إنتاج وكشف الأنكسين 5 البشري المؤشب باستخدام أضداده النوعية المتعددة النسيلة المنتجة في الأرنب

آية الطوير* **د. عصام قاسم****

د. عبد القادر عبادي***

الملخص

الأنكسين 5، بروتين يبلغ وزنه الجزيئي 35 كيلو دالتون، يرتبط بشوارد الكالسيوم ويمتاز بألفته العالية للفوسفاتيديل سيرين أحد الشحوم الفوسفورية المكونة للغشاء الخلوي. بالإضافة لكونه واسماً مهماً لعملية الموت الخلوي المبرمج، تبين أن بروتين الأنكسين 5 ذو صلة بالعديد من التغيرات الخلوية والفيزيولوجية ويتواجد في أمصال العديد من المرضى. تعد الأضداد أداة مهمة في أبحاث التقانة الحيوية والتطبيقات الطبية العلاجية والتشخيصية. تستهدف الأضداد متعددة النسيلة عدة محددات مستضدية (Epitops) من المستضد (Antigen). في هذا العمل، تم تحضير بروتين الأنكسين 5 المؤشب وذلك بالتعبير عنه في الإشريكية القولونية (*E.coli*)، وتنقيته من سيتوبلازما هذه البكتريا باستعمال طريقة كروماتوغرافيا الألفة السائلة المعدنية. تم تمنيع الأرنب بالأنكسين 5 النقي المحضر في مُسَاعِد فروند وذلك بهدف الحصول على أضداده النوعية المتعددة النسيلة. تم تقييم الاستجابة المناعية

* طالبة دكتوراه، قسم علم الحياة الحيوانية، كلية العلوم، جامعة دمشق.

** أستاذ دكتور، قسم علم الحياة الحيوانية، كلية العلوم، جامعة دمشق.

*** مدير بحوث، قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية، هيئة الطاقة الذرية السورية.

للأرنب الممنَع ومعايرة الغلوبوليينات المناعية من الصف G. نُقيت الأضداد من مصل الأرنب باستخدام عمود البروتين A. أظهرت النتائج قدرة هذه الأضداد النوعية المتعددة النسيلة المحضرة في الأرنب على الكشف عن الأنكسين 5 في اختباري المقايسة المناعية الأنزيمية والتبصيم المناعي. كما تمكنت هذه الأضداد من التقاط الأنكسين 5 ومن ثَمَّ يمكن توظيفها كبديل عن الضدّ التجاري في تحديد تركيز الأنكسين 5 في العينة المدروسة ومن الممكن وسم هذه الأضداد في المستقبل بغية تحديد موقع الأنكسين 5 في النسيج الحي.

الكلمات المفتاحية: الأنكسين 5، التعبير البروتيني، الأرنب، الأضداد متعددة النسيلة.

Detection of human Annexin V using anti-Annexin V polyclonal antibodies produced in rabbit

Aya Twair* **Dr. Issam Kassem****

Dr. Abdul Qader Abbady***

Abstract

Annexin -V (ANXV), a 35- kDa protein, binds with high affinity to phosphatidylserine (PS) in the presence of calcium ions. It has been considered as sensitive and specific probe to mark apoptosis. ANXV correlates to several cellular and physiological processes and is found in serums of many patients. Antibodies are essential tools of biomedical and biochemical researches. Polyclonal antibodies are produced against different epitopes of antigens. In this work, soluble recombinant human ANXV was produced in *Escherichia coli*. ANXV was then purified by FPLC. The specific polyclonal antibody was produced in a rabbit after immunization with highly pure recombinant ANXV. The immune response was then evaluated and rabbit IgG were tittered. Antibody purification, using protein A sepharose affinity chromatography column,

* PhD student, department of Animal Biology, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria.

** Doctor of philosophy, department of Animal Biology, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria.

*** Research Director, department of Molecular Biology and Biotechnology, Atomic Energy Commission of Syria (AECS), Damascus, Syria.

was performed to obtain reactive and pure anti−ANXV IgG. The potency and specificity of the purified IgG were examined by ELISA and immunoblotting. Anti− ANXV antibodies have interesting potentials, in the detection and measurement of ANXV and could be used as alternative to the commercial one. Further conjugation of Anti− ANXV antibodies would be useful for *in vivo* studies.

Keywords: Annexin V, protein expression, rabbit, polyclonal antibodies.

المقدمة:

تمتلك الفقاريات عائلة من البروتينات تدعى الأنكسينات تضم 12 نوعاً معروفاً هي (Annexins A1- 11 + A13) حيث بدأ تعرُّفُها في أواخر السبعينات والثمانينات [14؛ 19]. هذه البروتينات ترتبط شارديا بشكل خاص مع الشحوم الفوسفورية الموجودة في الأغشية السيتوبلازمية ومن ضمنها الفوسفاتيديل سيرين بوجود شوارد الكالسيوم [31 ;17]. يعد الأنكسين 5 اختصاراً (ANXV) واحداً من عائلة الأنكسينات ،وهو بروتين وزنه الجزيئي 35 كيلو دالتون وُصِف لأول مرة من قِبَلِ العالم Reutelingsperger ورفاقه باعتباره البروتين المضاد للتخثر [24]. يشتهر الأنكسين 5 أنه أداة عالمية للكشف عن الموت الخلوي المبرمج، فمن المعروف أن الخلية المتماوتة تخضع لعديد من التغيرات الظاهرية والحيوية الكيميائية المميزة ،أهمها تغير تموضع الفوسفاتيديل سيرين، وهو أحد الشحوم الفوسفورية المؤلفة للغشاء الخلوي، ليصبح على السطح الخارجي للغشاء الخلوي [18؛ 31] وهنا يرتبط بروتين الأنكسين 5 خارج الخلوي بالفوسفاتيديل سيرين وذلك بصورة نوعية وبألفة تتراوح بين 0.5–7 نانو مولار [16]. هذا الارتباط النوعي يمكننا من خلاله الكشف عن الموت الخلوي المبرمج (Apoptosis) [11].

يمتلك الأنكسين 5 عدة تسميات منها: lipocortin-V و calphobindin I و endonexin II [22]. يتوافر بكثرة في جسم الإنسان والحيوان والنبات وهو مهم في مختلف العمليات الخلوية والفيزيولوجية،مثل نقل الإشارات الخلوية،والالتهابات، والنمو، والتمايز. كما يرتبط الأنكسين 5 مع العديد من الأمراض مثل أمراض السكري واضطرابات أخرى [12] وقد يعد واسماً أساسياً لمرض الزهايمر ولعدة أنواع من السرطان [22؛ 27]. غالباً ما يعد الأنكسين 5 بروتيناً داخل خلوي وذلك نظراً لعدم وجود تسلسل الإفراز في حمضه النووي الريبي الرسول (mRNA). على أية حال، فقد ثبت خروجه وتواجده في الفراغ خارج الخلوي، وذلك من خلال سُبُل نقل

الإشارة الإفرازية غير التقليدية. هذا وإن فَهْمَ الأهمية البيولوجية لبروتين الأنكسين 5 الخارج خلوي له أهمية قصوى [30]. إضافة لذلك، فقد ثبت وجود أضداد مناعة ذاتية تجاه الأنكسينات بما في ذلك الأنكسين 5 في مصل وسوائل جسم العديد من المرضى، في حين يبقى دور هذه الأضداد وارتباطاتها موقع جدل [15]. لذا يعد التحري عنه وتصميم طرائق للكشف عن وجوده أو عن أضداد المناعة الذاتية النوعية له مجالاً بحثياً مهماً.

من المعروف استخدام الغلوبولينات المناعية على نطاق واسع في التطبيقات التشخيصية والعلاجية [7;26]، وكذلك في الأبحاث الحيوية الكيميائية والبيولوجية حيث تستخدم كأدوات للوسم أو التثبيت في عدد من طرائق الكشف الكمي أو النوعي عن الجزيئات مثل طريقة المقايسة المناعية الأنزيمية، الانتشار المضاعف والتبصيم المناعي [10 ;8 6]. لذا هدفت هذه الدراسة إلى إنتاج أضداد متعددة النسيلة نوعية لبروتين الأنكسين 5. إن توفر الأضداد النوعية للأنكسين 5 سيفيد في تطوير أطقم تشخيصية للكشف عن وجود البروتين في العينات الحيوية والخلوية، بالإضافة لإمكانية توظيفها في تنقية بروتين الأنكسين 5 المؤشب الخالي من الواسمات، المستخدم في التشخيص وذلك باستخدام الأضداد المحضرة كربائط لتحضير أعمدة الألفة المناعية [25].

مواد البحث وطرائقه:

بروتين الأنكسين 5 المؤشب:

تم تحضير بروتين الأنكسين 5 المؤشب بشكله المنحل وفقاً للطريقة المذكورة في الدراسة [32]. حيث تم تحوير سلالة الإشريكية القولونية *E.* coli BL21 (DE3) الخاصة بالتعبير البروتيني باستخدام البنية البلازميدية الحاوية على مورثة الأنكسين 5 البشري (pRSET-ANXV). تم تحريض التعبير البروتيني عن الأنكسين 5 عبر إضافة مركب IPTG (IsoPropel β-D-ThioGalactoside, Promega) إلى وسط الزرع بتركيز 0.3mM، وبعد مراحل التعبير البروتيني، تمت تنقية البروتين باستخدام

أعمدة النيكل (Ni-NTA Agarose; Qiagen) التي لها القدرة على التقاط البروتين المؤشب من خلال واسم سداسي الهيستيدين (6X His). بعد مراحل مستفيضة من الغسل لأعمدة النيكل بالموقي (16.2mM Na2HPO4, 3.8mM NaHPO4, 500mM NaCl, 20mM Imidazol pH:7.4)، تم تحرير البروتين النقي من العمود عن طريق تمرير الموقي السابق نفسه، ولكن بوجود تركيز عالٍ من الإيميدازول (500mM)، تم إدارة عملية التنقية تلك من خلال نظام الكروموتوغرافيا الآلي (GE Healthcare) AKTA prime، أخيراً تم تخزين البروتين النقي بتركيز (1 ملغ/مل) ضمن الغليسرول في درجة حرارة 20- °م لحين استخدامه.

زراعة الخلايا وتحضير حلالة محتواها البروتيني:

استنبتت الخطوط الخلوية السرطانية البشرية (HEK 293T, A549, CaCO2, U937, HeLa) المستوردة من شركة ATCC® في وسط الزراعة RPMI−1640 والحاوي على 10% من المصل البقري الجنيني (FBS)، 50 وحدة/مل من الصادات الحيوية بنسيلين−ستريبتومايسين، و2 ميلي مول من الغلوتامين. نُميت الخلايا بدرجة حرارة 37 °م وبوجود 5% من غاز ثاني أكسيد الكربون CO2. كانت جميع المواد المستخدمة في الزراعات الخلوية مستوردة من شركة Sigma. تم استخدام موقي حل الخلايا (TNN buffer: 50 mM Tris–HCl pH 8.0, 250 mM NaCl, 0.5% NP-40, 1 mM phenyl-methyl-sulfonyl-fluoride) بغية تحطيم الأغشية الخلوية والحصول على خلاصة محتواها من البروتينات.

تمنيع الأرنب:

لإجراء عملية التمنيع الأولى، تم مزج حوالي 250 ميكروغرام من بروتين الأنكسين 5 الموجود في 1 مل من الموقي الملحي الفوسفاتي مع حجم مماثل من مساعد فروند الكامل المصنع من شركة (Bio Basic Inc.) من أجل تشكيل مستحلب ثابت. قمنا بتمنيع أنثى أرنب رمادية اللون بعمر شهرين تزن حوالي 2 كيلوغرام وذلك بحقنها تحت الجلد في 2–4 مواضع مختلفة. كانت الحقنات المعززة مؤلفة من مزيج من بروتين

الأنكسين 5 مع مساعد فروند غير الكامل بفواصل زمنية مدتها 15 يوماً. جمعت عينات المصل من الأرنب قبل التمنيع (اليوم 0) واستخدمت كشاهد سلبي في الدراسة. كما جمع من الأرنب عينات دم (0.5–1 مل) في أوقات زمنية منتظمة قبل كل حقنة بالإضافة لعينة النزف النهائي (30 مل) بعد مرور 15 يوم على الحقنة الأخيرة أي في اليوم 45 وذلك لتقييم الاستجابة المناعية تجاه المستضد المحقون.

تنقية الأضداد متعددة النسيلة تجاه بروتين الأنكسين 5:

تم تنقية الأضداد متعددة النسيلة (الغلوبولينات المناعية من الصف G) من مصل الأرنب الممنع ببروتين الأنكسين باستخدام نظام الكروماتوغرافيا السائلة على عمود الربط الفائق (Hitrap) للبروتين A وهو بروتين جداري للمكورات العنقودية الذهبية يمتلك ألفة ربط عالية للغلوبولينات المناعية لعدة أنواع حيوانية [9]. باختصار وتبعاً لتعليمات الشركة المصنعة (GE Life Science)، تم تمديد حوالي 2.5 مل من مصل الأرنب بحجم مماثل من الموقي الملحي الفوسفاتي ثم مرر وبتدفق قدره 5 مل بالدقيقة على عمود الفصل الخاص بالبروتين A (5 مل) والمعايَر سابقاً بالموقي نفسه، حيث جمعت البروتينات غير المرتبطة (flow through) وبعد غسل العمود بما يعادل حجمه بالموقي (0.02 M sodium phosphate, pH 7) تم فك ارتباط الأضداد عن العمود بتمرير الموقي (0.1 mM citric acid, pH 3) وبمجرد الحصول على العينات عدل كل منها باستخدام الموقي (1 M Tris, pH 9)، ومن ثم تم ديلزتها بالموقي الملحي الفوسفاتي، ثم مُددت حتى تركيز 1ملغ/مل وحُفظت في درجة حرارة −20 °م.

اختبار المقايسة المناعية الأنزيمية:

تم تطبيق المقايسة المناعية الأنزيمية غير المباشرة لاختبار تفاعلية أمصال الأرنب خلال مراحل التمنيع تجاه بروتين الأنكسين، وكذلك بهدف معايرة أضداد الأنكسين المحضرة في الأرنب بعد تنقيتها، باختصار: تم تثبيت بروتين الأنكسين 5 ضمن صفيحة المقايسة المناعية الأنزيمية ذات 96 بئر (Maxisorb-Nunc) طيلة الليل في الدرجة 4°م بتركيز

0.25 ميكروغرام/بئر منحل ضمن موقي كربونات الصوديوم. بعد عملية التثبيت، تم غسل الصفيحة ثلاث مرات بالموقي TBS-T (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl and 0.05 % tween-20). في حين تم تعبئة بقية مواقع ارتباط البروتينات على سطح الآبار باستخدام موقي الإحصار blocking buffer (3% حليب منزوع الدسم، 1% BSA في TBS × 1) لمدة ساعة بدرجة حرارة المخبر. بعد التخلص من موقي الإحصار، تم إضافة تمديدات متسلسلة من مصل الأرنب الممنع، أو أضداد الأنكسين النقية لمدة ساعة في درجة حرارة المخبر. وبعد غسل الصفيحة ثلاث مرات، تم الكشف عن الارتباط النوعي بين المستضدّ والضدّ بإضافة مصل الماعز الحاوي على أضداد تجاه بروتينات الأرنب والموسوم بأنزيم بيروكسيداز فجل الخيل (BioRad) Horseradish peroxidase conjugated goat anti-rabbit بتمديد (1:3000) مع الحضن لمدة ساعة في درجة حرارة المخبر. وبعد غسل الصفيحة خمس مرات إضافية، تم إضافة المداد الخاص بالبيروكسيداز (Sigma) 3,3′,5,5′-Tetramethylbenzidine (TMB) وإيقاف التفاعل بإضافة حمض الكبريت1M ثم قياس المطيافية الناتجة وذلك بطول موجة 450 نانومتر.

في حين تم تطبيق المقايسة المناعية الأنزيمية الشطائرية لاختبار قدرة الأضداد على كشف وربط بروتين الأنكسين، من أجل ذلك الغرض تم تغليف الصفيحة بتمديد ثابت من ضدّ الأنكسين 5 (1:1000) طيلة الليل وفي اليوم التالي تم غسل الصفيحة كالسابق ثم إضافة موقي الإحصار (3% BSA في TBS × 1) لتعبئة بقية مواقع ارتباط البروتينات على سطح الآبار مدة ساعة بدرجة حرارة المخبر. بعد التخلص من موقي الإحصار، تم الحضن ساعة أخرى بعد إضافة سلسلة من التمديدات برتبة نانو غرام/مل من الأنكسين الموسوم بالبيوتين (Biotin N-hydroxysuccinimide ester, BNHS, Sigma)، وبعد الغسل، تم الكشف النهائي من خلال استخدام الستربتافيدين الموسوم بأنزيم

البيروكسيداز (streptavidin–POD, Roche Life Science) بتمديد (1:500) والركيزة الخاصة به ثم قراءة النتيجة باستخدام جهاز مقياس المطيافية الضوئية كما سبق.

التبصيم المناعي والرحلان الكهربائي للبروتينات:

تم ترحيل عينات البروتين بتركيز (25 ميكرو غرام/بئر من حلالة الخطوط الخلوية أو 0.25 من البروتين المؤشب) على هلامة عديد الأكريلاميد SDS-PAGE باستخدام نظام BioRad mini-Protein II system حسب تعليمات الشركة المنتجة. تم تحضير الهلامات باستخدام هلامة عليا بتركيز 4% لتكديس العينات، وهلامة سفلى بتركيز 12% لترحيل العينات. بعد الانتهاء من الرحلان الكهربائي تم إجراء التبصيم المناعي وذلك بنقل البروتينات إلى غشاء 0.45 µm من النتروسيليلوز (BioRad) باستخدام محلول التبصيم (25 mM tris−base, 200 mM glycine, 0.1% SDS and 20% methanol). بعد الحضن بموقي الإحصار (3% حليب منزوع الدسم، 1% BSA في 1 × TBS)، تم حضن الأغشية إما مع أضداد الأنكسين5 المحضرة في الأرنب أو الأضداد وحيدة النسيلة النوعية للبروتين المرجعي Glyceraldehyde 3- phosphate dehydrogenase (Anti-GAPHD, abcam) بتمديد (1:3000) مدة ساعة كاملة بدرجة حرارة المخبر. وبعد الغسل عدة مرات بمحلول الغسل TBS-T تم الكشف عن ارتباط الضدّ مع المستضدّ النوعي له بالحضن مع أمصال الماعز الحاوية إما على أضداد تجاه بروتينات الأرنب أو الفأر والموسومة بالبيروكسيداز بتمديد (1:3000) مدة ساعة أيضاً.

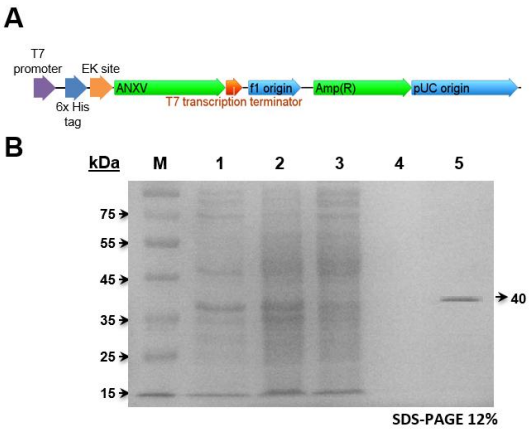
في حين تم إجراء التبصيم النقطي بإضافة 10 ميكرو لتر من تمديدات تسلسلية من البروتينات برتبة (نانو غرام/مل) إلى غشاء 0.45 µm من النتروسيليلوز حيث استخدم الأنكسين الحر أو المندمج مع البروتين الأخضر المتفلور [32] كما تم استخدام البروتين الأخضر المتفلور [3] كشاهد سلبي، وبعد تعبئة فراغات الأغشية بموقي الإحصار، تم حضن الأغشية مع أضداد الأنكسين المحضرة في الأرنب بتمديد (1:3000)، تلا ذلك

الكشف باستخدام مصل الماعز الموسوم بأنزيم بيروكسيداز فجل الخيل والحاوي على أضداد تجاه بروتينات الأرنب بتمديد (1:3000) وفي نهاية تجربتي التبصيم المناعي والتبصيم النقطي، تم إظهار عصابات البروتينات بإضافة مداد ملوّن اللون (3-AEC (3-amino-9-ethylcarbazole) (chromogen substrate محلول في موقي الأسيتات بوجود الماء الأكسجيني.

النتائج:

تحضير بروتين الأنكسين 5 المؤشب:

تمتاز البنية البلازميدية (الشكل. 1A) باحتوائها على مورثة الأنكسين 5 البشري، بالإضافة لوجود واسم سداسي الهيسيتيدين الذي من خلاله تم تنقية بروتين الأنكسين 5 المؤشب على أعمدة الكرموتوغرافيا ذات التجاذب المعدني، اعتماداً على الارتباط والألفة العالية بين الهيستيدين وشوارد النيكل المنتشرة على ملاط العمود. كما يحتوي البلازميد على الشيفرة الوراثية المرمزة لموقع تعرف أنزيم الهضم البروتيني (إنتيروكيناز) والذي يسمح بتحرير البروتين المؤشب عن واسم سداسي الهيستيدين [21]. وبعد نهاية مختلف مراحل التعبير البروتيني والتنقية تم الكشف عن بروتين الأنكسين 5 باستخدام الرحلان الكهربائي عبر هلامة الأكريلاميد حيث يظهر بروتين الأنكسين 5 المؤشب النقي في المسار الخامس بوزن جزيئي يقارب 40 كيلو دالتون (الشكل. 1B). تم الحصول على ناتج من بروتين ANXV يقدر بحوالي 50 ملغ /لتر من وسط التحضير البكتيري.

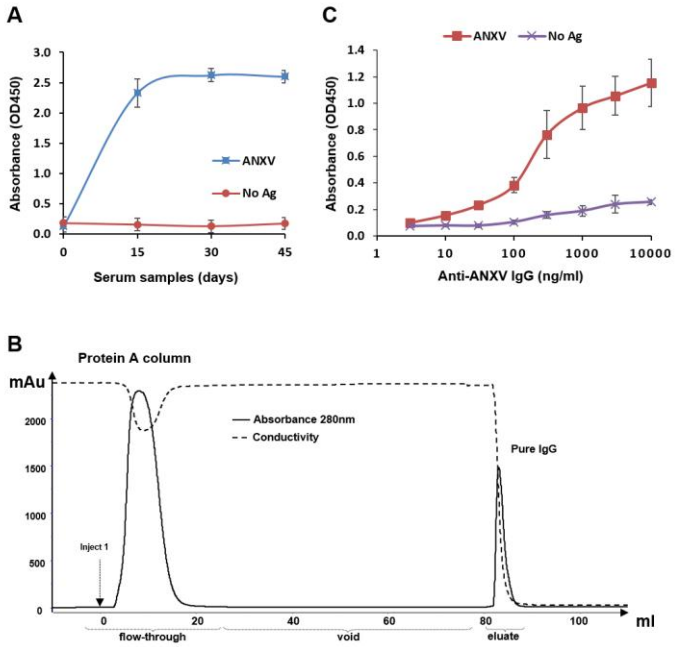


الشكل (1) التعبير البروتيني لمورثة الأنكسين 5

(A) ترسيم لبنية البلازميد pRSET-ANXV بشكل خطي تظهر فيها أهم المكونات المميزة له مثل المحضض T7، التسلسل المرمز لواسم سداسي الهيستيدين 6x His tag، موقع القطع الأنزيمي Enterokinase، مورثة بروتين ANXV، التسلسل المسؤول عن تضاعف البلازميد f1 origin ضمن السلالة *E. coli* والمورثة المقاومة للأمبسلين Amp. (B) هلامة عديد الأكريلاميد 12% المصبوغة بأزرق الكوماسي بعد ترحيل الخلاصة البروتينية المحضرة من البكتيريا المحورة ببلازميد pRSET-ANXV و ذلك بعد تحريض التعبير البروتني فيها، حيث يمثل المسار 1: الخلاصة البكتيرية قبل بدء التحريض، أي قبل إضافة IPTG، والمسار 2: الخلاصة البكتيرية بعد التحريض بأربع ساعات والمسار 3: يمثل طافي التحطيم بالأمواج فوق الصوتية والمسار 4: راشح العمود خلال التنقية في حين يمثل المسار 5: بروتين الأنكسين 5 النقي المؤشب بوزن جزيئي يقارب 40 كيلودالتون، كما يظهر سلم الأوزان الجزيئية مقدراً بالكيلو دالتون.

تقييم الاستجابة المناعية وتنقية ومعايرة أضداد الأرنب الموجهة لبروتين الأنكسين 5:

تم تمنيع أنثى أرنب بالغة بثلاث جرعات من بروتين الأنكسين 5 البشري المؤشب النقي تحت الجلد وذلك بفواصل زمنية محددة ولتقدير مدى تطور الاستجابة المناعية للأرنب بشكل نوعي تجاه الأنكسين 5، تم جمع عينات دم من الأرنب الممنّع خلال فترات زمنية متعددة من عملية التمنيع التي استمرت لمدة 45 يوم. تم إجراء تفاعل المقايسة المناعية الأنزيمية على المصل المأخوذ من عينات الدم سابقة الذكر بعد تمديده (1:2000)، وقد كشفت النتائج ظهور استجابة مناعية نوعية تجاه الأنكسين 5 بعد 15 يوماً من بداية التمنيع (الشكل. 2A). كما لوحظ ازدياد الاستجابة المناعية للأرنب تجاه الأنكسين 5 مع مرور شهر على التمنيع لتثبت تقريباً بعد 45 يوم وهي نهاية التمنيع وفيها تم أخذ عينة الدم النهائية من الأرنب الممنّع بغية الحصول على الأضداد النوعية للأنكسين 5 (الشكل. 2A). كما تمت تنقية الغلوبولينات المناعية من عينة مصل الأرنب الممنع ببروتين الأنكسين 5 وذلك في اليوم 45 من التمنيع باستخدام عمود البروتين A. جرت عملية التنقية الآلية بوساطة جهاز كروماتوغرافيا الألفة الذي يسمح بمتابعة عملية التنقية المباشرة، حيث لوحظ ظهور قمة عالية نسبياً في منحنى الامتصاصية بطول الموجة 280 نانومتر النوعية للبروتينات مما يشير إلى كمية جيدة من الأضداد النقية (الشكل. 2B). وبعد قياس تركيز الأضداد النقية، تم تقدير مردود التنقية بحوالي 1 ملغ /مل من مصل الأرنب. كما بينت تجربة معايرة أضداد الأنكسين 5 المحضرة في الأرنب بعد التنقية، تفاعلية جيدة ووصلت حساسيتها في الكشف عن الأنكسين 5 إلى تمديد (100نانوغرام/مل) (الشكل. 2C).



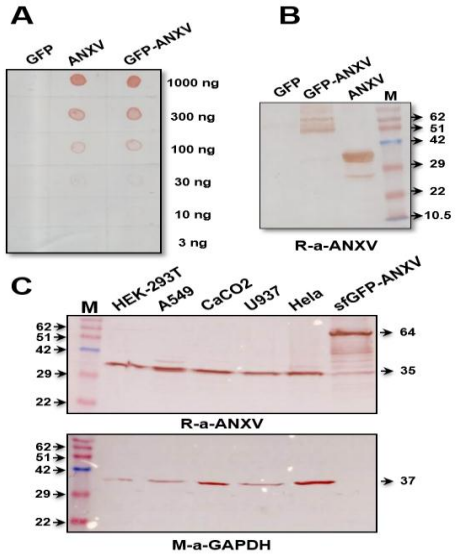
الشكل (2) تقييم الاستجابة المناعية وتنقية أضداد الأرنب الموجهة لبروتين الأنكسين 5

(A) تفاعل المقايسة المناعية الأنزيمية لاختبار تفاعلية عينات مختلفة من مصل الأرنب بتمديد (1:2000) تجاه بروتين الأنكسين 5 المثبت في صفيحة المقايسة بتركيز 0.25 ميكروغرام/بئر، أو بغياب المستضد. أُخذت العينات من الأرنب الممنع خلال فترات زمنية متعددة من بداية التمنيع وأثنائه، تم الكشف عن تفاعل الضد مع المستضد بواسطة ضد الماعز الموسوم بأنزيم بيروكسيداز فجل الخيل (1:3000). (B) رسم تخطيطي يوضح عملية تنقية الأضداد من مصل الأرنب الممنع باستخدام عمود البروتين A المحمل على جهاز الكروماتوغرافيا السائلة، يمثل الخط المستمر امتصاصية الطور الخارج من العمود، كما تمت الإشارة للمنحنيات الخاصة بالجزء المغسول عن العمود (flow-through) بالإضافة لعينة الضد المنقاة. أما الخط

المنقط فيمثل الناقلية الكهربائية للجزء المشطوف عن العمود. (C) تمت معايرة أضداد الأرنب الموجهة للأنكسين 5 النقية، بوساطة اختبار المقايسة المناعية الأنزيمية غير المباشر، حيث تم تثبيت حوالي 0.25 ميكروغرام/بئر من بروتين الأنكسين 5 المؤشب النقي، ثم الكشف عنه باستخدام سلسلة تمديدات (نانوغرام/مل) من الضدّ. كما تم اختبار تلك التمديدات بغياب المستضد (No Ag) كشاهد سلبي.

الكشف المناعي عن بروتين الأنكسين 5:

تم استخدام ضدّ الأرنب النوعي للأنكسين 5 للكشف عنه بشكليه الحر أو المندمج مع البروتين الأخضر المتفلور (GFP) سواء بطريقة التبصيم النقطي (Dot Blot) حيث وصلت عتبة الكشف حتى تركيز 30 نانو غرام لطخة من الأنكسين 5 وحتى 10 نانو غرام لطخة من الأنكسين المندمج مع البروتين الأخضر المتفلور، في حين تأكدت نوعية الضد المحضر للمستضد الخاص به بعدم قدرته على الكشف عن البروتين الأخضر المتفلور (الشكل. 3A). وبشكل مماثل أكدت تجربة التبصيم المناعي نوعية ضد الأنكسين 5 المحضر في الكشف عن بروتين الأنكسين 5 حتى بعد فقدانه البنية الثلاثية إثر الرحلان الكهربائي (الشكل.3B). كما طبق اختبار التبصيم المناعي على عينات من حلالة بعض الخطوط الخلوية السرطانية للكشف عن وجود بروتين الأنكسين 5 ضمن محتواها البروتيني وتبين أن الضد المحضر كان قادراً على الكشف عن مستضده بالمقارنة مع الضد التجاري النوعي للبروتين المرجعي (Glyceraldehyde 3- phosphate dehydrogenase, GAPHD) الذي كان قادراً على الكشف عن المستضد الخاص به ذي الوزن الجزيئي 37 كيلو دالتون ضمن المحتوى البروتيني للخلايا (الشكل. 3C).



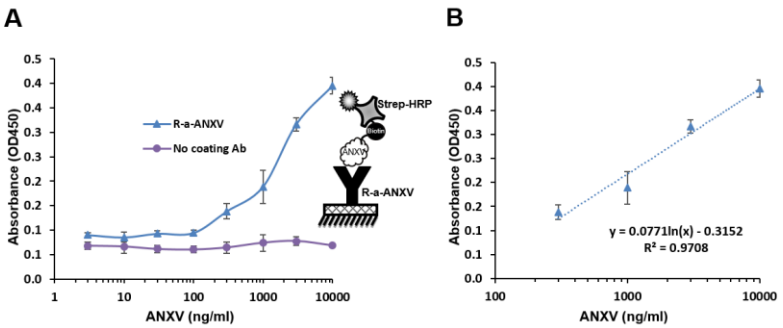
الشكل (3) الكشف المناعي عن بروتين الأنكسين 5 باستخدام أضداده النوعية

(A) التبصيم النقطي لسلسلة تمديدات من البروتينات المؤشبة: الأنكسين 5 بشكله المندمج مع البروتين الأخضر المتفلور، الأنكسين 5 بشكله الحر، والبروتين الأخضر المتفلور حيث تم تثبيت 10 ميكرولتر من كل تمديد على غشاء النتروسيليلوز ثم الكشف عن الأنكسين باستخدام أضداده النوعية المحضرة في الأرنب بتمديد (1:3000). (B) التبصيم المناعي للبروتينات المؤشبة: تم تثبيت (0.5 ميكروغرام/بئر) من الأنكسين 5 بشكله الحر، الأنكسين 5 بشكله المندمج مع البروتين الأخضر المتفلور، والبروتين الأخضر المتفلور على غشاء النتروسيليلوز، وذلك بعد ترحيلها على هلامة عديد الأكريلاميد 12% ثم واستخدام أضداد الأنكسين 5 للكشف عنها (1:3000)، يوجد في المسرى الأول سلم الأوزان الجزيئية الخاص بالبروتينات. (C) التبصيم المناعي لمحتوى البروتينات من حلالة الخطوط الخلوية المشار إليها بالإضافة لاستخدام الأنكسين 5 المؤشب بشكله المندمج مع البروتين

الأخضر المتفلور كشاهد، تم ترحيل العينات (25 ميكروغرام/بئر)على هلامة عديد الأكريلاميد ثم نقلها على غشاء النتروسيليلوز في الغشاء العلوي تم استخدام أضداد الأنكسين 5 المحلية الصنع للكشف عنه بتمديد 1:3000 ،أما الغشاء السفلي فتم استخدام أضداد تجارية نوعية للبروتين المرجعي GAPHD بتمديد(1:3000) للكشف عن هذا البروتين في حلالة الخطوط الخلوية كشاهد إيجابي، كما يظهر في المسرى الأول سلم الأوزان الجزيئية الخاص بالبروتينات.

اختبار قدرة أضداد الأرنب على ربط بروتين الأنكسين 5:

تبين أن أضداد الأنكسين 5 المحضرة في الأرنب بالإضافة لقدرتها في الكشف عنه، يمكن استخدامها في ربط ومعايرة الأنكسين 5 بالاعتماد على طريقة المقايسة المناعية الأنزيمية الشطائرية. حيث تم تغليف صفيحة المعايرة بالأضداد، ثم إضافة تراكيز مختلفة من بروتين الأنكسين 5 الموسوم بالبيوتين ما بين (1– 10000 نانو غرام/مل)، وقد استخدم واسم البيوتين لأن الكشف عن ارتباط الضد مع المستضد سيكون من خلال الستربتافيدين الموسوم بالبيروكسيداز. وقد أظهرت هذه النتيجة منحني معايرة نموذجي عند استخدام تمديدات تسلسلية من الأنكسين 5 (الشكل. 4A) يسمح بمعرفة تركيز مجهول من الأنكسين 5 بالاعتماد على المعادلة الخطية حيث y هي امتصاصية العينة المدروسة و x هي التركيز مقدراً بالوحدة نانو غرام/مل (الشكل. 4B).



الشكل(4) اختبار أضداد الأرنب الممنع ببروتين الأنكسين 5

(A) تم إجراء تفاعل المقايسة المناعية الأنزيمية الشطائرية وذلك بتغليف الصفيحة بتمديد ثابت من أضداد الأرنب الموجهة للأنكسين 5 (1:1000) حيث استخدم كضد لاقط للكشف عن سلسلة تمديدات من بروتين الأنكسين 5 الموسوم بالبيوتين، بعدها تم الكشف عن ارتباط المستضد بواسطة الستربتافيدين الموسوم بأنزيم بيروكسيداز فجل الخيل بتمديد (1:500)، كما تم اختبار تمديات المستضد بغياب الضد اللاقط كشاهد سلبي. (B) المنحنى الخطي العياري لنتائج المقايسة الأنزيمية الشطائرية السابقة، باستخدام طريقة التربيع حيث x هي تركيز الأنكسين 5 (نانوغرام/مل)، y هي قيم الامتصاصية الضوئية عند طول الموجة 450 نانومتر. حيث يمكن حساب تركيز مجهول للأنكسين باستخدام المعادلة [$y = a \ln(x) + b$] حيث a تمثل الميل (=0.07) بينما تمثل b تقاطع المنحنى مع محور العينات (-0.3). كما يوضح (R^2) المشار إليه جودة العلاقة الخطية.

المناقشة:

في هذه الدراسة، تم بداية إنتاج بروتين الأنكسين 5 المؤشب في الإشريكية القولونية والحصول عليه بشكل نقي وبمردود قُدَر بحوالي 50 ملغ لكل لتر من وسط التحضير. تمت تنقية البروتين بالاعتماد على وجود واسم سداسي الهيستيدين في الطرف الأميني

من الأنكسين المؤشب، هذا الواسم ذو ألفة عالية لشوارد النيكل الموجودة في عمود الألفة المثبت على جهاز الكروماتوغرافيا. أثبت هذا النوع من التنقية فعاليته في دراسات سابقة جرت في مخابر هيئة الطاقة الذرية السورية حيث تم إنتاج العديد من البروتينات المؤشبة وتنقيتها بهذه الطريقة [1-4].

كما شرح العمل تمنيع الأرنب باستخدام بروتين الأنكسين 5 النقي، حيث أبدت أمصال الأرنب بعد التمنيع تفاعلية عالية نوعية تجاه الأنكسين 5، وبما أن الاستجابة المناعية كانت قوية بعد أيام قليلة من حقن الأرنب نستطيع القول إن المستضد، وهو بروتين الأنكسين 5 عالي الاستمناعية. أبدت تجارب تمنيع الأرنب بمستضدات مختلفة مثل (البروتين الأخضر المتفلور، الميوتاسين والعاثي M13) في دراسات سابقة [3؛ 5؛ 29] استجابة مناعية عالية مشابهة لما حصلنا عليه في هذه الدراسة.

تم الحصول على الأضداد متعددة النسيلة المحضرة في الأرنب والنوعية للأنكسين 5 بشكلها النقي عن طريق استخدام عمود البروتين A المثبت على جهاز كروماتوغرافيا الألفة السائلة. تعد طريقة التنقية باستخدام عمودي البروتينA والبروتين G من أسرع الطرق المستخدمة في تنقية الأضداد، حيث يوصى دائماً باستخدام عمود البروتين A في تنقية أضداد الأرنب، فهو الخيار الأمثل لاستخلاص الأضداد متعددة ووحيدة النسيلة من مصل الدم والنسج المزروعة أو طافي الخلايا المزروعة بهدف إنتاج جزيئات حيوية. حيث يعتمد أيضاً مخبر الأضداد في هيئة الطاقة الذرية السورية على هذه الطريقة بشكل أساسي في تنقية الغلوبولينات المناعية، ففي أعمال سابقة تم تنقية أضداد نوعية لهرمون النمو [20] ولأضداد الجمل [13] وللعاثي M13 [29] وبكميات وفيرة انطلاقاً من أمصال الأرانب، حيث وُظفت هذه الأضداد في طرق مناعية كشفية عديدة.

تعد أضداد الأنكسين 5 المحضرة في الأرنب المنقاة والمنتجة محلياً بديلاً عن الضد التجاري وحيد النسيلة النوعي للأنكسين 5 في حال عدم توفره. على الرغم من أن الأضداد وحيدة النسيلة شديدة النوعية إلا أن إنتاجها يعد صعباً وباهظ الثمن كما أنها

تستهدف محدداً مستضدياً فريداً قد يكون في مجال ارتباط بروتين الأنكسين 5 بشوارد الكالسيوم [32]. كما أن الوقت اللازم لإنتاج أضداد وحيدة النسيلة يعد طويلاً نظراً للحاجة إلى تحضير الهجائن (Hybridomas) [34].

تمكنت أضداد الأنكسين 5 المحضرة في الأرنب في هذه الدراسة وبعد توظيفها في اختبار المقايسة المناعية الأنزيمية الشطائرية من التقاط بروتين الأنكسين 5 ،مما يسمح بإنشاء معادلة بسيطة يمكن من خلالها معرفة تركيز الأنكسين 5 في العينة المدروسة، كما أن عملية الوسم اللاحق لأضداد الأنكسين 5 بأنزيم بيروكسيداز فجل الخيل (HRP) أو الفوسفاتاز القلوية (AP) يؤدي لاختصار مرحلة من مراحل معظم الطرق المناعية وهي إضافة الضد الثانوي الموسوم[33] ، وبذلك لا نعود بحاجة لاستعمال أضداد تجارية.

تشير الدراسات الحديثة إلى ارتفاع مستوى التعبير عن بروتين الأنكسين 5 عند مرضى السرطان [22]. يعد تحديد تركيز الأنكسين 5 في مصل الدم عاملاً أساسياً لمعرفة درجة التعبير عن الأنكسين 5 في النسج السرطانية وتشخيص درجة الورم [28]، حيث يمكن اعتبار الأنكسين 5 مؤشراً حيوياً للكشف عن الأورام [23]. إن توفر الأضداد النوعية للأنكسين 5 سيفيد في تطوير أطقم تشخيصية للكشف عن وجوده في مختلف العينات الحيوية، الخلوية والنسيجية. بالإضافة لذلك استطاعت الأضداد النوعية للأنكسين 5 والمنتجة محلياً من كشف وربط بروتين الأنكسين5 بشكليه المنفرد أو المندمج مع البروتين الأخضر المتفلور بعدة طرق مناعية.

الشكر:

يتقدم معدي الورقة بجزيل الشكر للسادة المدير العام لهيئة الطاقة الذرية السورية ورئيس قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية لدعمهما المتواصل أثناء هذا العمل.

المراجع:

[1]. Abo Assali, L., Al Mariri, A., Hamad, E., and Abbady, A.Q., 2011. Cloning and protein expression of Yersinia GroEL using pHEN6 plasmid. Damascus Univ J Basic Sci. 00 (00): pp 00-00.

[2]. Abo Assali, L., Masoud, H., Al Mariri, A., Hamad, E., and Abbady, A.Q., 2012. Cloning and expression of recombinant Brucella GroEL using pHEN6 plasmid. Mansoura J Biol. 38 (1): pp 00-00.

[3]. Al-Homsi, L., Al-Assad, J.M., Kweider, M., Al-Okla, S., and Abbady, A.Q., 2012. Construction of pRSET-sfGFP plasmid for fusion-protein expression, purification and detection. Jordan Journal of Biological Sciences. 5 (4): pp 279-288.

[4]. Al-Homsi, L., Al-Okla, S., and Abbady, A.Q., 2012. Cloning of Mutacin gene from Streptococcus mutans and its protein expression using pT7-his plasmid. J Agricult Chem Biotech. 3 (1): pp 19-28.

[5]. Al-Homsi, L., Al-Okla, S., and Abbady, A.Q., 2015. Preparation of Specific Polyclonal Antibody Against the Recombinant Mutacin Produced by sfGFP Fusion Protein Technology. The open microbiology journal. 9 pp 70-80.

[6]. Calabozo, B., Duffort, O., Carpizo, J.A., Barber, D., and Polo, F., 2001. Monoclonal antibodies against the major allergen of Plantago lanceolata pollen, Pla l 1: affinity chromatography purification of the allergen and development of an ELISA method for Pla l 1 measurement. Allergy. 56 (5): pp 429-435.

[7]. Castano, A.R., Tangri, S., Miller, J.E., Holcombe, H.R., Jackson, M.R., Huse, W.D., Kronenberg, M., and Peterson, P.A., 1995. Peptide binding and presentation by mouse CD1. Science. 269 (5221): pp 223-226.

[8]. Cheung, H.Y., Chan, K.M., Ng, T.B., and Cheng, C.H., 2002. Production of a polyclonal antibody against recombinant goldfish prolactin and demonstration of its usefulness in a non-competitive antigen-capture ELISA. "Comparative Biochemistry and Physiology Part B, Biochemistry and Molecular Biology". 131 (1): pp 37-46.

[9]. Choe, W., Durgannavar, T.A., and Chung, S.J., 2016. Fc-Binding Ligands of Immunoglobulin G: An Overview of High Affinity Proteins and Peptides. Materials. 9 (12):

[10]. Crameri, R., and Suter, M., 1995. Display of biologically active proteins on the surface of filamentous phages: a cDNA cloning system for the selection of functional gene products linked to the genetic information responsible for their production [Gene 137 (1993) 69-75]. Gene. 160 (1): pp 139.

[11]. Elmore, S., 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicologic Pathology. 35 (4): pp 495-516.
[12]. Fatimathas, L., and Moss, S.E., 2010. Annexins as disease modifiers. Histology and Histopathology. 25 (4): pp 527-532.
[13]. Haddad, M., Soukkarieh, C., Khalaf, H.E., and Abbady, A.Q., 2016. Purification of polyclonal IgG specific for Camelid's antibodies and their recombinant nanobodies. Central European Journal of Biology. 11 (1): pp 1-9.
[14]. Hayes, M.J., and Moss, S.E., 2004. Annexins and disease. Biochemical and Biophysical Research Communications. 322 (4): pp 1166-1170.
[15]. Iaccarino, L., Ghirardello, A., Canova, M., Zen, M., Bettio, S., Nalotto, L., Punzi, L., and Doria, A., 2011. Anti-annexins autoantibodies: their role as biomarkers of autoimmune diseases. Autoimmunity Reviews. 10 (9): pp 553-558.
[16]. Lahorte, C.M., Vanderheyden, J.L., Steinmetz, N., Van de Wiele, C., Dierckx, R.A., and Slegers, G., 2004. Apoptosis-detecting radioligands: current state of the art and future perspectives. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 31 (6): pp 887-919.
[17]. Lizarbe, M., Barrasa, J., Olmo, N., Gavilanes, F., and Turnay, J., 2013. Annexin-Phospholipid Interactions. Functional Implications. International journal of molecular sciences. 14 (2): pp 2652.
[18]. Lizarbe, M.A., Barrasa, J.I., Olmo, N., Gavilanes, F., and Turnay, J., 2013. Annexin-phospholipid interactions. Functional implications. International journal of molecular sciences. 14 (2): pp 2652-2683.
[19]. Moss, S.E., and Morgan, R.O., 2004. The annexins. Genome Biology. 5 (4): pp 219.
[20]. Murad, H., Ali, B., Makeya, R., and Abbady, A.Q., 2014. Prokaryotic overexpression of TEV-rhGH and characterization of its polyclonal antibody. Gene. 542 (1): pp 69-76.
[21]. Parks, T.D., Leuther, K.K., Howard, E.D., Johnston, S.A., and Dougherty, W.G., 1994. Release of proteins and peptides from fusion proteins using a recombinant plant virus proteinase. Analytical Biochemistry. 216 (2): pp 413-417.
[22]. Peng, B., Guo, C., Guan, H., Liu, S., and Sun, M.Z., 2014. Annexin A5 as a potential marker in tumors. Clinica Chimica Acta. 427 pp 42-48.
[23]. Pogosian, G.G., Mikaelian, M.V., Avagian, A., and Gasparian, V.K., 2014. [The annexin 5 in serums of pregnant women and patients with particular types of cancer]. Klinicheskaia Laboratornaia Diagnostika. (4): pp 14-17.

[24]. Reutelingsperger, C.P., Hornstra, G., and Hemker, H.C., 1985. Isolation and partial purification of a novel anticoagulant from arteries of human umbilical cord. European Journal of Biochemistry. 151 (3): pp 625-629.

[25]. Shin, K., Hayasawa, H., and Lonnerdal, B., 2001. Purification and quantification of lactoperoxidase in human milk with use of immunoadsorbents with antibodies against recombinant human lactoperoxidase. American Journal of Clinical Nutrition. 73 (5): pp 984-989.

[26]. Silverman, G.J., Roben, P., Bouvet, J.P., and Sasano, M., 1995. Superantigen properties of a human sialoprotein involved in gut-associated immunity. Journal of Clinical Investigation. 96 (1): pp 417-426.

[27]. Sohma, H., Imai, S., Takei, N., Honda, H., Matsumoto, K., Utsumi, K., Matsuki, K., Hashimoto, E., Saito, T., and Kokai, Y., 2013. Evaluation of annexin A5 as a biomarker for Alzheimer's disease and dementia with lewy bodies. Frontiers in aging neuroscience. 5 pp 15.

[28]. Sun, C.B., Zhao, A.Y., Ji, S., Han, X.Q., Sun, Z.C., Wang, M.C., and Zheng, F.C., 2017. Expression of annexin A5 in serum and tumor tissue of patients with colon cancer and its clinical significance. World Journal of Gastroenterology. 23 (39): pp 7168-7173.

[29]. Twair, A., Al-Okla, S., Kawas, H., and Abbady, A.Q., 2013. production of polyclonal antibody against M13 phage for application in nanobody technology. Advances in Environmental Biology. 7 pp 3216-3223.

[30]. van Genderen, H.O., Kenis, H., Hofstra, L., Narula, J., and Reutelingsperger, C.P., 2008. Extracellular annexin A5: functions of phosphatidylserine-binding and two-dimensional crystallization. Biochimica et Biophysica Acta. 1783 (6): pp 953-963.

[31]. Wang, J., He, L., Chen, D., Pi, Y., Zhou, W., Xiong, X., Ren, Y., Lai, Y., and Hua, Z., 2015. Quantitative analysis of annexin V-membrane interaction by flow cytometry. European Biophysics Journal. 44 (5): pp 325-336.

[32]. Wang, J., Liu, J., Cao, Y., Hu, M., and Hua, Z., 2017. Domain IV of Annexin A5 Is Critical for Binding Calcium and Guarantees Its Maximum Binding to the Phosphatidylserine Membrane. Molecules. 22 (12):

[33]. Winston, S.E., Fuller, S.A., Evelegh, M.J., and Hurrell, J.G., 2001. Conjugation of enzymes to antibodies. Current protocols in molecular biology. Chapter 11 pp Unit11 11.

[34]. Yokoyama, W.M., Christensen, M., Santos, G.D., and Miller, D., 2006. Production of monoclonal antibodies. Curr Protoc Immunol. Chapter 2 pp Unit 2 5.