Archive of SID

طراحی و ساخت ناقل مناسب برای تولید آنتی بادیهای فلورسنت نوترکیب

علی اکبر خلیلی یزدی[۱] و مهدی گلچین[۲*]

[۱] کرمان، مرکز بین المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، گروه بیوتکنولوژی

[۲] کرمان، دانشگاه شهید باهنر، دانشکدهٔ دامپزشکی، بخش ایمیونولوژی

تاریخ دریافت: ۸۶/۱۱/۱۷ تاریخ پذیرش: ۸۸/۵/۲۵

چکیده

آنتی بادیهای نوترکیب مولکولهای جدیدی هستند که به وسیلهٔ روشهای مهندسی ژنتیک و به اشکال مختلف ساخته می شوند. با توجه به اینکه این آنتی بادیها امروزه استفاده های زیادی در تشخیص آنتی ژنهای مختلف دارند، هدف از انجام این تحقیق دستکاری ژنتیکی یک وکتور فاژمید با توانایی بیان آنتی بادیهای نوترکیب بوده است، به گونه ای که بتوان با قرار دادن ژن *EGFP* در آن، این دسته از آنتی بادیها را به آسانی به شکل آنتی بادی نوترکیب فلورسنت تولید نمود. بدین منظور، با انجام دستکاریهای لازم، ژن *EGFP* تکثیر و در وکتور بیان کننده آنتی بادی کلون گردید. وکتور نوترکیب به دست آمده به سلول باکتری *E. coli* سویهٔ HB2151 منتقل شد و فعالیت وکتور نوترکیب با مشاهدهٔ سلولهای حاوی آن توسط میکروسکوپ فلورسنت و انجام آزمون ELISA مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که ژن فوق با موفقیت در داخل وکتور قرار گرفته و وکتور جدید توانایی تولید آنتی بادیهای فلورسنت نوترکیب را دارا می باشد. آنتی بادیهای فلورسنت نوترکیب تولید شده در قسمت سیتوپلاسم باکتری قرار داشته و علاوه بر فلورسنت بودن، توانایی شناسایی آنتی ژن را دارند.

واژه های کلیدی: آنتی بادی نوترکیب، GFP، آنتی بادی فلورسنت نوترکیب

* نویسنده مسئول، تلفن تماس: ۰۳۴۱-۳۲۲۲۰۴۷، پست الکترونیک: golchin@mail.uk.ac.ir

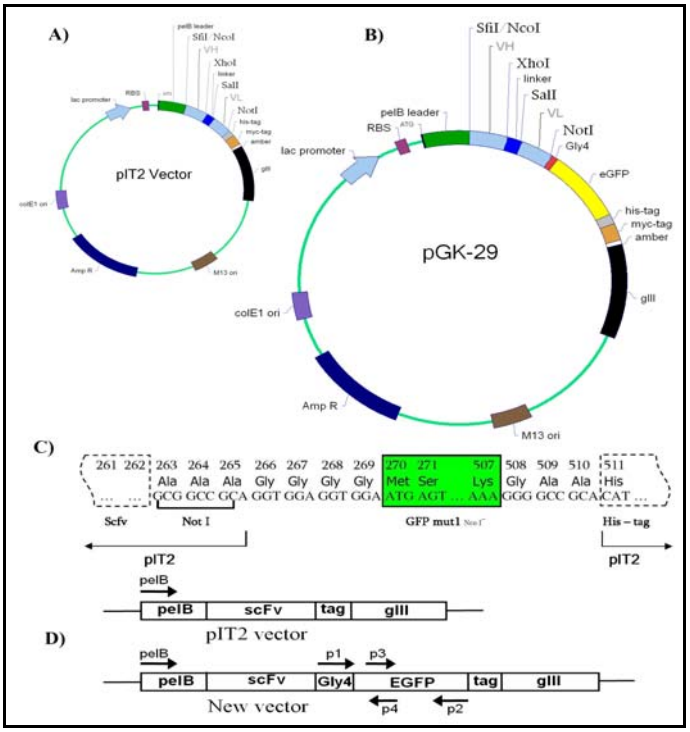
مقدمه

آنتی بادیها مولکولهایی با ماهیت پروتئینی هستند که با میل جذبی و ویژگی بالا به مولکول هدف خود که تحت عنوان آنتی ژن شناخته می شود، متصل می گردند. این خصوصیت بارز، آنها را به ابزارهای تشخیصی غیر قابل اجتنابی در زمینه های تحقیقاتی، پزشکی، علوم گیاهی و صنعتی مبدل ساخته است. با پیشرفتهای تدریجی علم، تاکنون سه نسل از آنتی بادیها توسط بشر مورد استفاده قرار گرفته اند. نسلهای اول و دوم آنتی بادیها متشکل از آنتی بادیهای پلی کلونال و منوکلونال می باشند که این آنتی بادی های کامل عمدتاً در بدن حیوانات آزمایشگاهی تولید می شوند و ساخت آنها نیازمند صرف هزینه و یا وقت نسبتاً زیادی می باشد. در دههٔ گذشته نسل سوم آنتی بادیها تحت عنوان آنتی بادیهای نوترکیب، به طور فزاینده ای گسترش یافته و مورد استفاده قرار گرفته اند (۱۸). این مولکولهای جدید که بطور عمده مشتمل بر نواحی متغییر آنتی بادیها (محل اتصال آنتی بادیها با آنتی ژن) می باشند، توسط انسان طراحی و ساخته شده و درون میزبانهای گوناگونی از جمله باکتریها (۱٤)، گیاهان (۲٤)، سلولهای پستانداران (۲۳)، مخمرها (۲۳) و غیره تولید می گردند. این مولکولهای نوترکیب تقریباً از مزایای آنتی بادیهای منوکلونال برخوردار بوده و در ضمن می توان آنها را با صرف هزینه های بسیار کمتر در مدت زمان اندکی در مقادیر زیاد تولید نمود (۱۱ ، ۱۳). به علاوه این مولکولها به طور ژنتیکی به طیف گسترده ای از مولکولهای پروتئینی

www.SID.ir

Archive of SID

متصل شده اند تا مولکولهای شیمری خلق شوند که علاوه بر اتصال به آنتی ژن قادر به انجام فعالیتهای دیگری به صورت همزمان نیز باشند. از جمله پروتئینهایی که به صورت ژنتیکی به آنتی بادیهای نوترکیب متصل گردیده اند می توان از آنزیم آلکالین فسفاتاز (۹)، پپتیدهای ضد قارچی (۱٦) و پروتئین فلورسنت سبز (GFP) (۱۵) نام برد. مهمترین خصوصیت GFP، فلورسنت ذاتی این پروتئین می باشد. پروتئین فلورسنت سبز برای اولین بار توسط Shimomura و همکارانش در سال ۱۹٦۲ از نوعی عروس دریائی جداسازی شد (۲۱) و در سال ۱۹۹۲ ژن این مولکول توسط Prasher و همکارانش کلون گردید (۱۷). در سالهای بعد این ژن درون سایر موجودات زنده بیان شد و پروتئین حاصله خصوصیات فلورسنتی خود را به طور کامل نمایان نمود (٤، ۱۲). نتایج این تحقیقات نشان داد که این ژن به طور کامل دارای تمامی اطلاعات لازم جهت ساخت کروموفور بوده و جهت فعالیت هیچ نیازی به ساختارهای سلولی عروس دریائی ندارد. ژن *GFP* به طور گسترده به عنوان ژن گزارشگر و نشانگر سلولی مورد استفاده قرار گرفته و همچنین خصوصیات فلورسنتی برتر و پایداری بالای آن در محیط *in vitro* منجر شده که از آن در ساخت پروتئینهای شیمریک با کاربرد دوگانه استفاده شود (۲ ، ۱ ، ۲۲). اتصال ژنتیکی *GFP* با آنتی بادیهای نوترکیب موجب پدید آمدن گروه جدیدی از پروتئینهای شیمریک تحت عنوان آنتی بادیهای فلورسنت نوترکیب گردیده است. این مولکولها تقریباً در تمامی آزمایشات اولیه ای که آنتی بادیهای فلورسنت به صورت مرسوم استفاده می شوند، از جمله ایمونوهیستوشیمی، مشاهدهٔ مکان حضور پاتوژنها در بافتهای مختلف و بررسی ساختار سلولی با استفاده از تکنیک ایمونوفلورسنت قابل استفاده می باشند (۳).



تصویر ۱- نقشهٔ وکتور pIT2 (A)، نقشهٔ وکتور pGK-29 (B)، مکانهای ژنی اضافه شده در وکتور pGK-29 که ژن *EGFP* در آن با رنگ سبز نمایش داده شده است (C) و محل قرار گیری آغازگرها بر روی وکتور جدید و وکتور pIT2 که نقشهٔ بالا متعلق به بخشی از وکتور pIT2 و نقشهٔ پائین متعلق به بخشی از وکتور جدید می باشد (D).

www.SID.ir

Archive of SID

هدف از این تحقیق قرار دادن ژن *EGFP* (Enhanced Green Fluorescent Protein) در کنار سایر عناصر وکتور pIT2 بود که از طریق آن بتوان وکتور جدیدی ایجاد کرد که از آن به منظور تهیهٔ آنتی بادیهای فلورسنت نوترکیب استفاده نمود. در ضمن وکتور جدید به گونه ای طراحی گردد که بتوان با جایگزین نمودن ژن مربوط به آنتی بادیهای نوترکیب، آنتی بادیهای فلورسنتی را بر علیه آنتی ژنهای مختلف تولید نمود.

مواد و روشها

به منظور ساخت وکتور تولید کنندهٔ آنتی بادیهای فلورسنت نوترکیب، ژن رمزکنندهٔ *EGFP* قرار گرفته بر روی وکتور pET33bEGFPPLY(اهدایی توسط آقای دکتر Graeme Cowan از دانشگاه گلاسگو، اسکاتلند) توسط دو جفت آغازگرهای P1، P4 و P2، P3 با استفاده از آزمون واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) و به کمک آنزیم *Pfu DNA polymerase* (Bioneer, Korea) پس از بهینه سازی شرایط PCR (۵)، جهت حذف جایگاه آنزیمی *Nco*I و تعبیه دو جایگاه جدید در دو سر آن، به صورت دو قطعهٔ جداگانه تکثیر شد. توالی آغازگرها به شرح زیر می باشد:

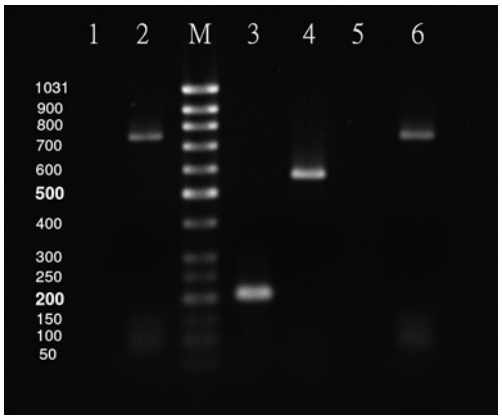
P1=5'ATAGCGGCCGCA*GGTGGAGGTGGA*ATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTC -3'

P2=5' ATATGGGCCCCTTTGTATAGTTCATCCATGC -3'

P3= 5'- CTGTTCCTTGGCCAAC -3'

P4= 5'- GTTGGCCAAGGAACAGG -3'

آغازگر P1 حامل جایگاه برش آنزیم *Not*I، (در زیر آن خط کشیده شده است) و در بر گیرنده توالی رمز کننده چهار اسیدآمینهٔ گلاسین (به صورت ایتالیک به نمایش در آمده است) و انتهای ′۵ ژن *EGFP* است. آغازگر P2 حامل جایگاه برشی آنزیمی *Bsp120*I (در زیر آن خط کشیده شده است) و انتهای ′۳ ژن *EGFP* بدون کدون خاتمه می باشد. همچنین دو آغازگر P3 و P4 برای بکارگیری در روش SOE (Spliced Overlap Extension) (۱۰)، بمنظور حذف جایگاه برش آنزیمی *Nco*I از روی ژن *EGFP* طراحی گردیدند. جایگاه اتصال آغازگرها به صورت شماتیک در تصویر (D)۱ آمده است. ابتدا قطعات α (۲۰۰ جفت باز) و β (۵۶۵ جفت باز) به ترتیب با استفاده از جفت آغازگر P4 / P1 و P2 / P3 ایجاد شدند. شرایط دمایی اعمال شده جهت تکثیر قطعات α و β شامل سیکل دمایی ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه، ۵۲ درجه سانتی گراد دو دقیقه، ۷۲ درجه سانتی گراد سه دقیقه و ۱۵ سیکل ۹۴ درجه سانتی گراد چهل و پنج ثانیه، ۵۲ درجه سانتیگراد پنجاه ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد دو دقیقه بود. سپس قطعات تکثیر شده با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد از یکدیگر تفکیک شده و با استفاده از کیت استخراج DNA از ژل (Bioneer, Korea) خالص سازی گردیدند. در مرحلهٔ بعد قطعهٔ کامل *EGFP* جهش یافته، از اتصال قطعات استخراج شدهٔ α و β بر طبق روش SOE ایجاد گردید. شرایط دمایی به کار رفته مشابهٔ مرحله قبل بود با این تفاوت که تکثیر آن در ۲۵ سیکل انجام پذیرفت.



تصویر ۲- مراحل انجام تغییرات بر روی ژن *EGFP* . ستون ۲ ژن *EGFP* قبل از عمل جهش، ستون ۳ قطعهٔ α ، ستون ٤ قطعهٔ β و ستون ٦ ژن *EGFP* تکثیر شده توسط دو قطعهٔ کوچک را نشان می دهند. ستونهای ۱و ۵ به ترتیب کنترل منفی برای ژن *EGFP* قبل و بعد از انجام جهش می باشند. ستون M: مارکر GeneRuler^{TM} 50bp DNA Ladder (Fermentas).

www.SID.ir

Archive of SID

پس از تکثیر قطعهٔ کامل ژن *EGFP* که محل برش *Nco*I از روی آن حذف شده بود، این قطعه خالص سازی شده و به ترتیب با آنزیمهای *Bsp120*I و *Not*I به صورت مجزا برش یافت (آنزیم *Bsp120*I علی رغم داشتن جایگاه شناسایی متفاوت، قادر به ایجاد انتهای چسبنده مشابه با آنزیم *Not*I می باشد). از سوی دیگر وکتور pIT2 (متعلق به کتابخانه های فاژی آنتی بادی Tomlinson I and J ساخت مرکز مهندسی پروتئین شهر کمبریج انگلستان که هر کدام از آنها شامل ۸×۱۰^{۸} نوع آنتی بادی به صورت scFv (Single chain Fv) می باشند) توسط آنزیم *Not*I برش خورده و پس از خالص سازی توسط آنزیم آلکالین فسفاتاز میگویی بر طبق دستور العمل شرکت سازنده (Promega, USA) دفسفریله گردید. در نهایت قطعهٔ بریده شده و وکتور برش یافته و دفسفریله، در مجاورت آنزیم T4 ligase به یکدیگر متصل گردیدند. جهت انتقال وکتور دستکاری شده به سلول *E. coli*، ابتدا با استفاده از روش کلرید کلسیم سلولهای مستعد ساخته شده (٦) و با به کارگیری روش شوک دمایی (۱۹)، وکتورها به درون سلولهای مستعد شدهٔ *E. coli* سویهٔ HB2151 منتقل گردیدند. پس از انتخاب باکتریهای نوترکیب بر روی محیط کشت جامد LB حاوی ۱۰۰µg/ml آمپی سیلین و ۱ درصد گلوکز، با استفاده از چند مرحله عمل Colony-PCR (۸) به کمک آغازگرهای اختصاصی ژن *EGFP* (P1 و P2) کلونیهایی که حامل ژن *EGFP* بودند جداسازی شده و در مرحلهٔ بعد با استفاده از آغازگرهای داخلی ژن *EGFP* و آغازگر pelB (با توالی 5'-ATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGC-3') واقع بر روی وکتور pIT2 ، جهت قرارگیری(Orientation) ژن بر روی وکتور مشخص گردید. در نهایت چند نمونه از وکتورهایی که ژن *EGFP* را در جهت صحیح دریافت کرده بودند جهت توالی یابی DNA به شرکت TAG-Copenhagen واقع در کشور دانمارک، ارسال گردیدند.

بعد از تأیید نتایج توالی یابی، جهت بررسی فعالیت مولکول نوترکیب تولید شده، کلونی مورد نظر به همراه باکتری حاوی وکتور pIT2 (به عنوان کنترل منفی) در محیط کشت 2.YT (۱۹) که با ۱۰۰µg/ml آمپی سیلین و ۱ درصد گلوکز تکمیل شده بود به مدت یک شب درون شیکر انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. سپس باکتریهای رشد داده شده به نسبت ۱ به ۱۰۰ به محیط کشت 2.YT تازه که حاوی ۱۰۰µg/ml آمپی سیلین و ۰/۱ درصد گلوکز بود افزوده شدند. باکتریها تا رسیدن به مرحله رشدی مناسب (OD ٦۰۰=۰/۹) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با دور ۲۰۰rpm کشت یافتند. در این مرحله به محیط کشت مادهٔ IPTG (غلظت نهایی ۱mM) افزوده گردید و باکتریها به مدت یک شب جهت بیان پروتئین درون شیکر انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. پس از القای بیان پروتئین، سلولهای باکتریایی توسط میکروسکوپ اپی فلورسنت (Zeiss, Germany) با فیلترهای مربوط به رنگ FITC (Fluorescein isothiocyanate) و با درشت نمایی ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ مشاهده گردیده و از آنها تصویر برداری شد.

جهت بررسی فعالیت پروتئین نوترکیب تولید شده، پروتئینهای موجود در فضاهای مختلف سلولی باکتری بر اساس پروتکولهای موجود (۱۹) استخراج گردید. بدین منظور سلولها در دمای ٤ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰rpm رسوب داده شدند. جهت تغلیظ پروتئینهای موجود در محیط کشت باکتری، با استفاده از تکنیک اولترافیلتراسیون با استفاده از فیلترهای Amicon® Ultra-15 با Cut-off برابر با ۱۰kDa (Millipore, USA)، محیط کشت ۲۰ برابر تغلیظ گردید. همچنین سلولهای ته نشین شده درون بافر TES سرد (mM Tris-HCl ۵۰، ۲mM EDTA و ۲۰Sucrose درصد) با حجمی معادل ۵ درصد حجم اولیه محیط کشت باکتریایی، سوسپانسیون شده و به مدت ۱ ساعت بر روی یخ

www.SID.ir

Archive of SID

نگهداری گردیدند. سپس سلولها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای٤ درجه سانتی گراد و با ٦۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. رونشین که حاوی پروتئینهای پریپلاسمیک بود، به آرامی با کمک پیپت به یک لولهٔ استریل منتقل گردید. سپس به مادهٔ ته نشین شده به میزان یک پنجم حجم اولیهٔ محیط کشت، از بافر استخراج (mM ۵۰Tris-HCl، ۲mM EDTA) افزوده گردید و با انجام سونیکاسیون در دمای ٤ درجه سانتی گراد با ۵ شوک ۱۵ ثانیه ای که بین هر کدام ۳۰ ثانیه وقفه بود سلولهای باکتریایی متلاشی شدند. سوسپانسیون به دست آمده به مدت ۱۵ دقیقه با ١٦۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی گراد، سانتریفیوژ گردیده و مایع رویی که حاوی پروتئینهای محلول سیتوپلاسمیک بود به آرامی به یک لولهٔ استریل منتقل شد.

جهت آزمون الایزا کف چاهکها با افزودن ۱۰۰µl از محلول آنتی ژن (۱۰۰µg/ml BSA در بافر PBS) پوشانیده شد. در مورد کنترل منفی آنتی ژن، ۱۰۰µl از محلول ۱۰۰µg/ml لایزوزیم در بافر PBS استفاده گردید. سپس با استفاده از مخلوط MPBS (بافرPBS حاوی ۱ درصد (Dried skimmed milk (Maravel عمل مسدود کردن صورت گرفت. در ادامه ۱۰۰µl از عصاره های پروتئینی حاصل از بخشهای مختلف سلول *E.coli* (سیتوپلاسم، پریپلاسم و محیط کشت) که نسبت به حجم اولیهٔ محیط کشت، به حجم یکسان رسانیده شده بودند به چاهک ها اضافه گردید. همچنین از scFv ضد BSA که به همراه کتابخانه های فاژی آنتی بادی Tomlinson I and J ارسال گردیده بود به عنوان کنترل مثبت و از آنتی بادی scFv-C9 (۷) به عنوان کنترل منفی استفاده شد. سپس به هر چاهک به میزان ۱۰۰µl از آنتی بادی Anti-c-myc (Roche, Germany) که با نسبت ۱ به ۲۰۰۰ در بافر MPBS رقیق شده بود اضافه شد. پلیت به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفته و در ادامه به هر چاهک ۱۰۰µl از آنتی بادی ثانویهٔ anti-mouse IgG-HRP (Sigma, USA) که با نسبت ۱ به ۲۰۰۰ در بافر MPBS رقیق شده بود اضافه گردید. در نهایت به چاهکها ۱۰۰µl از محلول تازه تهیه شدهٔ سوبسترا TMB (Sigma, USA) اضافه شده و پس از متوقف کردن واکنش، فعالیت آنزیمی با استفاده از دستگاه ELISA reader در طول موج ٤۵۰nm مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج

حذف جایگاه برش آنزیم *Nco*I از روی ژن *EGFP* و اضافه نمودن جایگاه آنزیمهای برشی به دو انتهای آن: به منظور افزودن جایگاه برش آنزیمهای *Not*I و *Bsp 120*I و توالی رمز کننده ٤ عدد اسیدآمینهٔ گلایسین (Gly_4) بـه انتهای ژن *EGFP* و حذف جایگاه برش آنزیم *Nco*I از روی آن، ابتدا شرایط بهینه جهت تکثیر قطعات α و β طی چندین مرحله به دست آمد (تا در حداقل تعداد سیکلهای ممکن حداکثر میزان DNA با حداقل خطای همانندسازی ساخته شود). اسید آمینه های گلایسین جهت ایجاد فاصله و انعطاف پذیری بین دو مولکول GFP و آنتی بادی نوترکیب در نظر گرفته شدند. قطعات تکثیر شده در تصویر ۲ نمایش داده شده اند. ستـون ۲ در این تصویـر، نشان دهندهٔ ژن *EGFP* تکثیر شـده قبـل از انجـام جهش زایی هدفمند (Site directed mutation) و ستون ٦ ژن کامـل *EGFP* تکثیر شده به کمک روش SOE می باشد.

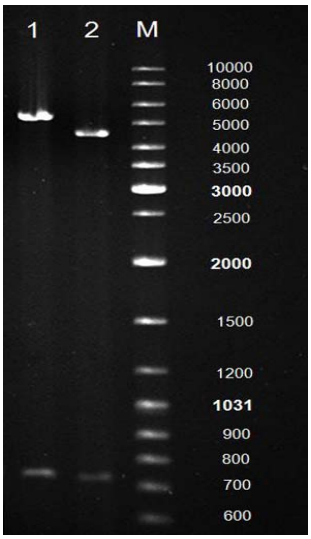
بررسی توالی وکتور نوترکیب:

الف- بررسی جهت قرار گیری ژن *EGFP* درون وکتور جدید: پس از مرحله کلون کردن ژن *EGFP* به درون وکتور pIT2 و انتقال آن به سلول *E. coli*، تعداد حدود ۵۰ کلنی بر روی محیط کشت رشد یافتند. در بیـن کلنیهـای مشاهده شـده احتمالاً تـعدادی در نتیجهٔ اتصال دو انتهای وکتور به یکدیگر (Self ligation) حاصل آمده بودند.

www.SID.ir

Archive of SID

همچنین در مورد کلونیهایی که قطعه مورد نظر را دریافت کرده بودند، ممکن بود که ژن *EGFP* در جهت درست و یا در جهت عکس درون وکتور قرار گرفته باشد. بنابراین با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمراز و با کمک آغازگرهای اختصاصی *EGFP* (P1 و P2)، کلنیهای حاصل از ترانسفورماسیون مورد ارزیابی قرار گرفتند. در مرحلهٔ بعد به منظور پی بردن به جهت قرار گیری ژن *EGFP* درون وکتورها، مجدداً با استفاده از تکنیک Colony-PCR و با بهره گیری از آغازگرهای P2 و pelB، کلنیهای مثبت شناسایی شده در مرحلهٔ قبل مورد ارزیابی قرار گرفتند. در صورت قرارگیری ژن *EGFP* به صورت صحیح درون وکتور، تکثیر قطعه ای با طول ۱۵۳۲bp مورد انتظار بود و در صورت قرار گرفتن ژن *EGFP* به صورت معکوس درون وکتور، به علت اینکه هر دو آغازگر به صورت Forward در آمده بودند هیچ قطعه ای قابل تکثیر نبود (تصویر ۱ بخش D). در نهایت ٤ کلنی (با شماره های ۱، ۵، ۲۳ و ۲۹) با این روش شناسایی شدند.



تصویر ۳- برش وکتور جدید و pIT2 با استفاده از آنزیمهای برشی. وکتورهای مورد مشاهده با آنزیم های *Not*I و *Nco*I برش خورده اند. ستون ۱ وکتور شمارهٔ ۲۹، ستون ۲ وکتور pIT2 (کنترل) و ستون M حاوی مارکر GeneRuler^{TM} DNA Ladder mix می باشد. محل قطعهٔ scFv های جدا شده از وکتورهای جدید و وکتور pIT2 در قسمت انتهائی ژل (~۷۲۰bp) مشخص می باشد.

ب- هضم وکتورهای جدید با آنزیمهای برشی: در مرحلهٔ بعد به منظور ارزیابی اندازه وکتورهای نوترکیب و مقایسهٔ آنها با وکتور اولیهٔ pIT2 و همچنین جهت بررسی بلوکه شدن جایگاه *Not*I در انتهای ژن *EGFP*، این وکتورها با استفاده از آنزیمهای *Not*I و *Nco*I برش یافتند. الگوی برش وکتور pIT2 و وکتور ۲۹ پس از هضم آنزیمی در تصویر ۳ نشان داده شده است که بیانگر اضافه شدن ژن *EGFP* به این وکتور و همچنین حذف جایگاه برش آنزیمی *Nco*I از روی ژن *EGFP* می باشد.

ج- بررسی وکتورهای جدید توسط توالی یابی DNA: با استفاده از توالی یابی DNA، پلاسمیدهای چند کلون ارزیابی شدند. این عمل به منظور بررسی مکانهای ژنی دستکاری شده بر روی وکتور جدید و همچنین اطمینان از عدم پدید آمدن جهشهای ناخواسته در قسمتهای ذکر شده انجام گردید. پس از بررسی توالیهای به دست آمده، مشخص گردید که وکتور شمارهٔ ۲۹ دارای تمامی موارد مورد نظر است و از هر نظر توالی آن مطابق با طراحیهای صورت گرفته می باشد و همچنین مکان برش آنزیم *Nco*I نیز با موفقیت از روی ژن *EGFP* حذف گردیده است (تصویر شمارهٔ ۱ بخش C). پس از اطمینان از اینکه این وکتور کاملاً مطابق موارد پیش بینی شده بود، تحت عنوان pGK-29 نامگذاری گردید.

آنالیز پروتئین نوترکیب تولید شده توسط وکتور pGK-29:

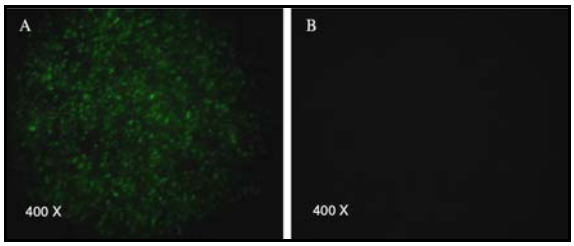
الف- بررسی فعالیت فلورسنتی پروتئین شیمریک: بیان آنتی بادی فلورسنت نوترکیب توسط وکتور جدید بوسیله میکروسکوپ اپی فلورسنت مورد بررسی قرار گرفت (تصویر شمارهٔ ٤). همانطور که در تصویر مشاهده می شود بیان و تجمع پروتئین نوترکیب در سلولهای حاوی وکتور pGK-29 به اندازه ای می باشد که این سلولها به طور کامل به صورت فلورسنت مشاهده می گردند (تصویر A) و این در حالی بود که سلولهای حاوی وکتور pIT2 در این طول

www.SID.ir

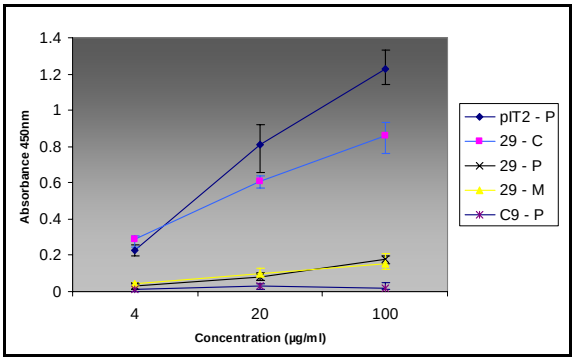
Archive of SID

موجها، هیچ نور فلورسنت قابل مشاهده ای از خود نشان ندادند (تصویر B).

ب- ارزیابی تمایل جذبی پروتئین شیمریک نسبت به آنتی ژن : نتایج به دست آمده از آزمون ELISA در تصویر ۵ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می گردد محلول پروتئینی به دست آمده از سیتوپلاسم سلولهای دارای وکتور نوترکیب، میزان زیادی از تمایل به آنتی ژن را نمایش می دهد و پروتئین تولید شده نسبت به آنتی ژن غیر اختصاصی (لایزوزیم) واکنشی نداده است.



تصویر ٤- نتایج حاصل از مشاهدهٔ سلولهای *E. coli* توسط میکروسکوپ اپی فلورسنت. تصویر A مربوط به سلولهای حامل وکتور pGK-29 و تصویر B مربوط به سلولهای حامل وکتور pIT2 می باشد. سلولها توسط میکروسکوپ اپی فلورسنت با فیلترهای متعلق به رنگ FITC مشاهده شده اند.



تصویر ۵- بررسی پروتئینهای استخراج شده از قسمتهای مختلف سلول *E. coli* با استفاده از آزمون pIT2-P ELISA ، پروتئینهای پریپلاسمیک کلونی BSA (کنترل مثبت) ; 29-C، پروتئینهای سیتوپلاسیمک کلونی ۲۹; 29-P، پروتئینهای پریپلاسمیک کلونی ۲۹; 29-M پروتئینهای موجود در محیط کشت کلونی ۲۹ و C9-P، پروتئینهای پریپلاسمیک کلونی C9 (۷) می باشند.

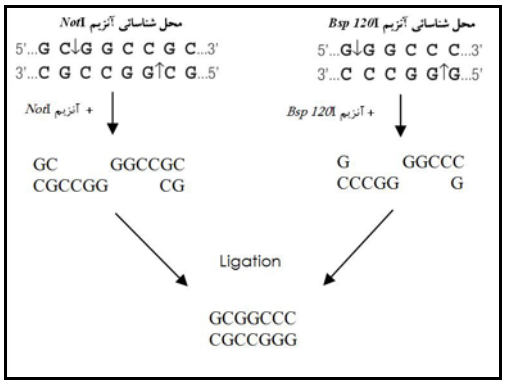
بحث

یکی از موارد متعدد کاربرد آنتی بادیها، نشان دار کردن آنها با مولکولهای مختلف از جمله آنزیم پروکسیداز، آنزیم آلکالین فسفاتاز، طلا و غیره بـه منظور ردیابی و بررسی بافتهـا، سلولها و یـا اجـزاء یک سلول می باشـد. از جمله مـوادی که جهـت نشانـدار کـردن آنتی بادیها به کار می روند مواد فلورسنت می باشند، در نتیجه آنتی بادیهایی تولید گردیده که علاوه بر قدرت شناسایی آنتی ژن، فلورسنت نیز هستند. از روشهای جدید تولید آنتی بادیهای فلورسنت، استفاده از روشهای بیوتکنولوژیک می باشد. در طـی چند سال گذشته در چندین تحقیـق جداگانه، تلاشهائی به منظور سـاخت آنتی بـادیهای فلورسنت نوترکیب انجـام گردیده است. در این تحقیقات ژن *GFP* و یا *EGFP* به صورت ژنتیکی به آنتی بادیهای نوترکیب متصـل شـده و سـاختـار حاصلـه درون سلـول میزبان بیـان گردیده است. Schwalbach و همکاران در سال ۲۰۰۰ واریـانتهای مختلفی از ژن *GFP* را در کنـار ژن scFv قرار دادند و نحوهٔ بیان و فعـالیت ایـن پروتئینها را در قسمتهـای مختلف سلولـی بررسی کردند. آنها توانستنـد آنتی بـادی فلورسنت نوترکیب فعال را در قسمت سیتوپلاسم سلولی بیان کرده و در نهایت از آن به صورت موفقیت آمیزی در ردیابـی آنتـی ژن مـورد نـظر بـا استفـاده از روشهای ایمونـوفلـورسنت استفـاده نمـاینـد (۲۰). در تحقیقی دیگر Casey و همکاران توانستند با اتصال ژن *EGFP* به انتهای ′۳ و یا ′۵ ژن مربوط به scFv، آنتی بادی فلورسنت فعالی را در نواحی مختلف سلولی تولید نمایند و از این آنتی بادی فلورسنت نوترکیب تولید شده در ردیابی آنتی ژن سطحی هپاتیت B بهره گیرند (۳). Oelschlaeger و همکاران پس از ساخت آنتی بادی فلورسنت نوترکیب از آن در تکنیکی تحت عنوان FLISA استفاده نمودند (۱۵).

www.SID.ir

Archive of SID

جهت ساخت وکتور تولید کنندهٔ آنتی بادیهای فلورسنت نوترکیب طراحی های لازم جهت دستکاری وکتور pIT2 انجام گردیدند. قرار دادن ژن *EGFP* در ابتدای ژن مربوط به scFv، در محل مربوط به آنزیمهای *Nco*I و *Sfi*I، در هر صورت منجر به ایجاد تغییر و اختلال در توالی سیگنال pelB می گردید. لذا تنها گزینهٔ مناسب، قرار دادن این ژن در محل برش آنزیم *Not*I در قسمت ′۳ ژن مربوط به آنتی بادی نوترکیب بود (تصویر ۱ بخش A). بنابراین با قرار دادن ژن *EGFP* درون این جایگاه و بلوکه کردن توالی آنزیم *Not*I در قسمت ′۳ ژن *EGFP* به اهداف مورد نظر دست یافته می شد. این عمل باعث می گردید که بتوان در آینده به راحتی ژن مربوط به آنتی بادی را با ژن سایر آنتی بادیهای نوترکیب جایگزین نمود. همانطور که در تصویر شمارهٔ ٦ مشاهده می گردد این توالی جدید در قسمت ′۳ ژن *EGFP* پالیندرومیک نبوده و قابل شناسایی توسط آنزیم *Not*I نمی باشد. بنابراین قسمت ′۵ ژن *EGFP* که با آنزیم *Not*I برش خورده به وکتور متصل شده و در مراحل بعدی قابل برش خواهد بود (تصویر شمارهٔ ۱، بخش C).



تصویر ٦- نحوهٔ بلوکه شدن جایگاه برش آنزیم *Not*I . آنزیمهای برشی*Not*I و *Bsp 120*I توالی های متفاوتی را برش می دهند. انتهای چسبندهٔ ایجاد شده پس از برش دو آنزیم، کاملاً مشابه و مکمل یکدیگر می باشند، ولی پس از اتصال دو انتهای چسبندهٔ به یکدیگر، مکان ایجاد شده مورد شناسایی و برش هیچ کدام از دو آنزیم قرار نمی گیرد.

همچنین آشکار گردید که جایگاه برش آنزیم *Nco*I بر روی ژن *EGFP* وجود دارد. حضور این جایگاه تمامی طراحیهای فوق را که به منظور ادغام ژن *EGFP* درون وکتور pIT2 و قابلیت تعویض ژن آنتی بادی بود را (به دلیل برش خوردن *EGFP* در هنگام تعویض ژن مربوط به scFv) با مشکل جدی مواجه می کرد. لذا جایگاه برش آنزیم *Nco*I با استفاده از روش جهش زایی هدفمند از روی ژن *EGFP* حذف گردید. از آنجایی که توالی هدف آنزیم *Nco*I، CCATGG بوده و این توالی به ترتیب در بردارندهٔ رمز مربوط به اسیدآمینه های پرولین (CCA) و تریپتوفان (TGG) می باشد، بنابراین رمز CCA به رمز CCT تغییر داده شد.

طی چندین مرحله فعالیت وکتور جدید بررسی شد. ابتدا از فلورسنت بودن پروتئین نوترکیب با مشاهده سلولهای باکتری حامل ژن توسط میکروسکوپ فلورسنت اطمینان حاصل گردید. در مرحلهٔ بعد به منظور بررسی مکان فیزیکی حضور آنتی بادیهای فلورسنت نوترکیب درون سلول *E. coli* و همچنین ارزیابی نسبی تمایل جذبی آنتی بادیهای فورسنت تولید شده، پروتئینهای موجود در قسمتهای مختلف سلول (سیتوپلاسم، پریپلاسم و فضای خارج سلولی) با استفاده از آزمون ELISA مورد بررسی قرار گرفتند. با استفاده از این روش تنها مولکولهای نوترکیبی قابل شناسایی بودند که در یک انتهای آنها آنتی بادی بوده و در انتهای دیگر پپتید c-myc tag حضور داشته باشد. اطلاعات به دست آمده از آزمون ELISA و نتایج حاصل از بررسی فلورسنت سلولها بیانگر این نکته بودند که هم بخش متعلق به آنتی بادی و هم بخش متعلق به پروتئین فلورسنت، در این مولکول شیمریک دارای فعالیت قابل قبولی می باشد. همانطور که در تصویر شمارهٔ ۵ ملاحظه می گردد تمایل جذبی آنتی بادی فلورسنت نوترکیب تولید شده (scFv-EGFP) تفاوت چندانی با تمایل جذبی آنتی بادی نوترکیب (scFv) ندارد که این

www.SID.ir

Archive of SID

یافته با نتایج Casey و همکاران نیز همخوانی دارد (۳). تفاوت مشاهده شده در نتایج آزمون ELISA مربوط به قسمتهای مختلف سلولی، احتمالاً به واسطهٔ تفاوت در میزان حضور آنتی بادیهای فلورسنت نوترکیب موجود در این نواحی می باشد. لذا می توان نتیجه گرفت که میزان آنتی بادیهای فلورسنت نوترکیب که قادر به شناسایی آنتی ژن باشند درون سیتوپلاسم سلولی به مراتب بالاتر از ناحیهٔ پریپلاسم و محیط کشت می باشد که این نتایج با یافته های قبلی مشابهت دارد و احتمالاً به دلیل ساختار مولکولی پروتئین شیمریک جدید می باشد (۳ و ۲۰).

بنابراین نتایج حاصل از مراحل مختلف این تحقیق منجر به ساخت وکتوری شده است که می تواند به صورت اختصاصی جهت تولید آنتی بادیهای فلورسنت نوترکیب مورد استفاده قرار گیرد. از مزایای این وکتور جدید این است که این وکتور به شکل کاملاً اختصاصی جهت بیان و تولید انواع مختلف این نوع آنتی بادیها قابل استفاده بوده و همچنین وجود توالیهای مربوط به دو Tag در انتهای پروتئین شیمریک که عبارتند از c-myc و His-tag، می توانند عوامل مناسبی جهت ردیابی و همچنین خالص سازی این پروتئین نوترکیب باشند.

منابع

1- Aoki T., Takahashi Y., Koch K.S., Leffert H.L. and H. Watabe, (1996) Construction of a fusion protein between protein A and green fluorescent protein and its application to Western blotting. FEBS Letters; 384: 193-197.

2- Arai R., Ueda H. and T. Nagamune, (1998) Construction of chimeric proteins between protein G and fluorescence-enhanced green fluorescent protein, and their application to immunoassays. Journal of Fermentation and Bioengineering; 86: 440–445.

3- Casey J.L., Coley A.M., Tilley L.M. and M. Foley, (2000) Green fluorescent antibodies: novel *in vitro* tools. Protein Engineering; 13: 445-452.

4- Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W. and D.C. Prasher, (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science; 263: 802–805.

5- Cline J., Braman J.C. and H.H. Hogrefe, (1996) PCR fidelity of *Pfu* DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. Nucleic Acids Research; 24: 3546–3551.

6- Cohen S.N., Chang A.C.Y. and L. Hsu, (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-Factor DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America; 69 (8): 2110-2114.

7- Golchin, M. and R. Aitken (2008) Isolation by phage display of recombinant antibodies able to block adherence of *Escherichia coli* mediated by the K99 colonisation factor. Vet Immunol Immunopathol. ;121: 321-331

8- Güssow D. and T. Clackson, (1989) Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase chain reaction. Nucleic Acids Research; 17: 4000.

9- Harper K., Kerschbaumer R.J., Ziegler A., Macintosh S.M., Cowan G.H., Himmler G., Mayo M.A., and L. Torrance, (1997) A scFv-alkaline phosphatase fusion protein which detects potato leafroll luteovirus in plant extracts by ELISA. Journal of Virological Methods; 63: 237-242.

10- Ho S.N., Hunt H.D., Horton R.M, Pullen J.K. and L.R. Peace, (1989) Site directed mutagenesis by overlap extention using the polymerase chain reaction. Gene; 77 (1): 51-59.

11- Hudson P.J. and C. Souriau, (2003) Engineered antibodies. Nature Medicine; 9 (1): 129-134.

12- Inouye S. and F.I. Tsuji, (1994) Aequorea green fluorescent protein expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. FEBS Letters; 341: 277–280.

13- Kontermann R. and Dubel S., (2001) Antibody engineering. Springer, Germany.

14- McCafferty J., Griffiths A.D. and G. Winter, (1990) Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. Nature; 348: 552–4.

www.SID.ir

Archive of SID

15- Oelschlaeger P., Srikant-Iyer S., Lange S., Schmitt J. and R.D. Schmid, (2002) Fluorophor linked immunosorbent assay: a time and cost saving method for the characterization of antibody fragments using a fusion protein of a single-chain antibody fragment and enhanced green fluorescent protein. Analytical Biochemistry; 309: 27–34.

16- Peschen D., He-Ping Li, Fischer R., Kreuzaler F. and Y. Liao, (2004) Fusion proteins comprising a *Fusarium*-specific antibody linked to antifungal peptides protect plants against a fungal pathogen. Nature Biotechnology; 22: 732-738.

17- Prasher D.C., Eckenrode V.K., Ward W.W., Prendergast F.G. and M.J. Cormier, (1992) Primary structure of the *Aequaria victoria* green fluorescent protein. Gene; 111: 229–233.

18- Roque A.C., Lowe C.R. and M.A Taip., (2004) Antibodies and genetically engineered related molecules: production and purification. Biotechnology Progress; 20: 639-654.

19- Sambrook J. and D.W. Russel, (2001) Molecular cloning: A laboratory manual (third edition), Cold Spring Habor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

20- Schwalbach G., Sibler A.P., Choulier L., Deryckere F. and E. Weiss, (2000) Production of fluorescent single-chain antibody fragments in *Escherichia coli*. Protein Expression and Purification; 18: 121– 132.

21- Shimomura O., Johnson F.H. and Y. Saiga, (1962) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from luminous hydromedusan, *Aequorea*. Journal of Cellular and Comparative Physiology; 59: 223–39.

22- Tsien R.Y. (1998) The green fluorescent protein. Annual Review of Biochemistry; 67: 509–544.

23- Verma R., Boleti E. and A.T. George, (1998) Antibody engineering: Comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems. Journal of Immunological Methods; 216: 165-181.

24- Zimmermann S., Schillberg S., Liao Yu-Cai and R. Fisher, (1998) Intracellular expression of TMV-specific single-chain Fv fragments leads to improved virus resistance in *Nicotiana tabacum*. Molecular Breeding; 4: 369–379.

www.SID.ir

Archive of SID

Construction of an expression vector for production of recombinant fluorescent antibodies

Khalili Yazdi A.A.[1] and Golchin M.[2]

[1] Biotechnology Dept, International Center for Science& high Technology and Environmental Science, Kerman, I.R. of IRAN

[2] Immunology Dept, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University, Kerman, I.R. of IRAN

Abstract

Green fluorescent protein can be joined to recombinant antibodies to produce recombinant fluorescent antibodies. Recombinant fluorescent antibodies are functional in different assays in which fluorescent antibodies are traditionally used. Their intrinsic fluorescent renders them directly applicable in many fluorescent-based assays currently used in a wide range of life science. The aim of this study was to manipulate a phagmid antibody vector to produce recombinant fluorescent antibodies by cloning the *EGFP* gene. With this aim the sequence of a linker peptide and two restriction enzyme sites were added to the *EGFP* gene and the *Nco*I restriction site in this gene was removed by means of site-specific mutagenesis. The modified gene was then cloned into pIT2 vector which was subsequently transformed into *Escherichia coli*. After confirming the sequencing results, this new vector was called pGK-29. Finally, the activities of the recombinant vector were tested by fluorescent microscopy and ELISA experiments. The results revealed that the produced chimeric protein has fluorescent activity and is able to recognize its corresponding antigen.

Keywords: Recombinant antibodies, GFP, Recombinant fluorescent antibodies.

www.SID.ir