

کلون و بیان آنتی‌بادی مونوکلونال نو ترکیب تک زنجیره‌ای scFv علیه آنتی‌ژن carcinoembryonic

مریم صلواتی فرا^{*}

چکیده

مقدمه: فناوری آنتی‌بادی‌های نو ترکیب، تولید و کاربرد این نوع آنتی‌بادی‌ها را متحول و برخی محدودیت‌های فناوری هیبریدوما را مرتفع نمود. آنتی‌بادی‌های مونوکلونال توانایی بالایی به‌عنوان عوامل تشخیصی، درمانی و به ویژه هدف قراردادن سلول‌های سرطانی دارند، اما کاربرد آن‌ها به واسطه‌ی اندازه‌ی بزرگشان با محدودیت‌هایی مواجه است. ساختار نواحی آنتی‌بادی امکان تقسیم بندی آن‌ها را به زیر واحدهای کارا فراهم می‌سازد که این بخش‌ها می‌توانند با ترکیب شدن و اتصالات مختلف، مولکول‌های جدید کارآمدی را ایجاد نمایند. مولکول‌های scFv نسبت به آنتی‌بادی اولیه، به دلیل کاهش اندازه، مزایای بسیاری دارند که مهم‌ترین آن‌ها، کاهش پاسخ‌های ایمنی نسبت به آنتی‌بادی کامل موشی به واسطه فقدان بخش‌های ثابت است. **روش‌ها:** در این تحقیق ژن نواحی متغیر آنتی‌بادی مونوکلونال ضد مارکر توموری کارسینوما ریونیک به صورت scFv ساخته شد و در ناقل فاژمیدی کلون و سپس بیان گردید. همچنین اختصاصیت آن توسط آزمون وسترن بلاتینگ بررسی شد. نتایج: طبق نتایج حاصله، ژن scfv با موفقیت ساخته شد. سپس کلونینگ و بیان آن انجام پذیرفت. در نهایت، اختصاصی بودن آن نسبت به مارکر توموری کارسینوما ریونیک، با وسترن بلاتینگ تأیید گردید. **بحث:** آنتی‌بادی نو ترکیب scFv بیان شده در این پژوهش، علی‌رغم کاهش اندازه، به‌طور اختصاصی قادر به شناسی آنتی‌ژن بود و از این‌رو می‌توان از آن در تشخیص و پایش برخی سرطان‌ها استفاده نمود. در مجموع، از این روش می‌توان برای سنتز آنتی‌بادی‌های نو ترکیب نوع scFv علیه سایر آنتی‌ژن‌ها و تست‌های مختلف تشخیصی و درمانی بیماری‌ها استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: کلونینگ، مارکر توموری، هیبریدوما.

مقدمه

مارکرهای توموری در تشخیص و غربالگری سرطان‌ها ارزش بالایی دارد و سنجش آن‌ها، رشد طبیعی سلول‌ها یا سرطان‌زا بودن در مراحل مختلف را تعیین می‌نماید (Loud & Murphy, 2017). ساختار مارکرهای توموری اغلب از پروتئین‌ها و لیپیدهای متصل به قند است و از زمان اولین توصیف آن‌ها در سال ۱۹۶۵، آنتی‌ژن کارسینو امبریونیک (CEA: Carcinoembryonic antigen) به عنوان یک مارکر توموری، به‌طور کامل مورد مطالعه قرار گرفته است. این آنتی‌ژن یکی از رایج‌ترین مارکرهای توموری و نوعی گلیکوپروتئین است که از طریق لیپید به غشا متصل می‌شود و وزن مولکولی آن ۲۰۰-۱۸۰ کیلو دالتون است (Hammarström, 1999). CEA به مقدار فراوان در سلول‌های اپیتلیال کولون جنین در حال رشد و به میزان اندکی در کولون طبیعی افراد بالغ وجود دارد و می‌تواند به عنوان یک مولکول چسبنده‌ی هموتایپیک (Homotypic) عمل نماید که این مورد منجر به تجمع سلول‌های بیان‌کننده CEA می‌گردد. الگوی تجمع و میزان این آنتی‌ژن در برخی سرطان‌ها مانند معده، روده کوچک، کولون، رکتوم، پانکراس، کبد، پستان، تخمدان، رحم و شش بسیار بالا می‌رود که تمامی این تومورها منشأ اپیتلیالی دارند. بنابراین، تشخیص و ارزیابی میزان CEA اهمیت زیادی در تشخیص افتراقی، نظارت بر وضعیت و ارزیابی درمانی برخی از انواع تومورها دارد (Sahlmann *et al.*, 2017; Spindler *et al.*, 2018).

در حال حاضر تشخیص و ردیابی سرطان‌ها با تکنیک‌های پیشرفته مانند حسگرهای زیستی آپتامر نوری و الکتروشیمیایی برای تشخیص آنتی‌ژن‌ها، مهم‌ترین بخش در پایش سرطان‌هاست (Xiang *et al.*, 2020). وجود پس زمینه از مهم‌ترین مشکلات تصویر برداری‌های تشخیصی می‌باشد که به دلیل وجود گیرنده برای بخش Fc آنتی‌بادی‌ها در سلول‌های مختلف ایجاد می‌گردد. آنتی‌بادی‌ها مولکول‌های گلیکوپروتئینی ساخته شده توسط سلول‌های لنفوسیت B سیستم ایمنی هستند که در پاسخ به انواع مولکول‌های بیگانه ساخته می‌شوند و از آن‌ها به عنوان آنتی‌ژن یاد می‌گردد. آنتی‌بادی‌های نوترکیب و قطعات منتصب به آن‌ها، ویژگی منحصر به فرد اتصال انتخابی به آنتی‌ژن‌های هدف را دارند و در سال‌های اخیر، توجه زیادی را به خود جلب نموده‌اند. امروزه از این مولکول‌ها به عنوان یک روش تشخیصی و درمانی جایگزین یا ترکیبی در شیمی درمانی، رادیوتراپی و جراحی‌های مرسوم در انکولوژی بالینی استفاده می‌گردد (Borghaei *et al.*, 2006; Pucca *et al.*, 2011). آنتی‌بادی‌های مونوکلونال تولید شده برای مقاصد ذکر شده، اغلب دارای منشأ موشی هستند و کاربرد محدودی در درمان انسان به علت خاصیت ایمنی زایی دارند. به‌علاوه، اندازه‌ی بزرگ آنتی‌بادی‌های کامل موجب محدودیت دسترسی آن‌ها به بعضی از آنتی‌ژن‌های هدف می‌شود. به دلیل وجود این مشکلات تولید آنتی‌بادی‌های انسانی با اندازه‌ی کوچکتر در مطالعات مختلف مورد اقبال قرار گرفته است. یکی از پرکاربردترین زیر مجموعه‌های آنتی‌بادی‌ها، قطعات آنتی‌بادی هستند که دارای مزایای چندی نسبت به آنتی‌بادی کامل می‌باشند. این آنتی‌بادی‌ها علی‌رغم حفظ قدرت اتصال به آنتی‌ژن هدف، اندازه‌ی کوچکتری دارند و دارای قدرت نفوذ پذیری بیشتری در بافت‌های توموری جامد هستند. آنتی‌بادی تک زنجیره (Single chain FV: scFV) یک دسته از این آنتی‌بادی‌های نوترکیب هستند (Kriangkum *et al.*, 2001; Pucca *et al.*, 2011).

آنتی‌بادی‌های نوترکیب با ساختار scFV، از اتصال بخش‌های متغیر آنتی‌بادی (VH و VL) از طریق قطعه‌ی اتصال دهنده (Linker) به یکدیگر ساخته می‌شوند. از نظر وزن مولکولی بسیار کمتر از آنتی‌بادی کامل است و از این رو سنتز و به‌کارگیری آن‌ها مقرون‌به‌صرفه می‌باشد. مزیت دیگر این آنتی‌بادی‌ها، کاهش پاسخ‌های ایمونوژنیک انسانی نسبت به آنتی‌بادی‌های کامل

موشی به دلیل حذف بخش‌های ثابت آنتی‌بادی است (Mohr *et al.*, 2004). هدف از این تحقیق تولید قطعه‌ی scFV نو ترکیب با اندازه‌ی بسیار کمتر و مقرون به صرفه علیه مارکر تومری CEA با استفاده از کلونینگ ژن در باکتری بود. در مرحله‌ی بعد، بیان آن القا گشت و اختصاصی بودن آن به آنتی‌ژن مربوطه بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش سلول‌های هیبریدومای موشی که قادر به ترشح آنتی‌بادی اختصاصی علیه آنتی‌ژن CEA بودند از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری دریافت گردید.

استخراج RNA و سنتز cDNA

پس از کشت ابتدایی سلول‌ها در محیط کشت RPMI به همراه ۱۰ درصد سرم جنین گاو و رسیدن سلول‌ها به تعداد مناسب، RNA تام از آن‌ها توسط محلول TRIZOL (Gibco BRL, Life Technologies) طبق دستورالعمل شرکت سازنده به شرح ذیل استخراج گردید. به این منظور، ابتدا یک میلی‌لیتر از محلول TRIZOL به حدود 2×10^6 سلول هیبریدوما افزوده و به شدت ورتکس گردید. سپس به کمک سرنگ، محلول به صورت سوسپانسیون در آمد و ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. در مرحله‌ی بعد ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به لوله اضافه و ۱۵ ثانیه ورتکس گشت و ۳ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. لوله به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با $16,000$ g سانتریفیوژ گردید. سپس فاز آبی که در بالا قرار داشت به لوله جدید منتقل و ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانل به آن اضافه شد و مدت ۷ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. در مرحله‌ی بعد، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با $16,000$ g سانتریفیوژ گردید.

محلول رویی دور ریخته و رسوب با یک میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درصد شستشو داده شد. سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با $14,000$ g سانتریفیوژ شد. لوله با درب باز در دمای اتاق تا خشک شدن رسوب قرار گرفت و در پایان، ۳۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل به آن اضافه گردید. کلیه‌ی ظروف و مواد مصرفی در این مرحله به صورت عاری از آنزیم RNase تهیه شده بودند.

پس از استخراج RNA، DNA مکمل توسط کیت سنتز DNA مکمل (Takara, cDNA: Complementary DNA) طبق دستورالعمل شرکت سازنده به شرح ذیل ساخته شد. به این منظور، ابتدا ۱۱ میکرولیتر از RNA تام جداسازی و وارد لوله شد. سپس پرایمر Oligo dT، بافر مربوطه و آنزیم نسخه بردار معکوس (Reverse Transcriptase) به آن افزوده گردیدند. در مرحله‌ی بعد، لوله به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و سپس به مدت ۵ ثانیه در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا واکنش متوقف گردد.

آزمون PCR (Polymerase Chain Reaction)

به منظور تکثیر بخش‌های متغیر زنجیره‌های سبک و سنگین خانواده آنتی‌بادی موشی، مخلوط پرایمری مخصوص این فرایند ارائه شده توسط شرکت MWG (Ebersberg, Germany) خریداری گردید. توالی پرایمرها در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای به کار رفته

Table 1. Specifications of the used primers

Primer name	Number of nucleotides	Primer sequence
1 VH1FOR-2 (A)	32	5' TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTGGCCCC 3'
2 VH1BACK(A)	22	5' AGGTSMARCTGCAGSAGTCWGG3'
3 MJK1FONX(B1)	24	5' CCGTTTGATTTCCAGCTTGGTGCC3'
4 MJK2FONX(B2)	24	5' CCGTTTTATTTCAGCTTGGTCCC 3'
5 MJK4FONX(B3)	24	5' CCGTTTTATTTCCTCAACTTTGTCCC3'
6 MJK4FONX(B4)	24	5' CCGTTCAGCTCCAGCTTGGTCCC3'
7 VK2BACK(B)	24	5' GACATTGAGCTCACCCAGTCTCCA3'
8 LINKFOR(D2)	24	5' TGGAGACTGGGTGAGCTCAATGTC3'
9 LINKFOR(D1)	24	5' GGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA3'
10 VH1BACKSfi(C)	56	5' GTCCTCGCAACTGCGGCCAGCCGGCCATCGCC CAGGTSMARCTGCAGSAGTCWGG 3'
11 JK1NOT10(C1)	42	5' GAGTCATTCTGCGGCCGCCGTTTGATTTCCAGCT TGGTGCC3'
12 JK1NOT10(C2)	42	5' GAGTCATTCTGCGGCCGCCGTTTTATTTCAGCT TGGTCCC 3'
13 JK1NOT10(C3)	42	5' GAGTCATTCTGCGGCCGCCGTTTTATTTCCTCAACT TTGTCCC3'
14 JK1NOT10(C4)	42	5' GAGTCATTCTGCGGCCGCCGTTTCAGCTGCAGCTT GTCCC3'
15 LINKBACK(D)	69	5' GGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGCG GTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGAGTCG3'
16 LINKFOR(D)	69	5' TGGAGACTGGGTGAGCTCAATGTCCGATCCGCCA CCGCCAGAGCCACCTCCGCCTGAACCGCCTCCACC3'
17 URP	22	5' ACAGGAAACAGCTATGACCATG3'

• M= A or C; R= A or G; S= G or C; W= A or T.

در این مرحله برای تکثیر بخش VH (قسمت متغیر زنجیره سنگین) از پرایمر A به عنوان پرایمر بالادست و از پرایمر A' به عنوان پرایمر پایین دست استفاده شد. به منظور تکثیر قطعه VL (بخش متغیر زنجیر سبک)، مخلوط پرایمرهای B1, B2, B3 و B4 (B) به عنوان پرایمر پایین دست و B به عنوان پرایمر بالادست به کار رفت. برای تکثیر قطعه اتصال دهنده نیز از پرایمر D1 به عنوان پرایمر بالادست و از D2 به عنوان پرایمر فرودست و از D و D' به عنوان الگو استفاده گردید چرا که Linker یک پلی پپتید ساختگی است. پرایمرهای C1, C2, C3 و C4 (C') به عنوان پرایمر بالادست و پرایمر C به عنوان پرایمر پایین دست برای تکثیر قطعه scFV به کار رفتند. پرایمر URP نیز برای کلونی PCR (اتصال در ۱۸۰ جفت باز بالادست قطعه scFV) استفاده گردیدند. در این واکنش‌ها برنامه PCR به شرح ذیل انجام شد:

۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، سپس ۳۵ سیکل شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه. در نهایت مخلوط واکنش به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه باقی ماند تا عمل طولیل شدن نهایی انجام شد. تمامی واکنش‌های PCR در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر با ترکیب زیر آماده‌سازی شدند:

غلظت نهایی ۰/۱ پیکومول از پرایمرها، ۲۰۰ میلی مولار از هر یک از dNTP ها، ۱/۵ میلی مولار $MgCl_2$ ، ۱ واحد بین الملل از آنزیم DNA پلی مراز و ۰/۵ میکرولیتر از cDNA سنتز شده در مرحله قبل. در پایان فرایند PCR، نتایج تکثیر، بر روی ژل آگارز یک درصد به کمک مارکر وزن مولکولی تأیید گردیدند.

تخلیص محصول PCR و کلونینگ ژن

تمام محصول PCR مربوط به قطعه‌ی scFV بر روی ژل آگارز یک درصد بارگذاری شد و باند مربوطه توسط کیت (Roche, Agarose Gel DNA extraction kit) (CAT Number: 11696505001) مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده تخلیص گردید. سپس قطعه توسط آنزیم‌های محدودکننده *SfiI* و *NotI* (Roche) در دما و زمان مناسب برای آنزیم‌ها برش زده شد. به صورت موازی، پلاسمید pCANTAB 5 E (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) نیز با دو آنزیم محدودکننده‌ی فوق برش خورد و در یک واکنش اتصالی، پلاسمید و قطعه‌ی scFV تخلیص شدند و توسط آنزیم T4 DNA Ligase (Fermentas, USA) به یکدیگر متصل گردیدند. مخلوط حاصل پس از مدت زمان لازم برای اتصال، با دستگاه الکتروپوریتور به داخل سلول‌های مستعد *E. coli* HB2151 وارد گشت و سپس در محیط کشت LB (Luria-Bertani) مایع منتقل شد. پس از یک ساعت رشد در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، بر روی پلیت حاوی محیط کشت SOC (Super Optimal broth with Catabolite repression) جامد واجد آنتی بیوتیک آمپی سیلین (۱۰۰ میکروگرم در هر میلی لیتر) به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد. برای تأیید کلونینگ و جدا نمودن کلونی‌های واجد آنتی بادی نو ترکیب، از کلونی‌های رشد نموده، کلونی PCR انجام پذیرفت. به این صورت که از هر کلونی به صورت مستقیم، به عنوان الگوی PCR به کمک پرایمرهای URP و C \square 4 (جدول ۱) استفاده گردید. برای تأیید نهایی، از کلونی‌های مثبت، استخراج پلاسمید انجام پذیرفت و هضم آنزیمی با همان آنزیم‌های محدودکننده یعنی *NotI* و *SfiI* انجام شد.

بررسی و اثبات بیان پروتئین نوترکیب scFV

پس از انتخاب کلون‌های نوترکیب واجد قطعه‌ی scFV، این کلون‌ها وارد مرحله بیان پروتئین شدند. به این صورت که یک کلونی تک در محیط کشت LB مایع واجد آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (۱۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر) به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. در روز بعد به محیط کشت 2XTY حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (۱۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر) و ۱ درصد گلوکز، از کشت شبانه تلقیح شد (نسبت ۱:۱۰۰). نگهداری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و هوادهی در شیکر با سرعت ۱۵۰-۱۲۰ دور در دقیقه انجام شد و پس از رسیدن جذب نوری محیط کشت به حدود ۰/۶ (در طول موج ۶۰۰ نانومتر)، با استفاده از غلظت یک میلی‌مولار IPTG (ایزوپروپیل تیو بتا-دی گالاکتوزید) بیان پروتئین القا گردید. کشت به مدت یک شب در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد همراه با هوادهی قرار گرفت و در روز بعد رسوب سلولی توسط سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با ۱,۰۰۰ g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد جمع‌آوری شد. با توجه به قرارگیری پروتئین‌های نوترکیب در فضای پری‌پلاسمیک، رسوب سلولی در بافر TES (Tris-HCl، EDTA، ساکارز، با pH=۸، به میزان یک درصد محیط کشت اولیه) به صورت سوسپانسیون در آمد و لوله به مدت ۲۰ دقیقه بر روی یخ قرار داده شد و چندین بار مخلوط گردید تا پروتئین‌های نوترکیب به صورت محلول درآیند. سپس سانتریفیوژ به مدت ۳۰ دقیقه با ۱۸,۰۰۰ g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد و محلول رویی جمع‌آوری و برای آنالیز بیان پروتئین با روش الکتروفورز روی ژل آکریل آمید ۱۲ درصد (SDS-PAGE) بارگذاری شد (Ghasemi et al., 2004).

به‌منظور تأیید بیان پروتئین نوترکیب scFV علیه آنتی‌ژن توموری CEA، از روش وسترن بلاتینگ استفاده گردید. در این آزمون از آنتی‌بادی اختصاصی Anti-Etag HRP (Amersham Pharmacia Biotech) به‌منظور ردیابی پروتئین نوترکیب استفاده شد. تمامی نمونه‌های مورد آزمایش به اضافه کنترل منفی آزمون (محیط کشت حاوی باکتری ولی بدون القا) توسط SDS-PAGE به‌طور کامل از یکدیگر تفکیک شد و سپس به غشاء PVDF منتقل گردید. پس از شستشوی غشا و قرارگیری در بافر مسدودکننده‌ی حاوی شیر خشک بدون چربی، Rabbit Anti mouse HRP برای ردیابی پروتئین نوترکیب استفاده شد.

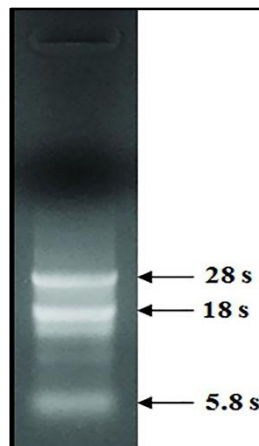
نتایج و بحث

انواع سرطان‌های روده بزرگ، شش، پستان، معده و پانکراس منجر به مرگ و میر بسیاری از مردم جهان می‌شوند که دلیل عمده‌ی آن، تشخیص دیرهنگام آن‌ها است. CEA جزء مهم‌ترین مارکرهای انکوفتال (Oncofetal) می‌باشد که سطوح آن در خون، میان افراد سالم و افراد سرطانی دارای تفاوت معنی‌داری است (Agrawal et al., 2020). آنتی‌ژن CEA به مقدار فراوان در سلول‌های اپیتلیال کولون جنین در حال توسعه و همچنین اپیتلیال طبیعی کولون بالغین در سطوح پایین‌تر وجود دارد. علاوه‌براین، بیان آن در برخی نارسایی‌های خوش‌خیم و در برخی تومورهای بدخیم معده، روده کوچک، کولون، رکتوم، پانکراس، کبد، پستان، تخمدان، رحم و شش بسیار بالا می‌رود که تمامی این تومورها منشاء اپیتلیال دارند. نقش CEA در سلول‌های طبیعی اپیتلیال کولون و در سلول‌های توموری هنوز به‌طور کامل شناخته شده نیست. بسیاری از اعضاء خانواده ژنی ایمونوگلوبولین‌ها به عنوان مارکرهای شناساگر در نظر گرفته می‌شوند و این مورد ممکن است در مورد CEA نیز صادق باشد (Xiang et al., 2020). CEA بر روی سطح سلولی تومورهای کولون و سایر سلول‌ها قرار می‌گیرد و می‌تواند به عنوان یک مولکول چسبنده‌ی هموتایپیک عمل نماید که این مورد منجر به تجمع سلول‌های بیان‌کننده‌ی آن می‌گردد. به‌علاوه با وجود این که بیان CEA در سلول‌های

طبیعی اپیتلیال کولون در بالغین به حداقل می‌رسد، الگوی تجمع آن با آنچه که در اغلب سلول‌های توموری کولون یا در کولون جنین در حال توسعه مشاهده می‌گردد، متفاوت است. در کولون طبیعی، CEA تنها در سطح لومینال سلول قرار می‌گیرد در حالی که در سلول‌های توموری، CEA به صورت نامنظم در سرتاسر غشاء سلول یافت می‌شود. از مجموع مطالعات به دست آمده در مورد کاربرد این آنتی‌ژن به عنوان مارکر تشخیصی در انواع کارسینوماهای ذکر شده می‌توان اینگونه استنباط کرد که به دلیل وجود موارد مثبت و منفی کاذب نمی‌توان از این مارکر به تنهایی به عنوان یک عامل قابل اطمینان در غربالگری اولیه سرطان استفاده نمود اما در مراحل پیشرفته سرطان این مارکر به خوبی قابل شناسایی و کاربرد می‌باشد (Hall *et al.*, 2019; Yaghoubi *et al.*, 2022). هدف از پژوهش حاضر ساخت قطعه‌ی scFV نو ترکیب علیه مارکر تومری CEA به منظور کاربرد در تشخیص سلول‌های سرطانی و انتقال دارو به سلول‌های بیان کننده آن بود.

نتایج استخراج RNA

به منظور تکثیر قطعات VH و VL، پس از کشت ابتدایی سلول‌های هیبریدوما مورد نظر و رسیدن سلول‌ها به تعداد مناسب، RNA تام سلولی استخراج شد. برای حصول اطمینان از عدم تجزیه RNA استحصال شده، غلظت آن با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری تعیین و کیفیت نمونه‌ها نیز بر روی ژل آگارز یک درصد مشاهده و ارزیابی شد (شکل ۱).



شکل ۱- بررسی کیفیت RNA کل استخراج شده از سلول‌های هیبریدوما

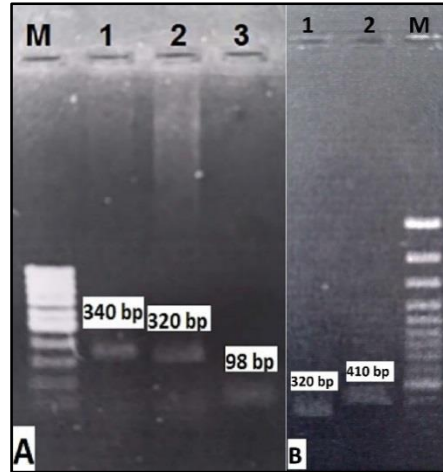
Figure 1. Evaluation of total RNA quality extracted from hybridoma cells

در سیتوپلاسم سلول‌های هیبریدوما، غالب mRNA ها (Messenger RNA)، مربوط به RNA کد کننده‌ی آنتی‌بادی هدف هستند. در این مطالعه نیز سلول‌های هیبریدوما موشی مورد نظر، حاوی mRNA مربوط به آنتی‌بادی مونوکلونال علیه آنتی‌ژن CEA بودند. همان‌گونه که در شکل ۱ مشاهده می‌گردد وجود باندهای ۵/۸S، ۱۸S و ۲۸S نشان دهنده‌ی صحت استخراج بود. نتایج حاصله نشان دادند RNA استحصال با اطمینان در مراحل بعدی مطالعه قابل به‌کارگیری بود.

نتایج حاصل از تکثیر و اتصال نواحی متغیر آنتی‌بادی (VH و VL) با واسطه‌ی Linker و ساخت scFV

به منظور ساخت قطعه‌ی scFV، قطعات VH (۳۴۰ جفت باز)، VL (۳۲۰ جفت باز)، و Linker (۹۳ جفت باز) در واکنش‌های مجزایی توسط پرایمرهای مربوطه تکثیر شدند (شکل ۲-A). قطعه‌ی Linker، دارای توالی مشترک با بخش 3' قطعه‌ی VH و

بخش 5' قطعه‌ی VL بود. از این رو در دو واکنش PCR مجزا با کمک پرایمرهای مربوطه، اقدام به اتصال Linker به هر یک از قطعات VH و VL نمودیم که اتصال VH به Linker با موفقیت انجام شد و شاهد تکثیر قطعه‌ای به طول 410 جفت باز بودیم (شکل ۲- B).

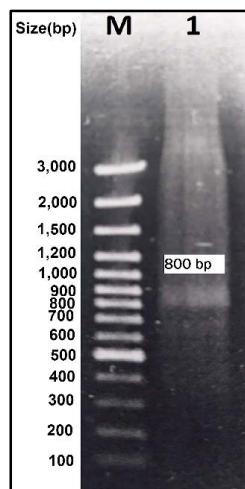


شکل ۲- نتایج حاصل از PCR قطعات آنتی‌بادی. A) چاهک ۱: قطعه‌ی VH، چاهک ۲: قطعه‌ی VL و چاهک ۳: قطعه‌ی Linker. B)

چاهک ۱: قطعه‌ی VL و چاهک ۲: قطعه‌ی VH-Linker. M) 100 bp DNA Ladder

Figure 2. PCR results of antibody fragments. A) Lane 1: VH fragment, Lane 2: VL fragment, and Lane 3: Linker fragment. B) Lane 1: VL fragment, and Lane 2: VH-Linker fragment. M) 100 bp DNA Ladder

در واکنش PCR بعدی به‌منظور اتصال قطعه‌ی VH-Linker به قطعه‌ی VL، پرایمرهای مربوطه و هر دو قطعه وارد واکنش شد و مشاهده‌ی قطعه‌ای با طول حدود 800 جفت باز، نشان دهنده‌ی تکثیر موفق scFV بود (شکل ۳). این باند از روی ژل آگارز تخلیص و برای تکثیر مجدد آن، با پرایمرهای C و C4 به‌کار گرفته شد.



شکل ۳- محصول PCR مربوط به قطعه‌ی scFV

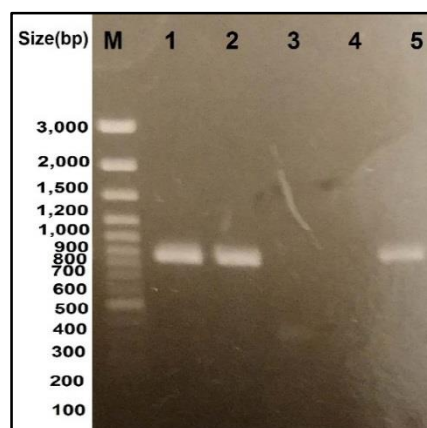
Figure 3. PCR product of scFV fragment

به‌منظور تکثیر قطعات متغیر این آنتی‌بادی‌ها، با در نظر گرفتن مسئله‌ی خانواده‌های ژنی و نامشخص بودن ماهیت ژنتیکی نواحی متغیر آنتی‌بادی‌های مونوکلونال حاصله، از یک مجموعه‌ی کامل پرایمرهای طراحی شده برای تکثیر مخازن ژنی بخش‌های

متغیر ایمونوگلوبولین‌های موش استفاده گردید. این مجموعه شامل دو پرایمر دژنره برای ناحیه VH، پنج پرایمر دژنره برای ناحیه VL، دو پرایمر دژنره برای تکثیر Linker و نهایتاً پنج پرایمر برای تکثیر مولکول scFV نو ترکیب بود. در مورد تکثیر نواحی ذکر شده، ابتدا از مخلوط پرایمرها استفاده گردید چرا که از نوع خانواده‌ی ژنی اطلاعاتی در دسترس نبود اما در مرحله بعد، تک تک پرایمرها در واکنش‌های جداگانه به کار رفت و در نهایت، پرایمر مطلوب برای ادامه کار و تکثیر انتخاب گردید. استراتژی‌های متفاوتی برای ساخت مولکول scFV پیشنهاد شده است که از جمله آن، مخلوط کردن مقادیر مولی یکسان از قطعات VH، VL و Linker می‌باشد. قطعه‌ی Linker واجد ۱۵ اسید آمینه گلیسین و سرین است که به صورت توالی 3(Gly4Ser) به دنبال هم قرار گرفتند و علاوه بر آن دارای توالی مکمل با انتهای قطعه‌ی VH و ابتدای قطعه‌ی VL می‌باشد. به کاربردن مخلوط این سه قطعه DNA در یک واکنش PCR به همراه دو پرایمر بالادست قطعه‌ی VH و پایین دست قطعه‌ی VL، منجر به گردهم‌آوری (assembly) مولکول scFV می‌گردد. از آنجایی که وجود نسبت مولی یکسان، یک عامل اساسی در این گردهم‌آوری است، در ابتدا امکان تکثیر مولکول scFV فراهم نگرددید. بنابراین از استراتژی دیگری که شامل دو واکنش بود استفاده گردید به این صورت که ابتدا قطعه‌ی VH با قطعه‌ی Linker اتصال داده شد و سپس از این قطعه (VH-Linker) برای گرد هم آوری نهایی با VL و ساخت scFV استفاده گردید. به دلیل کاهش تعداد قطعات به دو قطعه، این نوع گرد هم آوری توسط PCR شانس بسیار بالاتری داشت.

کلونینگ ژن scFV

از پلاسمید pCANTAB 5 E به عنوان ناقل فازمیدی مناسب برای بیان scFV استفاده گردید. این پلاسمید در ناحیه‌ی کلونینگ، جایگاه برش برای آنزیم‌های محدودگر *NotI* و *SfiI* را داشت و بنابراین با روش هضم آنزیمی ناقل و قطعه‌ی scFV با آنزیم‌های مربوطه برش خوردند. سپس هر دو بخش در غلظت‌های مناسب در واکنش اتصال وارد شدند و پس از آن، تراریختی در ناقل *E. coli* HB2151 انجام گردید. انجام کلونی PCR با استفاده از پرایمرهای URP و C□ 4 و مشاهده قطعه‌ی حدود ۹۵۰ جفت بازی، کلونینگ را تأیید نمود (شکل ۴).

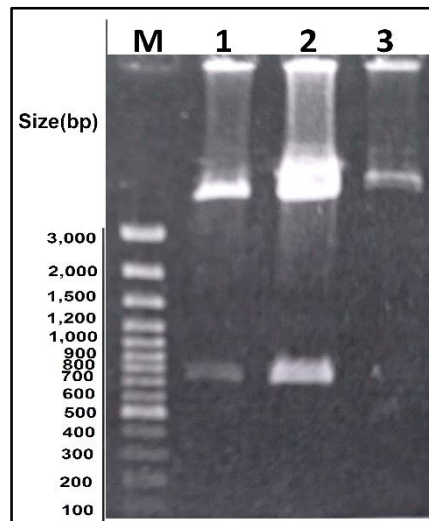


شکل ۴- ژل آگارز کلونی PCR مربوط به کلونینگ قطعه‌ی scFV. چاهک‌های ۱، ۲ و ۵: کلون‌های مثبت واجد قطعه، چاهک‌های ۳ و ۴:

کلون‌های منفی.

Figure 4. Clony PCR agarose gel of scFV fragment. Lanes 1, 2 and 5: positive clones with fragment, Lanes 3 and 4: negative clones.

سپس از چندین کلونی تأیید شده در مرحله قبل، استخراج پلاسمید انجام گردید. هضم مجدد پلاسمیدهای استخراج شده توسط آنزیم‌های محدودگر *SfiI* و *NotI* و مشاهده باند حدود ۸۰۰ جفت بازی، تراخی را ثابت نمود (شکل ۵).



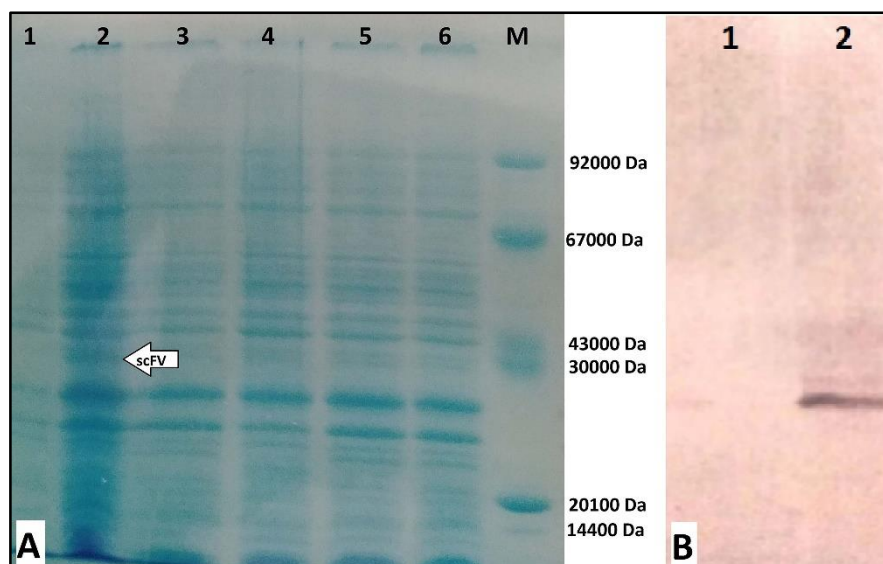
شکل ۵- نتایج حاصل از هضم آنزیمی کلون‌های مثبت در آزمون PCR. چاهک‌های ۱ و ۲: کلون‌های مثبت واجد قطعه، چاهک ۳: کلون منفی.

Figure 5. Enzymatic digestion results of positive clones in PCR test. Lanes 1 and 2: positive clones with fragment, Lane 3: negative clone.

ناقل فازمیدی pCANTAB 5 E ناقل مناسبی برای بیان مولکول scFV است و کارایی دوگانه داشت که هم می‌توانست مولکول scFV را به صورت فیوژن در سطح فاز نمایش دهد و هم با استفاده از نژاد مناسب باکتری، قادر به بیان پروتئین در فضای پری‌پلاسمی به صورت محلول بود (Ten Haaf *et al.*, 2015). به دلیل وجود پیوندهای دی سولفیدی در داخل قطعات VH و VL، نیاز به یک فضای مناسب برای تشکیل این پیوندها بود که فضای پری‌پلاسمی باکتری‌ها این امکان را فراهم ساخت. از طرف دیگر میزان تجمع پروتئین در سیتوپلاسم باکتری با انتقال به فضای پری‌پلاسمی، پایین تر بود و این مورد مزیتی برای رشد باکتری بود چرا که بیان بالای پروتئین‌های خارجی در سیتوپلاسم سلولی، می‌تواند باعث مرگ باکتری گردد (Raivio & Silhavy, 2001).

بررسی بیان پروتئین نو ترکیب در کلون‌های حاصله

پس از انتخاب کلون‌های نو ترکیب، این کلون‌ها تحت القا بیان با IPTG قرار گرفتند و پروتئین‌ها از فضای پری‌پلاسمی استخراج و محصولات بر روی ژل SDS-PAGE بارگذاری شدند. با توجه به اینکه ژن مورد نظر از کدون آغازی که در ۹۸ نوکلئوتید بالادست مکان کلونینگ تا کدون خاتمه در اواخر ژن ۸۹۴ نوکلئوتید داشت و در واقع شامل ۲۹۸ اسید آمینه بود، وزن پروتئین بیان شده در حدود ۳۲۷۸۰ دالتون محاسبه شد (شکل ۶-۱). به منظور تأیید بیان، از آنتی‌بادی اختصاصی Anti- Etag HRP در آزمون وسترن بلاتینگ استفاده شد. نتایج این آزمون تأیید کننده‌ی تولید آنتی‌بادی مونوکلونال نو ترکیب علیه آنتی‌ژن توموری CEA بود (شکل ۶-۲).



شکل ۶- نتایج بیان پروتئین. A) نتایج SDS-PAGE: چاهک ۱: نمونه پروتئینی قبل از القا، چاهک ۲: کنترل مثبت واجد باند مورد نظر، چاهک‌های ۳، ۴، ۵ و ۶: پروتئین تام ۴ عدد از کلون‌های مثبت، M: مارکر پروتئینی. B) نتایج وسترن بلاتینگ: چاهک ۱: پروتئین تام نمونه قبل از القا، چاهک ۲: پروتئین تام یکی از نمونه‌های مثبت.

Figure 6. Protein expression results. A) SDS-PAGE results: Lane 1: protein sample before induction, Lane 2: positive control containing the desired band, Lanes 3, 4, 5 and 6: total protein of 4 positive clones, M: marker protein B) Western blotting results: Lane 1: total protein of the sample before induction, Lane 2: total protein of one of the positive samples.

سیستمی که در این حامل برای بیان ژن‌های نو ترکیب به کار رفت تحت کنترل اپرون LacZ است که با IPTG القا می‌شود. مزیت این ناقل وجود توالی PelB leader است که سبب می‌شود پروتئین نو ترکیب پس از بیان به فضای پری پلاسمی منتقل شود و کار استخراج پروتئین ساده‌تر گردد. در ضمن این قطعه شامل ۱۰ اسید آمینه به نام Etag بعد از جایگاه کلونینگ در حامل بود که به پروتئین خارجی متصل می‌شود و امکان اتصال و شناسایی پروتئین نو ترکیب را توسط آنتی‌بادی مونوکلونال بر علیه آن در تست وسترن بلات فراهم می‌نماید. لازم به ذکر است که قطعه‌ی پپتیدی زمانی قابل بیان است که با مولکول پپتیدی در یک چارچوب مناسب برای بیان قرار گیرد (Albrecht *et al.*, 2004; Choi & Lee, 2004).

پس از بیان موفق مولکول‌های scFV در باکتری *E. coli*، تعیین مشخصات پروتئین بیان شده توسط ژل SDS-PAGE صورت گرفت و مشخص گردید که وزن مولکولی پروتئین بیان شده با وزن مولکولی محاسبه شده از لحاظ تئوری و همچنین با سایر مولکول‌های scFV گزارش شده مطابقت دارد. البته در بیان این مولکول چندین بار اشکالات پایداری پلاسمید مشاهده گردید که نهایتاً شرایط پایدار برای این پروتئین پایه‌گذاری شد. وجود یک پپتید نشانه به نام E-tag در بخش C-terminal این پروتئین، انجام واکنش بلاتینگ را ممکن ساخت و بنابراین ماهیت این مولکول کلون شده در آزمایش فوق تأیید گردید زیرا از آنتی‌بادی مونوکلونال ضد E-tag در ردیابی استفاده شد. البته این قطعه‌ی پپتیدی زمانی قابل بیان است که با مولکول پپتیدی در یک چارچوب مناسب برای بیان قرار گیرد (Albrecht *et al.*, 2004).

نتیجه‌گیری کلی

به‌طور خلاصه نتایج این طرح تحقیقاتی نشان داد که از طریق ساخت آنتی‌بادی نوترکیب scFV علیه آنتی‌ژن CEA، علاوه بر ساخت یک آنتی‌بادی مونوکلونال و اختصاصی کارآمد، امکان کاهش اندازه آن به حدود یک پنجم اندازه آنتی‌بادی کامل، وجود دارد و علی‌رغم حذف بخش‌های ثابت آنتی‌بادی، قابلیت شناسایی و اتصال به آنتی‌ژن مربوطه در آزمون وسترن بلائینگ حفظ گردیده است. از این رو چنین آنتی‌بادی نوترکیبی قادر به تشخیص و اتصال اختصاصی به آنتی‌ژن مربوطه است و همچنین می‌تواند داروها و سایر عوامل درمانی را به صورت ویژه به سلول‌های بیان‌کننده آنتی‌ژن خاص تحویل دهد.

سپاسگزاری

بدین وسیله مراتب قدردانی خود را از پژوهشگاه هوافضا و پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری جهت فراهم آوردن امکانات آزمایشگاهی اعلام می‌دارم.

تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

منابع

- Agrawal, S., A. Gupta, S. Gupta, B. Goyal, R. A. T. Siddeek, D. Rajput, U. Chauhan, S. Kishore, M. Gupta and R. Kant (2020). "Role of carbohydrate antigen 19-9, carcinoembryonic antigen, and carbohydrate antigen 125 as the predictors of resectability and survival in the patients of Carcinoma Gall Bladder." *Journal of Carcinogenesis* 19.
- Albrecht, H., P. A. Burke, A. Natarajan, C.-Y. Xiong, M. Kalicinsky, G. L. DeNardo and S. J. DeNardo (2004). "Production of soluble ScFvs with C-terminal-free thiol for site-specific conjugation or stable dimeric ScFvs on demand." *Bioconjugate chemistry* 15(1): 16-26.
- Borghaei, H., M. K. Robinson and L. M. Weiner (2006). *Monoclonal antibody therapy of cancer*. Immunotherapy of Cancer, Springer: 487-502.
- Choi, J. and S. Lee (2004). "Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*." *Applied microbiology and biotechnology* 64(5): 625-635.
- Ghasemi, F., A. Zomorodipour, S. Shojai, F. Ataei, M. Khodabandeh and M. H. Sanati (2004). "Using L-arabinose for production of human growth hormone in *Escherichia coli*, studying the processing of gIII:: hGH precursor."
- Hall, C., L. Clarke, A. Pal, P. Buchwald, T. Eglinton, C. Wakeman and F. Frizelle (2019). "A review of the role of carcinoembryonic antigen in clinical practice." *Annals of Coloproctology* 35(6): 294.
- Hammarström, S. (1999). *The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues*. Seminars in cancer biology, Elsevier.
- Kriangkum, J., B. Xu, L. P. Nagata, R. E. Fulton and M. R. Suresh (2001). "Bispecific and bifunctional single chain recombinant antibodies." *Biomolecular engineering* 18(2): 31-40.
- Loud, J. T. and J. Murphy (2017). *Cancer screening and early detection in the 21st century*. Seminars in oncology nursing, Elsevier.
- Mohr, L., A. Yeung, C. Aloman, D. Wittrup and J. R. Wands (2004). "Antibody-directed therapy for human hepatocellular carcinoma." *Gastroenterology* 127(5): S225-S231.

- Pucca, M. B., T. B. Bertolini, J. E. Barbosa, S. V. R. Galina and G. S. Porto (2011). "Therapeutic monoclonal antibodies: scFv patents as a marker of a new class of potential biopharmaceuticals." *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 47(1): 31-38.
- Raivio, T. L. and T. J. Silhavy (2001). "Periplasmic stress and ECF sigma factors." *Annual review of microbiology* 55: 591.
- Sahlmann, C. O., K. Homayounfar, M. Niessner, J. Dyczkowski, L. C. Conradi, F. Braulke, B. Meller, T. Beißbarth, B. M. Ghadimi and J. Meller (2017). "Repeated adjuvant anti-CEA radioimmunotherapy after resection of colorectal liver metastases: Safety, feasibility, and long-term efficacy results of a prospective phase 2 study." *Cancer* 123(4): 638-649.
- Shim, H. (2020). "Bispecific antibodies and antibody–drug conjugates for cancer therapy: technological considerations." *Biomolecules* 10(3): 360.
- Sompunga, P., N. Pruksametanan, K. Rangnoi, K. Choowongkomon and M. Yamabhai (2019). "Generation of human and rabbit recombinant antibodies for the detection of Zearalenone by phage display antibody technology." *Talanta* 201: 397-405.
- Song, P., Q. Pan, Z. Sun, L. Zou and L. Yang (2022). "Fibroblast activation protein alpha: Comprehensive detection methods for drug target and tumor marker." *Chemico-Biological Interactions* 354: 109830.
- Spindler, K.-L. G., C. Demuth, B. S. Sorensen, J. S. Johansen, D. Nielsen, N. Pallisgaard, E. Hoegdall, P. Pfeiffer and B. Vittrup Jensen (2018). "Total cell-free DNA, carcinoembryonic antigen, and C-reactive protein for assessment of prognosis in patients with metastatic colorectal cancer." *Tumor Biology* 40(11): 1010428318811207.
- Ten Haaf, A., S. Pscherer, K. Fries, S. Barth, S. Gattenlöhner and M. K. Tur (2015). "Phage display-based on-slide selection of tumor-specific antibodies on formalin-fixed paraffin-embedded human tissue biopsies." *Immunology letters* 166(2): 65-78.
- Xiang, W., Q. Lv, H. Shi, B. Xie and L. Gao (2020). "Aptamer-based biosensor for detecting carcinoembryonic antigen." *Talanta* 214: 120716.
- Yaghoubi, N., F. Z. Avval, M. Khazaei, A. Sahebkar and S. H. Aghae-Bakhtiari (2022). "High diagnostic and prognostic value of miRNAs compared with the carcinoembryonic antigen as a traditional tumor marker." *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)* 22(2): 206-214.

Cloning and expression of recombinant scFV monoclonal antibody against carcinoembryonic antigen

M. Salavatifar*¹

Received: 2022.6.25

Accepted: 2022.10.12

Abstract

Introduction: Recombinant antibody technology has revolutionized the production and use of these kinds of antibodies and removed some of the hybridoma technology limitations. Monoclonal antibodies have high potentials as diagnostic and therapeutic agents, especially in targeting cancer cells, but their uses has been limited due to their large sizes. The special structure of different regions of antibodies allows them to be divided into efficient subunits, which can combine to form new molecules with efficient properties. The reduced size of scFv molecules have many advantages compared to the primary antibodies. The most important of advantages is the reduction of immune response compare to complete mouse antibodies due to the lack of constant fragments. **Methods:** In this study, the variable regions of gene of carcinoembryonic tumor marker monoclonal antibody were constructed as scFV and cloned into the phagemid vector. Then its specificity was investigated by the western blotting test. The *scFV* gene was successfully constructed. Then cloning and expression was performed. Finally, its specificity was confirmed by western blotting. **Results:** The recombinant scFV antibody expressed in this study, due to size change, was able to specifically identify the carcinoembryonic tumor marker, and therefore it can be used in the diagnosis of some cancers. **Discussion:** This recombinant antibody was specifically capable of carcinoembryonic tumor marker recognition. Therefore, it can be applied to some cancers diagnosis and monitoring. In addition, this method can be used to synthesize scFV-type recombinant antibodies against other antigens. So that they can be used in various diagnostic tests and treatments.

Keywords: *Cloning, Hybridoma, Tumor marker.*

Department of Aerospace Physiology, Aerospace Research Institute, Ministry of Science, Research and Technology, Tehran, Iran (*. Responsible author Email: salavati@ari.ac.ir)