

همسانه‌سازی و بیان scFv از یک آنتی‌بادی منوکلونال ضد پلاسمینوژن انسانی

محمد رضا قرائتی^۱، منوچهر میرشاهی^{۱*}، حجت‌اله ربانی^۲، محبوبه سیفی ابوالحسن^۱، مهرداد بهمنش^۳ و فرشته شمسی پور^۲

^۱ تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه بیوشیمی

^۲ تهران، پژوهشگاه فناوریهای نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی- ابن‌سینا، پژوهشکده آنتی‌بادیهای منوکلونال، بخش مهندسی آنتی‌ژن-آنتی‌بادی

^۳ تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه ژنتیک

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۱/۶ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۱/۱۲

چکیده

رگزایی فرآیند ایجاد رگهای جدید از رگهای موجود است. رگهای جدید نیازهای متابولیک سلولها را تأمین می‌نمایند. رگزایی در بسیاری از پدیده‌های فیزیولوژیک و پاتولوژیک اهمیت فراوانی دارد. طی فرآیند رگزایی پروتئین‌ها به ویژه پلاسمین، ماتریکس خارج سلولی را تخریب می‌کند و سبب فعال شدن و آزاد سازی فاکتورهای رشد موجود در آن می‌شود. این فرایندها با فعال شدن موضعی پلاسمینوژن در سطح سلولها انجام می‌شوند. بررسیهای پیشین در ارتباط با همین تحقیق نشانگر توانایی یک آنتی‌بادی منوکلونال ضد پلاسمینوژن در مهار فرآیند رگزایی در یک مدل رگزایی می‌باشد. به دلیل اهمیت این آنتی‌بادی، scFv آن همسانه‌سازی شد و در *Escherichia coli* بیان گردید. نتایج حاصل از SDS-PAGE و ایمونوبلاتینگ و آزمون ELISA نشانگر صحت تولید scFv و قابلیت اتصال آن به پلاسمینوژن می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آنتی پلاسمینوژن، scFv، رگزایی، مهندسی آنتی‌بادی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۳۲۷۴۰۶۵ پست الکترونیکی: mirshahi_mc@yahoo.com

مقدمه

رگزایی فرآیندی است که طی آن از رگهای موجود، رگهای جدید به وجود می‌آیند. رگهای جدید نیاز سلولها را به اکسیژن، مواد غذایی و دفع مواد زائد تأمین می‌نمایند. اختلال در رگزایی در بسیاری از بیماریها نقش دارد که شناخته شده‌ترین آنها سرطان و ناهنجاریهای چشمی است که در این بیماریها رگزایی به صورت پاتولوژیک فعال می‌شود (۳، ۶، ۷).

در نخستین مراحل رگزایی سامانه پلاسمینوژن نقش عمده‌ای دارد. اجزای این سامانه شامل یک پیش‌آنزیم غیر فعال به نام پلاسمینوژن است که توسط فعال‌کننده‌های پلاسمینوژن، شامل فعال‌کننده بافتی پلاسمینوژن (Tissue

type plasminogen activator) یا tPA و فعال‌کننده ارادری پلاسمینوژن (Urinary type plasminogen activator) یا uPA یا اورکیناز (Urokinase) به فرم فعال یعنی پلاسمین تبدیل می‌شود. با فعال شدن پلاسمینوژن و تولید پلاسمین در سطح سلول، پدیده‌ای به نام فیبرینولیز پیرامون سلولی (Pericellular fibrinolysis) ایجاد می‌شود (۸). فرآیندهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک بسیاری مانند تخمک‌گذاری، جنین‌زایی، رگزایی و تومور زایی وابسته به این پدیده هستند. پلاسمینی که طی فرآیند فوق در سطح سلول تولید می‌شود علاوه بر هضم برخی از پروتئینهای ماتریکس خارج سلولی (۸)، بسیاری از ماتریکس

دامنه گسترده‌ای از کاربردهای تشخیصی و درمانی داشته باشند. scFv در مقایسه با آنتی‌بادی دست‌نخورده توانایی بیشتری برای وارد شدن به بافتهای متراکم مانند تومورها دارد (۲۰). در پژوهش حاضر scFv آنتی‌بادی MC2B8 ساخته شد و فعالیت ایمونولوژیک آن بررسی گردید.

مواد و روشها

استخراج RNA: سلولهای MC2B8، در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گوساله به همراه آنتی‌بیوتیک جنتامایسین به میزان $80 \mu\text{g/ml}$ در انکوباتور کشت سلول دارای ۵ درصد دی‌اکسید کربن در شرایط رطوبت اشباع و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. پس از رشد سلولها با استفاده از محلول RNX-Plus (سینازن، ایران) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده RNA سلولهای هیبریدوما استخراج شد. غلظت RNA استخراج شده با استفاده از تکنیک طیف‌سنجی تعیین شد.

ساخت cDNA: ساخت cDNA با استفاده از RNA استخراج شده و بر اساس دستورالعملهای استاندارد انجام گرفت (۱۶). کیفیت cDNA ساخته شده به وسیله تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با تکثیر ژن GAPDH با استفاده از پرایمرهای mGA5-1 و mGA3-1 بررسی شد (جدول ۱) (۹). تکثیر این ژن نشان‌دهنده صحت cDNA تولید شده می‌باشد.

طراحی پرایمرها: پرایمرهای ویژه تکثیر ژن بر اساس ترادفهای نواحی نسبتاً ثابت از بخش متغیر زنجیره‌های سبک و سنگین آنتی‌بادی با استفاده از سیستم بین‌المللی اطلاعات ایمونوژنتیکی یا IMGT طراحی شد (www.imgt.org). پرایمرهای KpnI-muIg-kV-S و XbaI-muIg-kJ-AS برای تکثیر زنجیره‌های سبک و پرایمرهای XhoI-muIgVh-S و EcoRV muIg JH AS برای تکثیر زنجیره سنگین طراحی گردید. به دلیل تنوع در ترادف آنتی‌بادیها، پرایمرها به صورت دژنره طراحی

متالوپروتئینازها را نیز فعال می‌سازد که موجب تخریب ماتریکس خارج سلولی می‌گردند (۲، ۴، ۱۰). برای انجام فیبرینولیز پیرامون سلولی، گیرنده‌های سطح سلولی پلاسمینوژن و uPA نقش مهمی دارند. حضور uPA در سطح سلول سبب آغاز آبشاری پروتئولیتیک می‌گردد به طوری‌که پلاسمین ایجاد شده به نوبه خود pro-uPA غیر فعال موجود در سطح سلول را به uPA فعال تبدیل می‌کند. این آبشار، پروتئولیز پیرامون سلولی را افزایش می‌دهد و با تخریب ماتریکس خارج سلولی، فعال سازی و آزاد سازی سیتوکین‌ها و فاکتورهای رشد مختلف زمینه را برای آغاز فرآیندهایی همچون رگزایی، مهاجم، متاستاز، مهاجرت سلولی، ترمیم بافت برای مهاجرت سلولها را فراهم می‌آورد. مطالعات انجام شده نشانگر آن است که کاهش تولید uPA و uPAR با استفاده از فن آوری آنتی‌سنس اثرات ضد توموری دارد (۱۳، ۱۴، ۱۹). علاوه بر این برخی از مهارکننده‌های uPA علاوه بر فعالیت ضد متاستازی دارای فعالیت ضد رگزایی نیز می‌باشند (۱۸). بنابراین uPA یک نامزد بالقوه برای طراحی مواد شیمی‌درمانی به عنوان بخشی از درمان ترکیبی به شمار می‌رود.

آزمایشهای پیشین در آزمایشگاه نشان می‌دهد که یک آنتی‌بادی مونوکلونال ضد پلاسمینوژن به نام MC2B8 با اتصال به آن فرآیند رگزایی را در مدل رگزایی *in vitro* مهار می‌کند (۱۱). بنابراین آنتی‌بادی مذکور می‌تواند به عنوان مهار کننده بالقوه رگزایی عمل کند. این آنتی‌بادی به دلیل تولید در بدن موش در بدن انسان ایمونوژن می‌باشد و کاربرد آنها در بدن انسان منوط به رفع ایمنی‌زایی آنهاست. این عمل با مهندسی آنها، در جهت انسانی‌سازی آنتی‌بادی مذکور قابل انجام است. در بسیاری از موارد جهت انسانی کردن یک آنتی‌بادی نخستین مرحله ساخت قطعه متغیر تک زنجیره‌ای یا scFv از آن می‌باشد. scFvها متداول‌ترین شکل استفاده از قطعات آنتی‌بادیها می‌باشند که به دلیل اندازه کوچک و حفظ ویژگی اتصال به آنتی‌ژن، می‌توانند

شدند(جدول ۱).

جدول ۱- ترادف پرایمرهای به کار گرفته شده در این پژوهش

| ترادف | نام پرایمر |
|--|-------------------------|
| 5'-TGGTATTCAAGAGAGTAGGGA-3' | mGA3-1 |
| 5'-CTGCCATTTGCAGTGGCAAAG-3' | mGA5-1 |
| 5'-GGTACCGCCACCATGGAHRTTSWGNISACYCAGWCT-3' | <i>Kpn</i> I-muIg-κV-S |
| 5'-TCTAGATTTBAKYTCCARYYTKGT-3' | <i>Xba</i> I-muIg-κJ-AS |
| 5'-CTCGAGGAGTSMARCTGCAGSAGTCWGG-3' | <i>Xho</i> I-muIgVh-S |
| 5'-GATATCCTATGMRGAGACDGTGASHRDRGT-3' | <i>EcoRV</i> muIg JH AS |

همسانه‌سازی (Cloning) ناحیه متغیر زنجیره های سبک و سنگین در حامل pGEM-FT: قطعات ژنی مربوط به ناحیه متغیر زنجیره های سبک و سنگین که آنتی‌بادیها منوکلونال MC2B8 هر یک به طور جداگانه به وسیله آنزیم لیگاز در داخل حامل pGEM-FT که از حامل pGEM®-5Zf(+) مشتق شده است همسانه سازی شدند(۲۱). پس از همسانه‌سازی، پلاسمیدهای حامل زنجیره‌های سبک و سنگین به سلولهای مستعد باکتری *E. coli* سویه JM 109 منتقل شدند(۱۷). باکتریها پس از انتقال روی محیط کشت LB جامد حاوی آمپی‌سیلین رشد داده شد. آزمون Colony PCR برای اطمینان از ورود قطعات به پلاسمیدها روی کلونی‌ها انجام گرفت. به منظور تأیید همسانه‌سازی از دو پرایمر SP6 و T7 استفاده شد که بر روی حامل pGEM-FT دو سمت جایگاه برش چندگانه را در بر گرفته‌اند. ترادف این دو پرایمر و شرایط انجام PCR از دستورالعمل مربوط به حامل pGEM®-5Zf(+) استخراج شد. کلونیهای دارای قطعه ورودی کشت داده شده و سپس پلاسمید این کلونیها با استفاده از کیت استخراج پلاسمید تولید شده شرکت QIAGEN و مطابق دستورالعمل شرکت استخراج گردید و برای ترادف‌یابی ارسال شد.

ترادف‌یابی از دو سمت به وسیله پرایمرهای SP6 و T7 انجام شد. کروماتوگرامهای حاصل از ترادف‌یابی به وسیله نرم‌افزارهای تخصصی Finch TV v.1.4.0 و Sequencher 4.8 محصول شرکت Codes Gene و Gene Runner

تکثیر نواحی متغیر آنتی‌بادی MC2B8: برای تکثیر ناحیه متغیر زنجیره سبک آنتی‌بادی، پرایمرهای *Kpn*I-muIg-κV-S و *Xba*I-muIg-κJ-AS هر یک به میزان (۶ μl)، (MgCl₂)، (۶ μl)، (۱/۵ cDNA) به مقدار ۱ μl، مخلوط dNTP به میزان ۱/۵ μl، بافر DNA پلیمرز ۲/۵ μl، DNA پلیمرز به میزان ۰/۲ μl و ۱/۸ آب مقطر تزریقی با یکدیگر مخلوط شدند. برای انجام PCR واسرشتگی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه انجام شد. سپس ۳۷ سیکل مشکل از ۳۰ ثانیه واسرشتگی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، ۳۰ ثانیه دمای ۵۸ درجه سانتی گراد برای اتصال پرایمرها و ۴۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد طولیل شدن صورت گرفت و طولیل شدن نهایی ۱۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد انجام شد. به منظور تکثیر ناحیه متغیر زنجیره سنگین از پرایمرهای *Xho*I-muIgVh-S و *EcoRV*-muIgJH-AS و هر کدام به میزان ۶ μl استفاده شد و سایر ترکیبات مشابه با ترکیبات استفاده شده در PCR زنجیره سبک بود. دمای اتصال پرایمرها برای ناحیه متغیر زنجیره سنگین ۵۶ درجه سانتی گراد در نظر گرفته شد و سایر شرایط زمانی و دمایی مشابه شرایط تکثیر زنجیره سبک بود. برای بررسی تکثیر این قطعات از الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده شد. پس از انجام PCR ژن زنجیره سبک و سنگین به وسیله کیت استخراج از ژل محصول شرکت QIAGEN بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده، از ژل آگارز جدا شدند.

بیان پروتئین L6H3: برای بیان پروتئین از حامل بیانی pGEMT-L6-polyG- استفاده شد. پلاسمید pET-22b(+) H3 (به اختصار pGEMT-L6H3) دارای جایگاههای برش آنزیمهای محدودگر *NcoI* و *SalI* در دو سمت ژن L6H3 می باشد که از همین دو جایگاه استفاده شد و ژن L6H3 در حامل pET-22b(+) همسانه سازی شد (۱۷). پلاسمید pET22b(+)-L6H3 به باکتریهای مستعد *E. coli* سویه BL21-DE3 انتقال داده شد. این باکتری به همراه باکتری فاقد پلاسمید به عنوان کنترل منفی و باکتری کنترل مثبت به طور جداگانه در محیط LB مایع حاوی آمپی سیلین با غلظت ۱۰۰ µg/ml در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و RPM ۲۰۰ کشت داده شد. زمانی که OD_{600 nm} باکتریها حدود ۰/۸ - ۰/۶ رسید، IPTG به میزان ۱ mM در شرایط استریل به محتویات ارلن افزوده شد. پس از تأیید تولید پروتئین توسط SDS-PAGE، با کمک ایمونوبلاتینگ تمایل اتصال این پروتئین به آنتی بادی ضد آنتی بادی موشی بررسی شد (۵).

پس از تأیید تولید پروتئین L6H3-scFv، این باکتریها در حجم بیشتر کشت داده شدند و پس از ۳ ساعت القاء با IPTG به وسیله سانتریفیوژ از محیط کشت جدا شدند. به وسیله شوک اسمزی پروتئینهای پری پلاسمی جدا شدند (۱۲) و سپس با استفاده از الکتروفورز و فرایند خالص سازی از ژل پلی اکریل آمید به وسیله دستگاه Electroeluter (محصول شرکت BioRad) پروتئین مربوط به باند L6H3 از ژل پلی اکریل آمید جدا شد.

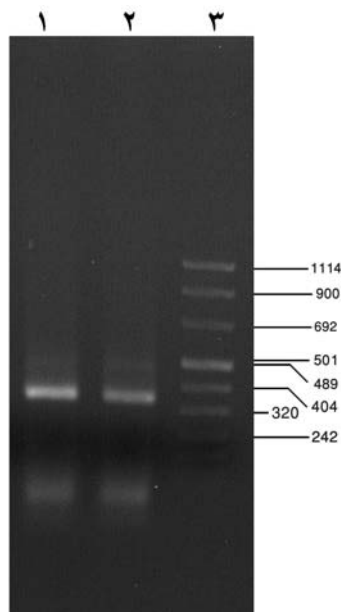
بررسی شناسایی پلاسمینوژن انسانی توسط ScFv با روش ELISA رقابتی: به منظور بررسی فعالیت ایمونولوژیک scFv تولید شده از آزمون ELISA رقابتی استفاده شد. برای این کار ابتدا پلیتهای ویژه ELISA، با ۱۰۰ µl پلاسمینوژن با غلظت ۲ µg/ml در بافر PBS حاوی Na₂HPO₄ 10mM، KCl 2.7mM، NaCl 140mM و

تجزیه و تحلیل شدند و با مکمل سازی ترادفها از هر دو سمت ترادف کلی به طور دقیق به دست آمد. در نهایت ترادف زنجیره سبک و سنگین با استفاده از پایگاه اطلاعاتی IMGT® از نظر تطابق با ترادفهای زنجیره سبک و سنگین آنتی بادی موشی مورد بررسی قرار گرفت.

وارد کردن قطعه ژنی ناحیه متغیر زنجیره سبک و سنگین در حامل pGEMT-polyG: پس از مشخص شدن کلونیهایی دارای قطعه صحیح، ابتدا به وسیله برش با آنزیمهای *XbaI* و *KpnI* ژن ناحیه متغیر زنجیره سبک تأیید شده از پلاسمید واجد آن جدا گردید. باند مربوطه پس از آشکار شدن از ژل استخراج شد. به منظور وارد کردن قطعه جدا شده در حامل pGEMT-polyG، این حامل نیز با آنزیمهای فوق برش داده شد. حامل بریده شده نیز از ژل استخراج گردید. سپس قطعه ژن زنجیره سبک (L6) با استفاده از واکنش لیگازی در حامل فوق قرار داده شد. پلاسمیدها به باکتریهای مستعد منتقل شدند و کلونیهایی مثبت برای مرحله بعدی جدا شدند.

ناحیه متغیر زنجیره سنگین با برش به وسیله آنزیمهای *XhoI* و *EcoRV* از پلاسمید دارای ترادف صحیح ژن ناحیه متغیر زنجیره سنگین (H3) جدا شد و باند مربوطه پس از آشکار شدن از ژل استخراج گردید. به منظور وارد کردن قطعه H3 در حامل pGEMT-L6-polyG، این حامل نیز با آنزیمهای *XhoI* و *EcoRV* بریده شد. حامل بریده شده نیز از ژل استخراج گردید. سپس قطعه H3 با استفاده از واکنش لیگازی در حامل pGEMT-L6-polyG قرار داده شد. برای شناسایی باکتریهای دارای پلاسمید pGEMT-L6-polyG-H3 آزمون Colony PCR با استفاده از پرایمرهای SP6 و T7 انجام شد. پس از جدا شدن کلونیهایی دارای پلاسمید pGEMT-L6-polyG-H3، از این باکتریها پلاسمید با روش Miniprep استخراج شد.

برای ناحیه‌های متغیر زنجیره های سبک و سنگین آنتی‌بادیها همخوانی دارد.



شکل ۱- تصویر الکتروفورزی تکثیر ناحیه متغیر ژن زنجیره سبک و سنگین آنتی‌بادی از cDNA حاصل از سلول هیبریدومای MC2B8. ۱- قطعه حاصل از تکثیر ناحیه متغیر ژن زنجیره سنگین، ۲- قطعه حاصل از تکثیر ناحیه متغیر ژن زنجیره سبک، و ۳- مارکر وزن مولکولی (مارکر VIII از شرکت Roche)

نتایج ترادف‌یابی نواحی متغیر آنتی‌بادی منوکلونال MC2B8: بخش مربوط به ناحیه متغیر زنجیره سبک و سنگین آنتی‌بادی در کروماتوگرامهای حاصل از ترادف‌یابی از دو سمت به وسیله پرایمرهای SP6 و T7 با استفاده از نرم‌افزار Sequencher 4.8 محصول شرکت Gene Codes و Gene Runner بررسی و تجزیه و تحلیل شدند. این ترادفها با استفاده از پایگاه اطلاعاتی IMGT و در مقایسه با ترادفهای شناخته شده مشابه بررسی شدند. نتایج نشان می‌دهد که ترادفها شباهت بالایی با زنجیره سبک (جدول ۲) و سنگین (جدول ۳) آنتی‌بادیهای موشی دارد و نوع زنجیره سبک K می‌باشد.

پوشش‌دهی شدند. پس از یافتن بهترین غلظت برای MC2B8 از این غلظت برای رقابت با مقادیر مختلف از پروتئین L6H3-scFv استفاده شد. بدین ترتیب که MC2B8 با غلظت ۲۰ ng/well با مقادیر صفر تا ۱۰۰ ng/ml از پروتئین L6H3-scFv مخلوط شد و بر روی چاهکهای پوشش داده شده با پلاسمینوزن ریخته شد. پس از یک ساعت چاهکها ۳ بار شستشو داده شدند. در ادامه آنتی‌بادی ضد ناحیه Fc آنتی‌بادی موش نشاندار شده با پراکسیداز به میزان ۱۰۰ μl به درون چاهکها ریخته شد. پس از یک ساعت مجاورت و پنج بار شستشو به وسیله بافر از محلول تترا متیل بنزیدین (TMB) به عنوان سوبسترای آنزیم پراکسیداز استفاده شد و در هر چاهک به میزان ۱۰۰ μl محلول TMB ریخته شد. پس از ۳ دقیقه واکنشها به وسیله اسید سولفوریک ۲۰ درصد متوقف شدند و جذب نمونه‌ها در ۴۵۰nm به وسیله دستگاه ELISA Reader قرائت گردید.

نتایج و بحث

استخراج RNA و ساخت cDNA: بررسی طیف‌سنجی نشان داد که RNA استخراج شده با دارا بودن نسبت جذب ۲۶۰ nm به ۲۸۰ nm برابر با ۱/۷۷ دارای خلوص مناسب می‌باشد (۱۵) در ادامه بررسی کیفیت RNA، الکتروفورز محصول PCR مربوط به تکثیر ژن GAPDH نشانگر صحت cDNA تهیه شده بود.

تکثیر ناحیه متغیر زنجیره های سبک و سنگین آنتی‌بادی منوکلونال MC2B8: ناحیه متغیر ژنهای زنجیره سبک و سنگین آنتی‌بادی منوکلونال MC2B8 به وسیله واکنش PCR تکثیر گردید و با استفاده از الکتروفورز در ژل آگارز این قطعات آشکار شدند. نتایج حاصل در شکل (۱) نمایش داده شده است. این نتایج نشان دهنده تکثیر قطعاتی با وزن حدود ۳۵۰ جفت باز می‌باشد که با وزن مورد انتظار

جدول ۲- نتایج به دست آمده از بررسی و مقایسه ناحیه متغیر زنجیره سبک آنتی‌بادیها MC2B8 از پایگاه اطلاعاتی IMGT

| | | | |
|-------------------|--|--------------|--------------------------------|
| Result summary: | Productive IGK rearranged sequence (no stop codon and in-frame junction) | | |
| V-GENE and allele | <u>Musmus IGKV3-10*01</u> | score = 1378 | identity = 97,25% (283/291 nt) |
| J-GENE and allele | <u>Musmus IGKJ1*01</u> | score = 172 | identity = 94,74% (36/38 nt) |

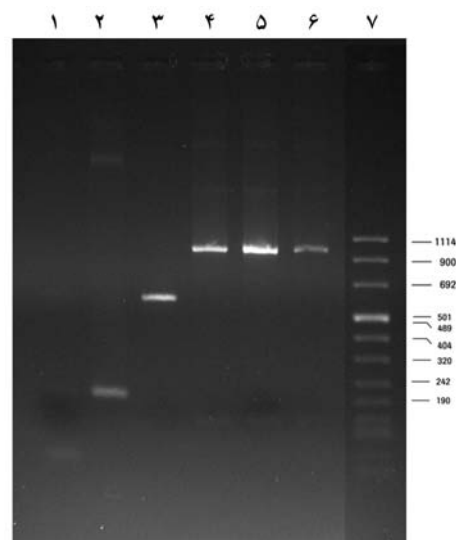
جدول ۳- نتایج به دست آمده از بررسی و مقایسه ناحیه متغیر زنجیره سنگین آنتی‌بادیها MC2B8 از پایگاه اطلاعاتی IMGT

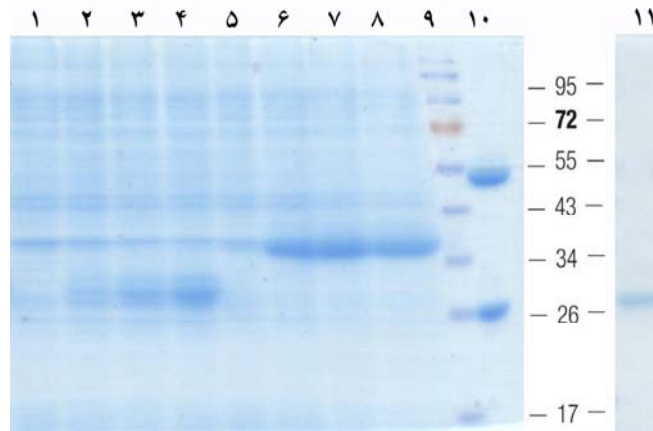
| | | | |
|--|--|--------------------------------|--------------------------------|
| Result summary: | Productive IGH rearranged sequence (no stop codon and in-frame junction) | | |
| V-GENE and allele | <u>Musmus IGHV8-8*01</u> | score = 1288 | identity = 93,81% (273/291 nt) |
| J-GENE and allele | <u>Musmus IGHJ4*01</u> | score = 207 | identity = 87,04% (47/54 nt) |
| D-GENE and allele by IMGT/JunctionAnalysis | <u>Musmus IGHD2-13*01</u> | D-REGION is in reading frame 3 | |

شکل ۲- تصویر الکتروفورزی تکثیر ناحیه مابین پرایمرهای T7 و SP6 برای کلون‌ها پس از انتقال پلاسمید pGEMT-L6-polyG-H3. ۱- کنترل منفی مارکر ۲- پلاسمید pGEMT-polyG فاقد هرگونه قطعه ورودی، ۳- L6H3-1، ۴- L6H3-2، ۵- L6H3-3، ۶- L6H3-4 و ۷- وزن مولکولی.

پس از القاء تولید پروتئین توسط باکتریهای BL21 دارای پلاسمید pET22b(+)-L6H3 در زمانهای مختلف نمونه برداری شد و از این نمونه‌ها در ژل پلی‌اکریل‌آمید الکتروفورز شدند. نتایج الکتروفورز باکتریهای القاء شده و تخلیص پروتئین در شکل (۳) ارائه شده است. براساس این تصویر مشخص است که بیان پروتئینی با وزن مولکولی حدود ۲۸ کیلودالتون در اثر القاء بیان به وسیله IPTG در باکتری افزایش می‌یابد که با وزن مولکول scFv سازگار است. از آنجایی که scFv بخشی از یک آنتی‌بادی موشی است انتظار می‌رود که به وسیله آنتی‌بادی پلی‌کلونال ضد آنتی‌بادی موشی در ایمونوبلاتینگ شناسایی شود. نتیجه ایمونوبلاتینگ که در شکل (۴) مشاهده می‌شود نیز این مسئله را تأیید می‌کند و بانندی در نمونه القاء شده در وزن حدود ۲۸ کیلودالتون مشاهده می‌شود.

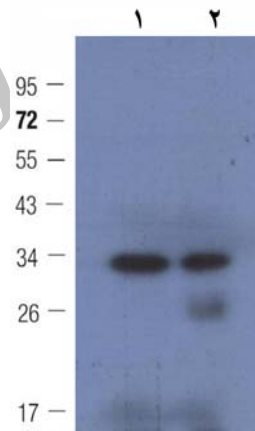
ایجاد حامل pGEMT-L6-polyG-H3 پس از انتقال پلاسمید pGEMT-L6-polyG-H3 به باکتریهای مستعد از آزمون Colony PCR با استفاده از پرایمرهای SP6 و T7 برای جدا کردن کلون‌های رشد کرده و یافتن باکتریهای دارای پلاسمید pGEMT-L6-polyG-H3 از باکتری‌های فاقد قطعه یا دارای قطعه ناقص استفاده شد که در شکل (۲) مشخص شده است. همان گونه که مشخص شده است، فقط کلون‌های L6H3-2، L6H3-3 و L6H3-4 دارای قطعه‌های با اندازه مناسب هستند که ترادف یابی نیز صحت توالی ژن را تأیید نمود.





شکل ۳- الکتروفورز باکتریهای القاء شده دارای پلاسمید pET22b(+)-L6H3 و تخلیص پروتئین L6H3 -۱ باکتری BL21 فاقد پلاسمید(کنترل منفی) -۲ باکتری دارای پلاسمید pET22b(+)-L6H3 پس از ۱ ساعت القاء، -۳ باکتری دارای پلاسمید pET22b(+)-L6H3 پس از ۲ ساعت القاء، -۴ باکتری دارای پلاسمید pET22b(+)-L6H3 پس از ۳ ساعت القاء، -۵ باکتری کنترل مثبت پیش از القاء، -۶ باکتری کنترل مثبت پس از ۱ ساعت القاء، -۷ باکتری کنترل مثبت پس از ۲ ساعت القاء، -۸ باکتری کنترل مثبت پس از ۳ ساعت القاء، -۹ مارکر وزن مولکولی، -۱۰ ایمونوگلوبولین موشی احیاشده، -۱۱ scFv تخلیص شده به وسیله Electroeluter

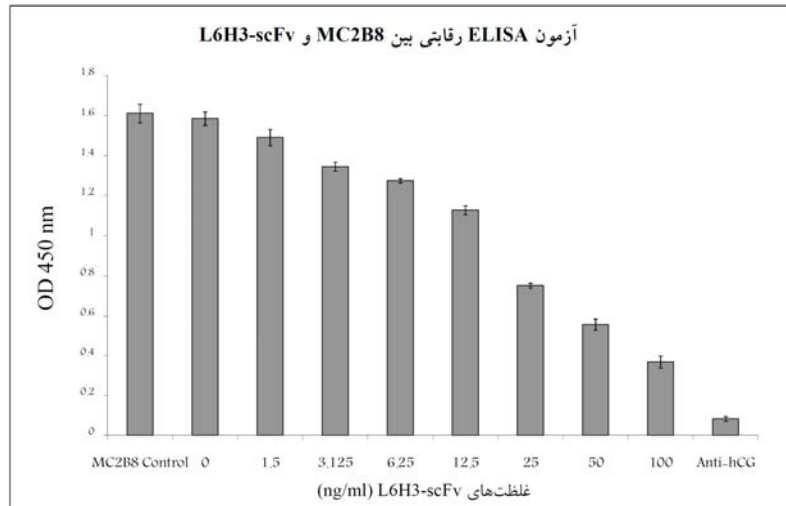
تمامی نتایج حاصل از ترادف‌یابی، بررسی در پایگاههای اطلاعات آنتی‌بادیها، الکتروفورز، ایمونوبلاتینگ، و ELISA همگی تأییدکننده تولید scFv از آنتی‌بادی MC2B8 می‌باشد. بررسیهای پیشین نشان می‌دهد که MC2B8 ناحیه انتهایی کربوکسیل مولکول پلاسمینوژن، یعنی بخش کاتالیتیک آن را، شناسایی می‌کند. اتصال این آنتی‌بادی موجب می‌شود تا فعال‌کننده‌های پلاسمینوژن قادر به فعال نمودن آن نباشند و لذا فرآیندهای فیبرینولیتیک در همان ابتدا متوقف می‌شوند(۱۱). از آنجا که مولکول uPA به صورت پیش‌آنزیم (pro-uPA) به وسیله سلولها ترشح می‌شود و پلاسمین اصلی‌ترین فعال‌کننده فیزیولوژیک pro-uPA است(۱). فرآیند فعال شدن پلاسمینوژن به وسیله اورکیناز به صورت خودتنظیمی مثبت به پیش می‌رود. بدین ترتیب که ایجاد اورکیناز فعال سبب فعال شدن پلاسمینوژن و تبدیل آن به پلاسمین می‌گردد و در مقابل پلاسمین تولید شده خود اورکینازهای غیر فعال را فعال می‌کند. بنابراین در صورت مهار تولید پلاسمین توسط عاملی از جمله scFv تولید شده، سبب می‌گردد چرخه تولید آن از ابتدا متوقف می‌شود و فعال شدن



شکل ۴- ایمونوبلاتینگ L6H3 با آنتی‌بادی پلی‌کلونال ضد آنتی‌بادی موشی. -۱ باکتری BL21 فاقد پلاسمید(کنترل منفی) -۲ باکتری دارای پلاسمید pET22b(+)-L6H3 پس از ۳ ساعت القاء.

آزمون ELISA رقابتی: در شکل ۵ نمودار جذب در nm ۴۵۰ برای واکنش ELISA رسم شده است. بر این اساس با افزایش غلظت L6H3 جذب کاهش می‌یابد به عبارت دیگر آزمون ELISA رقابتی نشان داد که scFv تولید شده قادر است تا با آنتی‌بادی مادر یعنی آنتی‌بادی MC2B8 برای اتصال به آنتی‌ژن رقابت کند و مانع از اتصال آن به آنتی‌ژن گردد.

پلاسمینوژن به طور گسترده مهار می‌شود. بنابراین scFv فیرینولیتیک و رگزایی عمل کند. البته اثبات این مسئله تولید شده می‌تواند به عنوان مهار کننده‌های بالقوه سیستم نیازمند انجام پژوهشهای تکمیلی است



شکل ۵- آزمون ELISA رقابتی. اثر کاهش جذب با افزایش غلظت L6H3 مشاهده می‌شود. در ستون آخر آنتی‌بادی ضد هورمون hCG به عنوان آنتی‌بادی کنترل منفی استفاده شد.

منابع

- Binnema, D. J., Dooijewaard, G., & Turion, P. N. (1991). An analysis of the activators of single-chain urokinase-type plasminogen activator (scu-PA) in the dextran sulphate euglobulin fraction of normal plasma and of plasmas deficient in factor XII and prekallikrein. *Thromb. Haemost.*, 65, 144-148.
- Birkedal-Hansen, H. (1995). Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol* 7(5), 728-735.
- Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407, 249-257.
- Collen, D., & Lijnen, H. (1991). Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood*, 78(12), 3114-3124.
- Copeland, R. (1994). *Methods for Protein Analysis A practical guide to Laboratory Protocols*. London: CHAPMAN & HALL.
- Folkman, J. (2002). Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin. Oncol.*, 29, 15-18.
- Folkman, J. (2007). Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov*, 6(4), 273-286.
- Fukao, H., Ueshima, S., Okada, K., & Matsuo, O. (1997). The role of pericellular fibrinolytic system in Angiogenesis. *Japanese J. Physiol*, 47, 161-171.
- Ichinoe, A., Behmanesh, M., Tominaga, Y., Ushijima, Y., Hirano, S., Sakai, Y., et al. (2004). Identification and characterization of two forms of mouse MUTYH proteins encoded by alternatively spliced transcripts. *Nucleic Acids Research*, 32(2), 477-487.
- Lijnen, H. (2002). Matrix metalloproteinases and cellular fibrinolytic activity. *Biochemistry (Mosc)*, 76(1), 92-98.
- Mansouri, K., Mirshahi, M., Pourfathollah, A., Hassan, Z. M., & Taheripak, R. (2007). Anti-plasminogen monoclonal antibody (MC2B8) inhibites angiogenesis. *Pak J Biol Sci*, 10(19), 3450-3453.
- Miller, K. D., Weaver-Feldhaus Jane, Gray, S. A., Siegel, R. W., & Feldhaus, M. J. (2005). Production, purification, and characterization of human scFv antibodies expressed in *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, and *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 42, 255-267.

13. Mohan, P. M., Chintala, S. K., Mohanam, S., Gladson, C. L., Kim, E. S., Gokaslan, Z. L., et al. (1999). Adenovirus-mediated delivery of antisense gene to urokinase-type plasminogen activator receptor suppresses glioma invasion and tumor growth. *Cancer Res*, 59, 3369-3373.
14. Morrissey, D., O'Connell, J., Lynch, D., O'Sullivan, G. C., Shanahan, F., & Collins, J. K. (1999). Invasion by esophageal cancer cells: functional contribution of the urokinase plasminogen activation system, and inhibition by antisense oligonucleotides to urokinase or urokinase receptor. *Clin. Exp. Metastasis*, 17, 77-85.
15. Nadège Gruel, Beatrix Kotlan, Marie Beuzard, & Teillaud, J.-L. (2002). Generation of scFv from a Phage Display Mini-Library Derived from Tumor-Infiltrating B-Cells. In J. O'Connell (Ed.), *Methods in Molecular Biology*, vol. 193: *RT-PCR Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press Inc.
16. Nam, C. H., Moutel, S., & Teillaud, J.-L. (2002). Generation of Murine scFv Intrabodies from B-Cell Hybridomas. In J. O'Connell (Ed.), *From: Methods in Molecular Biology*, vol. 193: *RT-PCR Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press Inc.
17. Sambrook, J., & Rucell, D. (2001). *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
18. Swiercz, R., Skrzypczak-Jankun, E., Merrell, M. M., Selman, S. H., & Jankun, J. (1999). Angiostatic activity of synthetic inhibitors of urokinase type plasminogen activator. *Oncol. Rep*, 6, 523-526.
19. Wilhelm, O., Schmitt, M., Hohl, S., Senekowitsch, E., & Graeff, H. (1995). Antisense inhibition of urokinase reduces spread of human ovarian cancer in mice. *Clin. Exp. Metastasis*, 13, 296-302.
20. Wu, A., & Senter, P. (2005). Arming antibodies: prospects and challenges for immunoconjugates. *Nat Biotechnol* 23, 1137-1146.
21. Zhao, Y., Liu, Z., Yu, S., Wen, S., Hammarstrom, L., & Rabbani, H. (2009). Construction of a High Efficiency PCR Products Cloning T Vector Using pGEM-5zf (+). *Avicenna J Med Biotech*, 1(1), 37-39.

Cloning and expression of a scFv from an anti human plasminogen monoclonal antibody

Gharaati M.R.¹, Mirshahi M.¹, Rabbani H.², Saifi-Abolhassan M.¹, Behmanesh M.³ and Shamsi Poor F.²

¹ Biochemistry Dept., School of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of IRAN

² Antigen and Antibody Engineering Dept., Monoclonal Antibody Research Center, Avicenna Research Institute, ACECR, Tehran, I.R. of IRAN

³ Genetics Dept., School of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of IRAN

Abstract

Angiogenesis is the formation of new blood vessels from existing ones. New blood vessels provide the cells with metabolic requirements. Angiogenesis plays a pivotal role in many physiological and pathological phenomena. Proteinease especially plasmin is critical in degrading of matrix metalloproteinase releasing and activating different growth factor from it. Angiogenesis initiate by the activation of plasminogen on the cell surface. Our previous finding indicates that an anti human plasminogen monoclonal antibody could inhibit the angiogenesis. According to importance of this antibody, we tried to make the scfv of this antibody. SDS-PAGE and immunoblotting analysis and ELISA confirmed the expression and immunological activity of the scFv.

Keywords: Antiplasminogen, scFv, Angiogenesis, antibody engineering