس ۱۰ میلی مولارهمراه با با PH های گرادیان های مختلف غلظت سدیم کلراید (۰/۸ -۰/۳ مولار)شستشو داده و فراکسیون های مختلف جمع آوری گردید.

٤-۲-۲-تعیین میزان خلوص نانوبادی استخراج شده :

به منظور تعیین میزان حضور نانوبادی ها از روش الکتروفورز پلی اکریل آمید سدیم دودسیل سولفات SDS-Page استفاده گردید . در این روش ژل اکریل آمید ۱۲ /۵ درصد مورد استفاده قرار گرفت سپس نمونه ها ی آماده شده ی نانوبادی به مقدار ۱۵ ماکرولیتر در هر ول لود وژل حاصل را با کوماسی برلیانت بلو G250 رنگ آمیزی شد .

به منظور سنجش مقدار پروتئین موجود در نمونه های حاصل از SDS-Page از تکنیک پروتئین سنجی به روش برادفورد استفاده و جذب نوری با دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت شد .

۳-نتایج :

۱-۳-نتایج حاصل از آزمایش ها انجام شده بر روی باکتری :

نتایج آزمایش ها وجود و عدم آلودگی سودوموناس آئروژینوزا را تایید نمود. میزان CFU باتوجه میانگین رشد کلنی ها در رقت ای کشت داده شده ، $10^{10} \times 1/42$محاسبه گردید.

۲-۳- نتایج حاصل ازآزمایش ها انجام شده بر روی موش سوری از نژاد بالبسی : میزان مرگ در موشهای سوری BALB/cدر نمونه خالص ۵ موش ازپنج موش بود.میزان مرگ در رقت 10^{-1} نیز ۳ موش از ۵ موش بوده و در رقت 10^{-2}نیز هیچ مرگی مشاهده نگردید.

۳-۳- نتایج حاصل از خالص سازی بوسیله کروماتوگرافی تعویض یونی :

۱-۳- نتایج حاصل از کروماتوگرافی CM-Sephadex-c50 : درنمونه خالص شده نانوبادی حاصل از کیتوزان بعنوان ادجوانت (تصویر۳-۱) حاصل از کروماتوگرافی CM-Sephadex فقط در غلظت های ۰/۳ -۰/۴-۰/۵ باند مشاهده شد و در سایر غلظت های نمکی هیچ باندی مشاهده نشد و در فراکسیون با غلظت ۰/۴ مولار کلرید سدیم باند مناسب ۴۰ کیلودالتونی در سه PH ۵،۶و۷ مشاهده گردید.

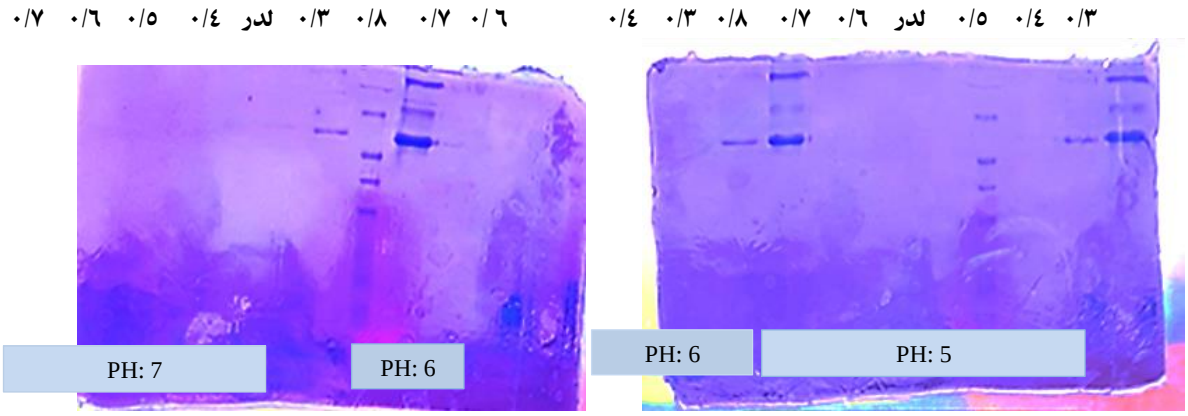
۲-۳-۳- نتایج حاصل از کروماتوگرافی DEAE : درنمونه ی نانوبادی حاصل از آلژینات کلسیم بعنوان ادجوانت (تصویر۳-۳) نتایج مشابه نمونه قبل با این تفاوت که درفراکسیون ۰/۴ مولارفقط در PH ۶ باند مناسب ۴۰ کیلو دالتونی مشاهده شده است

در نمونه ی خالص شده در نانوبادی حاصل از آلژینات کلسیم بعنوان ادجوانت (تصویر۳-۴)و نانوبادی حاصل از کیتوزان بعنوان

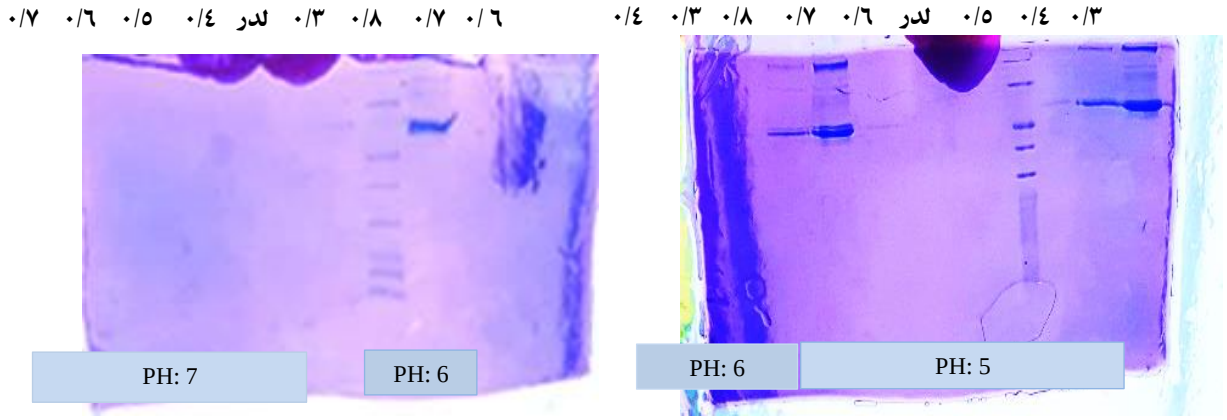
ادجوانت (تصویر ۵) حاصل از کروماتوگرافی DEAE نتایج مشابه یک دیگر بودند و فراکسیون هایی با غلظت های ۰/۳ – ۰/۴باند مشاهده شد و در سایر غلظت های نمکی هیچ باندی مشاهده نگردید .

۳-۳-۳-نتایج حاصل از پروتئین سنجی به روش برادفورد: مقدار غلظت نانوبادی خالص شده با کروماتوگرافی تعویض یونی با C Sephadex-C 50 نشان داد که غلظت نانوبادی علیه باکتری همراه با ادجونت کیتوزان ، ۹ میکروگرم بر میلی لیتر و غلظت نانو بادی علیه باکتری همراه با ادجونت آلژینات کلسیم ، ۵ میکروگرم بر میلی لیتر می باشد.

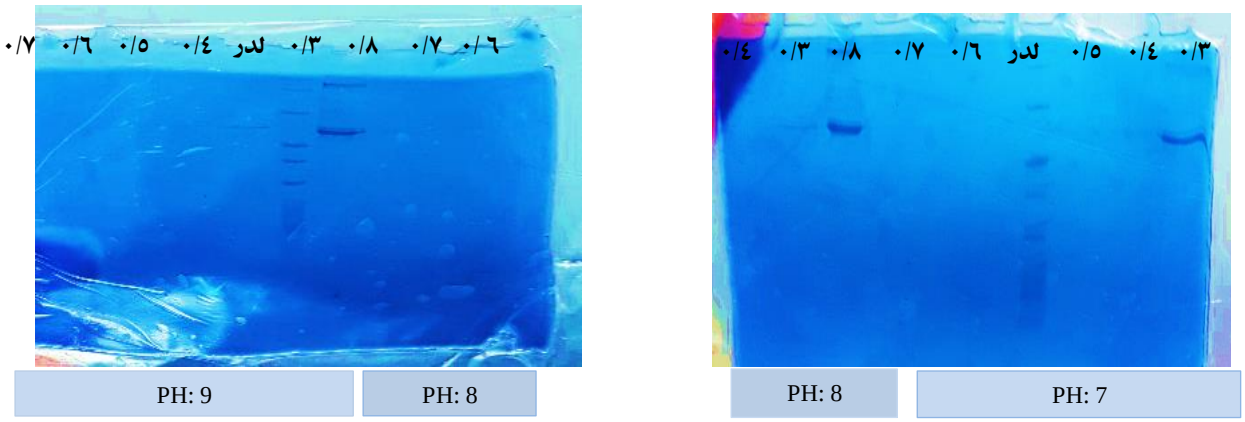
۳-۳-٤-نتایج حاصل از پروتئین سنجی :با توجه به جذب نوری قرائت شده میزان پروتئین در غلظت ۰/۴ نانوبادی حاصل از آلژینات کلسیم بعنوان ادجوانت ۵ ماکروگرم بر میلی لیتر و در غلظت ۰/۴ حاصل از کیتوزان بعنوان ادجوانت ۹ماکروگرم بر میلی لیتر محاسبه شد .



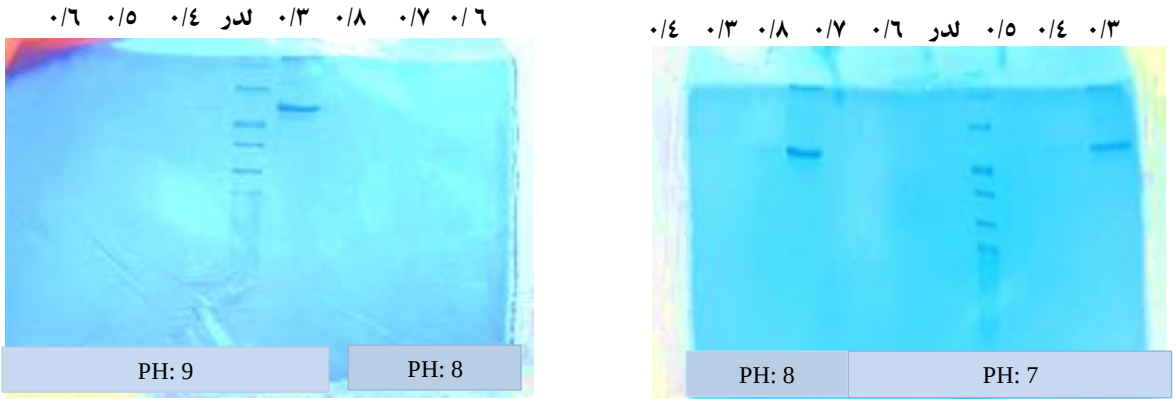
تصویر۳-۱:نتایج حاصل از SDS-PAGE کروماتوگرافی CM-Cephadex در PH ۵،۶،۷ ،
درنانوبادی هایی که از کیتوزان بعنوان ادجوانت استفاده شده است.



تصویر۳-۲:نتایج حاصل از SDS-PAGE کروماتوگرافی CM-Cephadex در PH ۵،۶،۷ ،
درنانوبادی هایی که از آلژینات کلسیم بعنوان ادجوانت استفاده شده است.



تصویر۳-۳:نتایج حاصل از SDS-PAGE کروماتوگرافی DEAE در PH ۷،۸،۹ ،
درنانوبادی هایی که از آلژینات کلسیم بعنوان ادجوانت استفاده شده است.



تصویر۳-۴:نتایج حاصل از SDS-PAGE کروماتوگرافی DEAE در PH ۷،۸،۹ ،
درنانوبادی هایی که از کیتوزان بعنوان ادجوانت استفاده شده است.

۵-بحث :

سودوموناس آئروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*) به عنوان یکی از مهمترین پاتوژن های فرصت طلب ایجاد کننده عفونت های بیمارستانی مطرح است .علیرغم پیشرفت های زیاد در سیستم های مراقبت بیمارستانی و معرفی طیف گسترده ای از عوامل ضد میکروبی، این باکتری همچنان از عوامل شایع ایجاد کننده عفونت در بیماران بستری در بخش های مختلف بیمارستان می باشد.

بنابراین اهمیت این پژوهش در خالص سازی نانو بادی تولید شده برعلیه آن که کارای بسیار بالاتری نسبت به انتی بادی دارد می تواند از میزان مرگ و میر ناشی از آن بکاهد .در این پژوهش از دوروش رسوب دادن با سولفات آمونیوم وکروماتوگرافی تعویض یونی برای خالص سازی نانو بادی برعلیه سودوموناس آئروژینوزا استفاده شده است . استفاده از نمک سولفات آمونیوم جهت رسوب دادن پروتئین ها ،اتصالات بین مولکول های آب با گروه های قطبی باردار در مولکول های پروتئینی باعث ایجاد اتصالات هیدروفوبیک بین مولکول های پروتئین می شود و مولکول ها به صورت نامحلول در می آیند و سپس توسط کروماوگرافی تعویض یونی خالص می شود . گرگوریان در پژوهش خود از روش فوق برای خالص سازی آنتی بادی های اختصاصی استرپتوکوک استفاده نمود (۲). مرادی و همکاران در سال ۲۰۱۸

جهت تلخیص زیر واحد IgG2a موشی ، ایمونوگلوبولین ها را با نسبت مساوی از آمونیوم سولفات ترکیب و رسوب حاصله رابرای خالص سازی به ستون کروماتوگرافی تعویض یونی وارد نمودند (۱).علیزاده و همکاران در سال ۲۰۱۲ برای تهیه و تلخیص آنتی بادی های پلی کلونال علیه آنتی ژن های مایکوباکتریوم در خرگوش ، سرم خرگوش از سولفات آمونیوم و سپس از کروماتوگرافی تعویض یونی در بستر DEAE –سلولز استفاده نمودند (۵). Neoh, S.H و همکاران در سال ۱۹۸۶ با استفاده از سولفات آمونیوم آنتی بادی های مونوکلونال موش را خالص کردند (۲). در سال های اخیر تمایل زیادی به استفاده از قطعات آنتی بادی (دارای وزن تقریبی ۱۵ تا ۵۵ کیلودالتون) مانند scFv به جای مولکول کامل آن با وزن تقریبی ۱۵۰ کیلودالتون صورت گرفته است . در پژوهشی که توسط احمد زاده و همکاران در سال ۲۰۱۳ برای تولید آنتی بادی تک زنجیره ای انسانی ضد مارکر CD20 انجام داد در روش SDS-PAGE ، باند ۲۶ کیلودالتونی رویت گردید (۴). شاهی و همکاران در سال ۲۰۱۴ تک باند ۱۴ کیلودالتون را مشاهده کردند که نشانگر حضور قطعه VHH در ساختار نانوبادی ها می باشد(۶).در این پژوهش باند مناسب ۴۰ کیلودالتونی در غلظت ۰/۴ ازکروماتوگرافی CM-Sephadex c50 مشاهده گردید که خالص شدن نانو بادی را نشان می دهد ، در سال ۲۰۱۷ در مطالعه ای که Tiansen و همکاران در ارتباط با بیان و خالص سازی نانوبادی در سلول های *E. coli* DE3 ، انجام دادند با استفاده از SDS- PAGE باند۴۴کیلو دالتونی را مشاهده کردند (۱۱).

تشکر و قدردانی

از موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه شمال شرق که در انجام این‌مطالعه مساعدت نموده اند کمال تشکر را داریم.

منابع:

رجب پور ، م . عربستانی ، م . یوسفی ، ر . علیخانی ، م . (۱۳۹۲) تعیین MIC سه کلاس مختلف پادزیستی در ایزوله های بالینی سودوموناس آئروژینوزا جداشده از بیماران بستری در بیمارستان های اموزشی شهر همدان ، مجله مکروب شناسی پزشکی ایران . سال ۷ شماره ۳ ، صفحات ۲۵-۱۸

گریگوریان ،ا . پایان نامه تهیه و تلخیص آنتی ژن و آنتی بادی اختصاصی استرپتوکوک های گروه D (۱۳۷۷)

Aghaei, S., Javadi , A., Sharifi ,Y., Morovvati, A..(2016) Detection of Exotoxin A, Y, T, U, S genes of Pseudomonas aeruginosa Isolates Resistant to Third-Generation Cephalosporins in Clinical Samples of Hospitalized Patients in Hospitals of Qom City, Iran. Qom University of Medical Sciences Journal ;10(1)

Ahmadzadeh V, Farajnia S, Hosseinpour Feizi MA, Khavarinejad RA, (2013)Generation of Humanized Single Chain anti-CD20Antibody Marker in E.coli, Journal of The University of Medical Sciences & Health Services,88(21):12-21

Alizadeh H, Madani R, Babaie M, Kavid N, Golchinfar F, Emami T,(2012) Preparation and Purification of Polyclonal Antibodies against Mycobacterium Avium Paratuberculosis Antigens in Rabbit, Journal of Fasa University of Medical Sciences.2(3):173

B. Shahi, S.L. Mousavi Gargari, I. Rasooli1, M. Rajabi Bazl, and R. Hoseinpoor.(2014) , Random mutagenesis of BoNT/E Hc nanobody to construct a secondary phage-display library, Journal of Applied Microbiology

Conrath KE, Lauwereys M, Galleni M, Matagne A, Frere JM, Kinne J, et al.(2001). β-Lactamase inhibitors derived from single-domain antibody fragments elicited in the Camelidae. Antimicrob Agents Chemother.45(10):2807–12

Darvish,M .(2017). Nanobody and Its Therapeutic Applications. J Mazandaran Univ Med Sci; 28 (159): 143-161

Fahrner R. L., Knudsen H. L., Basey C. D., Galan W. and Blank G. S. (2001). Industrial purification of pharmaceutical antibodies:development, operation, and validation of chromatography processes. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews. 18(1): 301-327.

Heydari1,F., Rashki,Z. (2016). Epidemiology and Drug Susceptibility of Pseudomonas aeruginosa Strains isolated from Patients admitted to Zabol hospitals. Journal of Birjand University of Medical Sciences; 22 (4): 386-391

Li ,T., Huang,M. Xiao,H. Zhang,G. Ding,J. Wu,P ,.et al. (2017),. Selection and characterization of specific nanobody against bovine virus diarrhea virus (BVDV) E2 protein,. *PLoS One* ,. 12(6)

Moradi Nebrin,Z., Jafar Majidi, J., Aghebati Maleki, L., Kazemi, T, Abdolalizadeh,J , Somayeh Dadashi, S, Sadeg Eivazi, S, Majid Ahmadi, M , Majidi Zolbanin,N, (2018).A simple method for purification of mouse igg2a by ion exchange and affinity chromatography. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. February-March; 39(6):74-80.

9-Neoh, S. H., Gordon, C., Potter,A., and Zola, H. (1986) The purification of mouse MAb from ascetic fluid. J.Immunol.Meth .91,231

Salehzadeh , M., Norouzian ,P., Abbasalipourkabir ,R. (2015). The application of nanoparticles in diagnosis and treatment of breast cancer: a review article. Pajouhan Scientific Journal.;13(2):1-12

Xiying F , Yuhang Z , Jianli Y, Fei L , Quan C , Haipeng S , et al.(2019). Non-affinity purification of a nanobody by void-exclusion anion exchange chromatography and multimodal weak cation exchange chromatography. journal homepage.88-96