

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

فاطمه رهبری زاده^{۱*}، وحید خدای‌ویشته^۲، داوود احمدوند^۳

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

پذیرش مقاله: ۸۶/۵/۳۰

دریافت مقاله: ۸۶/۴/۶

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 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 ایمنی‌درمانی داشته باشد. یکی از مواد مورد نیاز کلیدی در تولید و تعیین خصوصیات نانوبادی و نیز کاربرد نانوبادی‌ها در تشخیص، مولکول آنتی‌نانوبادی 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 و سپس تخلیص شده است؛ ضمن آنکه در مرحله دوم با تولید آنتی‌بادی علیه آن و کونژوگاسیون به مولکول آزیمی 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

محیط‌های ساده و ارزان، اطلاعات ژنتیکی کاملاً شناخته شده، در دسترس بودن تعداد زیادی از ناقل‌های کلونینگ (Cloning) و بیانی و گونه‌های جهش یافته میزبان، کنترل آسان و امکان تولید انبوه پروتئین نوترکیب از مواردی است که می‌توان به آن اشاره کرد [۸-۱۲].

به منظور بیان پروتئین نوترکیب در اشرشیاکلی، ناقل‌های بیانی متعددی طراحی شده‌اند. در این ناقل‌ها، عناصر کنترل‌کننده ژنتیکی، که در مراحل مختلف بیان ژن شامل: رونویسی، ترجمه، پایداری پروتئین، ترشح از سلول و میزان اکسیژن لازم نقش دارند، جایگذاری شده‌اند. عمده‌ترین عوامل دستیابی به بیان بالای پروتئین نوترکیب در اشرشیاکلی شامل موارد زیر است: گونه میزبان، تعداد کپی پلاسمید، آنتی‌بیوتیک انتخابی، پروموتور (Promoter)، خاتمه دهنده رونویسی، پایداری mRNA، علائم ترجمه، کدون رایج (Codon usage)، دما، شرایط کشت و محیط کشت (شرایط رشد، میزان اکسیژن، سرعت رشد، منبع کربن) و نوع فرماتور نقش مهمی در میزان بیان دارد [۸-۱۲].

از مهمترین عوامل لازم در حوزه تولید آنتی‌بادی‌های نوترکیب و همچنین آزمایش‌های تعیین خصوصیات این مولکول‌ها، در دست داشتن مولکول نشانگر یا مولکول شناساگر مناسب، جهت ردیابی این مولکول‌ها است. در این راستا در ابتدا باید میزان قابل توجهی از مولکول نوترکیب را بیان و سپس تخلیص نمود. در مرحله دوم با تولید آنتی‌بادی علیه آن و کوژوگاسیون (Conjugation) به مولکول آنزیمی، نهایتاً به مولکول شناساگری که در تحقیقات بنیادی مثل روش نمایش فاز و انواع روش‌های تعیین خصوصیات آنتی‌بادی‌ها، آزمون‌های تشخیصی (مثل ایمنوهیستوشیمی (Immunohistochemistry) و ایمنوسایتوشیمی (Immunocytochemistry) کاربرد دارد، دسترسی پیدا می‌شود. با توجه به اینکه مطالعات دامنه‌داری برای تولید و تعیین خصوصیات نانوبادی هدف گیرنده انواع نشانه‌های سرطانی در حال انجام است و نیز به دلیل اهمیت روزافزون نانوبادی‌ها در تحقیقات ایمنی‌درمانی (Immunotherapy)، و قابلیت بالقوه این مولکول برای استفاده در درمان با ریزذرات‌ها،

VH شان (Variable domain conventional antibodies) (که برای تفاوت نسبت به VH معمولی VHH (Variable domain of heavy chain antibodies) گفته می‌شود) به آنتی‌ژن وصل می‌شوند. 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 گفته می‌شود به این ترتیب تک دومن VHH (نانوبادی) کوچکترین قطعه آنتی‌بادی متصل شونده به آنتی‌ژن است که قطعه کامل آن وزنی در حدود ۱۲-۱۵ کیلودالتون و ابعادی در حدود نانومتر دارد و از یک آنتی‌بادی دارای قدرت اتصال مشتق شده است [۲، ۳].

کلون کردن نانوبادی در یک ناقل (vector) نمایش فاز (phage display)، انتخاب قطعه اتصال به آنتی‌ژن به وسیله غنی‌سازی و بیان نانوبادی انتخاب شده در باکتری‌ها به عنوان یک جایگزین جذاب و ارزشمند برای به دست آوردن مولکول کوچک شناساگر است. نانوبادی‌های به دست آمده از شترهای یک و دوکوهانه و یا لاماهای ایمن شده در مقایسه با Fab (Fragment antigen binding) و Fv (Fragment variable) و scFv (single chain Fragment variable) که از سایر پستانداران به دست آمده‌اند، برتری‌های درخشان دارد؛ زیرا علاوه بر اینکه با کلون کردن و بیان فقط یک تک دومن می‌توان قطعه کامل متصل شونده به آنتی‌ژن را در این ویوو (in vivo) بالغ شده، تولید کرد، VHH شتری نوترکیب، خصوصیات جالب و منحصر به فردی دارد. این خصوصیات شامل: بیان با بازده بالا و آسانی تخلیص، تولید قطعه آنتی‌بادی تک دومنی با پیچش کامل، بسیار محلول و بسیار پایدار، تولید قطعه اتصال ویژه آنتی‌ژن و با تمایل بالا، هومولوژی (Homology) بسیار نزدیک به قطعه VH انسانی و توانایی شناخت اپی‌توپهای فضایی ویژه به وسیله CDR3 طویل آن می‌باشد [۴-۷].

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

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: 5'-GTGGCCGCGTGGACTGGATCCTGAGGAGACGGTGAC-3'

Vp-Bbs: 5'-TATGAAGACACCAGGCCGTGCAGCTGCAGGCGTCTG-3'

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

در محیط TB (Tris-borate) حاوی آمپی سیلین (Ampicillin)، باکتری TG1 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 به دست آمد [۱۶].

۲-۲-۲- جمع‌آوری نانوبادی

محصول پروتئینی (نانوبادی) در باکتری حاوی سازه در پریپلاسم (Periplasm) تجمع می‌یابد که از رسوب ۱۰۰ ml 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 کونژوگاسیون آنتی‌بادی ثانویه علیه نانوبادی‌ها شرح داده شده است [۱۳، ۱۴].

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

سرم آلبومین گاوی (Bovine Serum Albumin: BSA)، آرلاسل (Arlacel)، سولفات آمونیم، نمک‌های فسفات 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 پلیمرز، T4 DNA لیگاز، آنزیم‌های برش‌گر محدود، dNTPs، آگارز، انواع پودرهای

سپس واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای یاد شده و آنزیم Pfu پلیمرز و با دمای واسرشتگی (Denaturation) ۹۴ درجه (۲۰ ثانیه)، جفت شدن (Annealing) معادل ۵۵ درجه (۳۰ ثانیه) و طولیل 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 شرکت MN آلمان اقدام به جداسازی قطعات مورد نظر 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

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

۲-۳-۲- تیر 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)، هر چاهک $100 \mu\text{l}$ از مخلوط محلول نانوبادی‌های تخلیص شده $10 \mu\text{g/ml}$ اضافه شد. در $2/5$ ردیف ۸ تایی دیگر نیز از محلول BSA $10 \mu\text{g/ml}$ به هر چاهک $100 \mu\text{l}$ اضافه شد؛
- ۲- ظرف در دمای 37 درجه سانتیگراد یک شب انکوبه شد؛
- ۳- سه بار شستشو با بافر فسفات 10 میلی مولار، $\text{pH}=7/2$ و بار آخر ظرف روی کاغذ صافی خشک شد؛

- ۴- مسدود کردن سطح چاهک‌ها با 200 میکروگرم در چاهک محلول مسدود کننده (Blocking solution) $2\% \text{ BSA}$ به مدت یک ساعت در 37 درجه سانتیگراد و تکرار مرحله ۳؛

- ۵- اضافه کردن رقت‌های متوالی از آنتی سرم خرگوشی $(\frac{1}{500}, \frac{1}{1000}, \frac{1}{2000}, \frac{1}{4000}, \frac{1}{8000}, \frac{1}{16000}, \frac{1}{32000})$ به صورت دوتایی و در دو تا از چاهک‌های باقی مانده از بافر (Enzyme Immuno Assay) EIA و در دو چاهک آخر از $\frac{1}{300}$ رقیق شده، سرم خرگوشی غیر ایمن اضافه شد؛
- ۶- انکوباسیون (Incubation) یک ساعته در 37 درجه سانتیگراد، سپس تکرار مرحله ۳؛

- ۷- به تمام چاهک‌ها هر کدام $100 \mu\text{l}$ از محلول $\frac{1}{4000}$ 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 37 درجه سانتیگراد؛

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

- ۹- به هر چاهک، $50 \mu\text{l}$ از محلول TMB (تترا متیل بنزیدین، سوسترای HRP) اضافه شد که بعد از 5 تا 10 دقیقه انکوباسیون در تاریکی، رنگ آبی در چاهک‌های حاوی آنزیم دیده شد؛

محلول غلیظ قند سوکروز و بلافاصله انتقال رسوب به غلظت پایین ($5-10 \text{ mM}$ کلرید منیزیم) محتویات پریپلاسم خارج می‌شود. برای هر یک از نانوبادی‌های به دست آمده در بهترین شرایط در حضور 2-Mercapto-ethanol (2-ME) (حالت احیا) الکتروفورز SDS-PAGE در ژل 12% انجام شد و به دنبال آن رنگ‌آمیزی کوماسی بریلیانت بلو (Coomassie brilliant blue) و نیز آزمایش وسترن بلات 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 (Nickel-nitrilo-triacetic acid یا Ni^+ -NTA) در شرایط بومی و با غلظت 150 میلی مولار 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 (MUC1 mimetic peptide)) با روش الایزا (Enzyme Linked Immunosorbent Assay: ELISA) ثابت گردید.

۲-۳-۲- ساخت آنتی‌بادی ثانویه علیه نانوبادی در خرگوش

۲-۳-۲-۱- ایمن کردن خرگوش‌ها

از محلول حاوی مخلوط نانوبادی‌های تخلیص شده، به ازای هر خرگوش، حجم حاوی 500 میکروگرم نانوبادی برداشته و با حجم مساوی از ادجوانت (Adjuvant) کامل فروند (Fround) به چهار خرگوش، سفید نیوزیلندی و سه ماهه، تزریق ($7-10$ محل در پشت حیوان در زیر پوست) انجام گرفت. در تزریقات بعدی 250 میکروگرم و همراه با ادجوانت ناقص به هر خرگوش تزریق شد. تزریق‌های یادآور،

۱۰۰ میلی مولار، $pH=9/2$ ، دیالیز شد. از طرفی ۳ mg از 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 یونهای اضافی و نمکها از واکنش حذف شوند. در ادامه محتویات پیپت پاستور با ۲/۲ ml بافر بی کربنات شستشو داده شد و به محلول خارج شده، ۱۰۰ μ l از محلول سدیم بوروهیدرات (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 μ l محلول سدیم بوروهیدرات اضافه کرده و مجدداً یک ساعت انکوباسیون در تاریکی اعمال شد [۲۰].

۲-۳-۷- تخلیص آنتی بادی 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 رسوب دهی با حجم مساوی از محلول سولفات آمونیم اشباع با $pH=7$ ، جداسازی آنتی بادی ثانویه کونژوگه (Conjugated) به آنزیم HRP انجام گردید [۲۰].

۲-۳-۸- بررسی تیتراژ آنتی بادی ثانویه متصل به HRP

بعد از کونژوگاسیون

بعد از اتمام کونژوگاسیون باید آنتی بادی ثانویه متصل به HRP برای به دست آوردن بهترین رقت کونژوگه در آزمونها، با روش الیزا کنترل شود. بررسی تیتراژ 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 چاهکها افزوده 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 به دست آورد [۱۷].

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

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

از آنتی سرم های دارای بالاترین تیتراژ

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].

۲-۳-۴- تعیین تیتراژ 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 غلظت های مختلف آنتی بادی از پودر خشک آنتی بادی تهیه گردید [۱۳].

۲-۳-۵- تعیین خصوصیات آنتی بادی ثانویه علیه نانوبادی

الف) تعیین حساسیت با استفاده از رسم منحنی استاندارد و با آزمایش غلظت های (۸، ۴، ۲، ۱، ۰/۵ و ۰/۱ میکروگرم 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 غلظت های مختلف نانوبادی در چاهکها، از آنتی ژن های مختلف، همچون BSA و KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) به عنوان نمونه های غیر مربوطه پروتئینی استفاده گردید [۱۹]؛

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

۲-۳-۶- اتصال آنتی بادی ثانویه علیه نانوبادی به آنزیم HRP

پس از اطمینان از وجود تیتراژ بالای آنتی بادی علیه نانوبادی در سرم خرگوش ها و تخلیص کروماتوگرافی تعویض یونی، ۲ mg/ml آنتی بادی خالص شده خرگوشی در بافر بی کربنات

۳- نتایج

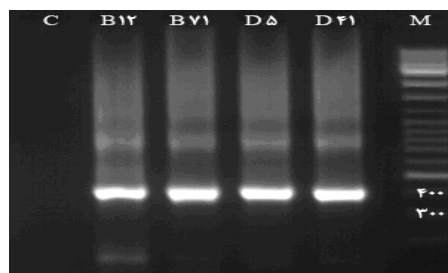
۳-۱- انتقال ژن نانوبادی به ناقل‌های بیانی و نتایج

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، چاهک C: کنترل منفی PCR برای همان آغازگرها و در بقیه چاهک‌ها از هر یک از کلون‌های B12, B71, D5 و D41 نمونه‌گذاری شده است.

نتایج سواب 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 سواب کلونینگ موفق است.

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

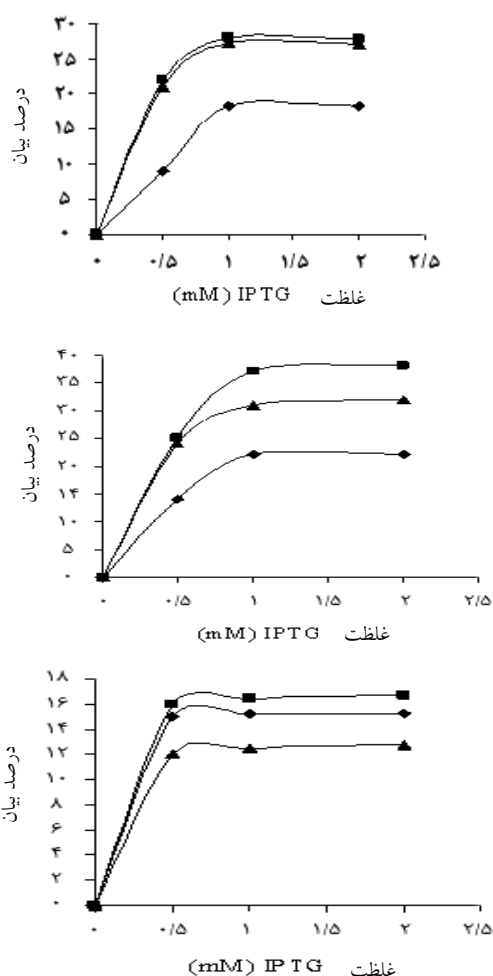
در این تحقیق، سه غلظت IPTG (شامل ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌مولار)، سه دمای (۲۵، ۳۰ و ۳۷ درجه سلسیوس) و سه طول دوره انکوباسیون (۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت) مورد آزمون قرار گرفت. نتایج شرایط مختلف برای دو کلون، یکی از منبع شتر یک کوهانه و دیگری از منبع شتر دو کوهانه، در شکل‌های ۲ و ۳ آورده شده است (در این شکل‌ها نتیجه زمان ۱۲ ساعت داده نشده است). از بین شرایط یاد شده، ۳۶ ساعت کشت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس 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 مقایسه درصد بیان باند مورد نظر این تحقیق با کل پروتئین‌های موجود در لیزات باکتری و با استفاده از دستگاه ژل داکيومنت (Gel Document) (Pharmacia) صورت گرفت.

۳-۲- جمع‌آوری VHH

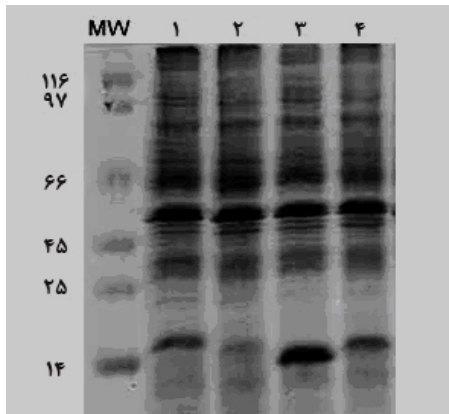
بعد از فراهم کردن شرایط بیان، نتایج الکتروفورز SDS-PAGE و بلائینگ (Blotting)، دال بر بیان مولکول نانوبادی می‌باشد (شکل ۴).

۳-۳- تخلیص با ستون IMAC

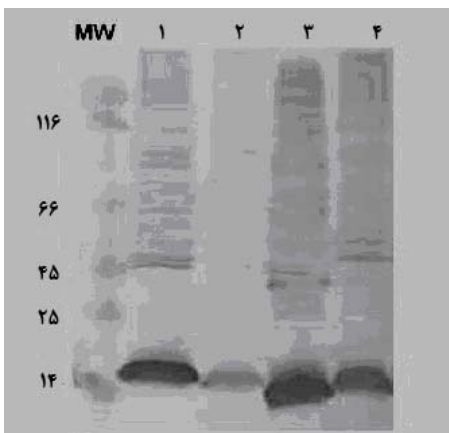
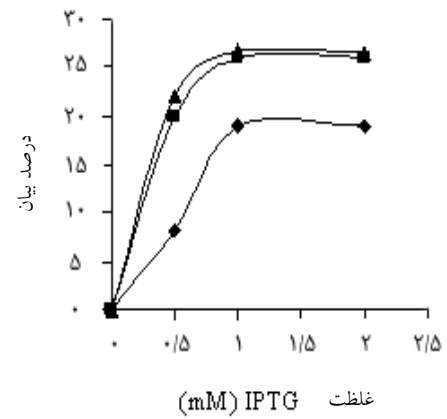
محصول مراحل تخلیص برای کلون‌های مختلف، الکتروفورز SDS-PAGE شد (به‌عنوان نمونه در شکل ۵، محصول تخلیص کلون RRB12 آورده شده است).



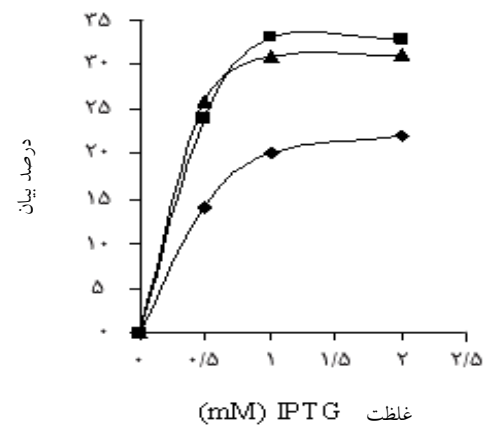
شکل ۲ در این شکل میزان بیان نانوبادی بر حسب درصد نسبت به توتال پروتئین باکتری در غلظت‌های مختلف IPTG بر حسب mM و دماهای مختلف (۳۷ °C -▲- و ۳۰ °C -■-) و در زمان‌های ۲۴ ساعت (الف)، ۳۶ ساعت (ب) و ۴۸ ساعت (ج) برای کلون RRB12 نشان داده شده است که نتایج دال بر بیشترین بیان در ۳۶ ساعت کشت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و غلظت ۱ میلی‌مولار IPTG می‌باشد.



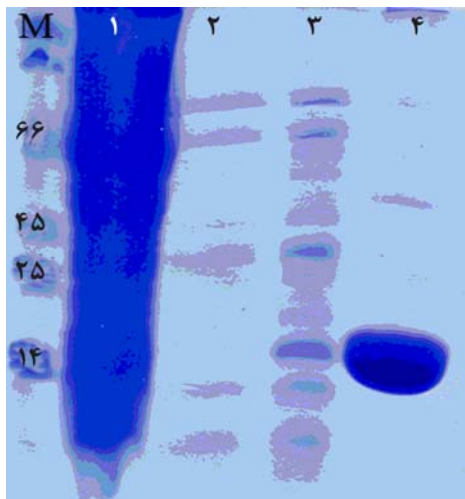
الف



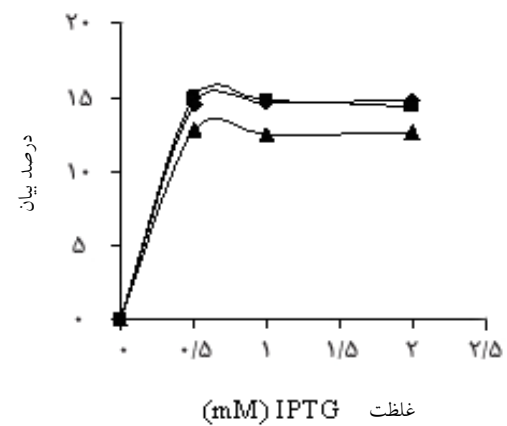
ب



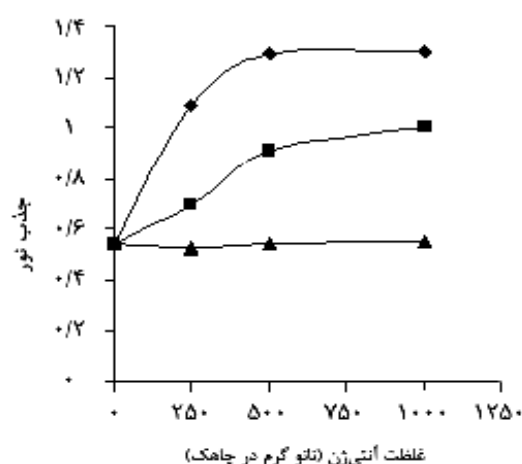
شکل ۴ نتیجه SDS-PAGE (الف) و بلاتینگ (ب) در چاهک‌های ۱، ۲، ۳، ۴، و ۵ به ترتیب از کلون‌های B12، B71، D5 و D41 نمونه‌گذاری شده است.



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



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 (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 میلی‌مولار IPTG می‌باشد.



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

۳-۶- ساخت آنتی‌بادی ثانویه علیه نانوبادی در خرگوش

۳-۶-۱- تیتراژ کردن آنتی‌سرم خرگوشی

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

۳-۶-۲- 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.

۳-۶-۳- 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 $10^1 M^{-1}$ می‌باشد.

۳-۶-۷- بررسی تیتراژ آنتی‌بادی ثانویه متصل به آنزیم (HRP)

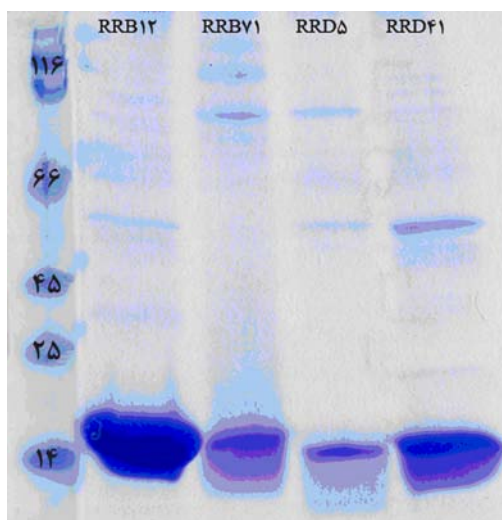
نتیجه تعیین تیتراژ برای آنتی‌بادی ثانویه متصل به HRP در جدول ۴ آمده است. بر طبق نتایج، بهترین تیتراژ $1/500$ می‌باشد.

۳-۴- تأیید و تعیین میزان بازده بیان و بازده تخلیص

محصول تخلیص، قبل و بعد از تخلیص با ستون نیکل بر روی ژل SDS-PAGE الکتروفورز گردید که نتایج نشان دهنده تخلیص با درجه بالا برای نانوبادی‌های مورد نظر می‌باشد؛ البته میزان بازده هر یک متفاوت می‌باشد (شکل ۶). این تفاوت در میزان پروتئین نانوبادی به دست آمده و نیز در درجه خلوص آنها قابل مشاهده است. به طوری که بازده بیان برای کلون‌های 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. پروتئین‌های تخلیص شده در محدوده وزنی حدود ۱۴ تا ۱۶ کیلودالتون می‌ایستد و این قطعات حاوی دنباله His و C-myc می‌باشند.

۳-۵- بررسی واکنش اتصال نانوبادی بعد از تخلیص

نتایج الیزا 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 ۶ محصول تخلیص هر یک از ۴ کلون

جدول ۱ تعیین تیترا سرم‌ها

BSA ۱۰ میکروگرم در چاهک	BSA ۵ میکروگرم در چاهک	BSA ۱ میکروگرم در چاهک	نانوبادی ۱۰ میکروگرم در چاهک	نانوبادی ۵ میکروگرم در چاهک	نانوبادی ۱ میکروگرم در چاهک	آنتی ژن 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	۳/۲۳	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) ۱/۳۲۰
۰/۶	۰/۵۹	۰/۵۷	۳/۱۰	۳/۰۹	۳/۰۸	(حیوان ایمن) ۱/۶۴۰
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	کنترل منفی 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	آنتی ژن در کف چاهک‌ها
۰/۹	۱/۵	۲/۲	۲/۷	۲/۸	۲/۹	۳/۸	۳/۷	۳/۵	نانوبادی
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	آنتی ژن در کف چاهک‌ها
۰/۴۰	۰/۵۲	۰/۴۵	۰/۵۰	۲/۸۰	آنتی بادی خالص شده ۰/۱ میکروگرم در چاهک
۰/۴۰	۰/۵۸	۰/۵۵	۰/۶۰	۰/۶۰	EIA بافر

جدول ۴ تعیین تیترا آنتی بادی ثانویه متصل به HRP

BSA ۱۰ میکروگرم در چاهک	BSA ۵ میکروگرم در چاهک	BSA ۱ میکروگرم در چاهک	نانوبادی ۱۰ میکروگرم در چاهک	نانوبادی ۵ میکروگرم در چاهک	نانوبادی ۱ میکروگرم در چاهک	آنتی ژن 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	۱/۱۰۰۰
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	کنترل منفی (بافر EIA)

۴- 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 تجویز درمانی 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 خصوصیتی 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 [۱۱-۱۴].

در این راستا، برای افزایش بیان در اشرشیاکلی با سواب 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 ۱ mM 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 (۱-۴۰ mg/l) میزان قابل ملاحظه‌ای می‌باشد [۳-۸]. مولکول بیان شده در آزمون‌های مختلف الیزا 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 محیط کشت، 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 پدیدآورندگان این تحقیق برای بیش بیان این مولکول در مخمر، نشان دهنده تولید و تخلیص مقادیر مناسبی از نانوبادی می‌باشد [۳، ۲۲، ۲۴]. البته گزارش جالبی هم از بیان این مولکول در ساکارومایسس سروسیسه (*Saccharomyces cerevisiae*) مبنی بر تولید ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر وجود دارد [۲۳].

روش‌های مختلفی برای اتصال ماکرومولکول‌ها (Macromolecules) وجود دارد. به‌عنوان مثال در روش پریدات، از مولکول قندی 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 کونژوگه در محلول نهایی آماده شده، با رقت ۱/۵۰۰ قابل استفاده در آزمایش‌های الایزا، (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 خرگوش استفاده شد. باتوجه به اینکه تولید و کاربرد آنتی‌بادی‌های نو ترکیب شتری به سرعت در حال پیشرفت است و یکی از اجزاء لازم برای تولید و به‌کارگیری 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 ایمنوژن به حیوان آزمایشگاهی (خرگوش) اقدام به تولید آنتی‌بادی ثانویه علیه این مولکول ارزشمند گردد. ضمناً پس از اطمینان از مناسب بودن تیترا، حساسیت، تمایل و ویژگی آنتی‌بادی ثانویه ساخته شده، با استفاده از روش پریدات (Periodate)، اتصال این ماکرومولکول (آنتی‌بادی علیه نانوبادی) به مولکول HRP [آنزیم پراکسیداز (Peroxidase) از منبع Horseradish] 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, Rasae 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, Rasae 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.