چهارمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران
کرمان مردادماه ۱۳۸٤

مرکز بین المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی
International Center For Science & high Technology and Environmental Sciences

The 4th National Biotechnology congress
Islamic Republic of Iran
Kerman august 2005

تولید آنتی بادی های سبز فلوروسنت جهت تشخیص سریع آزمایشگاهی مارکرهای توموری

شادی امین ، نسرین راستگو* ، مهدی اربابی ، زهرا مقدسی جهرمی**
پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و فناوری زیستی

چکیده:
پيشرفت در تكنولوژي آنتي باديهاي نوتركيب منجر به توليد آني باديهاي نوتركيبي شد كه محصول زيادي را توليد مي كنند و به عنوان عوامل درماني استفاده مي شوند. از جمله مهمترين آنتي باديهاي نوتركيب آنتي باديهاي تک زنجيره اي(scFv) مي باشند كه اين قطعات آنتي بادي از مولكول هاي كامل آنتي بادي مانند ايمونوگلوبولين G مشتق شده اند و خصوصيات بيوفيزيكو شيميايي آنها مشابه مولكول والدي است. پروتئين فلورسنت سبز (GFP) به طور ژنتيكي مي تواند با بسياري از پروتئين هاي گونه هاي مختلف فيوز شود و يک مولكول كايمر پايداري را ايجاد كند كه فعاليت بيولوژيكي اصلي خودش را كه خصوصيت فلورسنت مي باشد حفظ مي نمايد. بعلاوه شدت فلورسنت در موتانت هاي GFP (مثل EGFP) حدود ۳۵-۲۵ بار افزايش مي يابد. در اين تحقيق EGFP را به مولكول SCFV ساخته شده عليه ماركر سرطاني CEA متصل كرديم. مولكول DNA نوتركيب در ناقل فاژميدي pHEN6 كلون شد و در پري پلاسم سلول هاي باكتريايي بيان گرديد و با روش وسترن بلاتينگ و اسپكتروسكوپي اين بيان تائيد شد. براي بررسي فعاليت پروتئين فيوژن در in vitro سلولهاي CEA مثبت (MCF-7) با پروتئين نوتركيب انكوبه شد و خصوصيات اتصال آنتي بادي فلوروفور به وسيله ميكروسكوپ فلورسنت كنترل شد و وجود رنگ فلورسنت سبز در سلولهاي CEA مثبت اثبات گرديد.

Abstract
Advanced in recombinant antibody technology have led to the generation of recombinant antibodies which greatly improved the production output, and opened new windows for application of these bio-reagent in medicine. Among the most important recombinant antibody molecules generated are single-chain of variable domain(scFv). These antibody fragments are derived from complete antibody molecules such as IgG and their biophysico-chemical properties is similar to the parental molecules. Green fluorescent protein (GFP) originally isolated from the Jellyfish Aequorea Victoria, has been genetically fused to many protein in various species to produce stable chimeras which apparently retain their original biological activity as well as retaining the fluorescent properties of native GFP. Moreover, variants of GFP that fluorescence between 25-35 fold more intensely than wild type, such as EGFP have been generated by mutagenesis. In the present study, we have linked the EGFP marker to a scFv specific for the carcinoembryonic antigen (CEA) (our previous study) . The recombinant DNA molecule was cloned into a phagemid vector (pHEN6) and expressed in the priplasm of bacterial cells. The expression of scFv-GFP fusion protein in E.coli was confirmed by western blotting and spectroscopy. To test the functionality of the fusion protein in vitro, CEA-positive cell lines (MCF-7) werw incubated with scFv-EGFP proteins, and the binding properties of the fluoro-antibody was monitored by fluorescent microscopy. THE CEA-positive cell lines stained green on the surface but the negative control(SKOV3 cells) remained un stained.

مقدمه:
نواحي اتصال به آنتي ژن در هر نوع آنتي بادي متغير مي باشد كه FV (Fragment variable) ناميده مي شود. آنتي بادي هاي نوتركيب عموماً بر اساس مولكول هاي ايمونوگلوبولين نوع G طراحي مي شود. قطعات FV هتروديمرهايي هستند كه از يک ناحيه متغير سنگين (VH) و يک ناحيه متغير سبک (VL) تشكيل شده اند و كوچكترين بخش كاراي آنتي بادي هستند كه خصوصيت اتصال به آنتي ژن را حفظ كرده اند اما مهمترين اشكال اين قطعات ناپايداري آن مي باشد. با ساختن مولكول هاي نوتركيب كه در آنها VH و VL با يک پپتيد اتصالي به يكديگر متصل شده اند، مي توان FV هاي پايدار را توليد نمود.(۱) به اين مولكول نوتركيب اصطلاحاً آنتي بادي تک زنجيره اي يا scFv اطلاق مي شود. مولكول scFv نوتركيب كه در E.coli بيان شود داراي عملكردي مشابه با مولكول والد اوليه خود يعني IgG مي باشد. و از طرفي از لحاظ اندازه اين مولكول حدود يک پنجم مولكول والد بوده و داراي مزاياي بسياري نسبت به والد اوليه آن از قبيل تصفيه سريع از پلاسما است كه منجر به جذب بالاتر بافت توموري نسبت به بافت نرمال مي شود و به مدت طولاني هم در جريان خون باقي نمي ماند كه منجر به سمي شدن مغز استخوان گردد. (۲)
ايمونوفلورسانس روشي است كه در آن با استفاده از آنتي بادي هاي نشاندار فلورسنت كه گروه فلورسنت به صورت كووالان به آنها متصل است و هيچگونه تغيير قابل ملاحظه اي در فعاليت آنتي بادي ايجاد نمي كند جايگاه يک آنتي ژن مشخص مي شود. يكي از آن مولكول هاي فلورسنت پروتئين GFP است كه داراي 238 آمينواسيد و وزن مولكولي حدود 27 كيلودالتون مي باشد GFP در اثر تابش نور ۴۷۰ nm تحريک شده و در طول موج ۵۰۷ nm (نور سبز) تابش مي كند. (۳) ۳۰ سال پس از شناسايي اين پروتئين از آن به عنوان يک ماركر در تحقيقات مدرن انتقال ژن به كار گرفته شد.(۴)در اين تحقيق ژن GFP به صورت فيوژن به مولكول scFv ساخته شده عليه ماركر سرطاني CEA كه قبلاً در اين گروه كلون سازي و بيان شده بود، قرار گرفت و بيان پروتئين فيوژ شده و عملكرد آن بر روي سلولهاي يوكاريوتي كه داراي ماركر سرطاني CEA بودند، بررسي گرديد.
كلمات كليدی: آنتی بادی نوتركيب ، مولكول scFv ، پروتئين فلورسنت GFP

مواد و روش ها:
تكثير قطعات SCFV و EGFP با روش PCR : بر اساس تحقيقات قبلي اين گروه مولكول scFv عليه ماركر توموري CEA ساخته شده در وكتور Pcantab كلون سازي شده بود و عملكرد اين مولكول از نظر قدرت اتصال به آنتي ژن و نيز اختصاصيت آن بررسي شده بود. با استفاده از پرايمرهاي اختصاصي C4 و C`4 مولكول scFv از اين كاست ژني با روش PCR جداسازي و تكثير گرديد. اين پرايمرها داراي جايگاه برش آنزيمي *sfi*I و *Not*I بود. دو پرايمر GF1 و GF3 (به ترتيب مكمل بخش ابتدايي `5 و انتهاي `3) با جايگاه*BamH*I و*Not*I براي تكثير ژن EGFP طراحي شد. ناقل حامل cDNA كد كننده EGFP كه توسط گروه بيوتكنولوژي انستيتو پاستور ايران اهدا گرديده بود به عنوان DNA الگو در واكنش PCR مورد استفاده قرار گرفت و قطعه مورد نظر تكثير شد
كلون سازي قطعات GFP و scFv در وكتور بيانی pHEN6 : ابتدا قطعه GFP تكثير شده با آنزيم هاي *BamH*I و *Not*I برش داده شد و در اين جايگاهها در وكتور pHEN6 كه توسط همين گروه ساخته شده بود، كلون گرديد. و بعد از تائيد صحت كلونينگ با آزمايش هاي كلني PCR و هضم آنزيمي چند تا از كلون هاي نوتركيب انتخاب شدند و اين بار با آنزيم هاي *sfi*I و *Not*I برش داده شدند. مولكول scFv هضم شده با همين دو آنزيم در اين جايگاه كلون سازي گرديد و با آزمايش كلني- PCR و هضم آنزيمي كلونينگ تأييد شد وكتور نوتركيب حاصل تعيين ترادف گرديد.

بيان پروتئين فيوژن scFv-GFP :براي بررسي بيان كلون هاي نوتركيب و با توجه به پروموتر موجود در وكتور (Lacz) كه تحت القاي IPTG قرار مي گيرد كلون هاي نوتركيب پس از القاي بيان ژن و استخراج پروتئين آنها از فضاي پري پلاسميک روي ژل SDS-PAGE برده شد. و جهت تأييد بيان وسترن بلاتينگ با آنتي بادي مونوكلونال ضد پروتئين EGFP انجام گرديد. از طرفي بيان EGFP در سلول باكتريايي با مشاهده زير ميكروسكوپ فلورسنت بررسي شد كه براي اين منظور پس از القاي بيان سلولهاي باكتري بر روي لام ميكروسكوپ پخش گرديد و سپس با فيلتر GFP ميكروسكوپ مشاهده گرديد.

مطالعه اسپكتورفتومتري پروتئين فلورسنت: ميزان فلورسنت مولكول فيوژن توسط يک دستگاه اسپكتروفلورسنت در محدوده تحريک 450nm و تابش 515nm و در يک كووت با عرض شكاف 25 ميكرومتري اندازه گيري شد. ابتدا با بافر TE5 پروتئين فيوژن از فضاي پري پلاسمي استخراج شد. نمونه كنترل مثبت يک پروتئين فيوژ شده با مولكول EGFP با وزن مولكولي 110KD بود از بافر TES به عنوان كنترل منفي استفاده شد

.بررسي قدرت اتصال مولكول فيوژن نوتركيب به سلولهاي CEA مثبت (MCF7) :

سلول هاي MCF7 بر روي لامل هاي كوچک استريل در درون يک پليت استريل كشت داده شد تا سلول ها به مرحله مناسبي از رشد رسيده و تعدادشان زياد شود. براي فيكس كردن سلول ها ابتدا آنها را در PBS1% كشت داده و سپس با بارافرماالدئيد 4% فيكس شد و دوباره با PBS شستشو داده شد. سپس رسوب پروتئيني را به مدت يک ساعت روي سلول هاي فيكس شده ريخته و پس از شستشو با ميكروسكوپ فلورسنت مشاهده مي شود.

نتايج:

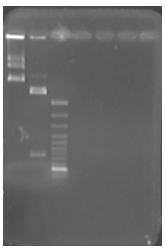
كلون سازي ژن EGFP و SCFV در وكتور pHEN6 :پس از هضم آنزيمي وكتور و نيز محصول PCR ، EGFP با آنزيم هاي NotI و BamHI و انجام واكنش ligation استرين كلون هاي حاصله با روش كلني- PCR انجام شد. (شكل۱) و سپس با آزمايش هضم آنزيمي با اين دو آنزيم صحت كلونينگ در نمونه هاي مثبت تأييد شد (شكل۲) سپس قطعه scFv و وكتور نوتركيب حاصله با آنزيمهاي *sfi*I و *Not*I هضم شدند و پس از انجام واكنش كلون سازي با روش كلني PCR (شكل ۳) و هضم آنزيمي (شكل۴) بر كلون هاي نوتركيب انتخاب شدند. يكي از كلون هاي نوتركيب حاصل تعيين ترادف شد و با برنامه BLAST مورد بررسي قرار گرفت. نتايج نشان داد كه ترادف ژني مربوط به scFv و EGFP ما با ترادف DNA كد كننده موجود در بانک ژن جهاني و نيز نتايج قبلي كار اين گروه تطابق كامل دارد

بررسي بيان پروتئين SCFV-EGFP در كلون هاي نوتركيب بدست آمده:بعد از القاي كلون هاي نوتركيب با IPTG و استخراج پري پلاسمي پروتئين از باكتري، نمونه هاي پروتئيني روي ژل SDS-PAGE برده شد. وزن پروتئيني فيوژن ما بايد حدود 53.5KD باشد. (شكل۵ و۶) همچنين باكتريهاي بيان كننده اين مولكول فيوژن مستقيماً زير ميكروسكوپ فلورسنت ديده شد (شكل7) . در اين آزمايش كل سلول باكتري به رنگ سبز براق زير ميكروسكوپ ديده مي شد ولي در نمونه كنترل منفي (كلون scFv اوليه كه قبلاً توسط اين گروه ساخته شده بود) زمينه كاملاً تاريک بود

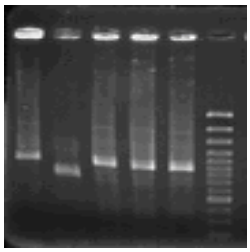
مطالعات اسپكتروفوتومتري پروتئين فلورسنت و بررسي قدرت اتصال آنتي بادي نوتركيب نشاندار توليد شده به سلول هاي CEA مثبت:ميزان فلورسنت مولكول فيوژن توسط دستگاه اسپكتروفلورسنت در محدوده تحريک 450nm و تابش 515nm اندازه گيري شد (شكل۸) همانگونه كه در نمودار مشخص است ميزان فلورسنت اندازه گيري شده در نمونه ما قابل مقايسه با نمونه كنترل مثبت مي باشد.در اين مرحله هم از پروتئين هاي فضاي پري پلاسم براي انجام آزمايش استفاده شد.پس از انتقال سوپ پروتئيني به سلول هاي CEA مثبت و مشاهده آن زير ميكروسكوپ فلورسنت نشاندار شدن اين سلول ها با فلورسنت سبز نسبت به كنترل منفي نشاندهنده اتصال مناسب آنتي بادي نشاندار نوتركيب توليد شده به ماركر سرطاني CEA به سلول هاي MCF-7 مي باشد. (شكل ۹)

References:

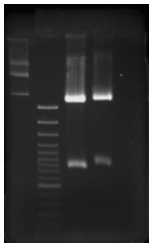
1-H.Zola(2000) monoclonal antibodes. Pp: 8-34
2-Chester KA, Mayer A, Bhatia J , Robson L , Spencer DI , Cooke SP , Begent RH.(2000) Recombinant anticarcinoembrynic antigen antibodies for targeting cancer. Cancer Chemotherapy Pharmacol , 46: 8-12
3- Yang F, Moss L.G, Philips G. n (1996) The molecular structure of green fluorescent protein , Nat. Biotechnol , 14:1246-1251
4- Chalfie M, Tu Y , Euskirchen G, Word W, Prasher D.(1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression , Science , 263:802-5



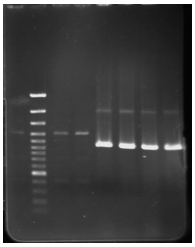
شكل ۴: واكنش هضم آنزيمي يكي از كلونيهاي مثبت با آنزيمهاي *NotI,SfiI*. لاين ۱:پلاسميد هضم نشده ، لاين ۲ :كلونی۵، لاين۳: ماركر وزن مولكولی 100bp



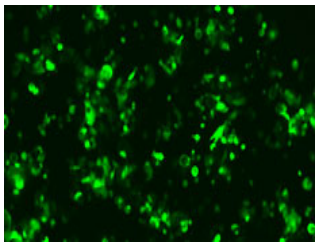
شكل ۳: كلنی-PCR چند كلونی از محصول ترانسفورميشن واكنش اتصال pHEN6-GFP وscFv . لاين ۵-۱: كلونيهای ۵- ۱ ، لاين۶: ماركر وزن مولكولی 100bp



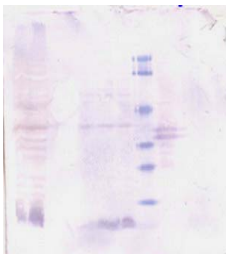
شكل :۲واكنش هضم آنزيمی ۲ تا از كلونيهای مثبت با آنزيمهای *NotI,BamHI*. لاين ۱: پلاسميد هضم نشده ، لاين ۲ : ماركر وزن مولكولی 100bp ، لاين۳و۴ : كلونيهای ۴ و۶



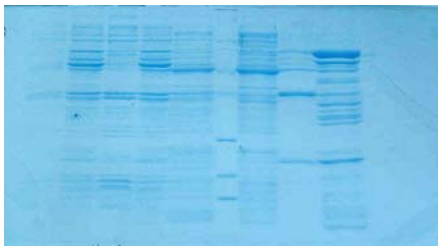
شكل ۱: كلنی-PCR چند كلونی از محصول ترانسفورميشن واكنش اتصال pHEN6 وGFP . لاين ۱: ماركر وزن مولكولی 100bp ، لاينهای ۷-۲ : كلونيهای ۶-۱



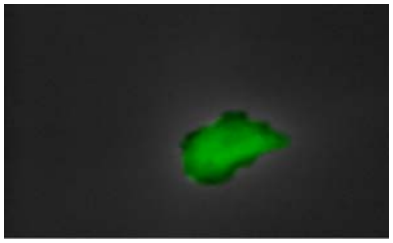
شکل ۷: باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب ساخته شده (pHEN6-GFP-scFv) در زیر میکروسکوپ فلوروسنت که به صورت نقاط سبز درخشنده دیده می شود.



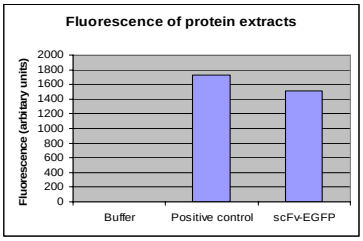
شکل ۶: آنالیز وسترن بلات با آنتی بادی ضد GFP . چاهک ۱و۲: نمونه پروتئینی از دو کلونی نوترکیب ساخته شده (pHEN6-GFP-scFv) ، چاهک ۳: مارکر وزن مولکولی به ترتیب از بالا: ۱۲۰، ۹۷، ۵۵/۴، ۳۶، ۲۸/۹، ۲۰/۹ کیلو دالتون ، چاهک ۴: کنترل مثبت ، چاهک ۵: کنترل منفی



شکل ۵: SCS-PAGE نمونه های پروتئینی. چاهک total:۱ قبل از القا ، چاهک total:۲ بعد از القا ، چاهک ۳: رسوب قبل از القا ، چاهک ۴:رسوب بعد از القا ،چاهک ۵: سوپ اول قبل از القا ، چاهک۶: مارکر وزن مولکولی به ترتیب از بالا: ۱۱۶ ، ۶۶/۲ ، ۴۵ ،۳۵ ، ۲۵ ، ۱۸,۴ کیلو دالتون، چاهک ۷: سوپ اول بعد از القا ، چاهک ۸: سوپ دوم قبل از القا ، چاهک ۹: سوپ اول بعد از القا



شکل ۸: سلول های MCF-7 که با پروتئین نوترکیب scFv-GFP اثر داده شده اند و زیرمیکروسکوپ فلورسنت به دلیل اتصال آنتی بادی نشاندار به آنتی زنهای سطح سلول سرطانی به رنگ سبز دیده می شوند.



شکل ۸: بررسی اسپکتروفوتومتری پروتئین فلورسنت. به ترتیب از چپ: کنترل منفی (TES) ، کنترل مثبت ، نمونه scFv-GFP

Surf and download all data from SID.ir: www.SID.ir

Translate via STRS.ir: www.STRS.ir

Follow our scientific posts via our Blog: www.sid.ir/blog

Use our educational service (Courses, Workshops, Videos and etc.) via Workshop: www.sid.ir/workshop