ORIGINAL ARTICLE

Protein A-Specific Enrichment of Insert-containing Phage in Antibody Phage Display Library

Reza Valadan[1,2],
Alireza Rafiei[2,3],
Gholamreza Hashemitabr[4],
Mohammad reza Bassami[5]

[1] Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
[2] Molecular and Cell Biology Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] Department of Immunology, Molecular and Cell Biology Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran Univeristy of Medical Sciences, Sari, Iran
[4] Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
[5] Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

(Received December 10, 2014; Accepted January 4, 2014)

Abstract

Background and purpose: Antibody phage display library is a powerful in vitro technology for production of recombinant antibody fragments against a wide variety of antigens. However, the presence of insert-free clones in the phage libraries limited the specific enrichment of antibody fragments in many studies. The aim of this study was to protein A-aided recovery of insert-containing phages in antibody phage display library.

Materials and methods: Tomlinson antibody library was prepared according to the standard protocol. Three rounds of panning were performed in two independent groups on VERO/HER2 cells, considering a step of protein A-aided phage precipitation at the end of each round only in one group. The efficiency of this method was evaluated on the selected clones using PCR and phage-Elisa.

Results: The results of PCR showed that 87% of clones contained insert after three rounds of panning using protein A-recovered phages while in the control group only 41% of clones contained insert. Also, the results of phage-ELISA showed specific enrichment of anti-HER2 antibodies in protein A-treated group.

Conclusion: This method provided a simple and effective way for selective enrichment of antibody fragments in the phage display antibody libraries.

Keywords: Antibody phage display library, HER2, Insert-free phage, Protein A

J Mazandaran Univ Med Sci 2015; 24(120):43-53 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و چهارم شماره ۱۲۰ دی سال ۱۳۹۳ (۵۳-۴۳)

انتخاب اختصاصی فاژهای حاوی قطعه آنتی‌بادی به کمک پروتئین A در تکنیک کتابخانه آنتی‌بادی فاژ

رضا ولدان [۲،۱]
علیرضا رفیعی [۲،۳]
غلامرضا هاشمی تبار [۴]
محمدرضا باسامی [۵]

چکیده

سابقه و هدف: تکنیک کتابخانه آنتی‌بادی فاژ یکی از قدرتمندترین روش‌های ساخت قطعات آنتی‌بادی در محیط آزمایشگاه است. با این حال یکی از مشکلات تکنیکی در مسیر انتخاب آنتی‌بادی‌های اختصاصی و عملکردی وجود فاژهای فاقد قطعه آنتی‌بادی در کتابخانه آنتی‌بادی فاژ است. هدف از این مطالعه استفاده از قابلیت اتصال کلون‌های موجود در کتابخانه آنتی‌بادی فاژ به پروتئین A برای خالص‌سازی فیزیکی فاژهای حاوی قطعه آنتی‌بادی از فاژهای فاقد قطعه آنتی‌بادی است.

مواد و روش‌ها: کتابخانه آنتی‌بادی فاژ Tomlinson طبق پروتکل مربوطه تکثیر شد. انتخاب آنتی‌بادی علیه گیرنده HER2 در سطح سلول VERO انجام شد. سه چرخه panning در دو گروه صورت گرفت به صورتی که در یک گروه قبل از هر چرخه panning فاژهای تولید شده به‌وسیله پروتئین A متصل به آگاروز خالص‌سازی شدند، در حالی که در گروه کنترل مرحله خالص‌سازی با پروتئین A صورت نگرفت. آنتی‌بادی‌های به دست آمده در انتهای هر چرخه در دو گروه مورد مطالعه به‌وسیله PCR و phage-ELISA مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج آزمون PCR نشان‌دهنده افزایش قابل‌ملاحظه تعداد فاژهای حاوی قطعه آنتی‌بادی پس از خالص‌سازی توسط پروتئین A در انتهای چرخه سوم panning (۸۷ درصد) نسبت به گروه کنترل (۴۱ درصد) است. بعلاوه نتایج آزمون الیزا نیز تأیید انتخاب و تکثیر اختصاصی آنتی‌بادی در گروه فاژ خالص شده با پروتئین A است.

استنتاج: این مطالعه اهمیت خالص‌سازی فاژهای حاوی قطعه آنتی‌بادی را برای تولید و انتخاب آنتی‌بادی‌های اختصاصی را در تکنیک کتابخانه آنتی‌بادی فاژ نشان می‌دهد.

واژه های کلیدی: کتابخانه آنتی‌بادی فاژ، پروتئین A، HER2، فاژ فاقد قطعه آنتی‌بادی.

مقدمه

کتابخانه آنتی‌بادی فاژ (antibody phage display) به مجموعه‌ای از فاژهای نوترکیب گفته می‌شود که روی سطح خود قطعات مختلف آنتی‌بادی را نمایش می‌دهند. فناوری مذکور روشی برای نمایش و

مولف مسئول: علیرضا رفیعی– ساری، کیلومتر ۱۸ جاده خزرآباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم Email: rafiei1710@gmail.com
۱. پژوهشکده زیست فن آوری، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
۲. مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۴. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
۵. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۳/۹/۱۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۳/۹/۲۹ تاریخ تصویب : ۱۳۹۳/۱۰/۱۴

انتخاب آنتی‌بادی از کتابخانه‌ای وسیعی از انواع آنتی‌بادی‌های مختلف روی سطح فاژ است. فاژ رشته‌ای M13 به‌صورت فیزیکی توالی اسیدآمینه یک آنتی‌بادی را به‌توالی ژنتیکی آن متصل می‌کند (۱). در معمول‌ترین حالت قطعات آنتی‌بادی به‌صورت تک زنجیره‌ای[1] (scFv) روی سطح فاژ قرار می‌گیرد. در این فرمت دامین‌های زنجیره سبک VL و زنجیره سنگین VH ایمونوگلوبولین توسط یک spacer یا linker انعطاف‌پذیر به یکدیگر متصل شده‌اند (۲). فناوری کتابخانه آنتی‌بادی فاژ یکی از فناوری‌های قدرتمند برای ساخت آنتی‌بادی و قطعات آنتی‌بادی در خارج از بدن[2] با تقلید از مکانیسم طبیعی تولید آنتی‌بادی در بدن است. این فناوری قادر به تولید و غربال‌گری کتابخانه‌های بزرگی از آنتی‌بادی تا حدود 10^{9}-10^{10} کلون مختلف است (۳). از محاسن این روش تولید کتابخانه وسیع، بالا بردن ظرفیت تولید[3]، کنترل در فرآیند انتخاب، پایداری ذرات فاژ و انتخاب در شرایط نامتعارف برای تولید آنتی‌بادی‌هایی با خصوصیات ویژه (مثلاً مقاوم به حرارت) و تولید آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن‌های سمی و خودی هستند (۴). از این فناوری برای ساخت آنتی‌بادی‌های منوکلونال علیه هدف‌های توموری مثل VEGF-2, TRAIL-R1, TRAIL-R2,EGFR مولکول‌ها و واسطه‌های التهابی دخالت کننده در بیماری‌های خود ایمن از جمله IL-12, IL-13,TNFα, GM-CSF آنتی‌ژن‌های میکروبی مثل AP در باکتری عامل سیاه‌زخم و در نهایت علیه β-amyloid برای جلوگیری از پیشرفت بیماری آلزایمر استفاده شده است. بسیاری از آنتی‌بادی‌های ذکر شده مراحل آزمون بالینی خود را طی می‌کنند، در حالی که تنها داروی پذیرفته شده از سوی FDA تولید شده با فناوری phage display داروی Adalimumab (Humira®) است که علیه TNFα و در درمان بیماری‌های کرون، روماتوئید آرتریتو سوریازیس استفاده می‌شود (۵).

کتابخانه آنتی‌بادی فاژ به دلیل گستردگی و تنوع در کلون‌های آن قابلیت تولید و انتخاب آنتی‌بادی علیه هرگونه اپیتوپی را دارد. با این حال یکی از مهم‌ترین معایب فناوری آنتی‌بادی فاژ وجود فاژهای فاقد قطعه آنتی‌بادی[4] در کتابخانه است. فاژهای فاقد قطعه آنتی‌بادی باعث عدم موفقیت در تولید آنتی‌بادی‌های باکیفیت و عملکردی علیه اهداف مختلف می‌شود. کلون‌های فاقد insert در روند تولید فاژهای نوترکیب موجب تولید فاژهای بدون آنتی‌بادی در سطح خود می‌شوند. این فاژهای نوترکیب بدون قطعه آنتی‌بادی به دلیل اتصال غیراختصاصی به سطوح و آنتی‌ژن در چرخه‌های متوالی انتخاب غالب می‌شوند و موجب شکست فرآیند انتخاب و انتخاب آنتی‌بادی‌های غیراختصاصی و غیر عملکردی می‌شوند (۶، ۷). دلایل وجود کلون‌های فاقد insert شامل ۱. هضم ناقص وکتور یا اتصال بدون insert وکتور به خود self-ligation در طی روند ساخت کتابخانه است (۷)؛ ۲. پایین بودن میزان کارآمدی تولید فاژهای نوترکیب از طریق فاژهای کمکی[5] (۷، ۸)؛۳. فشار مثبت انتخاب کلون‌های فاقد insert در مراحل کشت کتابخانه است. از طرف دیگر وجود ژن آنتی‌بادی (insert) در کلون‌های کتابخانه موجب تحمیل انرژی بیشتر به باکتری برای حفظ و بیان آنتی‌بادی می‌شود؛ در نتیجه در چرخه‌های متعدد panning از تعداد این کلون‌ها در رقابت با کلون‌های فاقد ژن آنتی‌بادی کاسته و موجب غالب شدن کلون‌های فاقد ژن آنتی‌بادی می‌شود (۶، ۹). استراتژی‌های مختلفی برای کاهش میزان فاژهای فاقد

[1] single chain fragments variable
[2] *in vitro*
[3] throughput
[4] insert-free clones
[5] helper phage

insert در روش کتابخانه آنتی‌بادی فاژ وجود دارد. به‌عنوان مثال اضافه کردن ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک تتراساکلین در محل وارد شدن insert در وکتور فاژمید، کلون کردن در چهارچوب[1] یک ژن آنتی‌بیوتیک به ژن آنتی‌بادی (۱۰) و اتصال یک تگ[2] به قطعه آنتی‌بادی برای خالص کردن فاژهای نوترکیب حاوی قطعه آنتی‌بادی (۱۱). از طرف دیگر پروموتورهای قابل‌اطمینان‌تر و قوی‌تر و فاژهای کمکی فاقد ژن PIII موجب بهبود کیفیت کتابخانه‌های آنتی‌بادی فاژ شده‌اند (۶). با این حال در تمام موارد ذکر شده نیاز به طراحی و ساخت کتابخانه‌های آنتی‌بادی جدید یا تغییر در کتابخانه‌های موجود است که همگی متحمل صرف هزینه و زمان بسیار زیاد است، از طرف دیگر هرگونه تغییر در ساختار کتابخانه نیز به بررسی‌های بسیار بیشتر برای حفظ عملکرد کتابخانه آنتی‌بادی دارد؛ بنابراین در صورتی که بتوان به‌صورت فیزیکی کلون‌های حاوی insert را از کلون‌های فاقد insert جدا کرد به‌راحتی می‌توان طی مراحل انتخاب به آنتی‌بادی‌های کاملاً اختصاصی دست یافت.

کتابخانه آنتی‌بادی فاژ Tomlinson بر اساس کلون قطعات زنجیره‌های سنتزی سبک و سنگین آنتی‌بادی‌های دریک وکتور فاژمید ساخته شده است. این کتابخانه بر اساس یک چهارچوب برای زنجیره سنگین (V3- 23/DP-47 and JH4b) و یک زنجیره سبک کاپا (O12/O2/DPK2and Jκ1) ساخته شده است که در آن تنوع در محل اتصال آنتی‌بادی به آنتی‌ژن وارد شده است (۱۲). در این کتابخانه قسمت CDR3 زنجیره سنگین تا جای ممکن کوتاه طراحی ولی قدرت اتصال به آنتی‌ژن آن حفظ شده است. کلون‌های موجود در کتابخانه از لحاظ قابلیت اتصال به پروتئین‌های A و L مورد بررسی قرار گرفته‌اند؛ بنابراین اکثر کلون‌های موجود در کتابخانه از لحاظ عملکردی فعال هستند و قابلیت اتصال به پروتئین A را دارند (۱۳). بر این اساس هدف از این مطالعه استفاده از قابلیت اتصال کلون‌های موجود در کتابخانه Tomlinson به پروتئین A برای بهبود کیفیت فرآیند انتخاب آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن است. بر این اساس در صورتی که به طریق فیزیکی و با استفاده از پروتئین A فاژهای حاوی قطعه آنتی‌بادی (insert) را از فاژهای فاقد قطعه آنتی‌بادی (insert-free) تفکیک و خالص کرد، می‌توان از فاژهای خالص شده در چرخه‌های متوالی panning به کلون‌های اختصاصی دست یافت.

مواد و روش‌ها

سلول‌ها و کشت سلول

سلول‌های VERO از انستیتو پاستور (تهران، ایران) تهیه شد. برای انتخاب آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن‌های سطحی (HER2) از سلول‌های VERO بیان‌کننده گیرنده HER2 استفاده شد ((VERO/HER2. سلول‌ها در محیط RMPI1640 (Biosera, UK) حاوی دو میلی مولار L-glutamine به همراه ده درصد FBS (Biosera) و ۱۰۰ واحد به ازای هر میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم به ازای هر میلی‌لیتر استرپتومایسین (Biosera) کشت داده شدند. سلول‌ها در آنکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به همراه پنج درصد دی‌اکسید کربن و ۹۵ درصد رطوبت نگهداری شدند.

آماده‌سازی کتابخانه و تولید فاژهای نوترکیب

کتابخانه آنتی‌بادی فاژ Tomlinson (Source bioscience, UK) به‌صورت منجمد در فریز ۸۰- نگهداری شد. کتابخانه در ۲۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت 2xTY حاوی ۱۰۰ میکرو لیتر به ازای میلی‌لیتر

[1] in frame
[2] tag

آمپی‌سیلین و یک درصد گلوکز به مدت دو ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به همراه تکان آنکوبه شد (تا زمانی که OD 600 به حدود ۰/۴ رسید). از این میزان ۵۰ میلی‌لیتر برداشته و به $۲×۱۰^{۱۱}$ از فاژهای کمکی اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم آنکوبه شد. بعد از طی شدن ۳۰ دقیقه آنکوباسیون کتابخانه با فاژهای کمکی محیط کشت در ۳۰۰۰ x g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب باکتری در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت 2xTY حاوی ۱۰۰ میکروگرم به ازای میلی‌لیتر آمپی‌سیلین و ۵۰ میکروگرم به ازای میلی‌لیتر کانامایسین و ۰/۱ درصد گلوکز حل شد. محیط کشت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب به همراه تکان آنکوبه شد. محیط کشت در x g ۳۳۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. به ۸۰ میلی‌لیتر از مایع رویی ۲۰ میلی‌لیتر محلول PEG/NaCl (۲۰ درصد پلی‌اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ و ۲/۵ میلی مولار NaCl) اضافه شد و به مدت یک ساعت روی یخ آنکوبه شد. محلول به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۳۰۰ x g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. رسوب فاژ به دست آمده در ۴ میلی‌لیتر PBS حل شد و سپس به مدت ده دقیقه در ۱۱۶۰۰ x g سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل دور ریخته شد. جذب نوری محلول فاژ رویی به دست آمده در ۲۶۰ خوانده شد و از طریق فرمول (تعداد فاژ در میلی‌لیتر= جذب نوری در ۲۶۰ × ضریب رقت × ۲۲/۱۴ × $۱۰^{۱۰}$) زیر تعداد فاژ محاسبه شد.

انتخاب آنتی‌بادی و خالص‌سازی فاژهای نوترکیب به کمک پروتئین A

سلول‌های VERO معمولی و سلول‌های VERO/HER2 تا ۸۰ درصد Confluency کشت داده شدند. سپس توسط cell scraper از پلیت جدا شدند. سلول‌ها پس از شستشو با PBS با تعداد دو میلیون در یک میلی‌لیتر Modified Tyrode's buffer (150 mMNaCl, 12 mM NaHCO3, 2.5mMKCl, 2 mMCaCl2, 2 mM MgCl2, 1 mg/ml BSA, 1 mg/ml glucose) حل شد. به سلول VERO معمولی $۱۰^{۱۰}$ کتابخانه آنتی‌بادی فاژ تولید شده در قسمت قبل اضافه شد و به مدت دو ساعت در دمای اتاق همراه به تکان ملایم آنکوبه گردید. سلول در ۱۴۰ x g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و سپس مایع رویی به یک تیوب جدید منتقل شد. مایع رویی مرحله قبل به حدود دو میلیون سلول VERO/HER2 اضافه شد. سلول‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق با تکان ملایم آنکوبه شدند. سلول‌ها در ۱۴۰ x g به مدت ده دقیقه سانتریفیوژ و سپس مایع رویی دور ریخته شد. رسوب حاصل به ۵۰ میلی‌لیتر HEPES-modified Tyrode's buffer (10 mM HEPES, 12 mM NaHCO3,138 mMNaCl, 2.9 mMKCl, 2 mM MgCl2, 2 mM CaCl2, 1 mg/ml glucose, 1 mg/ml BSA) شستشو داده شد. سلول‌ها در ۲۰۰ x g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل در ۱ میلی‌لیتر HEPES-modified Tyrode's buffer حل و مانند قبل سانتریفیوژ شد. این مرحله دو بار تکرار شد. فاژ متصل به سلول به‌وسیله آنکوباسیون با محلول Glycine به مدت ۱۵ دقیقه جدا شدند. فاژهای جدا شده با ۱۰۰ میکرو لیتر محلول Tris ۲ مولار با pH 8 خنثی شد و سریعاً در ۱۸۰۰۰x g به مدت ده دقیقه سانتریفیوژ شد. فاژهای جداشده به سه میلی‌لیتر باکتری TG1 اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه حمام آب گرم آنکوبه شد. سپس باکتری‌ها در پلیت TYE حاوی ۱۰۰ میکروگرم به ازای میلی‌لیتر آمپی‌سیلین و یک درصد گلوکز کشت سطحی داده و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد آنکوبه شد.

فاژهای نوترکیب برای چرخه بعدی انتخاب مطابق با روش آماده‌سازی کتابخانه تهیه شد. روند انتخاب تا چرخه سوم با شرایط ذکر شده در بالا انجام شد. در یک گروه دیگر مراحل انتخاب دقیقاً مشابه روش ذکر شده

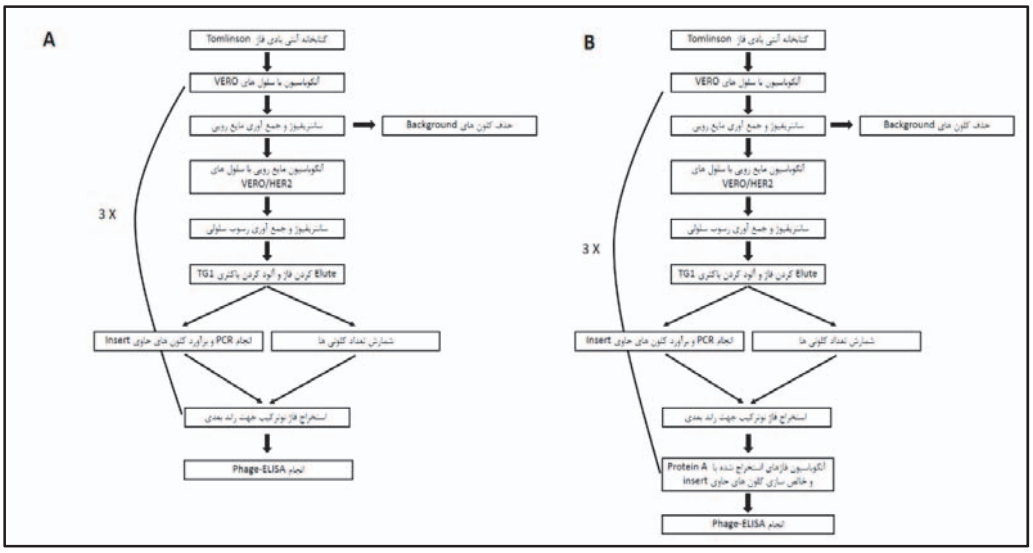
در بالا انجام شد با این تفاوت که برای خالص‌سازی فاژهای نوترکیب و تفکیک آن‌ها از فاژهای فاقد insert محصول فاژ نوترکیب هر چرخه قبل از وارد شدن به چرخه بعد با ۱۰۰ میکرو لیتر پروتئین A متصل آگاروز (Santa cruz, USA) به مدت یک شب در دمای یخچال به همراه تکان آرام آنکوبه شد. فاژهای نوترکیب حاوی قطعه آنتی‌بادی به پروتئین A متصل شد و سپس چهار بار توسط PBS سرد شسته شد. هر بار شستشو به کمک یک میلی‌لیتر محلول PBS شسته شد و در ۲۵۰۰ دور در دقیقه به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ شد. فاژهای نوترکیب متصل به پروتئین A از طریق آنکوباسیون با محلول Glycine به مدت ۱۵ دقیقه جدا شدند. فاژهای جدا شده با ۱۰۰ میکرو لیتر محلول Tris ۲ مولار با pH 8 خنثی شد. فاژهای جدا شده برای چرخه بعدی انتخاب استفاده شدند.

بررسی کلون‌های حاوی فاژ به‌وسیله PCR

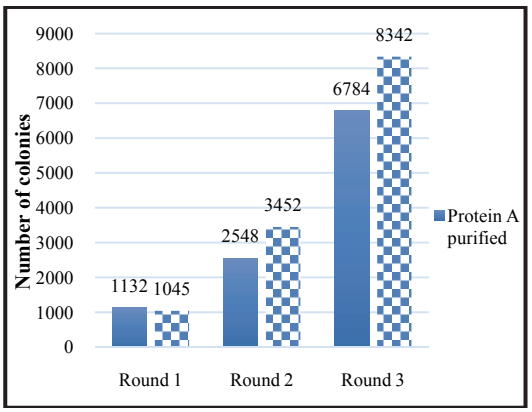
برای بررسی موفقیت روند انتخاب آنتی‌بادی جدا شده علیه گیرنده HER2 از باکتری‌های به دست آمده از انتهای هر چرخه به‌صورت تصادفی ۲۴ نمونه انتخاب شد. یک کلونی باکتری در ۲۵ میکرو لیتر آب مقطر حل و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد آنکوبه شد. واکنش PCR شامل ده میکرو لیتر از کیت PCR (Amplicon) دو میکرو لیتر از هر کدام از نمونه‌ها استخراج شده و ۰/۵ میکرو لیتر از هر کدام از پرایمرهای LMB3: CAGGAAACAGCTATGAC و pHEN: CTATGCGGCCCCATTCA بود. شرایط دمایی شامل واسرشت سازی اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد دو دقیقه و ۴۰ سیکل واسرشت سازی ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، اتصال در ۵۵ درجه ۴۵ ثانیه و Extension در ۷۲ درجه یک دقیقه و در نهایت ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه انجام شد. پس از اتمام PCR نمونه‌ها روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد رانده شد. نتایج PCR هر چرخه انتخاب در هر دو گروه فاژ خالص شده و خالص نشده با پروتئین A با یکدیگر مقایسه شد.

بررسی روند انتخاب به‌وسیله phage-ELISA

جمعیت فاژهای تولید شده در انتهای هر چرخه از نظر قابلیت اتصال به هر کدام از سلول‌های VERO/HER2 به‌وسیله Phage-ELISA مورد بررسی قرار گرفت. هر کدام از سلول‌های مورد نظر شمرده و ۴۰۰۰۰ سلول در پلیت ۹۶ خانه کشت داده شد. به سلول‌ها به مدت یک شب فرصت داده شد تا به کف پلیت متصل شود. در روز بعد سلول‌ها سه بار با PBS شسته شد. سلول‌ها به مدت یک ساعت توسط شیر خشک دو درصد در PBS بلاک شد. سلول‌ها دو بار توسط PBS شسته و سپس ده میکرو لیتر از فاژهای استخراج شده از انتهای هر چرخه به ۹۰ میکرو لیتر PBS حاوی ۲ درصد شیر خشک اضافه و سپس به هر حفره اضافه و یک ساعت در دمای اتاق آنکوبه شد. حفره‌ها سه بار توسط PBS حاوی ۰/۱ درصد Tween 20 (Sigma) شسته شد. به هر حفره ۱۰۰ میکرو لیتر از رقت ۱:۵۰۰۰ آنتی‌بادی anti-M13 متصل به HRP (Amersham) در دو درصد شیر خشک اضافه و به مدت یک ساعت در دمای اتاق آنکوبه شد. حفره‌ها سه بار توسط PBS حاوی ۰/۱ درصد Tween 20 شسته شد. به هر حفره ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول TMP (Sigma) اضافه شد و ۱۵ دقیقه در دمای اتاق آنکوبه شد. واکنش با اضافه کردن ۵۰ میکرو لیتر Stop solution متوقف و سپس جذب نوری در طول موج ۶۵۰ نانومتر و ۴۵۰ نانومتر خوانده شد. آزمون الیزا هر چرخه انتخاب با سه بار تکرار در هر دو گروه انتخاب با و بدون پروتئین A انجام و سپس نتایج با یکدیگر مقایسه شدند.



تصویر شماره ۱: استراتژی به کار گرفته شده برای انتخاب آنتی‌بادی علیه گیرنده HER2. مراحل طی شده در هر دو گروه فاژ خالص نشده با پروتئین A (شکل-A) و گروه خالص شده با پروتئین A (شکل-B) دقیقاً مشابه به یکدیگر هستند. با این تفاوت که در گروه خالص شده با پروتئین A در انتهای هر چرخه پس از استخراج فاژهای نوترکیب یک مرحله خالص‌سازی با پروتئین A نیز وجود دارد.

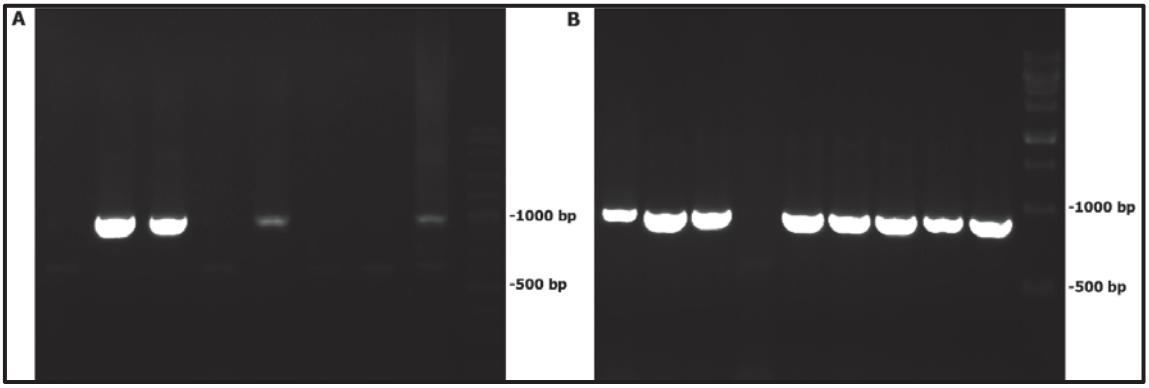


تصویر شماره ۲: نمودار تعداد کلونی‌های به دست آمده از هر چرخه panning در هر دو گروه فاژ خالص شده و خالص نشده با پروتئین A. تعداد کلونی‌های به دست آمده از انتهای هر چرخه در هر دو گروه شمارش شد. تعداد کلونی‌ها در چرخه‌های متوالی panning ۲ تا ۳ برابر شد با این حال تفاوت معنی‌داری بین تعداد کلونی‌ها در دو گروه فاژ خالص شده و خالص نشده با پروتئین A وجود نداشت.

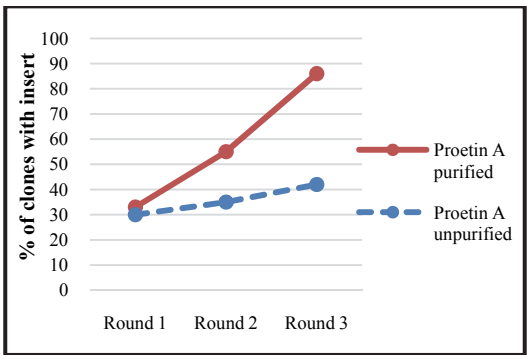
یافته ها

برای انجام مراحل انتخاب آنتی‌بادی علیه گیرنده HER2 بیان شده در سطح سلول VERO نیاز به تولید فاژ نوترکیب از کتابخانه آنتی‌بادی فاژ بود. نتایج تولید فاژ نوترکیب از کتابخانه Tomlinson نشان دهنده تیتر ۲×۱۰^{۱۲} فاژ نو ترکیب بود. میزان مناسب فاژ برای انجام یک چرخه موفق panning بر روی سلول در حدود ۱۰۰۰ فاژ به ازای هر سلول است؛ بنابراین با توجه به اینکه که در هر چرخه panning106 عدد سلول استفاده شود، در حدود $۱۰^{۹}$ عدد فاژ برای هر چرخه استفاده شد.

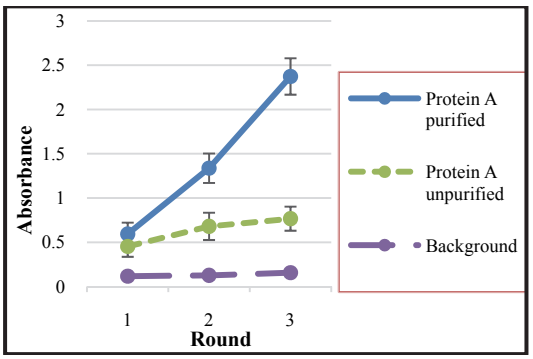
استراتژی‌های به کار گرفته شده برای انتخاب آنتی‌بادی علیه گیرنده HER2 به‌صورت شماتیک در تصویر شماره یک نشان داده شده است. هر کدام از مراحل انتخاب آنتی‌بادی علیه گیرنده HER2 به‌صورت موازی برای دو گروه فاژ خالص شده با پروتئین A و فاژ خالص نشده با پروتئین A انجام داده شد. نتایج شمارش کلونی در انتهای هر چرخه برای هر دو گروه نشان دهنده افزایش ۲ تا ۳ برابری تعداد کلونی‌ها در چرخه‌های متوالی panning بود. با پیشرفت چرخه‌های panning برای هر کدام از گروه‌ها تعداد کلونی‌های به دست آمده بیشتر شد تا در چرخه سوم به حداکثر میزان خود رسید. با این حال تفاوت معنی‌داری بین تعداد کلونی‌های به دست آمده در دو گروه فاژ خالص شده و خالص نشده با پروتئین A وجود نداشت (تصویر شماره ۲).



تصویر شماره ۳: تصویر الکتروفورز محصولات PCR بررسی تصادفی تعدادی از کلون‌ها از نظر وجود Insert. بررسی نتایج PCR در ۲۴ کلون انتخاب شده در انتهای چرخه سوم panning نشان داد که در گروه خالص نشده با پروتئین A ۴۱ درصد کلون‌ها حاوی insert بودند (A). در صورتی که در گروه خالص شده با پروتئین A ۸۷ درصد کلون‌ها حاوی insert بودند (B).



تصویر شماره ٤: نمودار درصد کلون‌های حاوی insert در دو گروه فاژ خالص شده و خالص نشده با پروتئین A. تعداد کلون‌های حاوی insert در گروه خالص شده با پروتئین A در طی چرخه‌های متوالی panning به‌صورت افزایشی بالا رفت و در چرخه سوم ۸۷ درصد کلون‌ها حاوی insert بود. در صورتی که در گروه خالص نشده با پروتئین A این میزان در انتهای چرخه سوم ۴۱ درصد بود.



تصویر شماره ٥: بررسی قابلیت اتصال کلون‌های انتخاب شده علیه گیرنده HER2 در دو گروه فاژ خالص شده و خالص نشده با پروتئین A. جذب نوری در آزمون الیزا با سلول‌های VERO/HER2 و فاژهای خالص شده با پروتئین A سبب بهبود قابل ملاحظه انتخاب آنتی‌بادی نسبت به گروه خالص نشده با پروتئین A می‌شود.

برای بررسی پیشرفت روند انتخاب آنتی‌بادی و همچنین برآورد میزان کلون‌های حاوی insert از کلونی‌های به دست آمده به‌صورت تصادفی PCR انجام شد (تصویر شماره۳). با افزایش چرخه‌های انتخاب در گروه فاژهای خالص شده با پروتئین A از تعداد کلون‌های Insert-free کاسته شد به صورتی که در آخرین چرخه panning ۸۷ درصد (۲۱ از ۲۴ کلون) کلون‌ها حاوی insert بودند در صورتی که در گروه خالص نشده با پروتئین A در چرخه انتهای panning در حدود ۴۱ (۱۰ تا از ۲۴ کلون) درصد کلون‌ها حاوی insert بودند (تصویر شماره۴).

قابلیت اتصال آنتی‌بادی‌های جداشده به سلول‌های هدف توسط آزمون phage-ELISA مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج phage-ELISA در گروه خالص شده با پروتئین A نشان دهنده افزایش قابل ملاحظه جذب نوری فاژهای متصل شده به سلول VERO/HER2 در چرخه‌های متوالی panning نسبت به گروه خالص نشده با پروتئین A است. به صورتی که روند افزایشی ملایم جذب نوری ثبت شده از چرخه‌های panning برای گروه خالص نشده با پروتئین A بیشتر نشان دهنده اتصال و تکثیر غیراختصاصی کلون‌های فاقد insert و میزان کمی کلون اختصاصی است (تصویر شماره ۵).

بحث

در این مطالعه اثر خالص‌سازی فاژهای نوترکیب توسط پروتئین A در بهبود انتخاب آنتی‌بادی علیه گیرنده HER2 مورد ارزیابی قرار گرفت. خالص‌سازی فاژهای نوترکیب در انتهای هر چرخه panning و انتخاب آنتی‌بادی با محصول خالص شده سبب کاهش چشمگیر میزان فاژهای نوترکیب فاقد قطعه آنتی‌بادی (insert-free clones) شد. از طرف دیگر میزان اختصاصیت آنتی‌بادی‌های به دست آمده از این طریق به میزان بسیار زیادی بهبود یافت. وجود فاژهای فاقد قطعه آنتی‌بادی از مشکلات و محدودیت‌های فناوری آنتی‌بادی فاژ است. فناوری کتابخانه آنتی‌بادی فاژ نسبت به روش‌های قدیمی مثل هیبریدما ارجحیت دارد، زیرا در این روش می‌توان آنتی‌ژن مورد نظر را خالص و به سطوح مخالف مثل پلیت ها و لوله‌های پلی استیرول، کاغذ نیتروسلولز، ذرات مگنت متصل کرد و سپس در فرآیند panning علیه آن آنتی‌بادی‌های مختلف تولید کرد (۱۴-۱۶). با این حال در این روش‌های احتمال ایجاد تغییرات ناخواسته در ساختار آنتی‌ژن در هنگام اتصال آنتی‌ژن بزرگ و پیچیده به سطوح وجود دارد که این خود مانع از تولید آنتی‌بادی‌های مناسب علیه اپیتوپ های فضایی می‌شود. انتخاب آنتی‌بادی به‌وسیله فناوری کتابخانه آنتی‌بادی فاژ در سطح سلول امکان جداسازی آنتی‌بادی‌های کاملاً عملکردی و اختصاصی را علیه اپیتوپ‌های فضایی فراهم آورده است (۱۶). بسیاری از گروه‌های پژوهشی در سراسر دنیا مشکلات مختلفی را از جمله شکست در انتخاب آنتی‌بادی‌های اختصاصی و به دست آوردن آنتی‌بادی‌های با میل اتصال پایین affinity را تجربه می‌کنند. به‌عنوان مثال استفاده از کتابخانه آنتی‌بادی فاژ Griffin برای جداسازی آنتی‌بادی علیه anthocyanin-1 (AN1) و دامین NAC پروتئین petunia موجب شکست در فرآیند انتخاب آنتی‌بادی شد. آنتی‌بادی‌های به دست آمده طی چرخه‌های متوالی انتخاب به‌خوبی جدا شده بودند ولی این آنتی‌بادی‌ها در آزمون الیزا و وسترن بلات قادر به شناسایی اهداف مورد نظر خود نبودند که این دلیل بر میزان بسیار پایین میل اتصال آنتی‌بادی‌های جداشده است (۶). برای درک این مشکل این محققان ۱۰۰ کلون مختلف را از طریق تعیین توالی مورد ارزیابی بیشتر قرار دادند. نتایج تعیین توالی نشان دهنده عدم وجود قطعه آنتی‌بادی بادی در اکثریت کلون‌های به دست آمده بود. به‌صورت مشابه نتایج آزمون PCR نیز نشان دهنده از دست رفتن insert در چرخه‌های متوالی انتخاب بود که این نتایج با نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر همخوانی دارد. در اینجا نیز نتیجه آزمون الیزا و PCR در گروه انتخاب با محصول خالص نشده با پروتئین A نشان دهنده عدم انتخاب آنتی‌بادی‌های اختصاصی پس از سه چرخه انتخاب است، به صورتی که اکثریت کلون‌ها پس از سه چرخه انتخاب فاقد insert بودند (تصویر شماره ۳ و ۴).

از دیگر دلایل شکست انتخاب آنتی‌بادی در چرخه‌های انتخاب، جدا نشدن آنتی‌بادی‌های با میل اتصال بالا از آنتی‌ژن خود با استفاده از روش‌های elution معمول است. آنتی‌بادی‌های با میل اتصال بالا به دلیل بالا بودن قدرت اتصال خود به آنتی‌ژن نیاز به تغییر در شرایط elution دارند. استفاده از triethylamine با pH=۱۲ به مدت ۳۰ دقیقه موجب جداسازی کارآمد آنتی‌بادی‌ها از اهداف خود می‌شود (۶). علاوه بر مشکلات ذکر شده، در مواردی که آنتی‌ژن مورد نظر در سطح سلول بیان می‌شود و مراحل انتخاب بر روی سلول زنده صورت می‌گیرد، آندوسیتوز فاژهای متصل به سطح سلول موجب عدم موفقیت در انتخاب کلون‌های با میل اتصال بالا نیز گزارش شده است. برای حل این مشکل کوتاه کردن زمان

آنکوباسیون کتابخانه آنتی‌بادی فاژ با سلول هدف یا انجام آنکوباسیون در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد پیشنهاد شده است (۱۶).

در یک مطالعه برای انتخاب آنتی‌بادی علیه CCR-5، استفاده از محلول شستشو با pH=۶/۵ موجب بهبود اختصاصیت کلون‌های به دست آمده شد (۱۷). به‌صورت مشابه در مطالعه دیگر اثر میزان pH محلول شستشو در دو گروه انتخاب آنتی‌بادی علیه disialoganglioside G_{D2} در سطح سلول زنده مورد بررسی قرار گرفت. استفاده از محلول شستشو (PBS به همراه Tween-20TPBS) با pH=۷/۵ برای انجام مراحل شستشو موجب انتخاب و غالب شدن کلون‌های فاقد insert شد، به صورتی که در آزمون الیزا و PCR بسیار از کلون‌ها غیراختصاصی بودند؛ در صورتی که استفاده از محلول TPBS با pH=۷/۵ موجب کاهش قابل توجه کلون‌های فاقد insert و غیراختصاصی از سطح سلول می‌شود. میزان کلون‌های حاوی insert در شرایط شستشو استاندارد ۷۳ درصد بود. در صورتی که با کاهش pH=۵ محلول شستشو این میزان به ۱۲ در صد رسید (۷). این نتایج نیز با نتایج به دست آمده در این مطالعه مطابقت دارد، به صورتی که در صورت انجام مراحل انتخاب به‌صورت معمول و استاندارد بسیاری از کلون‌ها فاقد insert هستند. با این کاهش pH محلول شستشو به‌عنوان یک راه‌حل برای حذف کلون‌های فاقد insert زمانی که هدف جداسازی آنتی‌بادی در شرایط کاملاً native و فیزیولوژیک است، منطقی به نظر نمی‌رسد، زیرا تغییرات pH موجب تغییرات در ساختار و عملکرد پروتئین‌های سطحی سلول خواهد شد. در نتیجه استفاده از روش به کار گرفته شده در این مطالعه به دلیل سازگاری کامل با شرایط طبیعی سلول امکان انتخاب آنتی‌بادی‌های مختلفی را در شرایط کاملاً فیزیولوژیک می‌دهد. از طرف دیگر اتصال فاژهای حاوی قطعه آنتی‌بادی به پروتئین A نه تنها از میزان کلون‌های فاقد insert و پس زمینه می‌کاهد، بلکه از این طریق کلون‌های عملکردی (functional) نیز انتخاب می‌شوند. به بیان دیگر این کلون‌ها نه تنها قابلیت اتصال اختصاصی به آنتی‌ژن را دارند، بلکه از دیگر جنبه‌های عملکردی آنتی‌بادی نیز فعال هستند (۱۲، ۱۳).

References

1. Hoogenboom HR. Selecting and screening recombinant antibody libraries. Nat Biotech. 2005;23(9):1105-1116.
2. Sergeeva A, Kolonin MG, Molldrem JJ, Pasqualini R, Arap W. Display technologies: Application for the discovery of drug and gene delivery agents. Advanced Drug Delivery Reviews. 2006;58(15):1622-1654.
3. Bradbury ARM, Sidhu S, Dubel S, McCafferty J. Beyond natural antibodies: the power of in vitro display technologies. Nat Biotechnol. 2011;29(3):245-254.
4. Smothers JF, Henikoff S, Carter P. Affinity Selection from Biological Libraries. Science. 2002;298(5593):621-2.
5. Thie H, Meyer T, Schirrmann T, Hust M, Dubel S. Phage display derived therapeutic antibodies. Curr Pharm Biotechnol. 2008;9(6):439-446.
6. de Bruin R, Spelt K, Mol J, Koes R, Quattrocchio F. Selection of high-affinity phage antibodies from phage display libraries. Nature Biotechnol. 1999;17(4):397-399.
7. Tur MK, Huhn M, Sasse S, Engert A, Barth S. Selection of scFv phages on intact cells

under low pH conditions leads to a significant loss of insert-free phages. Biotechniques. 2001;30(2):404-408.

8. Chasteen L, Ayriss J, Pavlik P, Bradbury AR. Eliminating helper phage from phage display. Nucleic Acids Res. 2006; 34(21):e145.
9. Lu J, Sloan SR. An alternating selection strategy for cloning phage display antibodies. J Immunol Methods. 1999; 228(1-2): 109-119.
10. Krebber A, Bornhauser S, Burmester J, Honegger A, Willuda J, Bosshard HR, et al. Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system. J Immunol Methods. 1997;201(1):35-55.
11. Guo J, Catchmark JM, Mohamed MN, Benesi AJ, Tien M, Kao TH, et al. Identification and characterization of a cellulose binding heptapeptide revealed by phage display. Biomacromolecules. 2013;14(6):1795-1805.
12. de Wildt RM, Mundy CR, Gorick BD, Tomlinson IM. Antibody arrays for high-throughput screening of antibody-antigen interactions. Nat Biotechnol. 2000;18(9):989-994.
13. Lee CM, Iorno N, Sierro F, Christ D. Selection of human antibody fragments by phage display. Nat protoc. 2007;2(11):3001-3008.
14. Hust M, Maiss E, Jacobsen HJ, Reinard T. The production of a genus-specific recombinant antibody (scFv) using a recombinant potyvirus protease. J Virol Methods. 2002;106(2):225-233.
15. Hawlisch H, Muller M, Frank R, Bautsch W, Klos A, Kohl J. Site-specific anti-C3a receptor single-chain antibodies selected by differential panning on cellulose sheets. Anal Biochem. 2001;293(1):142-145.
16. Eisenhardt SU, Schwarz M, Bassler N, Peter K. Subtractive single-chain antibody (scFv) phage-display: tailoring phage-display for high specificity against function-specific conformations of cell membrane molecules. Nat protoc. 2007;2(12):3063-3073.
17. Osbourn JK, Earnshaw JC, Johnson KS, Parmentier M, TimmermansV, McCafferty J. Directed selection of MIP-1 alpha neutralizing CCR5 antibodies from a phage display human antibody library. Nat Biotechnol. 1998;16(8):778-781.