Archive of SID

دانشور
پزشکی

غنی‌سازی کتابخانه ژنی نانوبادی علیه پروتئین سطحی ویروس پاپیلومای انسانی عامل سرطان دهانه رحم

نویسندگان: سارا مینائیان[۱]، فاطمه رهبری‌زاده*[۲]، سید حمید زرکش اصفهانی[۳]، داود احمدوند[۴]

۱.دانشجوی دکتری گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۲. استادیار گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳. دانشیار گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

٤. استادیار دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

نویسنده مسئول: فاطمه رهبری‌زاده **E-mail: Rahbarif@modares.ac.ir**

دوماهنامه علمی–پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال هیجدهم– شماره ۹۴
شهریور ۱۳۹۰

دریافت: ۱۳۹۰/۴/۲۰
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۰/۷/۳
پذیرش: ۱۳۹۰/۷/۱۸

چکیده

مقدمه و هدف: ویروس پاپیلومای انسانی، عامل اصلی سرطان دهانه رحم است و به‌راحتی از فردی به فرد دیگر منتقل می‌شود. برای جلوگیری از انتشار این ویروس، نیاز به تشخیص زود-هنگام و حساس سرطان دهانه رحم به‌خوبی احساس می‌شود. هدف از این مطالعه، غنی‌سازی کتابخانه فاژی به‌منظور جداسازی نانوبادی‌های اختصاصی علیه پروتئین L۱ ویروس پاپیلومای انسانی است. از این نانوبادی‌ها می‌توان در کیت‌های تشخیصی با حساسیت بالا برای سرطان دهانه رحم استفاده‌کرد.

مواد و روش‌ها: تکثیر فاژهای حاوی کتابخانه نانوبادی در باکتری Escherichia coli انجام‌شد و غنی‌سازی کتابخانه به کمک روش نمایان‌سازی فاژی صورت‌گرفت. به‌منظور اطمینان از غنی-سازی، تعداد فاژهای حاصل از هر مرحله شمرده شد و محصولات حاصل از هر مرحله غنی-سازی به کمک روش پلی کلونال فاژ الایزا مورد بررسی قرارگرفتند؛ سپس بهترین کلون‌ها از طریق روش مونوکلونال فاژ الایزا جداسازی شدند و با کمک تعیین توالی ژنی صحت آنها تأییدشد.

یافته‌ها: صحت فرایند غنی‌سازی از طریق افزایش تعداد کلون‌ها در خروجی غنی‌سازی و افزایش اختلاف جذب نوری با کمک روش فاژ الایزا، در طول موج ۴۵۰ نانومتر به‌اثبات‌رسید و در انتها، ۴ کلون به عنوان بهترین کلون‌ها انتخاب‌شدند.

نتیجه گیری: پس از سه مرحله غنی‌سازی، کتابخانه فاژمیدی علیه پروتئین L۱ چهار سویه ویروس پاپیلومای انسانی غنی‌سازی شد.

واژگان کلیدی: نانوبادی، ویروس پاپیلومای انسانی، نمایان‌سازی فاژی، پروتئین L۱

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

روش نمایان‌سازی فاژی، روشی بسیار قدرتمند برای نمایان‌کردن میلیون‌ها یا حتی میلیاردها پپتید و پروتئین مختلف در کتابخانه‌های فاژی است. یکی از موفق‌ترین موارد استفاده از این روش که در سال‌های اخیر گسترشی فراوان داشته‌است، طراحی و ساخت کتابخانه-های بزرگ فاژی حاوی آنتی‌بادی، غربالگری و انتخاب هوشمندانه آنتی‌بادی‌هایی با ویژگی‌های موردنظر با بهره‌گیری از این کتابخانه‌هاست (۱).

به‌تازگی با پیشرفت‌هایی که در زمینه ساخت آنتی-بادی‌های مونوکلونال صورت‌گرفته‌است امیدهایی تازه در درمان هدفمند و تشخیص زودهنگام بسیاری از بیماری‌ها از جمله سرطان‌ها حاصل شده‌است (۲و۳)؛ درواقع یکی از مهم‌ترین اهداف مهندسی آنتی‌بادی، تولید آنتـی‌بادی‌هایی با اندازه کوچک‌تر، پایداری بالاتر و قدرت اتصال قوی‌تر است. یکی از انواع آنتی‌بادی-های مونوکلونال، آنتی‌بادی‌های تک‌دومنی با منشاء شتری هستند که به دلیل اندازه کوچکشان نانوبادی نیز نامیده‌می‌شوند. نانوبادی‌ها ضخامتی در حدود ۲/۸ نانومتر و طولی معادل ٤/٤ نانومتر دارند؛ به‌عبارت‌دیگر، این پروتئین‌ها کوچک‌ترین قطعه اتصالی به آنتی‌ژن هستند که تنها دارای دومن متغیر از زنجیره سنگین بوده، در نبود زنجیره سبک، قادرند عملکرد خود را به‌خوبی حفظ‌کنند (٤). نانوبادی‌ها خصوصیات منحصربه‌فردی مانند حلالیت بالا (۵) و مقاومت و پایداری در برابر شرایط سخت دارند (٦). آنها برای آنتی‌ژن خود کاملا اختصاصی عمل‌کرده، با افینیتی بالا به آن می‌چسبند؛ همچنین به دلیل داشتن اندازه‌ای کوچک، قادرند به-سرعت به بافت‌های مختلف نفوذکنند (۷)؛ از مزایای دیگرشان اینکه تهیه کتابخانه فاژمیدی از این پروتئین-های کوچک به‌آسانی امکان‌پذیر است، درحالی‌که در حین تهیه کتابخانه از آنتی‌بادی‌های رایج، آرایش دومن-های متغیر زنجیره‌های سبک و سنگین به میزان زیادی تغییرمی‌کند (۸).

بر طبق آمارهای ارائه‌شده، پس از بیماری‌های قلبی، سرطان با شیوع روزافزون خود، دومین عامل مرگ و میر در جهان است (۹) و سرطان دهانه رحم پس از سرطان سینه، دومین عامل مرگ و میر در زنان گزارش‌شده (۱۰). عامل اصلی ایجادکننده سرطان دهانه رحم، آلودگی با ویروس پاپیلومای انسانی یا HPV (Human Papilomavirus) است، که دوسویه HPV١٦ و HPV١٨ باعث ایجاد ۷۰ درصد سرطان‌های دهانه رحم می‌شوند؛ همچنین سویه‌های HPV٦ و HPV١١ علت اصلی ایجاد زگیل‌های تناسلی هستند (۱۱). امروزه تشخیص زود-هنگام و برنامه‌های دوره‌ای غربالگری، یکی از ضروری-ترین راهکارها در برابر سرطان دهانه رحم به‌شمارمی-آیند. متأسفانه برخی از پژوهش‌ها نشان‌می‌دهند که تست‌های مربوط به سلول‌شناسی، حساسیت کمی دارند؛ همچنین تست‌های مربوط به بررسی DNA ویروس پاپیلومای انسانی نیز از اختصاصیت پایینی برخوردارند که این امر موجب پیگیری‌های غیرضروری مانند تکرار آزمایش‌ها می‌شود (۱۲و۱۳).

ویروس پاپیلومای انسانی DNA ویروس دو رشته‌ای است که تعدادی پروتئین اولیه و تأخیری را دربرمی-گیرد. پروتئین L1 که جزء پروتئین‌های ساختاری ساخته-شده در فاز تأخیری است، قسمت اعظم پوشش سطحی ویروس را تشکیل‌می‌دهد؛ این پروتئین در انسان ایمونوژن بوده و علیه آن، آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده ایجاد می‌شود (١٤). به‌تازگی، برخی از تحقیقات انجام-شده بیان‌کنندهٔ این مطلب هستند که پروتئین L1 می‌تواند یک علامت قدرتمند و مفید برای مشخص‌کردن اینکه «عفونت با ویروس پاپیلومای انسانی در مرحله تکثیری است یا فعال؟»، به‌کاربرده‌شود؛ بنابراین ردیابی این پروتئین می‌تواند در تشخیص اولیه ضایعات پیش-

www.SID.ir

Archive of SID

سرطانی مورد استفاده قرارگیرد (۱۵و۱۶).

در این پژوهش، هدف از غنی‌سازی کتابخانه فاژمیدی pComb3x، جداسازی کلون‌های حاوی نانوبادی علیه پروتئین پوششی L1 تعدادی از سویه‌های ویروس پاپیلومای انسانی است؛ به کمک این نانوبادی‌ها می‌توان نانوبادی الیگوکلونالی را با قدرت اتصال قوی‌تر و اختصاصی‌تر برای آنتی‌ژن L1 سویه‌های پرخطر ویروس پاپیلومای انسانی تولیدکرد که با استفاده از آن، امیدهایی تازه در تشخیص زودهنگام و غربالگری سرطان دهانه رحم حاصل می‌شود.

مواد و روش‌ها

تکثیر کتابخانه فاژمیدی pcomb3x حاوی نانوبادی: آقای دکتر داود احمدوند کتابخانه فاژی pcomb3x را اهداکرد و از باکتری Escherichia coli سویه (Biotech-Pharmacia -Amersham) TG1 به عنوان میزبان کتابخانه فاژی استفاده‌شد. باکتری‌ها در ۱۰ میلی‌لیتر محیط 2XYT در دمای ۳۷°C و دور۲۵۰ رشدداده‌شدند، هنگامی‌که میزان جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/٤ رسید، ۲۰۰ میکرولیتر از ذخیره کتابخانه فاژمیدی pComb3x با تیتر ۱۰۱۲ واحد تشکیل‌دهنده پلاک به محیط کشت باکتری حاوی فاژمید اضافه شد و ابتدا به مدت ۳۰ دقیقه بدون حرکت در دمای ۳۷°C و سپس در همین دما به مدت ۳۰ دقیقه و در دور ۲۵۰ انکوبه‌شد؛ پس از آن، آمپی‌سیلین مورد نیاز محیط به آن افزوده و با دور ۲۵۰ در دمای ۳۷°C انکوبه‌شد (غلظت نهایی آمپی‌سیلین، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر است). ۱۰۰ میکرولیتر از فاژ کمکی M13KO7 با تیتر ۱۰۱۲ واحد تشکیل‌دهنده پلاک[1] به محیط اضافه شد که ۳۰ دقیقه بدون حرکت و سپس ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷°C با دور ۲۵۰ انکوبه گشت. کانامایسین به عنوان آنتی‌بیوتیک دوم در دو مرحله با فاصله زمانی ۳۰ دقیقه به محیط افزوده شد (غلظت نهایی کانامایسین، ۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر است). حجم نهایی با محیط 2XYT تازه به ۱۰۰ میلی-لیتر رسانده و به مدت ۱٦ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷°C انکوبه شد. سپس محیط با دور ۳۷۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ٤°C سانتریفوژ شد و مایع رویی به ظرف استریل حاوی PEG/NaCl با نسبت ۱ به ۵ اضافه گردید. محلول حاصل را به مدت ۱ ساعت، روی یخ نگهداری‌کردند، سپس محلول به مدت ۱۵ دقیقه در دور g× ۱۵۰۰۰ سانتریفوژ شد. محلول رویی، تخلیه و رسوب با ۱ میلی‌لیتر شیر خشک ۵ درصد حل‌شده در بافر فسفات سالین ۱۰ میلی‌مولار با PH=۷/۲ شسته‌شد. مقداری از محصول برای تیتراسیون فاژ و مقداری نیز برای ذخیره به ۷۰°C- منتقل و نگهداری شد.

غنی‌سازی با آنتی‌ژن L1 : از واکسن گارداسیل

ساختِ شرکت Merck & CO به عنوان آنتی‌ژن استفاده-شد؛ این واکسن حاوی پروتئین L1 ویروس‌های پاپیلومای انسانی ٦، ۱۱، ۱٦ و ۱۸ است. ۲ میلی‌لیتر محلول ۱/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر واکسن گارداسیل رقیق‌شده در بافر فسفات سالین ۱۰ میلی‌مولار با PH=۷/۲ به یک چاهک از پلیت ٦ خانه اضافه‌شد و در چاهک دیگر ۲ میلی‌لیتر سرم آلبومین گاوی[2] با غلظت ۱/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر رقیق‌شده در بافر فسفات سالین ۱۰ میلی‌مولار با PH=۷/۲ به عنوان کنترل منفی اضافه و به مدت یک شب در دمای ٤°C انکوبه شد. چاهک حاوی آنتی‌ژن و سرم آلبومن گاوی، تخلیه و ۳ بار بافر فسفات سالین ۱۰ میلی مولار با PH=۷/۲ شسته-

1. Pfu/ml

2. Bovin serum albumin

www.SID.ir

Archive of SID

شد. ۳ میلی‌لیتر شیر خشک ۵ درصد به عنوان بلاک‌کننده به آن اضافه و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه شد. بافر بلاک‌کننده از چاهک‌های کنترل (سرم آلبومین گاوی) تخلیه و محلول فاژی تهیه‌شده در مرحله قبل به آنها اضافه و به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه شد؛ سپس محلول فاژی از چاهک سرم آلبومین گاوی به چاهک حاوی آنتی‌ژن انتقال‌یافت و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه‌شد. پس از طی این مرحله، محلول رویی تخلیه و چاهک ۱۰ بار با بافر شستشو (فسفات-توئین ۲۰) و ۱۰ بار با بافر فسفات ۱۰ میلی-مولار با PH=۷/۲ شسته‌شد؛ پس از خشک‌شدن چاهک-ها ۵۰ میکرولیتر از محلول تری‌اتانل‌آمین داخل هر چاهک ریخته‌شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد؛ پس از طی مراحل بالا ۲۵ میکرولیتر از بافر Tris-HCl با PH=۷/۵ به چاهک‌ها افزوده و محلول چند-بار پیپتاژ شد، سپس محتویات چاهک‌ها، داخل میکروتیوپ استریل جمع‌آوری و مقداری از محصول برای تیتراسیون، مقداری برای ذخیره در۷۰°C- و بقیه برای ورودی مرحله بعدی غنی‌سازی پلی کلونال تکثیر و تخلیص شدند؛ تمامی مراحل بالا ۳ بار انجام‌گرفت و در هر مرحله شستشو، غلظت توئین ۲۰ به ترتیب ۰،۵، ۱ و ۲ درصد غلیظ‌تر شد.

تعیین تیتر فاژهای ورودی و خروجی مراحل غنی‌سازی

۱۰۰ میکرولیتر از ورودی‌ها و خروجی‌های مراحل مختلف غنی‌سازی برداشته، به ۹۰۰ میکرولیتر محیط کشت LB حاوی باکتری TG1 رشدیافته در فاز لگاریتمی اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه بدون حرکت در دمای ۳۷°C و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷°C با دور ۲۵۰ انکوبه شد؛ سپس باکتری‌ها با دور ٤۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ٤ °C به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند؛ پس از دورریختن مایع رویی رسوب روی پلیت LB آگار حاوی ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آمپی‌سیلین کشت شبانه داده‌شد و بعد از طی این زمان، کلون‌های حاصل شمارش و تیتر ورودی و خروجی مشخص شد.

بررسی محصولات غنی‌سازی توسط تکنیک پلی کلونال فاژ الایزا

برای اطمینان از غنی‌شدن کتابخانه برای فاژمیدهای موردنظر علاوه‌بر تیتراسیون فاژ، از روش فاژ الایزا نیز استفاده‌شد. به تعداد مراحل غنی‌سازی برای هر محصول، ورودی و خروجی به صورت دوتایی، در هر چاهک الایزا محلول ۱/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌ژن L1 ویروس‌های پاپیلومای انسانی ٦، ۱۱، ١٦و ۱۸ رقیق‌شده در بافر فسفات سالین ۱۰ میلی‌مولار با PH=۷/۲ و در چاهک دیگر، سرم آلبومین گاوی با غلظت ۱/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر رقیق-شده در بافر فسفات سالین ۱۰ میلی‌مولار با PH=۷/۲ به عنوان کنترل منفی اضافه و به مدت یک شب در دمای ٤°C انکوبه شد. چاهک‌ها پس از تخلیه ۳ بار با بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار با PH=۷/۲ شسته‌شده، سپس با شیر خشک ۵ درصد بلاک شدند. پس از ۱ ساعت و ۳۰ دقیقه انکوبه-شدن در دمای ۳۷°C، ۵۰ میکرولیتر از محصولات فاژی ورودی و خروجی، مراحل مختلف غنی‌سازی بعد از تکثیر و خالص‌سازی (تیتر فاژها 10^{12} واحد تشکیل‌دهنده پلاک تنظیم شد) به همراه ۵۰ میکرولیتر بافر فسفات ۱۰ میلی-مولار با PH=۷/۲ به چاهک‌ها اضافه شد که در ابتدا ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷°C با حرکت آرام و سپس ۳۰ دقیقه در همین دما بدون حرکت انکوبه شدند؛ پس از طی این مرحله چاهک‌ها ۳ بار با بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار با PH=۷/۲ شسته‌شدند و پس از خشک‌شدن آنتی‌بادی ثانویه علیه فاژ M۱۳ متصل به HRP (Horseradish peroxidase) با نسبت ۱/۲۵۰۰ به چاهک‌ها اضافه و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷°C با حرکت آرام انکوبه شد؛ سپس چاهک‌ها ۳

www.SID.ir

Archive of SID

بار با بافر شستشو (فسفات-توئین ۲۰) و ۱ بار با بافرفسفات ۱۰ میلی‌مولار با PH=۷/۲ شسته‌شدند. ۷۰ میکرولیتر محلول تری‌اتانل‌آمین داخل هر چاهک ریخته‌شد و پس از طی زمان کافی در دمای ۳۷°C واکنش انجام-گرفت؛ سپس واکنش با ۵۰ میکرولیتر اسید کلریدریک ۲ نرمال متوقف و نتیجه با دستگاه ELISA reader (نورهان فجر) در طول موج ٤٥٠ نانومتر خوانده‌شد.

غربالگری مونوکلونال‌های موردنظر با استفاده از تکنیک مونوکلونال فاژ الایزا

از پلیت مربوط به تیتراسیون فاژمیدهای مرحله ۳ غنی-سازی بیش از ۱۰۰ تک‌کلون برداشته، پس از تکثیر و خالص‌سازی برای هر تک‌کلون با استفاده از روش فاژالایزا (مراحل در بالا ذکرشده‌است) جذب نوری در هر چاهک در طول موج ٤٥٠ نانومتر خوانده‌شد و از میان آنها چاهک‌های حاوی کلون‌هایی که جذب نوری-شان اختلاف بیشتری با چاهک کنترل منفی داشتند انتخاب‌شدند.

بررسی وجود ژن نانوبادی در کلون‌های انتخابی

برای تأیید وجود ژن نانوبادی در کلون‌های انتخابی از روش Colony-PCR (واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز روی تک‌کلون‌ها) استفاده‌شد. مقادیر مورد نیاز برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز عبارت است از: ۰/۵ میکرولیتر پرایمر omp با غلظت ۱۰ پیکومول (پرایمر مکمل بخش ابتدای نانوبادی) و ۰/۵ میکرولیتر پرایمر G-Backبا غلظت ۱۰ پیکومول (پرایمر مکمل بخش انتهایی نانوبادی) با ۲/۵ میکرولیتر Master mix 5x (به-صورت یک ویال آماده از شرکت فزاپژوه خریداری شد) مخلوط شدند و سپس با آب مقطر دیونیز، به حجم ۲۵ میکرولیتر رسانده‌شدند. چرخه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز که در دستگاه PCR گرادیان (Biorad) انجام‌گرفت در جدول شماره ۱ شرح‌داده‌شده-است. برای ارزیابی نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی، محصول PCR روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد و ژن‌های تکثیرشده برحسب اندازه ملکولی جداسازی شدند.

جدول شماره ۱. چرخه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرازی

مراحل	حرارت	زمان	تعداد چرخه
دناتوره‌کردن اولیه	۹٤°C	٥ دقیقه	۱
دناتوره‌کردن	۹٤°C	۲۰ ثانیه	۳۰
جفت‌شدن پرایمرها	٥٥°C	۳۰ ثانیه	
پلیمریزه‌شدن	۷۲°C	٥۰ ثانیه	
پلیمریزه‌شدن نهایی	۷۲°C	۱۰ دقیقه	۱

www.SID.ir

Archive of SID

جدول شماره ۲. نتایج حاصل از تعیین تیترفاژ خروجی و فاژ- الایزای پلی‌کلونال (برحسب جذب نوری در طول موج ٤٥٠ نانومتر) علیه آنتی‌ژن L1 ٤ سویه ویروس پاپیلومای انسانی در مراحل مختلف غنی‌سازی

مراحل غنی‌سازی	تیتر فاژ	نتایج فاژ الایزا	
	واحد تشکیل‌دهندهٔ فاژ به‌ازاء هر میلی‌لیتر	٦، ١١، ١٦، ١١٨(HPV L)	سرم آلبومین گاوی
مرحله اول	۲×۱۰^{۳}	۰/۱۰±۰/۳۸٤	۰/۱۲±۰/۳۹۳
مرحله دوم	۲×۱۰^{٤}	۰/۱۵±۰/٦۲۳	۰/۱۱±۰/۳۲۱
مرحله سوم	$٦/۱\times۱۰^{٦}$	۰/۲۰±۱/۳۳۱	۰/۱۹±۰/۳۳۰

نتایج

تیتراسیون و بررسی تعداد فاژهای قبل و بعد از غنی‌سازی

در این پژوهش، غنی‌سازی در سه مرحله انجام‌پذیرفت و کلون‌هایی که توانایی اتصال به پروتئین L1 ٤ سویه ویروس پاپیلومای انسانی را داشتند جداسازی شدند. در هر مرحله از غنی‌سازی، فاژهای اتصال‌نیافته از طریق شستشو از چاهک‌ها خارج‌شده و فاژهای اتصال‌یافته به آنتی‌ژن موردنظر، جداسازی و در باکتری E.coli تکثیرشدند که برای مرحله بعدی غنی‌سازی مورد استفاده قرارگرفتند. محاسبه تعداد فاژهای ورودی و خروجی در مراحل مختلف غنی‌سازی نشان‌داد که با افزایش تعداد فاژهای خروجی بین ۱۰ تا ۱۰۰ برابر در طول سه مرحله غنی‌سازی، این روند با موفقیت انجام‌شده‌است. همان‌طورکه در جدول شماره ۲ مشاهده‌می‌شوند، تعداد کلون‌های بعد از مراحل متوالی غنی‌سازی (تعداد فاژهای خروجی) به ترتیب از مرحله ۱ تا مرحله ۳ سیر صعودی داشته‌اند.

نتایج فاژالایزا پلی کلونال پس از هر مرحله از غنی‌سازی

نتایج حاصل از فاژالایزا پلی‌کلونال بعد از مراحل متوالی غنی‌سازی که در جدول شماره ۲ مشاهده‌می‌شود، نشان‌دهنده افزایش شدت جذب و میزان واکنش‌دهندگی در مراحل پایانی غنی‌سازی است. به‌طوری‌که در مرحله سوم غنی‌سازی، اختلاف جذب نوری با چاهک کنترل منفی، بیش از عدد ۱ (یک) است که موفقیت مراحل غنی‌سازی را نشان‌می‌دهد.

نتایج فاژالایزا برای فاژهای مونوکلونال

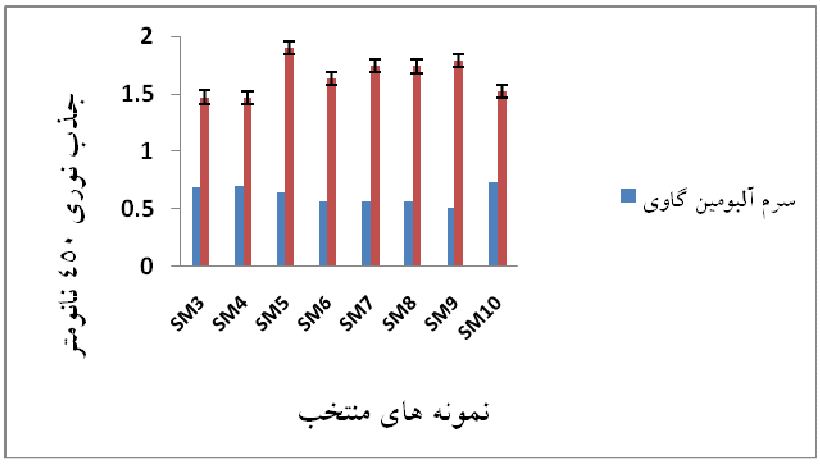
از فاژهای مرحله سوم غنی‌سازی که در واکنش پلی‌کلونال الایزا، بیشترین میزان جذب نوری را نسبت‌به مراحل قبلی داشتند بیش از ۱۰۰ کلون به‌طور تصادفی جداسازی شد. حجم برابری از فاژمیدهای تخلیص‌شده در شرایط یکسان رشد از نظر قدرت اتصال به آنتی‌ژن L1 سویه‌های ٦، ١١، ١٦ و١٨ ویروس پاپیلومای انسانی با روش مونوکلونال فاژالایزا و با کمک آنتی‌بادی ضد M۱۳ متصل‌شده به آنزیم HRP مورد بررسی قرار‌گرفتند. ٤ کلون که تمایل بیشتری نسبت‌به آنتی‌ژن داشتند از این طریق جداسازی شدند. شکل شماره ۱ نتایج تعدادی از بهترین کلون‌ها را نشان‌می‌دهد.

تأیید وجود ژن نانوبادی در کلون‌های انتخابی توسط روش Colony-PCR

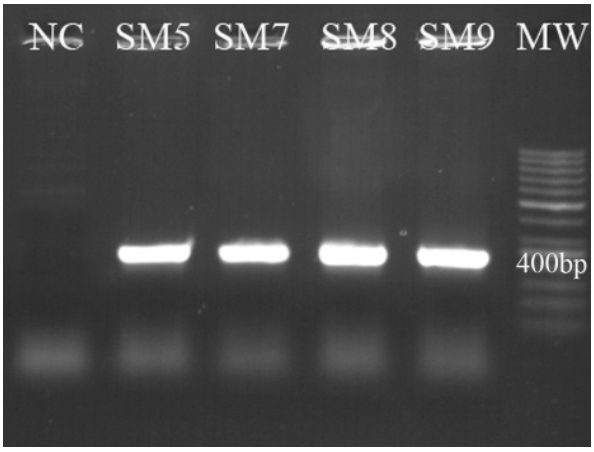
پس از انجام PCR، محصول روی ژل ۱ درصد برده‌شد و وجود باند ٤۰۰ جفت بازی ژن‌نانوبادی در ٤ کلون انتخابی SM۵ ,SMV, SM۸ و SM۹ تأییدشد؛ همچنین در نمونه کنترل منفی (R)، باندی مشاهده‌نشد که بیان‌کننده صحت انجام آزمایش PCR است (شکل شماره ۲).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل شماره ۱. نتایج مونوکلونال الایزا برای تعدادی از از بهترین کلون‌های انتخابی از مرحله سوم غنی‌سازی



شکل شماره ۲. نتایج الکتروفورز Colony-PCR کتابخانه ژنی. ستون اول از سمت چپ (NC) کنترل منفی، ستون۲،۳، ٤ و۵ نتایج PCR روی تعدادی از کلونی‌ها و ستون آخر(MW) مارکر وزن ملکولی

بحث

با کشف آنتی‌بادی‌های زنجیره سنگین که فاقد زنجیره سبک هستند و به‌طور طبیعی در شترسانان وجوددارند، فرصتی جدید برای گسترش آنتی‌بادی تک‌دومنی با ویژگی‌های منحصربه‌فرد فراهم شده‌است. قطعه آنتی-بادی تک‌دومنی مشتق‌شده از این آنتی‌بادی‌ها خصوصیات منحصربه‌فردی، مانند حلالیت و پایداری زیاد، بیان بسیار خوب، بالا بودن میزان افینیتی و اختصاصی‌بودن در برابر آنتی‌ژن مرتبط را دارند. خوشبختانه یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های نانوبادی‌ها این است که این نوع از آنتی‌بادی‌ها مشکلات مربوط به آنتی‌بادی‌های نوترکیب تک‌رشته‌ای، مانند تجمع و تشکیل توده و عدم پیچش مناسب را که باعث عملکرد نامناسب این دسته از آنتی‌بادی‌ها می‌شود ندارند (۱۷)؛ همچنین یکی از مهم‌ترین خصوصیات آنها شباهت زیاد و همولوژی بالایشان به اعضای خانواده VH3 انسانی

www.SID.ir

Archive of SID

است (۱۸)؛ این آنتی‌بادی‌های نوترکیب قادرند جایگاه فعال برخی از آنزیم‌ها را که دور از دسترس آنتی‌بادی‌های رایج‌اند، به‌راحتی شناسایی‌کنند (۱۹).

ویروس پاپیلومای انسانی، عامل اصلی ایجادکننده سرطان دهانه رحم بوده، و شیوع آن در کشورهای در حال توسعه بالاست (۱۱)؛ بنابراین لزوم وجود روش‌های دقیق‌تر با کارآمدی بالاتر در تشخیص زودهنگام سرطان دهانه رحم به عنوان یکی از اولویت‌های سیستم درمانی در این کشورها به‌خوبی احساس می‌شود.

پروتئین L1 ویروس پاپیلومای انسانی به‌طور وسیعی در سطح کپسید این ویروس بیان‌می‌شود (۲۰) که در این پژوهش به عنوان آنتی‌ژن هدف برای تولید نانوبادی از طریق روش نمایان‌سازی فاژی مورد استفاده قرار‌گرفت. از جمله محدودیت‌هایی که در این تحقیق وجودداشت، عدم دسترسی به پروتئین L1 سویه‌های ٦، ۱۱ و ۱۸ ویروس پاپیلومای انسانی به‌صورت خالص بود که برای رفع این مشکل از واکسن گارداسیل حاوی پروتئین L1 هر ٤ سویه ٦، ۱۱، ۱٦ و۱۸ ویروس پاپیلومای انسانی، استفاده‌شد و به کمک آن عمل غنی‌سازی انجام‌گرفت. برای اطمینان از غنی‌شدن کتابخانه علیه یک آنتی‌ژن خاص می‌بایست هم تیتراسیون فاژهای حاصل از هر مرحله غنی‌سازی و هم میزان واکنش‌دهندگی آنها در هر مرحله بررسی‌شود. افزایش تیتر فاژها و واکنش‌دهندگی آنها در مراحل مختلف غنی‌سازی با آنتی‌ژن موردنظر، نشانه پیشرفت فرایند غنی‌سازی است (۲۱). در این مطالعه با توجه به بالارفتن تیتر فاژها (فاژهای خروجی) و افزایش میزان جذب نوری به‌دست‌آمده در واکنش الایزا در سه مرحله متوالی غنی‌سازی، موفقیت فرایند غنی‌سازی به‌اثبات‌رسید. افزایش میزان جذب نوری، بیان‌کنندهٔ افزایش واکنش‌دهندگی فاژهای حاصل با پروتئین پوششی L1 سویه‌های ٦، ۱۱، ۱٦و ۱۸ ویروس پاپیلومای انسانی است؛ همچنین با استفاده از روش مونوکلونال فاژالایزا تک‌کلون‌هایی علیه پروتئین L1 ویروس پاپیلومای انسانی غربال و جداسازی شد. با استفاده از پرایمرهای اختصاصی نانوبادی، Colony-PCR برای کلون‌های منتخب انجام‌شد و مشاهده باند ٤۰۰ جفت بازی روی ژل نشان‌دهندهٔ تأیید وجود کتابخانه ژنی نانوبادی علیه پروتئین L1 ویروس پاپیلومای انسانی است.

در تحقیقی دیگر که *کالپ و همکارانش* (۲۰) انجام‌داده‌اند، تولید آنتی‌بادی کامل علیه پروتئین L1، ویروس پاپیلومای انسانی از طریق روش هیبریدوما صورت‌گرفته‌است و پس از آن به ترتیب قطعات (Fragment Fab antigen binding) و scFv (Single chain variable fragment) تولیدشده‌اند، اما جداسازی نانوبادی‌هایی علیه این آنتی‌ژن برای اولین‌بار و با استفاده از روش نمایان‌سازی فاژی انجام‌شده‌است. تا به حال نانوبادی‌هایی علیه ویروس‌هایی مانند ویروس آنفولانزا (۲۲)، ویروس نقص سیستم ایمنی (۲۳) و روتا ویروس (۲٤) جداسازی شده‌اند، اما جداسازی نانوبادی‌هایی علیه یک ویروس سرطان‌زا برای اولین‌بار در دنیا گزارش‌می‌شود.

بر طبق مطالعات انجام‌شده، قدرت اثر هم‌افزایی که ۳ آنتی‌بادی مونوکلونال باهم (الیگوکلونال آنتی‌بادی) دارند، به‌تنهایی، ۲۰۰۰۰ برابر قدرت هریک از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال است. امروزه با استفاده از آنتی‌بادی‌های الیگوکلونال علیه سم کزاز که ترکیبی از ۳ تا ٤ آنتی‌بادی مونوکلونال است، قدرت خنثی‌سازی سم در سیستم in vivo ۲۰۰ برابر افزایش‌یافته‌است (۲۵)؛ بنابراین

www.SID.ir

Archive of SID

با تولید نانوبادی الیگوکلونال علیه پروتئین L1 سویه‌های مهم ویروس پاپیلومای انسانی قادرخواهیم‌بود از آن به عنوان علامت اختصاصی با کارایی بالاتر در تشخیص زودهنگام سرطان دهانه رحم استفاده‌کنیم؛ تولید آسان، هزینه کم و تحمل محدوده وسیع دمایی از جمله ویژگی‌های مهم کیت‌های تشخیصی حاوی این نوع نانوبادی خواهندبود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت و کمک مالی دفتر تحصیلات تکمیلی دانشگاه اصفهان و ستاد ویژه توسعه فناوری نانو انجام‌شده‌است.

منابع

1. Hoogenboom, H.R. Selecting and screening recombinant antibody libraries. Nat. Biotechnol. 2005; 23: 1105–1116
2. Kay, P. Targeted therapies: a nursing perspective. Semin Oncol Nurs. 2006; 22: 1-4
3. Brekke, OH. Sandlie, I. Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty first century. Nat Rev Drug Discov. 2003; 2:52–62
4. Harmsen, M, M. De Haard, H, J. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. Appl Microbiol Biotechnol. 2007; 77: 13–22
5. Revets, H. De Baetselier, P. Muyldermans, S. Nanobodies as novel agents for cancer therapy. Expert opin Biol Theor. 2005; 5: 111-124
6. Dumoulin, M. Conrath, K. Van Meirhaeghe, A. Meersman, F. Heremans, K. Frenken, LG. Muyldermans, S. Wyns, L. Matagne, A. Single-domain antibody fragments with high conformational stability. Protein Sci. 2002; 11:500–515
7. Muyldermans, S. Baral, T.N. Retamozzo, V.C. De Baetselier, P. De Genst, E. Kinne, J. Leonhardt, H. Magez, S. Nguyen, V.K. Revets, H. Rothbauer, U. Stijlemans, B. Tillib, S. Wernery, U. Wyns, L. Hassanzadeh- Ghassabeh, G. Saerens, D. Camelid immunoglobulins and nanobody technology. Vet. Immunol. Immunopathol. 2009; 128: 178–183
8. Harmsen, MM. De Haard, H.J. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007; 77: 13–22
9. Global cancer facts and figures. American cancer society,2008 P: 3
10. Parkin, DM. Global cancer statistics in the year 2000. Lancet Oncol. 2001; 2: 533-543
11. Kahn, JA. HPV vaccination for the prevention of cervical intraepithelial neoplasia. N Engl J Med. 2009; 361: 271-278
12. Stoler, MH. Schiffmann, M. Atypical squamous cells of undetermined significance- low- grade squamouse intraepithelial lesion triage study (ALTS) group. Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations: realistic estimates from the ASCUS– LSIL Triage Study.JAMA. 2001; 285:1500–1505
13. Naucler, P. Ryd, W. Tornberg, S. Strand, A. Wadell, G. Elfgren, K. Radberg, T. Strander, B. Forslund, O. Hansson, BG. Hagmar, B. Johansson, B. Rylander, E. Dillner, J. Efficacy of HPV DNA testing with cytology triage and/or repeat HPV DNA testing in primary cervical cancer screening. J Natl Cancer Inst. 2009; 101:88–99
14. Frati, E. Bianchi, S. Colzani, D. Zappa, A. Orlando, G. Tanzi, E. Genetic variability in the major capsid L1 protein of human papillomavirus type 16 (HPV-16) and 18 (HPV-18). Infect Genet Evol. 2011; in press.
15. Melsheimer, P. Kaul, S. Dobeck, S. Bastert, G. Immunocytochemical detection of HPV high-risk type L1 capsid proteins in LSIL and HSIL as compared with detection of HPV L1 DNA. Acta Cytol. 2003; 47:124–128

www.SID.ir

Archive of SID

16. Rauber, D. Mehlhorn, G. Fasching, PA. Beckmann, MW. Ackermann, S. Prognostic significance of the detection of human papilloma virus L1 protein in smears of mild to moderate cervical intraepithelial lesions. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2008; 140: 258–262

17. Muyldermans, S. Single domain camel antibodies: current status. J Biotechnol, 2001; 74: 227-302

18. Ewert, S. Cambillau, Ch. Conrath, K. Pluckthun, A. Biophysical properties of camelid VHH domains compared those of human VH3 domains. Biochemistry. 2002; 41: 3628-3636

19. Wesolowski, J. Alzogaray, V. Reyelt, J. Unger, M. Juarez, K. Urrutia, M. Cauerhff, A. Danquah,W. Rissiek, B. Scheuplein, F. Schwarz, N. Adriouch, S. Boyer, O. Seman, M. Licea, A. Serreze, D. Goldbaum, F.A. Haag, F. Koch-Nolte, F. Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. Med Microbiol Immunol. 2009; 198: 157–174

20. Culp, T. D. Spatz, C.M. Reed, C. A. Christensen, N.D. Binding and neutralization efficiencies of monoclonal antibodies, Fab fragments, and scFv specific for L1 epitopes on the capsid of infectious HPV particles. Virology. 2007; 361: 435- 446

21. Andris- widhopf, J. Radar, C. Steinberger, P. Fuller, R. Barbas, CF 3rd. Methods for the generation of chikhen monoclonal antibody fragments by phage display. J Immunol Methods. 2000; 242: 159-81

22. Ibanez, LI. De Filette, M. Hultberg, A. Verrips, T. Temperton, N. Weiss, RA. Vandevelde, W. Schepens, B Vanlandschoot, P. Saelens, X. Nanobodies with in vitro neutralizing activity protect mice against H5N1 influenza virus infection. J Infect Dis. 2011; 203:1063-1072

23. Jahnichen, S. Blanchetot, C. Maussang, D. Gonzalez-Pajuelo, M. Chow, KY. Bosch, L. De Vrieze, S. Serruys, B. Ulrichts, H. Vandevelde, W. Saunders, M. De Haard, HJ. Schols, D. Leurs, R. Vanlandschoot, P. Verrips, T. Smit, MJ. CXCR4 nanobodies (VHH-based single variable domains) potently inhibit chemotaxis and HIV-1 replication and mobilize stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010; 107:20565-20570

24. Pant, N. Hultberg, A. Zhao, Y. Svensson, L. Pan-Hammarstrom,Q. Johansen, K. Pouwels, PH. Ruggeri, FM. Hermans, P. Frenken, L. Boren, T. Marcotte, H. Hammarstrom, L. Lactobacilli expressing variable domain of llama heavy-chain antibody fragments (lactobodies) confer protection against rotavirusinduced diarrhea. J Infect Dis. 2006; 194:1580–1588

25. Nowakowski, A. Wang ,C. Power, D,B. Potent neutralization of botulinum neurotoxin by recombinant oligoclonal antibody. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002; 99: 11346–11350

www.SID.ir

Archive of SID

Daneshvar

Medicine

Scientific-Research Journal of Shahed University Seventeenth Year, No.94 August, September 2011

Enrichment of nanobody gene library against human papillomavirus as the main cause of cervical cancer

Sara Minaeian[1], Fatemeh Rahbarizadeh[2], Sayyed Hamid Zarkesh-Esfahani[3], Davoud Ahmadvand[4]

1. Ph.D. student - Department of Biology, Facualty of Sciences, University of Isfahan. Isfahan, Iran
2. Assistant Professor- Department of Medical Biotechnology, Facualty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3. 1. Associate Professor- Department of Biology, Facualty of Sciences, University of Isfahan. Isfahan, Iran
4. Assistant Professor, School of Allied Medical Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

E-mail: Rahbarif@modares.ac.ir

Received: 10/7//2011
Last revised: 24/9/2011
Accepted: 9/10/2011

Abstract

Background and Objective: The human papillomavirus (HPV) is the main cause of cervical cancer. The symptoms of the disease are non-specific and it can be transferred from one person to another one. In order to prevent the spread of HPV virus and reducing mortality rate of cervical cancer, early detection programs are needed. Accurate and highly sensitive test is essential for screening examination. So, in this study, our aim was enrichment of nanobody library against HPVs L1 proteins to isolate clones which produce specific nanobody against L1 proteins. In the future, these nanobodies can be used in highly sensitive diagnostic kits for early detection of cervical cancer.

Materials and Methods: The phagmids of polyclonal library were amplified in *Escherichia coli* strain TG1. Panning of library and selection of clones were carried out against HPV L1 protein. The titer of output phagmids and optical density in Phage-ELISA were evaluated. The best clones were isolated by monoclonal phage ELISA method and checked by sequencing and colony PCR.

Results: An increase in the number of output clones in consecutive rounds of panning and the rise in the difference of OD450 in phage ELISA shows the accuracy of the enrichment process. At last, 4 clones were isolated as best ones.

Conclusion: This study proved that after three rounds of panning, the phagmid library was enriched for anti HPVs L1 nanobodies and isolation of specific clones against this antigen were accomplished. By use of these anti HPV L1 nanobodies in laboratory kits, new hopes for early diagnosis of precancerous lesions with high reliability can be achieved.

Key word: Nanobody, Human papilomavirus, Phage display, L1 protein

www.SID.ir