تازه‌های بیوتکنولوژی سلولی – ملکولی
دوره پنجم، شماره هفدهم، زمستان ۱۳۹۳

Research Article
مقاله تحقیقی

ساخت کتابخانه ژنی آنتی‌بادی ScFv انسانی بر پایهٔ T Vector علیه توکسین کزاز

حمیده روحانی نژاد [۱]، جلیل فلاح مهرآبادی [۲*]، جمیله نوروزی [۱]، مهدی مهدوی [۳]

۱.گروه تخصصی زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲. استادیار پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران.
۳. استادیار گروه ایمونولوژی انستیتو پاستور ایران، تهران.

چکیده

سابقه و هدف: امروزه آنتی‌بادی‌ها در حوزه‌های تشخیص و درمان جایگاه ویژه‌ای را به خود اختصاص داده‌اند. در این میان، آنتی‌بادی‌های مونوکلونال کاملاً انسانی به دلیل عدم برانگیختن پاسخ ایمنی در بدن و کارایی بالا در درمان بیماری‌ها مورد توجه قرارگرفته‌اند. تحقیق پیش‌رو به‌منظور ساخت کتابخانه ژنی آنتی‌بادی نوترکیب انسانی از یک فرد واکسینه با توکسوئید کزاز انجام گرفته است.

مواد و روش‌ها: ابتدا از فرد ایمن با توکسوئید کزاز خون گرفته شد. سپس لنفوسیت‌ها جدا و RNA از آن‌ها استخراج گردید. همهٔ تنوع ژن‌های ناحیهٔ متغیر زنجیره‌های سبک و سنگین آنتی‌بادی به روش RT-PCR تکثیر و به صورت ScFv به یکدیگر متصل شدند. سپس این قطعات به داخل T vector الحاق و به باکتری *E. coli* DH5α انتقال یافتند. پس از آن، الایزا صورت گرفت. جهت تأیید کتابخانه ژنی آنتی‌بادی، پلاسمید آن استخراج و توالی‌یابی انجام شد.

یافته‌ها: کیفیت cDNA با انجام واکنش توسط پرایمرهای ژن HPRT تأیید شد. صحت انجام مراحل PCR و کلونینگ، توسط الکتروفورز ژل آگارز و برش آنزیمی مورد تأیید قرارگرفت. باکتری‌های حاوی پلاسمید نوترکیب با رشد روی محیط کشت بر اساس رنگ آبی و سفید، مشخص شدند. از کلون‌ها پلاسمید استخراج و توالی‌یابی انجام شد. نتایج حاصل از تشابه توالی‌ها در پایگاه داده‌ی igblast نشان داد که این توالی‌ها مربوط به ژن آنتی‌بادی انسانی می‌باشند. هم‌چنین توسط الایزا تأیید این که آنتی‌بادی اختصاصی توکسین کزاز می‌باشد، صورت گرفت.

نتیجه‌گیری: در این تحقیق کتابخانه آنتی‌بادی انسانی از فرد ایمن با توکسوئید کزاز، ساخته شد. سپس، ژن آنتی‌بادی موجود در این کتابخانه توسط توالی‌یابی و هم ترازی در پایگاه NCBI مورد تأیید قرار گرفت و الایزا اختصاصیت این آنتی‌بادی‌ها را مشخص نمود. در ادامه جهت یافتن ژن آنتی‌بادی اختصاصی توکسین‌کزاز در این کتابخانه، لازم است غربال‌گری به روش نمایش فاژی انجام شود.

کلید واژه‌ها: کتابخانه ژنی آنتی‌بادی، ScFv، توکسین کزاز، الایزا

مقدمه

حدود چند قرن است که آنتی‌بادی‌های مونوکلونال mAbs جایگاه ویژه‌ای را در حوزه درمان به خود اختصاص داده‌اند به طوری‌که امروزه ۳۰ درصد از کل داروهای جهان را تشکیل می‌دهند.

نخستین نسل از آنتی‌بادی‌های درمانی مونوکلونال، از موش گرفته شده است. بزرگترین ایراد این دسته از آنتی‌بادی‌ها برانگیختن پاسخ ایمنی در بدن بیمار است. جهت رفع این مشکل، محققین با بهره‌گیری از تکنیک‌های مولکولی بخش‌های ثابت آنتی‌بادی موشی را با نوع انسانی جایگزین نمودند و در این زمینه به تدریج آنتی‌بادی‌های کایمریک و انسانی به‌وجود آمدند. راهکار بهتر، استفاده از آنتی‌بادی‌های درمانی کاملاً

*نویسنده مسئول : دکتر جلیل فلاح مهرآبادی
پست الکترونیکی: Jalil.fallah@gmail.com
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۰۳/۱۷
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۰۷/۲۰

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-02-21]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.5.17.13.7]

انسانی[1]است. زیرا، علاوه بر کاهش ایمونوژنیسیته به حداقل میزان خود، کارایی به حداکثر می‌رسد (۱۵). تکنیک‌های رایج در تهیه آنتی‌بادی‌های انسانی عبارتند از تهیه موش‌های ترنسژنیک[2]، ایجاد رده سلولی نامیرا از یک لنفوسیت انسانی[3]، هیبریدومای انسانی[4]و نمایش فاژی[5](۱۸). نمایش فاژی یک روش غربال‌گری کتابخانه‌ی ژنی می‌باشد که اولین بار در دهه‌ی ۱۹۸۰ روی کار آمد و تا به امروز پیشرفت‌های زیادی در این حوزه به‌دست‌آمده است. به طوری‌که اغلب آنتی‌بادی‌های درمانی کاملاً انسانی و نوترکیب که امروزه در بازار عرضه می‌گردند، از این روش به‌دست آمده‌اند (۱۳،۷). اولین قدم در روش نمایش فاژی، تهیه یک کتابخانه ژنی آنتی‌بادی است. این کتابخانه از نوع cDNA بوده که در وکتورهای فاژی کلون شده است. در مرحله بعد لازم است که این کتابخانه با روش نمایش فاژی علیه آنتی‌ژن خاص غربال‌گری شود (۳).

بیماری کزاز، نوعی عفونت حاصل از سم و کشنده می‌باشد که در اثر ورود سم تتانوس به خون و سپس دستگاه عصبی مرکزی ایجاد می‌گردد. این نوروتوکسین قدرتمند توسط باکتری *کلستریدیوم تتانی* تولید و ترشح گشته و سبب انقباض شدید عضلات می‌شود و در اغلب موارد در صورت عدم درمان، سبب مرگ بیمار می‌گردد (۲). با وجود این‌که امروزه بیماری کزاز به وسیله واکسن کنترل می‌شود، اما هم‌چنان سالیانه تعداد ۴۰۰ الی ۸۰۰ هزار نفر در اثر ابتلا به این بیماری عفونی جان خود را از دست می‌دهند. درمان بیماری کزاز تا زمانی که توکسین در خون در حال گردش است و به سلول‌های عصبی متصل نشده، امکان‌پذیر است. به گونه‌ای که با تزریق دوز مؤثری از خنثی-کننده توکسین که اغلب سرم افراد هایپرایمیون می‌باشند، می‌توان تتانوس را خنثی و فرد مبتلا را نجات داد. استفاده از سرم‌های هایپرایمیون مشکلاتی را به دنبال خواهد داشت که از جمله می‌توان به برانگیختن پاسخ شدید ایمونولوژیک و احتمال ابتلا به بیماری‌های منتقل شونده از طریق خون اشاره نمود (۶). به همین دلیل محققان به دنبال روش‌های تهیه آنتی‌بادی انسانی برای غلبه بر این بیماری می‌باشند (۱۴). تاکنون محققان با استفاده از روش نمایش فاژی اقدام به تهیه آنتی‌بادی نوترکیب اختصاصی کزاز نموده‌اند که هم‌چنان در فاز تحقیقاتی می‌باشند (۵).

با توجه به موارد ذکر شده، به نظر می‌رسد که یافتن جایگزین مناسب برای داروی تتابولین امری ضروری باشد. زیرا علاوه بر مشکلات سرم افراد هایپرایمیون، سالیانه مبلغ زیادی صرف واردات این دارو می‌گردد. هدف از این تحقیق، ساخت کتابخانه ژنی آنتی‌بادی انسانی از فرد ایمن شده و تأیید آن می‌باشد. در مراحل بعدی لازم است این کتابخانه جهت یافتن آنتی‌بادی اختصاصی توکسین کزاز به روش نمایش فاژی غربال‌گری گردد.

مواد و روش‌ها

خون‌گیری و جداسازی لنفوسیت

از فرد ایمن شده علیه توکسین کزاز به میزان ۵ میلی‌لیتر خون گرفته شد. فرد مذکور، ۷روز پیش از خون‌گیری، با واکسن دوگانه دیفتری و کزاز واکسینه شده بود. سپس هم حجم خون، PBS اضافه شد و با استفاده از فایکول، PBMCs[6] جداسازی شد. جهت استخراج RNA از کیت شرکت Roche (آلمان) استفاده شد. کلیه مواد و وسایل مورد استفاده در این مرحله با محلول ۰/۰۱٪ DEPC[7] تیمار شدند تا RNase آن‌ها غیرفعال گردد. در نهایت به کمک روش الکتروفورز بر روی ژل آگاروز کیفیت RNAی استخراج شده بررسی شد.

رونوشت برداری معکوس و انجام RT-PCR

پس از اطمینان از کیفیت مناسب RNA، نمونه‌ها برای سنتز cDNA مورد استفاده قرار گرفتند. جهت سنتز cDNA نیز از کیت شرکت Roche (آلمان) استفاده شد. برای کنترل کیفیت cDNA ساخته شده، از پرایمرهای اختصاصی ژن HPRT[8] و روش RT-PCR استفاده شد.

واکنش PCR

جهت تکثیر ناحیه VH و VL به ترتیب ۸ و ۶ نوع پرایمر پیشرو[9](F) به همراه یک نوع پرایمر پسرو[10](R) مورد استفاده قرار گرفت. توالی پرایمرها در جدول۱مشخص‌شده است (۱۰). ابتدا با استفاده از هر پرایمر به صورت جداگانه واکنش PCR انجام شد و پس از تغییر شرایط واکنش، از جمله تغییر تعداد سیکل، گرادیان دمای اتصال، غلظت MgCl2، غلظت dNTP و مهم‌تر از همه تغییر کمیت cDNA، شرایط بهینه ایجاد شد و با توجه به شرایط به‌دست آمده واکنشMultiplex PCR انجام شد. جهت انجام MultiplexPCR، غلظت پرایمرها به گونه‌ای انتخاب شد که نسبت هر یک از پرایمرهایF به کل غلظت

[1] Fully human antibodies
[2] Transgenic mice
[3] B cell immortalization
[4] Human hybridoma
[5] Phage display

[6] Peripheral Blood mononuclear cell
[7] Diethylpyrocarbonate
[8] Hypoxanthine PhosphoRibosyl Transferase
[9] Forward
[10] Reverse

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-02-21]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.5.17.13.7]

پرایمر R، ۱ به ۵ باشد. شرایط دمایی واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر به این صورت تنظیم شد.

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

انجام واکنش OE-PCR [11]

به منظور اتصال قطعات VH و VL و بدست آوردن توالی ScFv، یک واکنش OE-PCR با ۳۰ سیکل انجام شد. در این واکنش، ابتدا ۷ سیکل بدون پرایمر و سپس ۲۳ سیکل پس از اضافه نمودن پرایمرهای Semi Nested PCR صورت گرفت. با این روش ابتدا اجازه داده شد تا قطعات VHو VL به یکدیگر متصل شوند و سپس با اضافه نمودن پرایمرهای مورد نظر، قطعه مذکور تکثیر گردد.

خالص‌سازی قطعات تکثیری و کلون در T-vector

توالی‌های بەدست آمده از مرحله قبل در T-Vector شرکت Invitrogen کلون شدند و به باکتری DH5α ترنسفورم گشتند. سپس باکتری‌ها بر روی پلیت آگار حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی-سیلین، IPTG و Xgal کشت داده شدند. با استفاده از کیت شرکت Bioneer کلونی‌های سفید و آبی حاصل پلاسمید استخراج شد و از نظر حضور ژن مورد بررسی قرار گرفتند. به گونه‌ای که تعدادی کلونی سفید از روی پلیت برداشته شد و در محیط کشت LB broth حاوی آمپی‌سیلین با نسبت ۱/۱۰۰۰ به مدت ۱۶ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. سپس از هرکدام جداگانه پلاسمید استخراج شد. با توجه به اینکه در حالت حلقوی امکان سنجش حضور و یا عدم حضور ژن در پلاسمید وجود ندارد؛ با استفاده از آنزیم‌های محدودالاثر در کلونینگ سایت وکتور، برش آنزیمی به کمک آنزیم HindIII، بر روی پلاسمید استخراج شده از باکتری با کلونی آبی و باکتری با کلونی سفید رنگ انجام شد و نتیجه بر روی ژل مشاهده و مقایسه شد. در نهایت تعدادی از کلون‌های مثبت جهت تعیین توالی به شرکت ژن فن‌آوران ارسال گردید.

انجام واکنش ELISA

این آزمون توسط کیت IgG Tetanus IBL (آلمان) صورت گرفت. در اینجا، از فرد مورد نظر قبل و ۷ روز بعد از واکسیناسیون سرم جداسازی شد. سپس، واکنش الایزا بر روی سرم این فرد صورت گرفت.

جدول۱. توالی پرایمرهای پیشرو و پسرو نواحی متغیر زنجیره سنگین، سبک و **semi nested**

نام پرایمر	توالی پرایمر
پرایمرهای زنجیره سنگین	
F:VH 1	tattggcgcgccatggccCAGRTGCAGCTGGTGCART
F:VH 2	tattggcgcgccatggccSAGGTCCAGCTGGTRCAGT
F:VH 3	tattggcgcgccatggccCAGRTCACCTTGAAGGAGT
F:VH 4	tattggcgcgccatggccSAGGTGCAGCTGGTGGAG
F:VH 5	tattggcgcgccatggccCAGGTGCAGCTACAGCAG
F:VH 6	tattggcgcgccatggccCAGSTGCAGCTGCAGGAGT
F:VH 7	tattggcgcgccatggccGARGTGCAGCTGGTGCAGT
F:VH 8	tattggcgcgccatggccCAGGTACAGCTGCAGCAGC
R:CH	GACSGATGGGCCCTTGGTGG
پرایمرهای زنجیره سبک	
F:VLk 1	gccatggcgcgccaatagctagccGACATCCAGWTGACCCAGTCT
F:VLk 2	gccatggcgcgccaatagctagccGATGTTGTGATGACTCAGTCT
F:VLk 3	gccatggcgcgccaatagctagccGAAATTGTGWTGACRCAGTCT
F:VLk 4	gccatggcgcgccaatagctagccGATATTGTGATGACCCACACT
F:VLk 5	gccatggcgcgccaatagctagccGAAACGACACTCACGCAGT
F:VLk 6	gccatggcgcgccaatagctagccGAAATTGTGCTGACTCAGTCT
R:CLk	atatatatgcggccgcttaTTAACACTCTCCCCTGTTGAA
پرایمرهای واکنش Semi Nested	
F:JH 1	ggaggcgctcGAGACGGTGACCAGGGTGCC
F:JH 2	ggaggcgctcGAGACGGTGACCATTGTCCC
F:JH 3	ggaggcgctcGAGACGGTGACCAGGGTTCC
F:JH 4	ggaggcgctcGAGACGGTGACCGTGGTCCC
R:CLk	accgcctccaccggcggccgcttaTTAACACTCTCCCCTGTTGAAGCTCTT

پس از استخراج RNA از لنفوسیت‌های استخراج شده، cDNA ساخته شد و کیفیت آن توسط پرایمرهای ژن خانه دار[12] HPRT

یافته‌ها

سنتز cDNA و انجام Uniplex PCR

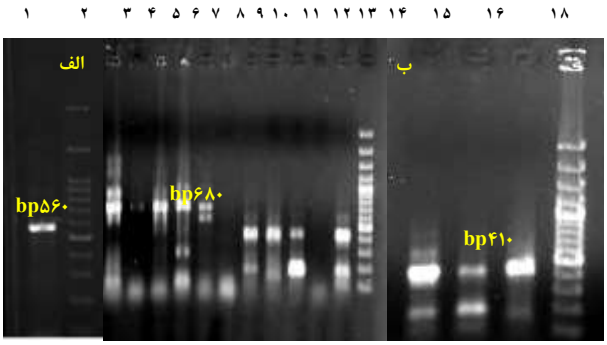
[11] Overlap Extension PCR

[12] Housekeeping

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-02-21]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.5.17.13.7]

انسانی، تأیید شد. سپس به صورت جداگانه، به کمک پرایمرهای سنتز شده، واکنش‌های تکثیری انجام گرفت.



شکل ۱. تصویر الکتروفورز محصولات RT-PCR. الف) نتیجه PCR با استفاده از پرایمر ژن HPRT. ردیف ۱ محصول PCR ژن‌های خانه‌دار برای تأیید ساخت cDNA، ردیف۲ مارکر ۱۰۰bpplus. ب) نتیجه Uniplex PCR با استفاده از پرایمرهای ویژه نواحی متغیر آنتی‌بادی. ردیف‌های ۳ الی ۸ محصولات تکثیر نواحی متغیر زنجیره سبک، ردیف‌های ۹ الی ۱۳ و ۱۵ الی ۱۶ محصولات تکثیر نواحی متغیر زنجیره سنگین، ردیف‌های ۱۴ و ۱۸ مارکر ۱۰۰bpplus (به دلیل تعداد زیاد نمونه‌ها، دو ژل جداگانه ران شد. سپس عکس آن‌ها در کنار یکدیگر قرار داده شده است).

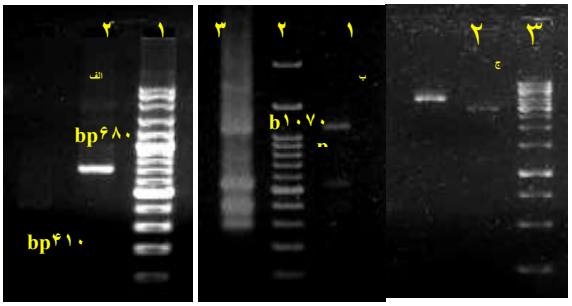
Multiplex PCR و OE-PCR، کلون‌سازی ژن در T vector و انجام الایزا

واکنش Multiplex PCR به صورت جداگانه برای تکثیر نواحی VHو VL به ترتیب با ۸ و ۶ جفت پرایمر انجام شد و محصول PCR از روی ژل آگارز خالص‌سازی شد (شکل ۲). جهت انجام واکنش OE-PCR نمونه رقیق شده از VHو VL با یکدیگر مخلوط شدند و به عنوان الگو مورد استفاده قرار گرفتند و پس از واکنش یک قطعه حدود ۱۰۷۰ جفت باز (علت کوتاه بودن حاصل ۶۸۰ و ۴۱۰ جفت باز مکمل بودن قسمتی از توالی پرایمرها با هم می‌باشد) به‌دست آمد. این قطعه حاصل از اتصال VH وVL به یکدیگر توسط یک لینکر می‌باشد. نتیجه واکنش قبل و بعد از بهینه‌سازی در شکل۲ نمایش داده شده است.

پس از تهیه کتابخانه‌ی آنتی‌بادی تعدادی از قطعات PCR مطابق روش‌های ذکر شده در T vector کلون شد و به باکتری DH5α ترنسفورم شد. پس از ظاهر شدن کلونی‌های آبی و سفید، جهت تأیید کلون قطعه مورد نظر، از کلونی‌های سفید استخراج پلاسمید انجام شد و واکنش هضم آنزیمی توسط آنزیم HindIII انجام گرفت. سپس، جهت مقایسه با T vector خطی بر روی ژل آگارز منتقل و الکتروفورز انجام شد (شکل ۲). نتیجه به‌دست آمده نشان می‌دهد که قطعه ۱۰۷۰ جفت بازی در T vector کلون شده است. با پوشش دادن توکسوئید تتانوس در پلیت الایزا و مقایسه‌ی تیتر آنتی‌بادی در سرم فرد مورد نظر قبل و بعد از واکسیناسیون مشخص شد که این آنتی‌بادی اختصاصی کزاز می‌باشد. جذب نوری فرد قبل از تزریق واکسن ۰/۱ و ۷ روز بعد از واکسیناسیون ۲ بود که تفاوت قابل توجهی در تیتر آنتی‌بادی مشاهده شد.

توالی‌یابی قطعات کلون شده جهت تأیید تکثیر ژن آنتی‌بادی

پس از تأیید وکتورهای نوترکیب، فرایند توالی‌یابی با استفاده از پرایمر T7 promoter انجام شد. سپس توالی حاصل در پایگاه-داده‌ژنتیکی‌آنتی‌بادی(www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast) blast شد. نتایج حاصل از Blast نمایان‌گر شباهت توالی، به توالی ژنی یک آنتی‌بادی بود که این امر موجب تأیید تکثیر ژن‌های آنتی‌بادی در فرایند RT-PCR بود. توالی نوکلئوتیدی یکی از ژن‌های کلون شده در وکتور نوترکیب در شکل ۳ مشخص شده است.



شکل ۲. نتیجه Multiplex PCR و OE-PCR. الف) ردیف ۱و۲ به ترتیب محصول Multiplex PCR قطعات VHو VL، ردیف ۳ مارکر۱۰۰bpplus. ب) الکتروفورز محصول OE-PCR. ردیف ۱ پیش از بهینه‌سازی شرایط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و ردیف ۳ پس از بهینه سازی. ردیف ۲ مارکر۱۰۰bpplus. ج) مقایسه وکتور نوترکیب برش داده شده و T vector خطی. ردیف ۱ وکتور برش داده شده توسط HindIII، ردیف ۲ وکتور خطی فاقد قطعه‌ی الحاقی، ردیف ۳ مارکر ۱ کیلوبازی.

>TvectorAb_T7promoter
CAGACAAGCTTGAATTATGGAGTAGCTATCTC
AGGTCAGGAGCTGTGAGACTGTAGTGCTGTCC
TGCTGTCAGCTTTGTGCCCTCTCATGGAGTTCC
CGATGGAGGGCATATCCACATTCCACGGACTT
TGCCTCTCGTGGATAGAAGTTTTCAGCAGGCA
CACACCAGAGGCAGTTCCAGATTTCATCTGCT
CATCAGATGGCGGGAAGATGAAGACAGATGG
TGCAGCCACAGTTCGTTTGATCGCCACCTTGGT
CCCTCCGCCGAAAGTGAGCGGGGCACTGTTAT
GCTTTTGACAGTAATAAGTTGCAACATCTTCAG
GCTGCAGGCTGCTGATGGTGAGAGTGAAATCT
GTCCCAGATCCACTGCCACTGAACCGAGATGG
GACCCCTGATTGCAAAGTGGATGCAGCATAGA
TCGGGAGCTTAGGAACTTTCCCTGGTTTCTGCT
GATACCAGGCTAAATAATTGTTAATGCCCTGA
CTCGCCCGGCAAGCGATGGTGACTCTGTCTCCT
ACAGATGCAGACAGGGAGGATGGAGACTGGG
TCATCTGGATGTCGGCTAGCTATTGGCGCGCC
ATGGCCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGC

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-02-21]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.5.17.13.7]

TGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGAAAA
TCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCATCTTCAGCA
GTTATGGCATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCCT
GGACGAGGGCTTGAGTGGATCGGAGGAATCAT
CCCTATGTTACGTGCAGCAAATTATGCACAGA
AATTGGAGGACAGAGTCACGATTAGTGCGGAC
GAATCCACGACCACAACTTACATGGAGCTGAA
CAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATT
TTCGTTAAAGGGAACCGGGGAGTTGTCGCCAA
GATTTGATACACCCTTTAAAGGGGCCACGGGA
CAATGGTCACCGTCTCGAGCGCCTCCAATCTTG
GGATCCTCTAGAGTCGACGCAGCTTCAGCTA

شکل ۳. توالی نوکلئوتیدی یکی از آنتی‌بادی‌های تکثیریافته با استفاده از واکنش RT-PCR.

بحث

از حدود سه دهه اخیر روش نمایش فاژی جهت غربال‌گری کتابخانه ژنی آنتی‌بادی بسیار مورد توجه قرار گرفته است به طوری‌که امروزه اکثر داروهایی که از جنس HmAb[13] در بازار عرضه می‌گردند از این روش به‌دست آمده‌اند (۳،۱۳). در مراحل تهیه کتابخانه ژنی برای آنتی‌بادی انتخاب پرایمر مناسب جهت تکثیر ژن‌های آنتی‌بادی انسانی از اهمیت زیادی برخوردار است. جهت تکثیر همه‌ی تنوع ژن‌های آنتی‌بادی و با توجه به تنوع بسیار زیاد موجود در آنتی‌بادی‌ها اغلب از یک مجموعه پرایمر استفاده می‌گردد که ۶ خانواده ژنی VL و ۸ خانواده ژنی VH را پوشش دهند (۸). در تحقیقات انجام شده در این زمینه انواع پرایمرها مورد استفاده قرار گرفته است. اولین بار در سال ۱۹۹۱ توسط مارکس و همکاران، پرایمرهای تکثیر کننده ایمونوگلبولین انسانی طراحی و معرفی شدند(۹). سپس محققان در جهت بهبود این پرایمرها پیش رفتند. به عنوان مثال رجاس و همکاران، در تحقیقات خود از پرایمرهایی استفاده کرده بودند که لازم بود قطعات VL و VH به صورت جداگانه در وکتور کلون شوند (۱۶) در صورتی‌که دیگر محققان توسط یک لینکر قطعات را به صورت ScFv به هم متصل نموده و با یک بار طی نمودن مراحل کلونینگ، قطعات ژن را در وکتور کلون نمودند(۱۰). هم‌چنین محققان دیگری پرایمرها را به گونه‌ای طراحی نمودند که امکان انجام واکنش‌ها به صورت Multiplex فراهم گشته و همه تنوع ممکن نیز تکثیر گردد. در این صورت حجم کار نسبت به زمانی که واکنش به صورت Uniplex انجام شود بسیار کاهش خواهد یافت. در ایران نیز تحقیقاتی جهت تهیه آنتی‌بادی کاملاً انسانی به روش نمایش فاژی انجام شده است. اولین بار در سال ۲۰۰۵ دکتر آیت و همکاران موفق به جداسازی آنتی‌بادی مونوکلونال ScFv علیه یکی از آنتی‌ژن‌های درگیر در بیماری سرطان سینه شدند (۱۷). هم‌چنین، تحقیق دیگری جهت تهیه کتابخانه ژنی انسانی با هدف جداسازی آنتی‌بادی مونوکلونال علیه P185 در دانشگاه شیراز در سال ۲۰۰۸ انجام شد(۱۰). در هردو این موارد، جهت تهیه کتابخانه ژنی آنتی‌بادی از واکنش های Uniplex PCR استفاده شده است، سپس محصولات واکنش با یکدیگر ادغام شدند. درصورتی‌که در تحقیق انجام شده توسط گروه سلولی و مولکولی دانشگاه مالک اشتر، کلیه تنوع ژنی آنتی‌بادی انسانی طی دو واکنش Multiplex PCR تکثیر و جداسازی شد که البته برای بهینه سازی این واکنش نیز تلاش‌های بسیاری انجام شد (۱) که در ادامه پس از بهینه سازی این روش، در T-vector کلون‌سازی صورت گرفت و توسط روش الایزا تأیید شد. به دلیل این‌که هدف از تهیه کتابخانه ژنی در نهایت غربال‌گری برای یافتن آنتی‌بادی اختصاصی توکسین کزاز بوده است، فرد دهنده از ۶ روز قبل واکسینه شد. زیرا از زمان ورود آنتی‌ژن به بدن فرد تا زمانی که تعداد زیادی سلول B فعال شده وارد خون می‌شوند ۶ روز به طول می‌انجامد. بنابراین، بیشترین میزان PBMCs را در نمونه خونی که روز ششم از فرد گرفته می‌شود، می‌توان به‌دست آورد. جهت تکثیر ژن آنتی‌بادی از سه مجموعه پرایمر، دو مجموعه برای تکثیر VHو VL که بر اساس تفاوت در تعداد خانواده ژنی زنجیره سبک و سنگین به ترتیب ۸ و ۶ جفت را شامل می‌شدند و یک مجموعه که از ۴ جفت پرایمر تشکیل شده است و جهت تکثیر قطعه حاصل از اتصال VH و VL (VL+linker+VH) مورد استفاده قرار می‌گیرند. شرایط دمایی واکنش PCR به دلیل وجود یک قطعه overhang نسبتاً طولانی، در پرایمرها به صورت دو مرحله‌ای طراحی شد به گونه‌ای که در ۷ سیکل اول دمای اتصال پرایمرها تنها با توجه به ناحیه GS[14] پرایمر در نظر گرفته شد. سپس در ۲۸ سیکل دیگر به دلیل اتصال ناحیه overhang، Tm بیشتری اعمال شد. در این‌صورت نتیجه واکنش بهتر بود. در واکنشOE-PCR نیز میزان باندهای غیراختصاصی زمانی که ۷ سیکل بدون پرایمر و ۲۳ سیکل پس از افزودن پرایمر انجام شد نسبت به زمانی که پرایمرها از ابتدا به واکنش اضافه شده بود، بسیار کاهش یافت. آخرین واکنش PCR انجام شده به نوعی Semi Nested PCR هم به حساب می‌آید، زیرا پرایمرهای مربوط به تکثیر ناحیه VH از ناحیه CH1 تا V را تکثیر می‌کند(VDJ+CH1). در حالی که پرایمرهای مورد استفاده در OE-PCR از ناحیه JH تا Vرا تکثیر می‌نمایند (۱۲). دلیل استفاده از پرایمر CH1 در مرحله اول جداسازی ژن ایزوتوپی از

[13] Human monoclonal antibodies

[14] Gene specific

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-02-21]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.5.17.13.7]

آنتی‌بادی است که بیشترین تمایل را برای آنتی‌ژن داشته باشد(IgG). پس از تکثیر قطعات ScFv و وارد نمودن آن‌ها در T-vector، باکتری *اشرشیا کلی* DH5α به دلیل متناسب بودن برای سیستم انتخابی آبی سفید به عنوان میزبان کلونینگ مورد استفاده قرار گرفت و در نهایت کلونی‌های سفید از نظر وجود ژن آنتی‌بادی مورد بررسی قرار گرفتند و کتابخانه ایجاد شده با توالی‌یابی تعدای از وکتورها، تأیید شد. در ادامه لازم است که این کتابخانه بر علیه توکسوئید کزاز غربال‌گری شود تا توالی مربوط به آنتی‌بادی اختصاصی توکسین کزاز مشخص شود.

در این تحقیق با استفاده از یک مجموعه پرایمر و سه واکنش PCR کلیه تنوع ژنی آنتی‌بادی انسانی تکثیر و به صورت ScFv به همدیگر متصل شدند. سپس قطعات حاصل در T-vector کلون شده و کتابخانه ژنی آنتی‌بادی انسانی تهیه شد. این کتابخانه را هم می‌توان به روش نمایش فاژی (۵) و هم به روش انتخاب ایمونولوژیکی کلونی[15] غربال‌گری نمود (۴).

نتیجه‌گیری

با توجه به این‌که طراحی پرایمر در مبحث آنتی‌بادی انسانی امری بسیار پیچیده است، می‌توان با ادغام توالی پرایمرهای مورد استفاده در مقالات معتبر و هم‌چنین با توجه به جایگاه برش آنزیم‌های محدودالاثر در وکتور مورد استفاده و عدم برش در توالی آنتی‌بادی، توالی آنزیم‌های محدودالاثر در پرایمر در نظر گرفته شود. هم‌چنین محل اتصال پرایمر در ژن آنتی‌بادی اهمیت دارد و با توجه به نوع آنتی‌بادی، وکتور و میزبان باید انتخاب شود و تا حد امکان از پرایمرها و وکتورهایی استفاده شود که قطعه ScFv را پیش از کلونینگ ایجاد نمایند.

سپاسگزاری

از دانشگاه صنعتی مالک اشتر، پژوهشکده‌ی فناوری زیستی برای تأمین منابع مالی این پروژه تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

۱. معصومه بزاز، حمیده روحانی نژاد، رامین فلاح زاده، سید حمیدرضا خاتمی، جلیل فلاح مهرآبادی. طراحی و بهینه سازی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چندگانه جهت تکثیر ژن های آنتی‌بادی انسانی علیه توکسوئید کزاز. مجله دانشگاه علوم پزشکی قم. دوره هشتم، شماره اول، فروردین- اردیبهشت93. صفحه 1 الی9.

2. *Attygalle, D. and N. Rodrigo, New trends in the management of tetanus. Expert review of anti-infective therapy, 2004; 2(1 :(p. 73-84.*
3. *Baker, M. Reynolds, H.M. Lumicisi, B. Bryson, C.J. Immunogenicity of protein therapeutics: The key causes, consequences and challenges. Self/nonself, 2010; 1(4): p. 314-322.*
4. *Du, Hongwu Chen, Guangyu Wang, Shuang Wang, Shan, et al Immunological screening and characterization of highly specific monoclonal antibodies against 20 kDa hGH. Bioanalysis, 2012; 17 (4) p. 2161-2168.*
5. *De Kruif, John Kramer, Arjen Visser, Therèse Clements, Carina , et al .Human Immunoglobulin Repertoires against Tetanus Toxoid Contain a Large and Diverse Fraction of High-Affinity Promiscuous VH Genes. Journal of Molecular Biology, 2009; 387(3): p. 548-558.*
6. *Haurum, J.S. Recombinant polyclonal antibodies: the next generation of antibody therapeutics? Drug Discovery Today, 2006; [cited 11 13–14]; 655-660].*
7. *Hoogenboom, H.R., Selecting and screening recombinant antibody libraries. Nat Biotech, 2005. 23(9): p. 1105-1116.*
8. *Martin B. Oleksiewiciz Lars S. Nielsen Peter S. Andersen Margit H. Hasen., Method for linking sequences of interest. 2010, symphogen A/S.*
9. *Marks, J. D. Tristem, M.Karpas, A.Winter, G. Oligonucleotide primers for polymerase chain reaction amplification of human immunoglobulin variable genes and design of family-specific oligonucleotide probes. European Journal of Immunology, 1991; 21(4): p. 985-991.*
10. *Nimmagadda, Sridevi V.Aavula, Shukra M. Biradh, ar, Neelakantam Sula, Samuel, et al. Development of recombinant single-chain variable fragment against hepatitis A virus and its use in quantification of hepatitis A antigen. Biologicals, 2012; 40(4): p. 299-308.*
11. *Nejatollahi, F., Z. Malek-Hosseini, D. Mehrabani, Development of Single Chain Antibodies to P185 Tumor Antigen. Iranian Red Crescent Medical Journal, 2008; 10(4): p. 298-302.*

[15] Immunological screening of clones

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-02-21]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.5.17.13.7]

12. *Per-Johan Meijer Lars S. Nielsen Johan Lantto Allan Jensen. Human Antibody Repertoires, in Therapeutic ANtibodies: Methods and protocols, A. S.Dimitrov, Editor. 2009*.
13. *Petering, J., P. McManamny, and J. Honeyman, Antibody therapeutics – the evolving patent landscape. New Biotechnology, 2011; 28(5): p. 538-544*.
14. *Poulsen, T. R. Meijer, P. J. Jensen, A. Nielsen, L. S. Andersen, P. S., Kinetic, affinity, and diversity limits of human polyclonal antibody responses against tetanus toxoid. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 2007;179(6): p. 3841-3850*.
15. *Ruuls, Sigrid R.Lammerts van Bueren, Jeroen J.van de Winkel, Jan G. J.Parren, Paul W. H. I. Novel human antibody therapeutics: The age of the Umabs. Biotechnology Journal, 2008;3(9-10): p. 1157-1171*.
16. *Rojas, Gertrudis Lamdan, Humberto Padron, Sheila Munoz, Yasmiana Ayala, Marta Gavilondo, Jorge V. Efficient construction of a highly useful phage-displayed human antibody repertoire. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005; 336(4): p. 1207-1213*.
17. *Simoens, S., T. De Rijdt, P. Declerck, Monoclonal antibodies: indications, budget impact and use. Journal of Pharmaceutical Health Services Research, 2010; 1(3): p. 123-130*.
18. *Tiller, T., Single B cell antibody technologies. New Biotechnology, 2011; 28(5): p. 453-457*.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-02-21]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.5.17.13.7]