کلونینگ، بیان و بررسی فعالیت ایمونولوژیکی ScFv حاصل از آنتی‌بادی منوکلونال موشی ضد پلاسمینوژن انسانی با توانایی افزایش فیبرینولیز

محبوبه سیفی ابوالحسن[۱]، منوچهر میرشاهی*[۱،]، مهرداد بهمنش[۲]، محمد رضا قرائتی[۱]، فهیمه چربگو[۱]، ملیحه محمدی[۱] و مهناز بژگی[۱]

[۱] **تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه بیوشیمی**

[۲] **تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه ژنتیک**

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۱/۱۸ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۲/۱۷

چکیده

امروزه آنتی بادیهای منوکلونال از پرمصرف ترین داروهای بیولوژیک هستند. اولین گام در این راستا ساخت قطعات آنتی بادی (ScFv) است که مزیت آن در داشتن اندازه کوچک، پاکسازی (کلیرانس) سریع از خون و نفوذپذیری بهتر به بافتها است. آنتی بادی منوکلونال A_1D_{12} که سبب افزایش هضم لخته می شود، کاندید خوبی به عنوان دارو در بیماران مبتلا به اختلالات عروقی است. بنابراین هدف اصلی در این بررسی برداشتن اولین گامهای لازم در راستای انسانی کردن این آنتی بادی یعنی تهیه ScFv است. در این تحقیق، قطعه تک زنجیره ای از نواحی متغیر (ScFv) این آنتی بادی تهیه و در سیستم *E.coli* بیان شد. نتایج حاصل از SDS-PAGE و ELISA صحت تولید ScFv و قابلیت اتصال آن به پلاسمینوژن را اثبات می کنند.

واژه های کلیدی: کلونینگ، ScFv، واکنش زنجیره‌ایی پلیمراز (PCR)، فیبرینولیز

* نویسنده مسئول، تلفن: ۸۲۸۸۴۷۱۷ ، پست الکترونیکی:mirshahi_mc@yahoo.com

مقدمه

فیبرینولیز شامل واکنشهای آنزیمی است که منجر به حل لخته فیبرین می شود. آنزیم کلیدی این سیستم، پلاسمین است که تحت تأثیر آنزیمهایی به نام فعال کنندگان پلاسمینوژن از پیش آنزیم پلاسمینوژن ساخته می شود و با اثر آنزیمی خود روی فیبرین، باعث حل شدن آن می گردد (۵ و ۲۰). پلاسمینوژن انسانی، گلیکوپروتئین تک زنجیره ای با ۶ دمین ساختاری است که شامل پنج دمین کرینگل (Kringle) در قسمت انتهای آمین با توانایی اتصال به فیبرین و یک دمین پروتئازی شبیه سایر سرین پروتئازها است (۴، ۸ و ۱۶). در هر یک از این کرینگل ها جایگاههای ویژه ای برای اتصال به اسید آمینه لیزین وجود دارد که به آنها نواحی اتصال به لیزین می گویند. این نواحی در کرینگل ۵ (اسیدآمینه های ۵۴۱-۴۶۲) به یک اسیدآمینه لیزین در انتهای N متصل است (۲۱) و همین امر سبب شده است که پلاسمینوژن ساختار بسته ای به خود بگیرد. این پیوند با اتصال به اسید آمینه های لیزین موجود در سطح فیبرین، باز می شود و در این حالت، پلاسمینوژن تحت اثر فعال کننده های پلاسمینوژن قرار می گیرد و به پلاسمین تبدیل می شود (۳). آنتی بادی منوکلونال موشی تحت عنوان A_1D_{12} که علیه اپی توپی (Arg^{68}-Lys^{77}) از انتهای آمین پلاسمینوژن انسانی است، می تواند سبب باز شدن ساختار پلاسمینوژن شود و تبدیل آن به پلاسمین را به کمک فعال کننده پلاسمینوژن ۳ تا ۵۰ برابر افزایش دهد (۱۳). با دانستن این موضوع، به نظر می رسد که این آنتی بادی کاندید خوبی برای افزایش حل لخته در بیماران مبتلا به انسداد رگی باشد ولی با توجه به منشأ موشی و

ایمونوژن بودن آن برای انسان نمی توان از آن مستقیماً استفاده نمود. بنابراین هدف اصلی در این تحقیق برداشتن اولین گامهای لازم در راستای انسانی کردن این آنتی بادی یعنی تهیه قطعه متغیر تک زنجیره‌ای (ScFv) آن است که متداول‌ترین شکل استفاده از قطعات آنتی‌بادیها است (۱۹ و ۶). در راستای رسیدن به این هدف، پس از طراحی پرایمر، این ساختار در سیستم بیانی *E.coli* بیان شد و با ELISA ی رقابتی قدرت شناسایی و اتصال به آنتی ژن مربوط بررسی شد.

مواد و روشها

کشت سلولهای A_1D_{12}، استخراج RNA و ساخت cDNA: سلولهای هیبریدومای A_1D_{12} در شرایط استریل با استفاده از محیط کشت RPMI 1640 حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گوساله و آنتی‌بیوتیک جنتامایسین (۸۰ µg/ml) در انکوباتور کشت سلول کشت داده شدند. پس از رشد سلولها به مقدار ۳ تا ۵ میلیون، جمع آوری آنها با سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰ rpm انجام شد و سلول‌ها سه بار با بافر فسفات استریل شستشو داده شد و هر بار مانند مراحل پیشین سانتریفیوژ گردید. این سلولها تحت استخراج total RNA با استفاده از روش کار کیت استخراج RNX^{TM} Total RNA Isolation (BiONEER) قرار گرفتند. غلظت RNA استخراج شده با استفاده از تکنیک طیف سنجی تعیین و کیفیت آن با ژل آگارز (۱ درصد) بررسی شد. در مرحله بعد cDNA با استفاده از پرایمر الیگو dT (Oligo$(dT)_{18}$ primer) ساخته شد (۱۸). صحت ساخت این محصول با پرایمرهای ژن موشی GAPDH به عنوان کنترل داخلی تحت واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با روش کار PCR Master Mix (سیناژن، ایران) بررسی شد. سپس محصولات PCR در ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شدند.

طراحی پرایمرها و انجام واکنش زنجیره‌ایی پلیمراز: طراحی پرایمر برای تکثیر ژن بخش متغیر زنجیره‌های سبک (V_L) و سنگین (V_H) با استفاده از سیستم بین‌المللی اطلاعات ایمونوژنتیکی یا IMGT (http://www.imgt.cines.fr) (۹) انجام شد (جدول ۱). برای تکثیر V_L از پرایمرهای V_LFR1 و V_LC و برای تکثیر V_H از پرایمرهای V_HFR1 و CH1 استفاده شد. واکنش زنجیره ای پلیمرازی با PCR Master Mix (سیناژن، ایران) انجام شد. برای انجام PCR واسرشتگی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد بمدت ۲ دقیقه، سپس ۳۰ سیکل متشکل از ۴۵ ثانیه واسرشتگی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، ۳۰ ثانیه دمای ۵۵ درجه سانتی گراد برای اتصال پرایمرها و ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد طویل شدن صورت گرفت و طویل شدن نهایی ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد انجام شد (۱). سپس محصولات PCR در ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شدند. قطعات PCR شده از ژل آگارز طبق روش کار ارائه شده در Gel Purification kit (BioNeer) استخراج و به کمک آنزیم لیگاز وارد TA وکتور (pTZ57R/T) شدند. سپس به سلولهای مستعد باکتری *E.coli* سویه *XL1-Blue* منتقل شدند (۱۸). این باکتری ها در محیط کشت LB جامد حاوی آمپی‌سیلین (۱۰۰µg/ml) کشت داده شدند و کلون های رشد کرده تحت کلونی PCR با پرایمرهای روی بدنه TA وکتور با توالی های 5′GTTTCCCAGTTCACGAC3′ و 5′CAGGAAACAGCTATG AC 3′ قرار گرفتند. کلون های مثبت دارای قطعه در محیط LB مایع حاوی آمپی سیلین (۱۰۰µg/ml) کشت داده شدند و واکنش miniprep (استخراج پلاسمید) با استفاده از کیت Plasmid mini extraction (BioNEER) انجام شد. پلاسمیدهای استخراج شده با استفاده از ژل آگارز (۰/۸ درصد) مورد بررسی قرار گرفتند و ۴ عدد از این پلاسمیدهای دارای هر یک از قطعات V_H و V_L برای توالی یابی فرستاده شدند.

جدول ۱- ترادف پرایمرهای دو زنجیره سبک (V_L) و سنگین (V_H).

V_HFR1	5′TCWGGRSSWGRVBTDSBRVNRYG3′
CH1	5′ AAYCTCCACACACAGGMMCCAGTGGATAGAC 3′
V_LFR1	5′TGGTGGGAAGATGGATACAG3′
V_LC	5′ AACTGGATGGTGGGAGATGGA 3′

R(a, g); Y(c, t); M(a, c); K(g, t); S(g, c); W(a, t); V(a, c, g); H(a, t, c); B(g, t, c); D(g, a, t); N(a, c, g, t).

جدول ۲- پرایمرهای Forward و Reverse برای PCR و اتصال دو قطعه V_H و V_L. جایگاه های برش *Nco1* در پرایمر Forward و *Sac1* در پرایمر Reverse به صورت ایتالیک و ضخیم نشان داده شده اند و زیر نواحی مکمل در هر دو پرایمر خط کشیده شده است.

Forward/V_L	5′*gg**CCATGG***ACGTTCAGGTGACTCAG3′
Reverse/V_L/Linker	5′<u>AGAACCACCTCCGCC</u>TGAACCGCCTCCACCTGCAGCATCAGCCCG3′
Forward/Linker/V_H	5′<u>GGCGGAGGTGGTTCT</u>GGCGGTGGCGGATCGGTGCAACTGCAGGAG3′
Reverse/V_H	5′*aa**GAGCTC***TCATGCGGAGACTGTGAGTAG3′

طراحی پرایمر های مکمل برای اتصال V_H و V_L : نتایج توالیها و کروماتوگرامهای تمامی نمونه ها با هم مقایسه و در بانکهای اطلاعاتی ایمونوژنتیکی IMGT (http://www.imgt.cines.fr) (۹) و NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) بررسی شدند. طراحی دوباره پرایمرها برای اتصال این دو قطعه به هم انجام شد، به گونه ای که پرایمر های دو سر دارای جایگاه برش *Nco1* و *Sac1* بودند. پرایمر های میانی نیز حدود ۱۵ نوکلئوتید مکمل هم بودند تا Linker ۳ تکراری از Gly4Ser را بین دو قطعه V_H و V_L به وجود آورند. توالی این پرایمر ها در جدول ۲ آورده شده است. جهت قرارگیری این قطعات نیز به گونه ای طراحی شد که در انتهای N پروتئین، دمین V_L و انتهای C آن V_H باشد یعنی به شکل V_L-V_H.

واکنش زنجیره ای پلیمرازی برای اتصال V_H و V_L : در این مرحله این دو قطعه V_H و V_L به هم متصل شدند که برای این امر Splicing by Overlapping Extension PCR (SOE-PCR) انجام شد (۷).

مواد مورد استفاده برای انجام این PCR همانند PCR در مراحل قبل است با این تفاوت که پرایمر های دو سر پس از گذراندن ۵ سیکل به مخلوط واکنش افزوده شدند. نتایج این PCR با الکتروفورز در ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد.

آماده سازی پلاسمیدهای بیانی و بیان پروتئین :

قطعات ScFv دارای جایگاه برش آنزیم *Nco1* در انتهای ′۵ زنجیره سبک و جایگاه برش آنزیم *Sac1* در انتهای ′۳ زنجیره سنگین می‌باشد. پلاسمید pET26b (+) که به عنوان وکتور بیانی انتخاب شده است نیز حاوی این جایگاههای برش آنزیمی بر روی خود می‌باشد. ابتدا با استفاده از جدول مربوط به خصوصیات آنزیمهای محدود کننده در کاتالوگ Takara شرایط بافری برای هضم دوتایی (Double Digest) به دست آورده شد و واکنش هضم آنزیمی انجام شد (۱۸). سپس تمامی محصولات هضم شده ژل الکتروفورز شدند و قطعه ScFv و وکتور با کیت BiONEER از ژل تخلیص شدند و تحت واکنش با آنزیم لیگاز به هم متصل شدند. شناسایی باکتریهای دارای پلاسمید با آزمون Colony PCR با استفاده از پرایمرهای T7 Forward و T7 Backward انجام شد. کلونهای دارای قطعه طی روش کار ارائه شده در کیت Plasmid mini extraction (BioNEER) تحت استخراج پلاسمید قرار گرفته و برای توالی یابی فرستاده شد. بررسی نتایج توالیها و کروماتوگرامهای تمامی نمونه ها و مقایسه آنها طبق

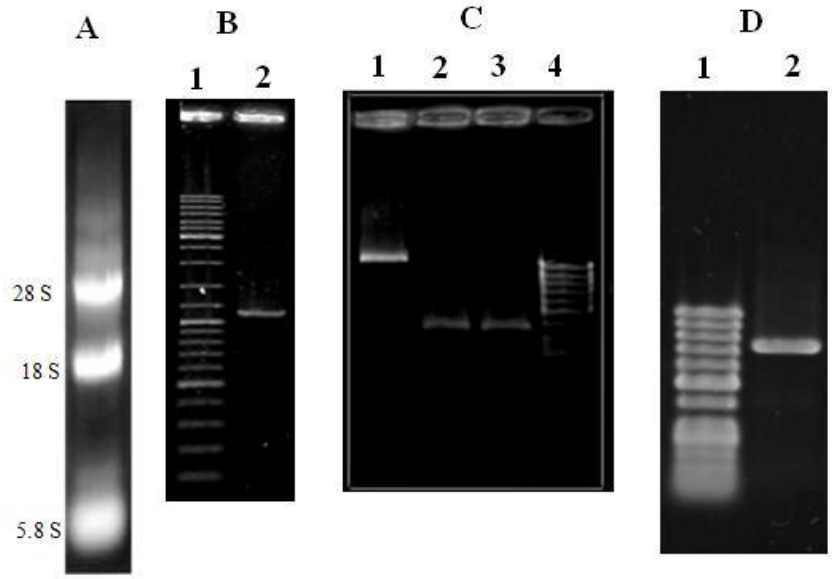
روشهای مذکور انجام شد. وکتورهای حاوی V_L-V_H به باکتریهای مستعد *اشریشیاکلی* سویه BL_{21} انتقال داده شدند و در پلیتهای LB-Agar با کانامایسین (۵۰µg/ml) به مدت ۱۶ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شدند تا کلونیها رشد کنند. سپس برای تهیه پری کالچر یکی از کلونهای به دست آمده برداشته شد و در محیط کشت LB با کانامایسین (۵۰µg/ml) با دور همزن (rpm ۲۵۰) و در مجاورت ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شد تا OD آن در nm ۶۰۰ به ۱-۰/۶ برسد. از این پری کالچر برای تلقیح چندین محیط کشت LB با کانامایسین (µg/ml ۵۰) جدید استفاده شد. پس از تلقیح، محیطهای کشت در ۳۷ درجه سانتی گراد مجاور شدند تا OD در در nm ۶۰۰ به ۰/۸ -۰/۴ رسید پس از برداشت ۱ میلی لیتر نمونه به عنوان کنترل منفی، به مابقی محیط کشت جهت القاء، IPTG با غلظت نهایی ۱ میلی مولار اضافه شد و هر یک از محیطهای کشت در ۲۸ درجه سانتی گراد به مدت ۵ ساعت مجاور شدند.

تخلیص پروتئین و ارزیابی اتصال به پلاسمینوژن انسانی با استفاده از ELISA رقابتی : پس از تایید تولید پروتئین ScFv با ژل الکتروفورز این باکتریها در حجم بیشتر کشت داده شدند و پس از گذشت ۵ ساعت از القاء با سانتریفیوژ از محیط کشت جدا شدند. با روش شوک اسمزی در pET System Manual از شرکت Novagen، پروتئینهای پری پلاسمی جدا شدند و برای تخلیص این پروتئین از بین پروتئینهای دیگر پری پلاسمیک و محیط کشت سلولی از روش جداسازی پروتئینها از ژل Native PAGE استفاده شد (۱۷). برای ارزیابی اتصال ScFv به آنتی ژن پلاسمینوژن انسانی از ELISA رقابتی استفاده شد. هر یک از چاهکهای پلیت ELISA با غلظت ng/well ۱۰۰ از آنتی ژن پلاسمینوژن انسانی پوشش دهی شده و در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت یک شبانه روز انکوبه شدند. سپس چاهکها سه بار با بافر شستشوی الایزا (PBS/Tween 0.05%) شسته و با ۱۰۰ میکرولیتر بافر بلاک کننده الایزا (PBS/BSA 1%) به مدت یک ساعت در دمای اتاق مجاور شدند. پس از شستشو با بافر شستشو، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از ScFv تخلیص شده با غلظتهای افزایشی از ng/ml ۱۵ تا ng/ml ۱۲۰ به چاهکها اضافه شد و به مدت یک ساعت در دمای اتاق مجاور گردید. در نمونه کنترل منفی از یک آنتی بادی منوکلونال دیگر که علیه اپی توپ انتهای کربوکسیل پلاسمینوژن است، استفاده شد. پس از ۵ بار شستشو، به هر چاهک آنتی بادی منوکلونال A_1D_{12} با غلظت ng/ml ۱۰۰ افزوده شد و به مدت یک ساعت در دمای اتاق مجاور گردید. پس از انجام شستشو مانند مرحله قبل، به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از HRP labeled goat anti-mouse Fc specific IgG با رقت ۱:۱۰۰۰ افزوده شد و به مدت یک ساعت در دمای اتاق مجاور شد. پس از شستشو و اضافه کردن سوبسترا (TMB) واکنش پس از ۳ دقیقه توسط اسید سولفوریک ۲ نرمال متوقف گردید و OD پلیتها در ۴۵۰ نانومتر با دستگاه الایزا خوان (Anthos 2020) قرائت شد.

نتایج

پس از استخراج RNA کل، کیفیت آن با ژل الکتروفورز آگارز ۱ درصد بررسی شد (شکل 1A) سپس ساخت cDNA انجام شد و این محصول با پرایمر های کنترل داخلی تحت PCR قرار گرفت و باندی حدود ۱۲۰۰ جفت باز روی ژل الکتروفورز مشاهده شد که صحت ساخت cDNA را تأیید می کرد (شکل 1B). واکنش PCR برای هر دو زنجیره سبک (V_L) و سنگین (V_H) انجام شد و باندهایی حدود ۳۸۰ جفت باز روی ژل الکتروفورز آگارز ۱ درصد به دست آمد (شکل 1C). نتایج توالیها و کروماتوگرامهای تمامی نمونه ها با هم مقایسه شدند و میزان شباهت این توالیها با توالیهای ثبت شده در بانکهای اطلاعاتی IMGT (۹) و NCBI بررسی شد(شکل ۲). دو قطعه متغیر با استفاده از SOE-PCR به هم متصل شدند که نتایج ژل الکتروفورز باندی حدود ۷۸۰ جفت باز را نشان

می دهد (شکل ۱D). پس از وارد کردن قطعه V_L-V_H به پلاسمید حامل pET26b (+) مسیر بیان در باکتری *اشریشیاکلی* سویه BL_{21} القاء شد. پروتئین بیان شده پس از القاء، تحت ژل الکتروفورز SDS-PAGE ۱۲/۵ درصد قرار گرفت که باندی حدود ۳۳ کیلودالتون را نشان می دهد. پس از جداسازی پروتئین محلول پری پلاسمیک، تخلیص آن از ژل انجام شد که نتیجه آن در شکل ۴ مشهود است. بررسی اتصال پروتئین ScFv به آنتی ژن پلاسمینوژن با تست ELISA رقابتی نسبت به آنتی بادی منوکلونال مادر A_1D_{12} سنجیده شد که نتایج در شکل ۵ نشان داده شده است. همان طور که در این شکل مشاهده می شود در غیاب ScFv، OD حاصل از اتصال آنتی بادی مادر حدود ۱ است. در حضور غلظتهای افزایشی از ng/ml ۱۵ تا ۱۲۰ ng/ml از ScFv، OD کاهش می یابد (ستونهای تیره) با این تفاوت که در OD آنتی بادی کنترل هیچگونه تغییری مشاهده نمی شود (ستونهای روشن).



شکل ۱- A: الکتروفورز RNA کل و ۳ باند آن. B: ژل آگارز ۱ درصد از محصول PCR با پرایمرهای کنترل داخلی که در آن 1 مارکر DNA و 2 باند ۱۲۰۰ جفت بازی را نشان می دهد. C: نتایج حاصل از PCR دو زنجیره سبک (V_L) و سنگین (V_H) که 1 همان کنترل مثبت، 2 محصول PCR از V_H و 3 محصول PCR از V_L است و 4 مارکر DNA است. D: نتیجه حاصل از SOE-PCR را نشان می دهد که در آن 1 مارکر DNA و 2 قطعه V_L-V_H است.

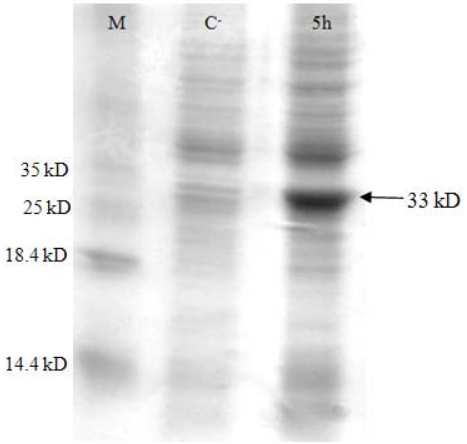
VL

Result summary:	Productive IGK rearranged sequence (no stop codon and in-frame junction)		
V-GENE and allele	IGKV4-58*01	score = 1279	identity = 94,68% (267/282 nt)
J-GENE and allele	IGKJ1*01	score = 181	identity = 97,37% (37/38 nt)
[CDR1-IMGT.CDR2-IMGT.CDR3-IMGT] lengths and AA JUNCTION	[7.3.9]	CQQWSGYPWTF	

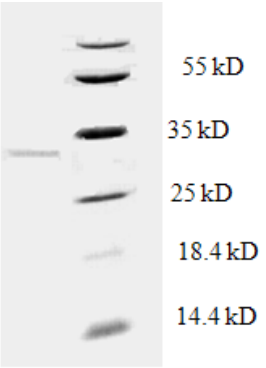
VH

Result summary:	Productive IGH rearranged sequence (no stop codon and in-frame junction)		
V-GENE and allele	IGHV3-2*02	score = 1322	identity = 95,82% (275/287 nt)
J-GENE and allele	IGHJ1*01	score = 175	identity = 81,13% (43/53 nt)
D-GENE and allele by IMGT/JunctionAnalysis	IGHD1-1*01	D-REGION is in reading frame 3	
[CDR1-IMGT.CDR2-IMGT.CDR3-IMGT] lengths and AA JUNCTION	[9.7.13]	CAKSGGSSYGFFDVW	

شکل ۲- بررسی ژنهای V_H و V_L در بانکهای اطلاعاتی در IMGT و میزان شباهت آن به سایر ژنهای ثبت شده در این سایت.



شکل ۳- بیان پروتئین نوترکیب. پروتئین بیان شده در حدود ۳۳ کیلودالتون است که در شکل مشخص شده است.M: مارکر پروتئین، C-: کنترل منفی، 5h: بررسی بیان پس از ۵ ساعت



شکل ۴- پروتئین ScFv پس از تخلیص روی ژل SDS-PAGE ۱۲/۵ درصد. باند پروتئینی ۳۳ کیلودالتونی در آن مشخص است.

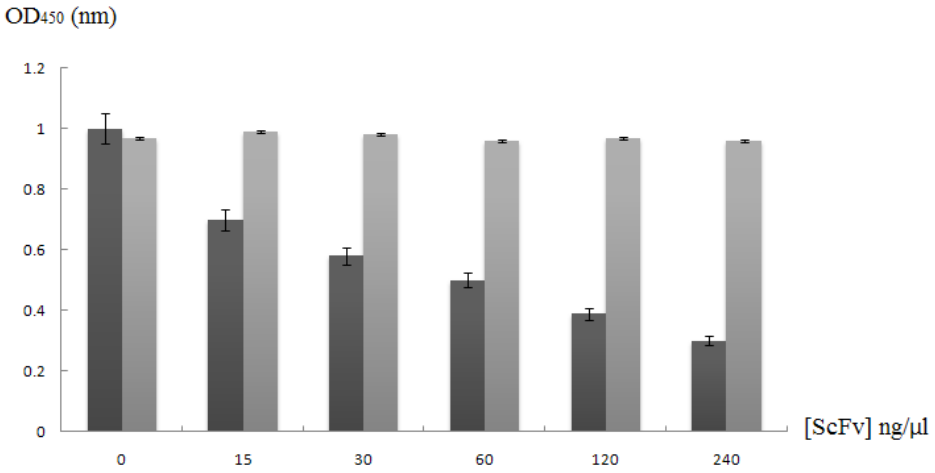
بحث

توانایی ویژه آنتی بادی در تشخیص و اتصال به آنتی ژن زمینه ساز کاربرد وسیع آن در پزشکی و تحقیقات علمی گشته است (۱۱، ۱۴ و ۱۹) اما در رسیدن به این اهداف مشکلات فراوانی وجود دارد که از مهم ترین آنها، فعال شدن پاسخهای ایمنی علیه آنتی بادی ارائه شده به انسان است. از این رو موضوع انسانی کردن آنتی بادیها مطرح شد که اولین گام در این راستا ساخت قطعات آنتی بادی (ScFv) است که در آن نواحی متغیر زنجیره سبک و سنگین به وسیله یک اتصال دهنده پپتیدی به طور مصنوعی به هم متصل می شوند. مزیت ScFv ها در داشتن اندازه کوچک، پاکسازی (کلیرانس) سریع از خون، نفوذپذیری بهتر به بافتها و پایداری در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد هستند (۱۹).

همان طور که در مقدمه ذکر شد آنتی بادی منوکلونال موشی (A_1D_{12}) می تواند در حضور فعال کنندگان پلاسمینوژن سبب افزایش فیبرینولیز شود (۲ و ۱۳). بنابراین این آنتی بادی پتانسیل استفاده در درمان با فیبرینولیز را دارد، لیکن لازم است که به کمک ساخت قطعات آنتی بادی (ScFv) از خواص ایمونوژنیک آن کاسته شود (۱۵). در این راستا، پس از کشت سلولهای هیبریدوما، استخراج RNA کل به خوبی انجام شد بطوری که در شکل ۱A سه باند مربوط به rRNA یا RNA ریبوزومی یوکاریوتی S ۲۸، S ۱۸ و S ۸/ ۵ در ژل مشخص است. با استفاده از این RNA، cDNA ساخته شد (شکل ۱B). مساله اساسی در این تحقیق، طراحی و انتخاب پرایمرهای مناسب است که طراحی پرایمر برای ناحیه داربستی ۱ (FR1) در سر ′۵ و ناحیه ثابت (Constant) در سر ′۳ انجام شد. همان طور که در شکل ۲ مشاهده می شود این پرایمر ها در جداسازی دو ژن V_H و V_L با تشابهات به ترتیب ۹۵/۸۲ و ۹۴/۶۸ موفق بودند (این توالیها تحت پتنت در سازمان ثبت اختراعات ایران هستند). با توجه به اهمیت جهت گیری دمینهای V_H و V_L، برای اتصال این دو قطعه به هم پرایمر هایی طراحی شد که دمین V_L در انتهای آمینی پروتئین ScFv قرار گیرد. جهت گیری V_L–V_H قدرت اتصال بالایی به آنتی ژن دارد که در این پژوهش ساخته شد (۱۲). مرحله مهم دیگر در ساخت ScFv فعال، انتخاب یک سیستم بیانی مناسب و کارآ است. پروتئین ScFv دارای دو پیوند دی سولفیدی درون زنجیره ای است که تشکیل درست این دو پیوند نقش بسیار مهمی در فعالیت بیولوژیکی این پروتئین دارد. تشکیل این پیوندهای دی سولفیدی در محیط احیایی سیتوپلاسم صورت نمی گیرد بلکه نیازمند محیط اکسیداتیو فضای پری پلاسمی است (۱۰). با توجه به این دانسته ها

وکتور بیانی pET26b (+) انتخاب شد که دارای توالی رهبر pelB است و پروتئین را به سمت فضای پری پلاسمی هدایت می کند. پس از بیان در سیستم پروکاریوتی *E.coli* همان طور که در شکل ۳ مشاهده می شود، پروتئین محلول پری پلاسمی تخلیص شد (شکل ۴) و تحت ELISA رقابتی با آنتی بادی والدی A_1D_{12} قرار گرفت (شکل ۵). با استناد به نتایج به دست آمده، می توان این نکته را بیان کرد که ScFv تولید شده، فعال است و می تواند آنتی ژن خود را بشناسد و به عنوان اولین ScFv تولید شده بر علیه پلاسمینوژن انسانی است که ویژگیهای اتصالی آنتی بادی منوکلونال اولیه خود را حفظ کرده است.

لازم به ذکر است که علی رغم وجود سایر آنتی بادیهای منوکلونال تجاری علیه پلاسمینوژن انسانی، فعالیت افزایش لیز لخته در آنها گزارش نشده است که این موضوع اهمیت تحقیق حاضر و ادامه کار را برای مقاصد درمانی بالقوه زیاد می کند.



شکل ۵- بررسی اتصال پروتئین ScFv به آنتی ژن پلاسمینوژن با تست ELISA رقابتی

منابع

۱. قرائتی محمد رضا، میرشاهی منوچهر، ربانی حجت اله، سیفی ابوالحسن محبوبه، بهمنش مهرداد، شمسی پور فرشته، ۱۳۹۱. مجله علمی-پژوهشی زیست شناسی ایران، شماره ۲۵ (تصویب شده و زیر چاپ).

۲. ملکی علی، منصوری کامران، میرشاهی منوچهر، پورفتح اله علی اکبر، اکرمی محمد، ۱۳۸۸. پتانسیل آنتی پلاسمینوژن منوکلونال آنتی بادی در دستکاری دو سیستم فیبرینولیز و آنژیوژنز. مجله دانشکده پزشکی تهران، شماره ۱: صفحات ۳۳-۴۱.

3. Browne, M. J., Chapman, C. G., Dodd, I., Reavy, B., Esmail, A. F., Robinson, J. H., 1989. The role of tissue-type plasminogen activator A-chain domains in plasma clearance. Fibrinolysis, 3: 207-214.
4. Cesarman-Maus, G, Hajjar, K. A., 2005. Molecular mechanisms of fibrinolysis. Br. J. Haematol., 129:307.
5. Dobrovolsky, A. B. , Titaeva, E. V., 2002. The Fibrinolysis System: Regulation of Activity and Physiologic Functions of Its Main Components. Biochemistry (Moscow), 67(1): 99-108.
6. Holliger, P. and Winter, G., 1997. Diabodies: small bispecific antibody fragments. Cancer Immunology Immunother. 45: 128-130.
7. Horton, R. M., Cai, Z., Ho, S. N., Pease, L. R., 1990. Gene splicing by overlap extension: tailor-made genes using the polymerase chain reaction. BioTechniques, 8: 528-535.
8. Kunamneni, A., Abdelghani, T. T., Ellaiah, P., 2007. Streptokinase-the drug of choice for thrombolytic therapy. J. Thromb. Thrombolysis, 23(1):9-23.
9. Lefranc, M. P., Giudicelli, V., Kaas, Q., Duprat, E., Jabado-Michaloud, J., Scaviner, D., Ginestoux, O., Clement, D., Lefranc, G., 2005. IMGT, the international ImMunoGeneTics information system. Nucleic Acids Res., 33: D593-

10. Lilie, H., Schwarz, E., Rudolph, R., 1998. Advances in refolding of proteins produced in E. coli. Curr Opin Biotechnol., 9(5):497-501.
11. Lipman, N. S., Jackson, L. R., Trudel, L. J., Weis-Garcia, F. J., 2005. Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources, ILAR Journal, 46 (3): 258-68.
12. Lu, D., Jimenez, X., Witte, L., Zhu, Z., 2004. The effect of variable domain orientation and arrangement on the antigen-binding activity of a recombinant bispecific diabody. Biochem Biophys Res Commun., 318: 507-13.
13. Mirshahi, M., Soria, J., Lijnen, H., Fleury, V., Bertrand, O., Drouet, L., Caen, JP., Soria, C., 1997. A monoclonal antibody directed against an epitope in the NH2-terminal region of native human plasminogen induces a modification of its functional properties. Fibrinolysis and Proteolysis, 11: 155-163.
14. Mosesson, M. W, Siebenlist, K. R, Hainfeld. J. F, Wall JS., 1995. The covalent structure of factor XIIIa crosslinked fibrinogen fibrils. J Struct Biol., 115: 88-101.
15. Presta L., 2003. Antibody engineering for therapeutics. Curr Opin Struct Biol., 13(4):519-25.
16. Raum, D., D. Marcus, and C. A. Alper. 1980. Genetic polymorphism of human plasminogen. Am. J. Hum. Genet., 32:681-689.
17. Retamal, C. A., Thiebaut, P., Alves, E. W., 1999. Protein purification from polyacrylamide gels by sonication extraction. Anal Biochem., 268(1):15-20.
18. Sambrook J. and Russell, D. W., 2001. Molecular Cloning, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
19. Sharkey, R. M., Goldenberg, D. M., 2005. Perspectives on cancer therapy with radiolabeled monoclonal antibodies. J Nucl Med., 46(Suppl 1): 115S-127S.
20. Stoica, E., Costa-Foru, D., Cherciulescu, F., 1967. The reactivity of the clotting mechanism and fibrinolysis in cerebral thrombotic disease. J. Neur. Sci., 8: 491-500.
21. Wang, X., Lin, X., Loy, J. A., Tang, J., and Zhang, X. C., 1998. Crystal Structure of the Catalytic Domain of Human Plasmin Complexed with Streptokinase. Science, 281 (5383):1662-1665.

Cloning, expression and immunological activity analysis of a ScFv from mouse monoclonal antibody against human plasminogen capable of enhancing fibrinolysis

Saifi Abolhassan M.[1], Mirshahi M.[1], Behmanesh M.[2], Gharaati M.R.[1], Charbgoo F.[1], Mohammadi M.[1], Bezhgi M.[1]

[1] Biochemistry Dept., School of Life Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran

[2] Genetics Dept., School of Life Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Nowadays, monoclonal antibodies are the most applicable biological drugs. To that end, the construction of ScFv is the first step, having the advantage of small size, rapid clearance from blood, and better penetration to the tissues. A monoclonal antibody (A1D12) that enhances the activation of plasminogen 3-50-fold in the presence of plasminogen activators is a good candidate as a drug for coronary disorders. The main goal of this study is to construct the single chain fragment of variable (ScFv) for humanization. In this investigation ScFv of A1D12 has constructed and expressed in *E.coli*, which is capable of recognizing the corresponding antigen according to the results of SDS-PAGE and competitive ELISA respectively.

Keywords: cloning, ScFv, polymerase chain reaction (PCR), fibrinolysis