مقاله پژوهشی

ساخت کتابخانه ی آنتی بادی تک دمین شتری بر ضد آنتی ژن های سلولی سرطان سینه

هدا آیت [۱*]، سیده آزاده موسویان [۱]، علی محمد احدی [۱]، الهام بهوندی [۲]، خداداد پیرعلی [۲]، محمدرضا محزونیه [۲]

[۱]گروه ژنتیک، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ [۲]گروه پاتوبیولوژی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۲/۲/ ۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۲/۸/۱۱

چکیده:

زمینه و هدف: **نواحی متغیر آنتی‌بادی‌های زنجیره سنگین شتری (VHH یا نانوبادی)، کوچک ترین واحد باند شونده به آنتی ژن ها هستند. اندازه کوچک نانوبادی ها بزرگ ترین مزیت آن ها می باشد که سبب دستکاری ژنتیکی راحت آن ها می شود. این مطالعه با هدف ساخت کتابخانه ی آنتی بادی تک دمین از شتر ایمن شده با یک رده سلولی آدنوکارسینومای سینه ی انسان (SKBR3) طراحی و اجرا شد.**

روش بررسی: **در این مطالعه تجربی ابتدا عصاره سلول SKBR3 طی سه نوبت به صورت زیر پوستی به یک شتر تزریق گردید. سپس RNA کامل از طحال شتر استخراج و قطعات VHH به کمک روش RT-PCR ساخته و تکثیر شدند. قطعات VHH در درون فاژمید Pcomb3x قرار گرفتند و به روش الکتروپوریشن قطعات نوترکیب وارد باکتری های DH5α شدند. تنوع کتابخانه ی تهیه شده توسط تکنیک انگشت نگاری آنزیمی مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت بیان VHH با روش SDS-PAGE ارزیابی شد.**

یافته ها: **در این پژوهش کتابخانه آنتی بادی شتری با بیش از ۱۰۵ کلونی ساخته شد. همچنین انگشت نگاری آنزیمی نشان داد که کتابخانه ی آنتی بادی حاصل دارای تنوع بالایی می باشد. بررسی های اولیه بوسیله SDS-PAGE مشخص کرد که پروتئین VHH با وزن مولکولی ۱۵ کیلو دالتون در باکتری های ترانسفورم شده بیان می شود.**

نتیجه گیری: **تهیه ی کتابخانه ی آنتی بادی ایمن بر ضد رده سلولی SKBR3، امکان جداسازی آنتی بادی های اختصاصی VHH بر ضد آنتی ژن های مختلف سرطان سینه را فراهم می کند.**

واژه‌های کلیدی: نانوبادی، کتابخانه ی آنتی بادی شتری، سرطان سینه.

مقدمه:

آنتی بادی ها یا ایمونوگلوبولین ها از اجزای ضروری سیستم ایمنی هستند که در خون و سیستم لنفاوی به گردش در آمده، آنتی ژن های خارجی را شناسایی کرده و به آن ها متصل می شوند (۱). فراوان ترین نوع آنتی بادی در گردش خون مهره داران، IgG، هومو دایمرهایی با ۲ زنجیره ی پلی پپتیدی یکسان سنگین و ۲ زنجیره ی پلی پپتیدی یکسان سبک هستند (۲). زنجیره های سبک شامل یک دمین متغیر و یک دمین ثابت (CL) و زنجیره های سنگین شامل یک دمین متغیر (VH) و ۳ دمین ثابت (CH3-CH2-CH1) هستند. آنتی بادی ها شش ناحیه بسیار متغیر (سه تا در VH و سه تا در VL) دارد که در تعامل با آنتی ژن بوده و CDR نام دارند (۳). سه زیر کلاس از IgG در شتر وجود دارد: IgG1، IgG2 و IgG3 که IgG1 شامل آنتی بادی های کلاسیک و IgG2 و IgG3 جزء نوع HCAb هستند (۴). HCAB ها هومو دایمر بوده و هر زنجیره آن شامل یک دمین متغیر (VHH) است که بلافاصله با یک ناحیه ی لولا، CH2 و CH3 دنبال می شود (۵). VHH یا نانو بادی در غیاب

نویسنده مسئول: شهرکرد- دانشگاه شهرکرد- گروه ژنتیک- تلفن: ۰۹۱۲۲۲۵۸۲۱۱، *E-mail: ayat-h@sci.sku.ac.ir*

www.SID.ir

دمین متغیر زنجیره ی سبک (VL) به آنتی ژن متصل می شود (۶). ساختمان VHH مانند دمین VH سه ناحیه ی تعیین کننده ی مکمل (CDR) دارد که در اتصال به آنتی ژن نقش دارند (۷).

بزرگترین مزیت دمین های VHH اندازه کوچک آن هاست. بنابراین در مقایسه با انواع آنتی بادی های مهندسی شده مانند scFv، Fab و Fv که امروزه در درمان و تشخیص بیماری ها استفاده می شوند دستکاری ژنتیکی آن ها راحت تر می باشد؛ زیرا فقط یک دمین کلون و بیان می شود (۸). در مقایسه با دمین VH آنتی بادی های مرسوم، VHH با وزن تقریبی ۱۵ کیلو دالتون می تواند بر مشکلاتی همچون تجمع و تخریب که اغلب در مورد آنتی بادی های مهندسی شده وجود دارد، غلبه کند (۹). به علاوه VHH های تهیه شده از شتر در مقایسه با آنتی بادی های هتروتترامر موش در برابر دما پایداری بیشتری دارند؛ این مولکول ها حتی در دمای ۹۰°C قدرت اتصال به آنتی ژن خود را حفظ می کنند (۱۰).

آنتی بادی ها نقش مهم و گسترده ای در درمان سرطان دارند چون معمولاً بیماران آثار جانبی کمتری در مقایسه با دیگر روش های درمان متحمل می شوند. آنتی بادی ها آثار ضد توموری خود را از طریق چندین مکانیسم شامل القای آپوپتوز یا جلوگیری از باند شدن فاکتورهای رشد به گیرنده های خود و یا دیگر روش ها اعمال می کنند (۱۱). یک آنتی بادی مطلوب برای کاربردهای کلینیکی باید از جمله اندازه ی کوچک برای نفوذ بهینه، پایداری بالا و میل ترکیبی و اختصاصیت زیاد بر ضد آنتی ژن شرایطی را دارا باشد (۱۲) خواص ویژه ی VHH، آن را گزینه ای عالی برای مهندسی پروتئین برای ایمنی درمانی کرده است. همچنین، ژن V، ژن کد کننده ی VHH در شتر، همولوژی بالایی با ژن IGHV3، زیر مجوعه ی خانواده ژن های VH انسانی نشان می دهد که احتمالاً در انسان، پاسخ آنتی ژنیک پایینی نشان می دهد. این مسئله خود یک ویژگی قابل توجه در روش ایمنی درمانی می باشد (۱۳).

با توجه به کاربردهای علمی یا پزشکی، انواع مختلفی از کتابخانه های ژن آنتی بادی می توانند ساخته و استفاده شوند. کتابخانه های آنتی بادی که شامل انواع مختلف آنتی بادی با قدرت اتصال به آنتی ژن هستند می توانند به فرم های ایمن، غیر ایمن، ساختگی و نیمه ساختگی باشند (۱۴). کتابخانه آنتی بادی ایمن را از RNA لنفوسیت نمونه هایی تولید می کنند که قبلاً در معرض آنتی ژن های مورد نظر قرار گرفته باشند. با کمک این روش زنجیره های سبک و سنگینی تولید می شوند که تمایل بالایی را برای آنتی ژن خاص دارند و در محیط موجود زنده متحمل بلوغ میل ترکیبی شده اند (۱۵).

هدف این مطالعه ساخت یک کتابخانه آنتی بادی از لنفوسیت های B شتر ایمن شده بر ضد رده سلولی سرطانی بود. برای ایمن کردن شتر از رده سلولی SKBR3 استفاده شد که یک رده سلولی آدنومای سرطان سینه بوده و حاوی آنتی ژن های مختلف سرطانی به ویژه تومور مارکر شاخص HER-2 می باشد (۱۶) این امر باعث افزایش احتمال یافتن آنتی بادی های ضد شاخص های سرطانی، در ذخیره ژنتیکی آنتی بادی های تولیدی در شتر می شود که با غربالگری نهایی کتابخانه جدا خواهند شد. از این رو برای رسیدن به آنتی بادی مورد نظر، مراحل ساخت کتابخانه،انتخاب وکتور مناسب، تعداد اعضای آن، تنوع کتابخانه حاصل و بیان آن از اهمیت خاصی برخوردار است که در این مقاله مورد بررسی قرار گرفته است.

روش بررسی:

در این مطالعه تجربی به منظورایمن سازی شتر و استخراج RNA، رده سلولی SKBR3 (آدنوکارسینومای سرطان سینه) که از بانک سلولی انستیتو پاستور تهیه شده بود، در محیط RPMI حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی کشت شد. سلول ها پس از جمع آوری، در ۳ نوبت به

Archive of SID

www.SID.ir

فاصله ی ۲ هفته یک بار به یک نفر شتر و به صورت زیر پوستی در ناحیه گردن تزریق شدند تا شتر ایمن شده پس از دریافت چندین دوز، به میزان زیادی آنتی بادی های مختلف بر ضد آنتی ژن های موجود در رده سلولی را تولید کند. پس از گذشت ۱۰ روز از آخرین تزریق، شتر کشته شده و RNA کامل از بافت طحال شتر با استفاده از محلول TRIZOL استخراج گردید. سپس با استفاده از پرایمر الیگو dT و آنزیم، M-MuLV Reverse Transcriptase رشته های cDNA سنتز شدند تا به منظور تکثیر قطعه ی VHH، وارد واکنش PCR شوند. جهت طراحی پرایمر برای تکثیر توالی VHH، از پایگاه اطلاعاتی NCBI و نرم افزارهای Gene Runner 3.05 و CLC Main Workbench 5-6-1 استفاده شد. ابتدا برخی از توالی های کد کننده ی mRNA ی توالی VHH از پایگاه اطلاعاتی NCBI گرفته شد. این توالی ها توسط نرم افزار CLC با یکدیگر مقایسه شده و توالی های حفاظت شده و مناسب بین آن ها جهت طراحی پرایمر انتخاب شدند. سپس به کمک نرم افزار Gene Runner و میزان تشابهات نوکلئوتیدی، ۲ جفت پرایمر پیشرو و معکوس طراحی شدند. پرایمرهای CCH2 و CLSHV1 به منظور تکثیر قطعه ی VHH-CH2 و پرایمرهای FR1CAM و FR4CAM جهت تکثیر قطعه ی VHH مورد استفاده قرار گرفتند (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: پرایمرهای استفاده شده جهت تکثیر قطعه ی VHH

نام پرایمر	توالی نوکلئوتیدی
CCH2	5'-GTACGTGCTGTTGAACTGTTCC- 3'
CLSHV1	5'-GTCCTGGCTGCTCTTCTACAAGG- 3'
FR1CAM	5'-CATCGAGCTCGTGCAACTGGTGGAGTCTGG- 3'
FR4CAM	5'-ATGTACTAGTTGAGGAGACGGTGACC- 3'

به منظور سنتز قطعه ی VHH ابتدا قطعه ی VHH-CH2 سنتز شد. جهت انجام این واکنش مواد لازم برای واکنش PCR وارد واکنش گردیدند. بافر PCR (1X)، کلرید منیزیم (۱/۵ میلی مولار)، الیگونوکلئوتید (۰/۲۴ میلی مولار) ، پرایمر CCH2 (۰/۶۴ میکرو مولار)، پرایمر CLSHV1 (۰/۶۴ میکرو مولار)، آنزیم Taq پلی مراز (۰/۰۴ واحد بر میکرولیتر) و۲ میکرولیتر از cDNA سنتز شده نیز به واکنش اضافه شدند. شرایط انجام واکنش شامل ۵ دقیقه واسرشتگی اولیه در ۹۴°c و سپس ۳۰ سیکل شامل ۳۰ ثانیه در ۹۴°c، ۴۵ ثانیه در ۵۷°c و ۴۵ ثانیه در ۷۲°c بود.

در مرحله ی بعد به منظور ساخت قطعه ی VHH، قطعه ی VHH-CH2 ساخته شده در مرحله ی قبل به عنوان الگو وارد واکنش PCR گردید. مواد استفاده شده برای انجام واکنش PCR، غلظت های مشابه واکنش قبل داشتند؛ فقط پرایمرهای جدید FR1CAM (۰/۶۴ میکرو مولار) و FR4CAM (۰/۶۴ میکرو مولار) و ۰/۵ میکرولیتر از قطعه ی VHH-CH2 سنتز شده نیز به عنوان الگو وارد واکنش گردید. شرایط انجام واکنش نیز شامل ۵ دقیقه واسرشتگی اولیه در ۹۴°c و سپس ۳۰ سیکل شامل ۳۰ ثانیه در ۹۴،۳۰°c ثانیه در ۵۹°c و ۳۰ ثانیه در ۷۲°c بود.در این کار تحقیقاتی از فاژمید pComb3x به منظور کلون کردن کتابخانه ژنی آنتی بادی استفاده شد. به منظور کلون کردن قطعات VHH درون فاژمید pComb3X، فاژمید به میزان ۱۲ نانوگرم و قطعات VHH به میزان ۸ نانوگرم به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در معرض یک واحد از هر یک از آنزیم های محدود کننده ی SpeI و SacI (شرکت ویوانتیس) قرار گرفتند. سپس فاژمید خطی شده و قطعات VHH بریده شده از ژل آگارز استخراج شدند و قطعات VHH هضم شده توسط

Archive of SID

www.SID.ir

آنزیم لیگاز T4 (شرکت تاکارا) به فاژمیدهای هضم شده متصل شدند. برای ایجاد کتابخانه از باکتری اشریشیاکولی سوش DH5α استفاده شد. بدین منظور نخست باکتری مستعد الکترو کامپتنت ساخته شد. جهت انجام الکترو پوریشن پس از ذوب باکتری ها در یخ، فاژمیدهای حاوی قطعه ی VHH با باکتری مستعد ترکیب شده و به آرامی پی پتاژ شد و ترکیب فوق به مدت ۳۰ ثانیه درون یخ قرار گرفت. پس از آن به کووت ۲ میلی متری مخصوص الکترو پوریشن منتقل شد. با استفاده از دستگاه بیورد شرایط الکترو پوریشن تنظیم شد به طوری که جریانی معادل ۲۵۰۰ ولت و مقاومت ۲۰۰ اهم برقرار گردید. باکتری های ترانسفورم شده در محلول SOC حل شدند و به مدت ۱ ساعت در انکوباتور شیکردار با دور rpm ۱۰۰ قرار گرفتند. جهت تهیه ی کتابخانه ی آنتی بادی، رقت های ۱/۱۰، ۱/۱۰۰و ۱/۱۰۰۰ از باکتری های ترانسفورم شده بر روی پلیت های حاوی محیط کشت 2XTY ، آمپی سیلین و گلوکز کشت داده شدند. سپس کلونی های رشد کرده بر سطح پلیت جمع آوری شده و به صورت گلیسروله در فریزر ۷۰- نگهداری شدند. جهت بررسی صحت کلونینگ، قطعات VHH از پلیت های حاوی کلونی تعدادی کلونی به صورت تصادفی انتخاب و واکنش کلونی PCR با پرایمرهای FR_1CAM و FR4CAM انجام شد. به منظور بررسی تنوع کتابخانه ی تولید شده، از تکنیک انگشت نگاری آنزیمی یا RFLP استفاده گردید. برای این کار از آنزیم محدود کننده ی ECORII جهت هضم قطعات VHH استفاده شد. محصولات PCR تولید شده در کلونی PCR، به مدت ۲ ساعت و در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد در معرض یک واحد از آنزیم ECORII قرار گرفتند و پس از آن درون ژل آکریل آمید ۸٪ الکتروفورز شدند.

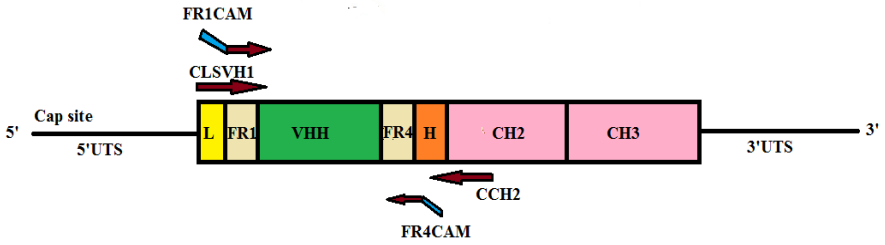
پس از تأیید حضور توالی ژنی VHH در کلونی های کشت داده شده توسط واکنش کلونی PCR، بیان قطعه ی VHH توسط روش SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور کلونی ها به طور جداگانه در ۱۰ میلی لیتر محیط کشت LB حاوی آمپی سیلین و گلوکز حل شدند. کنترل منفی هم شامل باکتری DH5α با فاژمید بدون قطعه بود. لوله ها در انکوباتور شیکردار با دور rpm ۱۰۰ و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. با رسیدن جذب نوری به ۰/۴-۰/۶، محلول ها به مدت ۱۰ دقیقه، در دمای ۴ درجه سانتی گراد و دور rpm۴۰۰۰ سانتریفوژ شدند. رسوب ها به صورت جداگانه در ۱۰ میلی لیتر محیط کشت LB مایع حاوی آمپی سیلین حل شدند. سپس سانتریفیوژ با شرایط قبل تکرار شد و رسوب ها در ۱۰ میلی لیتر محیط کشت مایع LB حاوی آمپی سیلین و غلظت ۱ میلی مولار IPTG برای القا بیان پروتئین حل شدند. محیط کشت ها در انکوباتور شیکردار در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد و دور rpm ۲۰۰ قرار گرفتند. پس از ۴ و ۶ ساعت نمونه برداری از باکتری ها انجام گرفت و بافر لیز (شامل EDTA (۲/۵ میلی مولار)، PMSF (۱ میلی مولار) و تریس (۳۰ میلی مولار) و لیزوزیم به رسوب باکتریای اضافه شد و ترکیب حاصل به خوبی پی پتاژ شد. سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه سانتی گراد، دور rpm ۱۰۰۰۰ و به مدت ۱۵ دقیقه انجام گرفت. برای انجام الکتروفورز محصولات پروتئینی استخراج شده از باکتری، از ژل SDS-پلی آکریل آمید ناپیوسته با غلظت ژل جداکننده ۱۵٪ از محلول استوک آکریل آمید-بیس آکریل آمید و ژل متراکم کننده با غلظت ۵٪ از این محلول استفاده شد.درنهایت نمونه های پروتئینی درون ژل الکتروفورز شدند.

Archive of SID

www.SID.ir

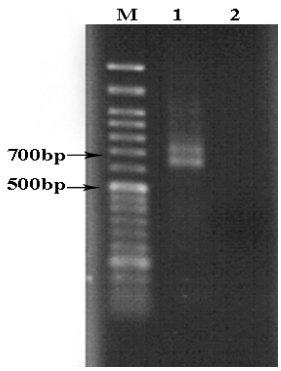
یافته ها:

قطعه ی VHH-CH2 با پرایمرهای CCH2 و CLSHV1 تکثیر شد (تصویر شماره ی ۱). این قطعه اندازه ای حدود ۶۰۰ جفت باز داشت (تصویر شماره ۲). به علاوه با استفاده از این پرایمرها قطعه ی VH نیز تکثیر می شود که اندازه ی آن حدود ۷۰۰ جفت باز می باشد. برای خلوص کامل، قطعه ی VHH-CH2 پس از انجام PCR های متعدد و رسوب دهی مجدد، تغلیظ گردید و پس از الکتروفورز در ژل آگارز، از ژل استخراج شد.



تصویر شماره ۱: محل اتصال پرایمرهای CCH2، CLSHV1، FR1CAM و FR4CAM.

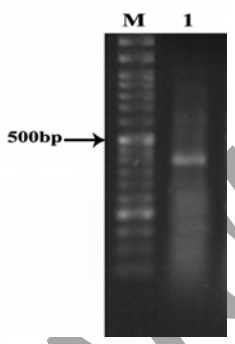
به منظور کلون کردن قطعه ی VHH درون فاژمید pComb3X، توالی هایی جهت شناسایی و برش آنزیم های محدود کننده ی SacI و SpeI به انتهای ۵′ پرایمرهای FR1CAM و FR4CAM اضافه گردید.



تصویر شماره ۲: الکتروفورز محصول PCR انجام شده توسط پرایمرهای CCH2 و CLSHV1.

باند ۶۰۰ جفت باز در چاهک شماره ۱ قطعه مورد نظر می باشد؛ M: مارکر اندازه DNA؛ ستون۱:محصول PCR وستون۲ کنترل منفی می باشند.

به منظور تکثیر قطعه ی VHH، قطعه ی VHH-CH2 ی تکثیر شده و استخراج شده از ژل، در مرحله ی قبل توسط پرایمرهای FR4CAM و FR1CAM تکثیر شد. قطعه ی VHH حاصل، اندازه ای حدود ۴۰۰ جفت باز داشت (تصویر شماره ۳).



تصویر شماره ۳: الکتروفورز محصول PCR انجام شده توسط پرایمرهای FR1CAM و FR4CAM.

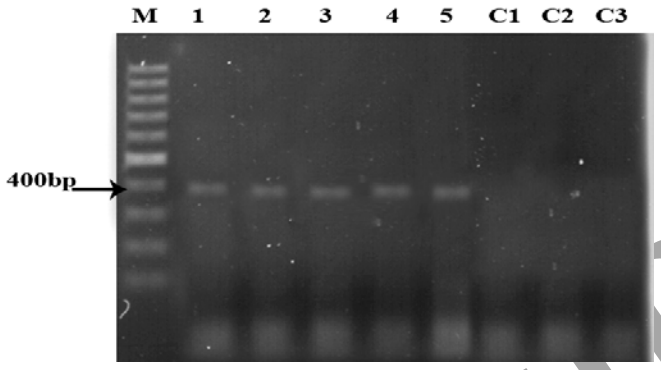
M مارکر ۵۰ جفت بازی اندازه DNA، ستون ۱: محصول استخراج از ژل که در آن باند ۴۰۰ جفت بازی مشخص می باشد.

الکتروفورز محصول کلونی PCR های پلیت حاوی فاژمید نوترکیب، قطعه ی VHH ۴۰۰ جفت بازی را نشان داد و الکتروفورز محصول کلونی PCR های پلیت حاوی فاژمید بدون قطعه، باند مورد نظر را نشان نداد (تصویر شماره ۴). به منظور تخمین اندازه

Archive of SID

www.SID.ir

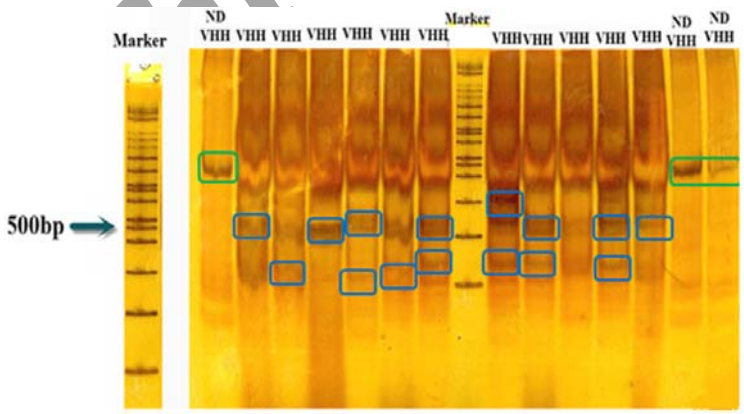
کتابخانه ی تولید شده کلونی های یک پلیت شمارش شد و بر اساس ضریب رقت انتخاب شده، نسبت کل کلونی های کتابخانه تعیین شد. بر این اساس، اندازه کتابخانه ی تولید شده، 10^5 کلون در یک میلی لیتر محیط کشت حاوی باکتری، تخمین زده شد.



تصویر شماره ۴: الکتروفورز محصولات واکنش کلونی PCR قطعه ی VHH توسط پرایمرهای FR1CAM و FR4CAM.

پیکان محل باند موردنظر VHH را در اندازه ۴۰۰ جفت بازی را نشان می دهد. ستون های شماره ۱ تا ۵ کلونی های انتخاب شده از پلیت حاوی فاژمید نوترکیب و C1، C2 و C3 کلونی های انتخاب شده از پلیت حاوی فاژمید بدون قطعه می باشند.

به منظور بررسی تنوع کتابخانه ی تهیه شده پس از هضم محصولات PCR توسط آنزیم ECORII، محصولات هضم شده در الکتروفورز ژل آکریل آمید بررسی شدند. قطعات حاصل از هضم آنزیمی دارای اندازه های متفاوت بودند و این قطعات در نمونه های هضم نشده دیده نشدند (تصویر شماره ۵).



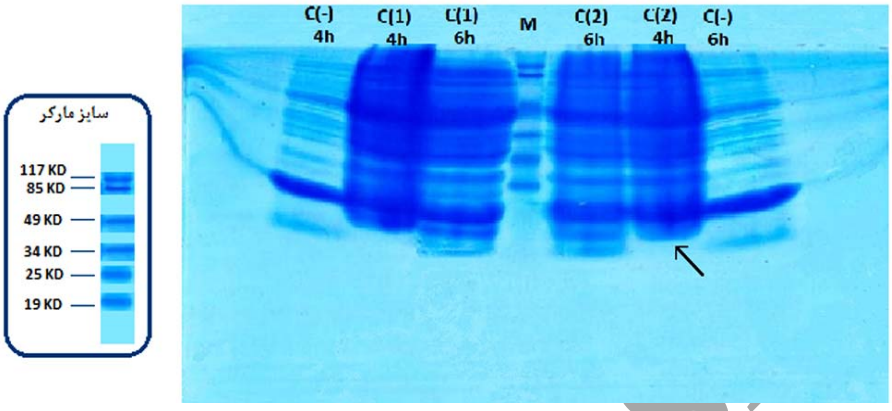
تصویر شماره ۵: الکتروفورز نتایج هضم محصولات PCR حاصل از انگشت نگاری آنزیمی در ژل آکریل آمید.

۸٪ V1 تا V11 محصولات PCR دارای قطعه ی VHH هضم شده توسط آنزیم ECOR II و ND VHH محصولات PCR هضم نشده می باشند که اندازه حدود ۴۰۰ جفت باز دارند. در مربع های مشخص شده، تفاوت برش ها در قطعات مختلف نشان داده شده است.

Archive of SID

www.SID.ir

تصویر ژل الکتروفورز نمونه های پروتئینی حاصل از استخراج وجود پروتئین VHH (با وزن مولکولی ۱۵ کیلو دالتون) را در کلونی های حاوی قطعه ی VHH نشان داد که می تواند نشانگر بیان موفق آنتی بادی ها در میزبان باشد (تصویر شماره ۶).



تصویر شماره ۶: ژل الکتروفورز محصولات پروتئینی استخراج شده از باکتری.

پیکان محل باند VHH با اندازه ی مولکولی ۱۵ کیلو دالتون را نشان می دهد؛ 4h-c(1) و 6h-c(1) پروتئین استخراج شده از کشت ٤ ساعته و ٦ ساعته کلونی شماره ی ۱؛ 4h-c(2) و 6h-(2) پروتئین استخراج شده از کشت ٤ ساعته و ٦ ساعته کلونی شماره ی ۲ و 4h-c(-) و 6h-c(-) پروتئین استخراج شده از کشت ٤ ساعته و ٦ ساعته کلونی کنترل منفی را نشان می دهند. بیان باند پروتئینی با وزن مورد نظر در کلون های ۱ و ۲ در مقابل عدم حضور آن در کنترل منفی مشخص است.

بحث:

نانو بادی مزایای متعددی نسبت به آنتی بادی های معمول دارد و می تواند جایگاه ویژه ای در زمینه ی تحقیقات بیوتکنولوژی، و همچنین در تشخیص بالینی و درمان داشته باشد. اندازه ی کوچک این آنتی بادی ها، ویژگی ساختاری منحصر به فرد، توانایی نفوذ بالا به درون بافت ها، شناسایی اپی تاپ های مخفی که از دسترس آنتی بادی معمول خارج هستند، تولید ارزان قیمت آن ها در باکتری و مخمر، حلالیت بالا، مقاومت در برابر شرایط محیطی شدید مثل دمای بالا و pH از جمله ویژگی های بی نظیر این آنتی بادی هاست. برای ساخت کتابخانه ی آنتی بادی ایمن، نواحی متغیر از لنفوسیت های B حیوان ایمن شده جدا می شوند. معمولا از کتابخانه های ایمن برای دستیابی به یک آنتی بادی بر ضد آنتی ژن هدف خاص مانند یک تومور مارکر استفاده می شود (۱۷).

اولین محققانی که موفق به کلون ژن VHH شدند، دکتر اربابی و همکاران بودند(۱۸). آن ها یک نوع آنتی بادی شتری به نام cAb-Lys3 تولید کردند که می توانست فعالیت لیزوزوم را در آزمایشگاه مهار کند. این نوع آنتی بادی توانست بطور موثری تومورها و ضایعات متاستاتیک حاصل از تومور مدل موشی که لیزوزیم را در سطح غشای خود بروز می داد، مهار کند. در مطالعه ای دیگر که توسط Vaneycken و همکاران انجام شد(۱۹)، ۳۸ نانو بادی مختلف که قادر بودند HER-2 را شناسایی کنند، تولید شد. برای این منظور، یک نفر شتر توسط پروتئین ترکیبی HER2-Fc ایمن شد. کتابخانه آنتی بادی ضد آن تولید و نانو بادی های اختصاصی HER-2 شناسایی شدند. درادامه اثر آنتی بادی های شناسایی کننده HER-2 بر روی مدل های

Archive of SID

www.SID.ir

موشی دارای تومورهای سرطان پستان و کبد بررسی شد. طبق این بررسی مشاهده شد که این نانوبادی ها قادرند با تمایل بالایی به آنتی ژن های توموری متصل شوند و نقش قابل توجهی در کاهش رشد تومور و متاستاز آن داشتند. علاوه بر این سرعت پاکسازی آن ها از خون بالا و تجمع آن ها در اندام های غیر هدف پائین بود.

در مطالعه ی حاضر، کتابخانه ی VHH بر ضد آنتی ژن های توموری سرطان سینه ساخته شد. برای این منظور، رده سلولی SKBR3 برای اولین بار برای ایمن کردن شتر استفاده شد. این رده سلولی حاوی آنتی ژن های توموری سرطان سینه از جمله HER-2 می باشد. پس انتظار می رود که کتابخانه ی VHH حاصل شده حاوی آنتی بادی های مختلف بر ضد انواع آنتی ژن های موجود در رده سلولی آدنوکارسینومای سینه باشد. به علاوه انواع آنتی ژن های غیر توموری دیگر موجود در این سلول ها می توانند محرک تولید آنتی بادی در شتر باشند که در مرحله غربالگری کتابخانه می توان آنتی بادی مورد نظر را جدا کرد. برای داشتن حداکثر کلون های حاوی قطعه VHH در کتابخانه از روش الکترو پوریشن برای ترنسفورم کردن باکتری ها استفاده شد. همچنین برای بررسی تنوع آنتی بادی های حاصل، از روش برش آنزیمی با EcoR II استفاده شد که بدلیل تعداد کم نوکئوتید در محل برش و نیز امکان برش A یا T در یک جایگاه، قطعات بیشتری را تولید کرده و تنوع را در توالی های مختلف نشان می دهد.

اندازه بزرگ کتابخانه حاصل که حاوی 10^5 کلون حاوی قطعه می باشد و نیز تنوع مشاهده شده در آن که با روش انگشت نگاری DNA مشخص شد احتمال رسیدن به آنتی بادی های مختلف را افزایش می دهد.

نتیجه گیری:

آنتی بادی های شتری به دلیل خواص منحصر به فردی مانند اندازه کوچک، قدرت نفوذ بیشتر به بافت ها، گزینه ی بسیار مناسبی به منظور ردیابی مارکرهای توموری می باشند. کتابخانه ی VHH ساخته شده در این پژوهش از طحال شتر ایمن شده با رده سلولی SK-BR-3 که لاین سلولی آدنو کار سینومای سرطان سینه انسان می باشد، بدست آمد. لذا به دلیل اختصاصیت زیاد VHHها بر ضد آنتی ژن های هدف و با توجه به بیان بالای آنتی بادی های تک دمین شتر در سیستم پروکاریوتی و تنوع و اندازه ی مناسب کتابخانه ی ساخته شده، امید می رود که در مطالعات بعدی موفق به جداسازی کلون های بیان کننده ی آنتی بادی های بسیار اختصاصی و توانمند ضد مارکرهای توموری به ویژه HER-2 شویم.

تشکر و قدردانی:

بدینوسیله از دانشگاه شهرکرد بخاطر حمایت های مالی سپاسگذاریم. همچنین از جناب آقای دکتر دوستی بخاطر همکاری صمیمانه در انجام مراحلی از این تحقیق قدردانی می نماییم.

منابع:

1. Roitt IM, Delves PJ. Roitt's essential immunology. Oxford: Blackwell Pub; 2001.
2. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. Nature. 1983 Apr 14; 302(5909): 575-81.
3. Padlan EA. X-ray crystallography of antibodies. Adv Protein Chem. 1996; 49: 57-133.
4. Shaker GH. Evaluation of antidiphtheria toxin nanobodies. Nanotechnol Sci Appl. 2010; 3: 29-35.
5. Decanniere K, Desmyter A, Lauwereys M, Ghahroudi MA, Muyldermans S, Wyns L. A single-domain antibody fragment in complex with RNase A: non-canonical loop

Archive of SID
www.SID.ir

structures and nanomolar affinity using two CDR loops. Structure. 1999 Apr 15; 7(4): 361-70.
6. Muyldermans, S, Atarhouch, T, Saldanha, J, Barbose JA, Hamers R. Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobu-lins lacking light chains. Protein Eng. 1994; 7(9):1129–35.
7. Padlan EA. Anatomy of the antibody molecule. Mol Immunol. 1994 Feb; 31(3): 169-217.
8. Tillib SV. "Camel nanoantibody" is an efficient tool for research, diagnostics and therapy. J Mol Biol. 2011; 45(1): 66–73.
9. Deffar K, Shi H, Li L, Wang X, Zhu X. Nanobodies - the new concept in antibody engineering. Afr J Biotech. 2009; 8(12): 2645-2652.
10. Muyldermans S, Baral TN, Retamozzo VC, De Baetselier P, De Genst E, Kinne J, et al. Camelid immunoglobulins and nanobody technology. Vet Immunol Immunopathol. 2009 Mar 15; 128(1-3): 178-83.
11. Roovers RC, Laeremans T, Huang L, De Taeye S, Verkleij AJ, Revets H, et al. Efficient inhibition of EGFR signaling and of tumour growth by antagonistic anti-EFGR Nanobodies. Cancer Immunol Immunother. 2007 Mar; 56(3): 303-17.
12. Kolkman J, Debbie A. Nanobodies – from llamas to therapeutic proteins. Drug Discovery Today: Technol. 2010; 10: 139-149.
13. Behar G, Chames P, Teulon I, Cornillon A, Alshoukr F, Roquet F, et al. Llama single-domain antibodies directed against nonconventional epitopes of tumor-associated carcinoembryonic antigen absent from nonspecific cross-reacting antigen. FEBS J. 2009 Jul; 276(14): 3881-93.
14. Goldman ER, Anderson GP, Liu JL, Delehanty JB, Sherwood LJ, Osborn LE, et al. Facile generation of heat-stable antiviral and antitoxin single domain antibodies from a semisynthetic llama library. Anal Chem. 2006 Dec; 78(24): 8245-55.
15. Zhou H, Zhang YL, Lu G, Ji H, Rodi CP. Recombinant antibody libraries and selection technologies. N Biotechnol. 2011 Sep; 28(5): 448-52.
16. Fogh J, Wright WC, Loveless JD. Absence of hela cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. J Natl Cancer Inst. 1977; 58(2): 209-214.
17. Chester KA, Begent RHJ, Robson L, Keep P, Pedley RB,Boden JA, et al. Phage libraries for generation of clinicallyuseful antibodies. Lancet. 1994; 343: 455–6.
18. Arbabi Ghahroudi M, Desmyter A, Wyns L, Hamers S, Muyldermans S. Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. FEBS Letts.1997; 14: 521-26.
19. Vaneycken I, Devoogdt N, Van Gassen N, Vincke C, Xavier C, Wernery U. et al. Preclinical screening of anti-HER2 nano bodies for molecular imaging of breast cancer. FASEB J. 2011; 25(7): 2433-46.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Shahrekord University of Medical Sciences
(J Shahrekord Univ Med Sci) 2014 Apr, May; 16(1): 21-30.

Original article

Construction of single domain camel antibody library against breast cancer cellular antigens

Ayat1 H(PhD)[1]*, Musavian SA(MSc)[1], Ahadi AM(PhD)[1], Behvandi E(MD)[2], Pirali KH(PhD)[2], Mahzounieh MR(PhD)[2]

[1] Genetics Dept., Shahrekord University; Shahrekord, I.R. Iran; [2]Pathobiology Dept., Shahrekord University, Shahrekord, I.R. Iran

Received: 20/May/2013 Accepted: 2/Nov/2013

Background and aims: VHH (Nanobody) is a camel antibody and is the smallest unit binding to antigen. The small size of nanobodies is the greatest advantage that makes easy genetic manipulation of them. The main aim of this study was construction of a single domain antibody library from camel immunized with human breast adenocarcinoma-SKBR3 cell line.

Methods: At first, in this experimental study, SKBR3 cell extract was subcutaneously injected to a camel in three rounds. Then, total RNA was extracted from spleen of camel and VHH fragments synthesized and amplified using RT-PCR method. The VHH fragments were inserted into Pcomb3X phagemid and recombinant constructs were electroporated into DH5α bacteria. Diversity of provided library was studied by enzymatic fingerprinting techniques. Finally, VHH expression was analyzed by SDS-PAGE.

Results: In this study, a camel antibody library with 105 colonies was constructed. Also, the enzymatic fingerprinting showed a high diversity in this antibody library. Primary studies by SDS-PAGE showed that VHH protein with a molecular weight of 15 kDa is expressed in transformant bacteria.

Conclusion: Providing an immune antibody library against SKBR3 cell line makes an option for isolation of specific VHH antibodies against different breast cancer antigens.

Keywords: **Breast cancer, Camel antibody library, VHH.**

Archive

Cite this article as: Ayat H, Musavian SA, Ahadi AM, Behvandi E, Pirali KH, Mahzounieh MR. Construction of single domain camel antibody library against breast cancer cellular antigens. J Shahrekord Univ Med Sci. 2014 Apr, May; 16(1): 21-30.

[*]**Corresponding author:**
Genetics Dept., Shahrekord University; Shahrekord, Iran. Tell: +989122258211, Email: ayat-h@sci.sku.ac.ir

www.SID.ir