مجله علوم پزشکی مدرس
دوره ۱۰، شماره ۱: از ۱۷-۲۸
بهار ۱۳۸٦

بیش بیان و تخلیص نانوبادی‌های نوترکیب و تهیه آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه علیه آنها

فاطمه رهبری‌زاده[1*]، وحید خدامی‌ویشته[2]، داوود احمدوند[3]

۱- استادیار، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- دانشجوی دکتری، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

دریافت مقاله: ۸۶/۴/۶ پذیرش مقاله: ۸۶/۵/۳۰

چکیده

هدف: قطعه متصل شونده به آنتی‌ژن از آنتی‌بادی‌های زنجیره سنگین (VHH) شتری به صورت یک تک دومن می‌باشند. ساختار کریستالی یک VHH خالص نشان داده است که این مولکول در حدود ۲/۵ نانومتر قطر و کمتر از ٤ نانومتر طول دارد. به همین علت به این مولکول، نانوبادی (Nanobody) گفته می‌شود. شباهت زیاد این مولکول‌ها به VH انسانی موجب می‌شود که این مولکول کاربرد بالقوه در تشخیص‌های ایمنی و نیز ایمنی‌درمانی داشته باشد. یکی از مواد مورد نیاز کلیدی در تولید و تعیین خصوصیات نانوبادی و نیز کاربرد نانوبادی‌ها در تشخیص، مولکول آنتی نانوبادی کونژوگه به HRP می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق بیان بالا و تخلیص چند نانوبادی ویژه نشانگرهای تومور انجام شد. به منظور بیان بالا، ژن‌های نانوبادی در ناقل pSJF9 ساب‌کلون شدند که در نتیجه قطعه نانوبادی به صورت ادغام شده با چند دنباله نشانگر در باکتری اشرشیاکلی نوع TG1 بیان می‌شود. نانوبادی‌های بیان شده با استفاده از ستون کروماتوگرافی تمایلی نیکل تخلیص شدند. در اینجا تهیه، تخلیص و تعیین خصوصیات آنتی‌بادی علیه نانوبادی‌ها، که به صورت متصل به HRP می‌باشد، توضیح داده شده است.

نتایج: آنالیز با SDS-PAGE و وسترن‌بلات نشان می‌دهد که نانوبادی‌های تخلیص شده، خالص و بدون شکستگی می‌باشد. ضمناً به علت استفاده از روش‌های خاص بیوشیمی، آنتی‌بادی کونژوگه به HRP تولید شده در این تحقیق، حساسیت و ویژگی مناسبی دارد. بنابراین آنتی‌بادی کونژوگه تولید شده قابل استفاده در سیستم‌های تشخیص نانوبادی است.

نتیجه‌گیری: در اینجا با تنظیم کردن دما و زمان و القاکننده، میزان قابل توجهی (در مقایسه با مطالعات مشابه) از مولکول نوترکیب بیان وسپس تخلیص شده است؛ ضمن آنکه در مرحله دوم با تولید آنتی‌بادی علیه آن و کونژوگاسیون به مولکول آنزیمی مشخص شد که مولکول حاصل، قابلیت تشخیص نانوبادی‌ها را در انواع روش‌های تشخیصی با دقت و حساسیت بالا دارد.

کلید واژگان: نانوبادی، VHH، بیش بیان، کونژوگاسیون.

۱- مقدمه

در سال ۱۹۹۳ سرم انواع شترهای یک کوهانه و لاما، که حاوی نوع منحصر به فردی از آنتی‌بادی‌های فاقد رشته سبک هستند، شناسایی شد [۱]. رشته سنگین از این آنتی‌بادی‌های شتری، که به آنتی‌بادی‌های زنجیره سنگین معروف شده است، نسبت به همتای خود در آنتی‌بادی‌های معمولی، به علت غیاب اولین دومن CH1، وزن کمتری دارد. چون رشته سبک حذف شده است، آنتی‌بادی‌های زنجیره سنگین فقط از طریق تک دومن

*نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، صندوق پستی: ۳۳۱-۱٤۱۱۵ E-mail: Rahbarif@modares.ac.ir

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-09]

VHشان (Variable domain conventional antibodies) (کـه بـرای تفـاوت نـسبت بـه VH مـعمولی VHH (Variable domain of heavy chain antibodies) گفتـه می‌شود) به آنتی‌ژن وصل می‌شـوند. سـاختار کریـستالی یـک VHH خالص نشان داده است که این مولکول در حـدود ۲/۵ نانومتر قطر و کمتر از ٤ نانومتر طول دارد؛ به همین علـت بـه این مولکول نانوبادی گفته می‌شود به این ترتیـب تـک دومـن VHH (نانوبادی) کوچکترین قطعه آنتی‌بادی متصل شونده به آنتـی‌ژن اسـت کـه قطعـه کامـل آن وزنـی در حـدود ۱۲-۱۵ کیلودالتون و ابعادی در حدود نانومتر دارد و از یک آنتی‌بـادی دارای قدرت اتصال مشتق شده است [۳،۲].

کلون کردن نانوبادی در یک ناقـل (vector) نمـایش فـاژ (phage display)، انتخاب قطعه اتصالی به آنتی‌ژن به وسیله غنی‌سازی و بیان نانوبادی انتخاب شده در باکتری‌ها به عنـوان یک جایگزین جذاب و ارزشمند برای به‌دست آوردن مولکول کوچک شناساگر است. نانوبادی‌های به‌دست آمده از شـترهای یک و دوکوهانه و یا لاماهای ایمـن شـده در مقایـسه بـا Fab (Fragment antigen binding) و Fv (Fragment variable) و scFv (single chain Fragment variable) کـه از سـایر پستانداران به‌دست آمده‌اند، برتری‌هـای درخـشان دارد؛ زیـرا علاوه بر اینکه با کلون کـردن و بیـان فقـط یـک تـک دومـن می‌توان قطعهٔ کامل متصل شونده بـه آنتـی‌ژن را در ایـن‌ویـوو (in vivo) بالغ شـده، تولیـد کـرد، VHH شـتری نوترکیـب، خصوصیات جالب و منحصر به فردی دارد. این خـصوصیات شامل: بیان با بازده بالا و آسانی تخلیص، تولید قطعه آنتی‌بادی تک دومنی با پیچش کامل، بسیار محلول و بسیار پایدار، تولید قطعـه اتـصالی ویـژه آنتـی‌ژن و بـا تمایـل بـالا، هومولـوژی (Homology) بسیار نزدیک به قطعه VH انـسانی و توانـایی شناخت اپی‌توپهای فضایی ویژه بـه‌وسـیله CDR3 طویـل آن می‌باشد [٤-۷].

در میان سیستم‌های پروکاریوتی (Prokaryotic)، بـاکتری اشرشیاکلی از جاذبه خاصی برای تولید پروتئین‌های نوترکیـب برخـوردار اسـت. توانـایی رشـد سـریع بـا تـراکم بـالا و در محیط‌های ساده و ارزان، اطلاعات ژنتیکی کاملاً شناخته شده، در دسـترس بـودن تعـداد زیـادی از ناقـل‌هـای کلونینـگ (Cloning) و بیانی و گونه‌های جهـش یافتـه میزبـان، کنتـرل آسان و امکان تولید انبوه پروتئین نوترکیب از مـواردی اسـت که می‌توان به آن اشاره کرد [۸-۱۲].

به منظور بیان پروتئین نوترکیب در اشرشیاکلی، ناقـل‌هـای بیـانی متعـددی طراحـی شـده‌انـد. در ایـن ناقـل‌هـا، عناصـر کنترل‌کننده ژنتیکی، کـه در مراحـل مختلـف بیـان ژن شـامل: رونویسی، ترجمه، پایداری پروتئین، ترشح از سـلول و میـزان اکسیژن لازم نقش دارند، جایگذاری شده‌اند. عمده‌ترین عوامل دستیابی به بیان بالای پروتئین نوترکیب در اشرشـیاکلی شـامل مـوارد زیـر اسـت: گونـه مـیزبان، تعـداد کپـی پلاسـمید، آنتی‌بیوتیک انتخـابی، پروموتـور (Promoter)، خاتمـه دهنـده رونویسی، پایـداری mRNA، عـلائم ترجـمه، کـدون رایـج (Codon usage)، دما، شرایط کشت و محیط کشت (شـرایط رشد، میزان اکسیژن، سرعت رشد، منبع کربن) و نوع فرمانتور نقش مهمی در میزان بیان دارد [۸-۱۲].

از مهمترین عوامل لازم درحوزه تولید آنتی‌بادی‌هـای نوترکیـب و همچنین آزمایش‌هـای تعیـین خـصوصیات ایـن مولکـول‌هـا، در دست داشتن مولکول نشانگر یا مولکول شناساگر مناسب، جهـت ردیابی این مولکول‌ها است. در این راستا در ابتدا باید میزان قابـل توجهی از مولکول نوترکیب را بیان و سـپس تخلـیص نمـود. در مرحلـه دوم بـا تولیـد آنتـی‌بـادی علیـه آن و کونژوگاسـیون (Conjugation) به مولکول آنزیمی، نهایتاً به مولکول شناساگری که در تحقیقات بنیادی مثل روش نمایش فـاژ وانـواع روش‌هـای تعیین خصـوصـیات آنتی‌بـادی‌ها، آزمـون‌هـای تشـخیـصی(مثـل ایمنوهیـستوشیمی (Immunohistochemistry) و ایمنوسایتوشـیمی (Immunocytochemistry) کاربرد دارد، دسترسی پیدا می‌شـود. با توجه به اینکـه مطالعـات دامنـه‌داری بـرای تولیـد و تعیـین خصوصیات نانوبادی هدف گیرنده انواع نـشانه‌هـای سـرطانی در حال انجام است و نیز به دلیل اهمیت روزافزون نانوبادی‌ها در تحقیقـات ایمنـی‌درمـانی (Immunotherapy)، و قابلیـت بالقوه این مولکول بـرای اسـتفاده در درمـان بـا ریـزذرات‌هـا،

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-09]

تلاش برای ساخت مولکول‌های شناساگر این عوامل، ضروری به نظر می‌رسد. در این مقاله گزارش کاملی از روش تولید، تخلیص و کونژوگاسیون آنتی‌بادی ثانویه علیه نانوبادی‌ها شرح داده شده است [۱۴،۱۳].

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

سرم آلبومین گاوی (Bovine Serum Albumin: BSA)، آرلاسل (Arlacel)، سولفات آمونیم، نمک‌های فسفاته سدیم، کلرید سدیم، سدیم آزید، کلرید منیزیم، HRP (Horseradish Peroxidase)، سفادکس G-25 (Sephadex G-25)، ژل فعال شده سیانوژن برماید، TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine)، تری‌اتیل‌آمین و PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride) از شرکت Sigma تهیه شد. آنزیم‌های Taq پلیمراز، T4 DNA لیگاز، آنزیم‌های برش‌گر محدود، dNTPs، آگارز، انواع پودرهای محیط کشت باکتری و اتیدیوم برماید (Ethidium bromide) از شرکت Roche و Fermentas تهیه گردید.

۲-۲- تولید مقادیر زیاد نانوبادی محلول به عنوان ایمنوژن (Immunogen)

۲-۲-۱- انتقال ژن نانوبادی به ناقل‌های بیانی و بررسی شرایط بهینه تولید انبوه

به منظور تولید نانوبادی در مقیاس انبوه، چهار کلون نانوبادی (RRB71، RRB12، RRD5 و RRD41) را، که قبلاً تعیین توالی شده بودند، انتخاب و انتقال ژن (sub-cloning) نانوبادی‌های مذکور به ناقل بیانی pSJF9 صورت گرفت. به این منظور، جفت آغازگر (Primer) جدید که با داشتن جایگاه برش BamHI و BbsI (BpuAI) مناسب کلونینگ قطعه VHH در ناقل pSJF9 می‌باشد، با توالی زیر طراحی و خریداری شد:

Vp-Bam: ۵′-GTGGCCGCGTGGACTGGATCCTGAGGAGACGGTGAC-۳′

Vp-Bbs: ۵′-TATGAAGACACCAGGCCGTGCAGCTGCAGGCGTCTG-۳′

سپس واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای یاد شده و آنزیم Pfu پلیمراز و با دمای واسرشتگی (Denaturation) ۹۴ درجه (۲۰ ثانیه)، جفت شدن (Annealing) معادل۵۵ درجه (۳۰ ثانیه) و طویل شدن (Extension) ۷۲ درجه (۵۰ ثانیه)، با ۳۰ چرخه تکثیر قطعات انجام گردید. در ادامه برای جدا کردن ژن‌های VHH از بین محصولات تکثیر شده، باندهای ۳۰۰-۴۵۰ bp را از ژل خارج کرده و با استفاده از کیت استخراج DNA از شرکتMN آلمان اقدام به جداسازی قطعات موردنظر گردید. پس از استخراج ناقل pSJF9 و آماده شدن ژن نانوبادی و انجام بررسی‌های کمی بر روی این دو مرحله، هضم آنزیمی با آنزیم‌های BamHI و BbsI در لوله‌های جداگانه برای ناقل و ژن نانوبادی نیز انجام گرفت. در مرحله بعد پس از استخراج از ژل و تعیین نسبت مولی ناقل و نانوبادی، درج ژن نانوبادی در ناقل pSJF9 با کمک T4 DNA لیگاز انجام شد و نهایتاً با روش انتقال الکتریکی به میزبان باکتری (TG1) منتقل گردید [۱۵].

در محیط TB (Tris-borate) حاوی آمپی‌سیلین (Ampicillin)، باکتریTG1 حاوی سازه یاد شده، بعد از رشد و رسیدن به جذب نوری (Optical Density) (۶۰۰ نانومتر) معادل ۰/۷، در شرایط مختلف دما، زمان و غلظت IPTG (Isopropyl-1-thio-β-D-galactoside)، القا و جمع‌آوری محصول شد که پس از مقایسه نتایج، بهترین شرایط برای بیان در مقیاس انبوه به‌دست آمد [۱۶].

۲-۲-۲- جمع‌آوری نانوبادی

محصول پروتئینی (نانوبادی) در باکتری حاوی سازه در پریپلاسم (Periplasm) تجمع می‌یابد که از رسوب ml۱۰۰ کشت باکتری با استفاده از شوک اسمزی (انتقال رسوب به

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-09]

محلول غلیظ قند سوکروز و بلافاصله انتقال رسوب به غلظت پایین (۵-۱۰mM کلرید منیزیم) محتویات پریپلاسم خارج می‌شود. برای هر یک از نانوبادی‌های به‌دست آمده در بهترین شرایط در حضور 2-ME (2-Mercapto-ethanol) (حالت احیا) الکتروفورز SDS-PAGE در ژل ۱۲٪ انجام شد و به دنبال آن رنگ‌آمیزی کوماسی بریلیانت بلو (Coomassie brilliant blue) و نیز آزمایش وسترن‌بلات با استفاده از آنتی C-myc متصل به HRP انجام گردید [۱۷].

۲-۲-۳- تخلیص با ستون IMAC

(Immobilized Metal Affinity Chromatography)

چون این نانوبادی‌ها به صورت ادغام شده به مولکول نشانه (His-tag) بیان می‌شوند، این تخلیص با استفاده از ستون نیکل(Ni^{+}-NTA یا Nickel-nitrilo-triacetic acid) در شرایط بومی و با غلظت ۱۵۰ میلی‌مولار ایمیدازول (Imidazole) انجام و محصول بر روی ژل SDS- PAGE الکتروفورز گردید [۱۷،۱۵].

۲-۲-۳- بررسی واکنش اتصال نانوبادی بعد از تخلیص

به منظور تأیید کارایی مولکول‌های نانوبادی‌های ساخته شده در مقیاس بالا، بعد از مراحل تخلیص، توانایی اتصال دو مورد از نانوبادی‌های بیان شده به آنتی‌ژن‌های سنتز شده (پپتیدهای مقلد MUC1 (MUCI mimetic peptide)) با روش الایزا (Enzyme Linked Immunosorbent Assay: ELISA) ثابت گردید.

۲-۳- ساخت آنتی‌بادی ثانویه علیه نانوبادی در خرگوش

۲-۳-۱- ایمن کردن خرگوش‌ها

از محلول حاوی مخلوط نانوبادی‌های تخلیص شده، به ازای هر خرگوش، حجم حاوی ۵۰۰ میکروگرم نانوبادی برداشته و با حجم مساوی از ادجوانت (Adjuvant) کامل فروند (Fround) به چهار خرگوش، سفید نیوزیلندی و سه ماهه، تزریق (۷-۱۰ محل در پشت حیوان در زیر پوست) انجام گرفت. در تزریقات بعدی ۲۵۰ میکروگرم و همراه با ادجوانت ناقص به هر خرگوش تزریق شد. تزریق‌های یادآور، بار اول، یک ماه بعد و موارد بعدی هر دو هفته یکبار صورت می‌گرفت [۱۸].

۲-۳-۲- تیتر کردن آنتی‌سرم خرگوشی

در یک آزمون الایزا، به ترتیب مراحل ذیل انجام شد (برای هر خرگوش این عملیات جداگانه انجام شده است):

۱- در ۲۰ چاهک از ظرف پلی‌استایرن (Polystyrene)، هر چاهک ۱۰۰µl ازمخلوط محلول نانوبادی‌های تخلیص شده ۱۰(µg/ml) اضافه شد. در ۲/۵ ردیف ۸ تایی دیگر نیز از محلول BSA ۱۰µg/ml به هر چاهک ۱۰۰µl اضافه شد؛

۲- ظرف در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد یک شب انکوبه شد؛

۳- سه بار شستشو با بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار، pH=۷/۲ و بار آخر ظرف روی کاغذ صافی خشک شد؛

٤- مسدود کردن سطح چاهک‌ها با ۲۰۰ میکروگرم در چاهک محلول مسدود کننده (Blocking solution) ۲٪ BSA به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد و تکرار مرحله ۳؛

۵- اضافه کردن رقت‌های متوالی از آنتی‌سرم خرگوشی ($\frac{۱}{۳۲۰۰۰}$، $\frac{۱}{۱۶۰۰۰}$، $\frac{۱}{۸۰۰۰}$، $\frac{۱}{۴۰۰۰}$، $\frac{۱}{۲۰۰۰}$، $\frac{۱}{۱۰۰۰}$، $\frac{۱}{۵۰۰}$) به صورت دوتایی و در دو تا از چاهک‌های باقی مانده از بافر EIA (Enzyme Immuno Assay) و در دو چاهک آخر از $\frac{۱}{۳۰۰}$ رقیق شده، سرم خرگوشی غیر ایمن اضافه شد؛

٦- انکوباسیون (Incubation) یک ساعته در ۳۷ درجه سانتیگراد، سپس تکرار مرحله ۳؛

۷- به تمام چاهک‌ها هر کدام ۱۰۰µl از محلول $\frac{۱}{۴۰۰۰}$ رقیق شده آنتی‌بادی سوم (آنتی‌بادی ثانویه علیه IgG خرگوشی و تهیه شده در بز و متصل به HRP) اضافه شد و بعد انکوباسیون یک ساعته در ۳۷ درجه سانتیگراد؛

۸- پنج بار شستشو با بافر شستشوی الایزا و خشک کردن ظرف‌ها در انتهای پنج بار شستشو؛

۹- به هر چاهک، ۵۰µl از محلول TMB (تترا متیل بنزیدین، سوبسترای HRP) اضافه شد که بعد از ۵ تا ۱۰ دقیقه انکوباسیون در تاریکی، رنگ آبی در چاهک‌های حاوی آنزیم دیده شد؛

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-09]

۱۰- توقف رنگ با µl۵۰ بافر متوقف کننده و تبدیل رنگ آبی به زرد و سپس قرائت شدت جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ٤٥٠ nm، با دستگاه قرائت‌گر الایزا انجام گردید. به این ترتیب بهترین آنتی‌سرم، که بالاترین تیتر را داشت برای کونژوگاسیون به HRP انتخاب شد [۱۸].

۲-۳-۳- تخلیص آنتی‌بادی پلی‌کلونال (Polyclonal) از آنتی‌سرم‌های دارای بالاترین تیتر

بعد از رسوب دادن پروتئین‌ها با نمک آمونیوم سولفات ۳۳٪، با کمک رزین مبادله کننده آنیون DEAE (دی اتیل آمینو اتیل سلولز)، جداسازی گلوبولین‌ها از سایر پروتئین‌ها انجام شد [۱۷].

۲-۳-٤- تعیین تیتر آنتی‌بادی تخلیص‌شده به‌روش الایزا و با استفاده از منحنی چکر بورد (Checker Board)

برای این منظور مانند آنتی‌سرم تخلیص نشده، عمل شد؛ با این تفاوت که غلظت‌های مختلف آنتی‌بادی از پودر خشک آنتی‌بادی تهیه گردید [۱۳].

۲-۳-۵- تعیین خصوصیات آنتی‌بادی ثانویه علیه نانوبادی

الف) تعیین حساسیت با استفاده از رسم منحنی استاندارد و با آزمایش غلظت‌های (۸، ٤، ۲، ۱، ۰/۵ و ۰/۱ میکروگرم در چاهک) از نانوبادی انجام شد؛

ب) تعیین ویژگی آنتی‌بادی تخلیص شده به روش الایزا مطابق قسمت قبلی؛ با این تفاوت که در مرحله اول به جای استفاده از غلظت‌های مختلف نانوبادی در چاهک‌ها، از آنتی‌ژن‌های مختلف، همچون BSA و KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) به عنوان نمونه‌های غیر مربوطه پروتئینی استفاده گردید [۱۹]؛

ج) محاسبه تمایل به روش بیتی (Beatty) و همکاران محاسبه شد [۲۰].

۲-۳-٦- اتصال آنتی‌بادی ثانویه علیه نانوبادی به آنزیم HRP

پس از اطمینان از وجود تیتر بالای آنتی‌بادی علیه نانوبادی در سرم خرگوش‌ها و تخلیص کروماتوگرافی تعویض یونی، mg/ml۲ آنتی‌بادی خالص شده خرگوشی در بافر بی‌کربنات ۱۰۰ میلی‌مولار، pH=۹/۲، دیالیز شد. از طرفی ۳ mg از HRP در ml٤ از همان بافر حل گردید. به محلول HRP، ۰/٤ میلی‌لیتر از محلول mg/ml ۱/۷ سدیم پریدات (حل شده در آب) اضافه شد. بعد از دو ساعت انکوباسیون در تاریکی، دو محلول یاد شده مخلوط شدند و سپس کل مواد واکنش به یک پیپت پاستور حاوی ۰/۵ گرم سفادکس G25 اضافه شد تا یون‌های اضافی و نمک‌ها از واکنش حذف شوند. در ادامه محتویات پیپت پاستور با ml ۲/۲ بافر بی‌کربنات شستشو داده شد و به محلول خارج شده، µl۱۰۰ از محلول سدیم بوروهیدرات (۵ میلی‌گرم در ۱ ml از سود ۱۰۰ میلی‌مولار به صورت تازه تهیه شده) اضافه گردید. بعد از سی دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق و در تاریکی، مجدداً µl۲۰۰ محلول سدیم بوروهیدرات اضافه کرده و مجدداً یک ساعت انکوباسیون در تاریکی اعمال شد [۲۰].

۲-۳-۷- تخلیص آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه به آنزیم HRP

در این تحقیق با استفاده از غلظت مولی دو به یک (HRP نسبت به IgG) و در مرحله بعد استفاده از رسوب‌دهی با حجم مساوی از محلول سولفات آمونیم اشباع با pH=۷، جداسازی آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه (Conjugated) به آنزیم HRP انجام گردید [۲۰].

۲-۳-۸- بررسی تیتر آنتی‌بادی ثانویه متصل به HRP بعد از کونژوگاسیون

بعد از اتمام کونژوگاسیون باید آنتی‌بادی ثانویه متصل به HRP برای به‌دست آوردن بهترین رقت کونژوگه در آزمون‌ها، با روش الایزا کنترل شود. بررسی تیتر کونژوگه آنتی‌بادی آنزیم، به ترتیب مراحل انجام شده در قسمت ۲-۳-۲ انجام می‌شود، با این تفاوت که در مرحله ۵ به جای افزودن آنتی‌بادی ثانویه خرگوشی، از آنتی‌بادی خرگوشی متصل به HRP به رقت‌های مختلف به چاهک‌ها افزوده می‌شود و مرحله ۷ و ۸ حذف می‌شود و بعد از مرحله ٦، مرحله ۹ است که باید صورت پذیرد و سپس بقیه مراحل به ترتیب انجام می‌شود. به این ترتیب می‌توان بهترین رقت برای آنتی‌بادی ثانویه متصل به HRP را به‌دست آورد [۱۷].

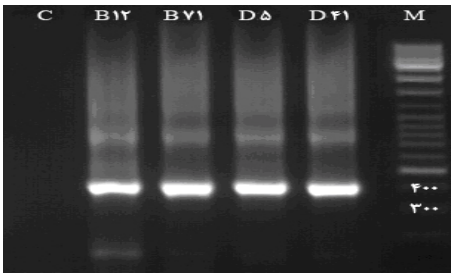
[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-09]

۳- نتایج

۳-۱- انتقال ژن نانوبادی به ناقل‌های بیانی و نتایج شرایط بهینه تولید انبوه

۳-۱-۱- نتیجه PCR روی کلون‌های اولیه حاوی ژن نانوبادی:

محصول PCR روی ژل آگارز الکتروفورز، تکثیر مناسب ژن را نشان می‌دهد (شکل ۱).



شکل ۱ الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ برای محصولات PCR. چاهک M: نشانگر، چاهکC: کنترل منفی PCR برای همان آغازگرها و در بقیه چاهک‌ها از هر یک از کلون‌های B12، B71، D5 و D41 نمونه‌گذاری شده است.

نتایج ساب کلونینگ و تایید آن بعد از انجام هضم و اتصال مولکولی، سازه حاصل به باکتری TG1 منتقل شد و نتایج تغییر شکل (تعداد زیاد کلون حاوی ژن نانوبادی) مؤید ساب کلونینگ موفق است.

۳-۱-۲- بررسی شرایط بهینه برای تولید در مقیاس انبوه:

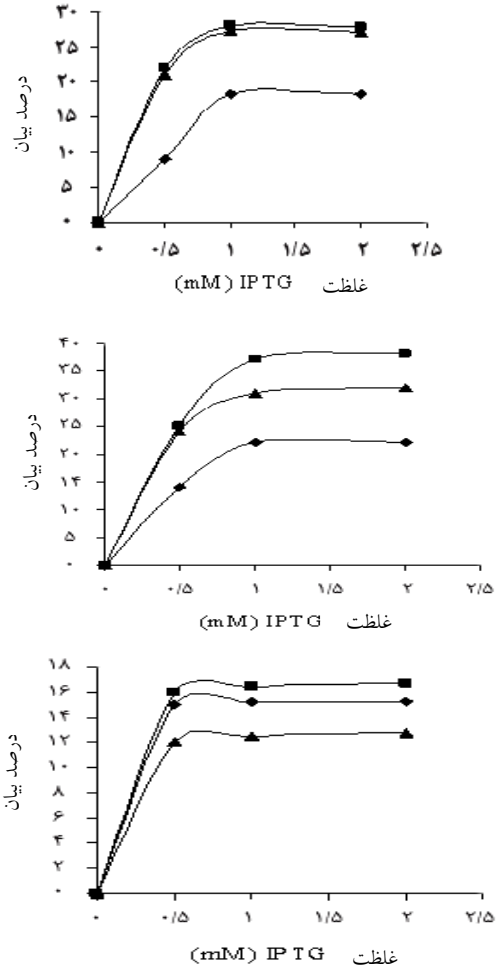
در این تحقیق، سه غلظت IPTG (شامل ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌مولار)، سه دمای (۲۵، ۳۰ و ۳۷ درجه سیلسیوس) و سه طول دورهٔ انکوباسیون (۱۲، ۲٤، ۳٦ و ٤٨ ساعت) مورد آزمون قرار گرفت. نتایج شرایط مختلف برای دو کلون، یکی از منبع شتر یک کوهانه و دیگری از منبع شتر دو کوهانه، در شکل‌های ۲ و ۳ آورده شده است (در این شکل‌ها نتیجه زمان ۱۲ ساعت داده نشده است). از بین شرایط یاد شده، ۳٦ ساعت کشت در دمای ۳۰ درجه سیلسیوس و غلظت ۱ میلی‌مولار IPTG نسبت به کل حالت بررسی شده برای این کلون‌ها، به عنوان شرایط بهینه انتخاب شد. این انتخاب بعد از بررسی غلظت باند پروتئین ترشحی در SDS-PAGE و مقایسهٔ درصد بیان باند مورد نظر این تحقیق با کل پروتئین‌های موجود در لیزات باکتری و با استفاده از دستگاه ژل داکیومنت (Gel Document) (Pharmacia) صورت گرفت.

۳-۲- جمع‌آوری VHH

بعد از فراهم کردن شرایط بیان، نتایج الکتروفورز SDS-PAGE و بلاتینگ (Blotting)، دال بر بیان مولکول نانوبادی می‌باشد (شکل ٤).

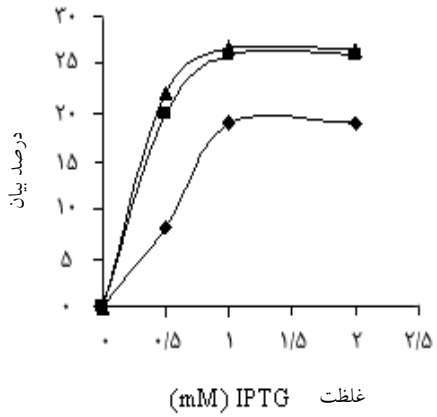
۳-۳- تخلیص با ستون IMAC

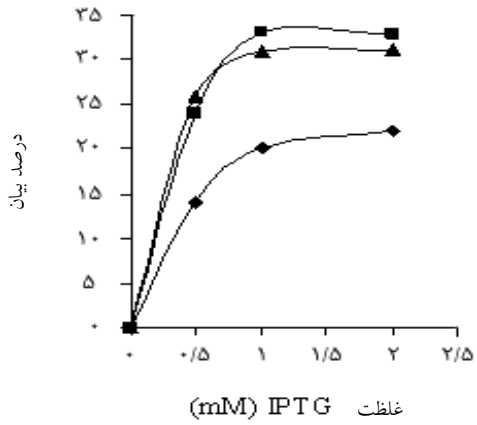
محصول مراحل تخلیص برای کلون‌های مختلف، الکتروفورزSDS-PAGE شد (به‌عنوان نمونه در شکل ۵، محصول تخلیص کلون RRB12 آورده شده است).

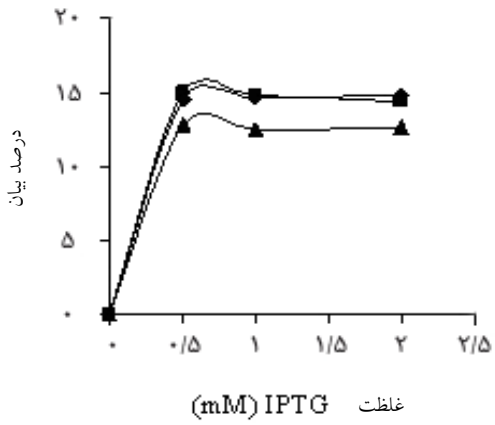


شکل ۲ در این شکل میزان بیان نانوبادی بر حسب درصد نسبت به توتال پروتئین باکتری در غلظت‌های مختلف IPTG برحسب mM، و دماهای مختلف (°C ۳۷–▲–، °C ۳۰–■– و °C ۲۵–◆–) در زمان‌های ۲٤ ساعت (الف)، ۳٦ ساعت (ب) و ٤٨ ساعت (ج) برای کلون RRB12 نشان داده شده است که نتایج دال بر بیشترین بیان در ۳٦ ساعت کشت در دمای ۳۰ درجه سیلسیوس و غلظت ۱ میلی‌مولار IPTG می‌باشد.

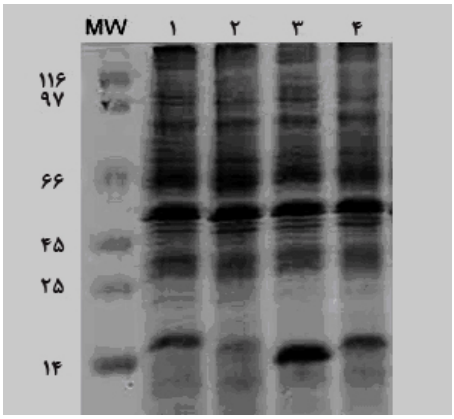
[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-09]



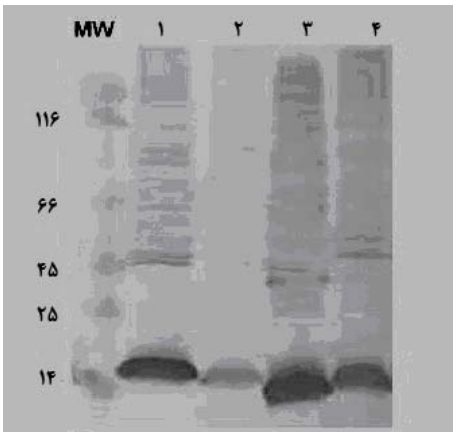




شکل ۳ در این شکل میزان بیان نانوبادی بر حسب درصد نسبت به توتال پروتئین باکتری در غلظت‌های مختلف IPTG برحسب mM، و دماهای مختلف (°C ۳۷ –▲–، °C ۳۰ –■– و °C ۲۵ –♦–) در زمان‌های ۲٤ ساعت (الف)، ۳٦ ساعت (ب) و ٤٨ ساعت (ج) برای کلون RRD41 نشان داده شده است که نتایج دال بر بیشترین بیان در ۳٦ ساعت کشت در دمای ۳۰ درجه سیلسیوس و غلظت ۱ میلی‌مولار IPTG می‌باشد.

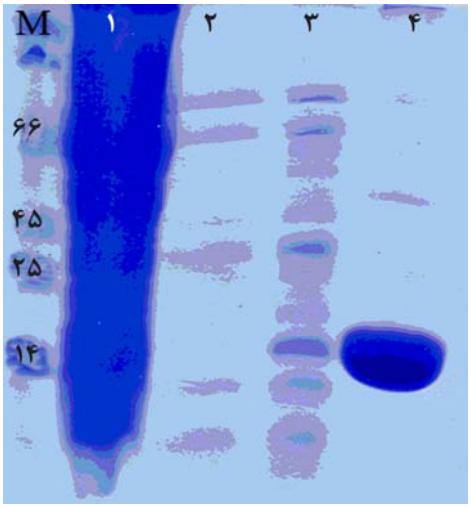


الف



ب

شکل ٤ نتیجه SDS-PAGE (الف) و بلاتینگ (ب) در چاهک‌های ۱، ۲، ۳ و ٤، به ترتیب از کلون‌های B12، B71، D5 و D41 نمونه‌گذاری شده است.



شکل ۵ محصول مراحل تخلیص کلون RRB12؛ M) نشانه؛ ۱) باکتری همگن؛ ۲) مایع رویی کشت؛ ۳) فراکشنی که به ستون تخلیص متصل نشده؛ ٤) فراکشنی که به ستون متصل و تخلیص شده

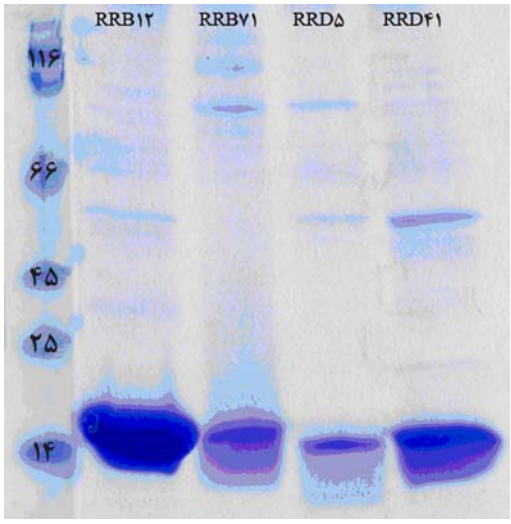
[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-09]

۳-٤- تأیید و تعیین میزان بازده بیان و بازده تخلیص

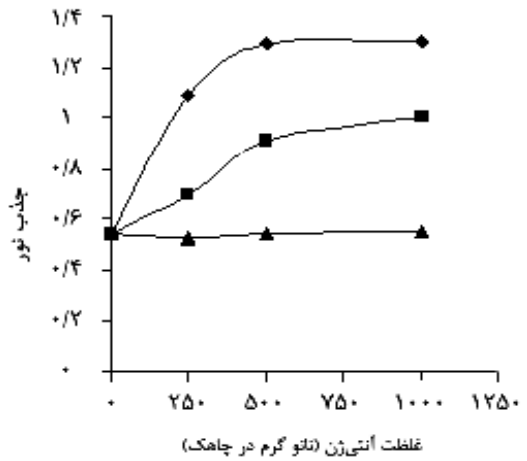
محصول تخلیص، قبل و بعد از تخلیص با ستون نیکل بر روی ژل SDS-PAGE الکتروفورز گردید که نتایج نشان دهنده تخلیص با درجه بالا برای نانوبادی‌های مورد نظر می‌باشد؛ البته میزان بازده هر یک متفاوت می‌باشد (شکل ٦). این تفاوت در میزان پروتئین نانوبادی به‌دست آمده و نیز در درجه خلوص آنها قابل مشاهده است. به طوری که بازده بیان برای کلون‌های مختلف، ۲/٤ گرم در لیتر در مورد RRB12، ۰/۳۸ گرم در لیتر در مورد RRB71، ۰/۱۷ گرم در لیتر در مورد RRD5، ۰/۵۹ گرم در لیتر در مورد RRD41 بود. پروتئین های تخلیص شده در محدوده وزنی حدود ١٤ تا ١٦ کیلودالتون می‌ایستد و این قطعات حاوی دنباله His و C-myc می‌باشند.

۳-۵- بررسی واکنش اتصال نانوبادی بعد از تخلیص

نتایج الایزا با توانایی اتصال دو مورد از نانوبادی‌های بیان شده با آنتی‌ژن‌های سنتز شده (پپتیدهای مقلد MUC1) در شکل ۷ آمد که نشان‌دهنده حفظ واکنش مولکول در ضمن مراحل تخلیص است.



شکل ٦ محصول تخلیص هر یک از ٤ کلون



شکل ۷ در این شکل واکنش نانوبادی‌های تخلیص شده (۱ میکروگرم در چاهک) با آنتی‌ژن یعنی پپتید متصل بهBSA نشان داده شده است.
(–♦–RRB12, –■–RRD41, –▲–NSB)

۳-٦- ساخت آنتی‌بادی ثانویه علیه نانوبادی در خرگوش

۳-٦-۱- تیتر کردن آنتی‌سرم خرگوشی

میزان ایمن شدن حیوانات سنجیده شد که نتایج آن بیانگر ایمن شدن خوب هر ٤ حیوان باقی مانده بود. ضمناً بعد از تعیین تیتر کلی خون‌ها، میزان تیتر بالاتر از ۱/٤۰۰۰ بود (جدول۱).

۳-٦-۲- تعیین خصوصیات آنتی‌بادی ثانویه علیه نانوبادی

نتایج تعیین حساسیت و ویژگی آنتی‌بادی ثانویه در جداول ۲ و ۳ آورده شده است. همان طور که در جداول نشان داده شده است، آنتی‌بادی ثانویه خرگوشی دارای حساسیت و ویژگی بالایی نسبت به آنتی‌ژن اصلی یعنی نانوبادی می‌باشد.

۳-٦-۳- محاسبه تمایل

نتایج تعیین تمایل دال بر تمایل بالای آنتی‌بادی خرگوشی تخلیص شده علیه نانوبادی می‌باشد. متوسط تمایل آنتی‌بادی خرگوشی تهیه شده برای نانوبادی‌ها در حدود 10^{10} M^{-1} می‌باشد.

۳-۷- بررسی تیتر آنتی‌بادی ثانویه متصل به آنزیم (HRP)

نتیجه تعیین تیتر برای آنتی‌بادی ثانویه متصل به HRP در جدول ٤ آمده است. بر طبق نتایج، بهترین تیتر ۱/۵۰۰ می‌باشد.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-09]

جدول۱ تعیین تیتر سرم‌ها

آنتی‌ژن در کف چاهک‌ها / رقت‌های سرم	نانوبادی ۱ میکروگرم در چاهک	نانوبادی ۵ میکروگرم در چاهک	نانوبادی ۱۰ میکروگرم در چاهک	BSA ۱ میکروگرم در چاهک	BSA ۵ میکروگرم در چاهک	BSA ۱۰ میکروگرم در چاهک
(حیوان ایمن)۱/۱۰۰	۳/٤۲	۳/٥	۳/٥۲	۱/٤	۱/٥	۱/٦
(حیوان ایمن)۱/۲۰۰	۳/۳۹	۳/٤	۳/٤۹	۱/۰	۱/۲۱	۱/۲٥
(حیوان ایمن)۱/٤۰۰	۳/۲۱	۳/۲۸	۳/۳۲	۱/۳	۱/۲۲	۱/۳
(حیوان ایمن)۱/۸۰۰	۳/۱٤	۳/۲۳	۳/۳۱	۰/۹	۱/۱	۰/۸۹
(حیوان ایمن)۱/٦۰۰	۳/۲٥	۳/۲۸	۳/۳۰	۰/۹	۱/۰	۰/۸٦
(حیوان ایمن)۱/۳۲۰۰	۳/۱۰	۳/۱۲	۳/۱۹	۰/٦	۰/٦	۰/٦
(حیوان ایمن)۱/٦٤۰۰	۳/۰۸	۳/۰۹	۳/۱۰	۰/٥۷	۰/٥۹	۰/٦
(حیوان ایمن)۱/۱۰۰	۱/۱۱	۱/٤۲	۱/۳	۲/۳	۲/۱	۲/٦
کنترل منفی PBS (Phosphate Bufferd Saline)	۰/۰۸	۰/۱۱۳	۰/۱۲	۰/۱٥	۰/۲	۰/۰۹

جدول ۲ تعیین حساسیت آنتی بادی بعد از تخلیص

آنتی‌ژن در کف چاهک‌ها	۸ میکروگرم در چاهک	٤ میکروگرم در چاهک	۲ میکروگرم در چاهک	۱ میکروگرم در چاهک	۰/٥ میکروگرم در چاهک	۰/۱ میکروگرم در چاهک	۰/۰٥ میکروگرم در چاهک	۰/۰۱ میکروگرم در چاهک	۰/۰۰٥ میکروگرم در چاهک
نانوبادی	۳/٥	۳/۷	۳/۸	۲/۹	۲/۸	۲/۷	۲/۲	۱/٥	۰/۹
*NSB(BSA)	۱/۰	۰/۸	۰/٦	۰/٥	۰/٤	۰/٤	۰/۳	۰/۲	۰/۲

*NSB: Non Specific Binding = اتصال های غیر اختصاصی

جدول ۳ تعیین ویژگی آنتی بادی بعد از تخلیص

آنتی‌ژن در کف چاهک‌ها	VHH	BSA	KLH	اووآلبومین (Ovalbumin)	پودر شیر
آنتی‌بادی خالص شده ۰/۱ میکروگرم در چاهک	۲/۸۰	۰/٥۰	۰/٤٥	۰/٥۲	۰/٤۰
بافر EIA	۰/٦۰	۰/٦۰	۰/٥٥	۰/٥۸	۰/٤۰

جدول ٤ تعیین تیتر آنتی بادی ثانویه متصل به HRP

آنتی‌ژن در کف چاهک‌ها / Anti-VHH-HRP	نانوبادی ۱ میکروگرم در چاهک	نانوبادی ۵ میکروگرم در چاهک	نانوبادی ۱۰ میکروگرم در چاهک	BSA ۱ میکروگرم در چاهک	BSA ۵ میکروگرم در چاهک	BSA ۱۰ میکروگرم در چاهک
۱/۱۲٥	۳/٥	۳/۷	۳/۸	۱/۷	۱/۸	۱/۹
۱/۲٥۰	۲/٦	۲/۸	۳/۰	۱/۰	۱/۱	۱/۳
۱/٥۰۰	۲/٤۹	۲/٦	۲/۷	۰/٦۱	۰/٥۸	۰/٦۱
۱/۱۰۰۰	۱/٤	۱/۷	۱/۸	۰/٥	۰/٥۸	۰/٦٤
۱/۲۰۰۰	۱/۰	۱/۲	۱/۳	۰/٤	۰/٤۸	۰/٤۸
(کنترل منفی) بافر EIA	۰/۱۸	۰/۱۳	۰/۱۲	۰/۱٥	۰/۲	۰/۰۹

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-09]

٤- بحث

بعد از بیشتر از ربع قرن تلاش در زمینه ساخت آنتی‌بادی‌ها، امروزه این مواد فراگیرترین دسته از ترکیبات دارویی برای درمان انواع بیماری‌های انسانی می‌باشند. نتایج آزمون‌های بالینی نشان دهنده محدودیت‌های اساسی آنتی‌بادی‌های موشی در تجویزدرمانی می‌باشد. عمده‌ترین این محدودیت‌ها شامل: ایمنوژن بودن آنتی‌بادی‌های موشی، توزیع در بافت‌های طبیعی و نفوذ کم به تومورهای سخت می‌باشد. با وجود پیشرفت‌های اخیر در زمینه مهندسی ژنتیک تلاش‌های عمده‌ای نیز برای مهندسی واحدهای اتصالی کوچکتر، که ویژگی و تمایل آنتی‌بادی‌های کلاسیک را حفظ کرده و همچنین ایمنی‌زایی کمتری داشته باشند، صورت گرفته است. نانوبادی‌ها به واسطه خصوصیاتی همچون اندازه کوچک، پایداری، حلالیت، راحتی کلون کردن کتابخانه‌های بالغ شده در این‌ویوو، بازده بیان بالا و یک پاراتوپ با پیچیدگی کمتر، برای کاربردهای ویژه درمانی مناسب می‌باشند. همچنین مزیت این مولکول‌ها به عنوان واحدهای سنجش در بیوسنسورها (Biosensors)، استفاده در جاذب‌های ایمنی و تولید مهارکننده‌های آنزیمی رقابتی مورد بررسی قرار گرفته است. سایر کاربردهای ممکن شامل: عوامل تصویربرداری این‌ویوو، راهی برای ساخته شدن داروهای پپتیدی، اساس ساختمانی برای سازه‌های گوناگون و اینترابادی‌ها (Intrabody) می‌باشد [۱-۸،۲۱].

کاربرد زیاد این مولکول‌ها نیاز به تولید مقادیر زیاد و ارزان از آنها را به دنبال دارد. در مورد نانوبادی‌های شتری، گرچه غالباً بیان خوبی در اشرشیاکلی دیده شده است، ولی میزان بیان در مورد هر نانوبادی کاملاً بستگی به توالی اسیدهای آمینه آن مولکول دارد که در نانوبادی‌های مختلف کاملاً متفاوت است و قابل پیش‌بینی نمی‌باشد. به همین دلیل تلاش‌هایی برای افزایش بیان انواع آنتی‌بادی‌های نوترکیب در میزبان‌های یوکاریوتی (Eukaryotic) صورت گرفته است [۲۲].

در مورد برخی از قطعات آنتی‌بادی، پایین بودن میزان محصول در میزبان‌های یوکاریوتی یک‌بار دیگر توجه زیادی را به سمت منابع پروکاریوتی جلب نمود. در چندین گزارش با استفاده از گونه‌های مناسب اشرشیاکلی، که قادر به بیان هم‌زمان با چاپرون‌ها (Chaperons) بودند و یا با بیان قطعه به صورت متصل به سایر پروتئین‌ها، موجب افزایش بیان فراهم شده است. همچنین افزودن علامت در بالادست ژن، برای ترشح به ناحیه پریپلاسمی (دارای شرایط اکسیدکننده مناسب برای پیچش آنتی‌بادی‌ها) افزایش تولید و بیان را ایجاد می‌کند [۱۱-۱٤].

در این راستا، برای افزایش بیان در اشرشیاکلی با ساب کلونینگ کردن نانوبادی در ناقل pSJF9، به مطالعه شرایط مختلف برای افزایش بیان پرداخته شد. ناقل pSJF9 به نحوی طراحی شده است که با قرار گرفتن یک علامت راهنما (OmpA) در بالادست محل درج ژن نانوبادی و در شرایط القاء با غلظت mM۱ از IPTG، موجب بیان بالا از پروتئین نانوبادی در باکتری اشرشیاکلی و ترشح آن به پریپلاسم گردید. میزان بازده پروتئین نانوبادی تخلیص شده از این سیستم بیانی با حدود ۱۰ تا ۲۵ میلی‌گرم از ۱ لیتر کشت برآورد شد که در مقایسه با گزارش‌های موجود در مقالات در زمینه بیان نانوبادی در باکتری (۱-٤۰ mg/l) میزان قابل ملاحظه‌ای می‌باشد [۳-۸].

مولکول بیان شده در آزمون‌های مختلف الایزا و وسترن بلات قابلیت اتصال مناسبی را به آنتی‌ژن در اشکال مختلف سنتز شده و یا تخلیص شده، نشان داد.

در بررسی راهکارهای افزایش بیان، با استفاده از تغییرات محیط‌کشت، دما و مواد القا کننده و... برای تأیید ویژگی و تمایل اتصال بعد از افزایش بیان و تخلیص، آزمون‌های مختلف انجام شد. در انتها مقادیر بیان حاصل از سیستم پروکاریوتی در شرایط مختلف مقایسه گردید. این نتایج در مقایسه با نتایج تلاش سایر محققین در راستای بیش بیان نانوبادی (VHH)، که در اشرشیاکلی انجام شد و نیز در مقایسه با تلاش پدیدآوردندگان این تحقیق برای بیش بیان این مولکول در مخمر، نشان دهنده تولید و تخلیص مقادیر مناسبی از نانوبادی می‌باشد [۲٤،۲۲،۳]. البته گزارش جالبی هم از بیان این مولکول در ساکارومایسس سرویسیه(Saccharomyces cerevisiae) مبنی‌بر تولید ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر وجود دارد [۲۳].

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-09]

در ایـن تحقیـق پـس از تولیـد مقـادیر کـافی از نانوبـادی و تخلیص آن در مرحله بعد، مخلـوطی از نانوبـادی‌هـای تخلـیص شده برای ایمن کردن خرگوش‌ها استفاده شـد. باتوجـه بـه اینکـه تولید و کاربرد آنتی‌بادی‌های نوترکیب شتری به سـرعت در حـال پیشرفت است و یکی از اجزاء لازم برای تولید و به‌کارگیری ایـن آنتی‌بادی‌ها در تشخیص و درمـان، یـک مولکـول شناسـاگر و در عین حال گزارشگر است (که همان آنتـی‌بـادی ثانویـه متـصل بـه آنزیم و یا یک شناساگر دیگر می‌باشد)، تلاش شـد کـه بـا تولیـد انبـوه نانوبـادی‌هـا و تزریـق آن بـه عنـوان ایمنـوژن بـه حیـوان آزمایشگاهی (خرگوش) اقدام به تولید آنتی‌بادی ثانویه علیـه ایـن مولکول ارزشمند گردد. ضمناً پـس از اطمینـان از مناسـب بـودن تیتر، حساسیت، تمایل و ویژگی آنتی‌بادی ثانویه سـاخته شـده، بـا استفاده از روش پریدات (Periodate)، اتصال این مـاکرومولکول (آنتی‌بادی علیه نانوبـادی) بـه مولکـول HRP [آنـزیم پراکـسیداز (Peroxidase) از منبع Horseradish] انجام شد.

روش‌هـای مختلفـی بـرای اتـصال مـاکرومولکول‌هـا (Macromolecules) وجـود دارد. بـه‌عنـوان مثـال در روش پریـدات، از مولکـول قنـدی موجـود در مـاکرومولکول‌هـای گلیکـوپروتئینی (Glycoprotein) بـرای اتـصال دو مولکـول استفاده می‌شود که با توجه به تجارب قبلی و اطمینان از اینکه این روش، مولکول آنزیم و آنتی‌بـادی را غیرفعـال نمـی‌کنـد، اتصال دو مولکول انجام شد.

نهایتاً مولکول آنتی‌بادی ثانویـه متـصل بـه HRP، از نظـر اتصال و شناسایی نانوبادی (در مقایسه با سـایر مولکـول‌هـای پروتئینی) ارزیابی شد که نتـایج نـشان مـی‌دهـد کـه مولکـول کونژوگه در محلول نهایی آماده شـده، بـا رقـت ۱/۵۰۰ قابـل استفاده در آزمایش‌های الایزا، (و احتمالاً در سایر آزمایش‌های ایمونولوژیکی) می‌باشد؛ همچنین در طرح‌های تولید نانوبـادی و کاربردهای مختلف نانوبادی‌ها استفاده می‌شود.

۵- منابع

[1] Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, Bendahman N, Hamers R. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. Nature 1993; 363(6428): 446-8.

[2] Revets H, De Baetselier P, Muyldermans S. Nanobodies as novel agents for cancer therapy. Expert Opin Biol Ther 2005; 5(1): 111-24.

[3] Arbabi Ghahroudi M, Desmyter A, Wyns L, Hamers R, Muyldermans S. Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. FEBS Lett 1997; 414(3): 521-6.

[4] Muyldermans S. Single domain camel antibodies: current status. J Biotechnol 2001; 74(4): 277-302.

[5] Muyldermans S, Cambillau C, Wyns L. Recognition of antigens by single-domain antibody fragments: the superfluous luxury of paired domains. Trends Biochem Sci 2001; 26(4): 230-5.

[6] Nuttall SD, Irving RA, Hudson PJ. Immunoglobulin VH domains and beyond: design and selection of single-domain binding and targeting reagents. Curr Pharm Biotechnol 2000; 1(3): 253-63.

[7] Tanha J, Xu P, Chen Z, Ni F, Kaplan H, Narang SA, MacKenzie CR. Optimal design features of camelized human single-domain antibody libraries. J Biol Chem 2001; 276(27): 24774-80.

[8] Lee MH, Park TI, Park YB, Kwak JW. Bacterial expression and in vitro refolding of a single-chain fv antibody specific for human plasma apolipoprotein B-100. Protein Expr Purif 2002; 25(1): 166-73.

[9] Cho WK, Sohn U, Kwak JW. Production and in vitro refolding of a single-chain antibody specific for human plasma apolipoprotein A-I. J Biotechnol 2000; 77(2-3): 169-78.

[10] Robin S, Petrov K, Dintinger T, Kujumdzieva A, Tellier C, Dion M. Comparison of three microbial hosts for the expression of an active catalytic scFv. Mol Immunol 2003; 39(12): 729-38.

[11] Pluckthun A. Antibodies from Escherichia coli. Nature 1990; 347(6292): 497-8.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-09]

[12] Holliger P, Bohlen H. Engineering antibodies for the clinic. Cancer Metastasis Rev 1999; 18(4): 411-9.

[13] Weller MG, Diemer M, Wersching C, Niessner R, Sochor H. Development of antibodies for the detection of N-acetyl-glufosinate. J Agric Food Chem 2003; 51(23): 6668-75.

[14] Gadkari DA, Fields HA, Maynard JE. Enzyme-antibody conjugation by a heterobifunctional reagent and its application in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of hepatitis B surface antigen. J Virol Methods 1985; 10(3): 215-24.

[15] Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, Cold Spring Harbor, 2001.

[16] Kontermann R, Dubel S. Antibody engineering. Germany, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2001.

[17] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. Short protocols in molecular biology. 4th ed. New York, John Wiley and Sons; 1999.

[18] Levy HB, Sober HA. A simple chromatographic method for preparation of gamma globulin. Proc Soc Exp Biol Med 1960; 103: 250-2.

[19] Beatty JD, Beatty BG, Vlahos WG. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay. J Immunol Methods 1987; 100(1-2): 173-9.

[20] Tijssen P. Practice and theory of enzyme immunoassays. In: Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Burdon RH, Knippenberg PH (eds.), Amsterdam, Elsevier, 1992.

[21] Rahbarizadeh F, Rasaee MJ, Forouzandeh Moghadam M, Allameh AA, Sadroddiny E. Production of novel recombinant single-domain antibodies against tandem repeat region of MUC1 mucin. Hybrid Hybridomics 2004; 23(3): 151-9.

[22] Rahbarizadeh F, Rasaee MJ, Forouzandeh M, Allameh AA. Over expression of anti-MUC1 single-domain antibody fragments in the yeast Pichia pastoris. Mol Immunol 2006; 43(5): 426-35.

[23] Frenken LG, van der Linden RH, Hermans PW, Bos JW, Ruuls RC, de Geus B, Verrips CT. Isolation of antigen specific llama VHH antibody fragments and their high level secretion by Saccharomyces cerevisiae. J Biotechnol 2000; 78(1): 11-21.

[24] Spinelli S, Frenken LG, Hermans P, Verrips T, Brown K, Tegoni M, Cambillau C. Camelid heavy-chain variable domains provide efficient combining sites to haptens. Biochemistry 2000; 39(6): 1217-22.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-09]