

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

فاطمه رهبری‌زاده^{۱*}، وحید خدامی ویشه^۲، داود احمدوند^۳

- ۱- استادیار، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- دانش آموخته 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 می‌باشدند. ساختار کریستالی یک VHH خالص نشان داده است که این مولکول در حدود ۲/۵ نانومتر قطر و کمتر از ۴ 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 ایمنی درمانی 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 ساپ‌کلون 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: آلتیز با SDS-PAGE و سترنبلات 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 کدن دما و زمان و القاگذاری، میزان قابل توجهی (در مقایسه با مطالعات مشابه) از مولکول نوترکیب بیان وسیع 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

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

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

محیط های ساده و ارزان، اطلاعات ژنتیکی کاملاً شناخته شده، در دسترس بودن تعداد زیادی از ناقل های کلونینیگ (Cloning) و بیانی و گونه های جهش یافته میزبان، کترل آسان و امکان تولید انبوه پروتئین نوترکیب از مواردی است که می توان به آن اشاره کرد [۱۲-۸].

به منظور بیان پروتئین نوترکیب در اشرشیاکلی، ناقل های بیانی متعددی طراحی شده اند. در این ناقل ها، عناصر کترل کننده ژنتیکی، که در مراحل مختلف بیان ژن شامل: رونویسی، ترجمه، پایداری پروتئین، ترشح از سلول و میزان اکسیژن لازم نقش دارند، جایگذاری شده اند. عمدۀ ترین عوامل دستیابی به بیان بالای پروتئین نوترکیب در اشرشیاکلی شامل موارد زیر است: گونه میزبان، تعداد کپی پلاسمید، آنتی بیوتیک انتخابی، پرموموتور (Promoter)، خاتمه دهنده رونویسی، پایداری mRNA، علامت ترجمه، کدون رایج (Codon usage)، دما، شرایط کشت و محیط کشت (شرایط رشد، میزان اکسیژن، سرعت رشد، منبع کربن) و نوع فرمانتور نقش مهمی در میزان بیان دارد [۱۲-۸].

از مهمترین عوامل لازم در حوزه تولید آنتی بادی های نوترکیب و همچنین آزمایش های تعیین خصوصیات این مولکول ها، در دست داشتن مولکول نشانگر یا مولکول شناساگر مناسب، جهت ردیابی این مولکول ها است. در این راستا در ابتدا باید میزان قابل توجهی از مولکول نوترکیب را بیان و سپس تخلیص نمود. در مرحله دوم با تولید آنتی بادی علیه آن و کونژو گاسیون (Conjugation) به مولکول آنزیمی، نهایتاً به مولکول شناساگری که در تحقیقات بنیادی مثل روش نمایش فائز و انواع روش های تعیین خصوصیات آنتی بادی ها، آزمون های تشخیصی (مثل ایمنو هیستوشیمی) Immunohistochemistry (IHC) و ایمنو سایتو شیمی (Immunocytochemistry) IHC کاربرد دارد، دسترسی پیدا می شود. با توجه به اینکه مطالعات دامنه داری برای تولید و تعیین خصوصیات نانو بادی هدف گیرنده انواع نشانه های سرطانی در حال انجام است و نیز به دلیل اهمیت روز افزون نانو بادی ها در تحقیقات ایمنی درمانی (Immunotherapy)، و قابلیت بالقوه این مولکول برای استفاده در درمان با ریز ذرات ها،

VH شان (Variable domain conventional antibodies) (VHH) که برای تفاوت نسبت به VH معمولی (Variable domain of heavy chain antibodies) می شود) به آنتی ژن وصل می شوند. ساختار کریستالی یک VHH خالص نشان داده است که این مولکول در حدود ۲/۵ نانومتر قطر و کمتر از ۴ نانومتر طول دارد؛ به همین علت به این مولکول نانو بادی گفته می شود به این ترتیب تک دومن VHH (نانو بادی) کوچکترین قطعه آنتی بادی متصل شونده به آنتی ژن است که قطعه کامل آن وزنی در حدود ۱۵-۱۲ کیلو دالتون و ابعادی در حدود نانومتر دارد و از یک آنتی بادی دارای قدرت اتصال مشتق شده است [۳، ۲].

کلون کردن نانو بادی در یک ناقل (vector)، نمایش فائز (phage display)، انتخاب قطعه اتصالی به آنتی ژن به وسیله غنی سازی و بیان نانو بادی انتخاب شده در باکتری ها به عنوان یک جایگزین جذاب و ارزشمند برای به دست آوردن مولکول کوچک شناساگر است. نانو بادی های به دست آمده از شترهای Fab (Fragment antigen binding) و Fv (Fragment antigen binding) و scFv (single chain Fragment variable) که از سایر پستانداران به دست آمده اند، برتری های درخشنان دارد؛ زیرا علاوه بر اینکه با کلون کردن و بیان فقط یک تک دومن می توان قطعه کامل متصل شونده به آنتی ژن را در این ویوو (in vivo) بالغ شده، تولید کرد، VH شتری نوترکیب، خصوصیات جالب و منحصر به فردی دارد. این خصوصیات شامل: بیان با بازده بالا و آسانی تخلیص، تولید قطعه آنتی بادی تک دومنی با پیچش کامل، بسیار محلول و بسیار پایدار، تولید قطعه اتصالی ویژه آنتی ژن و با تمایل بالا، هومولوژی (Homology) بسیار نزدیک به قطعه VH انسانی و توانایی شناخت اپی توپهای فضایی ویژه به وسیله CDR3 طویل آن می باشد [۷-۶].

در میان سیستم های پروکاریوتی (Prokaryotic)، باکتری اشرشیاکلی از جاذبه خاصی برای تولید پروتئین های نوترکیب برخوردار است. توانایی رشد سریع با تراکم بالا و در

(Ethidium bromide) محیط کشت باکتری و اتیدیوم برماید از شرکت Roche و Fermentas تهیه گردید.

۲-۲- تولید مقادیر زیاد نانوبادی محلول به عنوان

ایمنوژن (Immunogen)

۱-۲-۱- انتقال ژن نانوبادی به ناقل‌های بیانی و

بررسی شرایط بهینه تولید انبوه

به منظور تولید نانوبادی در مقیاس انبوه، چهار کلون نانوبادی (RRB71، RRD5 و RRD12) را، که قبلاً تعیین توالی شده بودند، انتخاب و انتقال ژن (sub-cloning) نانوبادی‌های مذکور به ناقل بیانی pSJF9 صورت گرفت. به این منظور، چهت 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'

T4 DNA لیگاز انجام شد و نهایتاً با روش انتقال الکترویکی به میزبان باکتری (TG1) منتقل گردید [۱۵].

در محیط TB (Tris-borate) حاوی آمپسی‌سیلین در TG1 (Ampicillin)، باکتری سازه یاد شده، بعد از ۶۰۰ رشد و رسیدن به جذب نوری (Optical Density) نانومتر) معادل ۰/۷، در شرایط مختلف دما، زمان و غلاظت (IPTG) (Isopropyl-1-thio-β-D-galactoside) جمع‌آوری محصول شد که پس از مقایسه نتایج، بهترین شرایط برای بیان در مقیاس انبوه به دست آمد [۱۶].

۲-۲-۲- جمع‌آوری نانوبادی

محصول پروتئینی (نانوبادی) در باکتری حاوی سازه در پرپلاسم (Periplasm) تجمع می‌یابد که از رسوب ml1۰۰ کشت باکتری با استفاده از شوک اسمزی (انتقال رسوب به

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

۲- مواد و روش‌ها

۱-۲- مواد

(Bovine Serum Albumin: BSA) آرلاسل (Arlacel)، سولفات آمونیم، نمک‌های فسفات سدیم، کلرید سدیم، سدیم آزید، کلرید منیزیم، G-25 (Horseradish Peroxidase) HRP TMB (Sephadex G-25)، ژل فعال شده سیانوژن برماید، (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) (Phenylmethylsulfonyl fluoride) PMSF Sigma تهیه شد. آنزیم‌های Taq پلیمراز، T4 DNA لیگاز، آنزیم‌های برش‌گر محدود، dNTPs، آگارز، انواع پودرهای

سپس واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای یاد شده و آنزیم Pfu پلیمراز و با دمای واسرشتگی (Denaturation) ۹۴ درجه (۰ ۲۰ ثانیه)، چفت شدن (Annealing) معادل ۵۵ 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 ۴۵۰-۳۰۰ bp را از ژل خارج کرده و با استفاده از کیت استخراج DNA از شرکت MN 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 BbsI و BamHI 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

بار اول، یک ماه بعد و موارد بعدی هر دو هفته یکبار صورت می گرفت [۱۸].

۲-۳-۲- تیتر کردن آنتی سرم 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 پلی استایرن (Polystyrene) $100\text{ }\mu\text{l}$ از مخلوط محلول نانو بادی های تخلیص هر چاهک $100\text{ }\mu\text{l}$ اضافه شد. در ۲/۵ ردیف ۸ تایی دیگر نیز شده $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ اضافه شد. در هر چاهک $100\text{ }\mu\text{l}$ اضافه شد؛
- ۲- ظرف در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد یک شب انکوبه شد؛
- ۳- سه بار شستشو با بافر فسفات $10\text{ }\mu\text{l}$ میلی مولار، $\text{pH}=7/2$ و بار آخر ظرف روی کاغذ صافی خشک شد؛
- ۴- مسدود کردن سطح چاهک ها با $200\text{ }\mu\text{l}$ میکرو گرم در چاهک محلول مسدود کننده (Blocking solution) $100\text{ }\mu\text{l}$ (Blocking solution) به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد و تکرار مرحله ۳؛
- ۵- اضافه کردن رقت های متواالی از آنتی سرم خرگوشی $(1/1, 1/1, 1/1, 1/1, 1/1, 1/1, 1/1)$ به صورت دو تایی و در دو تا از چاهک های باقی مانده از بافر (Enzyme Immuno Assay) EIA ۱/۳۰ رقیق شده، سرم خرگوشی غیر ایمن اضافه شد؛
- ۶- انکوباسیون (Incubation) یک ساعته در ۳۷ درجه سانتیگراد، سپس تکرار مرحله ۳؛

- ۷- به تمام چاهک ها هر کدام $100\text{ }\mu\text{l}$ از محلول $400\text{ }\mu\text{l}$ رقیق شده آنتی بادی سوم (آنتی بادی ثانویه علیه G 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 ظرف ها در انتهای پنج بار شستشو؛
- ۹- به هر چاهک، $50\text{ }\mu\text{l}$ از محلول TMB (تترا متیل بنزیدین، سوبسترای HRP) اضافه شد که بعد از ۵ تا ۱۰ دقیقه انکوباسیون در تاریکی، رنگ آبی در چاهک های حاوی آنزیم دیده شد؛

محلول غلیظ قند سوکروز و بلا فاصله انتقال رسوب به غلظت پایین ($5-10\text{ mM}$ کلرید منیزیم) محتويات پرپلاسم خارج می شود. برای هر یک از نانو بادی های به دست آمده در بهترین شرایط در حضور ۲-Mercapto-ethanol (2-ME) (حالا) الکتروفورز SDS-PAGE در ژل 12 \% انجام شد و به دنبال آن رنگ آمیزی کوماسی بریلیانت بلو (Coomassie brilliant blue) و نیز آزمایش وسترن بلات با استفاده از آنتی C-myc متصل به HRP انجام گردید [۱۷].

۲-۳-۳- تخلیص با ستون IMAC

(Immobilized Metal Affinity Chromatography) چون این نانو بادی ها به صورت ادغام شده به مولکول نشانه (His-tag) (بیان می شوند، این تخلیص با استفاده از (Nickel-nitrilo-triacetic acid Ni⁺-NTA) یا (Imidazole) در شرایط بومی و با غلظت $150\text{ }\mu\text{l}$ میلی مولار ایمیدازول SDS-PAGE (Imidazole) انجام و محصول بر روی ژل الکتروفورز گردید [۱۵، ۱۷].

۲-۳-۲-۲- بررسی واکنش اتصال نانو بادی بعد از تخلیص به منظور تأیید کارایی مولکول های نانو بادی های ساخته شده در مقیاس بالا، بعد از مراحل تخلیص، توانایی اتصال دو مورد از نانو بادی های بیان شده به آنتی ژن های سنتز شده (پپتید های مقلد MUC1 mimetic peptide) MUC1 با روش الایزا (Enzyme Linked Immunosorbent Assay: ELISA) ثابت گردید.

۲-۳-۳- ساخت آنتی بادی ثانویه علیه نانو بادی در خرگوش

۲-۳-۳-۱- ایمن کردن خرگوش ها

از محلول حاوی مخلوط نانو بادی های تخلیص شده، به ازای هر خرگوش، حجم حاوی $500\text{ }\mu\text{l}$ میکرو گرم نانو بادی برداشته و با حجم مساوی از ادجوانات (Adjuvant) (Fround) به چهار خرگوش، سفید نیوزیلندي و سه ماهه، تزریق ($10-7\text{ }\mu\text{l}$ محل در پشت حیوان در زیر پوست) انجام گرفت. در تزریقات بعدی $250\text{ }\mu\text{l}$ میکرو گرم و همراه با ادجوانات ناقص به هر خرگوش تزریق شد. تزریق های یادآور،

۱۰۰ میلی مولار، pH=۹/۲، دیالیز شد. از طرفی ۳ mg HRP در ۴ ml از همان بافر حل گردید. به محلول HRP ۰/۴ میلی لیتر از محلول ۱/۷ mg/ml 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 یون های اضافی و نمک ها از واکنش حذف شوند. در ادامه محتویات پیپت پاستور با ۲/۲ ml بافر بی کربنات شستشو داده شد و به محلول خارج شده، ۱۱۰۰ μl از محلول سدیم بورو هیدرات (۵ میلی گرم در ۱ ml از سود ۱۰۰ میلی مولار به صورت تازه تهیه شده) اضافه گردید. بعد از سی دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق و در تاریکی، مجدداً ۲۰۰ μl محلول سدیم بورو هیدرات اضافه کرده و مجدداً یک ساعت انکوباسیون در تاریکی اعمال شد [۲۰].

۷-۳-۲- تخلیص آنتی بادی ثانویه کونژوگه به آنزیم HRP
در این تحقیق با استفاده از غلظت مولی دو به یک (IgG) و در مرحله بعد استفاده از رسوب دهی با حجم مساوی از محلول سولفات آمونیم اشباع با pH=۷، جداسازی آنتی بادی ثانویه کونژوگه (Conjugated) به آنزیم HRP انجام گردید [۲۰].

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

بعد از تمام کونژوگاسیون باید آنتی بادی ثانویه متصل به HRP برای بدست آوردن بهترین رقت کونژوگه در آزمون ها، با روش الیزا کتلر شود. بررسی تیتر کونژوگه آنتی بادی آنزیم، به ترتیب مراحل انجام شده در قسمت ۲-۳-۲ انجام می شود، با این تفاوت که در مرحله ۵ به جای افزودن آنتی بادی ثانویه خرگوشی، از آنتی بادی خرگوشی متصل به HRP به رقت های مختلف به چاهک ها افروده می شود و مرحله ۷ و ۸ حذف می شود و بعد از مرحله ۶، مرحله ۹ است که باید صورت پذیرد و سپس بقیه مراحل به ترتیب انجام می شود. به این ترتیب می توان بهترین رقت برای آنتی بادی ثانویه متصل به HRP را بدست آورد [۱۷].

۱۰- توقف رنگ با ۵۰ μl بافر متوقف کننده و تبدیل رنگ آبی به زرد و سپس قرائت شدت جذب نوری چاهک ها در طول موج ۴۵۰ nm با دستگاه قرائت گر الایزا انجام گردید. به این ترتیب بهترین آنتی سرم، که بالاترین تیتر را داشت برای کونژوگاسیون به HRP انتخاب شد [۱۸].

۲-۳-۳- تخلیص آنتی بادی پلی کلونال (Polyclonal)

از آنتی سرم های دارای بالاترین تیتر

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

۲-۴-۴- تعیین تیتر آنتی بادی تخلیص شده به روش الیزا و با استفاده از منحنی چکر بورد (Checker Board)

برای این منظور مانند آنتی سرم تخلیص نشده، عمل شد؛ با این تفاوت که غلاظت های مختلف آنتی بادی از پودر خشک آنتی بادی تهیه گردید [۱۳].

۵-۳-۲- تعیین خصوصیات آنتی بادی ثانویه علیه نانوبادی
الف) تعیین حساسیت با استفاده از رسم منحنی استاندارد و با آزمایش غلاظت های (۸، ۴، ۲، ۱، ۰/۵ و ۰/۱ میکرو گرم در چاهک) از نانوبادی انجام شد؛

ب) تعیین ویژگی آنتی بادی تخلیص شده به روش الیزا مطابق قسمت قبلی؛ با این تفاوت که در مرحله اول به جای استفاده از غلاظت های مختلف نانوبادی در چاهک ها، از آنتی ژن های مختلف، همچون KLH و BSA و (Keyhole Limpet Hemocyanin) غیر مربوطه پروتئینی استفاده گردید [۱۹]؛

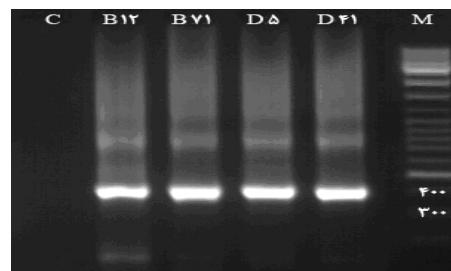
ج) محاسبه تمایل به روش بیتی (Beatty) و همکاران محاسبه شد [۲۰].

۶-۳-۲- اتصال آنتی بادی ثانویه علیه نانوبادی به آنزیم HRP
پس از اطمینان از وجود تیتر بالای آنتی بادی علیه نانوبادی در سرم خرگوش ها و تخلیص کروماتوگرافی تعویض یونی، آنتی بادی خالص شده خرگوشی در بافر بی کربنات mg/ml ۲

۳- نتایج

۳-۱- انتقال ژن نانو بادی به ناقل های ییانی و نتایج شرایط بهینه تولید انبوه

۳-۱-۱- نتیجه PCR روی کلون های اولیه حاوی ژن نانو بادی: محصول PCR روی ژل آگارز الکترو فورز، تکثیر مناسب ژن را نشان می دهد (شکل ۱).

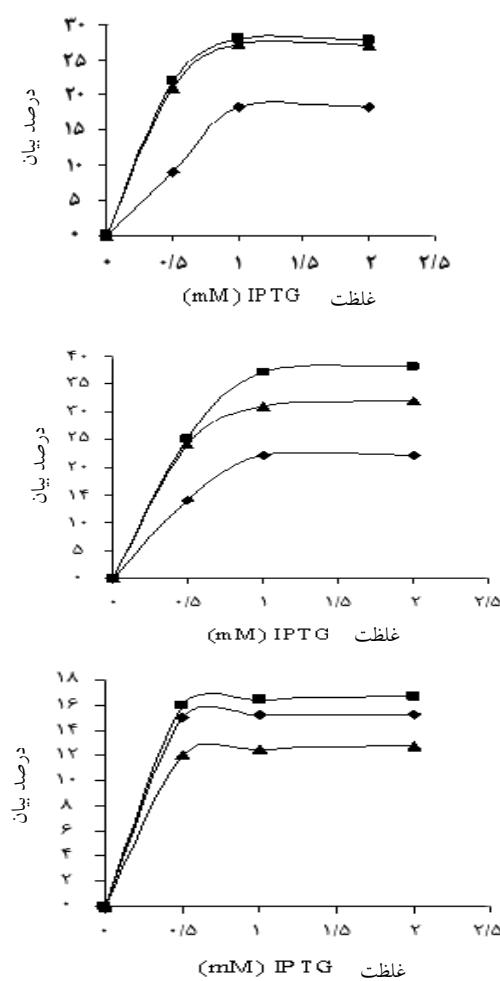


شکل ۱ الکترو فورز ژل آگارز ۱٪ برای محصولات PCR چاهک M: نشانگر، چاهک C: کنترل منفی PCR برای همان آغازگرها و در بقیه چاهکها از هر یک از کلون های B12، B71، D5 و D41 نمونه گذاری شده است.

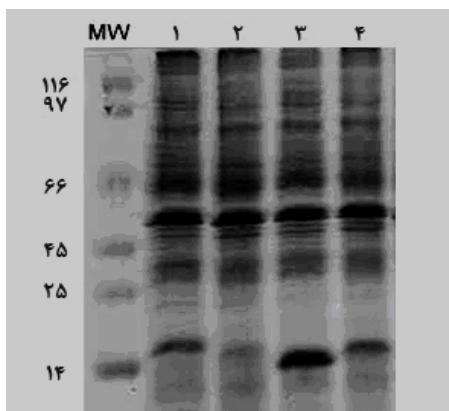
نتایج ساب کلو نینگ و تایید آن بعد از انجام هضم و اتصال مولکولی، سازه حاصل به باکتری TG1 متقل شد و نتایج تغییر شکل (تعداد زیاد کلون حاوی ژن نانو بادی) مؤید ساب کلو نینگ موفق است.

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

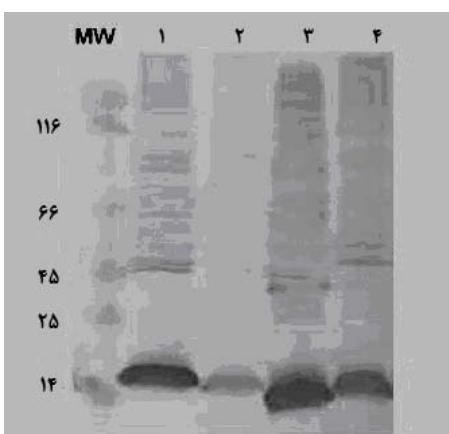
در این تحقیق، سه غلظت IPTG (شامل ۰، ۰.۵ و ۱ میلی مولار)، سه دمای (۲۵، ۳۰ و ۳۷ درجه سیلیسیوس) و سه طول دوره انکوباسیون (۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت) مورد آزمون قرار گرفت. نتایج شرایط مختلف برای دو کلون، یکی از منبع شتر یک کوهانه و دیگری از منبع شتر دو کوهانه، در شکل های ۲ و ۳ آورده شده است (در این شکل ها نتیجه زمان ۱۲ ساعت داده نشده است). از بین شرایط یاد شده، ۳۶ ساعت کشت در دمای ۳۰ درجه سیلیسیوس و غلظت ۱ میلی مولار IPTG نسبت به کل حالت بررسی شده برای این کلون ها، به عنوان شرایط بهینه انتخاب شد. این انتخاب بعد از بررسی غلظت باند پروتئین ترشحی در SDS-PAGE و مقایسه در لیزات موردنظر این تحقیق با کل پروتئین های موجود در لیزات (Gel Document) و با استفاده از دستگاه ژل داکیومنت (Pharmacia) صورت گرفت.



شکل ۲ در این شکل میزان بیان نانو بادی بر حسب درصد نسبت به توتال پروتئین باکتری در غلظت های مختلف IPTG بر حسب mM و دمای های مختلف (-۳۰°C، -۳۷°C، -۲۵°C و -۲۰°C) در زمان های ۲۴ ساعت (الف)، ۳۶ ساعت (ب) و ۴۸ ساعت (ج) برای کلون RRB12 نشان داده است که نتایج دال بر پیشترین بیان در ۳۶ ساعت کشت در دمای ۳۰ درجه سیلیسیوس و غلظت ۱ میلی مولار IPTG می باشد.

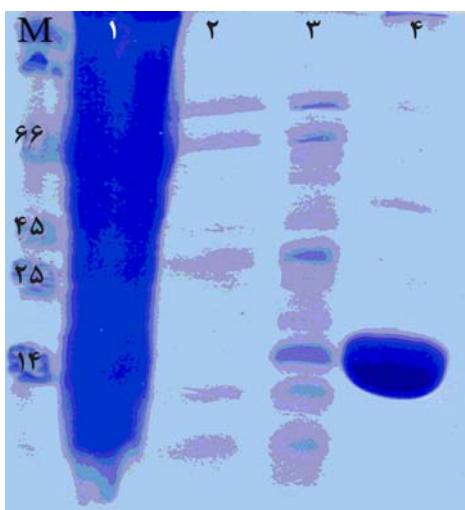


الف

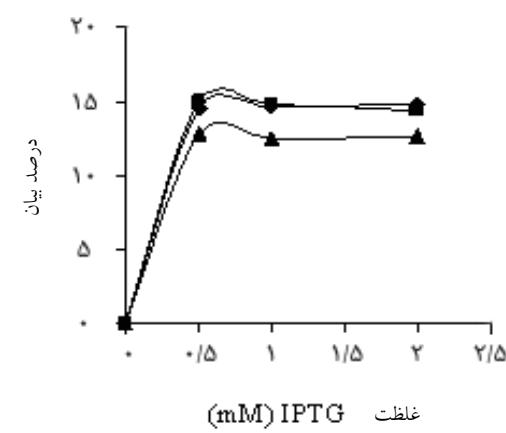
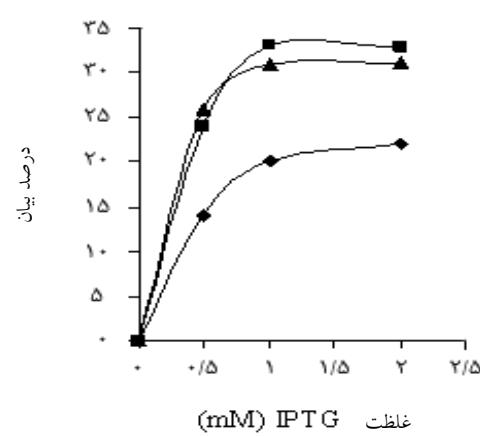
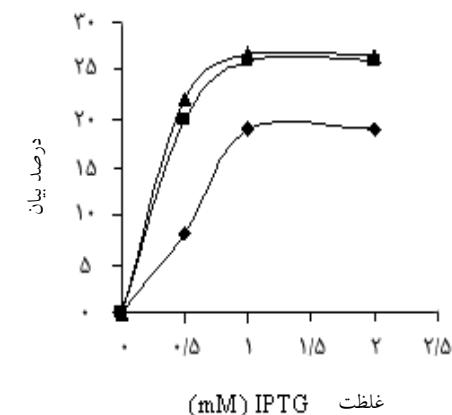


ب

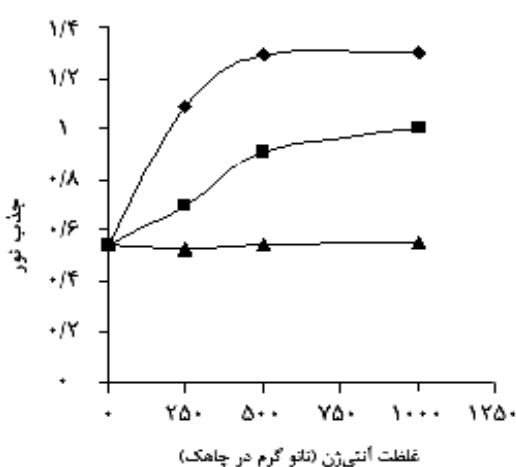
شکل ۴ نتیجه SDS-PAGE (الف) و بلاستینگ (ب) در چاهکهای ۱، ۲، ۳ و ۴، به ترتیب از کلونهای B12، B71، D5 و D41 نمونه‌گذاری شده است.



شکل ۵ محصول مراحل تخلیص کلون RRB12؛ (M) نشانه؛ ۱) باکتری همگن؛ ۲) مایع رویی کشت؛ ۳) فرآکشنی که به ستون تخلیص متصل نشده؛ ۴) فرآکشنی که به ستون متصل و تخلیص شده



شکل ۳ در این شکل میزان بیان نانوبادی بر حسب درصد نسبت به توتال پروتئین باکتری در غلاظت‌های مختلف IPTG بر حسب mM، و دماهای مختلف (37 °C ▲ - 30 °C ■ - 25 °C ◆) در زمان‌های ۲۴ ساعت (الف)، ۳۶ ساعت (ب) و ۴۸ ساعت (ج) برای کلون RRD41 نشان داده شده است که نتایج دال بر بیشترین بیان در ۳۶ ساعت کشت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و غلظت ۱ میلی مولار IPTG می‌باشد.



شکل ۷ در این شکل واکنش نانو بادی های تخلیص شده (۱ میکرو گرم در چاهک) با آنتی زن یعنی پیتید متصل به BSA نشان داده شده است.
—◆—RRB12, —■—RRD41, —▲—NSB

۶-۳ ساخت آنتی بادی ثانویه علیه نانو بادی در خرگوش

۶-۳-۱ تیتر کردن آنتی سرم خرگوشی

میزان ایمن شدن حیوانات سنجیده شد که نتایج آن بیانگر ایمن شدن خوب هر ۴ حیوان باقی مانده بود. ضمناً بعد از تعیین تیتر کلی خون ها، میزان تیتر بالاتر از $1/4000$ بود (جدول ۱).

۶-۲-۲ تعیین خصوصیات آنتی بادی ثانویه علیه نانو بادی
نتایج تعیین حساسیت و ویژگی آنتی بادی ثانویه در جداول ۲ و ۳ آورده شده است. همان طور که در جداول نشان داده شده است، آنتی بادی ثانویه خرگوشی دارای حساسیت و ویژگی بالایی نسبت به آنتی زن اصلی یعنی نانو بادی می باشد.

۶-۳-۳ محاسبه تمایل

نتایج تعیین تمایل دال بر تمایل بالای آنتی بادی خرگوشی تخلیص شده علیه نانو بادی می باشد. متوسط تمایل آنتی بادی خرگوشی تهیه شده برای نانو بادی ها در حدود $10^{10} M^{-1}$ می باشد.

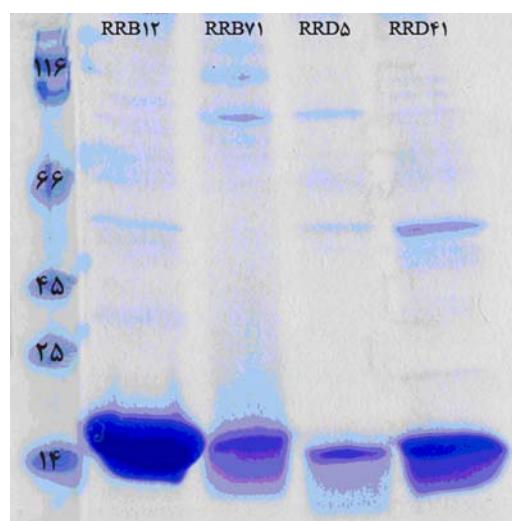
۷-۳ بررسی تیتر آنتی بادی ثانویه متصل به آنزیم (HRP)
نتیجه تعیین تیتر برای آنتی بادی ثانویه متصل به HRP در جدول ۴ آمده است. بر طبق نتایج، بهترین تیتر $1/500$ می باشد.

۴-۴ تأیید و تعیین میزان بازده بیان و بازده تخلیص

محصول تخلیص، قبل و بعد از تخلیص با ستون نیکل بر روی ژل SDS-PAGE الکترو فورز گردید که نتایج نشان دهنده تخلیص با درجه بالا برای نانو بادی های مورد نظر می باشد؛ البته میزان بازده هر یک متفاوت می باشد (شکل ۶). این تفاوت در میزان پروتئین نانو بادی به دست آمده و نیز در درجه خلوص آنها قابل مشاهده است. به طوری که بازده بیان برای کلون های مختلف، $2/4$ گرم در لیتر در مورد RRB12، $0/38$ گرم در لیتر در مورد RRB71، $0/17$ گرم در لیتر در مورد RRD5، $0/59$ گرم در لیتر در مورد RRD41 بود. پروتئین های تخلیص شده در محدوده وزنی حدود ۱۴ تا ۱۶ کیلو دالتون می ایستند و این قطعات حاوی دنباله C-myc می باشند.

۵-۳ بررسی واکنش اتصال نانو بادی بعد از تخلیص

نتایج الایزا با توانایی اتصال دو مورد از نانو بادی های بیان شده با آنتی زن های ستر شده (پیتید های مقلد MUC1) در شکل ۷ آمد که نشان دهنده حفظ واکنش مولکول در ضمن مرحله تخلیص است.



شکل ۶ محصول تخلیص هر یک از ۴ کلون

جدول ۱ تعیین تیتر سرم‌ها

BSA ۱۰ میکروگرم در چاهک	BSA ۵ میکروگرم در چاهک	BSA ۱ میکروگرم در چاهک	نانوپادی ۱۰ میکروگرم در چاهک	نانوپادی ۵ میکروگرم در چاهک	نانوپادی ۱ میکروگرم در چاهک	آنتیژن در کف چاهک‌ها
رقت‌های سرم						
۱/۶	۱/۵	۱/۴	۳/۵۲	۳/۵	۳/۴۲	(حیوان ایمن) ۱/۱۰۰
۱/۲۵	۱/۲۱	۱/۰	۳/۴۹	۳/۴	۳/۳۹	(حیوان ایمن) ۱/۲۰۰
۱/۳	۱/۲۲	۱/۳	۳/۳۲	۳/۲۸	۳/۲۱	(حیوان ایمن) ۱/۴۰۰
۰/۸۹	۱/۱	۰/۹	۳/۳۱	۳/۲۲	۳/۱۴	(حیوان ایمن) ۱/۸۰۰
۰/۸۶	۱/۰	۰/۹	۳/۳۰	۳/۲۸	۳/۲۵	(حیوان ایمن) ۱/۶۰۰
۰/۶	۰/۶	۰/۶	۳/۱۹	۳/۱۲	۳/۱۰	(حیوان ایمن) ۱/۳۲۰۰
۰/۶	۰/۵۹	۰/۵۷	۳/۱۰	۳/۰۹	۳/۰۸	(حیوان ایمن) ۱/۶۴۰۰
۲/۶	۲/۱	۲/۳	۱/۳	۱/۴۲	۱/۱۱	(حیوان ایمن) ۱/۱۰۰
۰/۰۹	۰/۲	۰/۱۵	۰/۱۲	۰/۱۱۳	۰/۰۸	PBS (Phosphate Bufferd Saline)

جدول ۲ تعیین حساسیت آنتی بادی بعد از تخلیص

۰/۰۰۵ میکروگرم در چاهک	۰/۰۱ میکروگرم در چاهک	۰/۰۵ میکروگرم در چاهک	۰/۱ میکروگرم در چاهک	۰/۵ میکروگرم در چاهک	۱ میکروگرم در چاهک	۲ میکروگرم در چاهک	۴ میکروگرم در چاهک	۸ میکروگرم در چاهک	آنتیژن در کف چاهک‌ها
نانوپادی									
۰/۹	۱/۵	۲/۲	۲/۷	۲/۸	۲/۹	۳/۸	۳/۷	۳/۵	نانوپادی
۰/۲	۰/۲	۰/۳	۰/۴	۰/۴	۰/۵	۰/۶	۰/۸	۱/۰	*NSB(BSA)

*NSB: Non Specific Binding = اتصال‌های غیر اختصاصی

جدول ۳ تعیین ویژگی آنتی بادی بعد از تخلیص

پودر شیر	اووآلبومین (Ovalbumin)	KLH	BSA	VHH	آنتیژن در کف چاهک‌ها
۰/۴۰	۰/۵۲	۰/۴۵	۰/۵۰	۲/۸۰	آنتی بادی خالص شده ۰/۰۰۰۱ میکروگرم در چاهک
۰/۴۰	۰/۵۸	۰/۵۵	۰/۶۰	۰/۶۰	EIA بافر

جدول ۴ تعیین تیتر آنتی بادی ثانویه متصل به HRP

BSA ۱۰ میکروگرم در چاهک	BSA ۵ میکروگرم در چاهک	BSA ۱ میکروگرم در چاهک	نانوپادی ۱۰ میکروگرم در چاهک	نانوپادی ۵ میکروگرم در چاهک	نانوپادی ۱ میکروگرم در چاهک	آنتیژن در کف چاهک‌ها
Anti-VHH-HRP						
۱/۹	۱/۸	۱/۷	۳/۸	۳/۷	۳/۵	۱/۱۲۵
۱/۳	۱/۱	۱/۰	۳/۰	۲/۸	۲/۶	۱/۲۵۰
۰/۶۱	۰/۵۸	۰/۶۱	۲/۷	۲/۶	۲/۴۹	۱/۵۰۰
۰/۶۴	۰/۵۸	۰/۵	۱/۸	۱/۷	۱/۴	۱/۱۰۰
۰/۴۸	۰/۴۸	۰/۴	۱/۳	۱/۲	۱/۰	۱/۲۰۰۰
۰/۰۹	۰/۲	۰/۱۵	۰/۱۲	۰/۱۳	۰/۱۸	EIA (کنترل منفی) بافر

۴- بحث

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 پرپلاسمی (دارای شرایط اکسیدکننده مناسب برای پیچش آنتی‌بادی‌ها) افزایش تولید و بیان را ایجاد می‌کند [۱۱-۱۴].

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 راهنمای (OmpA) در بالادست محل درج ژن نانوبادی و در شرایط القاء با غلظت mM1 از IPTG، موجب بیان بالا از پروتئین نانوبادی در باکتری اشرشیاکلی و ترشح آن به پرپلاسم 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 (mg/l ۱-۴۰) 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 محیط‌کشی، 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 پدیدآوردنگان این تحقیق برای بیش بیان این مولکول در مخمر، نشان دهنده تولید و تخلیص مقادیر مناسبی از نانوبادی می‌باشد [۲۲، ۲۴]. البته گزارش جالبی هم از بیان این مولکول در ساکارومایسین (Saccharomyces cerevisiae) سرویسیه (Saccharomyces cerevisiae) مبنی بر تولید ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر وجود دارد [۲۳].

بعد از بیشتر از ربیع 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 تجویز درمانی می‌باشد. عمدۀ ترین این محدودیت‌ها شامل: ایمنتوژن بودن آنتی‌بادی‌های موشی، توزیع در بافت‌های طبیعی و نفوذ کم به تومورهای سخت می‌باشد. با وجود پیشرفت‌های اخیر در زمینه مهندسی ژنتیک تلاش‌های عمدۀ ای نیز برای مهندسی واحدهای اتصالی کوچکتر، که ویژگی و تمایل آنتی‌بادی‌های کلاسیک را حفظ کرده و همچنین اینمی‌زایی کمتری داشته باشند، صورت گرفته است. نانوبادی‌ها به واسطه خصوصیاتی همچون اندازه کوچک، پایداری، حلایت، راحتی کردن کتابخانه‌های بالغ شده در این ویوو، بازده بیان بالا و یک پاراتوپ با پیچیدگی کمتر، برای کاربردهای ویژه درمانی مناسب می‌باشند. همچنین مزیت این مولکول‌ها به عنوان واحدهای سنجش در بیوسنسرها (Biosensors)، استفاده در جاذبهای ایمنی و تولید مهارکننده‌های آنژیمی رقابتی مورد بررسی قرار گرفته است. سایر کاربردهای ممکن شامل: عوامل تصویربرداری این ویوو، راهی برای ساخته شدن داروهای پیتیدی، اساس ساختمنی برای سازه‌های گوناگون و ایترابادی‌ها (Intrabody) می‌باشد [۱-۱۸].

کاربرد زیاد این مولکول‌ها نیاز به تولید مقادیر زیاد و ارزان از آنها را به دنبال دارد. در مورد نانوبادی‌های شتری، گرجه 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

روش‌های مختلفی برای اتصال ماکرومولکول‌ها (Macromolecules) وجود دارد. به عنوان مثال در روش پریدات، از مولکول قدری موجود در ماکرومولکول‌های گلیکوپروتئینی (Glycoprotein) برای اتصال دو مولکول استفاده می‌شود که با توجه به تجارب قبلی و اطمینان از اینکه این روش، مولکول آنزیم و آنتی‌بادی را غیرفعال نمی‌کند، اتصال دو مولکول انجام شد.

نهایتاً مولکول آنتی‌بادی ثانویه متصل به HRP، از نظر اتصال و شناسایی نانوبادی (در مقایسه با سایر مولکول‌های پروتئینی) ارزیابی شد که نتایج نشان می‌دهد که مولکول کوثرنگه در محلول نهایی آماده شده، با رقت ۱/۵۰۰ قابل استفاده در آزمایش‌های الیزا، و احتمالاً در سایر آزمایش‌های ایمونولوژیکی) می‌باشد؛ همچنین در طرح‌های تولید نانوبادی و کاربردهای مختلف نانوبادی‌ها استفاده می‌شود.

در این تحقیق پس از تولید مقادیر کافی از نانوبادی و تخلیص آن در مرحله بعد، مخلوطی از نانوبادی‌های تخلیص شده برای ایمن کردن خرگوش‌ها استفاده شد. با توجه به اینکه تولید و کاربرد آنتی‌بادی‌های نوترکیب شتری به سرعت در حال پیشرفت است و یکی از اجزاء لازم برای تولید و به کارگیری این آنتی‌بادی‌ها در تشخیص و درمان، یک مولکول شناساگر و در عین حال گزارشگر است (که همان آنتی‌بادی ثانویه متصل به آنزیم و یا یک شناساگر دیگر می‌باشد)، تلاش شد که با تولید انبوه نانوبادی‌ها و تزریق آن به عنوان ایمنوزن به حیوان آزمایشگاهی (خرگوش) اقدام به تولید آنتی‌بادی ثانویه علیه این مولکول ارزشمند گردد. ضمناً پس از اطمینان از مناسب بودن تیتر، حساسیت، تمایل و ویژگی آنتی‌بادی ثانویه ساخته شده، با استفاده از روش پریدات (Periodate)، اتصال این ماکرومولکول آنتی‌بادی علیه نانوبادی (HRP آنزیم پراکسیداز Horseradish Peroxidase) از منبع [5] انجام شد.

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.

- [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 VH 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.