تركيب البلاسميدين pTMES وpRMES لاختبار قدرتهما على التعبير عن الأضداد النانوية من خلال المحضض T7 عالي الفعالية

هبه مسعود[1] ومحمود قويدر[2] و عبد القادر عبادي[3]

تاريخ الإيداع 2012/11/19
قبل للنشر في 2013/03/04

الملخص

تعدُّ تقانة الأضداد النانوية Nanobodies من طرائق البيولوجيا الجزيئية الواعدة، التي تجري من خلال الهندسة الوراثية لنوع خاص من الأضداد ذات السلاسل الثقيلة فقط (heavy chain antibodies) التي تتميز بها عائلة الجمال Camelidea، بحيث تُمكن من الحصول على بروتينات صغيرة الحجم تُدعى بالأضداد النانوية (Nanobodies)، التي تمتاز بكونها عالية الثباتية والانحلالية وقادرة على الارتباط بمستضدها النوعي. تُنسَّل مورثات الأضداد النانوية خلال مراحل إنتاجها ضمن بلاسميدات أنظمة التعبير البروتيني مما يسمح بإنتاجها بصورة مستمرة وثابتة لاستخدامها في أهداف بحثية وتطبيقية.

هَدَف العمل إلى تصميم بلاسميدين جديدين يسمحان بتنسيل مورثات الأضداد النانوية بداخلهما، بحيث يُعَبّر عنها بشكل قوي من خلال المحضض T7 (T7 promoter) عالي الفعالية، ومن ثَمَّ يزيد من كمية الأضداد النانوية الناتجة، وقد أطلق على هذين البلاسميدين اسم pRMES وpTMES. وقد اختُبرت كفاءتهما في التعبير عن الضدين النانويين NbBruc02 وNb16M، إذْ أظهر البلاسميد pTMES قدرة على تحسين شروط إنتاج هذين الضدين. يمكن لهذين البلاسميدين الجديدين من خلال خصائصها المتنوعة أن يمثلا أدوات فعالة لإنتاج البروتينات المؤشبة عموماً بما فيها الأضداد النانوية.

الكلمات المفتاحية: الأضداد النانوية، التنسيل المورثي، المحضض T7 والتعبير البروتيني.

[1] طالبة ماجستير، [2] أستاذ مشرف، قسم علم الحياة الحيوانية، كلية العلوم، جامعة دمشق، سورية.
[3] أستاذ مشرف مشارك، قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية، هيئة الطاقة الذرية السورية، سورية.

Construction of pRMES and pTMES plasmids to test their expression ability of Nanobodies via the efficient T7 promoter

H. Masoud[(1)]; M. Quider[(2)] and A.Q. Abbady[(3)]

Received 19/11/2012

Accepted 04/03/2013

ABSTRACT

Nanobody technology is considered as a promising molecular biology technique performed by means of the genetic engineering of special type of antibodies, existing exclusively in Camelidea. It enables the obtaining of small proteins, referred to as Nanobodies, which are characterized by high stability and solubility, are able to link to their specific antigens. After production, the Nanobody genes are cloned within plasmids of protein expression in bacteria, allowing their stable and continuous production for research and applied purposes.

This work aimed to design new plasmids for Nanobody genes cloning in order to ensure a strong expression via the efficient T7 promoter, thus enhancing the quantity of the produced Nanobodies. These plasmids were called pRMES and pTMES and their ability to express Nanobodies, NbBruc02 and Nb16M, was tested. The plasmid pTMES showed an enhanced production condition of this Nanobody. These new plasmids, by their variable characteristics, could represent efficient tools for general production of recombinant proteins, including Nanobodies.

Key words: Nanobodies, cloning, T7 promoter and protein expression.

[(1)]MSC., Student, [(2)] Superviser, Department of Animal Biology, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria.

[(3)]Associated Supervisor, Department of Molecular Biology and Biotechnology, Atomic Energy Commission of Syria (AECS), Damascus, Syria.

المقدمة

تطورت تقانة الأضداد النانوية حديثاً بعد اكتشاف الأجسام المضادة في عائلة الجمال Camelidea (camels and llamas) التي تمتلك السلاسل الثقيلة فقط، خلافاً للأضداد التقليدية التي تتألف من سلسلتين ثقيلتين وسلسلتين خفيفتين (Hamers-Casterman *et al.*, 1993). والأهم من ذلك هو أن عملية عزل المنطقة الفعالة وإنتاجها من السلسلة الثقيلة (المجال المتغيّر) لهذه الأضداد، التي تدعى VHH أو Nanobody (الضد النانوي)، تجري بطرائق الهندسة الوراثية، بحيث تتسل ضمن بلاسميدات أنظمة التعبير البروتيني في البكتريا، مما يسمح بإنتاج مستمر وثابت لأي من الأضداد النانوية ذات الفعالية والأهمية البحثية والتطبيقية (Arbabi Ghahroudi *et al.*, 1997). فالأضداد النانوية هي عبارة عن بروتينات مؤشبة صغيرة يبلغ وزنها الجزيئي 15 كيلو دالتون، ولها القدرة على الارتباط بشكل تام بمستضدها النوعي بقدرة الأضداد العادية نفسها (Frenken *et al.*, 2000).

تمتاز الأضداد النانوية بنوعيتها العالية للهدف وسميتها المنخفضة، وبسهولة إنتاجها ضمن البكتريا بطرائق الهندسة الوراثية وبتكاليف منخفضة (Wesolowski *et al.*, 2009). وهي أكثر ثباتاً على مقاومة درجات الحرارة وتغيرات الحموضة، وتبقى قادرة على الارتباط بالمستضد في الأوساط المرجعة، كما أنها تحتفظ بفاعليتها في أثناء مرورها بالمعدة والأمعاء (Harmsen and De Haard, 2007). وقد أنتج عدد من الأضداد النانوية القادرة على تشخيص العوامل الممرضة كالفيروسات وأنواع من البكتريا وحتى أنواع من الديدان الطفيلية (Deckers *et al.*, 2009).

كما استُخدمت في الكشف عن بكتيريا البروسيلا المسببة لمرض الحمى المالطية ذات الانتشار الواسع (Glynn and Lynn, 2008)، وقد أُنشئت في هيئة الطاقة الذرية السورية مكتبة الأضداد النانوية، ومن ثم عُزِلَ عدد من الأضداد النانوية القادرة على ربط مستضدات البروسيلا الأكثر استمناعية (Abbady *et al.*, 2011). من أهم الأضداد النانوية التي عزلت بهذه الطريقة كان الضد NbBruc02 الذي تمتع بقدرة على تمييز البروسيلا عن عدد من السلالات البكتيرية الأخرى، وقد حُدّدَ مستضد هذا الضد النانوي على أنه بروتين الصدمة الحرارية GroEL باستخدام طرائق بروتيومية متنوعة (proteiomics) (Abbady *et al.*, 2012). كما أثبت قدرة هذا الضد النانوى على ربط مستضده بنوعية عالية حتى عندما يكون بشكله المؤشب (Abo Assali *et al.*, 2012). كما عُزل مؤخراً الضد النانوي Nb16M من هذه المكتبة؛ وقد أبدى نوعية عالية تجاه متعدد السكريد اللبيدي للبروسيلا بوجه خاص (Naoufi *et al.*, 2010).

يعدُّ توافر مورثة الأضداد النانوية المنتقاة من أهم ما يميز الأضداد النانوية، إذْ تكون منسلة في واحد من بلاسميدات التعبير البروتيني، مما يسمح بسهولة منابلتها مورثياً

باستخدام تقانات التنسيل المورثي لإنتاج أضداد نانوية مدمجة مع جزيئات وظيفية وحيوية كالأنزيمات أو حتى مع أنواع مختلفة من المركبات (Desmyter *et al.*, 1996). وقد قام حديثاً فريق من العلماء بتصميم أضداد نانوية قادرة على استهداف نوع معين من البروتينات على سطح الخلايا السرطانية، مما يتيح توجيهاً أدق للمعالجة باتجاه الأنسجة الورمية تحديداً (Revets *et al.*, 2005).

تتضمن مراحل إنتاج الأضداد النانوية تقانة الفاجات العارضة Phage display (Revets *et al.*, 2005)، وهي تقانة جزيئية تعتمد على عرض الأضداد النانوية على سطح الفاجات انطلاقاً من مكتبة مورثية لكامل التراكيب الضدية النانوية النوعية؛ وذلك في خلايا البكتريا (Winter *et al.*, 1994). وحتى الآن فإن أبرز البلاسميدات المستخدمة في إنتاج الأضداد النانوية – مثل البلاسميدين $pHEN_4$ و$pMES_4$ - هي تلك التي تعتمد المحضض المنخفض الفعالية Plac promoter وهو بهذه الخاصية يمكن من إتمام مراحل انتقاء الأضداد النانوية عندما تكون معروضة على سطح الفاجات. إذْ تتميّز هذا البلاسميدات بمجال مورثي يسمح عند تنسيل الضد النانوي ضمنه بالتعبير عن هذا الضد في الفراغ البلازمي المحيطي periplasm من خلال التسلسل الإشاري القائد pelB الذي يضاف إلى الضد النانوي من الطرف الأميني، كما يضاف إلى الضد من الطرف الكربوكسيلي بروتين المعطف الفيروسي PIII، وهذان المكونان مهمان جداً من أجل سير عملية انتقاء الأضداد النانوية بتقانة الفيروس العارض (Azzazy and Highsmith, 2002; Revets *et al.*, 2005).

إن واحدة من أهم مشكلات هذا النوع من بلاسميدات المحضض Plac هي مردودية الإنتاج المنخفضة للتعبير البروتيني في معظم حالات الأضداد النانوية المختارة، في حين توفر بعض الأنظمة البلاسميدية ذات المحضض T7 promoter الشديد النشاط ذو الأصل الفيروسي خياراً بديلاً من أجل الحصول على تعبير بروتيني قوي في البكتريا. إذْ يحرض المُحضض T7 على انتساخ المورثة ومن ثمَّ إنتاج حصيلة كبيرة من البروتين المطلوب، ويتطلب ذلك وجود مصدر للـ RNA T7 بوليمراز الفيروسي بشكل خاص، ضمن الخلية المضيفة الذي لا ينتج ضمن خلايا طلائعيات النواة، ولذلك تُستخدم سلالات البكتريا E coli BL(DE3) المحورة بالمورثة RNA T7 بوليمراز (Studier and Moffatt, 1986)، بحيث يمكن استخدامها كمضيف مناسب للتعبير عن هذه البلاسميدات بعد إضافة مضاهئ اللاكتوز IPTG (Steen *et al.*, 1986).

قمنا في هذا العمل باستخدام شدفة من الدنا تحتوي كامل المجال المورثي لموقع تنسيل الضد النانوي من البلاسميد pMES4 في تصميم بلاسميدين جديدين أطلقنا عليهما اسم pRMES وpTMES وذلك باستخدام بلاسميدين يمتلكان المحضض T7 وهما pRSET وpET-22b، على التسلسل. ولاختبار كفاءة النظامين الجديدين نُسّلت مورثتا الضدين

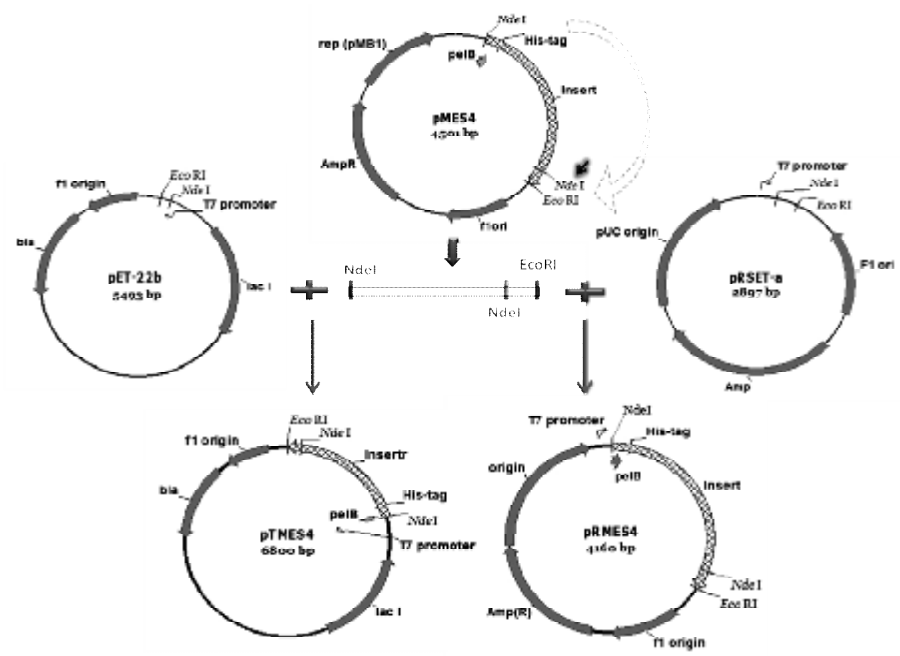
النانويين NbBruc02 وNb16M في كل منهما وقُورنت فعالية التعبير البروتيني. أثبت النظام الجديد pTMES إمكانية واعدة من أجل استخدامه في إنتاج الأضداد النانوية ذات الأهمية الطبية والتطبيقية التي عزلت والتي قد تعزل مستقبلاً.

مواد البحث وطرائقه

1- تنسيل شدفة البلاسميد pMES4 ضمن البلاسميدات ذات المحضض T7 العالي الفعالية:

بدأ العمل بالحصول على شدفة مهيئة من الدنا adaptor من البلاسميد pMES4، الذي يستخدم في إنشاء المكتبة المورثية للأضداد النانوية، إذ تمتلك هذه الشدفة عدداً من مواقع أنزيمات التقييد الخاصة بهذه الغاية، كما تملك التسلسل الإشاري القائد signal pelB الذي يعمل على إفراز الضد النانوي المنتج في السيتوبلاسما المحيطية. استُخرجت هذه الشدفة من البلاسميد بعد قطعه بأنزيمي التقييد NdeI وEcoRI (Fermentas)، وأُجريت هذه العملية على عدة مراحل، حيث قطع البلاسميد بالهضم الجزئي partial digestion باستخدام الأنزيم NdeI نظراً إلى امتلاكه موقعي قطع لهذا الإنزيم، بعدها استخلصت شدفة القطع المناسبة من الهلامة ونقيت وقطعت بالأنزيم الثاني، وهكذا حصلنا على شدفة مهيئة بطول 1401bp واقعة ضمن موقعي التقييد NdeI وEcoRI. نسلت هذه الشدفة المهيئة في بلاسميدين خاضعين للمحضض T7 هما البلاسميد pRSET (Invitrogen) والبلاسميد pET-22b (Novagen) فحصلنا على بلاسميدين جديدين أطلقنا عليهما: pRMES وpTMES، على التسلسل (الشكل 1).

عُومل البلاسميدين بأنزيمي التقييد نفسيهما NdeI وEcoRI، ثم أُجريت عملية الربط ligation باستخدام كيت Ready-To-Go™ T4 DNA ligase Kit (GE healthcare) بعدة نسب (3:1) (6:1) لكل من البلاسميدين والشدفة، على التسلسل. استخدم ناتج الربط في تحوير السلالة E. coli TOP10 بطريقة الصعق الكهربائي electroporation ونميت البكتريا المحورة على أوساط حاوية على الأمبسلين 100µg\ml (Applichem). بعد النمو، اختُبر عدد من المستعمرات النامية على أطباق الاستنبات بتفاعل بلمرة PCR باستخدام مَرئسات نوعية خاصة بالمحضض T7 (T7-F / T7-R) (جدول 1) وذلك لانتقاء المستعمرات الجرثومية الحاوية على التراكيب البلاسميدية الصحيحة. تضمن برنامج البلمرة التمسخ البدئي initial denaturation مدة دقيقتين في الدرجة 95°م اتبعت هذه الخطوة 35 دورة تتضمن كل منها الخطوات الثلاث (التمسخ denaturation في الدرجة 94°م مدة 30 ثانية، والالتحام annealing في الدرجة 58°م مدة 45 ثانية، والاستطالة extantion في الدرجة 72°م مدة 1.5 دقيقة). بعد إجراء التفاعل رُحّلت الشدف الناتجة على هلامة الأغاروز (1%) بوجود موقي الرحلان الكهربائي TAE (40mM Tris-base, 1mM EDTA, 0.1% acetic acid and pH:7). نميت المستعمرات الموجبة وعزلت منها البنى البلاسميدية بوساطة Plasmid Miniprep Kit (Qiagen)، وقيسَ تركيزها.



الشكل (1) مخطط توضيحي يمثل خطوات تركيب البلاسميدات pRMES وpTMES

تمتلك البلاسميدات المصممة العديد من الميزات المهمة التي تسمح بالتعبير القوي عن المورثة المرمزة للبروتين المؤشب وتنقيته: إذْ تحوي التسلسل الإشاري القائد pelB الذي يعمل على إفراز البروتين في الوسط المحيط (periplasm)، مورثة مقاومة للأمبسلبين ampicillin resistant gene: تساعد على انتقاء المستعمرات الإيجابية الحاوية على البلاسميد ضمن أوساط الاستنبات الحاوية على الصاد الحيوي، واسمة الهيستيدين Histidine tag: تساعد على تنقية البروتين المأشوب وكشفه بالضد النوعي للهيستيدين anti-His في تقنيات المقايسة والتبصيم المناعيين، أصل التضاعف Origin replication: تمكن البلاسميد من التضاعف ضمن الـ E. coli، فضلاً عن مواقع أنزيمات التقييد التي يمكن باستخدامها في تنسيل مورثات الأضداد النانوية في البلاسميد.

الجدول (1) المرئسات المستخدمة في انتقاء المستعمرات الحاوية على التراكيب البلاسميدية الصحيحة.

البروتوكول	اسم المرئسة	التسلسل النكليوتيدي للمرئسة	الطول
المرئسات الخاصة بالبلاسميد pMES4	pMES-F	TACCTATTGCCTACGGCAGC	20
	pMES-R	AACAGTGGAACCGTAGTCCG	20
المرئسات الخاصة بالمحضض T7	TF	TAATACGACTCACTATAGGG	20
	TR	TAGTTATTGCTCAGCGGTGG	20

2- تنسيل مورثة الضد النانوي ضمن البلاسميدات pTMES وpRMES

لمقارنة كفاءة البلاسميدين الجديدين، نُسّلتْ مورثتا الضدين النانويين NbBruc02 وNb16M النوعيين للبروسيلا. تم الحصول على مورثتي هذين الضدين بدءاً من البلاسميد pHEN4 (منه اشتق البلاسميد pMES4 المستخدم في الدراسة) المنسلتين بداخله الذي يمتلك المحضض Plac ذا الفعالية المعتدلة، وذلك من خلال معاملة هذا البلاسميد فضلاً عن البلاسميدين pRMES وpTMES بأنزيمي التقييد NcoI وEcoRI، وبعد ترحيل ناتج القطع على هلامة الأغاروز، نقيت الشدف المناسبة من البلاسميدين، وكذلك شدفتا مورثتا الضدين النانويين من الهلامة باستخدام الكيت Promega Wizadr ® SV Gel and PCR clean-up system وقيس تركيز الشدف جميعها، ثم أُجريت عملية الربط ligation بين شدفة كل من الضدين النانويين وكل من البلاسميدين على حدة بنسبة (5:1) لكل من البلاسميد وشدفة الضد النانوي، على التسلسل. بعد ذلك استخدم ناتج الربط في تحوير السلالة E. coli TOP10 بطريقة الصعق الكهربائي أيضاً، ونميت البكتريا المحورة على أوساط حاوية على الأمبسلين. وبعد النمو، اختُبر عدد من المستعمرات النامية على أطباق الاستنبات بتفاعل بلمرة PCR باستخدام مرئسات نوعية خاصة بالبلاسميد pMES4 (pMES-F pMES-R) (الجدول 1)، بالدرجة 48 °م كحرارة مناسبة لالتحام هذه المرئسات، وذلك لانتقاء المستعمرات الجرثومية التي تملك التراكيب البلاسميدية الصحيحة الحاوية على الأضداد النانوية. نميت المستعمرات الموجبة وعزلت منها البنى البلاسميدية، وقيسَ تركيزها.

3- التعبير عن الأضداد النانوية من البلاسميدين pRMES وpTMES

بعد إدخال البنى البلاسميدية الحاوية على مورثات الأضداد النانوية، التي عزلت من المستعمرات البكتيرية الموجبة، إلى سلالة التعبير البروتينيE. coli BL-21(DE3) Rosetta، نميت في صفائح الاستنبات الخلوي ذات 12 بئراً في 2ml من وسط الاستنبات Terrific Broth (17mM KH_2PO_4, 72mM K_2HPO_4, 1.2% Tryptone, 2.4% Yeast Extract, 0.8% Glycerol, 2mM $MgCl_2$ and 0.1% Glucose)، المضاف إليه أمبيسيلين، وذلك في الدرجة 17°م وبسرعة دوران لا تقل عن 200RPM وذلك بالنسبة إلى البكتريا E.coli Wk6 الحاوية على البلاسميد $pHEN_4$ لاستخدامه شاهداً للمقارنة، في حين استخدم الوسط Luria Bertani broth (LB) (1% Trypton, 0.5% Yeast Extracts and 171mM NaCl) المزود بالمضاد الحيوي أيضاً لباقي البنى البلاسميدية الجديدة، وعند تحقق العكارة المطلوبة OD_{600}=0.5، أُضيفت مادة IPTG (IsoPropelβ-D-ThioGalactoside) (Promega) لتحريض عملية التعبير البروتيني في وسط الاستنبات، حيث أُضيفَ تركيز 1M إلى الوسط وحُضّنَ مدة 16 ساعة في حالة البلاسميد pHEN4، في حين استخدم التركيز 0,5mM للبنى الجديدة وأُجري الحضن مدة 4 ساعات

فقط. بعد انتهاء التحريض، ثُقّل الوسط وجُمّع الراسب الجرثومي ومن ثم حُطّم بوساطة الضغط الحلولي لاستخراج بروتينات البلاسما المحيطية، إذْ تتضمن هذه الطريقة حضن البكتريا 10 دقائق في موقٍ ذي ضغط حلولي مرتفع حاوٍ على تركيز عالٍ من السكروز TES buffer (50mM Tris-base, 5mM EDTA and 20% Sucrose)، ثم ثُقّلتْ ونُقلتْ إلى محلول بارد ذي ضغط حلولي منخفض 5mM $MgSO_4$ عشر دقائق مجدداً.

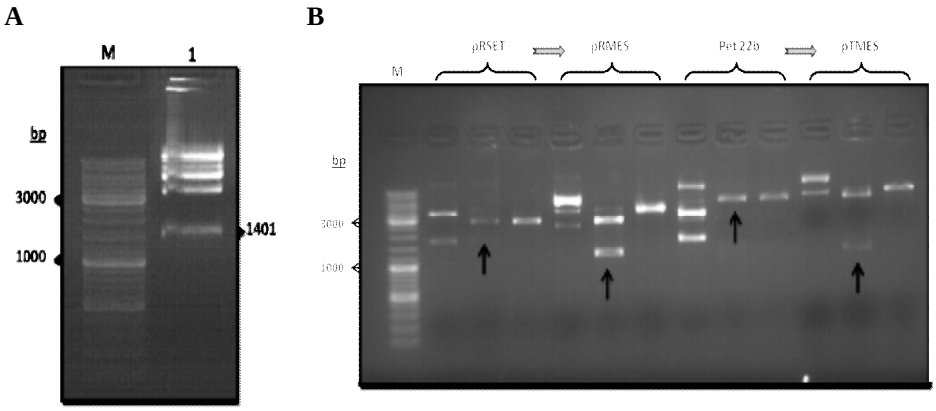
بعد التعبير، استخدمت هلامة سلفات دودوسيل الصوديوم متعدد الأكريلاميد SDS-PAGE (المتضمنة لهلامة التكديس stacking gel 4% ولهلامة الفصل running gel 12%)، بغية ترحيل عينات بروتينية ممثلة للشروط كلّها ضمن موقي الترحيل (25mM Tris-base, 200mM glycine and 0.1% SDS)، وبعد هجرة البروتينات في الهلامة، لُوّنتْ بمحلول أزرق الكوماسي (0.25% Coomassie Brilliant Blue R250 (Sigma), 40% methanol and 10% acetic acid))، ومن ثم نُقلتْ إلى محلول إزالة الصبغة حتى ظهور العصائب البروتينية.

النتائج

1- عزل الشدفة المأخوذة من البلاسميد pMES4 وتنسيلها:

عُولج البلاسميد pMES4 بأنزيم التقييد NdeI باستخدام القطع الجزئي للبلاسميد عن طريق التحكم بأزمنة القطع، وذلك بسبب امتلاك الشدفة المطلوبة لموقع قطع داخلي لهذا الإنزيم، أظهرت نتيجة القطع بعد ترحيلها على هلامة الأغاروز شدفة بطول 4501bp ناتجة عن قطع البلاسميد في واحد من موقعي هذا الأنزيم وشدفاً أخرى أصغر بطول 3233bp و1268bp ناتجة عن قطع البلاسميد في الموقعين معاً. نُقّيت الشدفة الكبيرة الأولى من الهلامة ومن ثم عُوملت بأنزيم القطع EcoRI، إذْ أعطت عدداً من الشدف التي من بينها الشدفة المطلوبة بطول 1401bp وهي الحاوية في نهايتيها على موقعي أنزيمي التقييد NdeI وEcoRI، حيث نُقّيت من الهلامة (الشكل A2).

كما عُومل كلا البلاسميدين pET-22b وpRSET بالأنزيمين السابقين EcoRI – NdeI ونُقّيت الشدف الناتجة ومن ثم رُبطت مع شدفة البلاسميد pMES4 السابقة لإنتاج البنى البلاسميدية المطلوبة. وباستخدام نواتج التنسيل السابقة حُوّرت السلالة E. coli TOP10 ومن ثم نُمّيتْ على أوساط انتقائية.



الشكل (2) إنشاء البنى البلاسميدية

(A) تظهر في الهلامة شدفة الدنا المطلوبة بطول 1401bp بعد معاملتها بأنزيمي التقطيع EcoRI وNdeI، وذلك مقارنة بالمسار M واسم الدنا الجزيئي (DNA marker). (B) التأكد من البنى البلاسميدية الناتجة عن التنسيل بتفاعل القطع. إذ يظهر في الشكل ناتج معاملة البلاسميدات pRSET وpET-22b وpTMES وpRMES بأنزيمي التقييد NdeI وEcoRI كلٍّ على حدة، حيث رُحّلت كل من هذه البلاسميدات إمّا دون قطع (مسار1) أو بعد قطعه بالأنزيم NdeI (مسار2)، أو الأنزيم EcoRI (مسار3)، المسار M واسم الدنا الجزيئي.

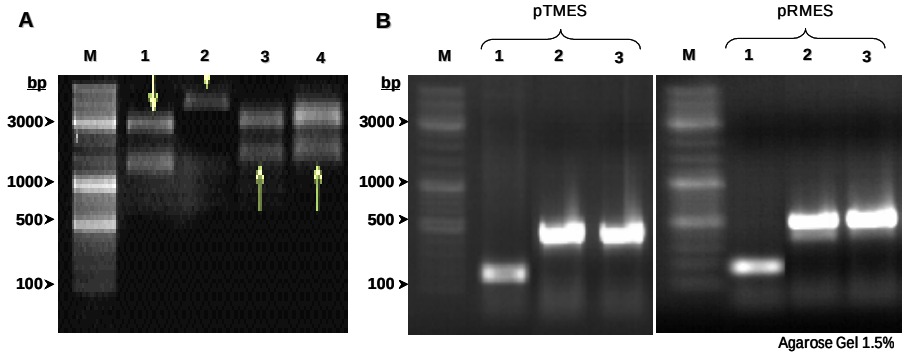
2- التحقق من صحة البنى البلاسميدية بتفاعل القطع

للتحقق من صحة تنسيل الشدفة في البلاسميدين، عُزلت البنى البلاسميدية من المستعمرات الإيجابية وعُوملت بأنزيمي التقييد نفسيهما NdeI وEcoRI كلٌّ على حدة، كما استخدمت البلاسميدات الأصلية شاهداً سلبياً (الشكل B2)، إذْ نلاحظ على هلامة الرحلان أن معاملة البنيتين البلاسميديتين pTMES وpRMES بأنزيم القطع NdeI تؤدي إلى ظهور شدفتين بالأطوال المتوقعة، مما يدلُّ على وجود موقعي قطع لهذا الإنزيم، وذلك ضمن الشدفة المدخلة مقارنة بظهور شدفة واحدة ناتجة عن القطع بهذا الإنزيم في البلاسميدات الأصلية pET22b وpRSET، في حين تظهر شدفة واحدة في حال القطع بالأنزيم الآخر EcoRI وتكون أطول في البنى البلاسميدية الجديدة منها في البلاسميدات الأصلية.

3- تنسيل مورثات الأضداد النانوية

أُجريت عملية القطع لكلا البلاسميدين الجديدين فضلاً عن البلاسميدين المشتقين من pHEN4 (منه اشتق البلاسميد pMES4 المستخدم في الدراسة) الحاويين على مورثتي الضدين النانويين NbBruc02 وNb16M؛ وذلك باستخدام أنزيمي التقييد NcoI وEcoRI. وبعد ذلك رُحّل ناتج القطع بهدف تنقية الشدف المطوبة بعد اقتطاعها من الهلامة (الشكل A3)، وبعد الحصول على التراكيز المطلوبة منها أُجريت أربعة تفاعلات لربط كل

بلاسميد إلى كل من شدفتي مورثتي الضدين النانويين بحيث حصلنا على البنى البلاسميدية الآتية: pTMES-NbBruc02 وpTMES-Nb16M وpRMES-NbBruc02 وpRMES-Nb16M.



الشكل (3) تنسيل مورثات الأضداد النانوية في البلاسميدين pTMES وpRMES

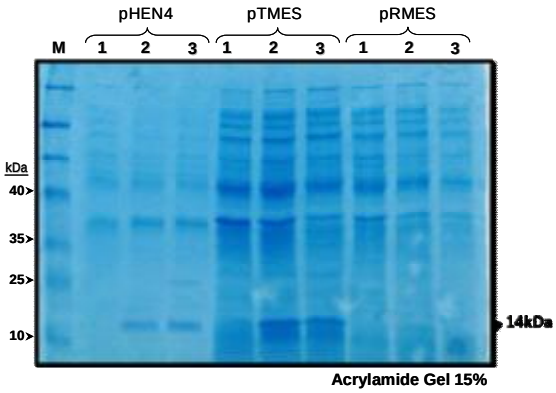
(A) رُحّل ناتج القطع بأنزيمي التقييد NcoI وEcoRI لكل من البلاسميد pRMES (مسار1) والبلاسميد pTMES (مسار2) والبلاسميد pHEN4-NbBruc02 (مسار3) والبلاسميد pHEN4-Nb16M (مسار4)، إذْ تشير الأسهم إلى الشدف التي نُقّيت من الهلامة لاستخدامها في تنسيل مورثات الأضداد النانوية. يظهر المسار 1 و2 الشدف العلوية بطول (2819bp وpRMES 5459bp) التي تمثل شدف البلاسميدات التي ستسخدم لتنسيل مورثات الأضداد النانوية بداخلها، في حين تظهر المسارات 3 و4 شدفاً سفلية بطول 1637bp تمثل الشدفة الحاوية على مورثات الأضداد النانوية. ويمثل المسار M واسم الدنا الجزيئي. (B) اختبار المستعمرات الجرثومية المحورة بالبنى البلاسميدية بتفاعل البلمرة باستخدام المرئستين pMES-F/R بعد تطبيقه على مستعمرة سالبة (مسار1) أو موجبة للضد النانوي NbBruc02 (مسار2) أو موجبة للضد النانوي Nb16M (مسار3) وذلك في كل من البلاسميدين pTMES وpRMES، كما يحتوي المسار M واسم الدنا الجزيئي (DNA marker).

حُوّرت السلالة E. coli TOP10 بنتائج تفاعلات الربط، ومن ثم نُمّيتْ على أوساط انتقائية. أُجري بعد ذلك تفاعل بلمرة لعدد من المستعمرات النامية للتأكد من صحة عملية الربط، إذْ تظهر بنتيجة إجراء التفاعل مباشرة على المستعمرات وباستخدام المرئسات (pMES-F/ pMES-R) تضخيم شدفة بطول 166bp إن كانت النتيجة سلبية، في حين تظهر المستعمرات الإيجابية التي تملك البلاسميد الحاوي على الضد النانوي شدفاً بطول 500bp لكلا البلاسميدين (الشكل B3).

4- التعبير البروتيني للأضداد النانوية

نقلت البنى البلاسميدية الحاوية على مورثات الأضداد النانوية إلى سلالة التعبير البروتيني E. coli BL-21(DE3) Rosetta، حيث حُرّض التعبير البروتيني في الخلايا،

ومن ثم أُجريت عملية الرحلان الكهربائي للخلاصات البروتينية المحضرة بعد تحـــريض التعبير للضدين النانويين NbBruc02 وNb16M الموجودين ضـــمن البنـــى البلاســـميدية الجديدة، وكذلك ضمن البلاسميد الأصلي pHEN4 ذي المحضض Plac المعتدل الفعالية؛ وذلك بهدف المقارنة (الشكل 4)، وقد تبيّن بوضوح زيادة في إنتاجيـــة هـــذين الـــضدين النانويين باستخدام البلاسميد pTMES مقارنة بالبلاسميد الأصلي، في حين أخفق البلاسميد pRMES كلياً في التعبير عن أي من الضدين.



الشكل (4) مقارنة التعبير البروتيني للضد النانوي.

التعبير البروتيني للضدين النانويين NbBruc02 (مسار2 من كل مجموعة) وNb16M (المسار3 من كـــل مجموعة) ضمن البلاسميدات pHEN4 وpTMES وpRMES، في حين مثل المسار1 من كل مجموعـــة التعبير البروتيني من البلاسميدات الشاهدة؛ وذلك بغياب مورثة الأضداد النانوية. المسار M سلم البروتينات الجزيئي (Protein marker) إذْ أشير إلى أطوال بعض العصابات البروتينية، كما يشير السهم إلى اليمـــين (14kDa) إلى الوزن الجزيئي المتوقع للأضداد النانوية المعبّر عنها.

المناقشة

تتشابه الأضداد النانوية والتقليدية في كونهما تستخدمان في العديد من تطبيقات التقانة الحيوية مثل التبصيم المناعي (Western Blot)، والمقايسة المناعية الإنزيمية (ELISA) والقيـــــاس الخلـــــوي بالتـــــدفق (Flow Cytometry) والترســـــيب المنـــــاعي (Immunoprecipitation) والمناعة النسيجية (Immunohistochimestry) وغيرها مـــن التطبيقات المهمة، فضلاً عن أهميتها كأدوات علاجية واعدة لعدد من الأمراض (Deffar et al., 2009). وعلى الرغم من الصعوبة البالغة في عملية إنتاج هذا النوع من الأضداد مقارنة بالأضداد التقليدية – وخاصة المتعددة النسائل - إلا أن الناتج النهائي فـــي هـــذه الحالة يتمثل في الحصول على كمية ومصدر مستمر من الأضداد المتماثلة النقية والعالية

النوعية نحو مستضداتها. إذْ تتضمن مراحل إنتاج الضد النانوي عزل مورثة هذا الضد والتعبير عنها بطريقة مؤشبة في البكتريا من خلال البلاسميد الحاوي على هذه المورثة، ومن ثمَّ فإن تطوير نظام عالي الكفاءة لإنتاج الأضداد النانوية النوعية لا بدَّ أن يكون على درجة عالية من الأهمية، وهذا ما عُولج في هذا العمل.

اعتمدنا في مخطط تصميم البنى البلاسميدية ذات المحضض T7 اللازمة للدراسة على البلاسميد pMES4 الخاص بإنتاج الضد النانوي نفسه، وهو مشتق من البلاسميد الأولي pHEN4 (Arbabi Ghahroudi et al., 1997)، فذلك من شأنه أن يحافظ على بيئة الضد النانوي البروتينية دون أدنى تغيير في حال نقل مورثته إلى إحدى هذه البنى البلاسميدية الجديدة، كما أنَّ عملية نقل مورثة الضد النانوي من البلاسميد الأصلي يمكن أن تجري – كما فعلنا في هذه الدراسة – بعملية تنسيل جزئي Sub-cloning باستخدام أنزيمات التقييد نفسها المستخدمة خلال مراحل إنتاج الأضداد النانوية، مما يعنى ملاءمتها الأكيدة للأضداد النانوية كلها المنتجة، أو تلك التي ستُنتج لاحقاً.

وبعد نجاح تجميع هذه البنى البلاسميدية اختُبرت من خلال إدخال مورثتي ضدين نانويين هما NbBruc02 و Nb16M في كلاَ البلاسميدين والتأكد من صحة التنسيل من خلال تفاعل قطع باستخدام أنزيمات التقييد المناسبة، وقد استخدمت هذه البنى البلاسميدية الجديدة في تحوير بكتريا مضيفة (E. coli) من النمط DE3 وهو ما تتطلبه عادة أنظمة التعبير ذات المحضض T7 (Studier and Moffatt, 1986). وقد أخضعت البكتريا المحورة بعد ذلك لاختبار التعبير البروتيني وفق الشروط الأكثر مناسبة لكل بنية بلاسميدية، وقورنت كمية الضد النانوي المعبر عنه من كل بنية بلاسميدية بكمية الضد النانوي من البلاسميد الأصلي pHEN4. باعتبار الشروط المخففة للاستنبات في حالة البلاسميدين الجديدين مقارنة بالبلاسميد الأصلي، الذي يتطلب عادة وسطاً عالي التغذية (Terrific Broth) من جهة ومدة حضن طويلة مقارنة بحالة البلاسميدين الجديدين. أظهر البلاسميد pTMES قدرة واضحة على التعبير البروتيني عن الضدين النانويين. وقد يتطلب الأمر أيضاً اختبار فعالية هذين الضدين النانويين المعبر عنهما نحو مستضداتهما النوعية للتأكد من ملاءمة هذا النظام بشكل تام لاستخدامه في التعبير البروتيني. سيتعين في المرحلة القادمة اختبار كفاءة هذا النظام وثباتيته مع أضداد نانوية لمستضدات أخرى. وتجريب عدد أكبر من شروط الاستنبات والتحريض بهدف اختيار أفضل الظروف للتعبير عن الأضداد النانوية باستخدام هذا النظام.

يمكن مستقبلاً التفكير في استخدام هذا النظام الجديد ليس للتعبير عن الأضداد النانوية بكميات كبيرة فحسب وإنما كنظام T7 جديد من أجل إنتاج الأضداد النانوية بحد ذاتها، وذلك انطلاقاً من مرحلة إنشاء المكتبة المورثية للجمل الممنع بالمستضد المدروس مروراً بمرحلة الفيروس العارض phage display التي يتطلبها غربلة الأضداد النانوية النوعية

للمستضد من تلك المكتبة (Muyldermans *et al.*, 2009). المؤسف بالأمر هو أنّ العناصر جميعها (pelB, GIII, F-origin) التي يتطلبها نجاح هذا النظام متوافرة في البلاسميد pRMES تحديداً، وهذا الأمر يدعونا إلى إعادة تقييم فعالية هذا البلاسميد ومحاولة معرفة هل كان إخفاقه أمراً بنيوياً عاماً أو أنه يتعلق بالأضداد النانوي تحديداً، ومن ثمَّ يمكن أن تتغيّر النتيجة باستخدام بروتينات مؤشبة أخرى، وهو ما ينبغي العمل عليه في المراحل القادمة، فمشكلة اختلاف انسجام البروتين المؤشب - الضد النانوي في هذه الحالة- مع البلاسميد المستخدم في التعبير البروتين هي أمر شائع الحدوث ولا يمكن تفسيرها دوماً.

يمكن اختبار البلاسميدين pTMES وpRMES كأنظمة عالية الكفاءة لإنتاج العديد من البروتينات المؤشبة، خاصة وأنها تقدم حلاً لتجنب فقدان البروتينات لبنيتها الفراغية وترسبها في السيتوبلاسما ضمن ما يعرف بالأجسام الضمنية inclusion bodies في أثناء عملية التعبير البروتيني باستخدام الأنظمة ذات المحضضات العالية الفعالية، فوجود التسلسل الإشاري القائد pelB في الطرف الأميني من البروتين المعبّر عنه سيوجه البروتين إلى الفراغ البلازمي المحيطي حيث يطرح هناك؛ مما يسهل استخلاصه من خلال عملية تحطيم سريعة للجدر الخلوية بطريقة الصدمة الحلولية (Rathore *et al.*, 2003).

كما يحتوي البروتين المؤشب المنتج وفق البلاسميد pTMES على واسمة الهيستيدين السداسية 6xHistidine tag من الناحية الكربوكسيلية للبروتين الحر، لأنّها مرمزة من قبل تسلسل يسبق مرمز التوقف الشرطي أمبر (amber TAG). في حين أن البروتين المندمج مع بروتين المعطف الفيروسي GIII يحتوي على واسمة إضافية هي المعينة المستضدية HA التي تفصل بين البروتينين المندمجين، وذلك نظراً إلى وجود التسلسل المرمز لهذه الواسمة في بنية البلاسميد بعد مرمز التوقف الشرطي مباشرة. يعد تنوع الواسمات الذي يمنحه هذا النظام بغاية الأهمية من أجل الكشف عن البروتين المؤشب في الخلاصة البكتيرية باستخدام أضداد نوعية لكل من هاتين الواسمتين، خاصة وأنه غالباً ما يترافق فقدان الضد النوعي للواسمة قدرته على كشفها بتغير طبيعة التطوية folding التي يتخذها البروتين المؤشب بعد التعبير عنه. كما أن وجود الواسمة سداسية الهيستيدين يتيح سهولة التنقية باستخدام الأعمدة الحاوية على شوارد النيكل ذات الألفة العالية لواسمة الهيستيدين (Crowe *et al.*, 1996).

من ناحية أخرى، يمكن الاستفادة من مورثة بروتين المعطف الفيروسي GIII في البلاسميد pTMES، لإنتاج بنية مندمجة مع البروتين المنسل المدروس، ولتحقيق هذه الغاية يجب التعبير البروتيني في نوع خاص من الخلايا E. coli (DE3) من النمط SupE لأنّها غير قادرة على تمييز مرمز التوقف الشرطي الذي يفصل مورثة الضد النانوي عن

مورثة المعطف الفيروسي، ومن ثمَّ البدء بترجمة المرمز الإشاري ثم المورثة المنسلة (الضد النانوي مثلا) ومن ثم مورثة بروتين المعطف الفيروسي GIII والانتهاء بعدها مباشرة، ومن ثمّ إنتاج البروتين المندمج الكامل. ويعدُّ استخدام أنظمة البنى المندمجة ذا أهمية كبيرة في عدد من حالات البروتينات الصغيرة (<10 كيلودالتون) صعبة الانحلال وضعيفة الثباتية، وحتى بالنسبة إلى البروتينات ذات الخصائص السامة للخلية. ويعدُّ بروتين المعطف الفيروسي GIII من البروتينات العالية الانحلالية المستخدمة في العديد من الحالات شأنه في ذلك شأن بروتين الفلورة الخضراء GFP العالي الذوبانية (Al-Homsi *et al.*, 2012; Hall, 2007).

إن خاصية ربط البروتين المدروس ببروتين المعطف الفيروسي GIII ذات أهمية خاصة نظراً إلى أنّها تتيح إمكانية عرض هذا البروتين على سطح الفاج الخيطي M13(Beckmann *et al.*, 1998)، وهو أمر مهم جداً خاصة في عدد من التطبيقات الطبية والعلاجية (Sergeeva *et al.*, 2006)، كما أنها تدخل في تطوير لقاحات vaccines جديدة باستخدام المستضدات البروتينية للعوامل الممرضة (Petrenko, 2008)، فعملية كتلك كفيلة بأن تضاعف قدرة هذه المستضدات على تحفيز النظام المناعي للمضيف أضعافاً كثيرة مقارنة بالحالة المفردة أو حتى المندمجة مع بروتين المعطف الفيروسي GIII، ناهيك عن سهولة تحضير الفاجات العارضة للمستضدات بكميات كبيرة مقارنة بتحضير المستضدات البروتينية النقية من الخلاصات البكتيرية. وفي الختام يمكن للأنظمة البلاسميدية التي قمنا بتطويرها بنتيجة هذه الدراسة أن تكون بمنزلة أدوات واعدة لاستخدامها - ليس في تحسين إنتاجية الأضداد النانوية فحسب - ولكن في العديد من تطبيقات التعبير البروتيني.

REFERENCES المراجع

Abbady, A. Q., Al-Daoude, A., Al-Mariri, A., Zarkawi, M., and Muyldermans, S. (2012). Chaperonin GroEL a Brucella immunodominant antigen identified using Nanobody and MALDI-TOF-MS technologies. Vet. Immunol. Immunopathol. 146, 254-263.

Abbady, A. Q., Al-Mariri, A., Zarkawi, M., Al-Assad, A., and Muyldermans, S. (2011). Evaluation of a nanobody phage display library constructed from a Brucella-immunised camel. Vet. Immunol. Immunopathol. 142, 49-56.

Abo Assali, L., Al-Mariri, A., Hamad, E., and Abbady, A.Q. (2012). Immunodetection of the recombinant GroEL by the Nanobody NbBruc02. World J. Microbiol. Biotechnol. 28, 2987-2995.

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 J. Biol. Sci. 5, 279-288.

Arbabi Ghahroudi, M., Desmyter, A., Wyns, L., Hamers, R., and Muyldermans, S. (1997). Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. FEBS Lett. 414, 521-526.

Azzazy, H. M., and Highsmith, W. E., Jr. (2002). Phage display technology: clinical applications and recent innovations. Clin. Biochem. 35, 425-445.

Beckmann, C., Haase, B., Timmis, K. N., and Tesar, M. (1998). Multifunctional g3p-peptide tag for current phage display systems. J. Immunol. Methods 212, 131-138.

Crowe, J., Masone, B.S., and Ribbe, J. (1996). One-step purification of recombinant proteins with the 6xHis tag and Ni-NTA resin. Methods Mol. Biol. 58, 491-510.

Deckers, N., Saerens, D., Kanobana, K., Conrath, K., Victor, B., Wernery, U., Vercruysse, J., Muyldermans, S., and Dorny, P. (2009). Nanobodies, a promising tool for species-specific diagnosis of Taenia solium cysticercosis. Int. J. Parasitol. 39, 625-633.

Deffar, K., Shi, H., Li, L., Wang, X., and Zhu, X. (2009). Nanobodies - the new concept in antibody engineering. Afr. J. Biotechnol. 8, 2645-2652.

Desmyter, A., Transue, T.R., Ghahroudi, M.A., Thi, M.H., Poortmans, F., Hamers, R., Muyldermans, S., and Wyns, L. (1996). Crystal structure of a camel single-domain VH antibody fragment in complex with lysozyme. Nat. Struct. Biol. 3, 803-811.

Frenken, L.G., van der Linden, R.H., Hermans, P.W., Bos, J.W., Ruuls, R.C., de Geus, B., and Verrips, C.T. (2000). Isolation of antigen specific llama VHH antibody fragments and their high level secretion by Saccharomyces cerevisiae. J. Biotechnol. 78, 11-21.

Glynn, M.K., and Lynn, T.V. (2008). Brucellosis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 233, 900-908.

Hall, J.P. (2007). Applying Fusion Protein Technology to E. coli. BioPharm Int.

Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., Songa, E.B., Bendahman, N., and Hamers, R. (1993). Naturally occurring antibodies devoid of light chains. Nature 363, 446-448.

Harmsen, M.M., and De Haard, H.J. (2007). Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. Appl. Microbiol. Biotechnol. 77, 13-22.

Muyldermans, S., Baral, T. N., Retamozzo, V. C., De Baetselier, P., De Genst, E., Kinne, J., Leonhardt, H., Magez, S., Nguyen, V.K., Revets, H., et al. (2009). Camelid immunoglobulins and nanobody technology. Vet. Immunol. Immunopathol. 128, 178-183.

Naoufi, A., Khdrawi, A., Al-Mariri, A., Mourad, A.R., and Abbady, A.Q. (2010). Applying Nanobody phage display technology to distinguish between Brucella and Yersinia Lipopolysaccharids. J Agricult Chem Biotech 1 177 – 184.

Petrenko, V. (2008). Evolution of phage display: from bioactive peptides to bioselective nanomaterials. Expert Opin. Drug. Deliv. 5, 825-836.

Rathore, A.S., Bilbrey, R.E., and Steinmeyer, D.E. (2003). Optimization of an osmotic shock procedure for isolation of a protein product expressed in E. coli. Biotechnol. Prog. 19, 1541-1546.

Revets, H., De Baetselier, P., and Muyldermans, S. (2005). Nanobodies as novel agents for cancer therapy. Expert Opin. Biol. Ther. 5, 111-124.

Sergeeva, A., Kolonin, M.G., Molldrem, J.J., Pasqualini, R., and Arap, W. (2006). Display technologies: application for the discovery of drug and gene delivery agents. Adv. Drug Del. Rev. 58, 1622-1654.

Steen, R., Dahlberg, A.E., Lade, B.N., Studier, F.W., and Dunn, J.J. (1986). T7 RNA polymerase directed expression of the Escherichia coli rrnB operon. EMBO J. 5, 1099-1103.

Studier, F. W., and Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. J. Mol. Biol. 189, 113-130.

Wesolowski, J., Alzogaray, V., Reyelt, J., Unger, M., Juarez, K., Urrutia, M., Cauerhff, A., Danquah, W., Rissiek, B., Scheuplein, F., et al. (2009). Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. Med. Microbiol. Immunol. 198, 157-174.

Winter, G., Griffiths, A.D., Hawkins, R.E., and Hoogenboom, H.R. (1994). Making antibodies by phage display technology. Annu. Rev. Immunol. 12, 433-455.