● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ بیست‌ودوم، شمارهٔ ۶، ص۶۱۳-۶۰۲، ۱۳۹۴

مقالهٔ پژوهشی

تهیه آنتی‌بادی نوترکیب scFv بر ضد پروتئین سطحی P30 توکسوپلاسما گوندی

مهدی گلچین*[۱]، محدثه نخعی مقدم[۲]، سعیدرضا نورالهی فرد[۳]

خلاصه

مقدمه: توکسوپلاسما گوندی (Toxoplasma gondii)، انگل داخل سلولی اجباری با شیوع گسترده می‌باشد که قادر است همه میزبانان خونگرم شامل انسان و حیوانات اهلی را آلوده کند. بیشتر موارد آلودگی در انسان بعد از خوردن گوشت خام یا نیم‌پز آلوده به کیست‌های بافتی اتفاق می‌افتد. بنابراین، روش‌های گوناگونی برای شناسایی این انگل در مواد غذایی آلوده به کار برده شده است. آنتی‌بادی‌های نوترکیب نسل جدیدی از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال می‌باشند که اغلب توسط فن‌آوری نمایش بر روی سطح فاژ از لیبراری‌های فاژی ایمن یا غیر ایمن علیه آنتی‌ژن مورد نظر جدا می‌گردند و از آن‌ها جهت تشخیص تعداد زیادی از آنتی‌ژن‌ها و همچنین امور درمانی استفاده می‌شود. هدف از انجام این تحقیق، جداسازی آنتی‌بادی‌های مونوکلونال نوترکیب علیه این انگل مهم بود.

روش: آنتی‌ژن سطحی توکسوپلاسما گوندی خالص شده P30 روی سطح ایمونوتیوب‌ها پوشانده شد تا به عنوان یک هدف برای انتخاب آنتی‌بادی‌هایی از لیبراری‌های فاژی تاملینسون I و J نوع scFv استفاده شود. کلون‌های حامل آنتی‌بادی‌های اختصاصی توسط سه مرحله اتصال، جداسازی و تکثیر جدا شد. آنتی‌بادی‌های scFv انتخاب شده برای شناخت آنتی‌ژن فوق توسط آزمایش‌های ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)، Dot blot و Western blot مورد سنجش قرار گرفت.

یافته‌ها: آنتی‌بادی‌های نوترکیبی که قادر به شناخت آنتی‌ژن P30 با میل ترکیبی بالا بودند، جدا شدند و اختصاصی بودن آن‌ها تأیید گردید.

نتیجه‌گیری: آنتی‌بادی‌های تک زنجیره‌ای محلول جدا شده، گزینه‌های مناسبی برای استفاده در کیت‌های تشخیصی جهت شناسایی انگل توکسوپلاسما گوندی در نمونه‌های آلوده می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌بادی نوترکیب، توکسوپلاسما گوندی، scFv، P30

۱- دانشیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران ۲- دکتری حرفه‌ای دامپزشکی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران ۳- دانشیار، گروه انگل‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

* **نویسنده مسؤول، آدرس پست الکترونیک:** golchin@uk.ac.ir

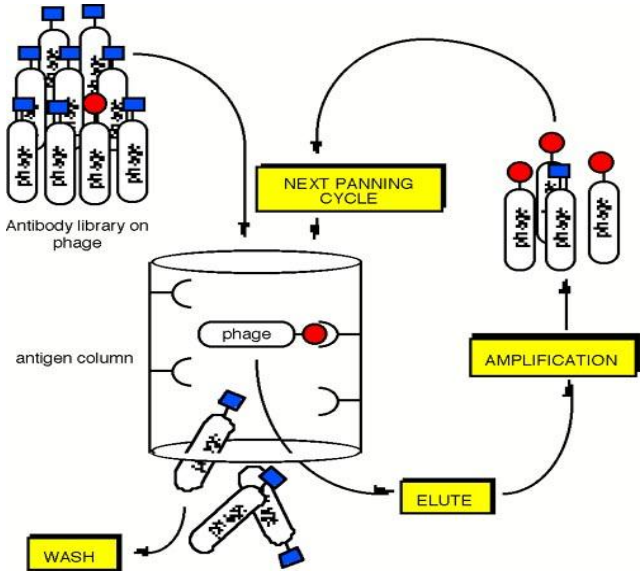
دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۳/۲ **دریافت مقاله اصلاح شده:** ۱۳۹۳/۹/۹ **پذیرش مقاله:** ۱۳۹۳/۱۰/۱۷

مقدمه

بیماری توکسوپلاسموز (Toxoplasmosis)، بیماری مشترکی بین انسان و دام با شیوع بسیار گسترده در سراسر جهان می باشد. عامل این بیماری تک یاخته، توکسوپلاسما گوندی (Toxoplasma gondii) است که می‌تواند باعث آلودگی انسان از طریق استفاده مواد غذایی و آب آلوده به کیست انگل، خوردن گوشت های نپخته آلوده و همچنین انتقال از طریق جفت به جنین شود. از میان این عوامل، خوردن گوشت های نپخته آلوده در طول دوران بارداری، مهم‌ترین عامل خطر محسوب می‌شود. بنابراین با تشخیص صحیح و سریع مواد غذایی آلوده، می توان از مصرف آن ها توسط افراد در معرض خطر مانند زنان باردار و افراد دارای نقص در سیستم ایمنی و وقوع بیماری جلوگیری نمود. روش‌های تشخیصی مختلفی جهت تشخیص بیماری توکسوپلاسموز و یا آلودگی به انگل توکسوپلاسما گوندی انجام شده است که از آن جمله می توان به روش های سرولوژی، تکثیر یک توالی خاص اسید نوکلئیک با روش PCR (Polymerase chain reaction)، روش‌های بافت‌شناسی و جداسازی ارگانیسم از نمونه های آلوده اشاره کرد (۱). استفاده از روش‌های آزمایشگاهی که مبتنی بر به کارگیری آنتی بادی های اختصاصی علیه این تک یاخته هستند، می‌تواند روشی سریع، ارزان و قابل انجام برای تشخیص نمونه‌های آلوده در مکان‌های مختلف باشد (۳، ۲).

امروزه علاوه بر تولید آنتی‌بادی‌ها در بدن حیوانات، آن‌ها را مانند پروتئین‌های نوترکیب دیگر می‌توان با کمک روش‌های مهندسی ژنتیک و با استفاده از وکتورهای خاص و فن‌آوری‌های بیولوژی مولکولی، در داخل سلول‌های باکتری، مخمر، گیاهان و محیط‌های کشت سلولی تهیه کرد (۵، ۴). توجه اصلی در این فن آوری، جایگاه محل اتصال آنتی‌بادی‌ها با آنتی‌ژن (نواحی متغیر) می‌باشد. برای این‌که امکان تولید مقدار زیادی آنتی‌بادی در موجودات ساده‌ای مانند باکتری‌ها به وجود آید، بقیه ساختمان آنتی‌بادی‌ها (نواحی ثابت) حذف گردیده، در بیشتر موارد به دو شکل Fab و scFv ساخته می‌شود. این دو شکل (Fab و scFv) آنتی‌بادی‌های نوترکیب را می‌توان از روی کلون‌های سلول‌های B با استفاده از روش PCR تولید نمود و یا با کلون نمودن تعداد بسیار زیادی (Library) ژن نواحی متغیر آنتی‌بادی‌ها در داخل فاژمید وکتورها، به این امر مهم دست یافت (۶). این مجموعه‌های بسیار بزرگ که به صورت‌های طبیعی و یا سنتتیک ساخته شده‌اند، می‌توانند بر روی سطح باکتریوفاژهایی مانند M13 بیان شوند (۷، ۴).

جداسازی آنتی‌بادی‌های نوترکیب علیه یک آنتی‌ژن از دو مرحله اصلی مواجه کردن لیبراری فاژ آنتی‌بادی با آنتی‌ژن (Panning) و غربالگری (Screening) تشکیل شده است. طی مرحله اول، لیبراری فاژ آنتی‌بادی در مجاورت آنتی‌ژن مورد نظر قرار داده می‌شود تا پس از اتصال، فاژهای متصل نشده به آنتی‌ژن طی چندین مرحله شستشو خارج گردند و تنها فاژهای باقی‌مانده از مرحله رهاسازی (Elution) دوباره به دست آیند. بیشتر این فاژها به طور اختصاصی به آنتی‌ژن اتصال پیدا می کنند و هر روشی که بتواند فاژهایی را که به آنتی‌ژن متصل می‌شوند از آن‌هایی که متصل نمی‌شوند، تفکیک نماید، به عنوان روش جداسازی مورد استفاده قرار می گیرد. در مرحله بعد و با انجام غربالگری تعداد زیادی آنتی‌بادی، آن‌هایی که خواص مطلوب بیشتری دارند، شناسایی می‌شوند (شکل ۱) (۴).



شکل ۱. *نمای شماتیک مراحل جداسازی فاژ آنتی‌بادی‌های اختصاصی علیه آنتی‌ژن مورد نظر (٤)*

لیبراری‌های تاملینسون I و J یکی از جدیدترین لیبراری‌های نیمه ساختگی هستند که به وسیله مرکز مهندسی پروتئین شهر کمبریج (انگلستان) توزیع شده‌اند. هر لیبراری شامل بیش از ۱۰۰ میلیون ژن scFv متفاوت می‌باشد که در یک فاژمید وکتور مقاوم به آمپی‌سیلین که مشتق از وکتور pHEN1 است و pIT2 نامیده می‌شود، کلون شده است (۸). این لیبراری‌ها را می‌توان با استفاده از فن‌آوری نمایش روی سطح فاژ و همچنین روش‌های معمول جداسازی، برای به دست آوردن scFv علیه هر مولکول هدفی استفاده کرد. از scFvهای جدا شده برای کاربردهای مشابه آنتی‌بادی‌های مونوکلونال مانند ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)، Western blot، FACS (Fluorescence-activated cell sorting)، ایمونوشیمی و... استفاده می‌گردد (۱۱-۹).

با توجه به در اختیار داشتن لیبراری‌های تاملینسون I و J و عدم تولید آنتی‌بادی‌های نوترکیب از نوع scFv علیه آنتی‌ژن سطحی P30 توکسوپلاسما گوندی و همچنین مزایای این نوع آنتی‌بادی‌ها، هدف از انجام تحقیق حاضر جداسازی آنتی‌بادی‌های اختصاصی (مونوکلونال) به شکل scFv از لیبراری‌های تاملینسون I و J علیه آنتی‌ژن سطحی P30 توکسوپلاسما گوندی و ارزیابی فعالیت تعدادی از کلون‌های جدا شده علیه این آنتی‌ژن بود تا در آینده بتوان از آنتی‌بادی‌های اختصاصی احتمالی جدا شده جهت موارد تشخیصی مواد غذایی آلوده به این انگل استفاده نمود.

روش بررسی

این مطالعه تحقیقی در سال ۹۱-۱۳۹۰ در محل دانشکده دام‌پزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان صورت گرفت. در این تحقیق از آنتی‌ژن خالص P30 تک یاخته توکسوپلاسما گوندی (Serotec, UK) استفاده گردید. رقت‌های مختلف از این پروتئین که به صورت لیوفیلیزه ارسال شده بود، با استفاده از محلول PBS (Phosphate buffered saline) تهیه شد و مورد استفاده قرار گرفت.

از لیبراری‌های scFv آنتی‌بادی تاملینسون I و J مربوط به مرکز مهندسی پروتئین شورای تحقیقات پزشکی (Medical Research Counci یا MRC) کمبریج انگلستان که هر کدام

بیش از ۱۰۰ میلیون تنوع داشت و ژن آن ها در فاژمید وکتور pIT2 کلون شده بود، استفاده گردید. به همراه این لیبراری ها، سلول های باکتریایی اشریشیاکلی سویه TG1 (جهت تکثیر فاژ آنتی بادی) و سویه HB2151 برای تولید scFvهای محلول و همچنین، فاژ کمکی KM13 و یک نسخه از دستورالعمل مربوط ارسال شده بود (۸).

مطابق دستورالعمل مربوط به استفاده از لیبراری‌ها (۸) و به منظور جداسازی فاژ آنتی بادی های اختصاصی از هر لیبراری، ایمونوتیوب‌ها (Nunc, Denmark) با ۴ میلی‌لیتر آنتی ژن P30 (غلظت ۰/۵ میکروگرم در میلی لیتر) به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی گراد پوشانده شدند. پس از شستشوی ایمونوتیوب‌ها با محلول PBS، فضاهای خالی بر روی سطح آن‌ها با افزودن بافر مسدود کننده Milk Phosphate-Buffered Saline (MPBS) (Maravel, UK) ۴ درصد مسدود گردید. سپس 10^{13} فاژ آنتی بادی از هر لیبراری (که از قبل با بافر مسدود کننده مخلوط و به مدت یک ساعت در دمای آزمایشگاه نگهداری شده بود) به ایمونوتیوب مربوط اضافه شد. لوله ها بعد از ۲ ساعت، ۲۰ مرتبه با محلول PBS/Tween20 شستشو گردیدند تا فاژ آنتی‌بادی‌هایی که نمی‌توانستند به آنتی‌ژن اتصال یابند، از محیط ایمونوتیوب‌ها خارج شود.

در مرحله بعد، رهاسازی فاژ آنتی‌بادی‌های اتصال یافته با افزودن آنزیم تریپسین به غلظت ۱ میلی گرم در میلی‌لیتر انجام شد و به دنبال آن سلول‌های باکتریایی سویه TG1 با این فاژها آلوده گردید. جهت تکثیر فاژهای رهاسازی شده در داخل سلول باکتری، فاژ کمکی KM13 اضافه شد و فاژ آنتی بادی های تکثیر شده برای دور بعدی جداسازی مورد استفاده قرار گرفت. در مجموع برای به دست آوردن آنتی‌بادی‌های دارای میل ترکیبی بالا و اختصاصی، سه مرحله جداسازی انجام شد. تیتر فاژهای اضافه شده و رهاسازی شده در هر دور از جداسازی با آلوده کردن سلول‌های باکتریایی سویه TG1 و شمارش تعداد کلنی ها بر روی محیط آنتی‌بیوتیک‌دار TYE انجام گرفت.

برای تهیه scFvهای محلول (بدون فاژ) از فاژ آنتی بادی های به دست آمده از دورهای دوم و سوم جداسازی، سلول باکتری اشریشیاکلی سویه HB2151 مورد استفاده قرار گرفت (۸). در این سویه باکتریایی بعد از ژن آنتی بادی، کدون TAG به عنوان کدون خاتمه شناخته می شود و بنابراین ساخت فاژ انجام نمی گیرد. بدین منظور ۲۰۰ میکرولیتر از سویه باکتری HB2151 که در مرحله رشد لگاریتمی قرار داشت، با ۱۰ میکرولیتر از فاژهای رهاسازی شده مربوط به دور دوم و سوم هر لیبراری آلوده گردید و باکتری های مذکور بر روی محیط جامد TYE حاوی آنتی‌بیوتیک کشت داده شد.

جهت ارزیابی کلون های دورهای دوم و سوم جداسازی در شناخت آنتی ژن P30 توکسوپلاسما گوندی با آزمایش مونوکلونال ELISA، ۱۶ کلونی مربوط به دور دوم و ۳۱ کلونی مربوط به دور سوم جداسازی از هر لیبراری در خانه‌های یک پلیت کشت سلول ۹۶ خانه‌ای استریل حاوی محیط 2xTY و آمپی سیلین کشت داده شد و پس از رسیدن به مرحله رشد لگاریتمی، محلول IPTG (Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) با غلظت نهایی ۱ میلی مولار اضافه شد تا scFvهای محلول در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد بیان گردند.

به طور هم‌زمان ۹۴ خانه از یک پلیت ELISA با قدرت جذب بالا (Nunc, Denmark) و غلظت ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر با آنتی‌ژن P30 توکسوپلاسما گوندی، یک خانه از پلیت با پروتئین BSA (Bovine serum albumin) (Merck, Germany) و یک خانه دیگر با scFv ضد آنتی ژن K99 به عنوان کنترل منفی آنتی‌ژن پوشانده شد و سپس با محلول ۳ درصد BSA بلوک گردید. در مرحله بعد ۱۰۰ میکرولیتر از مایع محیط کشت واجد scFvهای محلول به خانه مربوط بر

روی پلیت ELISA انتقال داده شد. آنتی‌بادی‌های اتصال یافته با استفاده از آنتی‌بادی ضد c-myc (Roche, Germany) و آنتی‌بادی ضد ایمونوگلوبولین‌های موشی متصل به آنزیم HRP (Horseradish peroxidase) (Sigma, USA) با غلظت ۱ در ۲۰۰۰ و سوبسترای TMB (Tetramethylbenzidine) (Sigma, USA) تشخیص داده شدند.

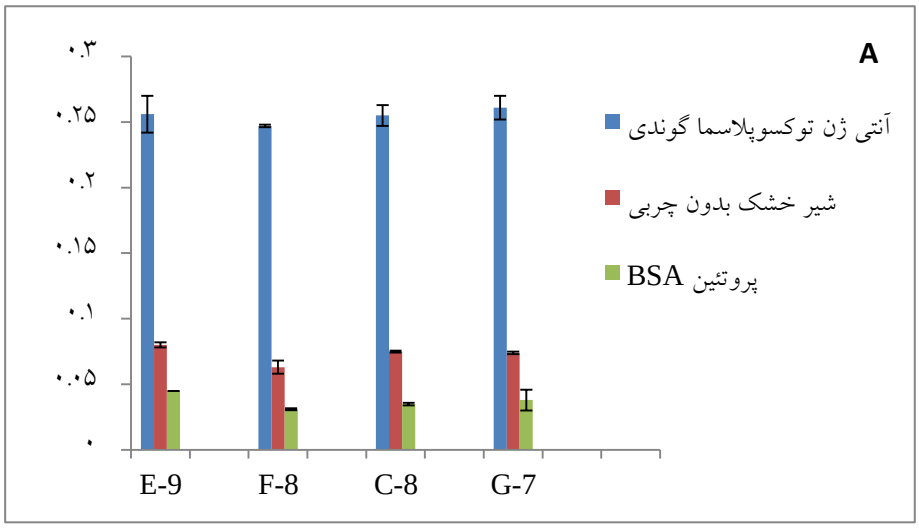
به منظور پی بردن به عملکرد اختصاصی کلون‌های انتخابی و به دنبال آزمایش فوق، آزمایش ELISA دیگری بر روی ۴ کلون از هر لیبراری که بیشترین واکنش را با آنتی ژن داشتند، انجام شد. در این آزمایش با استفاده از آنتی‌ژن‌های P30، محلول ۲ درصد شیر خشک بدون چربی در PBS (MPBS) به عنوان کنترل منفی آنتی‌ژن و محلول ۳ درصد BSA به عنوان کنترل منفی آنتی‌ژن دیگر، به صورت دوگانه و مشابه روش مذکور انجام گرفت.

برای انجام آزمایش Dot blot، ۳ میکرولیتر آنتی‌ژن P30 و ۳ میکرولیتر پروتئین ۳ درصد BSA به صورت نقطه ای بر روی ۸ قطعه غشای نیتروسلولزی (Schleicher and Schuell, Germany) ریخته شد. جهت انجام آزمایش Western blot مطابق دستورالعمل استاندارد آن (۱۲)، آنتی ژن P30 در ۸ چاهک از یک ژل SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis) رانده شد و سپس با استفاده از دستگاه Mini-PROTEAN 3 (BioRad, USA) به غشای نیتروسلولزی منتقل گردید. در ادامه تمام غشاهای نیتروسلولزی با استفاده از محلول ۲ درصد MPBS بلوک شده، سپس به آن‌ها scFv آنتی‌بادی‌های مربوط به ۸ کلون مختلف از مرحله جداسازی (که بیشترین واکنش را در آزمایش ELISA با آنتی ژن نشان داده بودند)، به صورت جداگانه اضافه شد و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. تشخیص واکنش بین scFvهای محلول با آنتی ژن قرار گرفته بر روی غشاهای نیتروسلولزی با استفاده از آنتی بادی ضد c-myc و آنتی بادی ضد ایمونوگلوبولین های موشی متصل به آنزیم HRP با غلظت ۱ در ۲۰۰۰ و همچنین، استفاده از سوبسترای (Sigma, USA) 4-chlro-1-naphtol انجام گرفت.

جهت سنجش وجود ژن‌های کامل scFv (قطعات VH و VL) در ۸ کلون انتخاب شده از لیبراری های تاملینسون I و J، آزمایش PCR بر روی پلاسمیدهای استخراج شده از این کلون‌ها به وسیله کیت استخراج پلاسمید (Bioneer, Korea) و با استفاده از آغازگرهای LMB3 (5'_CAGGAAACAGCTATGAC-3) و pHEN seq (5'-CTATGCGGCCCCATTCA-3') (۸) و دستگاه ترموسایکلر (BioRad, USA Minicycler) انجام گردید.

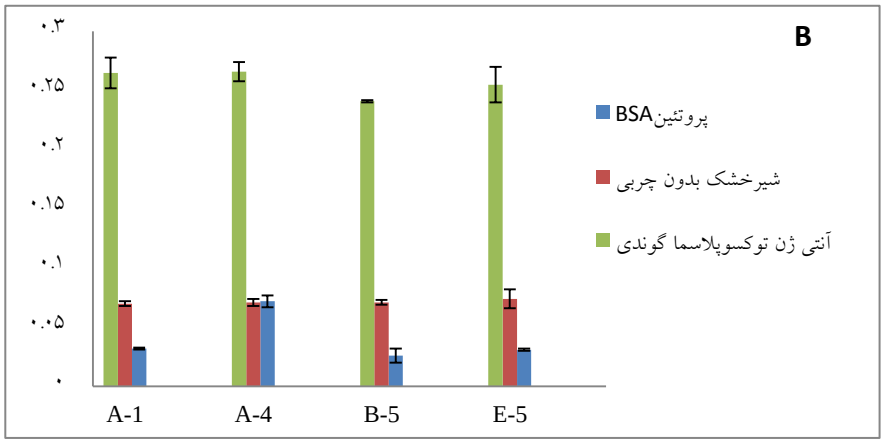
نتایج

آزمایش ELISA: پس از سه مرحله جداسازی از میان لیبراری های تاملینسون I و J، فعالیت ۴۷ کلون از هر لیبراری در تولید آنتی‌بادی‌های نوع scFv علیه پروتئین P30 تک یاخته توکسوپلاسما گوندی مورد سنجش قرار گرفت. نتایج این مرحله نشان داد که حدود نیمی از کلون‌های مورد بررسی که به صورت تصادفی انتخاب شده بودند، توانستند با آنتی‌ژن مورد نظر از هر کدام از لیبراری‌ها واکنش دهند و واکنش رنگی در آزمایش ELISA را با شدت و ضعف مختلفی نشان دادند. از آن‌جا که امکان انجام واکنش تعدادی از این کلون‌ها با پروتئین MPBS (محلول بلوک کننده طی مراحل جداسازی) وجود داشت، آزمایش ELISA دیگری با ۴ کلون از هر لیبراری (در مجموع ۸ کلون) و با استفاده از آنتی ژن P30، MPBS و پروتئین BSA به صورت دوگانه انجام شد. در شکل‌های ۲ و ۳ شدت واکنش ایجاد شده نسبت به هر یک از پروتئین‌ها نشان داده شده است.



شکل ۲. *واکنش بهترین آنتی‌بادی‌های محلول از نوع scFv از لیبراری I با آزمایش ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) علیه آنتی‌ژن P30 خالص توکسوپلاسما گوندی و شیر خشک بدون چربی و پروتئین BSA (Bovine serum albumin)*

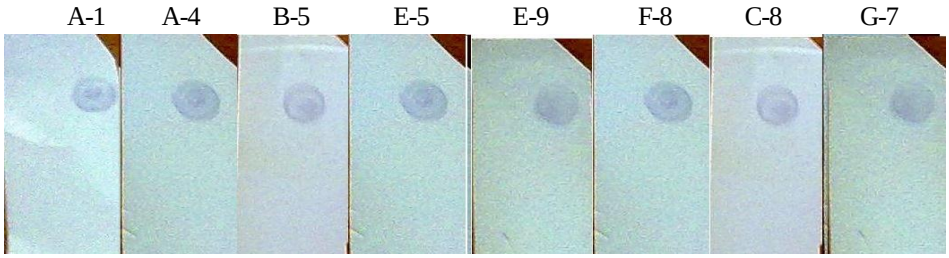
BSA: Bovine serum albumin



شکل ۳. *واکنش بهترین آنتی‌بادی‌های محلول از نوع scFv از لیبراری J با آزمایش ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) علیه آنتی‌ژن P30 خالص توکسوپلاسما گوندی و شیر خشک بدون چربی و پروتئین BSA (Bovine serum albumin)*

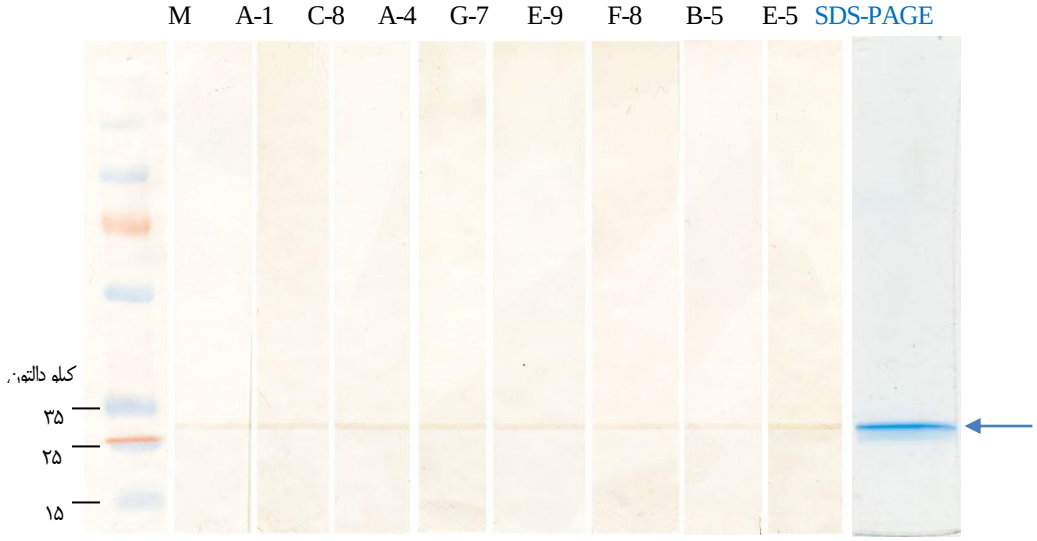
BSA: Bovine serum albumin

آزمایش Dot blot: این آزمایش به منظور تأیید کلونی‌های انتخاب شده، بررسی آن‌ها در مورد شناخت آنتی ژن توکسوپلاسما گوندی و تأیید آزمایش ELISA انجام شد. همان گونه که در شکل ۴ مشاهده می شود، لکه آبی رنگ روی کاغذ نیتروسلولزی در مکانی که آنتی‌ژن توکسوپلاسما گوندی ریخته شده بود، ایجاد شد و نشان داد که واکنش آنتی‌ژن توکسوپلاسما گوندی با scFv آنتی‌بادی‌های ضد این آنتی‌ژن می‌باشد.



شکل ٤. *آزمایش Dot blotting با کلون‌های انتخاب شده نسبت به شناخت آنتی‌ژن توکسوپلاسما گوندی*

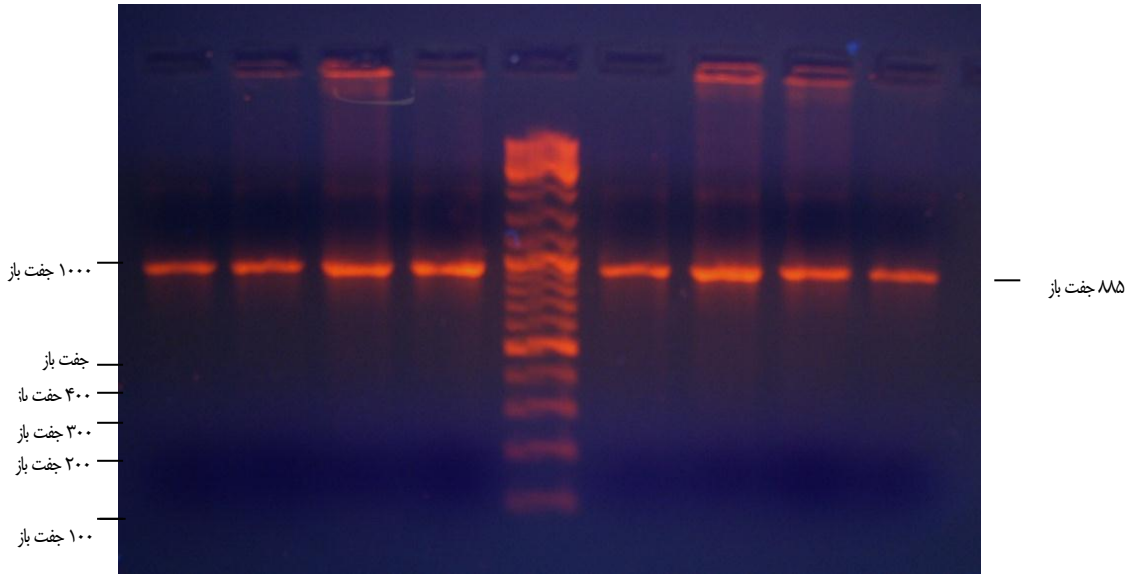
آزمایش Western blot: این آزمایش که به منظور شناسایی آنتی‌بادی‌ها نسبت به فرم خطی این آنتی‌ژن انجام گرفت، نشان داد که تمام آنتی‌بادی‌های جدا شده انتخابی قادر هستند اپی‌توپ‌های خطی را شناسایی نمایند. بنابراین، حفظ ساختار سه بعدی آنتی‌ژن در عملکرد این آنتی‌بادی‌ها جهت شناسایی آن دخالت ندارد (شکل ۵).



شکل ۵. *نتایج حاصل از الکتروفورز آنتی‌ژن توکسوپلاسما بر روی SDS–PAGE (Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis) (سمت راست) و ردیابی ایمونولوژیک آن با آنتی‌بادی‌های حاصل از کلون‌های مختلف در آزمایش Western blot*

ستون M: نشانگر PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas, Lithuania)

آزمایش PCR: نتایج تکثیر ژن کد کننده آنتی‌بادی نوترکیب ضد پروتئین سطحی انگل توکسوپلاسما گوندی از روی پلاسمیدهای حامل این ژن مربوط به ۸ کلون انتخابی با روش PCR، نشان دهنده وجود این ژن در همه کلون‌های رشد یافته بود. همان‌گونه که در شکل ۶ مشاهده می‌شود، با استفاده از پرایمرهای PHENseq و LMB3، قطعه‌ای به طول ۸۸۵ جفت باز تکثیر گردید.



شکل ٦. *بررسی کلون‌های انتخابی از لحاظ داشتن ژن scFv با روش PCR (Polymerase chain reaction)*

ستون M: نشانگر ۱۰۰ Plus جفت باز (Fermentas, Lithuania)

بحث

اگرچه بیماری توکسوپلاسموز در افراد سالم اغلب بدون علایم و به صورت مزمن مشاهده می شود، اما این بیماری می تواند برای جنین مادران بارداری که در طول دوره بارداری آلوده به انگل توکسوپلاسما گوندی می‌شوند و همچنین بیماران دارای نقص سیستم ایمنی بسیار خطرناک باشد و باعث عوارضی مانند سقط جنین، کوری و نقایص مختلف مغزی گردد. همان گونه که ذکر گردید، مهم ترین عامل در بروز بیماری، مصرف مواد غذایی آلوده و به خصوص گوشت های نپخته و یا خوب حرارت ندیده آلوده به این انگل می باشد. تحقیقات انجام شده نشان می دهد که میزان آلودگی به انگل توکسوپلاسما گوندی شیوع گسترده‌ای در جهان دارد؛ به طوری که تخمین اپیدمیولوژی بیماری توکسوپلاسموز در انسان از گستره ۱۱ درصد در ایالات متحده آمریکا تا ۷۰ درصد در کشور برزیل متفاوت است (۱۳).

بررسی منبع آلودگی زنان باردار در اروپا با استفاده از روش‌های IFA (Indirect fluorescent antibody) و ISAGA (Immunosorbent agglutination assay) نشان داده است که عوامل خطر بروز بیماری توکسوپلاسموز در این زنان، به استفاده از گوشت نپخته و تماس با خاک و مسافرت های خارجی ارتباط دارد. همچنین، بررسی ها نشان داده است که ۶۳-۳ درصد عامل این بیماری در زنان باردار مربوط به مصرف گوشت نپخته و نمک زده است و ۱۷-۶ درصد آلودگی ها به تماس با خاک ارتباط دارد (۱۴). تحقیقات متعدد انجام شده در کشور ما نیز سطح بالای آلودگی دام‌ها در نقاط مختلف را نشان می دهد (۱۶، ۱۵). از جمله این تحقیقات می توان به مطالعه ضیاء علی و همکاران در شمال ایران (استان مازندران و گیلان) اشاره کرد که تأثیر وجود آنتی‌بادی ضد انگل این بیماری را در سرم گوسفندان، بزها و جوجه‌ها بررسی نمود. آنان شیوع این عامل بیماری‌زا را در گوسفندان، بزها و جوجه ها به ترتیب ۳۲/۵، ۱۴/۳ و ۵۱/۰ درصد تخمین زدند و احتمال دادند که تیتر بالای آنتی بادی در جوجه ها به علت رطوبت زیاد هوا است که اووسیست انگل می‌تواند تا مدت‌ها زنده باقی بماند (۱۵).

مطالعه دیگری نیز در مورد شیوع بیماری توکسوپلاسموز و وجود انگل در بافت های مختلف گوسفندان و بزهای استان فارس انجام گرفت و در آن از بافت‌های مغز، زبان، کبد، ماهیچه بین دنده‌ای، ماهیچه ران و گردن گوسفند و بز نمونه گیری به عمل آمد. با استفاده از روش PCR نشان داده شد که میزان وجود عامل بیماری‌زای این بیماری در بز ۲۲/۷ درصد و در گوسفند ۳۷/۵ درصد می‌باشد. همچنین، بیشترین میزان آلودگی در بافت‌های مغز و زبان و کمترین میزان در کبد یافت شد (۱۶).

چنانچه هدف، پیشگیری از وقوع این بیماری در افراد حساس باشد، یکی از مهم ترین راهکارها، تشخیص نمونه‌های غذایی آلوده به اشکال مختلف بیماری‌زای انگل توکسوپلاسما گوندی و جلوگیری از مصرف آن ها توسط افراد در معرض خطر است. تاکنون روش های تشخیصی مختلفی برای این منظور طراحی و به صورت آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گرفته است که می توان با استفاده از آن‌ها، نمونه‌های سالم و آلوده را از هم تفکیک نمود. از آن جمله می‌توان به روش‌های PCR، Nested PCR، Real-Time PCR و ایزولاسیون انگل در حیوانات آزمایشگاهی اشاره نمود (۱۹-۱۷، ۱۵). روش های مذکور اگرچه از حساسیت بسیار بالایی در تشخیص برخوردارند، اما استفاده از آن‌ها در اغلب موارد وقت گیر، پرهزینه و نیازمند امکانات آزمایشگاهی خاص می باشد. بنابراین، تحقیق حاضر با هدف دستیابی به روشی ساده‌تر، کم‌هزینه‌تر و قابل انجام در همه مکان‌ها انجام گرفت.

با توجه به اختصاصیت زیاد آنتی‌بادی‌های مونوکلونال برای تشخیص آنتی‌ژن‌ها در روش‌هایی مانند ELISA، لاتکس آگلوتیناسیون (Latex agglutinasition) و ایمنوکروماتوگرافی و همچنین، تهیه بسیار آسان تر و ارزان‌تر آنتی‌بادی‌های مونوکلونال نوترکیب نسبت به نوع موشی آن‌ها، از تکنیک نمایش قطعات آنتی‌بادی بر روی سطح فاژ استفاده گردید تا با استفاده از آن، آنتی بادی مونوکلونال نوترکیبی نوع scFv از میان لیبراری‌های نیمه سنتتیک تاملینسون I و J علیه آنتی ژن سطحی توکسوپلاسما گوندی (پروتئین P30 یا SAG1) جداسازی گردد.

نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر نشان داد که بعد از سه مرحله جداسازی از هر کدام از لیبراری‌های تاملینسون، تعداد ۴۷ کلنی از جهت تولید آنتی‌بادی‌های محلول علیه آنتی‌ژن مذکور مورد بررسی قرار گرفت و آنتی‌بادی‌های ساخته شده توسط نیمی از کلون‌ها قادر به شناسایی آنتی‌ژن در آزمایش ELISA بودند. از این تعداد، ۸ کلون با نام‌های A-1، C-8، A-4، G-7، E-9، F-8، B-5 و E-5 که واکنش بیشتری را نسبت به آنتی ژن نشان می دادند، انتخاب شدند. فعالیت این کلون‌ها دوباره در آزمایش‌های ELISA و Dot blot مورد سنجش قرار گرفت و تأیید شد. آزمایش Western blot که جهت پی بردن به شناسایی آنتی‌بادی‌ها نسبت به فرم خطی این آنتی‌ژن انجام گرفت، نشان داد که تمام آنتی‌بادی‌های جدا شده انتخابی قادر به شناسایی اپی‌توپ یا اپی‌توپ‌هایی هستند که آنتی‌ژن خطی شده (که ساختار فضایی آن در هنگام تهیه ژل الکتروفورز باز گردیده است)، واجد آن (آن‌ها) می‌باشد. به دلیل این‌که در هنگام ساخت و تهیه لیبراری ها این امکان وجود دارد که ژن آنتی‌بادی به صورت کامل کلون نشود و جهت اطمینان از این‌که آنتی‌بادی‌های جدا شده دارای قطعات کامل VH و VL هستند، آزمون PCR بر روی تعدادی از این کلون ها انجام گرفت که وجود این قطعات (دارای ۸۸۵ جفت باز) در مورد کلون‌های انتخاب شده تأیید گردید.

بنابراین می‌توان از هر کدام از آنتی‌بادی‌های فوق در تشخیص نمونه‌های آلوده به تک یاخته توکسوپلاسما گوندی از جمله نمونه های گوشت آلوده در آزمایش های مختلف استفاده نمود. از جمله روش‌های تشخیصی سریع برای این آنتی‌ژن، به کارگیری آن‌ها در کیت‌های تشخیصی از جمله کیت‌های لاتکس آگلوتیناسیون و ایمنوکروماتوگرافی می‌باشد که تاکنون در این زمینه

استفاده نشده‌اند. این روش ها جزء روش های ساده، ارزان و قابل استفاده در هر مکان و بدون نیاز به تجهیزات گرانقیمت می‌باشند. علاوه بر این، تولید آنتی‌بادی‌های نوترکیب با غلظت بالا می تواند با استفاده از وکتورهای بیانی قوی مانند وکتورهای pET در باکتری اشریشیاکلی انجام شود که هزینه تولید آن‌ها را بسیار کمتر می کند (۲۱، ۲۰).

سپاسگزاری

تحقیق حاضر با همکاری حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه شهید باهنر کرمان و حمایت مالی بنیاد ملی نخبگان ایران انجام گرفت که بدین‌وسیله مراتب تشکر و قدردانی از آنان به عمل می‌آید.

References

1. Montoya JG. Laboratory diagnosis of Toxoplasma gondii infection and toxoplasmosis. *J Infect Dis* 2002; 185(Suppl 1): S73-S82.
2. Ogouyemi-Hounto A, Agbayahoun-Chokki F, Sissinto Savi de TY, Biokou BB, Adinsi dS, V, Assogba M, et al. [Evaluation of a rapid diagnostic test in the diagnosis of toxoplasmosis in pregnant women in Cotonou (Benin)]. *Bull Soc Pathol Exot* 2014; 107(2): 85-9.
3. Chong CK, Jeong W, Kim HY, An DJ, Jeoung HY, Ryu JE, et al. Development and clinical evaluation of a rapid serodiagnostic test for toxoplasmosis of cats using recombinant SAG1 antigen. *Korean J Parasitol* 2011; 49(3): 207-12.
4. Hoogenboom HR, de Bruinea AP, Hufton SE, Hoet RM, Arends JW, Roovers RC. Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology* 1998; 4(1): 1-20.
5. Geyer CR, McCafferty J, Dubel S, Bradbury AR, Sidhu SS. Recombinant antibodies and in vitro selection technologies. *Methods Mol Biol* 2012; 901: 11-32.
6. Bradbury AR, Marks JD. Antibodies from phage antibody libraries. *J Immunol Methods* 2004; 290(1-2): 29-49.
7. Sommavilla R, Lovato V, Villa A, Sgier D, Neri D. Design and construction of a naive mouse antibody phage display library. *J Immunol Methods* 2010; 353(1-2): 31-43.
8. Tomlinson I&J libraries protocol. Available at: Http://www.geneservice.co.uk/products/proteomic/datasheets/tomlinsonIJ.pdf.
9. Caravelli A, Luz DE, Andrade FB, Moraes CT, Maranhao AQ, Piazza RM. Sensitive and specific detection of enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli using recombinant anti-intimin antibody by immunofluorescence assay. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; 77(4): 301-3.
10. Hairul Bahara NH, Tye GJ, Choong YS, Ong EB, Ismail A, Lim TS. Phage display antibodies for diagnostic applications. *Biologicals* 2013; 41(4): 209-16.
11. Weisser NE, Hall JC. Applications of single-chain variable fragment antibodies

in therapeutics and diagnostics. *Biotechnol Adv* 2009; 27(4): 502-20.

12. Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual. New York, NY: CSHL Press; 2001.
13. Munoz-Zanzi CA, Fry P, Lesina B, Hill D. Toxoplasma gondii oocyst-specific antibodies and source of infection. *Emerg Infect Dis* 2010; 16(10): 1591-3.
14. Cook AJ, Gilbert RE, Buffolano W, Zufferey J, Petersen E, Jenum PA, et al. Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. *BMJ* 2000; 321(7254): 142-7.
15. Zia-Ali N, Fazaeli A, Khoramizadeh M, Ajzenberg D, Darde M, Keshavarz-Valian H. Isolation and molecular characterization of Toxoplasma gondii strains from different hosts in Iran. *Parasitol Res* 2007; 101(1): 111-5.
16. Asgari Q, Sarnevesht J, Kalantari M, Sadat SJ, Motazedian MH, Sarkari B. Molecular survey of Toxoplasma infection in sheep and goat from Fars province, Southern Iran. *Trop Anim Health Prod* 2011; 43(2): 389-92.
17. Ergin S, Ciftcioglu G, MIdilli K, Issa G, Gargili A. Detection of toxoplasma gondii from meat and meat products by the nested-pcr method and its relationship with seroprevalence in slaughtered animals. *Bull Vet Inst Pulawy* 2009; 53: 657-61.
18. Aspinall TV, Marlee D, Hyde JE, Sims PF. Prevalence of Toxoplasma gondii in commercial meat products as monitored by polymerase chain reaction--food for thought? *Int J Parasitol* 2002; 32(9): 1193-9.
19. Dubey JP, Hill DE, Jones JL, Hightower AW, Kirkland E, Roberts JM, et al. Prevalence of viable Toxoplasma gondii in beef, chicken, and pork from retail meat stores in the United States: risk assessment to consumers. *J Parasitol* 2005; 91(5): 1082-93.
20. Golchin M, Khalili-Yazdi A, Karamouzian M, Abareghi A. Latex agglutination test based on single-chain Fv recombinant antibody fragment. *Scand J Immunol* 2012; 75(1): 38-45.
21. Spadiut O, Capone S, Krainer F, Glieder A, Herwig C. Microbials for the production of monoclonal antibodies and antibody fragments. *Trends Biotechnol* 2014; 32(1): 54-60.

Recombinant scFv Antibodies against P30 Surface Protein of Toxoplasma Gondii

Mehdi Golchin, Ph.D.[1*], Mohadeseh Nakhaei-Moghadam, D.V.M.[2], Saeid Reza Nourollahi-Fard, Ph.D.[3]

1. Associate Professor, Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

2. Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

3. Associate Professor, Department of Parasitology, School of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

* Corresponding author; e-mail: golchin@uk.ac.ir

(Received: 23 May 2014 Accepted: 7 Jan. 2014)

Abstract

Background & Aims: *Toxoplasma gondii* is an obligate, intracellular parasite, which is widely spread in the world. The parasite is able to infect all warm-blooded hosts including humans and farm animals. The infection in humans often occurs after the ingestion of raw or undercooked meat containing tissue cysts. Several methods have been applied to detect this parasite in contaminated foods. Recombinant antibodies are new generation of monoclonal antibodies, which are isolated via phage display technology from immune or non-immune phage libraries against target antigens. These antibodies are used for diagnosis of many different antigens and therapeutics proposes. The object of the present study was to isolate recombinant monoclonal antibodies against this important parasite.

Methods: The purified *Toxoplasma gondii* surface antigen, P30, was coated to immunotubes and used as a target for selection of antibodies from the Tomlinson I and J phage display libraries of single-chain fragment variable (scFv) antibodies. Clones that were able to recognize antigen were isolated in three rounds of binding, elution and amplification. The specificity of scFv antibodies chosen from the resulting panel, were confirmed using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), dot blotting and western blotting methods.

Results: Recombinant antibodies capable of recognizing P30 antigen were isolated with high affinity; and their specificity was approved.

Conclusion: Isolated soluble single chain antibodies are good candidates to apply as monoclonal recombinant antibodies in diagnostic kits for detection of *Toxoplasma gondii* in contaminated samples.

Keywords: Recombinant antibody, *Toxoplasma gondii*, Single-chain fragment variable (scFv), P30

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2015; 22(6): 602-613