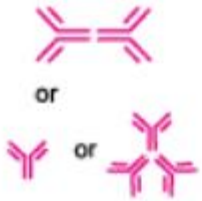
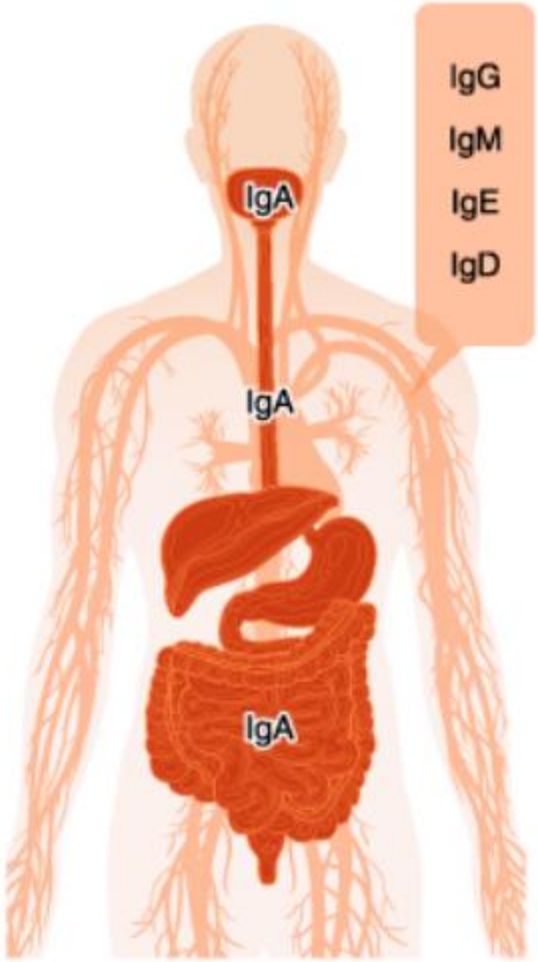
Antigen-Antibody reactions

Types of antibodies

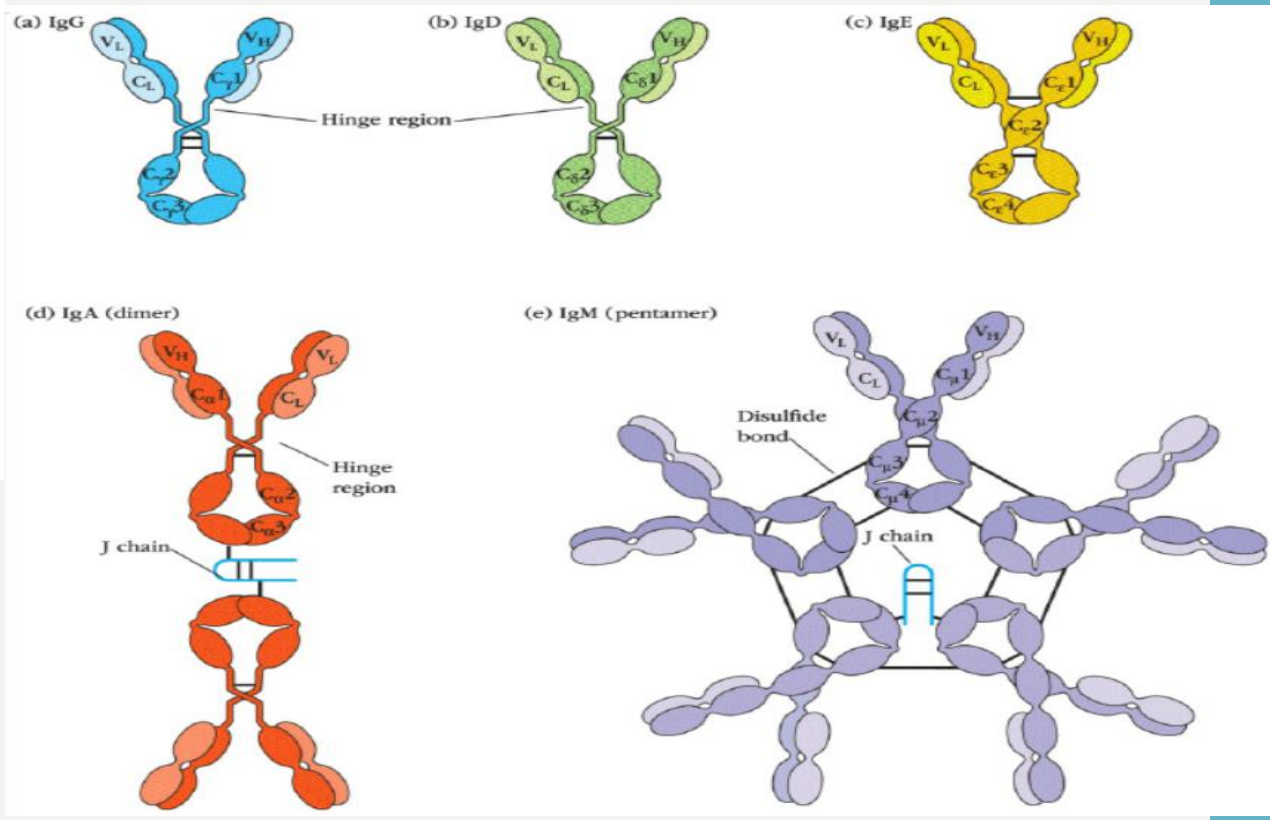
Types and characteristics of antibodies

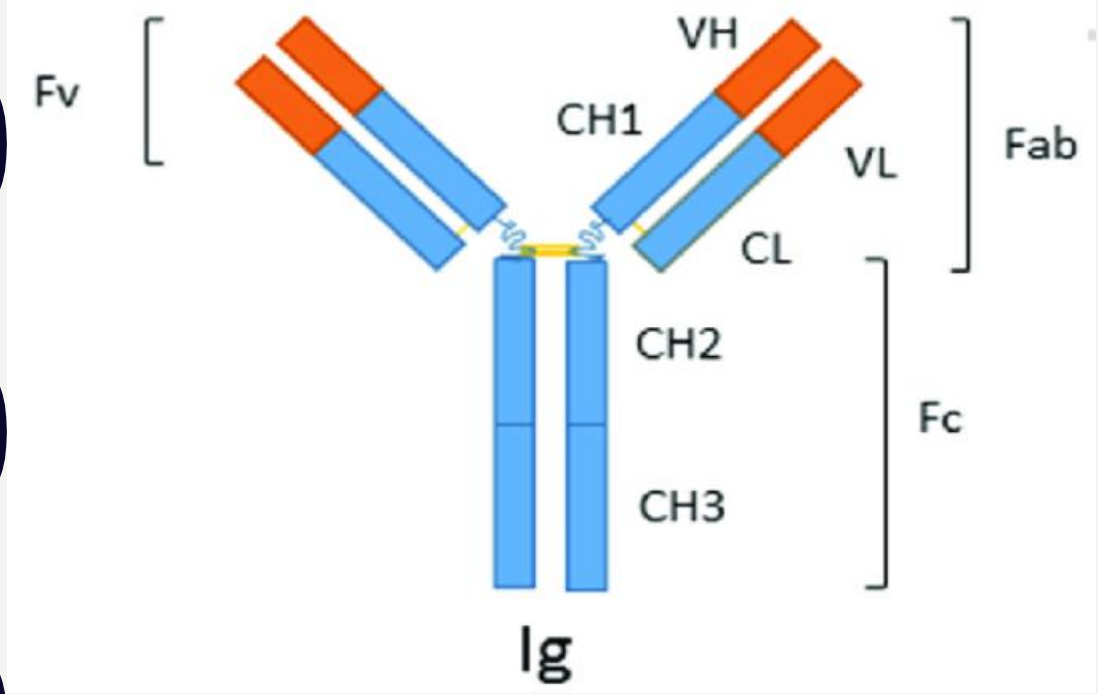
IgG		• Highest opsonization and neutralization activities. • Classified into four subclasses (IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4).
IgM		• Produced first upon antigen invasion. Increases transiently.
IgA		• Expressed in mucosal tissues. Forms dimers after secretion.
IgD		• Unknown function.
IgE		• Involved in allergy.

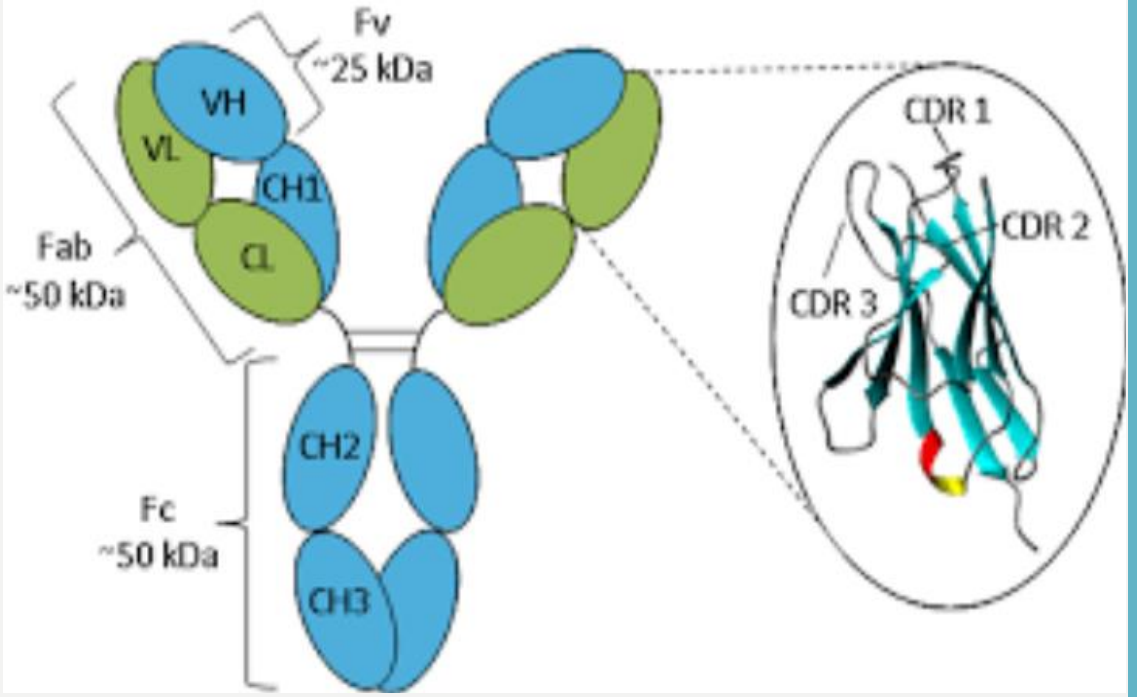
Distribution in the body



General structures of the five major classes of antibodies.
Light chains are shown in lighter shades, and disulfide bonds are indicated by thick black lines. Note that the **IgG, IgA, and IgD** heavy chains contain four domains and a **hinge region**, whereas the IgM and IgE heavy chains contain five domains but no hinge region. The polymeric forms of IgM and IgA contain a polypeptide, called the **J chain**, that is linked by two disulfide bonds to the Fc region in two different monomers. Serum IgM is always pentamer; most serum IgA exists as a monomer, although dimers, trimers, and even tetramers are sometimes present.

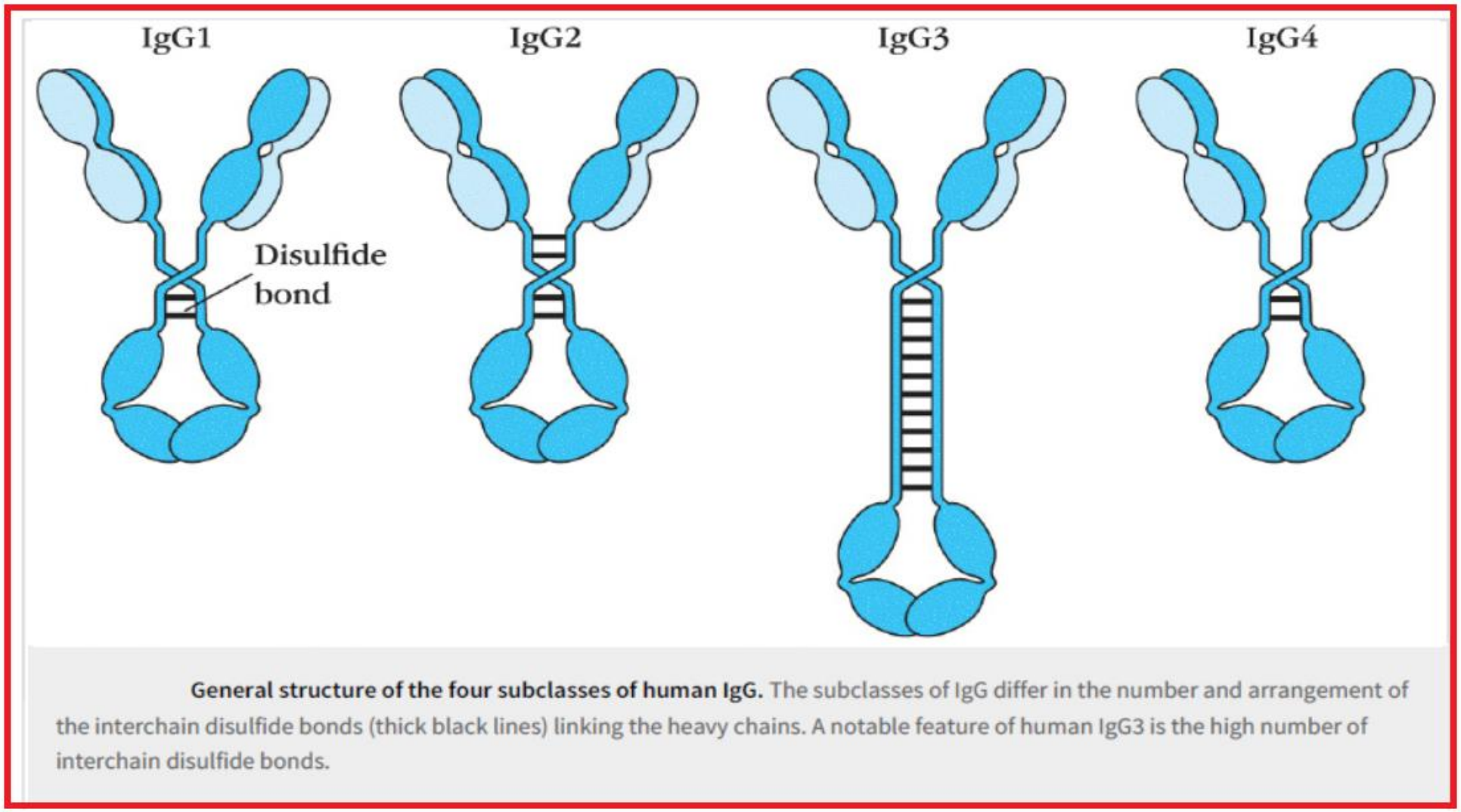




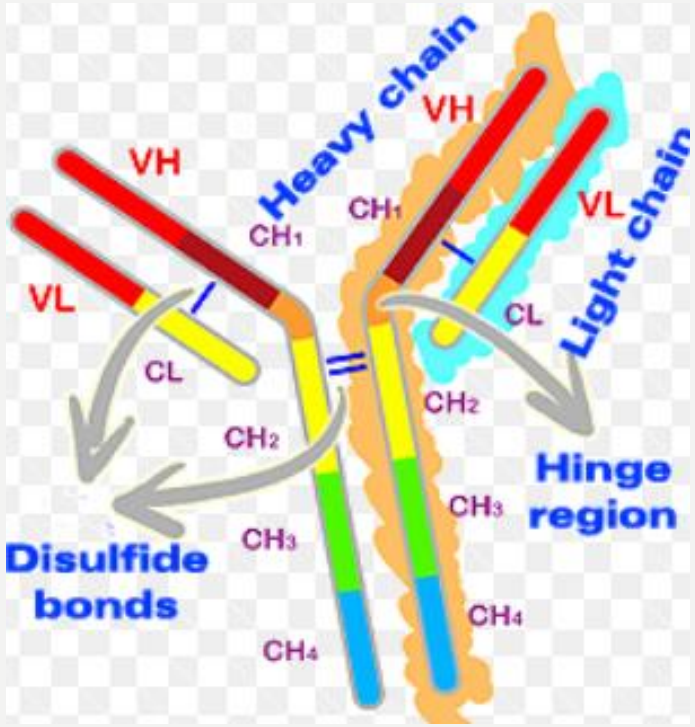


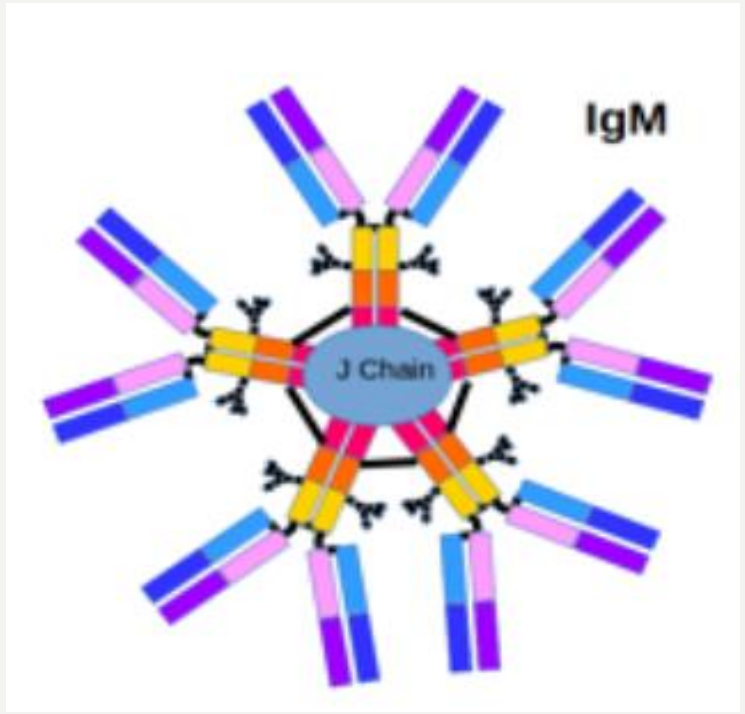
IgG

IgG is the most abundant antibody isotype in the blood (plasma), accounting for 70-75% of human immunoglobulins (antibodies). IgG detoxifies harmful substances and is important in the recognition of antigen-antibody complexes by leukocytes and macrophages. IgG is transferred to the fetus through the placenta and protects the infant until its own immune system is functional.



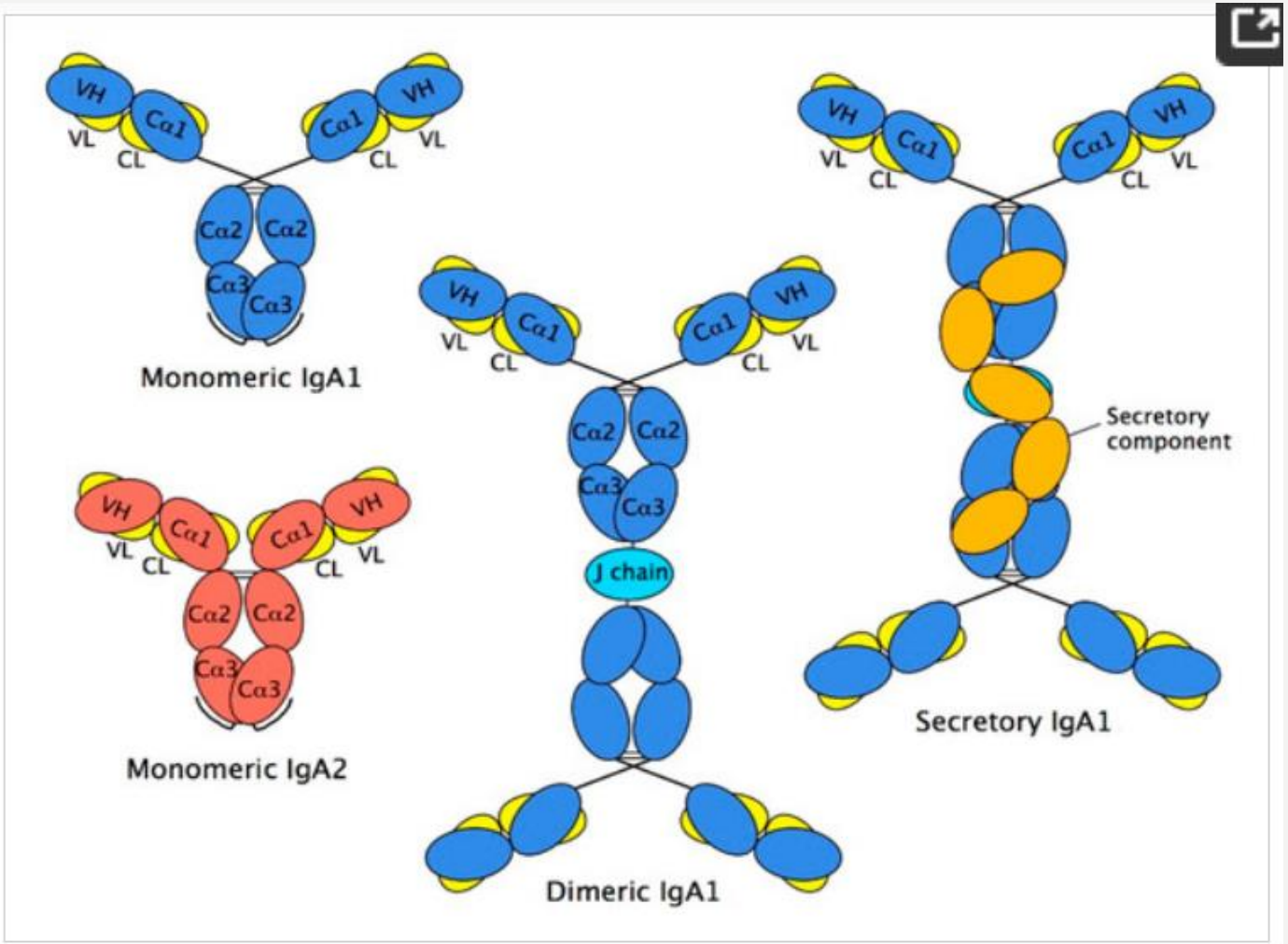
General structure of the four subclasses of human IgG. The subclasses of IgG differ in the number and arrangement of the interchain disulfide bonds (thick black lines) linking the heavy chains. A notable feature of human IgG3 is the high number of interchain disulfide bonds.





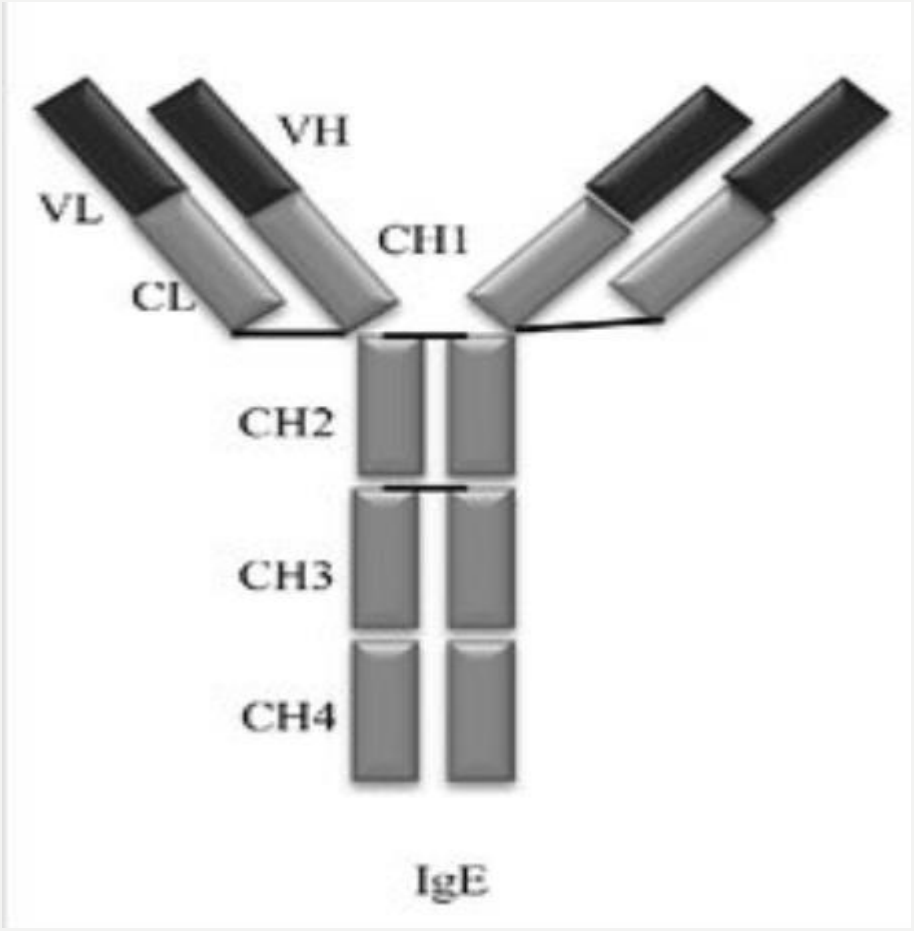
IgM

IgM usually circulates in the blood, accounting for about 10% of human immunoglobulins. IgM has a pentameric structure in which five basic Y-shaped molecules are linked together. B cells produce IgM first in response to microbial infection/antigen invasion. Although IgM has a lower affinity for antigens than IgG, it has higher avidity for antigens because of its pentameric/hexameric structure.



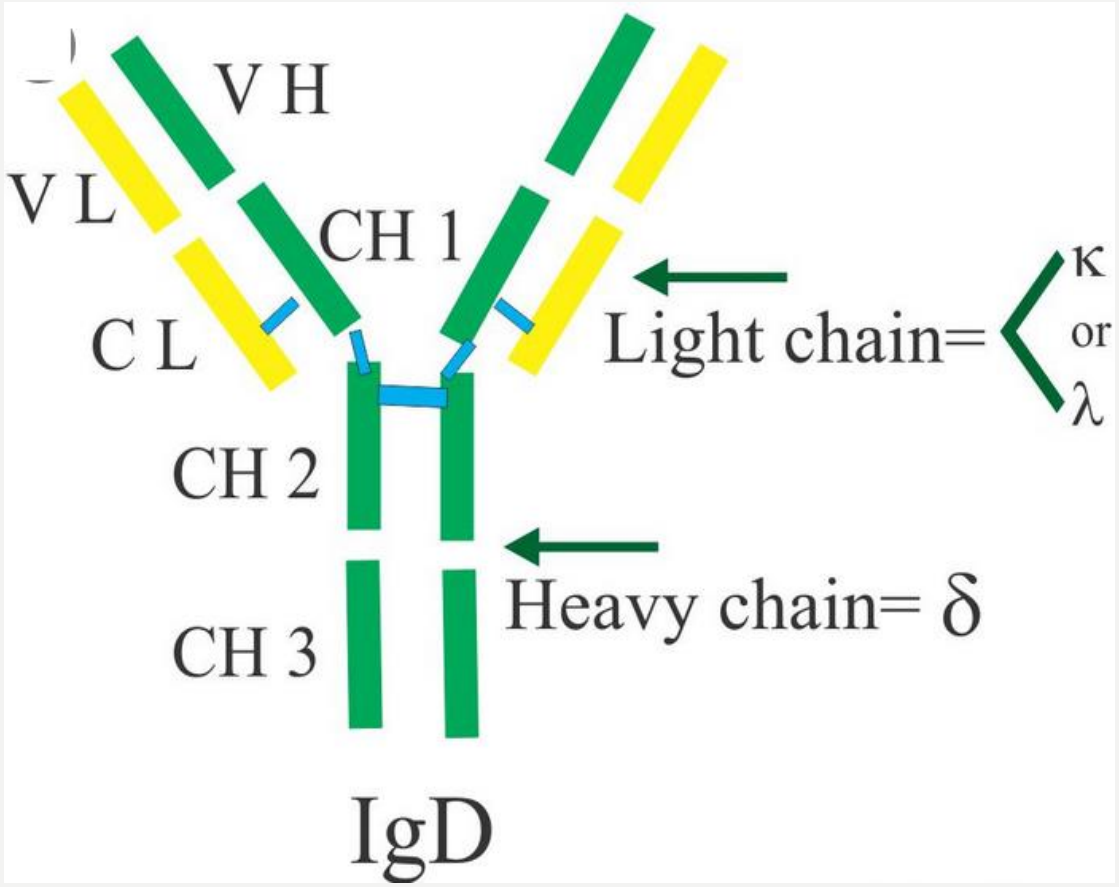
IgA

IgA is abundant in serum, nasal mucus, saliva, breast milk, and intestinal fluid, accounting for 10-15% of human immunoglobulins. IgA forms dimers (i.e., two IgA monomers joined together). IgA in breast milk protects the gastrointestinal tract of neonates from pathogens.



IgE

IgE is present in minute amounts, accounting for no more than 0.001% of human immunoglobulins. Its original role is to protect against parasites. In regions where parasitic infection is rare, IgE is primarily involved in allergy.



IgD

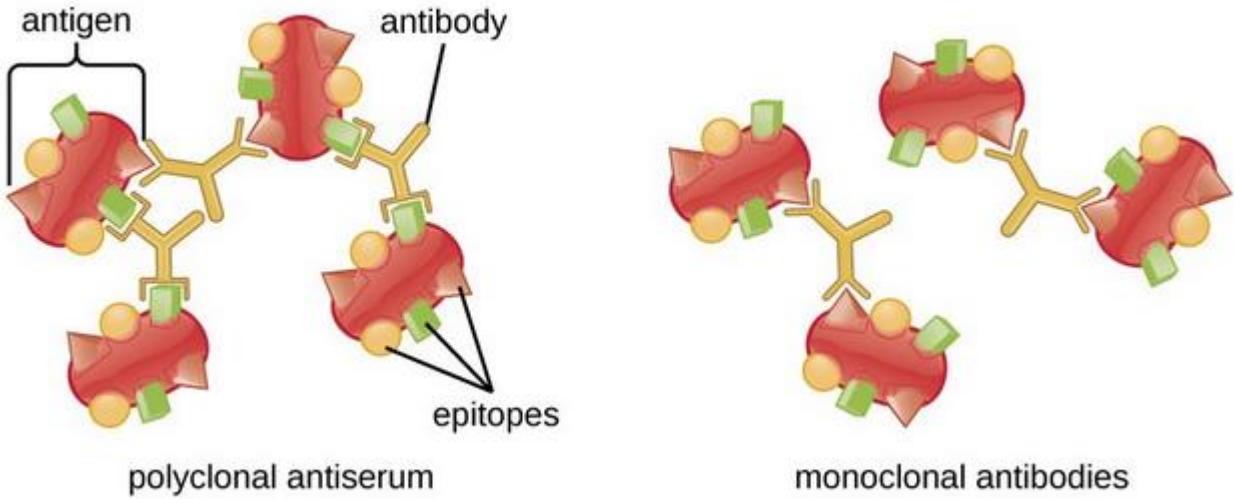
IgD accounts for less than 1% of human immunoglobulins. IgD may be involved in the induction of antibody production in B cells, but its exact function remains unknown.

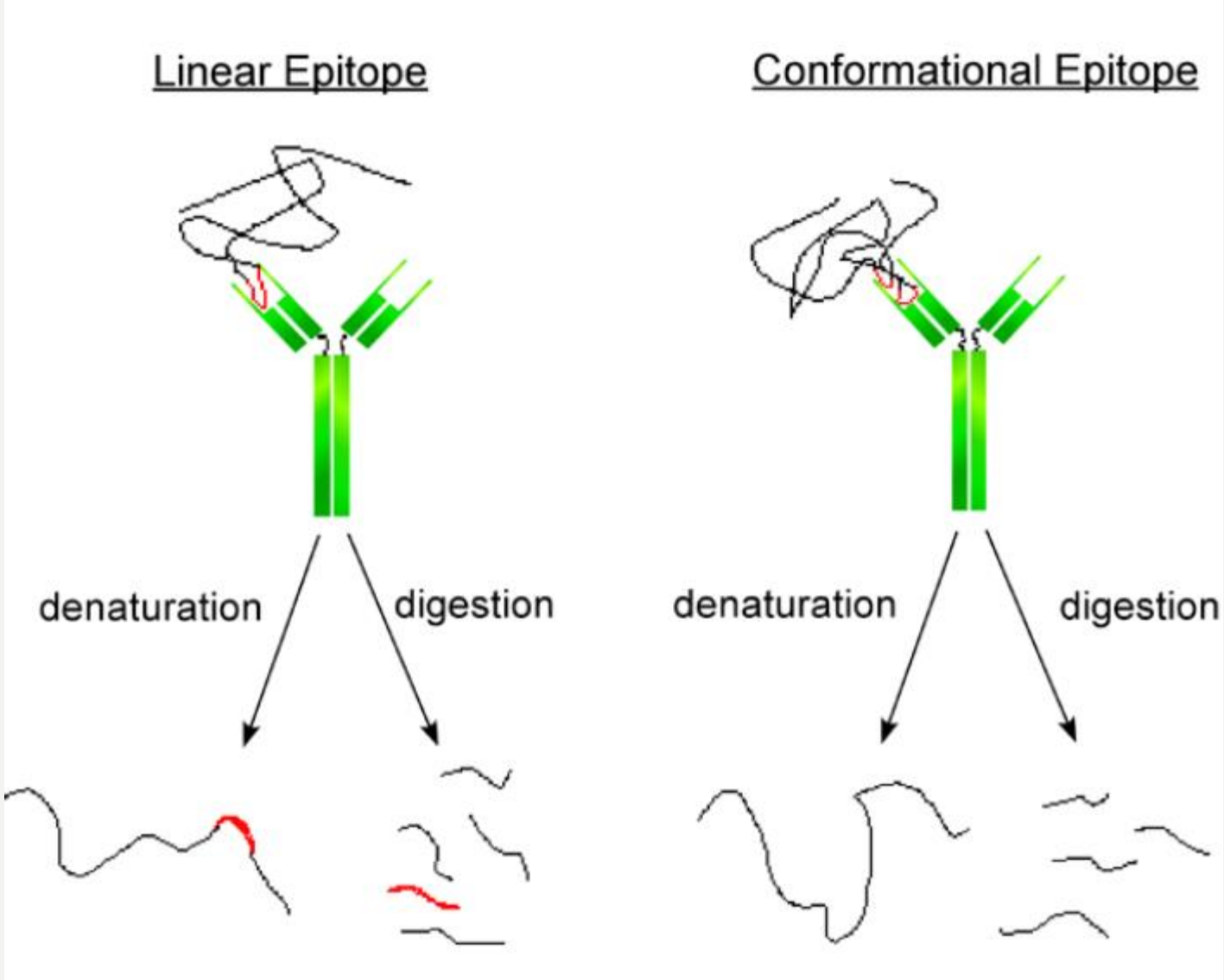
Polyclonal vs. Monoclonal Antibodies

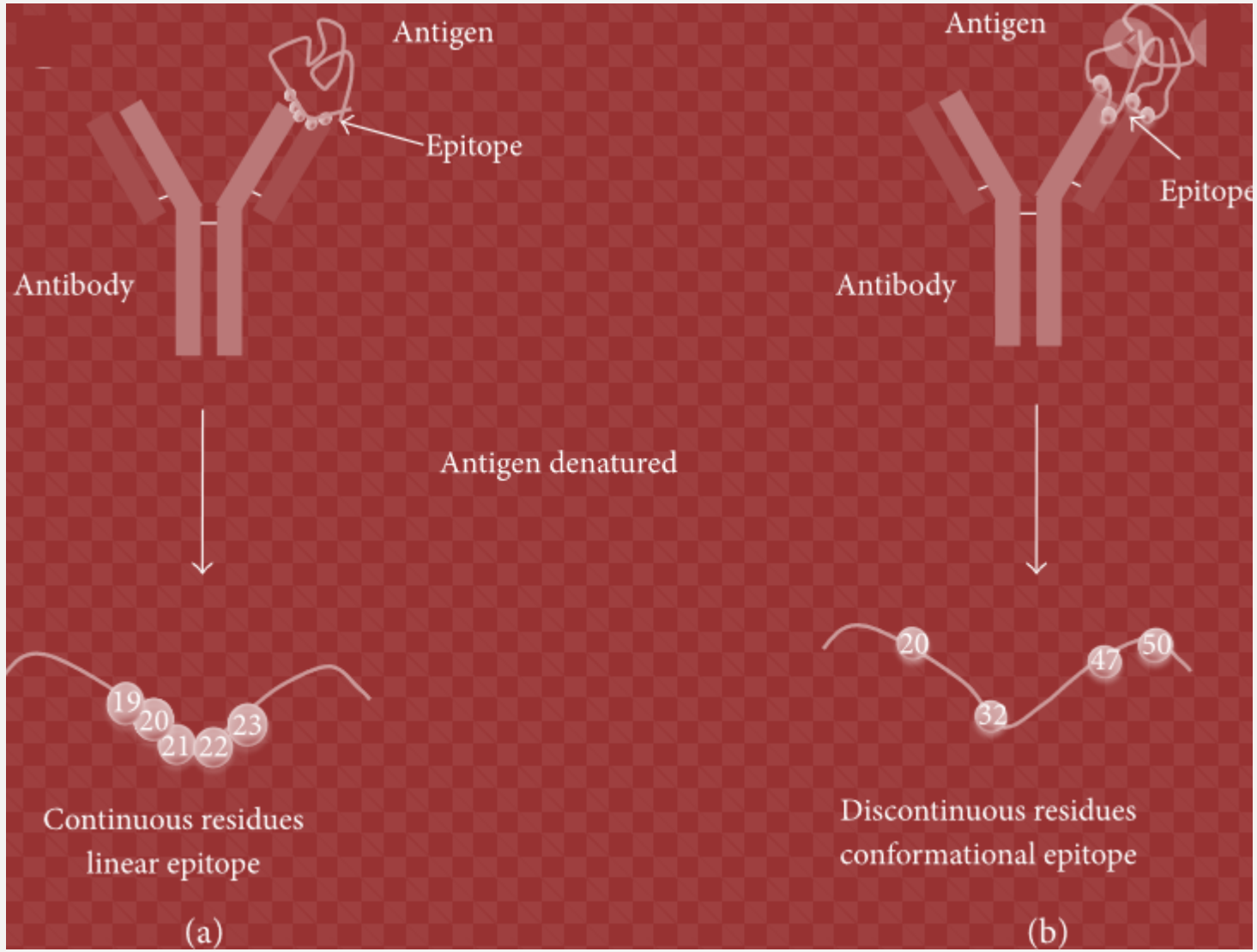
Test sensitivity (Interact with a particular epitope on the antigen)

Test specificity (high affinity to a single epitope)

Cross-reactivity (The ability of an antibody to react with similar antigenic sites on different proteins)




Linear Epitope
denaturation
digestion
Conformational Epitope
denaturation
digestion


Antigen
Epitope
Antibody
Antigen denatured
19
20
21
22
23
Continuous residues
linear epitope
(a)
Antigen
Epitope
Antibody
20
32
47
50
Discontinuous residues
conformational epitope
(b)

Polyclonal Antibodies

آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال مخلوطی از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال می‌باشند که علیه اپی‌توپ‌های مختلف تولید می‌شوند و با تمایل بالا به مولکول آنتی‌ژن اتصال می‌یابند که احتمالاً به دلیل وجود انواع مختلف آنتی‌بادی علیه اپی‌توپ‌های آنتی‌ژن در آن‌ها می‌باشد

در سرم خون هر فرد بین 10^{9}-10^{7} مولکول مختلف آنتی‌بادی وجود دارد و با این وجود تعیین دقیق ساختمان مولکول‌های آنتی‌بادی امکان‌پذیر نیست زیرا سرم حاوی مخلوطی از آنتی‌بادی‌هاست که توسط کلون‌های مختلف لنفوسیتی B تولید می‌شود که اصطلاحاً آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال (Polycolonal Antibody) نامیده می‌شوند.

Polyclonal Antibodies

Polyclonal antibodies (pAbs) are mixture of heterogeneous which are usually produced by different B cell clones in the body. They can recognize and bind to many different epitopes of a single antigen.

ویژگی آنتی بادی های پلی کلونال:

1. تشخیص اپی توپ های چندگانه
2. تشخیص پروتئین های دناتوره شده
3. قابلیت ایجاد شدن در انواع حیوانات (خرگوش، مرغ، بز، خوکچه هندی، همستر، اسب، **موش**، رت و گوسفند می‌باشند)
4. دارای حساسیت کمتر در مقایسه با منوکلونال
5. بکارگرفته می شوند وقتی ماهیت یک آنتی ژن در یک گونه یا گونه های تست شده، مشخص نباشد.

Critical Steps in PAb Production

(1) preparation of the antigen

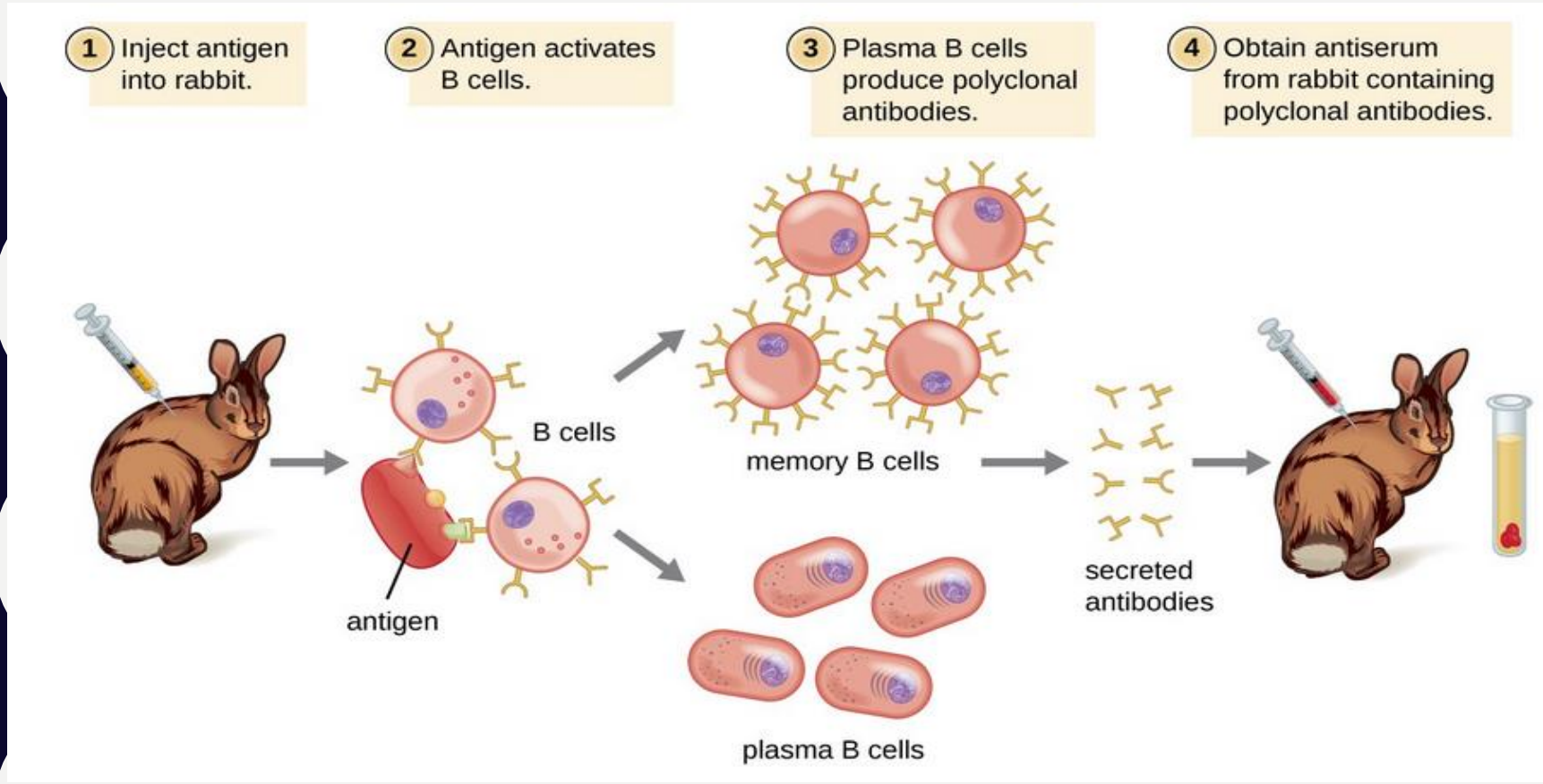
(2) selection of the animal species

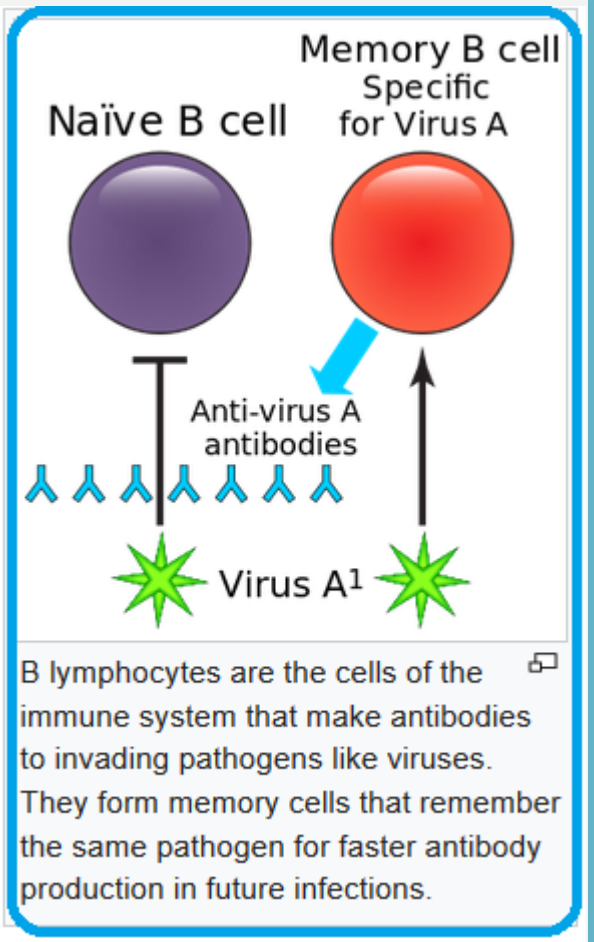
(3) selection and preparation of the adjuvant

(4) injection protocol

(5) postinjection observation

(6) collection of the antibodies





B lymphocytes are the cells of the immune system that make antibodies to invading pathogens like viruses. They form memory cells that remember the same pathogen for faster antibody production in future infections.

Preparation of the Antigen

quality and quantity of the antigen

►Purity ("contamination free"; contamination with endotoxins such as lipopolysaccharide or chemical residues used to inactivate the microorganism, or an extreme pH level)

►quantity of injected antigen (determines the immune response that is evoked. Too much or too little antigen may induce suppression, sensitization, tolerance, or other unwanted immunomodulation)

for rabbits is in the range of 50 to 1000 µg; for mice, 10 to 200 µg; for goats and sheep, 250 to 5000 µg.

►Freund's adjuvant/Alum

ادجوانت ها، ترکیبات شیمیایی یا بیولوژیک هستند که باعث تحریک غیر اختصاصی سیستم ایمنی، علیه آنتی ژنی یا آنتی ژنهایی می‌شوند که به همراه آن تزریق شده است. کاهش اثرات مضر مربوط به واکسن و تحریک انواع خاصی از ایمنی، منجر به توسعه ادجوانت های بسیار زیاد و جدیدی شده است. ادجوانت ها در واکسن های آزمایشگاهی و تجاری، شامل نمک های آلومینیوم (آلوم) (آلومینیوم فسفات و آلومینیوم هیدروکساید)، امولیسیون های روغنی، ساپونین ها، کمپلکس های محرک ایمنی، لیپوزوم ها، میکروپارتیکل ها، کوپلیمرهای دسته ای غیر یونی، پلی ساکارید های مشتق شده، سایتوکاین ها و انواع گسترده ای از مشتقات باکتریایی می‌باشند.



ادجوانت کامل فروند (از روغن معدنی، آب و میکروب کشته سل)

ادجوانت ناکامل فروند (فاقد میکروب کشته شده سل)

Preparation of the Antigen

quality and quantity of the antigen

► Purity ("contamination free"; contamination with endotoxins such as lipopolysaccharide or chemical residues used to inactivate the microorganism, or an extreme pH level)

► quantity of injected antigen (determines the immune response that is evoked. Too much or too little antigen may induce suppression, sensitization, tolerance, or other unwanted immunomodulation)

for rabbits is in the range of 50 to 1000 μg; for mice, 10 to 200 μg; for goats and sheep, 250 to 5000 μg.

► Freund's adjuvant/Alum

ادجوانت ها، ترکیبات شیمیایی یا بیولوژیک هستند که باعث تحریک غیر اختصاصی سیستم ایمنی، علیه آنتی ژنی یا آنتی ژنهایی می‌شوند که به همراه آن تزریق شده است. کاهش اثرات مضر مربوط به واکسن و تحریک انواع خاصی از ایمنی، منجر به توسعه ادجوانت های بسیار زیاد و جدیدی شده است. ادجوانت ها در واکسن های آزمایشگاهی و تجاری، شامل نمک های آلومینیوم (آلوم) (آلومینیوم فسفات و آلومینیوم هیدروکساید)، امولیسیون های روغنی، ساپونین ها، کمپلکس های محرک ایمنی، لیپوزوم ها، میکروپارتیکل ها، کوپلیمرهای دسته ای غیر یونی، پلی ساکارید های مشتق شده، سایتوکاین ها و انواع گسترده ای از مشتقات باکتریایی می‌باشند.

ادجوانت کامل فروند (از روغن معدنی، آب و میکروب کشته سل)

ادجوانت ناکامل فروند (فاقد میکروب کشته شده سل)

Recommended age of animals for polyclonal antibody production [a]

Animal	Age
Mice	6 wk
Rats	6 wk
Rabbits	3 mo
Guinea pigs	3 mo
Chickens	18-20 wk
Goats	6-7 mo
Sheep	7-9 mo

Injection Protocol

The immunization protocol can be prepared after selection of the animal species and the adjuvant

Routes of injection for PAb production are

subcutaneous (s.c زير جلدي)

intradermal (i.d.داخل پوستي)

intramuscular (i.m. عضلاني),

intraperitoneal (i.p.داخل صفاقي),

intravenous (i.v.داخل وريدي)

Volume of Injection

Recommended maximum volume of injection (in mL) used for injection of aqueous antigen/adjuvant mixture per injection route for different animal species

Animal	Injection route b				
	s.c.	i.d.	i.m.	i.p.	i.v.
Mice	0.5	NR b	NR	1	0.2
Rats	0.5-1.0	NR	NR	5	0.5
Guinea pigs	1	NR	NR	5.0-10.0	0.5-1.0
Rabbits	1.5	0.05	0.2-0.5	10.0-20.0	1.5
Sheeps/goats	2	0.05	2	NA b	30
Cattle	2	0.05	2	NA	NG b
Poultry	0.5	0.05	1	NA	0.5

b NR, not recommended; NA, not acceptable; NG, not given.

Injection route recommendations for different adjuvant types per animal species a

Animal	Oil adjuvants and viscous gel adjuvants	No or aqueous adjuvants
Mice, rats, hamsters, guinea pigs	s.c.	s.c., i.p., i.v. b
Rabbits, sheep, goats	s.c., i.d.	s.c., i.d., i.m., i.v. b
Horses	—	s.c., i.d., i.m., i.v. b

b i.v. only with soluble antigens.

Monitoring of the Antibody Response

Maximum blood volumes to be collected from animals during experimentation

Animal	Maximum blood volume (mL)
Rabbits	15 b
Mice	0.3
Rats	2
Guinea pigs	5
Hamsters	0.3
Sheeps	200-600 b
Goats	150-400 b
Horses	500-7000 b

b Dependent on body weight.

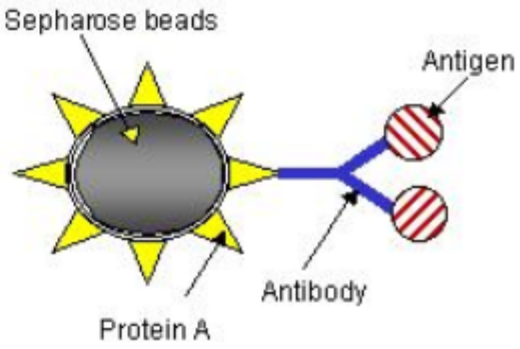
ELISA and RIA

Antiserum obtained from animals will not only contain antibodies against the antigen artificially introduced in the laboratory, but it will also contain antibodies to any other antigens to which the animal has been exposed during its lifetime. For this reason, antisera must first be "purified" to remove other antibodies before using the antibodies for research or diagnostic assays.

The two most common techniques that are applied in order to purify antibodies are **affinity chromatography** and ion-exchange chromatography.

Protein A from *Staphylococcus aureus* has bacterial Fc (or fragment crystalline) receptors which bind to IgG (Sepharose beads conjugated with Protein A)

Confirmation of the purity by SDS-PAGE



The best use of polyclonal antibodies is to detect unknown antigens. Polyclonal antibodies are used as a secondary antibody in immunoassays (e.g. ELISA, western blotting, microarray assays, immunohistochemistry, flow cytometry).

Monoclonal Antibodies

Monoclonal antibodies (mAbs) are generated by identical B cells which are clones from a single parent cell

► **Clones: Cells that are genetically and phenotypically identical to each other and derived from same stem cell**

1. Monovalent affinity (only recognize the same epitope of an antigen)
2. Unlike polyclonal antibodies, which are produced in live animals, monoclonal antibodies are produced in vitro using tissue-culture techniques

Production stages

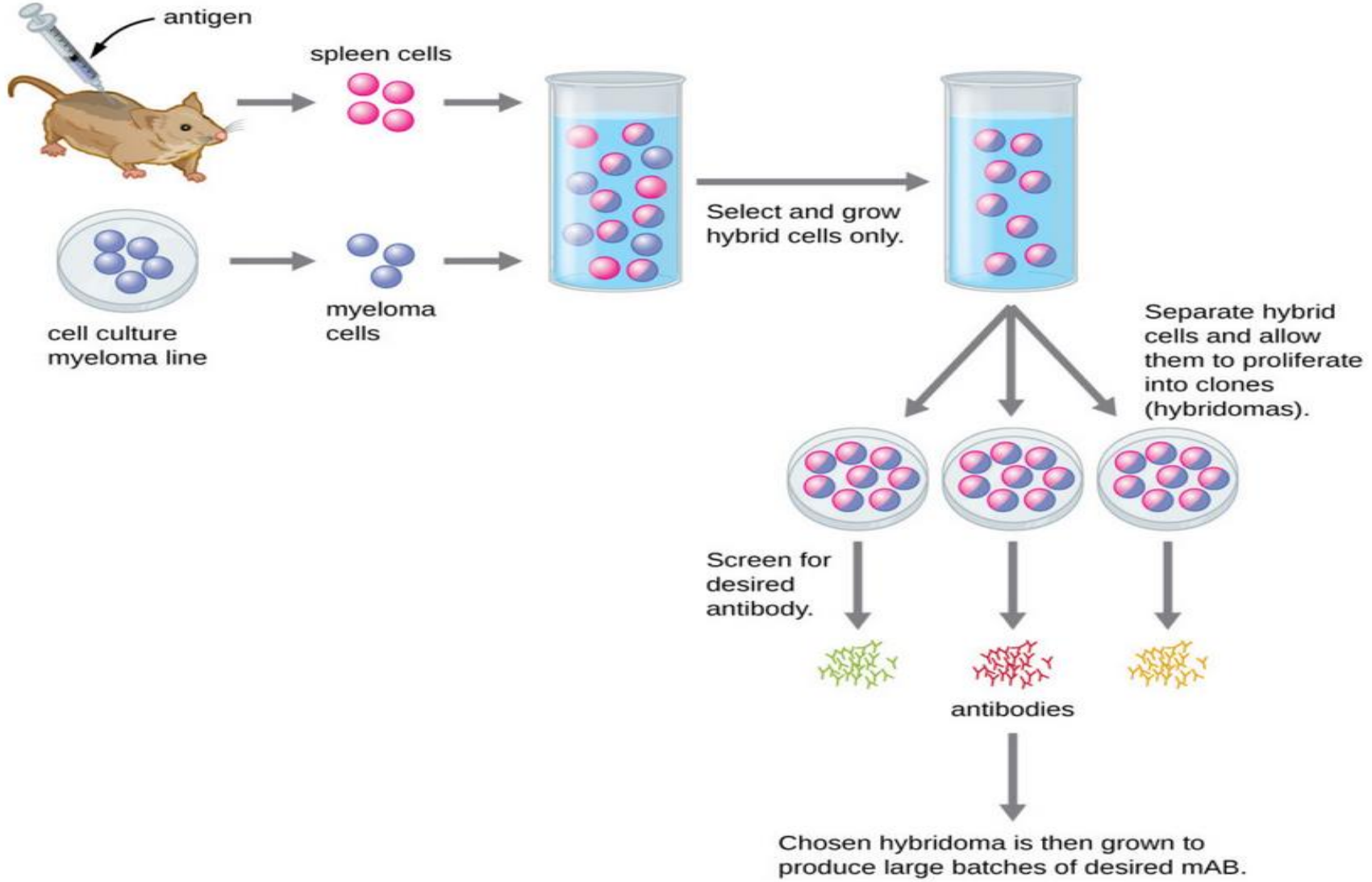
1. injection of the desired antigen into an animal
2. the B-lymphocytes are isolated from the animal's spleen
3. fused with a myeloma cell line
4. creating immortalized B cell-myeloma hybridisms

The hybridomas, then screened for desired mAb

آنتی بادی های منوکلونال

اولین و در حال حاضر عمومی‌ترین روش تولید آنتی‌بادی‌های منوکلونال با ادغام سلولی یا هیبریداسیون سلول‌های B طبیعی تولیدکننده آنتی‌بادی و سلول میلوما و متعاقباً انتخاب سلول‌های ادغام شده ترشح کننده آنتی‌بادی دارای ویژگی مورد نظر انجام می‌گیرد. چنین رده‌های سلولی نامیرا و تولیدکننده آنتی‌بادی را که حاصل ادغام سلولی هستند هیبریدوما می‌نامند و آنتی‌بادی‌های تولید شده توسط آنها را آنتی‌بادی‌های منوکونال می‌گویند.

برای تولید آنتی‌بادی منوکلونال ویژه یک آنتی‌ژن مشخص، آنتی‌ژن را به موش تزریق می‌کنند و سلول‌های B طحال یا گره‌های لنفی آن را جدا می‌سازند سپس سلول‌های B را با رده سلولی نامیرای مناسب ادغام می‌نمایند.



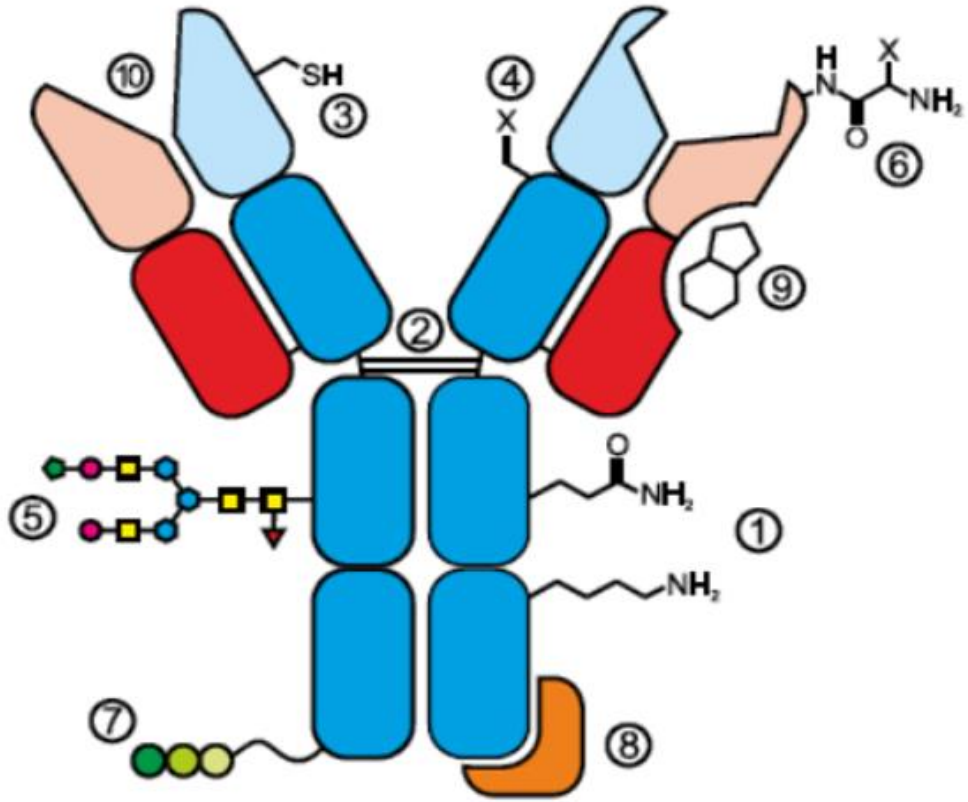
Monoclonal antibodies (mAbs) are produced by introducing an antigen to a mouse and then fusing polyclonal B cells from the mouse's spleen to myeloma cells. The resulting hybridoma cells are cultured and continue to produce antibodies to the antigen. Hybridomas producing the desired mAb are then grown in large numbers on a selective medium that is periodically harvested to obtain the desired mAbs.

Characteristics of Polyclonal and Monoclonal Antibodies	
Monoclonal Antibodies	**Polyclonal Antibodies**
Expensive production	Inexpensive production
Long production time	Rapid production
Large quantities of specific antibodies	Large quantities of nonspecific antibodies
Recognize a single epitope on an antigen	Recognize multiple epitopes on an antigen
Production is continuous and uniform once the hybridoma is made	Different batches vary in composition

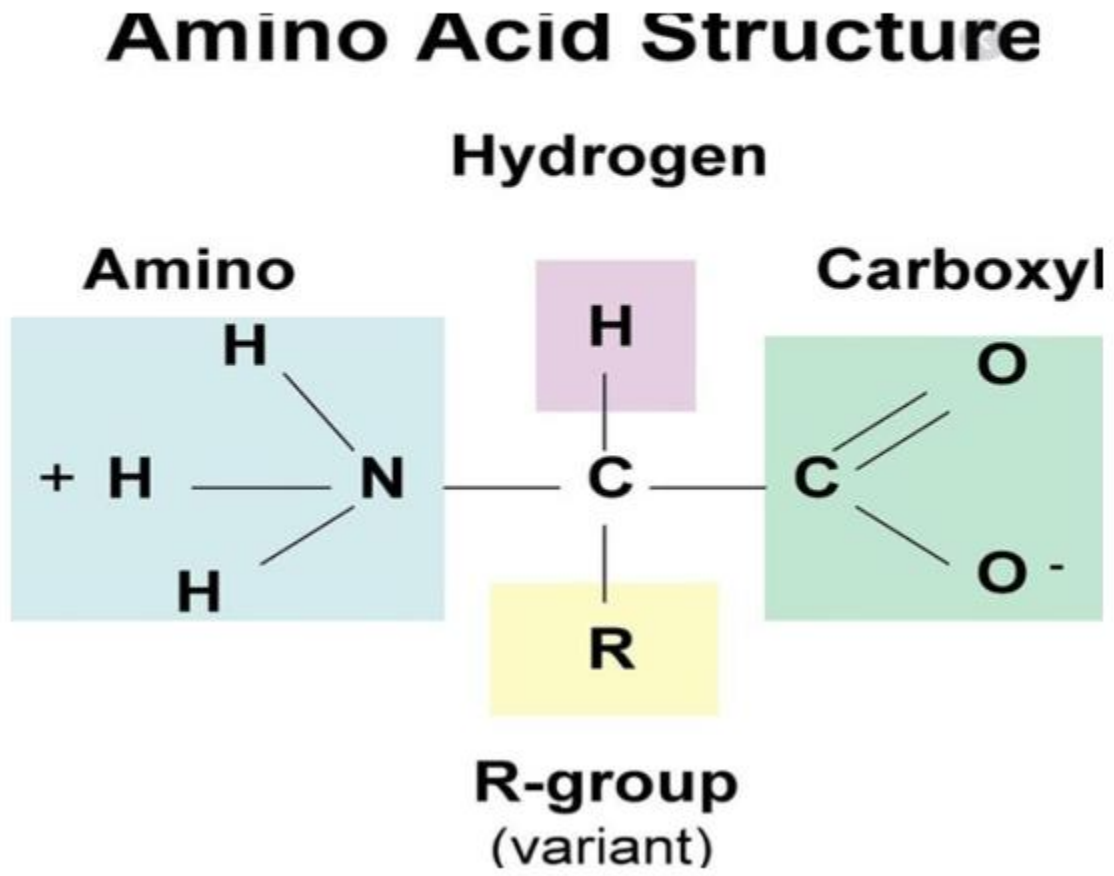
Cross-linking

Antibody Conjugates

Different sites within the structure of an antibody can be targeted to generate antibody conjugates

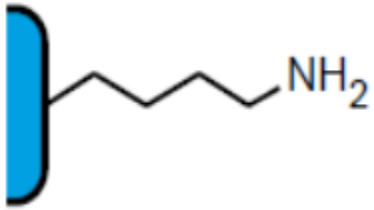


As proteins are based on an amino acid backbone, **conjugation via reactive natural or engineered residues** is the most obvious method

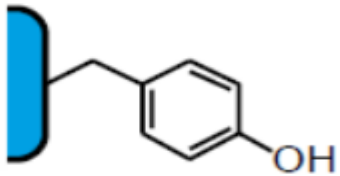


Conjugation via Natural Amino Acid Residues

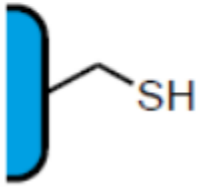
Lysine



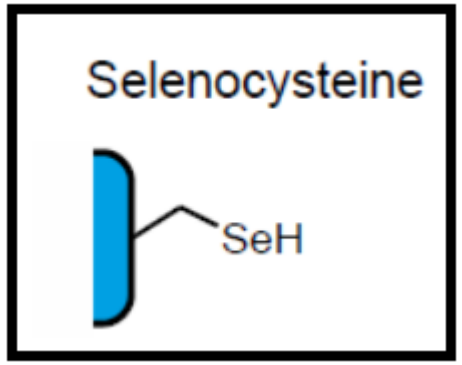
Tyrosine



Cysteine



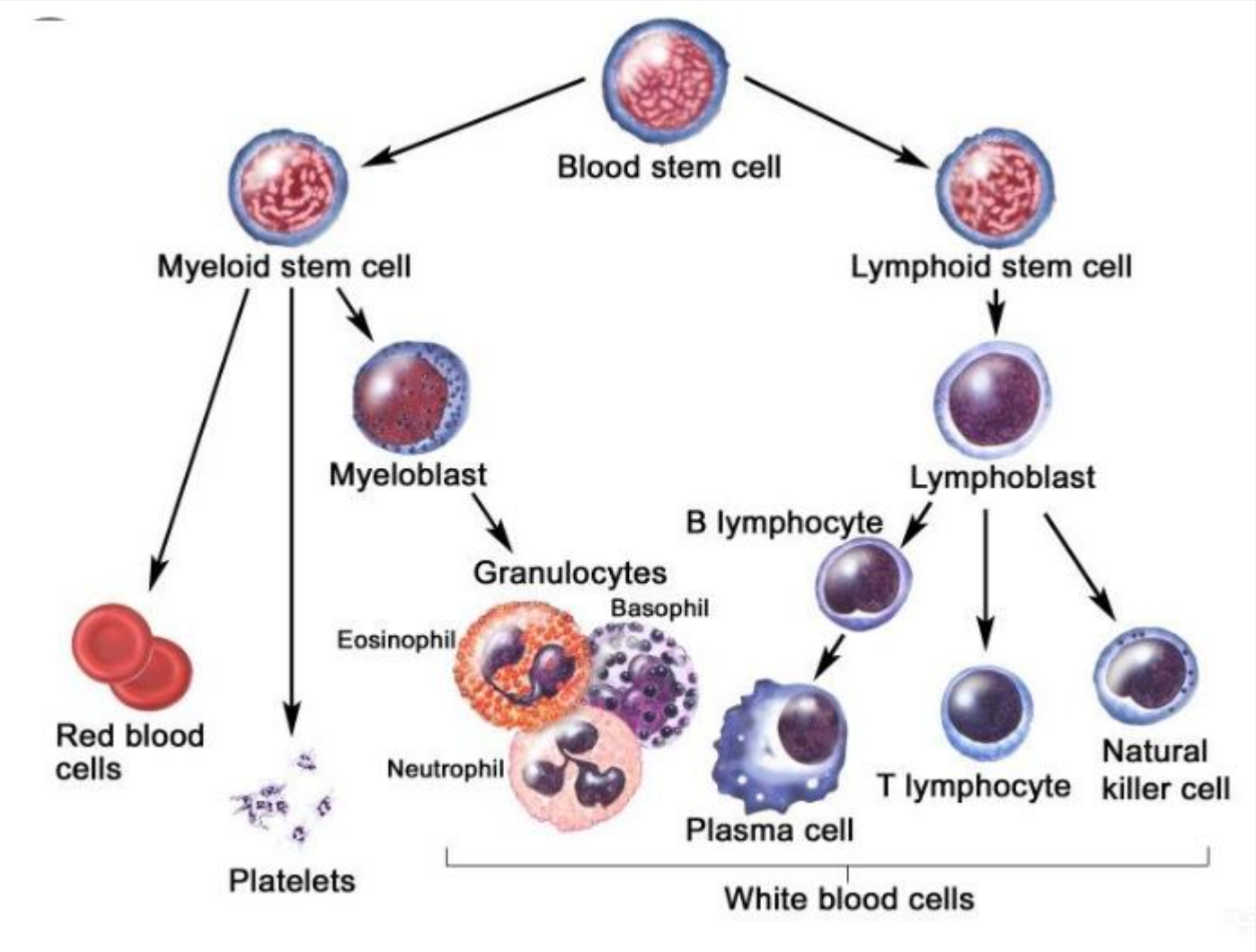
Engineered Cysteines



Conjugation via the Carbohydrate Moiety

Conjugation via Fc-Binding Domains (FcBD)

Bioconjugation via the Nucleotide Binding Site
found in the variable region of immunoglobulins


Blood stem cell
Myeloid stem cell
Lymphoid stem cell
Myeloblast
Lymphoblast
B lymphocyte
Granulocytes
Basophil
Eosinophil
Neutrophil
Red blood cells
Platelets
Plasma cell
T lymphocyte
Natural killer cell
White blood cells