

طراحی و بهینه‌سازی واکنش زنجیره‌ای پلیمر از چندگانه جهت تکثیر ژن‌های آنتی‌بادی انسانی علیه توکسوئید کزاز

معصومه بن‌از^۱، حمیده روحانی‌نژاد^۲، رامین فلاح‌زاده^۳، سید حمیدرضا خاتمی^۳، جلیل فلاح مهرآبادی^{۴*}

چکیده

زمینه و هدف: آنتی‌بادی‌ها در بسیاری از حوزه‌های تشخیص و درمان مورد استفاده قرار می‌گیرند. آنتی‌بادی‌های کاملاً انسانی به دلیل عدم برانگیختن پاسخ ایمنی در بدن بسیار مورد توجه قرار دارند. این مطالعه با هدف طراحی و بهینه‌سازی واکنش زنجیره‌ای پلیمر از چندگانه جهت تکثیر ژن‌های آنتی‌بادی انسانی علیه توکسوئید کزاز انجام شد.

روش بررسی: پس از خونگیری از انسان ایمن‌شده با توکسوئید کزاز و جداسازی لمفوسیت‌ها، RNA استخراج و cDNA ساخته شد. طی دو واکنش PCR چندگانه و با استفاده از ۱۴ جفت پرایمر، همه تنوع ژن‌های ناحیه متغیر زنجیره‌های سبک (کاپا) و سنگین آنتی‌بادی تکثیر شد. واکنش PCR جهت اتصال قطعات VH و VL به صورت ScFv و واکنش Semi Nested PCR جهت افزودن جایگاه برش آنزیم محدودالایر به دو انتهای قطعه انجام شد.

یافته‌ها: در انجام دو واکنش Multiplex PCR، دو قطعه VH و VL به ترتیب به اندازه‌های ۴۱۰bp و ۶۸۰bp تکثیر شد. با واکنش Overlap Extension PCR، دو قطعه VH و VL به صورت ScFv به هم متصل و قطعه ۱۰۷۰bp به دست آمد. در نتیجه انجام واکنش Semi Nested PCR، جایگاه برش به دو انتهای ScFv اضافه شد.

نتیجه‌گیری: با انتخاب مجموعه پرایمر مناسب و بهینه‌سازی عوامل موثر در Multiplex PCR، می‌توان با دو واکنش Multiplex PCR جداگانه به جای چند واکنش Uniplex، همه تنوع‌های ژن‌های آنتی‌بادی به دست آمده از میان cDNA تام لمفوسیت انسانی را تکثیر و جداسازی نمود، لذا می‌توان تنها با استفاده از دو واکنش Multiplex PCR، تمامی تنوع‌های ژنتیکی آنتی‌بادی انسانی را به صورت قطعات VH و VL از خون فرد ایمن‌شده با توکسوئید کزاز تکثیر کرد.

کلیدواژه‌ها: آنتی‌بادی نو ترکیب؛ توکسوئید کزاز؛ واکنش زنجیره‌ای پلیمر از چندگانه.

^۱دانشجوی کارشناس ارشد بیوتکنولوژی مولکولی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران.

^۲دانشجوی دکتری میکروبی‌شناسی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران.

^۳کارشناس ارشد بیوتکنولوژی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران.

^۴استادیار میکروبی‌شناسی، پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:

جلیل فلاح مهرآبادی، پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:
jalil.fallah@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۲/۱/۱۹

تاریخ پذیرش: ۹۲/۵/۳

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Bazzaz M, Rouhaninejad H, Fallahzadeh R, Khatami SHR, Fallah Mehrabadi J. Designing and optimizing of multiplex polymerase chain reaction for amplification of human anti-tetanus toxoid antibody genes. Qom Univ Med Sci J 2014;8(1):1-9. [Full Text in Persian]

مقدمه

آنتی‌بادی‌ها کاربردهای تشخیصی و درمانی بسیاری دارند، با این حال استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال موشی و کایمریک در موارد درمانی با محدودیت‌هایی روبه‌رو است که از جمله می‌توان به برانگیختن پاسخ ایمنی، کارآیی نامناسب و نیمه عمر کم آنها اشاره نمود. از این‌رو تکنیک‌های تهیه آنتی‌بادی‌های مونوکلونال درمانی در حال پیشروی به سمت تولید آنتی‌بادی‌های درمانی کاملاً انسانی است (۱) و تاکنون نیز چندین محصول تجاری از این نوع وارد بازار شده و تکنیک‌های مختلفی نیز جهت ساخت آنتی‌بادی کاملاً انسانی ابداع گردیده است (۲). در این میان می‌توان به تکنولوژی تولید موش‌های تراریخت، موش‌های ترنسکروموزوم و Severe Combined Immunodeficient (۳)، تکنیک‌های تهیه هیبریدومای انسانی (۴)، تهیه آنتی‌بادی از سلول‌های B ترنسفورم‌شده با ویروس اپشتاین بار (Epshtein Bar Virus, EBV) (۵) و در نهایت تکنیک نمایش فاژ اشاره نمود (۶، ۷). از میان روش‌های تهیه آنتی‌بادی انسانی، روش نمایش فاژی بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۸). در این روش، ابتدا همه تنوع ژن‌های آنتی‌بادی انسانی توسط واکنش RT-PCR، تکثیر و به‌صورت یک کتابخانه آنتی‌بادی ذخیره می‌شود، سپس با واکنش الایزا، آنتی‌بادی اختصاصی آنتی‌ژن موردنظر غربالگری می‌گردد. جهت تهیه یک کتابخانه آنتی‌بادی انسانی، تعداد زیادی پرایمر نیاز است (۹). علت این امر، تنوع موجود در ژن‌های آنتی‌بادی‌های انسانی است. از این‌رو بهینه‌سازی شرایط PCR آن، از اهمیت بالایی برخوردار است (۱۰). بنابراین، لازم است پرایمرها به‌گونه‌ای طراحی و انتخاب شوند، که همه تنوع‌های ممکن آنتی‌بادی را در برگیرند؛ بدین منظور، دو دسته پرایمر مورد استفاده قرار می‌گیرد: دسته اول شامل پرایمرهای اختصاصی ناحیه متغیر زنجیره سنگین (Variable Heavy) VH و دسته دوم پرایمرهای اختصاصی ناحیه متغیر زنجیره سبک آنتی‌بادی (Variable Light) VL می‌باشد (۱۱). بیماری کزاز نوعی عفونت حاصل از سم بوده که عامل ایجاد آن، باکتری بی‌هوازی کلوستریدیوم تتانی می‌باشد. این باکتری نوعی توکسین به‌نام تتانوس ترشح می‌کند که مسئول بروز علائم ویژه بیماری کزاز است.

تتانوس به‌عنوان یک نوروتوکسین قدرتمند می‌تواند سبب انقباض شدید عضلات و در صورت عدم درمان، موجب مرگ بیمار گردد. میزان مرگ‌آوری این بیماری حدود ۵۰-۲۵٪ گزارش شده است (۱۲). بیماری کزاز به‌وسیله واکسن کزاز کاملاً قابل کنترل می‌باشد، اما همچنان سالانه تعداد ۸۰۰-۴۰۰ هزار نفر در اثر ابتلا به این بیماری عفونی جان خود را از دست می‌دهند (۱۳). بهترین درمان برای این بیماری، خنثی‌سازی توکسین پیش از اتصال آن به گیرنده‌های سلولی؛ یعنی زمانی که در خون در حال گردش است، می‌باشد (۱۴). خنثی‌کننده‌های توکسین کزاز ماهیت آنتی‌بادی دارند و اغلب از سرم‌های هائیرایمیون حیوانی یا انسانی تهیه می‌شوند. با وجود پیشرفت‌های صورت گرفته در زمینه تهیه آنتی‌بادی‌های درمانی، همچنان جهت درمان کزاز، از سرم هائیرایمیون انسانی یا حیوانی و یا آنتی‌بادی پلی‌کلونال جداسده از سرم استفاده می‌شود (۱۵). امروزه، دارویی با نام تتابولین جهت درمان کزاز مورد استفاده قرار می‌گیرد که از نوع سرم هائیرایمیون انسانی است (۱۲، ۱۴). لازم به ذکر است استفاده از داروهای نشأت‌گرفته از سرم انسان یا حیوان، علاوه بر اینکه موجب برانگیختن پاسخ ایمنی می‌شوند؛ امکان ابتلای فرد پذیرنده به بیماری‌های منتقل‌شونده از طریق خون را نیز افزایش می‌دهند (۱۶). به‌همین دلیل محققان کشورهای مختلف، تحقیقاتی جهت دستیابی به آنتی‌بادی انسانی اختصاصی توکسین کزاز را آغاز کردند. Kozbor و همکاران در سال ۱۹۸۲ با استفاده از تکنیک هیبریدومای و نامیراسازی سلول B، اقدام به تهیه آنتی‌بادی انسانی نمودند (۴، ۱۷). دکتر Meijer و همکاران نیز در سال ۲۰۰۵ با تهیه کتابخانه آنتی‌بادی انسانی، برعلیه توکسین کزاز به روش نمایش فاژی غربالگری کردند (۱۸). با وجود اینکه آنتی‌بادی‌های درمانی انسانی مختلفی به روش نمایش فاژی تهیه و وارد بازار شده‌اند (۱۹)، اما آنتی‌بادی انسانی اختصاصی توکسین کزاز همچنان در فاز تحقیقاتی به سر می‌برد. در ایران نیز روش نمایش فاژی برای تهیه آنتی‌بادی‌های انسانی دیگری به کار گرفته شده است (۲۰، ۲۱). در مطالعه حاضر تکثیر تنوع کاملی از ژن‌های نواحی متغیر آنتی‌بادی انسانی با استفاده از پرایمرها، بدون نیاز به انجام تعداد زیادی واکنش Uniplex PCR و تنها طی دو واکنش Multiplex PCR صورت گرفت.

لذا این تحقیق با هدف طراحی و بهینه‌سازی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چندگانه و به‌روزرسانی روش تهیه کتابخانه ژنی آنتی‌بادی در ایران، همچنین تهیه یک کتابخانه ژنی آنتی‌بادی ایمن جهت غربالگری و تکثیر ژن‌های آنتی‌بادی انسانی علیه توکسوئید کزاز انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه ابتدا از فرد ایمن‌شده علیه توکسین کزاز، به میزان ۵ml خون گرفته شد. (فرد مذکور ۷ روز پیش از خونگیری، با واکسن دوگانه دیفتی - کزاز واکسینه شده بود) (۲۲)، سپس هم حجم خون، PBS اضافه و با استفاده از فایکول، PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cell) جداسازی شد. جهت استخراج RNA، از کیت شرکت Roche کشور آلمان استفاده گردید.

تمامی مواد و وسایل مورد استفاده در این مرحله با محلول ۰/۰۱٪ DEPC (Transferase Hypoxanthine Phosphoribosyl) تیمار شدند و RNase غیرفعال گردید. در نهایت، جهت تعیین کیفیت RNA استخراج‌شده، از روش الکتروفورز ژل آگارز استفاده شد. پس از اطمینان از کیفیت مناسب RNA، سنتز cDNA با استفاده از کیت شرکت Roche بر روی نمونه‌ها انجام گرفت. برای کنترل کیفیت cDNA ساخته‌شده، از پرایمرهای اختصاصی ژن HPRT (F:cttctctctctgagcagtc) و روش RT-PCR استفاده شد (۲۳). جهت تکثیر ناحیه VH و VL نیز به ترتیب پرایمر پیشرو (Forward) نوع ۸ و ۶ به همراه یک نوع پرایمر پسرو (Reverse) مورد استفاده قرار گرفت (۱۱) (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: توالی پرایمرهای پیشرو و پسرو جهت تکثیر نواحی متغیر زنجیره سنگین،

زنجیره سبک کاپا و واکنش Semi Nested PCR

نام	توالی
F:VH 41	tattggcgccatggccCAGRTGCAGCTGGTGCACT
F:VH 42	tattggcgccatggccSAGGTCCAGCTGGTRCAGT
F:VH 43	tattggcgccatggccCAGRTCACCTTGAAGGAGT
F:VH 44	tattggcgccatggccSAGGTGCAGCTGGTGGAG
F:VH 45	tattggcgccatggccCAGGTGCAGCTACAGCAG
F:VH 46	tattggcgccatggccCAGSTGCAGCTGCAGGAGT
F:VH 47	tattggcgccatggccGARGTGCAGCTGGTGCAGT
F:VH 48	tattggcgccatggccCAGGTACAGCTGCAGCAGTC
R:CH9	GACSGATGGGCCCTTGTTGG
F:VLk 54	gccatggcgcccaatagctagccGACATCCAGWTGACCCAGTCT
F:VLk 55	gccatggcgcccaatagctagccGATGTTGTGATGACTCAGTCT
F:VLk 56	gccatggcgcccaatagctagccGAAATTGTGWTGACRCAGTCT
F:VLk 57	gccatggcgcccaatagctagccGATATTGTGATGACCCACACT
F:VLk 58	gccatggcgcccaatagctagccGAAACGACACTCACGCAGT
F:VLk 59	gccatggcgcccaatagctagccGAAATTGTGCTGACTCAGTCT
R:CLk 60	atatatatgcggcgcttaTTAACACTCTCCCCTGTTGAA
F:JH 61	ggaggcgctcGAGACGGTGACCAGGGTGCC
F:JH 62	ggaggcgctcGAGACGGTGACCATTGTCCC
F:JH 63	ggaggcgctcGAGACGGTGACCAGGGTTCC
F:JH 64	ggaggcgctcGAGACGGTGACCGTGGTCCC
R:CLk 21	accgcctccaccggcgccgcttaTTAACACTCTCCCCTGTTGAAGCTCTT

پرایمرهای F به کل غلظت پرایمر R، ۱ به ۵ باشد. در ادامه، شرایط دمایی واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر به صورت زیر تنظیم شد:

۷ سیکل (Denature: 94°C/30s, Annealing: 52°C/30s, Extension: 72°C/30s) و ۳۳ سیکل (Denature: 94°C/30s, Annealing: 60°C/30s, Extension: 72°C/30s) (Final Extension: 72°C/10min).

با استفاده از هر پرایمر به صورت جداگانه، واکنش PCR انجام شد و پس از تغییر شرایط از جمله (تغییر تعداد سیکل، گرادیان دمایی اتصال، غلظت $MgCl_2$ ، غلظت dNTP، تغییر کمیته cDNA)، واکنش به یک شرایط بهینه رسید و با توجه به شرایط به دست آمده، واکنش Multiplex PCR انجام شد (جدول شماره ۲). جهت انجام Multiplex PCR، غلظت پرایمرها به گونه‌ای انتخاب گردید، که نسبت هریک از

جدول شماره ۲: غلظت مواد مورد استفاده جهت انجام دو واکنش Multiplex PCR با شرایط بهینه شده

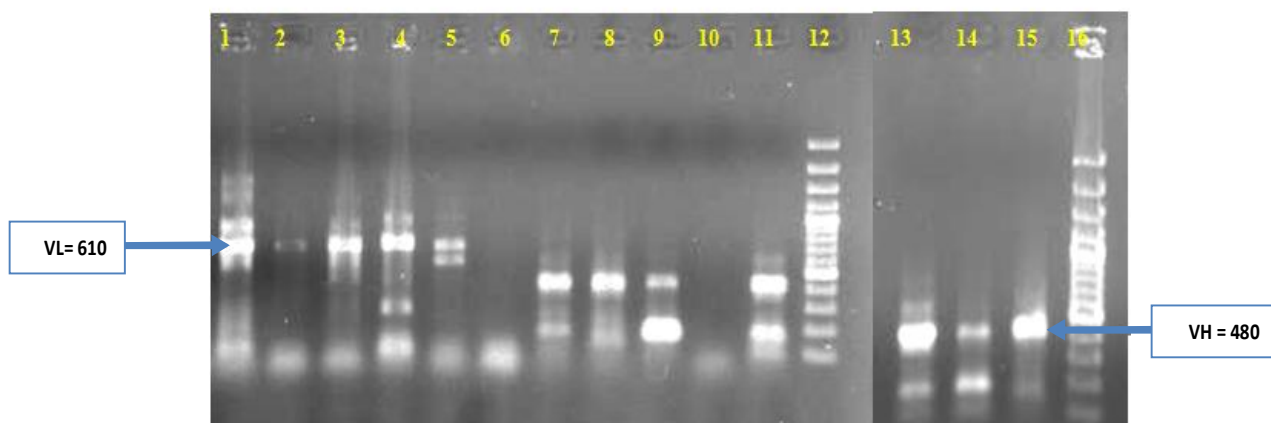
نام ماده	مقدار	PCR Master mix	Primers		cDNA	$MgCl_2$	H_2O	Total
			F: VH1-8	R: CH60				
VH		۱X	(۰/۴×۸) pM	۲pM	۳μl	۱/۵mM	۱۶μl	۵۰μl
نام ماده	مقدار	PCR Master mix	Primers		cDNA	$MgCl_2$	H_2O	Total
			F: VL4-9	R: CLK60				
VL		۱X	(۰/۴×۶) pM	۲pM	۳μl	۱/۵mM	۱۸μl	۵۰pM

پرایمرهای مورد نظر، قطعه مذکور تکثیر شود.

به منظور اتصال قطعات VH و VL و به دست آوردن توالی ScFv، یک واکنش Overlap Extension PCR با ۳۰ سیکل انجام شد. این واکنش ابتدا با ۷ سیکل بدون پرایمر، سپس ۲۳ سیکل پس از اضافه کردن پرایمرهای Semi Nested PCR صورت گرفت. همچنین در این روش ابتدا اجازه داده شد تا قطعات VH و VL به یکدیگر متصل، سپس با اضافه نمودن

یافته‌ها

در این مطالعه ابتدا مطابق برنامه دمایی ذکر شده در بخش قبل، ۱۴ واکنش Uniplex PCR جهت تکثیر قطعات آنتی‌بادی انجام شد (شکل شماره ۱)



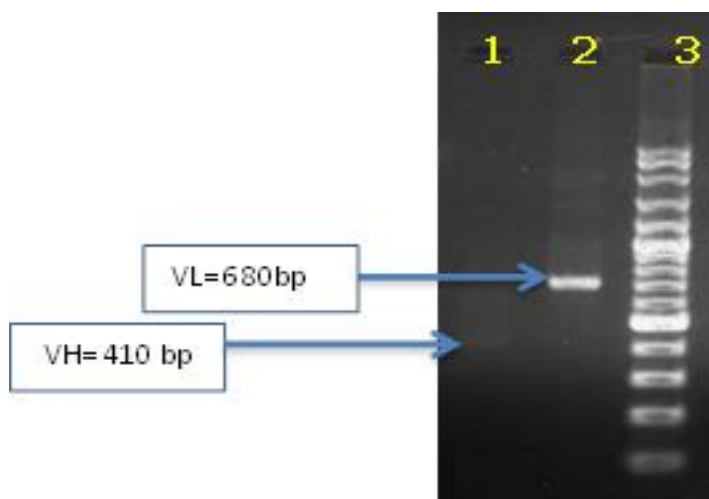
شکل شماره ۱: انجام واکنش PCR، با استفاده از پرایمرهای VH و VL. ردیف‌های ۱ الی ۶ نتیجه PCR با پرایمرهای VL و ردیف‌های ۷ الی ۱۱، ۱۳، ۱۴ و ۱۵ نتیجه PCR با اندازه محصول PCR ناحیه VH و VL به ترتیب قطعاتی به طول ۴۱۰bp و ۶۸۰bp می‌باشند. (به دلیل زیاد بودن تعداد نمونه‌ها از دو ژل جداگانه استفاده شده و سپس تصویر هر دو ژل به یکدیگر متصل شده است).

بخش‌هایی از پرایمر که با حروف کوچک مشخص شده‌اند مربوط به بخش Tail و بخش‌هایی که با حروف بزرگ مشخص شده‌اند مربوط به ناحیه Gene Specific می‌باشد. R معرف توالی پرایمر پسرو و F معرف توالی پرایمر پیشرو است.

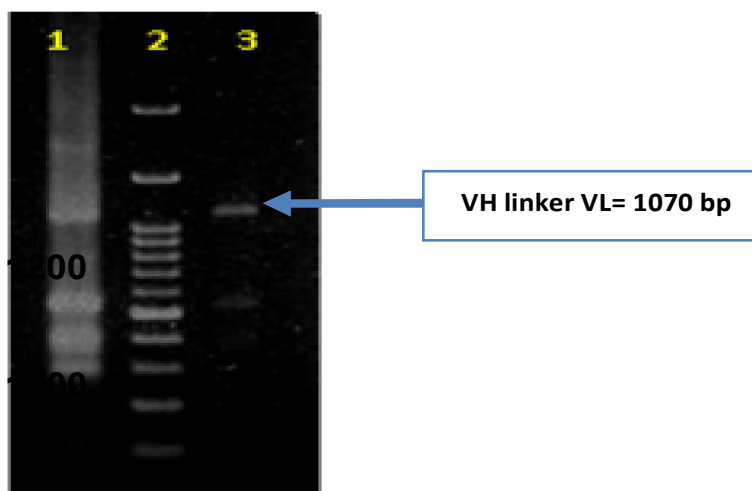
* حجم cDNA به اساس مقدار پیشنهاد شده در کیت شرکت Roche، همچنین کیفیت محصول، واکنش، PCR housekeeping تعیین شد.

پس از تغییر در شرایط واکنش Uniplex PCR، با توجه به شرایط بهینه به دست آمده، واکنش Multiplex PCR طراحی گردید. با اعمال تغییرات در غلظت مواد مورد استفاده، براساس بهینه شرایط برای واکنش Multiplex PCR، قطعات VL و VH به صورت جداگانه تکثیر شد. سپس محصولات از روی ژل استخراج شده و برای مرحله بعد مورد استفاده قرار گرفت (شکل شماره ۲).

همان‌طور که در شکل شماره ۱ مشاهده می‌شود باندهای غیراختصاصی نیز وجود دارند. بنابراین، به منظور بهینه‌سازی شرایط PCR، تغییراتی در غلظت مواد مورد استفاده و نیز کمیت cDNA داده شد. در همین راستا، واکنش PCR با گرادیان $MgCl_2$ انجام گرفت تا مناسب‌ترین غلظت $MgCl_2$ به دست آید. در نتیجه بهترین شرایط برای انجام واکنش فراهم شد.



شکل شماره ۲: الکتروفورز محصولات VL و VH خالص‌سازی شده از روی ژل ردیف ۱. VH ردیف ۲، VL ردیف ۳. مارکر ۱۰۰bp plus پس از تکثیر قطعات VL و VH به صورت جداگانه، طی یک واکنش Overlap Extension PCR (۷ سیکل ابتدایی واکنش) هر دو قطعه از سمت ۵' به یکدیگر متصل شدند و یک قطعه با طول ۱۰۷۰bp به دست آمد. سپس با افزودن پرایمرهای Semi Nested PCR، طی ۲۳ سیکل واکنش PCR؛ قطعه ۱۰۷۰bp تکثیر و جایگاه‌های برش آنزیم‌های محدودالایر NotI و XhoI نیز به دو سر آن اضافه شد (شکل شماره ۳).



شکل شماره ۳: محصول Overlap Extension PCR. ردیف ۱. محصول PCR پیش از بهینه‌سازی، ردیف ۲. مارکر ۱۰۰bp plus، ردیف ۳. محصول PCR پس از بهینه‌سازی محصول PCR

بحث

آنتی‌بادی‌ها کاربردهای تشخیصی و درمانی بسیاری دارند؛ به‌طوری‌که امروزه حدود ۳۰٪ از داروهای درمانگر از نوع آنتی‌بادی هستند (۲۴). با وجود اینکه آنتی‌بادی‌های مونوکلونال موشی، کایمیریک و انسانی بوده، اما همچنان به‌عنوان دارو مورد استفاده قرار می‌گیرند، تکنیک‌های تهیه آنتی‌بادی‌های کاملاً انسانی (Fully Human Antibodies)، به‌سرعت در حال پیشروی است؛ به‌گونه‌ای که امروزه حدود ۱۳ نوع آنتی‌بادی مونوکلونال درمانی کاملاً انسانی در بازار عرضه می‌شود (۲۵). در این دسته از آنتی‌بادی‌ها همه بخش‌ها شامل نواحی متغیر، ثابت و در صورت وجود ناحیه Fc، از ژنوم انسانی کپی‌برداری شده است که در این صورت، احتمال برانگیختن پاسخ ایمنی به حداقل خواهد رسید. از سال ۱۹۸۲ تهیه آنتی‌بادی‌های انسانی به روش هیبریدوما، سپس به روش نامیراسازی سلول‌های B رواج یافت (۴). با روی کار آمدن تکنیک نمایش فاژی در سال ۱۹۹۰، محدودیت‌های موجود در روش‌های مذکور (یافتن یک جفت مناسب جهت ادغام با لمفوسیت انسانی، پایداری کم لاین سلولی بیان‌کننده آنتی‌بادی) برطرف شد، به‌گونه‌ای که امروزه تکنیک نمایش فاژی، رایج‌ترین روش برای تهیه آنتی‌بادی انسانی محسوب می‌گردد؛ زیرا علاوه بر حذف محدودیت‌های دو روش قبلی، می‌توان به توالی آنتی‌بادی دست یافت و این امکان نیز فراهم گردد که هر نوع آنتی‌بادی مهندسی‌شده شامل آنتی‌بادی کامل، تک‌زنجیره، قطعات Fab و یا $F(ab)_2$ به دست آید (۳). لذا در این تحقیق، روش نمایش فاژی به‌منظور تعیین توالی آنتی‌بادی علیه توکسوئید کزاز انتخاب شد. تهیه آنتی‌بادی مونوکلونال علیه توکسین کزاز در دهه ۱۹۸۰ با روش هیبریدوما و نامیراسازی با EBV انجام شد (۲۶، ۱۷، ۴). پس از آن در سال ۱۹۹۶ قطعه Fab اختصاصی توکسین کزاز با استفاده از روش نمایش فاژی به دست آمد (۲۷). در ادامه نیز محققان در جهت بهبود تکنیک نمایش فاژی حرکت کردند (۲۸، ۹). در کشور ایران نیز تکنیک‌های تهیه آنتی‌بادی مونوکلونال انسانی در حال پیشرفت است (۴). آیت و همکاران اولین بار در سال ۲۰۰۵ کتابخانه آنتی‌بادی را با هدف جداسازی آنتی‌بادی مونوکلونال برای سرطان سینه تهیه کردند (۲۰). در این تحقیق ۳۶ جفت پرایمر جهت تهیه کتابخانه مورد استفاده قرار

گرفت. پس از انجام واکنش‌های PCR به‌صورت Uniplex، محصولات آنها را با هم ادغام کرده و توانستند همه تنوع ممکن ژن‌های آنتی‌بادی را تکثیر کنند. در دانشگاه شیراز نیز در سال ۲۰۰۸، کتابخانه آنتی‌بادی انسانی ساخته شد. هدف از این تحقیق، غربالگری آنتی‌بادی اختصاصی P185 بود (۲۱). در پژوهش حاضر، ابتدا شرایط بهینه جهت انجام واکنش‌های Uniplex PCR، سپس Multiplex PCR فراهم شد، سپس طی دو واکنش جداگانه Multiplex PCR، تمامی تنوع ژن‌های VH و VL از cDNA نام حاصل از لمفوسیت‌های خون فرد ایمن‌شده، تکثیر و جداسازی شدند. همان‌طور که پیشتر ذکر گردید، مجموعه پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق نیز از میان مقالات و پتنت‌های منتشرشده انتخاب شد. در مطالعه حاضر، به‌منظور ایجاد یک کتابخانه ایمن، از لمفوسیت‌های فرد واکسینه‌شده با توکسوئید کزاز استفاده شد. هدف در استفاده از آنتی‌بادی درمانی اختصاصی کزاز، خنثی‌سازی توکسین کزاز در خون بود که ساختار آنتی‌بادی آن به‌صورت تک‌زنجیره ScFv در نظر گرفته شد. بدین منظور، سه دسته پرایمر مورد استفاده قرار گرفت:

۱- طراحی مجموعه VL (۶ نوع پرایمر F و یک نوع پرایمر R)، جهت تکثیر ناحیه متغیر رشته سبک؛

۲- طراحی مجموعه VH (۸ نوع پرایمر F و یک نوع پرایمر R)، جهت تکثیر ناحیه متغیر رشته سنگین آنتی‌بادی؛

۳- مجموعه پرایمرهای مورد نیاز جهت انجام Semi Nested PCR، که از یک نوع پرایمر F و چهار نوع پرایمر R تشکیل شده و جهت تکثیر قطعه حاصل از اتصال VH و VL به یکدیگر مورد استفاده قرار می‌گیرند.

توالی پرایمرها از مطالعات انجام‌شده جهت به دست آوردن آنتی‌بادی انسانی در سال ۲۰۱۰ انتخاب شد (۱۱). ساختار پرایمرهای به کار رفته در این تحقیق از دو بخش تشکیل شده بود: ناحیه اختصاصی ژن؛ مسئول اتصال به انتهای ۵' ژن آنتی‌بادی و ناحیه Tail، که تعیین‌کننده نحوه اتصال قطعات VL و VH به یکدیگر، همچنین محل برش آنزیم جهت فرآیند کلونینگ بود. توالی موجود در بخش Tail پرایمرهای F این امکان را فراهم می‌کند، که دو قطعه VH و VL پس از تکثیر، در یک واکنش دیگر با عنوان Overlap Extension PCR به‌صورت ScFv

یکدیگر متصل شوند. با توجه به اینکه پرایمرها دارای بخش Overhang هستند، T_m برای زمانی که تنها به ناحیه اختصاصی ژن متصل می‌شود (سیکل‌های ۷-۱) نسبت به زمانی که هم ناحیه اختصاصی ژن و هم Tail متصل می‌گردد (سیکل هفتم به بعد)، متفاوت در نظر گرفته شده است. بنابراین در مطالعه حاضر، واکنش PCR به صورت دو لوپ با T_m متفاوت انجام شد. در نتیجه، علاوه بر افزایش کیفیت باندهای به دست آمده نسبت به زمانی که تنها یک لوپ برای PCR تعریف شده بود، تعداد باندهای غیراختصاصی نیز کاهش یافت. مورد دیگری که در تنظیم واکنش Multiplex PCR تأثیر به سزایی داشت؛ نسبت غلظت پرایمرهای F به پرایمر R بود. زمانی که نسبت ۱ به ۵ اعمال شد، علاوه بر افزایش کیفیت و درخشندگی باند DNA، از میزان دایمر پرایمر نیز کاسته شد. از میان پارامترهای دخیل در بهینه‌سازی، کیفیت cDNA ساخته شده و مقدار آن، اهمیت بسیاری داشت. جهت انتخاب مجموعه پرایمر مناسب برای تکثیر ژن آنتی‌بادی اختصاصی توکسوئید کزاز، نکات زیر در نظر گرفته شد:

۱- ساختار نهایی آنتی‌بادی؛ ۲- وکتور بیانی که قطعات در آن کلون می‌گردند؛ ۳- توالی آنزیم‌های محدودالایر؛ ۴- سیستم بیانی که جهت تهیه آنتی‌بادی در نظر گرفته شد. ساختار آنتی‌بادی باید پیش از طراحی پرایمر در نظر گرفته شود. در صورتی که هدف، به دست آوردن یک آنتی‌بادی تک زنجیره باشد، لازم است در ساختار پرایمرها، بخشی به صورت Overhang قرار داده شود و مهم‌ترین ویژگی این بخش آن است که بتواند امکان اتصال دو قطعه را طی یک واکنش Overlap Extension PCR فراهم سازد (۲۹). انتخاب وکتور و سیستم بیانی مناسب در میزان و کارایی آنتی‌بادی بسیار اهمیت دارد. با توجه به اینکه سیتوپلاسم یک مکان احیاکننده بوده و برای تجمع آنتی‌بادی مناسب نیست، لذا سیستم بیانی به گونه‌ای انتخاب شده است، که قطعات به فضای پری‌پلاسمی هدایت شوند. در این صورت می‌توان قطعات را به صورت ScFv بیان نمود. جهت انجام فرآیند کلونینگ لازم است تا توالی محل برش آنزیم‌های محدودالایر در پرایمرها قرار داده شود. مهم‌ترین مبنای انتخاب آنزیم‌های محدودالایر، عدم احتمال وجود توالی شناساگر آنزیم در توالی‌های مربوط به

آنتی‌بادی است. در این تحقیق با عنایت به نکات ذکر شده، مجموعه پرایمرهای مناسب از میان منابع مختلف انتخاب و شرایط بهینه Multiplex PCR به دست آمد (در بخش مواد و روش‌ها ذکر شده است). تحقیقاتی که تاکنون در زمینه بهینه‌سازی واکنش Multiplex PCR صورت گرفته، اغلب بر روی ژن‌هایی غیر از آنتی‌بادی بوده است. تفاوت مهمی که در این میان وجود دارد این است که اندازه ژن‌های تکثیرشونده در اغلب واکنش‌های چندگانه‌ای که برای بهینه‌سازی در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفت، با یکدیگر بسیار تفاوت داشت؛ به گونه‌ای که بررسی تکثیر و عدم تکثیر یک ژن خاص در اثر تغییر شرایط امکان‌پذیر بود (۳۱، ۳۰)، در صورتی که هنگام تکثیر ژن‌های آنتی‌بادی، تنوع گسترده‌ای از ژن‌های هم‌اندازه متعلق به یک خانواده نیز تکثیر می‌یابد. بنابراین، روش‌های مورد استفاده در این تحقیق به گونه‌ای انتخاب شد، که ریسک عدم بیان وجود نداشته باشد. همچنین در مطالعات پیشین انجام شده، جهت بهینه‌سازی Multiplex PCR، مربوط به تغییر غلظت مواد و دمای واکنش بوده است (۳۲). در تحقیق حاضر نیز علاوه بر تغییر دما و غلظت، تغییر در تعداد لوپ واکنش‌های PCR، همچنین دو مرحله‌ای نمودن واکنش، نتیجه بسیار بهتری را نشان داد.

نتیجه‌گیری

طبق نتایج این مطالعه، انتخاب پرایمر مناسب و بهینه‌سازی شرایط واکنش، طی دو واکنش PCR چندگانه، تمام تنوع ژنتیکی بخش‌های متغیر زنجیره سبک کاپا و سنگین را از لمفوسیت‌های فرد ایمن شده با توکسوئید کزاز، تکثیر می‌دهد. سپس طی یک واکنش Overlap Extension PCR، قطعات VH و VL به صورت ScFv به یکدیگر متصل می‌شوند. در نهایت، با انجام واکنش Semi Nested PCR توالی‌های ScFv با حساسیت بیشتر تکثیر و محل برش آنزیم‌های محدودالایر به دو انتهای آنها اضافه می‌گردد. در ادامه، این قطعات با آنزیم‌های محدودالایر برش داده شده و وارد وکتور فازی می‌شوند. لذا استفاده از این مجموعه پرایمر جهت تکثیر توالی هر نوع آنتی‌بادی توصیه می‌گردد. همچنین با توجه به استفاده از دو واکنش Multiplex PCR و اینکه پرایمرهای Semi Nested PCR اختصاصی ناحیه JH

می‌باشند، پیشنهاد می‌گردد برای بیان آنتی‌بادی از وکتورهایی استفاده شود که ناحیه CH1 در ساختار آنها موجود باشد. مناسب‌ترین وکتور برای بیان آنتی‌بادی اختصاصی توکسین کزاز که با پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق تکثیر شده است، وکتور JSK301 نام دارد، که با استفاده از آن می‌توان قطعات آنتی‌بادی را در میزبان پروکاریوتی E.coli بیان نمود.

References:

1. Petering J, McManamny P, Honeyman J. Antibody therapeutics– the evolving patent landscape. *New Biotechnol* 2011;28(5):538-44.
2. Ruuls SR, Lammerts van Bueren JJ, van de Winkel JGJ, Parren PWHI. Novel human antibody therapeutics: The age of the Umabs. *Biotechnol J* 2008;3(9-10):1157-71.
3. van Dijk MA, van de Winkel JGJ. Human antibodies as next generation therapeutics. *Curr Opin Chem Biol* 2001 Aug; 5(4):368-74.
4. Kozbor D, Lagarde AE, Roder JC. Human hybridomas constructed with antigen-specific Epstein-barr virus-transformed cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982 Nov; 79(21):6651-5.
5. Liao H-X, Levesque MC, Nagel A, Dixon A, Zhang R, Walter E, et al. High-throughput isolation of immunoglobulin genes from single human B cells and expression as monoclonal antibodies. *J Virol Methods* 2009 Jun; 158(1-2):171-9.
6. Rojas G, Lamdan H, Padron S, Munoz Y, Ayala M, Gavilondo JV. Efficient construction of a highly useful Phage-displayed human antibody repertoire. *Biochem Biophys Res Commun* 2005 Nov 4;336(4):1207-13.
7. Islam MO, Lim YT, Chan CE, Cazenave-Gassiot A, Croxford JL, Wenk MR, et al. Generation and characterization of a novel recombinant antibody against 15-ketocholestane isolated by Phage-display. *Int J Mol Sci* 2012;13(4):4937-48.
8. Nimmagadda SV, Aavula SM, Biradhar N, Sula S, Lingala R, Chandran D, Villuppanoor SA. Development of recombinant single-chain variable fragment against Hepatitis A virus and its use in quantification of Hepatitis A antigen. *Biologicals* 2012 Jul; 40(4):299-308.
9. de Kruif J, Kramer A, Visser T, Clements C, Nijhuis R, Cox F, et al. Human immunoglobulin repertoires against Tetanus toxoid contain a large and diverse fraction of high-affinity promiscuous VH genes. *J Mol Biol* 2009 Apr 3;387(3):548-58.
10. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology: With student consult. 7th ed, New York: Elsevier Sunders; 2011.
11. Oleksiewicz MB, Nielsen LS, Andersen PS, Hansen MH. Method for linking sequences of interest. Patent; US 7749697 B2.
12. Wahlberg T, Leibl H, Brauner A, Kirgios M, Adner N. Tetanus antibody levels of female volunteers after injection with solvent/detergent-treated human tetanus immunoglobulin (Tetabulin S/D). *Vox Sang* 2001 Apr; 80(3):159-61.
13. Mathers CD, Fat DM, Boerma J. Health statistics and health information systems: The global burden of disease. World Health Organization. Available From: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease. Accessed, 2008.
14. Attygalle D, Rodrigo N. New trends in the management of tetanus. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2004 Feb; 2(1):73-84.
15. Linnenbrink T, McMichael M. Tetanus: Pathophysiology, clinical signs, diagnosis, and update on new treatment modalities. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2006;16(3):199-207.
16. Haurum JS. Recombinant polyclonal antibodies: The next generation of antibody therapeutics? *Drug Discov Today* 2006 Jul; 11(13-14):655-60.

17. Kozbor D, Roder JC, Chang TH, Steplewski Z, Koprowski H. Human anti-tetanus toxoid monoclonal antibody secreted by EBV-transformed human B cells fused with murine myeloma. *Hybridoma* 1982;1(3):323-8.
18. Meijer PJ, Andersen PS, Haahr Hansen M, Steinaa L, Jensen A, Lantto J, et al. Isolation of human antibody repertoires with preservation of the natural heavy and light chain pairing. *J Mol Biol* 2006 May 5;358(3):764-72.
19. Modjtahedi H, Ali S, Essapen S. Therapeutic application of monoclonal antibodies in cancer: Advances and challenges. *Br Med Bull* 2012;104:41-59.
20. Ayat H, Rastgo N, Jahanzad E, Sadghizadeh M, Arbabi M. Construction of human recombinant ScFv phage libraries from the advanced stages of breast carcinoma patients. *Iran J Biotechnol (IJB)* 2005;3(3):170-79.
21. Nejatollahi F, Malek-Hosseini Z, Mehrabani D. Development of single chain antibodies to P185 tumor antigen. *Iran Red Crescent Med J (IRCMJ)* 2008;10(4):298-302.
22. He X-S, Sasaki S, Narvaez CF, Zhang C, Liu H, Woo JC, et al. Plasmablast-derived polyclonal antibody response after influenza vaccination. *J Immunol Methods* 2011 Feb 28;365(1-2):67-75.
23. Sun Y, Li Y, Luo D, Liao DJ. Pseudogenes as weaknesses of ACTB (Actb) and GAPDH (Gapdh) used as reference genes in reverse transcription and polymerase chain reactions. *Plos One* 2012;7(8):e41659.
24. Souriau C, Hudson PJ. Recombinant antibodies for cancer diagnosis and therapy. *Expert Opin Biol Ther* 2003 Apr; 3(2):305-18.
25. Nelson AL, Dhimolea E, Reichert JM. Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. *Nat Rev Drug Dis Cov* 2010;9(10):767-74.
26. Kozbor D, Roder JC. Requirements for the establishment of high-titered human monoclonal antibodies against tetanus toxoid using the Epstein-Barr virus technique. *J Immunol* 1981 Oct; 127(4):1275-80.
27. Vogel M, Lai L, Rudolf M, Curcio-Vonlanthen V, Miescher S, Stadler B. Cross reactive anti-tetanus and anti-melittin Fab fragments by phage display after tetanus toxoid immunisation. *Hum Antibodies Hybridomas* 1996;7(1):11-20.
28. Poulsen TRM, Jensen PJ, Nielsen A, Andersen LS. Kinetic, affinity, and diversity limits of human polyclonal antibody responses against tetanus toxoid. *J Immunol* 2007 Sep 15;179(6):3841-50.
29. Jensen P. Human antibody repertoires. In: S Dimitrov A, editor. *Therapeutic antibodies: Methods and protocols*. New York: Humans Press; 2009.
30. Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vance GH, Vogt PH. Multiplex PCR: Critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques* 1997 Sep; 23(3):504-11.
31. Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, Klapper PE. Multiplex PCR: Optimization and application in diagnostic virology. *Clin Microbiol Rev* 2000 Oct; 13(4):559-70.
32. Markoulatos P, Siafakas N, Moncany M. Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. *J Clin Lab Anal* 2002;16(1):47-51.