

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

نویسندگان: سارا مینائیان^۱، فاطمه رهبری زاده*^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

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

نویسنده مسئول: فاطمه رهبری زاده
Rahbarif@modares.ac.ir E-mail:

چکیده

مقدمه و هدف: ویروس پاپیلومای انسانی، عامل اصلی سرطان دهانه رحم است و به راحتی از فردی به فرد دیگر منتقل می‌شود. برای جلوگیری از انتشار این ویروس، نیاز به تشخیص زود- هنگام و حساس سرطان دهانه رحم به خوبی احساس می‌شود. هدف از این مطالعه، غنی‌سازی کتابخانه فاژی به منظور جداسازی نانوبادی‌های اختصاصی علیه پروتئین L1 ویروس پاپیلومای انسانی است. از این نانوبادی‌ها می‌توان در کیت‌های تشخیصی با حساسیت بالا برای سرطان دهانه رحم استفاده کرد.

مواد و روش‌ها: تکثیر فاژهای حاوی کتابخانه نانوبادی در باکتری Escherichia coli انجام شد و غنی‌سازی کتابخانه به کمک روش نمایان‌سازی فاژی صورت گرفت. به منظور 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 قرار گرفتند؛ سپس بهترین کلون‌ها از طریق روش مونوکلونال فاژ الایزا جداسازی شدند و با کمک تعیین توالی ژنی صحت آنها تأیید شد. 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 به اثبات رسید و در انتها، ۴ کلون به عنوان بهترین کلون‌ها انتخاب شدند.

نتیجه گیری: پس از سه مرحله غنی‌سازی، کتابخانه فاژمیدی علیه پروتئین L1 چهار سویه ویروس پاپیلومای انسانی غنی‌سازی شد.

واژگان کلیدی: نانوبادی، ویروس پاپیلومای انسانی، نمایان‌سازی فاژی، پروتئین L1

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

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

مقدمه

روش نمایان سازی فاژی، روشی بسیار قدرتمند برای نمایان کردن میلیون ها یا حتی میلیارد ها پپتید و پروتئین مختلف در کتابخانه های فاژی است. یکی از موفق ترین موارد استفاده از این روش که در سال های اخیر گسترشی فراوان داشته است، طراحی و ساخت کتابخانه های بزرگ فاژی حاوی آنتی بادی، غربالگری و انتخاب هوشمندانه آنتی بادی هایی با ویژگی های مورد نظر با بهره گیری از این کتابخانه هاست (۱).

به تازگی با پیشرفت هایی که در زمینه ساخت آنتی بادی های مونوکلونال صورت گرفته است امیدهایی تازه در درمان هدفمند و تشخیص زودهنگام بسیاری از بیماری ها از جمله سرطان ها حاصل شده است (۲ و ۳)؛ در واقع یکی از مهم ترین اهداف مهندسی آنتی بادی، تولید آنتی بادی هایی با اندازه کوچک تر، پایداری بالاتر و قدرت اتصال قوی تر است. یکی از انواع آنتی بادی های مونوکلونال، آنتی بادی های تک دومنی با منشاء شتری هستند که به دلیل اندازه کوچکشان نانوبادی نیز نامیده می شوند. نانوبادی ها ضخامتی در حدود ۲/۸ نانومتر و طولی معادل ۴/۴ نانومتر دارند؛ به عبارت دیگر، این پروتئین ها کوچک ترین قطعه اتصالی به آنتی ژن هستند که تنها دارای دومن متغیر از زنجیره سنگین بوده، در نبود زنجیره سبک، قادرند عملکرد خود را به خوبی حفظ کنند (۴). نانوبادی ها خصوصیات منحصر به فردی مانند حلالیت بالا (۵) و مقاومت و پایداری در برابر شرایط سخت دارند (۶). آنها برای آنتی ژن خود کاملاً اختصاصی عمل کرده، با اfinity بالا به آن می چسبند؛ همچنین به دلیل داشتن اندازه ای کوچک، قادرند به سرعت به بافت های مختلف نفوذ کنند (۷)؛ از مزایای دیگرشان اینکه تهیه کتابخانه فازمیدی از این پروتئین های کوچک به آسانی امکان پذیر است، در حالی که در حین تهیه کتابخانه از آنتی بادی های رایج، آرایش دومن-

های متغیر زنجیره های سبک و سنگین به میزان زیادی تغییر می کند (۸).

بر طبق آمارهای ارائه شده، پس از بیماری های 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 گزارش شده (۱۰). عامل اصلی ایجاد کننده سرطان دهانه رحم، آلودگی با ویروس پاپیلومای انسانی یا HPV (Human Papillomavirus) است، که دوسویه HPV۱۶ و HPV۱۸ باعث ایجاد ۷۰ درصد سرطان های دهانه رحم می شوند؛ همچنین سویه های HPV۶ و HPV۱۱ علت اصلی ایجاد زگیل های تناسلی هستند (۱۱). امروزه تشخیص زود هنگام و برنامه های دوره ای غربالگری، یکی از ضروری ترین راهکارها در برابر سرطان دهانه رحم به شمار می آید. متأسفانه برخی از پژوهش ها نشان می دهند که تست های مربوط به سلول شناسی، حساسیت کمی دارند؛ همچنین تست های مربوط به بررسی DNA ویروس پاپیلومای انسانی نیز از اختصاصیت پایینی برخوردارند که این امر موجب پیگیری های غیر ضروری مانند تکرار آزمایش ها می شود (۱۲ و ۱۳).

ویروس پاپیلومای انسانی DNA ویروس دو رشته ای است که تعدادی پروتئین اولیه و تأخیری را در بر می گیرد. پروتئین L1 که جزء پروتئین های ساختاری ساخته شده در فاز تأخیری است، قسمت اعظم پوشش سطحی ویروس را تشکیل می دهد؛ این پروتئین در انسان ایمونوژن بوده و علیه آن، آنتی بادی های خنثی کننده ایجاد می شود (۱۴). به تازگی، برخی از تحقیقات انجام شده بیان کننده این مطلب هستند که پروتئین L1 می تواند یک علامت قدرتمند و مفید برای مشخص کردن اینکه «عفونت با ویروس پاپیلومای انسانی در مرحله تکثیر است یا فعال؟»، به کار برده شود؛ بنابراین ردیابی این پروتئین می تواند در تشخیص اولیه ضایعات پیش-

۲۵۰ انکوبه گشت. کانامایسین به عنوان آنتی بیوتیک دوم در دو مرحله با فاصله زمانی ۳۰ دقیقه به محیط افزوده شد (غلظت نهایی کانامایسین، ۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر است). حجم نهایی با محیط 2XYT تازه به ۱۰۰ میلی-لیتر رسانده و به مدت ۱۶ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷°C انکوبه شد. سپس محیط با دور ۳۷۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴°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 نگهداری کردند، سپس محلول به مدت ۱۵ دقیقه در دور $15000 \times g$ سانتریفوژ شد. محلول رویی، تخلیه و رسوب با ۱ میلی لیتر شیر خشک ۵ درصد حل شده در بافر فسفات سالین ۱۰ میلی مولار با $PH=7/2$ شسته شد. مقداری از محصول برای تیتراسیون فاز و مقداری نیز برای ذخیره به $-70^{\circ}C$ منتقل و نگهداری شد.

غنی سازی با آنتی ژن L1: از واکسن گارداسیل

ساخت شرکت Merck & CO به عنوان آنتی ژن استفاده- شد؛ این واکسن حاوی پروتئین L1 و ویروس های پاپیلومای انسانی ۶، ۱۱، ۱۶ و ۱۸ است. ۲ میلی لیتر محلول ۱/۵ میکروگرم بر میلی لیتر واکسن گارداسیل رقیق شده در بافر فسفات سالین ۱۰ میلی مولار با $PH=7/2$ به یک چاهک از پلیت ۶ خانه اضافه شد و در چاهک دیگر ۲ میلی لیتر سرم آلبومین گاوی^۲ با غلظت ۱/۵ میکروگرم بر میلی لیتر رقیق شده در بافر فسفات سالین ۱۰ میلی مولار با $PH=7/2$ به عنوان کنترل منفی اضافه و به مدت یک شب در دمای ۴°C انکوبه شد. چاهک حاوی آنتی ژن و سرم آلبومین گاوی، تخلیه و ۳ بار بافر فسفات سالین ۱۰ میلی مولار با $PH=7/2$ شسته-

سرطانی مورد استفاده قرارگیرد (۱۶ و ۱۵).

در این پژوهش، هدف از غنی سازی کتابخانه فازمیدی pComb3x، جداسازی کلون های حاوی نانوبادی علیه پروتئین پوششی L1 تعدادی از سویه های ویروس پاپیلومای انسانی است؛ به کمک این نانوبادی ها می توان نانوبادی الیگوکلونالی را با قدرت اتصال قوی تر و اختصاصی تر برای آنتی ژن L1 سویه های پرخطر ویروس پاپیلومای انسانی تولید کرد که با استفاده از آن، امیدهایی تازه در تشخیص زودهنگام و غربالگری سرطان دهانه رحم حاصل می شود.

مواد و روش ها

تکثیر کتابخانه فازمیدی pcomb3x حاوی نانوبادی: آقای دکتر داود احمدوند کتابخانه فاژی pcomb3x را اهدا کرد و از باکتری Escherichia coli سویه (Biotech -Amersham -Pharmacia) TGI به عنوان میزبان کتابخانه فاژی استفاده شد. باکتری ها در ۱۰ میلی لیتر محیط 2XYT در دمای ۳۷°C و دور ۲۵۰۰ رشت داده شدند، هنگامی که میزان جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۴ رسید، ۲۰۰ میکرولیتر از ذخیره کتابخانه فازمیدی pComb3x با تیتراژ ۱۰۱۲ واحد تشکیل دهنده پلاک به محیط کشت باکتری حاوی فازمید 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 انکوبه شد؛ پس از آن، آمپی سیلین مورد نیاز محیط به آن افزوده و با دور ۲۵۰ در دمای ۳۷°C انکوبه شد (غلظت نهایی آمپی سیلین، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر است). ۱۰۰ میکرولیتر از فاز کمی M13KO7 با تیتراژ ۱۰۱۲ واحد تشکیل دهنده پلاک ۱ به محیط اضافه شد که ۳۰ دقیقه بدون حرکت و سپس ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷°C با دور

2. Bovin serum albumin

1. Pfu/ml

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 تیتروردی و خروجی مشخص شد.

بررسی محصولات غنی‌سازی توسط تکنیک

پلی کلونال فاژ الایزا

برای اطمینان از غنی‌شدن کتابخانه برای فاژمیدهای موردنظر علاوه بر 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 ۶، ۱۱، ۱۶ و ۱۸ رقیق‌شده در بافر فسفات سالین ۱۰ میلی‌مولار با $\text{pH}=7/2$ و در چاهک دیگر، سرم آلبومین گاوی با غلظت ۱/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر رقیق-شده در بافر فسفات سالین ۱۰ میلی‌مولار با $\text{pH}=7/2$ به عنوان کنترل منفی اضافه و به مدت یک شب در دمای 4°C انکوبه شد. چاهک‌ها پس از تخلیه ۳ بار با بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار با $\text{pH}=7/2$ شسته‌شده، سپس با شیر خشک ۵ درصد بلاک شدند. پس از ۱ ساعت و ۳۰ دقیقه انکوبه-شدن در دمای 37°C ، ۵۰ میکرولیتر از محصولات فاژی ورودی و خروجی، مراحل مختلف غنی‌سازی بعد از تکثیر و خالص‌سازی (تیتروفاژها 10^{12} واحد تشکیل‌دهنده پلاک تنظیم شد) به همراه ۵۰ میکرولیتر بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار با $\text{pH}=7/2$ به چاهک‌ها اضافه شد که در ابتدا ۳۰ دقیقه در دمای 37°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 $\text{pH}=7/2$ شسته‌شدند و پس از خشک‌شدن آنتی‌بادی ثانویه علیه فاژ M۱۳ متصل به HRP (Horseshoe peroxidase) با نسبت ۱/۲۵۰۰ به چاهک‌ها اضافه و به مدت ۱ ساعت در دمای 37°C با حرکت آرام انکوبه شد؛ سپس چاهک‌ها ۳

شد. ۳ میلی‌لیتر شیر خشک ۵ درصد به عنوان بلاک‌کننده به آن اضافه و به مدت ۱ ساعت در دمای 37°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 37°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 $\text{pH}=7/2$ 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 $\text{pH}=7/5$ به چاهک‌ها افزوده و محلول چند-بار پیتاژ شد، سپس محتویات چاهک‌ها، داخل میکروتیوپ استریل جمع‌آوری و مقداری از محصول برای تیتراسیون، مقداری برای ذخیره در 70°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 تیتروفاژهای ورودی و خروجی مراحل

غنی‌سازی

۱۰۰ میکرولیتر از ورودی‌ها و خروجی‌های مراحل مختلف غنی‌سازی برداشته، به ۹۰۰ میکرولیتر محیط کشت LB حاوی باکتری TG۱ رشدیافته در فاز لگاریتمی اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه بدون حرکت در دمای 37°C و به مدت ۱ ساعت در دمای 37°C با دور ۲۵۰ انکوبه شد؛ سپس باکتری‌ها با دور ۴۰۰۰ در دور دقیقه در دمای 4°C به مدت ۵ دقیقه سانتی‌فیوژ

بررسی وجود ژن نانوبادی در کلون‌های انتخابی
 برای تأیید وجود ژن نانوبادی در کلون‌های انتخابی از روش Colony-PCR (واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز روی تک‌کلون‌ها) استفاده شد. 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-Back با غلظت ۱۰ پیکومول (پرایمر مکمل بخش انتهایی نانوبادی) با ۲/۵ میکرولیتر Master mix 5x (به صورت یک ویال آماده از شرکت فزایپژوه خریداری شد) مخلوط شدند و سپس با آب مقطر دیونیز، به حجم ۲۵ میکرولیتر رسانده شدند. چرخه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز که در دستگاه PCR گرایدان (Biorad) انجام گرفت در جدول شماره ۱ شرح داده شده است. برای ارزیابی نتایج واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرازی، محصول PCR روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد و ژن‌های تکثیر شده برحسب اندازه ملکولی جداسازی شدند.

بار با بافر شستشو (فسفات-توئین ۲۰) و ۱ بار با بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار با $\text{PH}=7/2$ شسته شدند. ۷۰ میکرولیتر محلول تری اتانل آمین داخل هر چاهک ریخته شد و پس از طی زمان کافی در دمای 37°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 ۴۵۰ نانومتر خوانده شد.

غربالگری مونوکلونال‌های مورد نظر با استفاده

از تکنیک مونوکلونال فاژ الایزا

از پلیت مربوط به تیتراسیون فازمیدهای مرحله ۳ غنی سازی بیش از ۱۰۰ تک‌کلون برداشته، پس از تکثیر و خالص سازی برای هر تک‌کلون با استفاده از روش فاژالایزا (مراحل در بالا ذکر شده است) جذب نوری در هر چاهک در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد و از میان آنها چاهک‌های حاوی کلون‌هایی که جذب نوری شان اختلاف بیشتری با چاهک کنترل منفی داشتند انتخاب شدند.

جدول شماره ۱. چرخه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرازی

تعداد چرخه	زمان	حرارت	مراحل
۱	۵ دقیقه	94°C	دنا توره کردن اولیه
۳۰	۲۰ ثانیه	94°C	دنا توره کردن
	۳۰ ثانیه	55°C	جفت شدن پرایمرها
	۵۰ ثانیه	72°C	پلیمریزه شدن
۱	۱۰ دقیقه	72°C	پلیمریزه شدن نهایی

جدول شماره ۲. نتایج حاصل از تعیین تیتراژ خروجی و فاژ-الایزای پلی کلونال (برحسب جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر) علیه آنتی ژن L1 ۴ سویه ویروس پاپیلومای انسانی در مراحل مختلف غنی سازی

مراحل غنی سازی	تیتراژ فاژ واحد تشکیل دهنده فاژ به ازاء هر میلی لیتر	نتایج فاژالایزا	
		سرم آلبومین گاوی	(HPV L) ۱۱۸، ۱۶، ۱۱، ۶
مرحله اول	$10^3 \times 2$	$0/12 \pm 0/393$	$0/10 \pm 0/384$
مرحله دوم	$10^4 \times 2$	$0/11 \pm 0/321$	$0/15 \pm 0/623$
مرحله سوم	$10^6 \times 6/1$	$0/19 \pm 0/330$	$0/20 \pm 1/331$

نتایج

تیتراسیون و بررسی تعداد فازهای قبل و بعد از غنی سازی

در این پژوهش، غنی سازی در سه مرحله انجام پذیرفت و کلون‌هایی که توانایی اتصال به پروتئین L1 ۴ سویه ویروس پاپیلومای انسانی را داشتند جداسازی شدند. در هر مرحله از غنی سازی، فازهای اتصال نیافته از طریق شستشو از چاهک‌ها خارج شده و فازهای اتصال یافته به آنتی ژن مورد نظر، جداسازی و در باکتری E.coli تکثیر شدند که برای مرحله بعدی غنی سازی مورد استفاده قرار گرفتند. محاسبه تعداد فازهای ورودی و خروجی در مراحل مختلف غنی سازی نشان داد که با افزایش تعداد فازهای خروجی بین ۱۰ تا ۱۰۰ برابر در طول سه مرحله غنی سازی، این روند با موفقیت انجام شده است. همان‌طور که در جدول شماره ۲ مشاهده می‌شود، تعداد کلون‌های بعد از مراحل متوالی غنی سازی (تعداد فازهای خروجی) به ترتیب از مرحله ۱ تا مرحله ۳ سیر صعودی داشته‌اند.

نتایج فاژالایزا پلی کلونال پس از هر مرحله از غنی سازی

نتایج حاصل از فاژالایزا پلی کلونال بعد از مراحل متوالی غنی سازی که در جدول شماره ۲ مشاهده می‌شود، نشان دهنده افزایش شدت جذب و میزان واکنش-

دهندگی در مراحل پایانی غنی سازی است. به طوری که در مرحله سوم غنی سازی، اختلاف جذب نوری با چاهک کنترل منفی، بیش از عدد ۱ (یک) است که موفقیت مراحل غنی سازی را نشان می‌دهد.

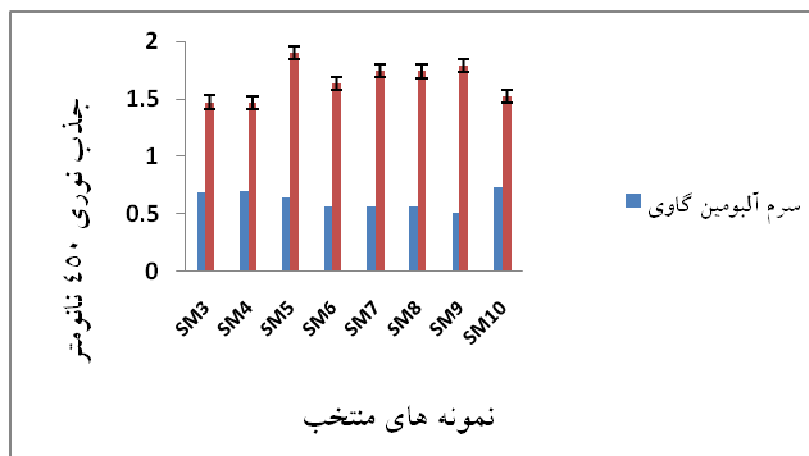
نتایج فاژالایزا برای فازهای مونوکلونال

از فازهای مرحله سوم غنی سازی که در واکنش پلی-کلونال الایزا، بیشترین میزان جذب نوری را نسبت به مراحل قبلی داشتند بیش از ۱۰۰ کلون به طور تصادفی جداسازی شد. حجم برابری از فازمیدهای تخلیص شده در شرایط یکسان رشد از نظر قدرت اتصال به آنتی ژن L1 سویه‌های ۶، ۱۱، ۱۶ و ۱۸ ویروس پاپیلومای انسانی با روش مونوکلونال فاژالایزا و با کمک آنتی بادی ضد M۱۳ متصل شده به آنزیم HRP مورد بررسی قرار گرفتند. ۴ کلون که تمایل بیشتری نسبت به آنتی ژن داشتند از این طریق جداسازی شدند. شکل شماره ۱ نتایج تعدادی از بهترین کلون‌ها را نشان می‌دهد.

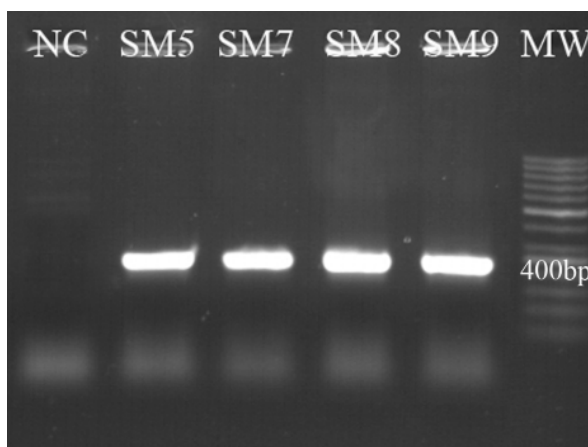
تأیید وجود ژن نانوبادی در کلون‌های انتخابی

توسط روش Colony-PCR

پس از انجام PCR، محصول روی ژل ۱ درصد برده شد و وجود باند ۴۰۰ جفت بازی ژن نانوبادی در ۴ کلون انتخابی SM۵، SMV، SMA، و SM۹ تأیید شد؛ همچنین در نمونه کنترل منفی (R)، بانندی مشاهده نشد که بیان کننده صحت انجام آزمایش PCR است (شکل شماره ۲).



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، ستون ۲، ۳، ۴ و ۵ نتایج PCR روی تعدادی از کلونی‌ها و ستون آخر (MW) مارکر وزن ملکولی

بحث

اختصاصی بودن در برابر آنتی‌ژن مرتبط را دارند. خوشبختانه یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های نانوبادی‌ها این است که این نوع از آنتی‌بادی‌ها مشکلات مربوط به آنتی‌بادی‌های نوترکیب تک‌ارشته‌ای، 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

با کشف آنتی‌بادی‌های زنجیره سنگین که فاقد زنجیره سبک هستند و به‌طور طبیعی در شترسانان وجود دارند، فرصتی جدید برای گسترش آنتی‌بادی تک‌دومنی با ویژگی‌های منحصربه‌فرد فراهم شده است. قطعه آنتی-بادی تک‌دومنی مشتق‌شده از این آنتی‌بادی‌ها خصوصیات منحصربه‌فردی، مانند حلالیت و پایداری زیاد، بیان بسیار خوب، بالا بودن میزان افینیتی و

افزایش میزان جذب نوری، بیان‌کننده افزایش واکنش-دهندگی فازهای حاصل با پروتئین پوششی L1 سویه‌های ۶، ۱۱، ۱۶ و ۱۸ ویروس پاپیلومای انسانی است؛ همچنین با استفاده از روش مونوکلونال فاژالایزا تک-کلون‌هایی علیه پروتئین L1 ویروس پاپیلومای انسانی غربال و جداسازی شد. با استفاده از پرایمرهای اختصاصی نانوبادی، Colony-PCR برای کلون‌های منتخب انجام شد و مشاهده باند ۴۰۰ جفت بازی روی ژل نشان‌دهنده تأیید وجود کتابخانه ژنی نانوبادی علیه پروتئین L1 ویروس پاپیلومای انسانی است.

در تحقیقی دیگر که کالپ و همکاران (۲۰) انجام داده‌اند، تولید آنتی‌بادی کامل علیه پروتئین L1 ویروس پاپیلومای انسانی از طریق روش هیبریدوما صورت گرفته است و پس از آن به ترتیب قطعات (Fragment scFv (Single chain variable و Fab antigen binding) تولید شده‌اند، اما جداسازی نانوبادی‌هایی علیه این آنتی‌ژن برای اولین بار و با استفاده از روش نمایان‌سازی فازی انجام شده است. تا به حال نانوبادی‌هایی علیه ویروس‌هایی مانند ویروس آنفولانزا (۲۲)، ویروس نقص سیستم ایمنی (۲۳) و روتا ویروس (۲۴) جداسازی شده‌اند، اما جداسازی نانوبادی‌هایی علیه یک ویروس سرطان‌زا برای اولین بار در دنیا گزارش می‌شود.

بر طبق مطالعات انجام شده، قدرت اثر هم‌افزایی که ۳ آنتی‌بادی مونوکلونال باهم (الیگوکلونال آنتی‌بادی) دارند، به‌تنهایی، ۲۰۰۰۰ برابر قدرت هر یک از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال است. امروزه با استفاده از آنتی‌بادی‌های الیگوکلونال علیه سم کزاز که ترکیبی از ۳ تا ۴ آنتی‌بادی مونوکلونال است، قدرت خنثی‌سازی سم در سیستم *in vivo* ۲۰۰ برابر افزایش یافته است (۲۵)؛ بنابراین

است (۱۸)؛ این آنتی‌بادی‌های نو ترکیب قادرند جایگاه فعال برخی از آنزیم‌ها را که دور از دسترس آنتی‌بادی‌های رایج‌اند، به‌راحتی شناسایی کنند (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 به‌عنوان یکی از اولویت‌های سیستم درمانی در این کشورها به‌خوبی احساس می‌شود.

پروتئین L1 ویروس پاپیلومای انسانی به‌طور وسیعی در سطح کپسید این ویروس بیان می‌شود (۲۰) که در این پژوهش به‌عنوان آنتی‌ژن هدف برای تولید نانوبادی از طریق روش نمایان‌سازی فازی مورد استفاده قرار گرفت. از جمله محدودیت‌هایی که در این تحقیق وجود داشت، عدم دسترسی به پروتئین L1 سویه‌های ۶، ۱۱ و ۱۸ ویروس پاپیلومای انسانی به‌صورت خالص بود که برای رفع این مشکل از واکسن گارداسیل حاوی پروتئین L1 هر ۴ سویه ۶، ۱۱، ۱۶ و ۱۸ ویروس پاپیلومای انسانی، استفاده شد و به کمک آن عمل غنی‌سازی انجام گرفت. برای اطمینان از غنی‌شدن کتابخانه علیه یک آنتی‌ژن خاص می‌بایست هم‌تیتراسیون فازهای حاصل از هر مرحله غنی‌سازی و هم‌میزان واکنش-دهندگی آنها در هر مرحله بررسی شود. افزایش تیتراژها و واکنش‌دهندگی آنها در مراحل مختلف غنی‌سازی با آنتی‌ژن موردنظر، نشانه پیشرفت فرایند غنی‌سازی است (۲۱). در این مطالعه با توجه به بالا رفتن تیتراژها (فازهای خروجی) و افزایش میزان جذب نوری به‌دست‌آمده در واکنش الایزا در سه مرحله متوالی غنی‌سازی، موفقیت فرایند غنی‌سازی به‌اثبات رسید.

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 squamous 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. Elfgrén, 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

با تولید نانوبادی الیگوکلونال علیه پروتئین L1 سوبه‌های مهم ویروس پاپیلوما‌ی انسانی قادر خواهیم بود از آن به عنوان علامت اختصاصی با کارایی بالاتر در تشخیص زودهنگام سرطان دهانه رحم استفاده کنیم؛ تولید آسان، هزینه کم و تحمل محدوده وسیع دمایی از جمله ویژگی‌های مهم کیت‌های تشخیصی حاوی این نوع نانوبادی خواهند بود.

تشکر و قدردانی

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

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 chicken 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. Vandeveld, 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. Ulrichs, H. Vandeveld, W. Saunders, M. De Haard, HJ. Schols, D. Leurs, R. Vanlandschoot, P. Verrips, T. Smit, MJ. CXCR4 nanobodies (VHH-based single variable domains) potentially 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 rotavirus-induced 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

Daneshvar

Medicine

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

Received: 10/7/2011

Last revised: 24/9/2011

Accepted: 9/10/2011

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

Sara Minaeian¹, Fatemeh Rahbarizadeh², Sayyed Hamid Zarkesh-Esfahani³, Davoud Ahmadvand⁴

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

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