فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۳۲، جلد ۹، شماره ۱، زمستان۹۴، صفحه ۱۷ تا ۲۵

غربال‌گری آنتی‌بادی انسانی بر علیه توکسین کزاز با روش نمایش فاژی

حمیده روحانی نژاد[۱]، جلیل فلاح مهرآبادی[۲]، معصومه بزاز[۱]
۱–پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران. ایران.
۲–گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه قم، قم. ایران. j. fallah@qom.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹٤/۷/٤ تاریخ پذیرش:۹٤/۱۲/۵

چکیده

مقدمه و هدف: توکسین کزاز یکی از سمی‌ترین موادی است که بر روی سیستم اعصاب مرکزی تاثیر دارد و باعث انقباض شدید عضلات می‌شود. بنابراین، تشخیص سریع و درمان نورو توکسین‌های تتانوس ضروری به نظر می‌رسد. امروزه آنتی‌بادی‌ها در حوزه‌های تشخیص و درمان جایگاه ویژه‌ای را به خود اختصاص داده‌اند. در این میان، آنتی‌بادی‌های منوکلونال کاملاً انسانی به دلیل عدم برانگیختن پاسخ ایمنی در بدن و کارایی بالا در درمان بیماری‌ها مورد توجه قرار گرفته شده است. بلوغ تمایلی آنتی‌بادی‌ها کاربرد آن‌ها را در پزشکی و پروژه‌های تحقیقاتی تسهیل نموده است. در این مطالعه، هدف ما غربال‌گری آنتی‌بادی کزاز با استفاده از روش نمایش فاژی و یافتن کاربرد قطعات آنتی‌بادی جدا شده از کتابخانه ایمن در ابزار تشخیصی و درمانی می‌باشد.

روش کار: در تحقیق پیش‌رو، به‌وسیله‌ی روش نمایش‌فاژی غنی‌سازی و غربال‌گری آنتی‌بادی منوکلونال نوترکیب انسانی از یک فرد واکسینه با توکسوئید کزاز انجام گرفته شد. کتابخانه با وکتور بیانی pSEX81 ساخته و برای غربال‌گری در این کتابخانه، غنی‌سازی با استفاده از روش نمایش فاژی انجام شد.

یافته ها: فاژ کمکی M13K07 با تیتر 10^{13} pfu/ml آماده و توکسین تتانوس در میکروپلیت پوشش داده شد. روند غنی‌سازی با استفاده از ذرات فاژ انجام و دقت فرآیند غنی‌سازی توسط فاژ ELISA تایید گردید. تنها کلون با جذب نوری بالا از چرخه غنی‌سازی جدا شد. برای جداسازی آنتی‌بادی های کزاز، ابتدا استخراج وکتور از کتابخانه انجام شد. پس از آن، پنج مرحله غنی‌سازی صورت گرفت. قوی‌ترین غنی‌سازی در چرخه چهارم رخ داد و وجود آنتی‌بادی کزاز را تایید نمود. در مجموع ۵۰ تک کلنی به صورت تصادفی از این چرخه انتخاب و ۲۰ کلون با اتصال قوی انتخاب و توالی‌یابی شدند.

نتیجه گیری: در این مطالعه، هدف ما غربال‌گری آنتی‌بادی کزاز با استفاده از روش نمایش فاژی و یافتن کاربرد قطعات آنتی‌بادی جدا شده از کتابخانه ایمن در ابزار تشخیصی و درمانی می‌باشد.

واژه های کلیدی: کزاز، غنی‌سازی، نمایش فاژی

مقدمه

بعد از گذشت حدود ۲۵ سال از ساخت آنتی‌بادی-های منوکلونال امروزه این مواد شاخص یکی از وسیع-ترین عوامل درمانی علیه انواع بیماری‌های انسانی از جمله سرطان محسوب می‌شوند(۱۴). آنتی بادی‌ها برای سالیان متمادی است توجه پژوهشگران را به خود جلب نموده‌اند و یکی از زمینه‌های تحقیقاتی بسیار فعال را تشکیل می-دهند. آنتی‌بادی‌ها به دو گروه پلی‌کلونال و منوکلونال تقسیم می‌شوند(۷). آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال مجموعه‌ای از آنتی‌بادی‌ها با ویژگی و خصوصیات متفاوت علیه اپی-توپ‌های مختلف یک آنتی‌ژن می‌باشند. هر آنتی‌بادی ویژگی و خصوصیات خاص خود را در مجموعه آنتی-بادی پلی‌کلونال دارد. ناهمگونی خصوصیات آنتی‌بادی-های پلی‌کلونال تا حدودی استفاده درمانی آن‌ها را محدود و کاربرد آن ها را در تشخیص رایج نموده است. در روش‌های نوین تولید آنتی‌بادی منوکلونال امکان دستکاری ژنتیکی مولکول آنتی‌بادی مانند کاهش اندازه و ایمنوژنیسیتی مولکول، تک زنجیره‌ای نمودن آن و افزایش میل ترکیبی را می‌توان فراهم نمود، به این نوع

آنتی‌بادی‌ها، آنتی‌بادی‌های نوترکیب اطلاق می‌گردد. انواعی از روش‌های مهندسی آنتی‌بادی که در طی سال-های اخیر ارائه شده است به هیبریدسازی، انسانی-سازی(Humanization)، نمایش فاژی(Phage Display)، حیوانات ترانسژنیک، نمایش mRNA، نمایش ریبوزوم(Ribosome Display)، کمپلکس پروتئین–DNA-mRNA می توان اشاره نمود. از میان روش های ذکر شده تهیه آنتی بادی نوترکیب به روش نمایش فاژی مورد نظر ما می‌باشد. نمایش فاژی روش نسبتاً جدیدی از تکنیک‌های مولکولی برای نمایش پروتئین‌ها بر روی سطح باکتریوفاژ می‌باشد که در اواسط دهه ۱۹۸۰ توسط Smith معرفی شده است(۷). در سال ۱۹۹۱ Griffiths وMccafferty اقدام به بکارگیری این روش در مورد آنتی‌بادی‌ها نمودند. مراحل این روش در اصل تقلیدی از سیستم ایمنی هومورال بدن است. روند روش شامل تولید مخازن ژنی قطعه مورد نظر، کلون-سازی مخازن درحامل‌های فاژی یا فاژمیدی مناسب، جداسازی فاژهایی که دارای آنتی‌بادی بر علیه آنتی‌ژن مورد نظر هستند و تعیین خصوصیات آنتی‌بادی اختصاصی است(۸، ۶). فاژهای رشته‌ای، برای نمایان سازی قطعات آنتی‌بادی توصیف شده‌اند، اما استفاده از فاژهایی که به هنگام رها شدن از باکتری آن را تخریب نمی‌نمایند مانند دسته فاژهای خطی Ff مانند M_{13} از کاربرد گسترده‌تری برخوردار است. حامل‌های فاژی به طور مستقیم مواد لازم برای ساخت فاژ را حمل می‌کنند ولی نیاز به یک آلودگی ثانویه(Superinfection) با فاژ دارند تا بسته‌بندی(Packing) موفقیت آمیز باشد. پس از این که عمل بسته بندی انجام شد فاژ در باکتری شروع به تکثیر کرده و به واسطه جوانه‌زدن از باکتری خارج گشته و وارد محیط کشت می‌شود. امروزه این روش در تولید آنتی‌بادی‌های تک دودمانی اهمیت و جایگاه فوق العاده-ای پیدا نموده است که دلیل آن راحتی کار با سلول‌های پروکاریوتی و امکان تولید انبوه می‌باشد. آنتی‌بادی تولید شده با این روش می‌تواند به صورت متصل به پروتئین III سطح فاژ و یا آن‌که با تغییر در سویه باکتری به صورت محلول ترشح گردد(۹، ۷). *کلستریدیوم تتانی* باکتری عامل کزاز، در خاک قابلیت زیست دارد. مسمومیت حاصل از این باکتری‌ها به طور معمول کاملاً موضعی و در محل ورود اسپور باکتری است. کزاز یک بیماری کاملاً قابل کنترل است و از طریق تزریق واکسن کزاز صورت می گیرد. عامل بیماری آن تتانواسپاسمین است که یک نوروتوکسین می‌باشد. گروه کربوکسیل انتهایی پلی‌پپتید زنجیره سنگین این توکسین به طور غیر قابل برگشتی به دو مولکول گانگلیوزید سلول‌های عصبی متصل می‌شود و بدین وسیله به درون سلول‌های عصبی راه می‌یابد و با عبور از سیناپس‌های عصبی از طریق سیستم انتقال برگشتی در آکسون، به نخاع و بعد به ساقه مغز می‌رسد. توکسین در پایانه‌های سلول‌های مهاری که شامل نورون‌های بینابینی ترشح کننده‌ی گلایسین و گاما آمینو بوتیریک اسید می‌باشند، انتشار می‌یابد. این دو ماده، عامل تنظیم انقباضات عضلات هستند. توکسین باعث تخریب پروتئین سیناپتوبروین که برای ادغام وزیکول‌های حاوی واسطه‌های عصبی با غشای پیش سیناپسی الزامی است، می شود که نتیجه‌ی آن هیپر رفلکسی، اسپاسم عضلانی و فلج اسپاستیک می باشد(۱۶، ۱۳). برای درمان توکسین بلافاصله پس از آلودگی باید تتابولین تزریق نمود. تتابولین از سرم افراد های پرایمیون گرفته می‌شود، لذا امکان ایجاد واکنش های آلرژی زا می باشد. در این تحقیق هدف تولید آنتی بادی منوکلونال انسانی با روش نمایش فاژی می‌باشد و استفاده از این آنتی‌بادی‌ها در حوزه‌ی تشخیص و درمان است.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در دانشگاه صنعتی مالک اشتر توسط گروه تحقیقاتی انجام شد.

تهیه کتابخانه‌ی فاژ نوترکیب

ابتدا پس از خون گیری از فرد ایمن با توکسوئید کزاز لنفوسیت‌ها از خون محیطی جدا و RNA آن‌ها استخراج و ژن‌های متنوع ناحیهٔ متغیر زنجیره‌های سبک و سنگین آنتی‌بادی به روش RT-PCR تکثیر شدند. قطعات VH و VL حاوی جایگاه برش آنزیمی هر کدام به طور جداگانه در وکتور pSEX81 کلون و برای انجام مراحل غربال‌گری بر سطح فاژ به نمایش گذاشته شدند(۱۴).

تکثیر و تیتر فاژ $M_{13}KO_7$

فاژ کمکی استفاده شده در این تحقیق Amersham $M_{13}KO_7$ (US) است. برای تکثیر این فاژ به فالکون۵۰ میلی لیتری، ۱۰ میلی‌لیتر از محیط SB و ۱۰۰ میکرولیتر از باکتری *اشریشیاکلی* XL_1-Blue اضافه و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با دور ۲۵۰ قرار داده تا جذب نوری آن در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۵ برسد. سپس یک میکرولیتر از فاژ $M_{13}KO_7$ به همراه کانامایسین ۵۰ µg/ml به فالکون مرحله قبل اضافه و به مدت یک شب در ۳۷ درجه سانتی گراد و دور ۲۵۰ قرار داده شد. محیط کشت حاوی فاژ به فالکون ۵۰ میلی‌لیتری منتقل و در rpm ۴۵۰۰ به مدت ۲۵ دقیقه سانتریفیوژ و محلول روئی که حاوی فاژ است به لوله‌ی جدید منتقل و در ۴ درجه سانتی گراد ذخیره گردید. به منظور تعیین تیتر فاژ کمکی، ۵ میلی‌لیتر محیط SB با ۵۰ میکرولیتر باکتری *اشریشیاکلی* XL_1-blue آلوده و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و با دور ۲۵۰ گرماگذاری شد تا جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۵برسد. از فاژ تهیه‌شده رقت‌های 10^{-2}، 10^{-4}، 10^{-6}، 10^{-8}، 10^{-10} در محیط SB تهیه و ۱۰ میکرولیتر از هر رقت به ۲۰۰ میکرولیتر از باکتری کشت شده با جذب نوری ۰/۵ اضافه گردید. لوله‌های مذکور به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری شدند. ۳ میلی‌لیتر از محیط LB TOP Agar که دمای آن به ۴۲ درجه سانتی گراد رسیده بود را به محلول باکتری و فاژ مرحله قبل اضافه کرده و پس از مخلوط کردن آن به پلیت LB Agar حاوی کانامایسین(۷۰ g/ml) اضافه و به مدت یک شبانه روز در دمای ۳۷درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. شمارش کلنی از روی پلیت‌ها انجام و تیتر فاژ به دست آمده، تعیین گردید.

رهاسازی و تخلیص فاژ نوترکیب و تعیین اندازه آن

وکتورهای فاژمیدی از جمله pSEX81 برای رهایی از باکتری نیاز به فاژ کمکی دارند. تمام کلنی‌های کتابخانه‌ی فاژ نوترکیب به ۲۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت SB حاوی آمپی‌سیلین(۸۰ g/ml) منتقل و پس از رسیدن به جذب نوری ۰/۵ در طول موج ۶۰۰ نانومتر، ۳ تا ۴ میلی‌لیتر فاژ کمکی تهیه شده به آن اضافه و پس از اضافه نمودن کانامایسین ۵۰ µg/ml در دمای ۳۷ درجه سانتی-گراد و دور ۲۵۰ به مدت یک شب قرار داده شد. محیط کشت باکتری در ۴۰۰۰rpm به مدت ۲۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ و محیط رویی برای تخلیص فاژ به ظرف جدید منتقل گردید. برای تخلیص فاژ به محیط رویی به میزان ۲۰ درصد حجم، ۸۰۰۰ واحد PEG و کلرید سدیم استریل اضافه و به مدت ۱۲۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد. مخلوط مرحله قبل به مدت ۲۵ دقیقه در ۱۴۰۰۰rpm سانتریفیوژ و محلول رویی تخلیه و رسوب حاصل در ۲ میلی‌لیتر محلول BSA یک درصد حل گردید. محلول رویی با استفاده از فیلتر ۰/۴ µm صاف و به میکروتیوپ‌های ۱/۵ میلی لیتری منتقل شد.

غنی‌سازی با استفاده از آنتی‌ژن تثبیت شده بر سطوح چاهک پلیت الایزا

۱۰۰میکرولیتر از محلول توکسوئید کزاز در هر چاهک پلیت افزوده و به مدت یک شب در ۴ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. چاهک توسط بافر TBS(حاوی ۰/۰۵٪ توئین ۲۰) ۴ مرتبه شستشو و ۱۰۰ میکرولیتر محلول بلاک کننده(TBS حاوی ۰/۰۵گرم شیرخشک) به آن اضافه و یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری گردید. پس از تخلیه و

شستشو محلول بلاک کننده محلول کتابخانه فاژی به آن اضافه و ۲ ساعت در دمای اتاق گرماگذاری شد. سپس محلول رویی تخلیه و چاهک ۱۵-۱۰ بار(طی مراحل غنی‌سازی بهتر است تعداد شستشو و غلظت توین افزایش یابد) شستشو، به منظور رهایی فاژهای متصل به آنتی‌ژن ۱۰۰ میکرولیتر بافر Glycin– HCl با pH=۲/۲ به چاهک اضافه و ۱۰ دقیقه در دمای محیط گرماگذاری شد. محتویات چاهک که شامل فاژهای رها شده است توسط ۲۸ میکرولیتر بافر تریس با pH =۹ خنثی. در دمای۴ درجه سانتی گراد برای مراحل بعد نگه‌داری گردید. برای آلوده سازی مجدد باکتری با فاژ نوترکیب ۳۰ میکرولیتر از باکتری *اشریشیاکلی* XL1-Blue روی محیط LB مایع کشت و به مدت یک شب در ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری، سپس ۱ میلی‌لیتر از کشت باکتری مرحله قبل به ۲۰۰ میلی‌لیتر محیط SB مایع منتقل و در شرایط ۳۷ درجه سانتی گراد و دور ۲۵۰ تا هنگامی که شدت جذب نوری محیط در ۶۰۰nm به ۰/۵ برسد، گرماگذاری شد. پس از تهیه فاژ در انتهای هر مرحله از غنی‌سازی و آماده شدن باکتری در فاز لگاریتمی، نیمی از حجم فاژ به دست آمده به ۳۰ میلی لیتر از باکتری رشد یافته *اشریشیاکلی* XL1-Blue اضافه و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری و نیم ساعت بدون حرکت و نیم ساعت باقی مانده در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و با دور۲۵۰ در انکوباتور شیکردار قرار داده شد. سپس مقدار ۸۰µg/ml آمپی‌سیلین به محیط اضافه و مجدداً در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و دور ۲۵۰ به مدت یک ساعت گرماگذاری شد. به میزان ۱۰۰۰ Pfu/ml فاژ کمکی همراه با کانامایسین (۵۰µg/ml) اضافه و به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و دور۲۵۰ گرماگذاری گردید. فاژها مجدداً توسط NaCl و PEG ۸۰۰۰ واحد تخلیص و برای مرحله غنی‌سازی بعدی استفاده شد. به طور متوالی پنج بار مرحله غنی‌سازی تکرار گردید.

تایید کتابخانه پس از هر مرحله غربال‌گری توسط کلنی PCR

پس از هر مرحله غنی‌سازی، تک کلونی‌های حاصل روی محیط LB Agar حاوی آمپی‌سیلین(۸۰µg/ml) بررسی شد. برای بررسی ابتدا هر کلنی باکتری در داخل آب مقطر استریل وارد و خوب حل گردیده و در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه در ترموسایکلر قرار گرفت. پس از آن بقیه مواد به آن اضافه و با شرایط دمای واسرشت اولیه ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵´(۳۵ سیکل)، در هر سیکل دمای واسرشت ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰´´، دمای اتصال ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰´´ و دمای طویل‌سازی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱´ و دمای طویل‌سازی نهایی۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰´ دقیقه انجام گرفت تا از صحت انجام مراحل غربال‌گری اطمینان حاصل شود(جدول ۱).

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده برای انجام کلنی PCR

نام پرایمر	توالی
Primer forwar	CATGAAATACCTATTGCCTACG
Primer reverse	TGACAAGCTTGCGGCCGCGAAGAAGATGGTGCAGCCACAGT

الایزا پلی‌کلونال فاژی

این قسمت همانند مراحل غنی‌سازی تا پس از بافر بلاک کننده انجام شد. محلول فاژی تهیه شده(فاژهای تهیه شده بعد از هر مرحله غنی‌سازی) به چاهک‌ها اضافه و ۲ ساعت در دمای اتاق گرماگذاری شدند. محلول رویی تخلیه و چاهک‌ها ۳-۴ بار با بافر شستشوو به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی ضد باکتریوفاژ M_{13} کونژوگه(Anti- M13 HRP Conjugate)، اضافه کرده و ۶۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. محلول رویی تخلیه و چاهک‌ها شستشو و ۱۰۰ میکرولیتر محلول TMB(سوبسترا) به هر چاهک اضافه و ۳۰ دقیقه در۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری گردید. سپس ۱۰۰

میکرولیتر اسید سولفوریک ۳ نرمال برای توقف واکنش به هر چاهک اضافه و جذب نوری چاهک‌ها با دستگاه الیزا در طول موج ۴۵۰-۶۳۰ نانومتر سنجش شد. برای کنترل منفی به جای فاژ نوترکیب از فاژ M_{13} خالی، برای کنترل مثبت از نمونه مثبت به جای فاژ نوترکیب و برای شاهد به جای فاز نوترکیب و آنتی‌بادی ضد باکتریوفاژ M_{13} کونژوگه بافر TBS استفاده شد.

غربال‌گری فاژهای مناسب و انجام الایزا منوکلونال فاژی

ابتدا از پلیت‌های مربوط به مرحله‌ی پنجم غنی-سازی(پلیت‌هایی که کمتر از ۱۰۰ کلنی دارا هستند)، تعداد ۱۰ کلونی انتخاب و هر کدام در ۳۰ میلی لیتر محیط کشت SB کشت داده و پس از رسیدن باکتری به فاز لگاریتمی، ۱ میلی لیتر فاژ کمکی همراه با کاناماسین(۵۰µg/ml) به محیط اضافه و یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و دور ۲۵۰ گرماگذاری و سپس فاژها تخلیص شدند(این مرحله ۳ بار تکرار شد). الایزا منوکلونال فاژی نیز مانند پلی‌کلونال فاژی انجام گردید.

نتایج

تعیین اندازه کتابخانه

با شمارش کلنی‌های روی محیط جامد، اندازه کتابخانه $۸/۷۷ \times ۱۰^{۷}$ pfu/ml به دست آمد.

تعیین تیتر فاژ

تیتر فاژ $M_{13}KO_7$ پس از تکثیر به صورت زیر تعیین شد که در آن v حجمی از فاژ رقیق شده که به کشت باکتری اضافه می‌شود و d رقت فاژ محسوب می گردد.

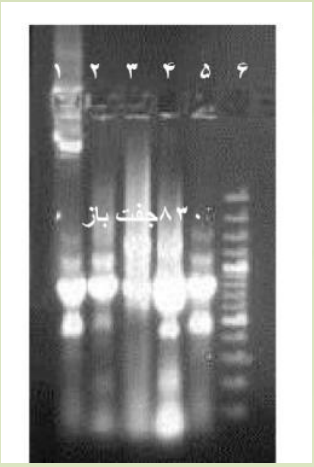
$$\text{تیتر فاژ (pfu/ml)} = \frac{\text{تعداد پلاک‌ها (pfu)} \times (1000\mu l/ml)}{v(\mu l) \times d} = ۳۲ \times ۱۰۰۰/۱۰ \times ۱۰^{-۱۰} = ۳/۲ \times ۱۰^{۱۳}$$

تایید وجود ژن در کتابخانه پس از هر مرحله غربال-گری با روش کلنی *PCR*

برای تایید وجود ژن در کتابخانه‌های غربال شده پس از هر مرحله، به طور تصادفی بر روی تعدادی از کلون‌ها، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز انجام شد(شکل ۱).

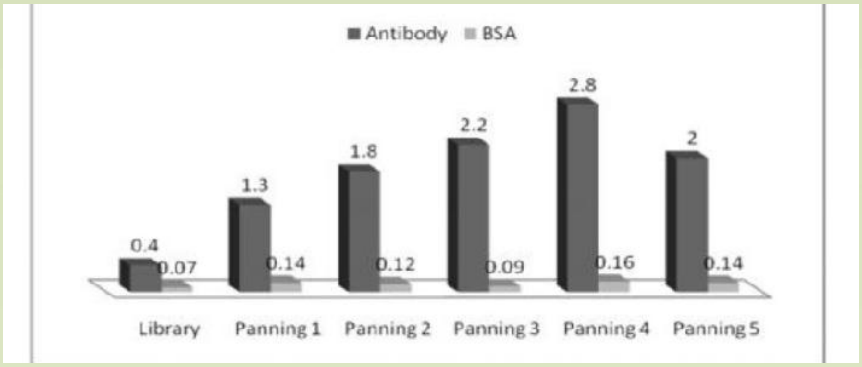
ارزیابی پیشرفت مرحله غنی‌سازی کتابخانه فاژی توسط انجام فاژ الیزا پلی‌کلونال

هدف از مرحله غنی‌سازی، افزایش امکان انتخاب کلون‌هایی است که بیشترین تمایل را به توکسوئید کزاز داشته باشد. الایزا پلی‌کلونال فاژی بر روی فاژهای به دست آمده از هر مرحله غنی‌سازی، با استفاده از آنتی‌ژن مورد نظر برای ارزیابی پیشرفت مراحل غنی‌سازی، انجام شد. نتایج این آزمایش در نمودار۱ نشان داده شده است.



شکل۱- نتایج کلنی PCR برای غربال‌گری‌های مراحل۱، ۲، ۳، ٤، ۵.

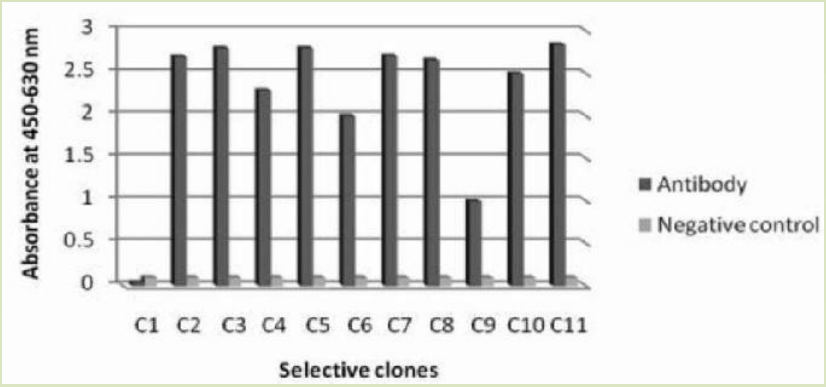
ردیف ۱. مارکر۱۰۰جفت باز، ردیف ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶ مراحل غربال‌گری.



نمودار ۱- نتایج حاصل از الایزا پلی‌کلونال فاژی به دست آمده بعد از هر مرحله غنی‌سازی

فاژ الایزا منوکلونال جهت غربال‌گری یا انتخاب فاژهایی با بیشترین تمایل به آنتی‌ژن

برای انتخاب و جداسازی فاژهای دارای تمایل بالا به آنتی‌ژن، ۴۰ کلونی از مرحله چهارم غنی‌سازی انتخاب و تکثیر فاژهای حاصل از هر کلونی انجام گرفت. سپس بر روی محلول‌های منوکلونال فاژی، الایزا انجام شد. چند کلونی با بیشترین تمایل به آنتی‌ژن انتخاب و برای تولید scfv در فاز محلول مورد استفاده قرار گرفت. نمودار ۲ نتایج حاصل از فاژ الایزای ۱۱ کلونی که دارای بیشترین جذب نوری است را نشان می دهد.



نمودار۲- نتایج حاصل از الایزای ۱۱ کلونی از مرحله چهارم غنی‌سازی که به صورت تصادفی انتخاب شده‌اند.

بحث و نتیجه گیری

امروزه آنتی‌بادی‌های تک دودمانی(Monoclonal antibodies) دارویی براساس یک قانون مشخص جهت عرضه در اروپا، امریکا و سایرکشورهای دیگر تصویب می‌شوند. تعداد زیادی آنتی‌بادی تک دودمانی در دسترس پزشکان و بیماران می‌باشد که آمار گرفتن آن‌ها از نقطه نظر تعداد، انواع، رده‌های سلول تولیدکننده(Production cell lines) آن، آنتی‌ژن مورد شناسایی، زمان و مکان تصویب چالش برانگیز می‌باشد. تا مارس ۲۰۱۲، ۳۴ آنتی‌بادی تک دودمانی در اروپا و آمریکا و یک آنتی‌بادی تک دودمانی در خارج از این دو ناحیه تصویب شده است. از این ۳۴ آنتی‌بادی، ۲۸ مورد در بازار اروپا و آمریکا وجود دارند و شش مورد از این آنتی‌بادی‌هاتصویب شده ولی به دلایل مختلف، تولید آن‌ها متوقف گردیده است(۸). اولین آنتی‌بادی انسانی در دهه ۱۹۸۰ توسعه داده شد، اما موفقیت تجاری و

آزمایشگاهی به دست نیاورد. پیشرفت در فناوری برای تولید مولکول‌های مورد مطالعه در دهه ۱۹۹۰، خصوصاً فناوری موش تراریخته و فناوری نمایش مخمری یا فاژی(Yeast or phage display)، پیشرفت آنتی-بادی‌های تک دودمانی انسانی را توسعه بخشید(۱۲، ۴). در این پروژه، تهیه آنتی‌بادی انسانی با استفاده از تکنیک نمایش فاژی می‌باشد. امروزه بیشترین تمایل برای تهیه آنتی‌بادی‌های درمانی، استفاده از آنتی بادی‌های کاملاً انسانی است. مگر در مواردی که مسئله اخلاقی در زمینه ایمن‌سازی انسان وجود داشته باشد چرا که واکنش‌های حساسیتی شدید(Hypersensivity)، کمپلکس‌های ایمنی خون و پاسخ‌های ضد ایمونوگلبولین کمتر ایجاد می‌گردد. برای این کار معمولاً از دو روش استفاده می-شود. آنتی‌بادی‌ها یا از فناوری نمایش‌فاژی کتابخانه انسانی و یا از فناوری هیبریدوما حاصل می‌شوند. به طوری که بیشتر آنتی‌بادی‌های درمانی که به تازگی تهیه شده است یا از کتابخانه ژنی خود انسان می‌باشد و یا از هیبریدومایی که در اثر الحاق سلول‌های حاصل از موش-های تراریختی(Transgenic) یا کتابخانه آنتی‌بادی انسانی تهیه شده‌اند، تهیه می‌شود. بنابر این کتابخانه ژنی انسانی، منبع مهمی برای تهیه آنتی‌بادی‌های تک دودمانی انسانی هست. بیش از ۳۰ درصد آنتی‌بادی‌های درمانی از کتابخانه ژنی تهیه شده‌اند. روش‌های قدیمی ترنسفرم کردن سلول‌ها با ویروس ابشتین بار و یا با استفاده از هیبریدوما گاهی باعث ایجاد دودمان‌های سلولی می‌شدند که تنها سطح کمی آنتی‌بادی تولید می‌نمود و یا گاهی آنتی‌بادی‌های تولید شده بسیار ناپایدار بودند(۱۰، ۲). در حال حاضر، برای تهیه آنتی‌بادی‌های انسانی بیشتر از روش نمایش‌فاژی استفاده می‌شود چرا که بسیاری از محدودیت‌های روش‌های قبلی را ندارد. بیماری کزاز توسط *کلستریدیوم تتانی* که یک نوروتوکسین قوی تولید می‌کند، ایجاد می‌گردد(۱). آلودگی در انسان از طریق اسپورهای باکتری که وارد بافت آسیب دیده می-شود، رخ می‌دهد. به دلیل مسدود شدن نورون‌های مهاری توسط توکسین کزاز، فلج سفت ایجاد می‌شود. فعالیت نورون‌های حرکتی توسط این نورون‌های مهاری تنظیم می‌گردد، در نتیجه این توکسین سبب فلج ماهیچه-ها می‌شود(۳). بیماری کزاز توسط واکسن آن قابل پیشگیری است و یادآور ده ساله واکسن جهت حفظ مصونیت ضروری است بسیاری از افراد یادآور دریافت نمی‌کنند. به این دلیل، در دنیا افراد زیادی در اثر بیماری کزاز جان خود را از دست می‌دهند(۵، ۱). با توجه به این شرایط، از تتابولین برای درمان استفاده می‌شود. در مورد توکسوئید کزاز، این امر به واسطه وجود واکسن کزاز، به آسانی میسر بود. با ابداع روش نمایش‌فاژی، انتخاب ژن خاص از میان مجموعه کتابخانه ژنی تا حدود بسیار زیادی تسهیل شده است. یکی از موفق‌ترین کاربردهای نمایش فاژی، جداسازی آنتی‌بادی‌های تک دودمانی از کتابخانه‌های بزرگ آنتی‌بادی بیان شده در سطح فاژ است(۱۵). اندازه‌ی کتابخانه ها در تحقیقات دیگری که با این روش صورت گرفته بود $۱۰^{۷}$(۲۱)، $۱۰^{۹}\times۲$(۱۸)، $۱۰^{۷}\times۴$(۱۹) و در تحقیق ما $۱۰^{۷}\times۸/۷$ pfu/ml بود که نشان دهنده‌ی کتابخانه ی بسیار غنی است. در ادامه این کتابخانه با استفاده از تکنیک نمایش‌فاژی، غربال‌گری انجام شد تا کلون‌هایی که تمایل بیشتری به توکسوئید کزاز دارند، شناسایی شوند. هدف غربال‌گری، ژنی بود که دارای بیش‌ترین تمایل نسبت به آنتی‌ژن مورد نظر است. در راستای این هدف بر روی کتابخانه آماده شده، ۵ مرحله غنی‌سازی انجام گرفت. در مراحل غنی‌سازی پس از رسیدن به میزان حداکثر، در نهایت فرآیند کاهشی پدید می‌آید. حداکثر غنی‌سازی برای این کتابخانه در مرحله‌ی چهارم غنی‌سازی به دست آمد. در اغلب تحقیقات، میزان حداکثر غنی‌سازی در مراحل ۳ تا

۵ غنی‌سازی به دست می‌آید. به طوری که با ادامه‌ی غنی‌سازی و در مراحل ۴ و ۵ از میزان غنی‌سازی کتابخانه کاهش یافته است. Tanha و همکاران گزارش کردند که با استفاده از روش‌های مهندسی پروتئین کتابخانه‌ای جهشی ساختند که در مرحله‌ی سوم غنی سازی به میزان حداکثری خود رسید(۲۰). هم چنین Ducancel (۱۷) و Noren (۱۱) نیز بیان داشتند که غنی-سازی در مرحله‌ی چهارم به میزان حداکثر خود رسید. عوامل متعددی مانند شدت شرایط شستشو، میزان خصوصیات آنتی‌بادی مورد نظر نسبت به آنتی‌ژن و سایر موارد تعیین کننده‌ی مرحله‌ای که در آن غنی‌سازی به میزان حداکثر خود می‌رسد دخالت دارند. هر چه شرایط شستشوی سخت تری برای انجام مراحل غنی‌سازی اعمال شود، ژن‌های دارای تمایل و اختصاصیت کمتر در غنی‌سازی‌های مراحل پایین‌تر حذف می‌شوند و غنی‌سازی زودتر به حداکثر میزان خود خواهد رسید. در انجام این تحقیق در طی مراحل غنی‌سازی، غلظت توئین مورد استفاده برای شستشو به تدریج افزایش یافت و سعی بر این بود که شرایط متعادلی در انجام مراحل غنی‌سازی به کار گرفته شود و با توجه به این که در مرحله‌ی چهارم غنی‌سازی به میزان حداکثر حاصل شد، نشان از وجود شرایط متعادل در طی غنی‌سازی بوده است. با ادامه‌ی این پروژه یعنی بیان ژن آنتی‌بادی، دست‌یابی به پروتئین، بررسی در سطح حیوانی و در نهایت، انجام مراحل بررسی‌های انسانی آن می‌توان به راحتی از آن برای درمان بیماران مبتلا به کزاز استفاده نمود. هم چنین با بهینه سازی روش نمایش فاژی با توجه به بازده بالای آن، تمایل و خصوصیات آنتی‌بادی منوکلونال می توان در طراحی و تولید سایر داروها استفاده نمود.

منابع

1.Alagappan, K. (2001). Tetanus: An Overview. Hospital Physician, 23-26.

2.Barbas, CF., Kang, AS., Lerner, RA., Benkovic, S. (1991). Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: The gene III site (combinatorial immunoglobulin repertoire/filamentous phage/surface expression/ human antibodies/catalytic antibodies) Biochemistry Proc. Natl. Acad. Sci, 88; 7978-7982.

3.Cook, TM., Protheroe, RT., Handle, JM. (2001). Tetanus: a review of literature. British Journal of Anaesthasia, 87; 477-488.

4.Dooly, H., Flajnik, MF., Porter, AJ. (2003). Selection and characterization of naturally occurring single-domain (IgNAR) antibody fragments from immunized sharks by phage display. Mol Immunol, 40(1); 25-33.

5.European Medicines Agency. Applications for new human medicines under evaluation by the Committee for Medicinal Products for Human Use 2012.

6.Hoogenboom, HR., de Bruine, AP., Hufton, SE., Hoet, RM., Arends, JW., Roovers, RC. (1998). Antibody phage display technology and its applications. Immuno Technolog, 4(1); 20.

7.Hones, J., Pluckthun, A. (1997). In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. Proc Natl Acad Scic USA, 94(10); 4937-42.

8.Howard, M. (1982). Antigen-induced B lymphocyte differentiation. CRC Critical Reviews in Immunology, 3(3);181.

9.Inbar, NH., Benhar, I. (2012). Selection of antibodies form synthetic antibody libraries. Archives of Biochemistry and Biophysics, 526(2); 87-98.

10. Meijer, PJ., Andersen, PS., Haahr Hansen, M., Steinaa, L. (2006). Isolation of human antibody repertoires with preservation of the natural heavy and light chain pairing. J. Mol. Biol, 358; 764–772.

11. Muller, BH., Savatier, A., L'Hostis, G., Costa, N., Bossus, M. (2011). In vitro affinity maturation of an anti-PSA antibody for prostate cancer diagnostic assay. Journal of Molecular Biology, 545-562.

12. Neelakantam, B., Sridevi, NV., Shukra, AM., Sugumar, P. (2014). Recombinant human antibody fragment against tetanus toxoid produced by Phage Display. European Journal of Microbiology and Immunology, 1 -4.

13.Rádis-Baptista, G., Kerkis, A., Prieto-Silva, ÁR., Furuie, HMA., Kerkis, I., Yamane, T. (2008). Membrane-translocating peptides and

toxins: from nature to bedside. Journal of Brazilian Chemistry Society, 19; 211-225.
14. Rouhani Nejad, H., Fallah Mehrabadi, J., Nourozi, J., Mahdavi, M. (2014). Construction of scFv library of human antibodies against tetanus toxin. Human Antibodies journal, 1–6.
15. Tang, Y., Jang, N., Parakh, C., Hilverts, D. (1996). Selection of linkers for a catalytic single-chain antibody using phage display technology. J.Biol. Chem, 271; 15682-15686.
16. Tuckey, CD., Noren, CJ. (2002). Selection for mutants improving expression of an anti-MAP kinase monoclonal antibody by filamentous phage display. Journal of Immunological Methods, 270(2); 247-257.
17. Turton, K., Chaddock, JA., Acharya, KR. (2002). Botulinum and tetanus neurotoxins: structure, function and therapeutic utility. Trends in Biochemical Sciences, 27; 552-558.
18. Van, WW., Malatji, T., Mashau, C., Fehrsen, J. (2004). A large semi-synthetic single-chain Fv phage display library based on chicken immunoglobulin genes. BMC Biotechnol, 1;4-6.
19. Weber, M., Bujak, E., Putelli, A., Villa, A. (2014). A highly functional synthetic phage display library containing over 40 Billion Human Antibody Clones. PLoS ONE , 10;1371.
20. Yamaguchi, Y., Hironaka, K., Okawaki, M., Okita, R., Matsuura, K. (2005). HER2-specific cytotoxic activated killer cells in the presence of trastuzumab. Anticancer Res, 25(2A); 827-32.
21. Yau, KY., Dubuc, G., Li, S., Hirama, T., Mackenzie, CR., Jermutus, L. (2005). Affinity maturation of a V HH by mutational hotspot randomization. Journal of Immunological Methods, 297(1); 213-224.