رنگ‌آمیزی فاژ آنتی‌بادی نوترکیب ضد فیمبریه K99

مهدی گلچین[1*]
فاطمه نوری[1]
علی‌اکبر خلیلی یزدی[1و2]

۱- بخش ایمنی‌شناسی، گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان
۲- گروه بیوتکنولوژی، مرکز بین‌المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، کرمان

*نویسنده مسئول، دانشکدهٔ دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان تلفن: ۳۲۲۲۰۴۷-۰۳۴۱
email: golchin@mail.uk.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۸/۰۶/۰۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۰۹/۱۱

چکیده

زمینه و هدف: آنتی‌بادی‌های نوترکیب نسل جدیدی از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال می‌باشند که با روش‌های جدید بیولوژی مولکولی ساخته می‌شوند. این آنتی‌بادی‌ها معمولاً توسط فن‌آوری نمایش بر روی سطح فاژ از کتابخانه‌های فاژی ایمن یا غیرایمن بر علیه آنتی‌ژن مورد نظر جدا می‌گردند و از آنها جهت تشخیص و درمان برخی از بیماری‌ها و همچنین شناسایی تعداد زیادی از آنتی‌ژن‌ها استفاده می‌شود. در موارد تشخیصی، تشکیل کمپلکس آنتی‌بادی آنتی‌ژن بایستی به نحوی ردیابی شود که از روش‌های گوناگونی جهت آشکارسازی آنها استفاده می‌شود. هدف از انجام این تحقیق رنگ‌آمیزی یک فاژ آنتی‌بادی نوترکیب ضد آنتی‌ژن K99 توسط دو رنگ مخصوص رنگ‌آمیزی پروتیین‌ها و سنجش فعالیت فاژ رنگ‌آمیزی شده در تشخیص مستقیم فیمبریه K99 می‌باشد. ***روش بررسی:*** فاژمید وکتور حامل ژن آنتی‌بادی ضد فیمبریه K99 را پس از خالص‌سازی به سلول *E. coli* سویه TG1 انتقال داده تا این آنتی‌بادی به‌شکل Phage- scFv بیان گردد. پس از بیان آنتی‌بادی فوق و خالص نمودن آن، با استفاده از رنگ‌های Coomassie brilliant blue و Disperse Red dye 60 اقدام به رنگ‌آمیزی آن نموده و توانایی شناسایی آنتی‌بادی رنگ‌آمیزی شده نسبت به آنتی‌ژن K99 خالص مورد بررسی قرار گرفت. ***یافته‌ها:*** رنگ‌آمیزی فاژ آنتی‌بادی با هر دو رنگ فوق قابل انجام بوده و آنتی‌بادی مذکور بعد از رنگ‌آمیزی قادر به شناسایی آنتی‌ژن K99 می‌باشد. ***نتیجه‌گیری:*** می‌توان از رنگ‌های فوق که قابلیت رنگ‌آمیزی پروتیین‌ها را دارند و همچنین باعث تخریب ساختار آن‌ها نمی‌شوند در رنگ‌آمیزی فاژ آنتی‌بادی‌ها بهره جست و از آنها در جهت شناسایی آنتی‌ژن مربوطه استفاده نمود.

کلمات کلیدی: آنتی‌بادی نوترکیب، فاژ، رنگ‌آمیزی، K99.

مقدمه

آنتی‌بادی‌ها (Antibodies) اجزایی از سیستم ایمنی بدن هستند که بخشی از دفاع بدن در مقابل عوامل مهاجم را به‌عهده دارند. آنتی‌بادی‌ها به شکل کاملاً اختصاصی می‌توانند با این عوامل اتصال یافته و با نشان‌دار کردن، آنها را برای حمله توسط سایر اجزای سیستم ایمنی آماده سازند.[1] آنتی‌بادی‌ها می‌توانند واکنش‌های بسیار اختصاصی با انواع مختلفی از پروتیین‌ها، گلیکو پروتیین‌ها و همچنین مارکرهای سطحی سلولی داشته باشند. به‌همین جهت از آنها استفاده‌های زیادی جهت کارهای تحقیقاتی، تشخیصی و درمانی می‌شود.[2] امروزه علاوه بر تولید آنتی‌بادی‌ها در بدن حیوانات، آنها را مانند پروتیین‌های نوترکیب (Recombinant) دیگر با روش‌های مهندسی ژنتیک در داخل سلول‌های باکتری، مخمر، گیاهان و محیط‌های کشت سلولی با استفاده از وکتورهای خاص و با کمک فن‌آوری‌های بیولوژی مولکولی تهیه می‌کنند. در این فن‌آوری توجه اصلی به جایگاه محل اتصال آنتی‌بادی‌ها با آنتی‌ژن (نواحی متغیر) می‌باشد و برای اینکه امکان تولید مقدار زیادی آنتی‌بادی در موجودات ساده‌ای مانند باکتری‌ها به‌وجود آید، بقیه ساختمان آنتی‌بادی‌ها (نواحی ثابت) حذف می‌شود و اکثراً به دو فرم scFv و Fab ساخته می‌شوند. اشکال مذکور آنتی‌بادی‌های نوترکیب را می‌توان از روی کلون‌های سلول‌های B با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) تولید نموده و یا با کلون نمودن تعداد بسیار زیادی (Library) از ژن نواحی متغیر آنتی‌بادی‌ها در داخل فاژمید وکتورها و

سپس با جداسازی فاژآنتی‌بادی اختصاصی به این مهم دست یافت.[۶-۳] از آنتی‌بادی‌های نوترکیب مانند آنتی‌بادی‌های کامل مونوکلونال در تشخیص بسیاری از آنتی‌ژن‌ها در آزمایشاتی مانند Dot blotting، Western blotting، ELISA، ایمیونوفلورسانس، رادیو ایمیونواسی و مطالعات توسط میکروسکوپ الکترونی (Immuno labeling) و غیره استفاده می‌گردد.[۵] جهت ردیابی این آنتی‌بادی‌ها در آزمایشات فوق معمولاً از پپتیدهای کوچکی که ژن آن‌ها در انتهای ژن آنتی‌بادی‌های نوترکیب قرارگرفته‌اند مانند His-tag، c-myc tag و یا آنتی‌بادی‌ها و پروتیین‌های دیگری مانند پروتیین A و پروتئین L که توان شناسایی قسمت چارچوب (Framework) آنتی‌بادی‌ها را دارند استفاده می‌شود. همچنین در مواردی این ردیابی با قراردادن ژن مربوط به پروتیین‌های دیگری در کنار ژن آنتی‌بادی مانند ژن GFP[۷و۸] و یا ژن مربوط به آنزیم آلکالین فسفاتاز انجام شده است. در هنگامی که آنتی‌بادی‌های نوترکیب بر روی سطح فاژ قرار گرفته‌اند، این ردیابی علاوه بر روش‌های ردیابی فوق می‌تواند با استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی بر ضد پوشش پروتیینی فاژ مانند Anti-M13 و Anti-PIII انجام گیرد.[۹] در یک تحقیق که در سال ۲۰۰۲ توسط Meissner انجام گردیده است، پوشش پروتیینی فاژ آنتی‌بادی توسط یک رنگ تجاری که برای رنگ‌آمیزی پارچه استفاده می‌گردد رنگ‌آمیزی شده است.[۱۰] محققین فوق بیان نمودند که توانسته‌اند با رنگ‌آمیزی فاژ آنتی‌بادی‌های اختصاصی ضد چهار سویه از ویروس Ebola، آنها را از هم تفکیک نمایند. از سوی دیگر فیمبریه K99 یا F5 ساختمان پروتیینی میله‌ای شکلی است که به تعداد زیاد روی سطح سویه‌های انتروتوکسیژنیک (ETEC) باکتری‌های *E. coli* وجود دارد و در چسبیدن باکتری‌های سویه‌های فوق به دیواره جدا روده گوساله‌ها نقش اساسی داشته و باعث می‌گردد که باکتری بتواند در محل چسبیدن شروع به کلونیزه کردن کرده و توکسین تولید نماید. این عفونت می‌تواند باعث مرگ و میر گوساله‌ها در چند روز اولیه بعد از تولد آنها گردد.[۱۱] با توجه به اینکه آنتی‌بادی نوترکیب اختصاصی ضد فیبریه K99 به شکل scFv قبلاً توسط Golchin و Aitken[۱۲] تهیه گردیده و همچنین تحقیق Meissner تنها تحقیق در زمینه رنگ‌آمیزی فاژ آنتی‌بادی‌ها می‌باشد و از آنجا که تولید فاژ آنتی‌بادی‌ها بسیار ساده و کم هزینه می‌باشد هدف از انجام این تحقیق این بوده است که با انتقال پلاسمید حامل این آنتی‌بادی به سلول *E. coli* سویه TG1 بتوان این آنتی‌بادی را به فرم فاژ آنتی‌بادی تولید نموده و روش ابداعی Meissner را با استفاده از رنگ‌های Disperse red dye 60 و Coomassie brilliant blue آزموده و فعالیت فاژ آنتی‌بادی رنگ‌آمیزی شده نسبت به شناخت آنتی‌ژن K99 مورد سنجش قرار گیرد.

روش بررسی

در یک مطالعه تحقیقی که در سال ۱۳۸۶ در محل دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان انجام پذیرفت به‌منظور تولید فاژ آنتی‌بادی اختصاصی ضد فیمبریه K99، ابتدا کلون حاوی ژن این آنتی‌بادی بر روی محیط کشت جامد TYE و سپس یک کلنی از آن در محیط مایع 2xTY حاوی آمپی‌سیلین ۱۰۰µg/ml و گلوکز ۱٪ به‌مدت یک شب در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷^{oC} با چرخش ۲۰۰ دور در دقیقه رشد داده شد. سپس پلاسمید حامل ژن آنتی‌بادی ضد فیمبریه K99 که قبلا از میان کتابخانه‌های فاژی Tomlinson I & J استخراج گردیده بود،[۱۲] با استفاده از کیت (Qiagen, Germany) QlAprep Spin Miniprep kit از باکتری *E. coli* سویه HB2151 استخراج شد. جهت اطمینان نیز قطعه DNA مربوط به ژن آنتی‌بادی از روی این پلاسمید (pIT2) با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و با استفاده از دستگاه ترموسیکلر (BioRad, USA) و با به‌کارگیری آغازگرهای pelB و gIII تکثیر گردید.

pelB (5'- ATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGC -3')

gIII (5'- CCCTCATAGTTAGCGTAACG -3') شرایط دمایی اعمال شده جهت تکثیر این قطعه شامل یک سیکل ۹۴$^{°C}$ برای سه دقیقه و ۳۰ سیکل ۹۴$^{°C}$ برای ۳۰ ثانیه، ۵۲$^{°C}$ برای ۵۰ ثانیه و ۷۲$^{°C}$ برای یک دقیقه و یک سیکل ۷۲$^{°C}$ برای هفت دقیقه استفاده شد و سپس باند DNA تکثیر یافته بر روی ژل آگاروز ۱٪ مورد مشاهده قرارگرفت.

انتقال پلاسمید حامل ژن آنتی‌بادی به داخل سلول *E. coli*: قبل از انتقال پلاسمید جهت تهیه سلول‌های مستعد از روش شیمیایی استفاده گردید.[۱۳] بدین منظور ابتدا باکتری *E. coli* سویه TG1 بر روی محیط جامد TYE کشت داده شده و یک کلونی از باکتری تازه رشد یافته به پنج میلی‌لیتر محیط 2xTY حاوی آمپی‌سیلین ۱۰۰µg/ml و گلوکز ۱٪ انتقال یافت. کشت باکتری به‌مدت یک شب در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷^{oC} با چرخش ۲۰۰ دور در دقیقه نگهداری گردید. روز بعد

با افزودن یک میلی‌لیتر از باکتری رشد یافته به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط تازه 2xTY، باکتری مجددا رشد داده شد تا کدورت آن در طول موج ۶۰۰ نانومتر به حدود۰/۴ رسید. ۱۰ میلی‌لیتر از کشت فوق سانتریفوژ گردید و به باکتری ته نشین شده ابتدا ۵۰ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ مولار کلرید منیزیم سرد و پس از نگهداری به مدت ۳۰ دقیقه بر روی یخ و سانتریفوژ کردن، به‌میزان ۱۰ میلی‌لیتر از محلول کلرید کلسیم ۰/۱ مولار سرد اضافه شد. از این سلول‌های مستعد شده جهت ترانسفورماسیون پلاسمید استخراج شده با روش شوک حرارتی در دمای ۴۲^{oC} به‌مدت ۹۰ ثانیه استفاده شد.[۱۳]

تکثیر فاژ آنتی‌بادی: جهت بیان آنتی‌بادی ضد فیبریه K99 به شکل فاژ آنتی‌بادی در سلول TG1، یک پرگنه از باکتری سویه TG1 حامل ژن آنتی‌بادی ابتدا در محیط 2xTY حاوی آمپی‌سیلین ۱۰۰μg/ml و گلوکز ۱٪ رشد داده و روز بعد مجددا در محیط تازه 2xTY حاوی گلوکز ۰/۱ درصد این باکتری رشد یافت تا اینکه میزان کدرت ایجاد شده در طول موج ۶۰۰ نانومتر برابر ۰/۴ رسید. در این زمان به باکتری‌های رشد یافته به‌میزان ۵×۱۰^{۱۰} فاژ کمکی KM13 و کانامایسین ۵۰μg/ml اضافه گردید و به باکتری اجازه داده شد که به‌مدت یک‌شب در دمای ۳۰^{oC} در داخل انکوباتور شیکردار رشد کند (فاژ کمکی دارای ژن مقاومت به کانامیسین بوده و در صورت ورود به باکتری این مقاومت به سلول باکتری انتقال داده می‌شود).[۱۴] روز بعد با سانتریفوژ کردن محیط کشت، به ۴۰ میلی‌لیتر از مایع رویی جدا شده، ۱۰ میلی‌لیتر ترکیب PEG ۶۰۰۰/NaCl سرد (محلول پلی‌اتیلن گلیکول ۲۰٪ و کلریدسدیم ۲/۵ مولار) اضافه شد و این مخلوط به مدت یک ساعت بر روی یخ نگهداری گردید. فاژ آنتی‌بادی تولید شده توسط PEG/NaCl از محیط کشت ترسیب داده شده و پس از سانتریفوژ کردن مجدداً در محلول PBS به حالت محلول در آمد. مخلوط فوق با سرعت ۱۱۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد و از مایع رویی به‌عنوان فاژ آنتی‌بادی خالص شده استفاده گردید.

آزمایش Dot blotting جهت اطمینان از بیان فاژ آنتی‌بادی: برای اطمینان از تولید فاژ آنتی‌بادی و فعالیت آن، آزمایش Dot blotting با استفاده از آنتی‌ژن خالص K99 و به کارگیری Protein-L HRP (Sigma, USA) انجام شد.[۱۵و۱۳] بدین جهت روی گوشه‌ای از یک قطعه غشاء نیتروسلولزی ۳μl فیمبریه K99 خالص شده و در سمت مقابل آن همین مقدار از محلول ۳٪ پروتیین BSA (Merck, Germany) در PBS به عنوان کنترل منفی ریخته شد و اجازه داده شد تا در معرض هوا خشک شود. سپس سطح غشاء فوق توسط محلول ۳٪ شیر خشک بدون چربی (Maravel, UK) مسدود گردیده و پس از شستشو با محول PBS، فاژ آنتی‌بادی ضد K99 که در بافر بلوک‌کننده رقیق شده بود (۵:۱) ریخته شد. غشاء به مدت یک ساعت در دمای آزمایشگاه بر روی روتاتور قرار گرفت و بعد از طی این مدت غشاء نیتروسلولزی سه مرتبه توسط محلول PBS/Tween شسته شد. در مرحله بعد به غشاء به میزان سه میلی‌لیتر از Protein L-HRP که در محلول دو درصد شیر خشک بدون چربی به نسبت ۱:۱۰۰۰ رقیق شده بود اضافه گردیده و برای مدت یک ساعت در دمای ۳۷^{oC} قرار گرفت. بعد از شستشوی غشاء با محلول PBS/Tween، جهت ظاهر ساختن واکنش آنزیمی از محلول سوبسترای 4-chloro-1-naphtol (Sigma, USA) استفاده گردید.[۱۳]

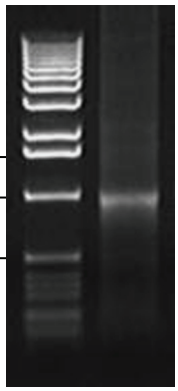
آماده‌سازی رنگ‌ها: برای رنگ‌آمیزی فاژ آنتی‌بادی از رنگ Disperse red dye 60 (اهدایی توسط آقای دکتر محمدجواد کارآمد از دانشکده هنر دانشگاه شهید باهنر کرمان) که از آن جهت رنگ‌آمیزی پارچه و قالی استفاده می‌شود و قبلا توسط Meissner[۱۰] نیز به‌کار گرفته شده بود و همچنین رنگ Coomassie brilliant blue R250 (Sigma, USA) استفاده شد. جهت آماده‌سازی این رنگ‌ها در دو لوله میکروتیوب جداگانه ۰/۰۵ گرم از پودر رنگ مورد نظر ریخته و با محلول PBS حجم نهایی هر لوله به یک میلی‌لیتر رسید. محتویات لوله‌ها با ورتکس به خوبی مخلوط و به‌مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. مجدداً با انجام ورتکس مایع رویی و قسمت ته‌نشین شده تا حد امکان مخلوط شده و مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۱۳,۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. این مراحل برای سه مرتبه دیگر تکرار شدند. در انتها لوله‌ها ورتکس شده و به مدت یک ساعت با سرعت ۱۰,۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردیدند. مایع رویی هر لوله به آرامی به لوله تمیز دیگری منتقل و باقیمانده پودر رنگ که ته‌نشین شده بود، دور ریخته شد.

رنگ‌آمیزی فاژ آنتی‌بادی‌ها: با آماده‌سازی رنگ‌ها، اقدام به رنگ آمیزی فاژ آنتی‌بادی‌ها گردید.[۱۰] بدین منظور در دو لوله میکروتیوب جداگانه حجم یکسانی از فاژ آنتی‌بادی و رنگ مورد نظر ریخته و به‌مدت یک ساعت در دمای آزمایشگاه بر روی روتاتور با دور کم نگهداری شدند. پس از طی این مدت، به اندازه یک پنجم حجم

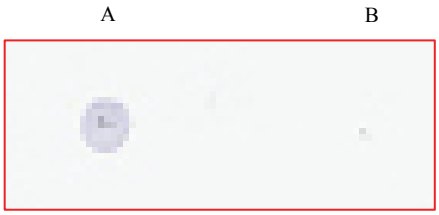
محتویات هر لوله محلول ۳۰٪ از شیرخشک بدون چربی افزوده گردید و لوله‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه نگهداری شدند تا فاژ آنتی‌بادی‌های رنگ‌آمیزی شده ترسیب یابند. متعاقباً این لوله‌ها به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و پس از دور ریختن مایع رویی، به فاژ آنتی‌بادی‌های رنگ‌آمیزی شده و ته‌نشین شده ۵۰۰µl محلول PBS اضافه و از آنها برای استفاده در آزمایشات بعدی بهره گرفته شد. فعالیت فاژ آنتی‌بادی رنگ‌آمیزی شده نسبت به شناسایی آنتی‌ژن K99 با انجام آزمایش Dot blotting فعالیت فاژ آنتی‌بادی‌های رنگ‌آمیزی شده مورد بررسی قرار گرفت. بدین جهت در یک سمت از یک قطعه غشاء نیتروسلولوزی ۳µl آنتی‌ژن K99 و در سمت مقابل غشاء همین مقدار از پروتیین BSA به عنوان کنترل منفی ریخته شده و به همین ترتیب آنتی‌ژن‌های مذکور روی قطعه کاغذ نیتروسلولزی دیگری ریخته شدند. سپس سطح قطعات غشاء نیتروسلولزی با محلول ۳٪ پروتیین شیرخشک بدون چربی بلوکه شده و ۰/۵ میلی‌لیتر از فاژ آنتی‌بادی رنگ‌آمیزی شده با رنگ‌های مذکور به‌صورت جداگانه به هر غشاء اضافه گردید و به مدت یک ساعت در دمای آزمایشگاه بر روی روتاتور نگهداری شدند. نهایتاً غشاءهای نیتروسلولزی توسط PBS/Tween سه مرتبه شسته شدند و مورد مشاهده قرار گرفتند.

یافته‌ها

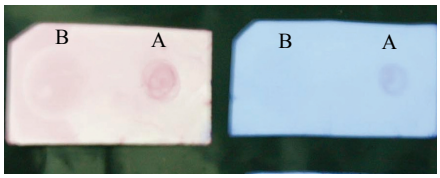
نتایج تکثیر ژن کد کننده آنتی‌بادی نوترکیب ضد فیمبریه K99 از روی پلاسمید حامل این ژن با روش PCR نشان دهنده وجود این ژن در کلون رشد یافته بود. همانگونه که در شکل ۱ مشاهده می‌شود با استفاده از پرایمرهای pelB و gIII قطعه‌ای به‌طول ۹۸۴bp تکثیر گردیده است که برابر با طول مورد نظر بوده است. همچنین نتایج ترانسفورماسیون این پلاسمید به سلول TG1 موفقیت‌آمیز بود به گونه‌ای که حدود ۵۰ کلنی بر روی پلیت حاوی آمپی‌سیلین رشد یافتند. همانطور که انتظار می‌رفت فاژ آنتی‌بادی مطابق پروتکل استاندارد تولید گردیده و وجود آنها با آزمایش Dot blotting تایید شد (شکل ۲). بررسی رنگ‌های مورد استفاده در رنگ‌آمیزی فاژ آنتی‌بادی، نشان داده شد که رنگ‌های Coomassie brilliant blue و Disperese red dye 60 قادر به رنگ آمیزی فاژ آنتی‌بادی بودند. همچنین نتایج آزمایش Dot blotting با فاژ آنتی‌بادی رنگ‌آمیزی شده



شکل- ۱: تکثیر ژن آنتی‌بادی ضدآنتی‌ژن K99 با پرایمرهای pelB و gIII



شکل- ۲: آزمایش Dot blotting جهت تشخیص بیان فاز آنتی‌بادی ضد آنتی‌ژن K99. A: نشان‌دهنده محل آنتی‌ژن خالص‌شده K99. B: محل آنتی‌ژن BSA



شکل- ۳: آزمایش Dot blotting با فاژ آنتی‌بادی‌های رنگ‌آمیزی شده با Coomassie brilliant blue (راست) و رنگ Disperse red dye 60 (چپ). A: محل قرار گرفتن آنتی‌ژن K99. B: محل قرار گرفتن آنتی‌ژن BSA (کنترل منفی)

نسبت به شناخت آنتی‌ژن بعد از رنگ‌آمیزی بیان‌کننده این بود که آنها قادر به شناخت آنتی‌ژن به‌صورت اختصاصی می‌باشند (شکل ۳).

بحث

آنتی‌بادی‌های نوترکیب آنتی‌بادی‌هایی هستند که در محیط *In vitro* در داخل سلول‌های میزبانی مانند باکتری‌ها، مخمرها، سلول‌های پستانداران و در محیط‌های کشت سلولی تولید می‌گردند.[۱۶] این دسته از آنتی‌بادی‌ها را معمولاً با تکنولوژی نمایش برروی سطح

فاژ (از میان کتابخانه‌های فاژی ایمن و غیرایمن (طبیعی، نیمه سنتتیک یا سنتتیک)) جدا می‌نمایند.[۵] آنتی‌بادی‌های بیان شده بر روی سطح فاژ را می‌توان با انتقال پلاسیمد حامل ژن آنها به سلول‌هایی که می‌توانند تولید آنتی‌بادی‌ها را به فرم محلول بر عهده گیرند (مانند سلول *E. coli* سویه HB2151)، بدون قرار گرفتن بر روی سطح فاژ تولید نمود. در مورد اخیر نیاز است که آنتی‌بادی محلول از میان سایر پروتیین‌هایی که سلول میزبان آنها را تولید می‌کند جدا گردیده و مراحل خالص‌سازی بر روی آن انجام گیرد.[۱۹] برای مشاهده فعالیت آنتی‌بادی‌های نوترکیب به فرم فاژ آنتی‌بادی و یا آنتی‌بادی محلول از آنتی‌بادی‌های ثانویه دیگری استفاده می‌شود. به‌کارگیری ترکیبات فوق باعث می‌گردد که هزینه تشخیص آنتی‌ژن افزایش یافته و زمان انجام آزمایشات هم طولانی شود. در تحقیقاتی که در سال‌های اخیر جهت استفاده نکردن از آنتی‌بادی‌های ثانویه انجام گردیده است، منجر به ساخت آنتی‌بادی‌های نوترکیب شیمریکی شده است که ژن پروتیین دیگری در کنار ژن آنتی‌بادی قرار داده شده است که از جمله آنها می‌توان به افزودن ژن آنزیم پراکسیداز (HRP)،[۱۷] ژن آنزیم آلکالین فسفاتاز (AP)[۱۸] و ژن پروتیین سبز درخشان (GFP) اشاره نمود.[۷] در همه موارد فوق، پروتیین شیمریک تولید شده به‌صورت آنتی‌بادی محلول می‌باشد که بایستی مراحل خالص‌سازی بر روی آن نیز انجام گیرد. هزینه ساخت آنتی‌بادی‌های نوترکیب شیمریک در مقایسه با استفاده از آنتی‌بادی‌های ثانویه کمتر بوده و مدت انجام آزمایشات هم کاهش یافته است. از طرف دیگر تولید فاژ آنتی‌بادی‌ها نسبت به آنتی‌بادی‌های محلول نوترکیب بسیار زیادتر و آسان‌تر انجام می‌گیرد. همچنین امکان ترسیب فاژ آنتی‌بادی‌ها با استفاده از ترکیب PEG/NaCl به‌راحتی وجود دارد.[۱۹] بنابراین از مجموع مطالب فوق می‌توان نتیجه گرفت که اگر به‌طور مستقیم از فاژ آنتی‌بادی‌ها و بدون استفاده از آنتی‌بادی‌های دیگر در تشخیص آنتی‌ژن‌ها استفاده شود به‌دلیل تولید زیادتر این دسته از آنتی‌بادی‌ها و عدم نیاز به تولید آنتی‌بادی محلول و انجام مراحل خالص‌سازی آنها صرفه‌جویی زیادی در وقت و هزینه می‌شود. به‌دلایل مذکور، اهمیت تحقیق Meissner در سال ۲۰۰۲ میلادی که برای اولین بار اقدام به رنگ‌آمیزی پوشش پروتیینی فاژ با استفاده از یک نوع رنگ صنعتی پارچه به نام Disprese red dye نمودند مشخص می‌گردد.[۱۰] با توجه به اینکه این مقاله تنها تحقیقی بوده است که در زمینه رنگ‌آمیزی فاژ آنتی‌بادی‌ها انجام گرفته، در تحقیق جاری روش ارائه شده توسط میسنر و همکاران بر روی یک فاژ آنتی‌بادی نوترکیب ضد فیمبریه K99 با استفاده از دو رنگ مختلف مورد سنجش قرار گرفت و فعالیت فاژ آنتی‌بادی‌های رنگ‌آمیزی شده نسبت به آنتی‌ژن خالص شده K99 بررسی شد. با انتخاب دو رنگ Disprese red dye و Coomassie brilliant blue، آزمایش Dot blotting با فاژ آنتی‌بادی‌های رنگ‌آمیزی شده در حضور آنتی‌ژن خالص شده K99 و آنتی‌ژن BSA انجام گرفت که نتایج موفقیت‌آمیزی را به همراه داشت و فاژ آنتی‌بادی‌های رنگ‌آمیزی شده با هر دو رنگ قادر به شناسایی آنتی‌ژن بودند. همچنین مشخص گردید که ساختار سه بعدی و فعالیت آنتی‌بادی‌های بیان شده بر روی سطح فاژ توسط این رنگ‌ها از بین نمی‌رود. بنابراین تجربیات حاصل در این تحقیق با یافته‌های Meissner هم‌خوانی داشته و امکان استفاده از رنگ‌های صنعتی جهت فاژ آنتی‌بادی‌ها را تایید می‌نماید. به‌علاوه تجربیاتی که در این تحقیق نسبت به رنگ‌آمیزی فاژ آنتی‌بادی‌ها به‌دست آمده نشان‌دهنده این بود که این روش اگر چه قابل استفاده می‌باشد اما دارای نکاتی است که بایستی ضمن توجه به آنها در تحقیقات آینده، مشکلات آن نیز برطرف گردد. از جمله این موارد این است که هنگام رنگ‌آمیزی فاژ آنتی‌بادی‌ها، در مراحل انتهایی به‌همراه رسوب ته‌نشین شده که مربوط به فاژ آنتی‌بادی رنگ‌آمیزی شده است، مقداری از رنگ به‌صورت آزاد وجود دارد که این رنگ باعث می‌گردد که پروتیین‌هایی که در مرحله بلوک‌کردن غشاء نیتروسلولزی استفاده شده‌اند مقداری از رنگ را به خود جذب نموده و باعث پدید آوردن رنگ زمینه‌ای بر روی سطح غشاء شوند. در صورتی که رسوب فوق توسط ترکیباتی مانند PBS شستشو داده شود مقدار زیادی از فاژ آنتی‌بادی‌های رنگ‌آمیزی شده از دست خواهند رفت. همچنین تجربیات انجام این تکنیک نشان داد که برای رنگ‌های مختلف بایستی غلظت خاصی از رنگ در نظر گرفته شود که در نتیجه حداقل رنگ زمینه‌ای و حداکثر رنگ مربوط به شناخت آنتی‌ژن مشاهده گردد. به‌علاوه مطالعات دیگری برای پیدا نمودن رنگ‌های جدید نیاز می‌باشد که امکان رنگ‌آمیزی اختصاصی‌تر فاژ آنتی‌بادی‌ها نسبت به رنگ‌آمیزی پروتیین‌های دیگر از جمله پروتیین‌های مربوط به مرحله بلوک کردن را داشته باشند.

سپاسگزاری: بدینوسیله از زحمات آقای دکتر محمد جواد کارآمد به‌خاطر در اختیار قرار دادن رنگ Disprese red dye، آقای دکتر

Robert Aitken در دانشگاه گلاسگو جهت ارائه پیشنهادات، سرکار خانم دکتر منیژه عطاپور در مرکز تحقیقات علوم و اعصاب و معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان برای استفاده از امکانات آن حوزه و همکاری صمیمانه آقای دکتر امین باقی‌زاده در مرکز بین‌المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی تقدیر و تشکر به‌عمل می‌آید.

References

1. Breitling F, Dübel S. Recombinant Antibodies. New York: John Wiley & Sons, Inc;1999.
2. Riethmüller G, Schneider-Gädicke E, Johnson JP. Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Curr Opin Immunol* 1993;5(5):732-9.
3. Marks JD, Hoogenboom HR, Bonnert TP, McCafferty J, Griffiths AD, Winter G. By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol* 1991;222(3):581-97.
4. Maynard J, Georgiou G. Antibody engineering. *Annu Rev Biomed Eng* 2000;2:339-76.
5. Hoogenboom HR, de Bruïne AP, Hufton SE, Hoet RM, Arends JW, Roovers RC. Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology* 1998;4(1):1-20.
6. Breitling F, Dübel S, Seehaus T, Klewinghaus I, Little M. A surface expression vector for antibody screening. *Gene* 1991;104(2):147-53.
7. Casey JL, Coley AM, Tilley LM, Foley M. Green fluorescent antibodies: novel in vitro tools. *Protein Eng* 2000;13(6):445-52.
8. Hink MA, Griep RA, Borst JW, van Hoek A, Eppink MH, Schots A, et al. Structural dynamics of green fluorescent protein alone and fused with a single chain Fv protein. *J Biol Chem* 2000;275(23):17556-60.
9. Kay BK, Winter J, McCafferty J, editors. Phage Display of Peptides and Proteins: a Laboratory Manual. San Diego: Academic Press; 1996.
10. Meissner F, Maruyama T, Frentsch M, Hessell AJ, Rodriguez LL, Geisbert TW, et al. Detection of antibodies against the four subtypes of ebola virus in sera from any species using a novel antibody-phage indicator assay. *Virology* 2002;300(2):236-43.
11. Nagy B, Fekete PZ. Enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) in farm animals. *Vet Res* 1999;30(2-3):259-84.
12. Golchin M, Aitken R. Isolation by phage display of recombinant antibodies able to block adherence of Escherichia coli mediated by the K99 colonisation factor. *Vet Immunol Immunopathol* 2008;121(3-4):321-31.
13. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2000.
14. Kristensen P, Winter G. Proteolytic selection for protein folding using filamentous bacteriophages. *Fold Des* 1998;3(5):321-8.
15. Coligan JE. Short Protocols in Immunology. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc; 2005.
16. Schirrmann T, Al-Halabi L, Dübel S, Hust M. Production systems for recombinant antibodies. *Front Biosci* 2008;13:4576-94.
17. Malecki M, Hsu A, Truong L, Sanchez S. Molecular immunolabeling with recombinant single-chain variable fragment (scFv) antibodies designed with metal-binding domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(1):213-8.
18. Mousli M, Turki I, Kharmachi H, Saadi M, Dellagi K. Recombinant single-chain Fv antibody fragment-alkaline phosphatase conjugate: a novel in vitro tool to estimate rabies viral glycoprotein antigen in vaccine manufacture. *J Virol Methods* 2007;146(1-2):246-56.
19. O'Brien PM, Aitken R. Antibody Phage Display: Methods and Protocols. Totowa, NJ: Humana Press; 2002.

Tehran University Medical Journal; Vol. 67, No. 12, Mar 2010: 821-827

Staining of an anti-K99 recombinant phage antibody

Mehdi Golchin Ph.D.[1*]
Fatemeh Noori D.V.M.[1]
Ali Akbar Khalili-Yazdi M.S.[1,2]

1- Division of Immunology, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman. Kerman, Iran.
2- Department of Biotechnology, International Center for Science & high Technology and Environmental Science, Kerman., Iran.

*Corresponding author: Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman. Kerman, Iran.
Tel: +98-341-3222047
email: golchin@mail.uk.ac.ir

Received: August 30, 2009 Accepted: December 02, 2009

Abstract

***Background*:** Recombinant antibodies are new versions of monoclonal antibodies that are produced by recent molecular biology techniques. These antibodies can be isolated by phage display technology from immune or non-immune libraries. Recombinant antibodies are applied to treatment of some diseases and also are increasingly used for diagnosis and detection of many antigens. In the latter case, the presence of antigen-antibody complexes has to be detected by further approaches. The aim of current research was to stain an anti-K99 phage antibody with two different protein dyes and to apply them directly for detection of *E. coli* K99 fimbriae.
***Methods*:** In order to stain above antibody, a phagmid vector carrying the anti-K99 single-chain Fv (scFv) antibody was isolated, purified and transformed into TG1 strain of *E. coli*. Afterward, the antibody was expressed in this cell as phage-scFv antibody. Phage antibodies were subsequently eluted, purified and stained with Disperse Red dye 60 and Coomassie Brilliant Blue. Finally, the binding activity of coloured phage antibodies towards the purified K99 fimbriae was verified by immunoblotting.
***Results*:** The results showed that anti-K99 phage antibody was stained with both dyes and the coloured phages were able to recognize the corresponding antigen.
Conclusions: These protein stains that they usually do not alter the protein structure can be used for staining phage antibodies. The coloured phage antibodies retain their binding affinity for the antigens, and therefore can be applied to detection of relevant antigens.

Keywords: Recombinant, antibody, phage, staining, K99.