

إنتاج أضداد نانوية موجهة لليشمانيا المدارية مدمجة مع البروتين المتألق الأخضر واختبار حساسيتها

إيناس أبو الشامات* د. محمود قويدر* د. عبد القادر عبادي**

المخلص

تعد الأضداد النانوية المشتقة من أضداد السلسلة الثقيلة لعائلة الإلبليات واحدة من أهم الأضداد المؤشبة، وذلك نتيجة لما تتمتع به من ميزات بنيوية خاصة، فضلاً عن إمكانية تسهيلها بهيئات وأشكال مختلفة. ونظرًا لما يتيح دمج الأضداد مع البروتين المتألق الأخضر من سبل استخدامها في تطبيقات تشخيصية أو علاجية، هدف بحثنا إلى دمج الأضداد النانوية الموجهة لطفيلي اليشمانيا المدارية المنتشر في سورية بالبروتين المتألق الأخضر وأمثلة شروط التعبير عنه ودراسة الميزات التي يضيفها هذا الدمج. جرى تسهيل جين الأضداد النانوية لليشمانيا ضمن بلاسميد *PMES4-GFP*، وعند اختبار شروط مختلفة للتعبير عن الأضداد النانوية المدمجة تبين تراكمها في الأجسام الضمنية، كما تبين أن درجة الحرارة 22 مئوية والتركيز 0.5 ميلي مول من IPTG هي الشروط المثلى للتعبير. وكان من

* قسم علم الحياة الحيوانية، كلية العلوم، جامعة دمشق، سورية.

** قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية، هيئة الطاقة الذرية، دمشق، سورية.

اللافت ارتفاع حساسية الأضداد النانوية المدمجة وقدرتها على التعرف على تراكيز منخفضة من مستضدات اليشمانيا تصل لـ 30 نانو غرام بالميلي مقارنة مع الأضداد النانوية غير المدمجة باستثناء الضدّ النانوي NbLTC24 الذي لم يبد فرقاً سواء كان مدمجاً مع GFP أو غير مدمج.

الكلمات المفتاحية: الأضداد النانوية، البروتين المتألق الأخضر، اليشمانيا المدارية.

Production of anti-*L.tropica* Nanobodies fused with GFP protein and assessment their sensitivity

E. Abu Alshamat* Dr. M. Kweider* Dr. A. Q. Abbady**

Abstract

Nanobodies derived from the heavy chain antibodies of the family of camelidea are one of the most important recombinant antibodies due to their special structural properties, as well as the possibility of cloning them into different features and forms. Since fusing antibodies with green fluorescent protein GFP is a way to be used in diagnostic or therapeutic applications, this work aimed to fuse anti *L. tropica* nanobodies which diffuse in Syria with GFP protein, optimize expression conditions, and study the advantages of this fusion. The gen of anti *L. tropica* nanobodies were cloned within PMES4-GFP, and when testing different conditions for the expression of the fusing nanobodies, their accumulation was shown in inclusion bodies, temperature 22 ° C and 0.5 mM concentration of IPTG were the optimal conditions for expression. Significantly, the sensitivity of the conjugated nanobodies and their ability to identify low concentrations of leishmaniasis antigens 30 ng/ml compared with non- conjugated nanobodies except for NbLTC24 showed no difference whether they were fused with GFP or not.

Keywords: Nanobody, green florescent protein, *Leishmania tropica*

* Department of Animal Biology, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria.

** Division of Molecular Biomedicine, Department of Molecular Biology and Biotechnology, Damascus, Syria.

المقدمة:

اكتُشف في عائلة الإبلات Camelidea أضداداً وظيفية تفتقر للسلاسل الخفيفة لديها القدرة على ربط المستضد بوساطة مجال واحد دون الحاجة لوجود مجالين كما هو الحال في الضد التقليدي [1]. ولقد تمكن الباحثون باستخدام طرائق البيولوجيا الجزيئية والهندسة الوراثية من عزل المنطقة المتغيرة من السلسلة الثقيلة لهذه الأضداد وإنتاجها variable domain of nanobody (VHH) heavy chain antibodies تلك التي تدعى اختصاراً بالضد النانوي (Nb) [2]. تمتاز الأضداد النانوية بصغر حجمها وببنيتها البروتينية المستقرة وبانحلالية وثباتية حرارية عالية، بالإضافة إلى قدرتها على التطوي والنفاذ الجيد في أسجة الكائن الحي، ما يمكنها من الوصول لمستضدات يصعب على الأضداد العادية الوصول إليها [3، 4]، الأمر الذي يجعل هذه الأضداد النانوية مثالية لدراسات النفاذ الحيوية والتطبيقات الطبية [5-7]. علاوة على إمكانية تسهيل هذه الأضداد بأشكال وهيئات مختلفة؛ إذ يمكن دمج جينات ضدين نانويين أو ثلاثة أضداد نانوية تتعرف على مستضدات مختلفة أو تكرارات للمستضد نفسه، ما يسمح بزيادة الألفة الوظيفية [8-11]، كما يتيح دمجها مع بروتينات أخرى أو لبيدات سُبلاً لاستخدامها في تطبيقات علاجية أو تشخيصية [12]؛ إذ يشكل دمج الضد النانوي ببروتين متألق مسابراً متألقاً مناسبة لكشف العديد من المستضدات الممرضة داخل الخلايا وتتبعها [13، 14].

يعد وسم الأضداد بمادة متألقة طريقة ناجعة في الدراسات التشخيصية والعلاجية؛ إذ يتم الوسم إما بطريقة كيميائية أو حيوية بالدمج بين جين الضد وجين بروتين المتألق الأخضر green fluorescent protein GFP. وتتمثل مشكلة الوسم الكيميائي في صعوبة التحكم بعدد الروابط المتألقة، بالإضافة إلى احتمالية ارتباطها مع الجزء الرابط للمستضد paratope فيصبح الضد غير فعال بشكل جزئي أو كلي [15]. من جهة أخرى يمثل إنتاج الأضداد المؤشبة المدمجة مع البروتين المتألق (GFP) في بكتيريا ال *E.coli* تحدياً كبيراً وذلك نظراً

لاحتياجات التطوي المختلفة لكلٍ من الضد والبروتين المتألق الأخضر، فنتيجة لاحتواء الأضداد روابطاً كبريتية فإن التطوي الصحيح لها يتطلب بيئةً مؤكسدةً تؤمنها السيتوبلازما المحيطية periplasm أما البروتين المتألق الأخضر فيجري تطويه ضمن العصارة السيتوبلازمية cytosol [16]. وهذا ما يفسر قلة الدراسات المقدمة عن إنتاج أضداد مؤشبة مدمجة مع الـ (GFP) ضمن البكتيريا؛ إذ يكون مردود الأضداد المتألقة الفعالة قليلاً [17]-[19]، إلا في بعض الحالات الاستثنائية التي يتطوى فيها الضد بشكل صحيح في بيئة السيتوبلازما المرجعة دون تشكيل جسور كبريتية [20، 21]. لذلك يعد من المهم بمكان تحديد الشروط المثلى (من حرارة وتركيز IPTG isopropyl β -D-thiogalactoside) لإنتاج أضداد مدمجة مع الـ (GFP) بشكل فعال [22، 23]. كما تجدر الإشارة إلى أن دمج الأضداد مع البروتين المتألق الأخضر يسمح باستخدامها ضمن عدد من التقانات كقياس التدفق الخلوي Flow cytometry والتألق المناعي fluorescent immunoassay [17]، كما تمتاز بانعدام السمية الضوئية phototoxic على الخلايا الحية في أثناء الكشف بمجهر الفلورة على العكس من الوسم بجزيئات متألقة صغيرة كـ Fluorescein isothiocyanate، FITC، هذا ويمكن استغلال الانبعاثات الصادرة عن البروتين المتألق الأخضر لتشكيل مسابر علامة يتم من خلالها استهداف المستضدات السطحية للخلايا أو تتبع بعض المستضدات الممرضة [13، 14]. إضافة لما سبق نستطيع استغلال هذه الأضداد المدمجة في تقانة هامة وهي المقايسة المناعية المتألقة fluorescence-linked immunosorbent assay (FLISA) التي تمتاز بالاستغناء عن التفاعل الأنزيمي اللوني (الضد الثانوي والركيزة)، ما يوفر كثيراً من الوقت والجهد والمال، فضلاً عن امتلاكها حساسية عالية تصل إلى نحو 10⁻⁸ - 10⁻¹⁰ أضعاف حساسية المقايسة المناعية الأنزيمية التقليدية [24-26].

على الرغم من إنتاج عددٍ من الأضداد النانوية النوعية تجاه عوامل ممرضة مختلفة كالبكتيريا [8، 27] والفيروسات [28، 29] والطفيليات [30-32]، فإنّ الدراسات التي تناولت دمج الأضداد النانوية مع البروتين المتألق الأخضر قليلة. ونظرًا للأهمية الكبيرة التي تمتلكها هذه الأضداد المدمجة كان من المهم استغلال هذه الخصائص في كشف عدد من الأمراض المنتشرة في منطقتنا وتشخيصها، ويتصدرها داء الليشمانيات الذي يعد من أهم مشكلات الصحة العامة في سورية، ويعرف لهذا الداء ثلاثة أشكال سريرية، وهي: الشكل الجلدي، والشكل الجلدي المخاطي، بالإضافة للشكل الحشوي. ويعدّ الشكل الجلدي الأكثر انتشارًا في سورية، ويسببه بشكلٍ رئيس في الأونة الأخيرة طفيلي الليشمانيا المدارية. ويعدّ استخدام الأضداد في عزل مستضدات الليشمانيا وتنقيتها من أنجع الطرق المستعملة لكشف داء الليشمانيات وتشخيصه وكذلك علاجه؛ إذ طوّرت حديثاً آلية لتشخيص مستضدات الليشمانيا الحشوية في البول وكشفها باستخدام تقانة المقايسة المناعية الإنزيمية معتمدة على الأضداد النانوية بحساسية كشف عالية وصلت 15-45 بيكوغرام بالميلي [30]. في عمل سابق أنتجت أضداد نانوية لطفيلي الليشمانيا المدارية لديها القدرة على التعرف على أكثر من مستضد، كما يمكنها كشف كلا طوري الطفيلي (أمامي وداخلي السوط)، بالإضافة إلى قدرتها على تثبيط الإخماج في الزجاج (قيد النشر). ونظرًا للخصائص الهامة التي يضيفها دمج الأضداد بالبروتين المتألق الأخضر، هدف بحثنا إلى دمج الأضداد النانوية الموجهة لطفيلي الليشمانيا بالبروتين المتألق، وأمثلة شروط التعبير عنه، ودراسة إمكانية زيادة حساسية الكشف عن مستضدات الليشمانيا بهذه الأضداد مقارنة مع الأضداد النانوية غير المدمجة.

المواد والطرائق:

بناء البلاسميد **PMES4-Nb-GFP**:

صُخِّمَت جينة الأضداد النانوية للشمانيا المدارية (NbL105, 06, 14, 24 and 36) من البلاسميد PMES4-Nb بتقانة التفاعل السلسلي للبوليمراز PCR باستخدام مرئستين نوعيتين: pMES4-F (5'-TACCTATTGCCTACGGCAGC-3') و pMES4-R (5'-CGGACTACGGTTCCACTGTT-3').

هُضِمَ ناتج الـ (PCR) باستخدام أنزيمي التقييد (*PstI* / *BstEII*)، ثم رُبط مع البلاسميد *PMES4-GFP* المهضوم بأنزيمي التقييد السابقين نفسيهما بواسطة أنزيم الربط T4 DNA ligase (Invitrogen) ونسل في البكتريا *E. coli* WK6. وبذلك حصلنا على التركيب البلاسميدي *PMES4-Nb-GFP*. جرى التأكد من صحة الربط مع البلاسميد بإحدى طريقتين: إما بتفاعل (PCR) باستخدام مرئستين نوعيتين:

GFP R2 seq (5'- و pMES4-F (5'-TACCTATTGCCTACGGCAGC-3') أو عن طريق هضم كل من البلاسميد (*PstI* / *ECORI* أو *PstI* / *BstEII*) و *PMES4-GFP* و *PMES4-Nb-GFP* بأنزيمي التقييد والمقارنة بينهما.

التعبير عن الأضداد النانوية المدمجة مع البروتين المتألق **NbLTC-GFP** وتحديد مكان وجودها:

جرى التعبير عن مستعمرتين جرثوميتين لكلٍ من الأضداد النانوية المختلفة المدمجة مع البروتين المتألق الأخضر في صفحة تعبير تحوي 12 بئر عبر استنابات البكتيريا بحجم 1ملي ضمن وسط TB (1.2% tryptone، 2.4% yeast extracts، 0.8% glycerol، 17ملي مول KH_2PO_4 ، 72ملي مول K_2HPO_4). المزود بالغلوكوز 1% بالإضافة للأمبيسيلين 100

ميكروغرام/مل، وحضنها بدرجة حرارة 37 مئوية إلى أن تصل كثافتها الضوئية OD إلى حوالي 0.6-0.9، ثم تحريض التعبير البروتيني بإضافة IPTG (isopropyl β -D-thiogalactoside from Promega) واستمرار الحضانة لمدة 16 ساعة في درجة حرارة 22 مئوية. لمعرفة المكان الذي وجدت فيه هذه الأضداد استخلصت بروتينات البلازما المحيطة بطريقة الصدمة (الأسموزية) الحلولية باستخدام بفر TES وذلك بعد ترسيب الخلايا البكتيرية. أما لاستخلاص البروتينات الموجودة في الأجسام الضمنية تُعامل الرسابة باليوريا بتركيز 8 مول، وتُحضان مع الرج عند الدرجة 4 مئوية لمدة ساعتين، ومن ثم تُثقل ويُؤخذ الطافي للتنقية.

أمثلة شروط التعبير:

لتحديد الشروط المثلى للتعبير عن الأضداد النانوية المدمجة مع بروتين الفلورة اختير أحد هذه الأضداد NbLtc36 وعُبر عنه ضمن إرلينات حجمها 250 مل عبر استنبات البكتيريا في وسط TB المزود بالغلوكوز 1% بالإضافة للأمبيسلين 100 ميكروغرام/مل، وحُضِن بالدرجة 37 مئوية إلى أن وصلت الكثافة الضوئية إلى نحو 0.6-0.9 عند قراءتها بطول موجة 600 نانومتر. حُرِّض التعبير البروتيني عن جينات الأضداد النانوية بإضافة 0.1-0.5 ميلي مول من IPTG (isopropyl β -D-thiogalactoside from Promega) واستمرار الحضانة لمدة 16 ساعة في درجات حرارة مختلفة (10، 16، 22، 28 درجة مئوية).

تنقية الأضداد:

جرى التعبير عن الأضداد النانوية وفقاً للشروط المثلى المزودة بواسم سداسي الهستيدين الضروري من أجل مراحل التنقية بواسطة الكروماتوغرافيا السائلة السريعة عبر الأعمدة المشحونة بالنيكل. ومن أجل المحافظة على التطوي الصحيح للضد سُحبت اليوريا تدريجياً؛ إذ مرر الطافي على عمود تنقية من كرات السيفاروز المشحونة بجزيئات النيكل (بثلاثي نتريل حمض الخل (NTA)) سعته 5 مل (Qiagen) لمدة نصف ساعة مع الرج، وبعد ذلك

غُسل العمود بدارئة فوسفاتية تحوي تركيز متدرج من اليوريا (8، 6، 4، 2، 0 مول). شطفت البروتينات المرتبطة بتمرير دارئة الشطف (500 ميلي مول imidazole، 20 ميلي مول Tris-base، 300 ميلي مول NaCl)، ولتركيز الحلافة الناتجة استعملت أنابيب التركيز Vivaspin الخاصة بالبروتينات التي كتلتها أكبر من 10 كيلو دالتون (Vivascience)، ثم حدد تركيز الضد النقي باستعمال طريقة "برادفورد".

التبصيم المناعي النقطي Dotblot:

أضيف كل من بروتينات البلاسما المحيطة والأجسام الضمنية والبروتينات المنقاة لشروط التعبير المختلفة على ورق النتروسيللوز 0.45 ميكرومتر (BioRad) على شكل نقط. جرى تعبئة مواقع ارتباط البروتينات الشاغرة بدارئة التغطية حليب منزوع الدسم (x5) skimmed milk، وذلك ضمن دارئة TBS (20 ميلي مول Tris-base، 150 ميلي مول NaCl). كُشف عن وجود الضد النانوي المدمج مع البروتين المتألق الأخضر بأضداد الأرنب الموجهة لبروتين الفلورة R-a-GFP بتمديد 1:3000 وحضنت لمدة ساعة. لاحقًا كُشف عن أضداد الأرنب بأضداد الماعز الموسومة بأنزيم البيروكسيداز G-a-R-HRP بتمديد 1:3000. فُصلت مراحل العمل جميعها بغسل الغشاء ثلاث مرات بدارئة الغسل TBS-T (50 ميلي مول Tris-HCl، 150 ميلي مول NaCl، 0.05% tween-20) أظهرت النقط باستخدام ركيزة 3-amino-9-ethylcarbazole AEC في دارئة فوسفاتية بدرجة حموضة pH=5.

اختبار المقايسة المناعية الأنزيمية:

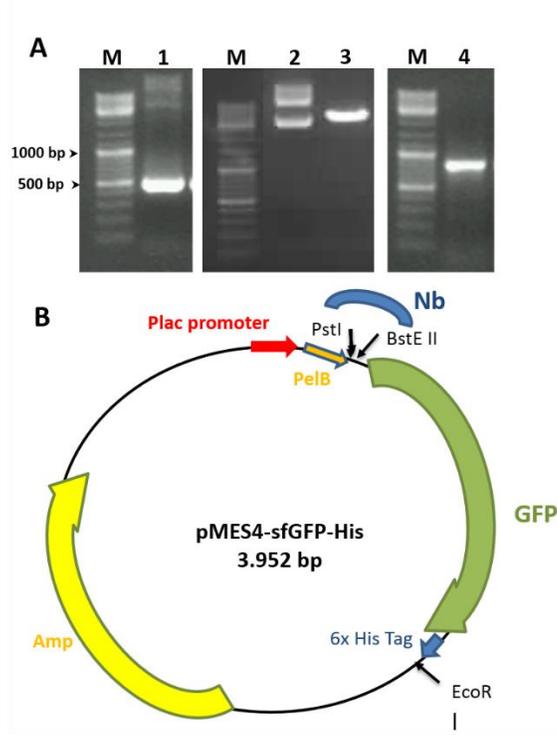
غُلقت آبار صفيحة (96 بئر (Maxisorb (Nunc)) ب 100 ميكرو لتر من بروتينات الليشمانيا المدارية بتركيز متدرج من (0، 1، 3، 10، 30، 100، 300، 1000) نانوغرام بالميلي) وذلك باستعمال محلول الكربونات، ومن ثم حضنت لليوم التالي عند درجة حرارة 4 مئوية. تمت تعبئة بقية مواقع ارتباط البروتينات بدارئة التغطية حليب منزوع الدسم (x5)

skimmed milk، وذلك ضمن دائرة (TBS) (20 ميلي مول Tris-base، 150 ميلي مول NaCl).. أضيف 25 ميكرو لتر من طافي معالجة (TES) و (UREA) أو 100 ميكرو لتر من الضدّ النانوي أو الضدّ النانوي المدمج مع البروتين المتألق الأخضر GFP بتمديد 1:500، وحضنت لمدة ساعة بحرارة الغرفة. كُثِفَ عن الضد النانوي باستخدام الأرنب الموجهة لذيل الهستدين R-a-His بتمديد 1:500، في حين كُثِفَ عن الضد النانوي المدمج مع البروتين المتألق الأخضر بأضداد الأرنب الموجهة لبروتين الفلورة R-a-GFP بتمديد 1:3000 وحضنت لمدة ساعة. لاحقاً كُثِفَ عن أضداد الأرنب بأضداد الماعز الموسومة بأنزيم البيروكسيداز G-a-RHP بتمديد 1:3000. فُصِلَت مراحل العمل جميعها بغسل الأبار ثلاث مرات بدائرة الغسل TBS-T (50 ميلي مول Tris-HCl، 150 ميلي مول NaCl، 0.05% tween-20). قيسَت الكثافة الضوئية عند طول موجة 450 نانومتر بعد ربع ساعة من إضافة ركازة رُباعيِّ ميثيل البنزيدين (TMB-Substrate) الخاصة بأنزيم (HRP).

النتائج:

بناء البلاسميد:

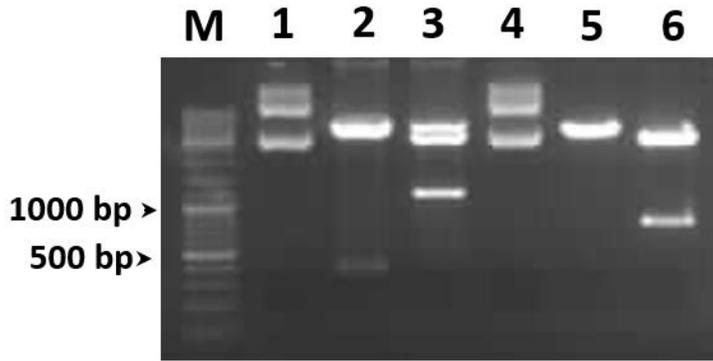
بداية ضُخِمَ جين الأضداد النانوية للشمانيا المدارية (NbL05, 06, 14, 24 and 36) من البلاسميد PMES4-Nb بتقانة التفاعل السلسلي للبوليمراز PCR باستخدام مرئستين نوعيتين pMES4 F/R فنتجت عصا ب طول 400 أساس آزوتي (الشكل 1A، العمود 1). هُضم ناتج الـ PCR باستخدام أنزيمي التقييد (*PstI* / *BstEII*) ثم رُبط مع البلاسميد *PMES4-GFP* (الشكل 1B) المهضوم ب أنزيمي التقييد السابقين نفسيهما (الشكل 1A العمود 2و3) ونسل في البكتريا *E.coli* WK6، وبذلك حصلنا على التركيب البلاسميدي (*PMES4-Nb-GFP*).



الشكل 1: بناء البلاسميد PMES4-Nb-GFP

(A): هلامة أغاروز تظهر مراحل بناء البلاسميد PMES4-Nb-GFP. (1) يمثل تضخيم جين ضد النانوي من البلاسميد PMES4-Nb باستخدام المرئستين pMES4 F/R، (2) البلاسميد PMES4-GFP المغلق، (3) هضم البلاسميد بأنزيمي التقييد *PstI* / *BstEII*، (4) يمثل التأكد من صحة البلاسميد الناتج PMES4-Nb-GFP بتفاعل (PCR) باستخدام المرئستين pMES4-F/ GFP R2 seq. (B): بنية البلاسميد PMES4-GFP.

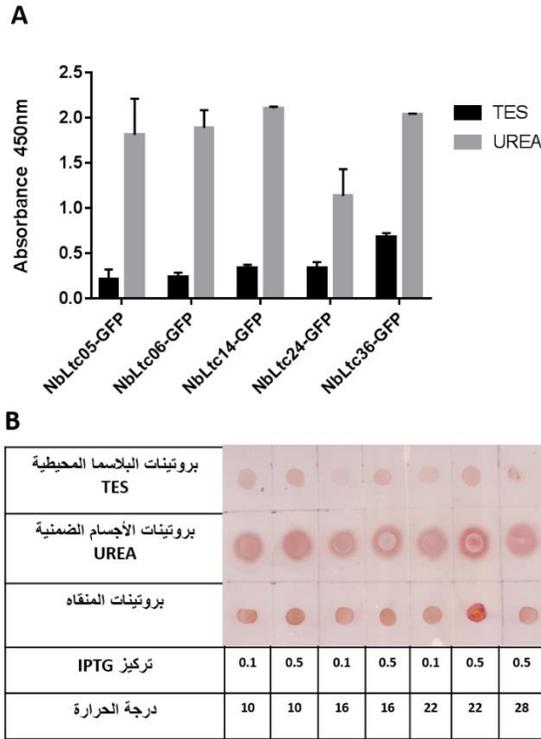
جرى التأكد من صحة البنية البلاسميدية بإحدى طريقتين: إما بتفاعل (PCR) باستخدام مرئستين نوعيتين pMES4-F/ GFP R2 seq فظهرت عصابة بطول 700 أساس آزوتي (الشكل 1A، العمود 4)، أو عن طريق هضم كل من البلاسميدين PMES4-Nb-GFP و PMES4-GFP بأنزيمات التقييد؛ فعند هضم البلاسميد PMES4-Nb-GFP بأنزيمي التقييد (*PstI* / *BstEII*) تظهر عصابة بطول 400 أساس آزوتي الممثلة للضد النانوي، في حين أن هضمه بأنزيمي التقييد *PstI* / *ECORI* ظهرت عصابة بطول 1000 أساس آزوتي الممثلة لجين البروتين المتألق الأخضر مع جين الضد النانوي. أما هضم البلاسميد PMES4-GFP بأنزيمي التقييد (*PstI* / *BstEII*) يظهر البلاسميد بشكله المفتوح فقط، في حين أن هضمه بأنزيمي التقييد *PstI* / *ECORI* ظهرت عصابة بطول 700 أساس آزوتي الممثلة لجينة البروتين المتألق الأخضر (الشكل: 2).



الشكل 2: التأكد من صحة بناء البلاسميد PMES4-Nb-GFP

(A): هلامة أغاروز تظهر هضم كل من البلاسميدين PMES4-GFP و PMES4-Nb-GFP بأنزيمي التقييد (*PstI* / *BstEII* أو *PstI* / *ECORI*). (1) يمثل البلاسميد PMES4-Nb-GFP المغلق، (2) هضم البلاسميد بأنزيمي التقييد *PstI* / *BstEII*، (3) هضم البلاسميد بأنزيمي التقييد

PstI / *ECORI*، (4) يمثل البلاسميد PMES4-GFP المغلق، (5) هضم البلاسميد بأنزيمي التقويد *PstI* / *BstEII*، (6) هضم البلاسميد بأنزيمي التقويد *PstI* / *ECORI*.
تحديد مكان وجود الأضداد النانوية المدمجة والشروط المثلى للتعبير عنها:
جرى التعبير عن الأضداد النانوية المختلفة المدمجة مع البروتين المتألق الأخضر، وكُشف عن تشكل هذه الأضداد النانوية في كلٍ من بروتينات البلاسما المحيطية والأجسام الضمنية بتقانة المقايسة المناعية الأنزيمية، فتبين وجود الأضداد في الأجسام الضمنية وليس في السيتوبلازما المحيطية، وكان الضد (NbLTC24-GFP) هو الأقل مردودًا (الشكل: 3A).
ولتحديد الشروط المثلى للتعبير عن هذه الأضداد حُرِّض التعبير البروتيني باستخدام تركيزين مختلفين من (IPTG) (0.1 أو 0.5 ميلي مول) والحضن عند درجات حرارة مختلفة (10، 16، 22، 28 درجة مئوية). كُشف عن تشكل الأضداد النانوية المدمجة مع بروتين المتألق الأخضر في كلٍ من بروتينات البلاسما المحيطية والأجسام الضمنية والبروتينات المنقاة لشروط التعبير المختلفة بتقانة التبصيم المناعي Dotblot باستخدام أضداد موجهة لبروتين المتألق الأخضر. أعطى استخدام التركيز 0.5 ميلي مول من IPTG نقطاً بشدة لونية أعلى من تركيز 0.1 ميلي مول بدرجات الحرارة المختلفة، في حين أعطت درجة الحرارة 22 مئوية أفضل شدة لونية (الشكل 3B).



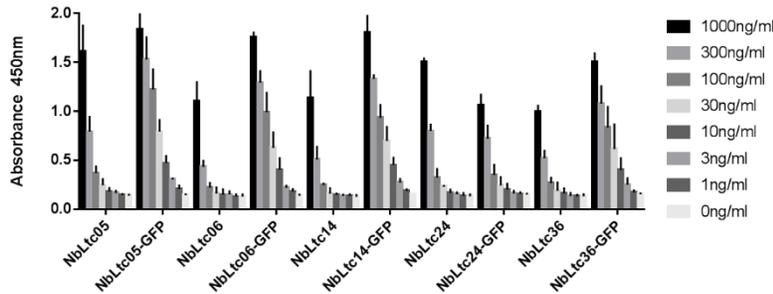
الشكل 3: التعبير عن الأضداد النانوية المدمجة مع البروتين المتألق الأخضر

(A): تحدد المقايسة المناعية الأنزيمية مكان وجود الأضداد النانوية المدمجة مع البروتين المتألق الأخضر في السيتوبلازما المحيطة أو الأجسام الضمنية. استخدم 25 ميكرو لتر من طافي (TES) وطافي (UREA) وكشف باستخدام أضداد موجهة ضد البروتين المتألق الأخضر. (B): تبصيم مناعي (Dotblot) لكل من بروتينات البلازما المحيطة والأجسام الضمنية والبروتينات المنقاه لشروط التعبير المختلفة (تركيز مختلفة من IPTG ومن درجات

حرارة) استخدم 10 ميكرو لتر من طافي (TES) وطافي (UREA) و2 ميكرو من البروتينات المنقاه وكشف باستخدام أضداد موجه لبروتين المتألق الأخضر.

المقايسة المناعية الأنزيمية:

اختبر مدى حساسية الأضداد النانوية المدمجة مع البروتين المتألق الأخضر على الكشف عن مستضدات الليشمانيا مقارنة مع الأضداد النانوية غير المدمجة بتقانة المقايسة المناعية وذلك من خلال الكشف عن تراكيز متدرجة من مستضدات الليشمانيا. تبين أن الأضداد النانوية غير المدمجة تتعرف على مستضدات الليشمانيا بتركيز بين 300-100 نانوغرام بالميلي، في حين أن حساسية الأضداد النانوية المدمجة مع البروتين المتألق الأخضر قد ارتفعت؛ فأصبحت حساسة لتركيز 30 نانو غرام بالميلي ماعدا الضدّ النانوي NbLTC24 الذي لم يبدّ فرقاً سواء كان مدمجاً مع GFP أم غير مدمج (الشكل 4).



(الشكل: 4): مقارنة بين حساسية الأضداد النانوية الموجهة ضد للشمانيا والمدمجة مع (GFP) مع غير المدمجة.

المقايسة المناعية الأنزيمية لاختبار مدى حساسية الأضداد النانوية المدمجة مع (GFP) مقارنة مع غير المدمجة. استخدمت تراكيز متدرجة من مستضدات الليشمانيا، وأضيف الضدّ

النانوي المدمج وغير المدمج بتمديد 1:500. كُثِفَ عن الضد النانوي باستخدام أضداد الأرنب الموجهة لذيل الهستدين (R-a-His)، في حين كُثِفَ عن الضد النانوي المدمج مع البروتين المتألق الأخضر بأضداد الأرنب الموجهة لبروتين المتألق (R-a-GFP).

المناقشة:

يعدّ بروتين المتألق الأخضر من أكثر الواسمات المتألفة استخداماً؛ إذ يمكن الاستفادة منه بوصفه بروتين علام لعدد من الغايات سواء كان ذلك في الزجاج أم في الكائن الحي؛ فهو لا يحتاج إلى وجود عامل مساعد لانبعثات الفلورة كالليسيفرز Luciferase [33]، بالإضافة إلى تمتعه بقابلية طي عالية وثباتية حرارية وكيميائية كذلك مقاومته لعدد من عوامل التمسح [34]. حفزت هذه المواصفات عدداً من الباحثين على دمج الأضداد مع البروتين المتألق الأخضر نظراً لما يضيفه هذا الدمج من إمكانية تتبع مستضدات ممرضة أو الاستخدام بتقانات التدفق الخلوي والفلورة المناعية والمقايسة المناعية المتألفة [13، 14، 24-26]. جرى في عملٍ سابقٍ إنتاج أضداد نانوية نوعية تجاه طفيلي الليشمانيا المدارية لديها القدرة على التعرف على مستضدات طوري الطفيلي (أمامي وداخلي السوط)، بالإضافة إلى قدرتها على تثبيط الإخماج في الزجاج (قيد النشر). قمنا في هذا العمل بتضخيم جينة الأضداد النانوية لليشمانيا المدارية (NbLt05, 06, 14, 24 and 36) من البلاسميد PMES4-Nb وإعادة تنسيقها في البلاسميد *PMES4-GFP* وبذلك حصلنا على التركيب البلاسميدي *PMES4-Nb-GFP*. وجرى التأكد من صحة التركيب البلاسميدي بطريقتين بتفاعل (PCR) وعن طريق هضم كل من البلاسميدين (*PMES4-Nb-GFP*) و(*PMES4-GFP*) بأنزيمات التقييد. جرى، لاحقاً، التعبير عن الأضداد النانوية المدمجة مع البروتين المتألق الأخضر، ولوحظ تراكم الأضداد المنتجة في الأجسام الضمنية؛ إذ من المعروف أن التطوي الصحيح للبروتين المتألق الأخضر يتم عادة في العصارة السيتوبلاسمية [16] ولا يتشكل هذا البروتين

إذا عُبر عنه في السيتوبلازما المحيطة [18]، أما التطوي الصحيح للضد يتم في بيئة مؤكسدة تؤمنها السيتوبلازما المحيطة. يؤدي التعبير عن الأضداد المؤشبة المدمجة مع بروتين (GFP) في السيتوبلازما إلى تراكمها داخل الأجسام الضمنية inclusion bodies نتيجة للخلل في تطوي هذه الأضداد، الأمر الذي يمكن تداركه عن طريق إعادة التطوي [35، 36]، في حين أشارت دراسات أخرى أنه من الممكن أن يتطوى الضد بشكل صحيح في بيئة السيتوبلازما المرجعة حتى من دون تشكل الروابط الكبريتية [20، 21] وعليه نظراً لتراكم الأضداد المدمجة مع البروتين المتألق الأخضر في الأجسام الضمنية جرى معاملتها بتركيز عالٍ من اليوريا 8 مول ولحفاظ على التطوي الصحيح للأضداد سُحبت اليوريا تدريجياً. أشار عدد من الدراسات إلى أهمية تحديد العوامل المؤثرة في التعبير عن البروتينات المدمجة مع البروتين المتألق [22، 23]. لذلك اختبرت شروط مختلفة للتعبير عن الأضداد النانوية المدمجة مع بروتين الفلورة من درجات حرارة وتركيز (IPTG)؛ وكُثِفَ عن هذه الأضداد بتقانة التبصيم المناعي النقطي (Dot blot)، فتبين أن التركيز 0.5 ميلي مول من (IPTG) يعطي نقطاً بشدة لونية أعلى من تركيز 0.1 ميلي مول بدرجات الحرارة المختلفة على العكس من دراسة "Wang" وزملائه التي أوضحت أن التركيز المنخفض من (IPTG) 0.1 ميلي مول هو الأفضل [22]؛ في حين بينت دراسة أخرى أنه لا علاقة لتركيز (IPTG) في التعبير عن البروتين المدمج مع (GFP)، في حين كانت درجة الحرارة هي العامل الرئيس في التعبير [23]. كما بينت دراسة أخرى أن درجة الحرارة 18 مئوية تعد الدرجة المثالية للتعبير عن بروتين مدمج مع بروتين (GFP)، وأن الارتفاع في درجة حرارة الحضانة أثناء تحريض التعبير البروتيني يترافق مع انخفاض في التطوير الصحيح للبروتين المدمج [23]. بينت دراستنا أن درجة الحرارة 22 مئوية هي الفضلى في التعبير عن الأضداد النانوية المدمجة مع بروتين (GFP)، وأظهرت دراسة أخرى أن درجة الحرارة 20 مئوية هي

الأنسب للتعبير، وهي قيمة متقاربة مع دراستنا، بالإضافة إلى إمكانية الحصول على النتيجة نفسها عند استخدام درجة الحرارة 16 أو 18 مئوية لفترة زمنية أطول [22].

أنتجت لاحقاً الأضداد النانوية مدمجة مع البروتين المتألق الأخضر وفقاً لشروط التعبير المثلى التي حدّدت، ومن ثم اختبرت حساسية هذه الأضداد في الكشف عن تراكيز متناقصة من مستضدات الليشمانيا مقارنة مع الأضداد النانوية غير المدمجة بتقانة المقايسة المناعية الأنزيمية؛ فتبين ارتفاع حساسية الأضداد النانوية المدمجة مع البروتين المتألق وصولاً لتركيز 30 نانو غرام بالميلي، وربما يعود السبب في ذلك إلى كون البروتين المتألق الأخضر كبير نسبياً، ما يحفز تشكّل طيف واسع من الأضداد تجاه معينات مستضدية مختلفة، ما ينعكس على تضخيم أكبر للإشارة مقارنة مع الأضداد الموجهة لواسمة الهيستدين الصغيرة نسبياً. بالمقابل لم يلاحظ وجود اختلاف يذكر بين الضد النانوي NbLTC24 سواء كان مدمجاً مع (GFP) أم غير مدمج، وربما يعود السبب في ذلك لاحتواء هذا الضد على رابطتين كبريتيتين على خلاف باقي الأضداد التي تحتوي على رابطة كبريتية واحدة؛ إذ يعد من الصعب تشكيل رابطتين كبريتيتين في بيئة السيتوبلازما المرجعة مقارنة مع تشكيل رابطة واحدة. تعتمد حديثاً أغلب الدراسات التي تستخدم أضداد مدمجة مع البروتين المتألق الأخضر طريقة الكشف بالمقايسة المناعية المتألقة التي توفر الوقت والمال والأهم من ذلك تؤمن حساسية أفضل تصل إلى نحو من 8-10 أضعاف المقايسة المناعية الأنزيمية [24-26]، وبالنتيجة أظهرت هذه الدراسة بوضوح أن الأضداد المدمجة المحضرة في دراستنا قد أعطت حساسية أكبر من غير المدمجة باستخدام المقايسة المناعية الأنزيمية التقليدية، ومن المتوقع أن ترتفع الحساسية باستخدام المقايسة المناعية المتألقة التي تعتمد على قراءة الانبعاث الصادر عن بروتين (GFP).

المراجع

1. Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, Bendahman N, Hamers R: Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 1993, 363(6428):446-448.
2. Frenken LG, van der Linden RH, Hermans PW, Bos JW, Ruuls RC ,de Geus B, Verrips CT: Isolation of antigen specific llama VHH antibody fragments and their high level secretion by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of biotechnology* 2000, 78(1):11-21.
3. Harmsen MM, De Haard HJ: Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Applied microbiology and biotechnology* 2007, 77(1):13-22.
4. Wesolowski J, Alzogaray V, Reyelt J, Unger M, Juarez K, Urrutia M, Cauerhff A, Danquah W, Rissiek B, Scheuplein F *et al*: Single domain antibodies :promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Medical microbiology and immunology* 2009, 198(3):157-174.
5. Muyldermans S: Single domain camel antibodies: current status. *Journal of biotechnology* 2001, 74(4):277-302.
6. Cortez-Retamozo V, Lauwereys M, Hassanzadeh Gh G, Gobert M, Conrath K, Muyldermans S, De Baetselier P, Revets H: Efficient tumor targeting by single-domain antibody fragments of camels. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2002, 98(3):456-462-
7. Dumoulin M, Last AM, Desmyter A, Decanniere K, Canet D, Larsson G, Spencer A, Archer DB, Sasse J, Muyldermans S *et al*: A camelid antibody

- fragment inhibits the formation of amyloid fibrils by human lysozyme. *Nature* 2003, 424(6950):783-788.
- 8 .Conrath KE, Lauwereys M, Galleni M, Matagne A, Frere JM, Kinne J, Wyns L, Muyldermans S: Beta-lactamase inhibitors derived from single-domain antibody fragments elicited in the camelidae. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2001, 45(10):2807-2812.
 - 9 .Harmsen MM, Van Solt CB, Fijten HP, Van Setten MC: Prolonged in vivo residence times of llama single-domain antibody fragments in pigs by binding to porcine immunoglobulins. *Vaccine* 2005, 23(41):4926-4934.
 - 10 .Coppieters K, Dreier T, Silence K, de Haard H, Lauwereys M, Casteels P, Beirnaert E, Jonckheere H, Van de Wiele C, Staelens L *et al*: Formatted anti-tumor necrosis factor alpha VHH proteins derived from camelids show superior potency and targeting to inflamed joints in a murine model of collagen-induced arthritis. *Arthritis and rheumatism* 2006, 54(6):1856-1866.
 - 11 .Roovers RC, Laeremans T, Huang L, De Taeye S, Verkleij AJ, Revets H, de Haard HJ, van Bergen en Henegouwen PM: Efficient inhibition of EGFR signaling and of tumour growth by antagonistic anti-EFGR Nanobodies. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 2007, 56(3):303-317.
 - 12 .Els Conrath K, Lauwereys M, Wyns L, Muyldermans S: Camel single-domain antibodies as modular building units in bispecific and bivalent antibody constructs. *The Journal of biological chemistry* 2001, 276(10):7346-7350.
 - 13 .Rothbauer U, Zolghadr K, Tillib S, Nowak D, Schermelleh L, Gahl A, Backmann N, Conrath K, Muyldermans S, Cardoso MC *et al*: Targeting

- and tracing antigens in live cells with fluorescent nanobodies. *Nature methods* 2006, 3(11):887-889.
- 14 . Olichon A, Surrey T: Selection of genetically encoded fluorescent single domain antibodies engineered for efficient expression in Escherichia coli. *The Journal of biological chemistry* 2007, 282(50):36314-36320.
 - 15 . Luria Y, Raichlin D, Benhar I: Fluorescent IgG fusion proteins made in E. coli. *mAbs* 2012, 4(3):373-384.
 - 16 . Feilmeier BJ, Iseminger G, Schroeder D, Webber H, Phillips GJ: Green fluorescent protein functions as a reporter for protein localization in Escherichia coli. *Journal of bacteriology* 2000, 182(14):4068-4076.
 - 17 . Casey JL, Coley AM, Tilley LM, Foley M: Green fluorescent antibodies: novel in vitro tools. *Protein engineering* 2000, 13(6):445-452.
 - 18 . Schwalbach G, Sibler AP, Choulier L, Deryckere F, Weiss E: Production of fluorescent single-chain antibody fragments in Escherichia coli. *Protein expression and purification* 2000, 18(2):121-132.
 - 19 . Griep RA, van Twisk C, van der Wolf JM, Schots A: Fluobodies: green fluorescent single-chain Fv fusion proteins. *Journal of immunological methods* 1999, 230(1-2):121-130.
 - 20 . Tavladoraki P, Girotti A, Donini M, Arias FJ, Mancini C, Morea V, Chiaraluce R, Consalvi V, Benvenuto E: A single-chain antibody fragment is functionally expressed in the cytoplasm of both Escherichia coli and transgenic plants. *Eur J Biochem* 1999, 262(2):617-624.

- 21 . Worn A, Pluckthun A: An intrinsically stable antibody scFv fragment can tolerate the loss of both disulfide bonds and fold correctly. *FEBS letters* 1998, 427(3):357-361.
- 22 . Wang L, Quan C ,Liu B, Xu Y, Zhao P, Xiong W, Fan S: Green fluorescent protein (GFP)-based overexpression screening and characterization of AgrC, a Receptor protein of quorum sensing in *Staphylococcus aureus*. *International journal of molecular sciences* 2013, 14(9):1847.18487-0
- 23 . Wang Z, Xiang Q, Wang G, Wang H, Zhang Y: Optimizing expression and purification of an ATP-binding gene *gsiA* from *Escherichia coli* k-12 by using GFP fusion. *Genetics and molecular biology* 2011, 34(4):661-668.
- 24 . Sakamoto S, Tanizaki Y, Pongkitwitoon B, Tanaka H, Morimoto S: A chimera of green fluorescent protein with single chain variable fragment antibody against ginsenosides for fluorescence-linked immunosorbent assay. *Protein expression and purification* 2011, 77(1):124-130.
- 25 . Sakamoto S ,Pongkitwitoon B, Sasaki-Tabata K, Putalun W, Maenaka K, Tanaka H, Morimoto S: A fluorescent single domain antibody against plumbagin expressed in silkworm larvae for fluorescence-linked immunosorbent assay (FLISA). *The Analyst* 2011, 136(10):2056-2063.
- 26 . Oelschlaeger P, Srikant-Iyer S, Lange S, Schmitt J, Schmid RD: Fluorophor-linked immunosorbent assay: a time- and cost-saving method for the characterization of antibody fragments using a fusion protein of a single-chain antibody fragment and enhanced green fluorescent protein. *Analytical biochemistry* 2002, 309(1):27-34.

- 27 .Szynol A, de Soet JJ, Sieben-van Tuyl E, Bos JW, Frenken LG: Bactericidal effects of a fusion protein of llama heavy-chain antibodies coupled to glucose oxidase on oral bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2004, 48(9):3390-3395.
- 28 .Garaicoechea L, Olichon A, Marcoppido G, Wigdorovitz A, Mozgovoij M, Saif L, Surrey T, Parreno V: Llama-derived single-chain antibody fragments directed to rotavirus VP6 protein possess broad neutralizing activity in vitro and confer protection against diarrhea in mice. *Journal of virology* 2008, 82(19):9753-9764.
- 29 .Serruys B, Van Houtte F, Verbrugge P, Leroux-Roels G, Vanlandschoot P: Llama-derived single-domain intrabodies inhibit secretion of hepatitis B virions in mice. *Hepatology* 2009, 49(1):39-49.
- 30 .Abeijon C, Dilo J, Tremblay JM, Viana AG, Bueno LL, Carvalho SFG, Fujiwara RT, Shoemaker CB, Campos-Neto A: Use of VHH antibodies for the development of antigen detection test for visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol* 2018:e12584.
- 31 .Baral TN, Magez S, Stijlemans B, Conrath K, Vanhollebeke B, Pays E, Muyldermans S, De Baetselier P: Experimental therapy of African trypanosomiasis with a nanobody-conjugated human trypanolytic factor. *Nature medicine* 2006, 12(5):580-584.
- 32 .Stijlemans B, Conrath K, Cortez-Retamozo V, Van Xong H, Wyns L, Senter P, Revets H, De Baetselier P, Muyldermans S, Magez S: Efficient targeting of conserved cryptic epitopes of infectious agents by single domain antibodies. African trypanosomes as paradigm. *The Journal of biological chemistry* 2004, 279(2):1256-1261.

- 33 .Limon A, Briones J, Puig T, Carmona M, Fornas O, Cancelas JA, Nadal M, Garcia J, Rueda F, Barquinero J: High-titer retroviral vectors containing the enhanced green fluorescent protein gene for efficient expression in hematopoietic cells. *Blood* 1997, 90(9):3316-3321.
- 34 .Fisher AC, DeLisa MP: Laboratory Evolution of Fast-Folding Green Fluorescent Protein Using Secretory Pathway Quality Control. *PLoS One* 2008, 3(6):e2351(2351-2357).
- 35 .Sanchez L, Ayala M, Freyre F, Pedroso I, Bell H, Falcon V, Gavilondo JV: High cytoplasmic expression in E. coli, purification, and in vitro refolding of a single chain Fv antibody fragment against the hepatitis B surface antigen. *Journal of biotechnology* 1999, 72(1-2):13-20.
- 36 .Buchner J, Pastan I, Brinkmann U: A method for increasing the yield of properly folded recombinant fusion proteins: single-chain i Division of Molecular Biomedicine, Department of Molecular Biology and Biotechnology, Damascus, Syria. Immunotoxins from renaturation of bacterial inclusion bodies. *Analytical biochemistry* 1992, 205(2):263-270.