جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقاله پژوهشی
(Original Article)

دوره هشتم، شماره اول، فروردین ـ اردیبهشت ۹۳
صفحه ۱ الی ۹

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

معصومه بزاز[۱]، حمیده روحانی‌نژاد[۲]، رامین فلاح‌زاده[۳]، سید حمیدرضا خاتمی[۳]، جلیل فلاح مهرآبادی[۴*]

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

[۲]دانشجوی دکتری میکروب‌شناسی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران.

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

[۴]استادیار میکروب‌شناسی، 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

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 پلیمراز 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 به‌صورت ScFv و واکنش Semi Nested PCR جهت افزودن جایگاه برش آنزیم محدودالاثر به دو انتهای قطعه انجام شد.

یافته‌ها: در انجام دو واکنش Multiplex PCR ، دو قطعه VH و VL به ترتیب به اندازه‌های ۴۱۰bp و ۶۸۰ تکثیر شد. با واکنشOverlap Extension PCR، دو قطعه VH و VL به‌صورت ScFv به‌هم 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 به‌صورت قطعات VH و VL از خون فرد ایمن‌شده با توکسوئید کزاز تکثیر کرد.

کلید واژه‌ها: آنتی‌بادی نوترکیب؛ توکسوئید کزاز؛ واکنش زنجیرهای پلیمراز چندگانه.

لطفاً به این مقاله به‌صورت 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]

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

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 (۷،۶). 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 VH (Variable Heavy) و دسته دوم پرایمرهای اختصاصی ناحیه متغیر زنجیره سبک آنتی‌بادی VL (Variable Light) می‌باشد (۱۱). بیماری کزاز نوعی عفونت حاصل از سم بوده که عامل ایجاد آن، باکتری بی‌هوازی کلستریدیوم 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 سالیانه 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 زمانی‌که در خون در حال گردش است، می‌باشد (۱۴). خنثی‌کننده‌های توکسین کزاز ماهیت آنتی‌بادی دارند و اغلب از سرم‌های هایپرایمیون حیوانی یا انسانی تهیه می‌شوند. با وجود پیشرفت‌های صورت گرفته در زمینه تهیه آنتی‌بادی‌های درمانی، همچنان جهت درمان کزاز، از سرم هایپرایمیون انسانی یا حیوانی و یا آنتی‌بادی پلی‌کلونال جداشده از سرم استفاده می‌شود (۱۵). امروزه، دارویی با نام تتابولین جهت درمان کزاز مورد استفاده قرار می‌گیرد که از نوع سرم هایپرایمیون انسانی است (۱۴،۱۲). 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 سلولB، اقدام به تهیه آنتی‌بادی انسانی نمودند (۱۷،۴). 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 فازی برای تهیه آنتی‌بادی‌های انسانی دیگری به کار گرفته شده است (۲۱،۲۰). 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.

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

لذا این تحقیق با هدف طراحی و بهینه‌سازی واکنش زنجیرهای پلیمراز چندگانه و به‌روزسازی روش تهیه کتابخانه ژنی‌آنتی‌بادی 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 دیفتری - 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 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:cttcctcctcctgagcagtc) و (R:aacacttcgtggggtccttt) 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 شماره۱: توالی پرایمرهای پیشرو و پسرو جهت تکثیر نواحی متغیر زنجیره سنگین، زنجیره سبک کاپا و واکنش Semi Nested PCR

نام	توالی
F:VH 41	tattggcgcgccatggccCAGRTGCAGCTGGTGCART
F:VH 42	tattggcgcgccatggccSAGGTCCAGCTGGTRCAGT
F:VH 43	tattggcgcgccatggccCAGRTCACCTTGAAGGAGT
F:VH 44	tattggcgcgccatggccSAGGTGCAGCTGGTGGAG
F:VH 45	tattggcgcgccatggccCAGGTGCAGCTACAGCAG
F:VH 46	tattggcgcgccatggccCAGSTGCAGCTGCAGGAGT
F:VH 47	tattggcgcgccatggccGARGTGCAGCTGGTGCAGT
F:VH 48	tattggcgcgccatggccCAGGTACAGCTGCAGCAGTC
R:CH9	GACSGATGGGCCCTTGGTGG
F:VLk 54	gccatggcgcgccaatagctagccGACATCCAGWTGACCCAGTCT
F:VLk 55	gccatggcgcgccaatagctagccGATGTTGTGATGACTCAGTCT
F:VLk 56	gccatggcgcgccaatagctagccGAAATTGTGWTGACRCAGTCT
F:VLk 57	gccatggcgcgccaatagctagccGATATTGTGATGACCCACACT
F:VLk 58	gccatggcgcgccaatagctagccGAAACGACACTCACGCAGT
F:VLk 59	gccatggcgcgccaatagctagccGAAATTGTGCTGACTCAGTCT
R:CLk 60	atatatatgcggccgcttaTTAACACTCTCCCCTGTTGAA
F:JH 61	ggaggcgctcGAGACGGTGACCAGGGTGCC
F:JH 62	ggaggcgctcGAGACGGTGACCATTGTCCC
F:JH 63	ggaggcgctcGAGACGGTGACCAGGGTTCC
F:JH 64	ggaggcgctcGAGACGGTGACCGTGGTCCC
R:CLk 21	accgcctccaccggcggccgcttaTTAACACTCTCCCCTGTTGAAGCTCTT

با استفاده از هر پرایمر به‌صورت جداگانه، واکنش PCR انجام شد و پس از تغییر شرایط از جمله (تغییر تعداد سیکل، گرادیان دمای اتصال، غلظت $MgCl_2$، غلظت dNTP، تغییر کمیّت 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 به‌گونه‌ای انتخاب گردید، که نسبت هریک از پرایمرهای F به کل غلظت پرایمر R، ۱ به ۵ باشد. در ادامه، شرایط دمایی واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر به‌صورت 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).

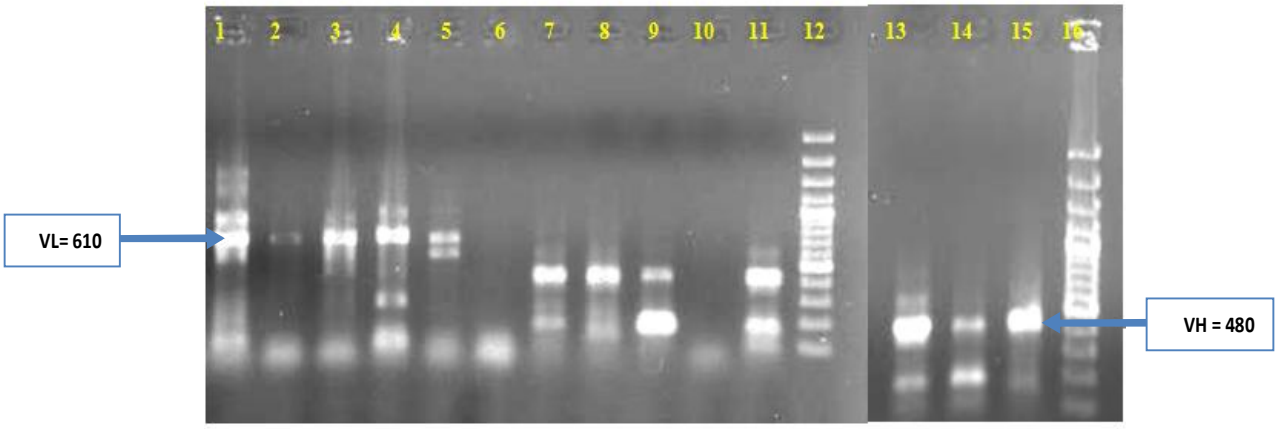
جدول شماره۲: غلظت مواد مورد استفاده جهت انجام دو واکنش Multiplex PCR با شرایط بهینه‌شده

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

به‌منظور اتصال قطعات VH و VL و به دست آوردن توالی ScFv، یک واکنش Overlap Extenssion 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 پرایمرهای موردنظر، قطعه مذکور تکثیر شود.

یافته‌ها

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



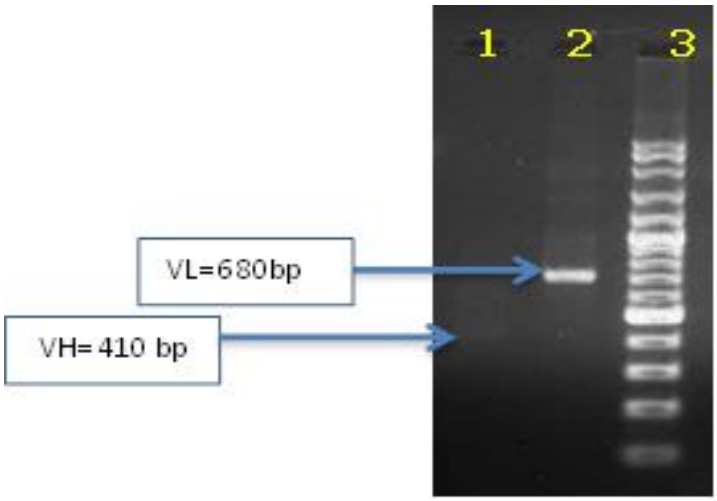
شکل شماره ۱: انجام واکنش PCR، با استفاده از پرایمرهای VH و VL. ردیف‌های ۱ الی ۶ نتیجه PCR با پرایمرهای VL و ردیف‌های۷ الی۱۱، ۱۳، ۱۴ و ۱۵ نتیجه PCR با اندازه محصول PCR ناحیه VH و VL به ترتیب قطعاتی به طول ۴۱۰bp و ۶۸۰bp می‌باشند. (به دلیل زیاد بودن تعداد نمونه‌ها از دو ژل جداگانه استفاده شده و سپس تصویر 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.

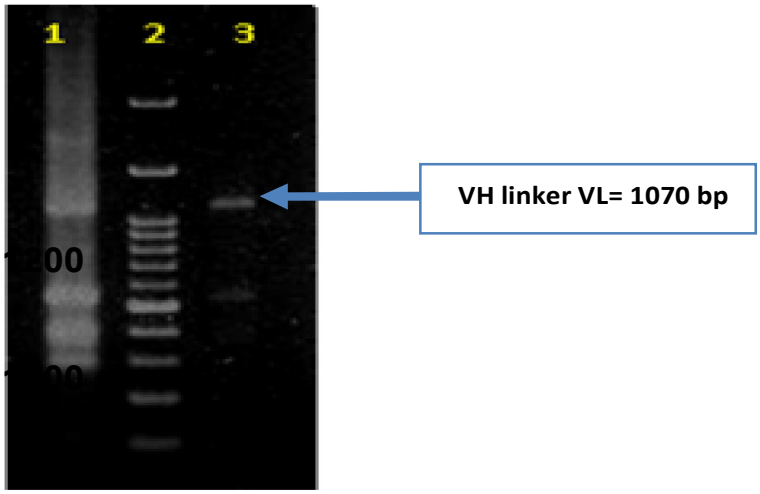
***حجم cDNA بر اساس مقدار پیشنهاد شده در کیت شرکت Roche، همچنین کیفیت محصول واکنش housekeeping PCR تعیین شد.**

همان‌طورکه در شکل شماره ۱ مشاهده می‌شود باندهای غیراختصاصی نیز وجود دارند. بنابراین، به‌منظور بهینه‌سازی شرایط PCR، تغییراتی در غلظت مواد مورد استفاده و نیز کمیّت 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.

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 VH و VL به‌صورت جداگانه تکثیر شد. سپس محصولات از روی ژل استخراج شده و برای مرحله بعد مورد استفاده قرار گرفت (شکل شماره ۲).



شکل شماره۲: الکتروفورز محصولات VH و VL خالص‌سازی‌شده از روی ژل ردیف ۱. VH ردیف ۲. VL، ردیف ۳. مارکر ۱۰۰bp plus پس از تکثیر قطعات VL و VH به‌صورت 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 محدودالاثر NotI و XhoI نیز به دو سر آن اضافه شد (شکل شماره۳).



شکل شماره۳: 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، کایمریک و انسانی بوده، اما همچنان به‌عنوان دارو مورد استفاده قرار می‌گیرند، تکنیک‌های تهیه آنتی‌بادی‌های کاملاً انسانی (Fully Human Antibodies)، به‌سرعت در حال پیشروی است؛ به‌گونه‌ای‌که 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، به‌گونه‌ای‌که 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 تام حاصل از لمفوسیت‌های خون فرد ایمن‌شده، تکثیر و جداسازی شدند. همان‌طورکه 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 به

یکدیگر متصل شوند. با توجه به اینکه پرایمرها دارای بخش Overhang هستند، Tm برای زمانی‌که تنها به ناحیه اختصاصی ژن متصل می‌شود (سیکل‌های ۷-۱) نسبت به زمانی‌که 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 به‌صورت دو لوپ با Tm متفاوت انجام شد. در نتیجه، علاوه بر افزایش کیفیت باندهای به دست آمده نسبت به زمانی‌که تنها یک لوپ برای PCR تعریف شده بود، تعداد باندهای غیراختصاصی نیز کاهش یافت. مورد دیگری که در تنظیم واکنش Multiplex PCR تأثیر به‌سزایی داشت؛ نسبت غلظت پرایمرهای F به پرایمر R بود. زمانی‌که 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 ساخته‌شده 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 محدودالاثر؛ ۴- سیستم بیانی که جهت تهیه آنتی‌بادی در نظر گرفته شد. ساختار آنتی‌بادی باید پیش از طراحی پرایمر در نظر گرفته شود. درصورتی‌که هدف، به دست آوردن یک آنتی‌بادی تک زنجیره باشد، لازم است در ساختار پرایمرها، بخشی به‌صورت 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 کارآیی آنتی‌بادی بسیار اهمیت دارد. با توجه به اینکه سیتوپلاسم یک مکان احیاکننده بوده و برای تجمع آنتی‌بادی مناسب نیست، لذا سیستم بیانی به‌گونه‌ای انتخاب شده است، که قطعات به فضای پری‌پلاسمی هدایت شوند. در این صورت می‌توان قطعات را به‌صورت ScFv بیان نمود. جهت انجام فرآیند کلونینگ لازم است تا توالی محل برش آنزیم‌های محدودالاثر در پرایمرها قرار داده شود. مهم‌ترین مبنا در انتخاب آنزیم‌های محدودالاثر، عدم احتمال وجود توالی شناساگر آنزیم در توالی‌های مربوط به آنتی‌بادی است. در این تحقیق با عنایت به نکات ذکرشده، 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 مهمی‌که 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؛ به‌گونه‌ای‌که بررسی تکثیر و عدم تکثیر یک ژن خاص در اثر تغییر شرایط امکان‌پذیر بود (۳۱،۳۰)، درصورتی‌که هنگام تکثیر ژن‌های آنتی‌بادی، تنوع گسترده‌ای از ژن‌های هم‌اندازه متعلق به یک خانواده نیز تکثیر می‌یابد. بنابراین، روش‌های مورد استفاده در این تحقیق به‌گونه‌ای انتخاب شد، که ریسک عدم بیان وجود نداشته باشد. همچنین در مطالعات پیشین انجام‌شده، 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 ایمن‌شده با توکسوئید کزاز، تکثیر می‌دهد. سپس طی یک واکنش OverlapExtenssion PCR، قطعات VH و VL به‌صورت ScFv به یکدیگر متصل می‌شوند. در نهایت، با انجام واکنش Semi Nested PCR توالی‌های ScFv با حساسیت بیشتر تکثیر و محل برش آنزیم‌های محدودالاثر به دو انتهای آنها اضافه می‌گردد. در ادامه، این قطعات با آنزیم‌های محدودالاثر برش داده شده و وارد وکتور فاژی 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 توکسوئید 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. Avalible 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.