Medical Science Journal of Islamic Azad University Vol. 33, No. 1, Spring 2023 ORIGINAL ARTICLE

Computational analysis, design and expression of hybrid antibody in Single Chain Fragment Variable (scFv) form for identifying surface antigen factor H binding protein (fHbp) of Neisseria meningitidis

Marjan Khajavi[1], Fatemeh Yarian[2], Shahrzad Ahangarzadeh[3], Mojgan Bandehpour[4], Mohsen Mohammadpour[5], Akram Jalali[6]

[1] Msc Student, Department of Biology, School of Basic Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

[2]Assistant professor, Department of Medical Biotechnology, School of Advanced Technologies in Medicine, Fasa University of Medical Sciences, Fasa, Iran

[3]Assistant professor, Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

[4]Professor, Cellular and Molecular Biology Research Center Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

[5]Department of Electrical and Computer Engineering, Fasa Branch, Islamic Azad University, Fasa, Iran

[6] Assistant professor, Research Center for Molecular Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-18]

[DOR: 20.1001.1.10235922.1402.33.1.6.8]

[DOI: 10.52547/iau.33.1.50]

Abstract

Background: Meningococcal disease is an acute disease caused by the bacterium *Neisseria meningitidis*. The factor H binding protein (fHbp) virulence factor plays a vital role in the survival of the pathogen in the host. Single Chain Fragment Variable (scFv) antibodies are used for therapeutic and diagnostic applications. Utilizing computational study, Design, expression and affinity analysis of hybrid scFv for detecting the *N. meningitidis* were the main goals of this study.

Materials and methods: In this study, by performing a series of computational analysis (Antibody and Antigen modeling and Antigen-Antibody Docking), a hybrid antibody designed. The designed antibody has a high affinity to the fHbp protein. The hybrid antibody's nucleotide was synthesized in the expression vector pET28(+a). Afterward, the protein expression in BL21 bacteria was considered. Subsequently, the protein purification was completed using Ni-NTA resin. Finally, its affinity to fHbp protein was checked using ELISA.

Results: VH1-VL2 form of hybrid antibody was selected with computational analysis. The SDS-PAGE and western blotting techniques were approved the expressed hybrid antibody. After purification of scFv and fHbp protein, in ELISA studies, the affinity of this scFv 7.6×10^{-9}M was calculated.

Conclusion: Based on the hybrid antibody's proper affinity and utilizing antibody engineering and computational analysis, other forms of single-chain antibodies can be produced. These products can be used for therapeutic and diagnostic purposes, as the appropriate hybrid affinity of the scFv.

Keywords: *Hybrid single chain fragment antibody, Neisseria meningitidis, Factor H binding protein (fHbp), Cloning, Expression.*

Cited as: Khajavi M, Yarian F, Ahangarzadeh SH, Bandehpour M. Computational analysis, design and expression of hybrid antibody in Single Chain Fragment Variable (scFv) form for identifying surface antigen factor H binding protein (fHbp) of Neisseria meningitidis. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2023; 33(1): **50-58.**

Correspondence to: Fatemeh Yarian
Tel: *+98 9173014648*
E-mail: f.yarian@fums.ac.ir
ORCID ID: 0000-0002-6350-7162
Received: 7 Jul 2022; **Accepted:** 16 Oct 2022

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۳۳، شماره ۱، بهار ۱۴۰۲، صفحات ۵۰ تا ۵۸

Original Article

ارزیابی محاسباتی، طراحی و بیان آنتی‌بادی هیبرید به فرم تک زنجیره (scFv) Single Chain Fragment Antibody برای شناسایی پروتئین سطحی Factor H binding Protein (fHbp) باکتری نایسریا مننژیتیدیس

مرجان خاجوی[۱]، فاطمه یاریان[۲]، شهرزاد آهنگرزاده[۳]، مژگان بنده پور[۴]، محسن محمدپور[۵]، اکرم جلالی[۶]

[۱]دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
[۲]استادیار، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده فناوریهای نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی فسا، فسا، ایران
[۳]استادیار، مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۴]استاد، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
[۵]گروه مهندسی برق و کامپیوتر، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فسا، فسا، ایران
[۶]استادیار، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

چکیده

سابقه و هدف: *فاکتور بیماری‌زای پروتئین متصل شونده به فاکتور H (fHbp) نقش حیاتی در بقای پاتوژن در میزبان دارد. آنتی‌بادی‌های تک زنجیره به فرم scFv کاربردهای درمانی و تشخیصی دارند. هدف از انجام این مطالعه، استفاده از روش‌های محاسباتی، طراحی، بیان و بررسی قدرت اتصال آنتی بادی تک زنجیره هیبریدی برای شناسایی باکتری نایسریامننژیتیدیس، عامل بیماری منگوکوک، بود.*

روش بررسی: *در این تحقیق با انجام یک سری ارزیابی‌های محاسباتی (مدلسازی آنتی ژن، آنتی بادی و داکینگ آنتی ژن-آنتی بادی)، آنتی بادی هیبریدی با قدرت اتصال بالا به پروتئین fHbp طراحی شد. سازه ژنی آن در وکتور بیانی pET28a(+) سنتز شد و پس از بیان در باکتری BL21 و خالص سازی با استفاده از رزین Ni-NTA، میل اتصال آن با پروتئین fHbp با استفاده از روش الایزا بررسی شد.*

یافته‌ها: *فرم هیبریدی (VH1-VL2) با استفاده از ارزیابی‌های محاسباتی انتخاب شد. بیان سازه طراحی شده با استفاده از SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ تائید شد. پس از خالص سازی آنتی بادی و آنتی ژن fHbp در بررسی‌های الایزا، میل اتصال این فرم هیبریدی scFv ۱۰M - ۷/۶×^{۹} محاسبه شد.*

نتیجه‌گیری: *میل اتصال مناسب فرم هیبریدی آنتی بادی نشان می‌دهد که با استفاده از روش‌های مهندسی آنتی‌بادی و روش‌های محاسباتی، می‌توان به اشکال دیگری از آنتی بادی‌های تک زنجیره دست یافت که برای اهداف درمانی و تشخیصی کاربرد دارند.*

واژگان کلیدی: *آنتی بادی تک زنجیره هیبرید، باکتری نایسریا مننژیتیدیس، پروتئین متصل شونده به فاکتور H، کلونینگ و بیان پروتئین.*

مقدمه

باکتری نایسریا مننژیتیدیس (Neisseria meningitides) نوعی پاتوژن مهم انسانی است که باعث ایجاد گروهی از بیماری های حاد به نام بیماری مننگوکوک می‌شود. مننژیت باکتریایی تظاهرات بالینی مختلفی از تب گذرا تا حتی مرگ را در چند ساعت پس از شروع علائم بالینی نشان می‌دهد. این عفونت در کودکان خردسال و جوانان شایع‌تر است و عامل آن، باکتری نایسریا مننژیتیدیس، عضوی از میکروبیوم نازوفارنکس در افراد سالم است که می‌تواند باعث ایجاد بیماری در افراد مستعد شود (۱).

آدرس نویسنده مسئول: فسا، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده فناوریهای نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی فسا، فاطمه یاریان (**email**: f.yarian@fums.ac.ir)
ORCID ID: 0000-0002-6350-7162
تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۴/۱۸
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۷/۲۴

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-18]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1402.33.1.6.8]
[DOI: 10.52547/iau.33.1.50]

این باکتری کوکسی گرم منفی است و بر اساس پلی ساکاریدهای کپسولی به ۱۲ سروگروه طبقه بندی می‌شود که شش مورد از آنها (A، B، C، X، ۱۳۵W، و Y) عامل بیماری منتگوکوک در سراسر جهان هستند (۲). این باکتری چندین فاکتور بیماری‌زایی دارد، مانند لیپوالیگوساکارید، که به عنوان اندوتوکسین عمل می‌کند، یک کپسول پلی ساکارید که از فاگوسیتوز جلوگیری می‌کند، یک پروتئاز برای تجزیه IgA، زائده‌های مو مانند به نام پیلی، و پروتئین های سطحی Opa و Opc که به سلول‌های میزبان متصل می شوند. این باکتری همچنین دارای یک لیپوپروتئین در سطح است که به باکتری ها کمک می کند تا در میزبان زنده بمانند(۳, ۴). این پروتئین fHbp (پروتئین متصل شونده به فاکتور H) نامیده می شود که به فاکتور H انسانی (hFH) در سرم خون متصل می شود. فاکتور H انسانی یک گلیکوپروتئین محلول در پلاسمای نرمال و تنظیم کننده کاهش فعالیت کمپلمان است. بنابراین فاکتور fHbp از باکتری در برابر حمله کمپلمان و ایمنی ذاتی میزبان محافظت می کند. از این رو، این فاکتور به عنوان یک عامل بیماریزای بسیار مهم برای بیماری منتگوکوک در نظر گرفته می شود. fHbp همچنین کاندید مناسبی برای طراحی واکسن است، زیرا به طور گسترده به عنوان جزئی از واکسن‌های طراحی شده علیه سروگروه B باکتری N. meningitidis استفاده شده است. این پروتئین بسیار ایمونوژن است، به طوریکه باعث تحریک سیستم ایمنی هومورال و ترشح آنتی بادی بر علیه آن می‌گردد (۵). بنابراین مطالعات نشان داده‌اند که پروتئین fHbp یک هدف مناسب برای تهیه آنتی بادی‌های ضد باکتریایی است که از اتصال باکتری به فاکتور H انسانی جلوگیری می‌کنند.

آنتی بادی‌های ضد نایسریا منتژیتیدیس علاوه بر محافظت در برابر بیماری منتگوکوک، برای تشخیص ایمونولوژیک آنها نیز استفاده می‌شوند. از سوی دیگر، فناوری‌های جدید، امکان تولید آنتی بادی‌هایی با میل ترکیبی بالا و فعالیت ضد میکروبی بهینه را فراهم می‌کنند (۶، ۷). آنتی بادی‌های تک زنجیره ای scFv (Single Chain Fragment Antibody) یک کلاس از آنتی بادی های مهندسی شده هستند که از نواحی متغیر زنجیره های سبک (VL) و سنگین (VH) آنتی بادی ها تشکیل شده اند که با استفاده از یک پیوند دهنده دارای اسیدهای آمینه تکراری گلیسین و سرین به هم متصل شده‌اند. این آنتی بادی‌ها توانایی بالایی در خنثی کردن عفونت را نشان داده‌اند و بنابراین می‌توانند به عنوان یک جایگزین قابل اعتماد برای درمان یا تشخیص بیماری‌های عفونی باکتریایی استفاده شوند (۸). در مطالعات قبلی ما، یک کتابخانه از آنتی بادیهای تک زنجیره به فرم scFv تهیه شد. تکنیک ریبوزوم دیسپلی برای شناسایی آنتی بادی‌های تک زنجیره بر علیه پروتئین fHbp استفاده شد و دو scFv اختصاصی با میل اتصال بالا جدا شدند (۹, ۱۰).

امروزه استفاده از مهندسی آنتی بادی و کمک گرفتن از روشهای محاسباتی کمپلکس های آنتی ژن-آنتی بادی، تکنیک‌های سریع و ارزانی برای به دست آوردن ساختارهایی هستند که با روش های تجربی قابل مطالعه نیستند (۱۱, ۱۲). بنابراین، در این مطالعه، با استفاده از این تکنیک‌ها، توالی دو فرم هیبریدی جدید (VL2-VH1 و VL1-VH2) از آنتی بادی‌های تک زنجیره اولیه طراحی شد. به کمک روش‌های محاسباتی، مدلسازی و داکینگ آنتی ژن-آنتی بادی، میل اتصال این دو آنتی بادی با پروتئین fHbp با استفاده از وب سرورهای آنلاین مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت سازه آنتی بادی مناسب سنتز شد و میل اتصال آن به پروتئین هدف با استفاده از روش الایزا مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روشها

مواد مورد استفاده

محیط نوترین براث و نوترین آگار (مرک)، تریس، متانول، استون، اوره، گلایسین (مرک آلمان)، آمپی سیلین، کانامایسین، Isopropyl β- d-1-thiogalactopyranoside (IPTG)، BSA (سیگما)، Anti-his Tag HRP (abcam)، رزین Ni-NTA (کیاژن)، توئین ۲۰، تریتون X-100 (مرک)، NaH_2PO_4، کلرید سدیم، ایمیدازول (مرک)، کیت TMB (سیتومتین ژن اصفهان)، کاغذ نیتروسلولز (Roche)، گلیسرول (مرک)، کیت SDS-PAGE (شرکت سیتومتین ژن اصفهان)، DAB (سیگما)، برموفنول بلو، کوماسی بلو G250 (سیگما).

مطالعه محاسباتی

این طرح با کد اخلاق IR.SBMU.RETECH.REC.1396.73 به ثبت رسیده است. دو scFv اختصاصی بر علیه پروتئین fHbp (VL1-VH1 و VL2-VH2) با میل اتصال بالا از مطالعه قبلی ما (۹) جداسازی شدند. با توجه به مطالعات ساختاری صورت گرفته بر روی این دو scFv و توالی نوکلئوتیدی آنها، دو ساختار هیبریدی (VL2-VH1 و VL1-VH2) طراحی شد. با توجه به ساختار خاص آنتی بادیها از نظر وجود نواحی متغیر Complementarity-determining regions (CDRs) و حساسیت برای مدل‌سازی مناسب این ساختارها، چندین وب سایت برای

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-18]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1402.33.1.6.8]
[DOI: 10.52547/iau.33.1.50]

این منظور در دسترس است که در این مطالعه، این دو ساختار با استفاده از سایت تخصصی (http://opig.stats.ox.ac.uk/webapps/newsabdab/sabpred/ab odybuilder) (۱۳) مدل‌سازی شدند. در این سایت، بر اساس روش CDR grafting، نزدیک‌ترین مدل برای نواحی متغیر آنتی بادی هدف، در نظر گرفته می‌شود و در نهایت مدل آنتی بادی مورد ساخته می‌شود. برای انجام داکینگ مولکولی (بررسی برهمکنش آنتی ژن-آنتی بادی)، از سایت (https://cluspro.bu.edu/publications.php) استفاده شد (۱۴, ۱۵). این سایت به صورت تخصصی برای انواع برهمکنش‌های پروتئین-پروتئین مورد استفاده قرار می‌گیرد که در این مطالعه از گزینه Antibody mode استفاده شده است. نتیجه حاصل از این وب سایت، فایل PDB است که نیاز است توسط وب سایت دیگری مورد بررسی قرار گیرد. پس از آپلود فایل‌های PDB داکینگ مولکولی در وب سایت PDBsum (https://www.ebi.ac.uk/pdbsum)، نتایج مختلفی از جمله، اسیدهای آمینه درگیر در واکنش آنتی ژن-آنتی بادی و انواع پیوندهای موجود در برهمکنش آنتی ژن-آنتی بادی به دست می‌آید (۱۶). تجزیه و تحلیل داده‌های به دست آمده نشان دادند که مدل اول یعنی اتصال قطعه VH1 به VL2، از نظر اتصال و تعامل، ساختار مناسب‌تری نسبت به مدل دوم VL1-VH2 است. بنابراین، این مدل برای مطالعه بیشتر در شرایط آزمایشگاهی انتخاب شد.

بیان و خالص سازی آنتی بادی هیبرید و پروتئین fHbp

سازه ژنی آنتی بادی هیبرید (VL2-VH1) که دارای ۷۲۰ نوکلئوتید بود در وکتور بیانی pET28a (+) سنتز شد. پلاسمید مورد نظر در سلول بیانی BL21 (DE3) ترانسفورم شد. پس از ترانسفورماسیون، یک کلونی از باکتری حاوی پلاسمید مورد نظر درمحیط کشت مایع LB حاوی ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر کانامایسین کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد روی شیکر ۱۶۰ دور در دقیقه به مدت ۱۶ ساعت انکوبه شد تا به کدورت ۰/۶ برسد. سپس با استفاده از دو غلظت ۰/۵ و ۱ میلی مولار Isopropyl β- d-1-thiogalactopyranoside (IPTG) القا بیان پروتئین به مدت ۶ ساعت انجام شد. سلول‌ها با استفاده از سانتریفیوژ ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه برداشت شدند. به رسوب باکتریها بافر لیز (۵۰ میلی مولار تریس، ۱۰٪ گلیسرول، ۰/۱٪ Triton-X100,) اضافه شد و با استفاده از دستگاه سونیکاتور لیز شدند. لیزات بدست امده برای بررسی بیان پروتئین بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد بارگذاری شدند. با استفاده از تکنیک وسترن بلاتینگ بیان پروتئین هدف مورد بررسی قرار گرفت. طبق دستورالعمل، نمونه ی القایی ۴ ساعته، سلول BL21 (به عنوان کنترل) و ۳۰ میکروگرم پروتئین خالص سازی شده پس از بارگذاری بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد، به کاغذ نیتروسلولز منتقل شدند. از دستگاه وسترن Semi- Dry (شرکت Biorad) استفاده شد. پس از انتقال پروتئین، با استفاده از BSA3% عمل بلاکینگ به مدت ۲ ساعت صورت گرفت. پس از آن، کاغذ به مدت ۲ ساعت در محلول آنتی بادی کنژوگه شده با HRP بر علیه تگ هیستیدین که در پروتئین وجود داشت، قرار گرفت. در نهایت از سوبسترای DAB و آب اکسیژنه برای عملکرد آنزیم HRP استفاده شد که باندهای مورد نظر بصورت باند قهوه ای بر روی کاغذ آشکار گردید. عمل شستشو با محلول TBST، سه بار بعد از هر مرحله انجام شد.

برای استخراج و خالص سازی پروتئین (scFv) نوترکیب که دارای برچسب هیستیدین است از کروماتوگرافی میل ترکیبی و رزین اختصاصی آن که Ni-NTA است، استفاده شد. ۱۰۰ سی سی رسوب باکتری با استفاده از بافر لیز حاوی ۶ مولار اوره، ۲۰ میلی مولار NaH_2PO_4 و ۵۰۰ میلی مولار NaCl، (pH=۸) ۱۰ بار سونیکه شد. پس از سانتریفیوژ (۲۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰)، بر روی ستون حاوی رزین ریخته شد. پس از انجام کروماتوگرافی، پس از چند بار شستشو با محلول گرادیانت ایمیدازول، با استفاده از ۱ سی سی بافر حاوی ایمیدازول ۵۰۰ میلی مولار، پروتئین متصل شده به رزین، جداسازی و در میکروتیوب جمع آوری شد. پروتئین خالص سازی شده با استفاده از کیسه دیالیز در بافر PBS به مدت ۳ ساعت دیالیز شد. در انتها، برای بررسی کیفیت پروتئین خالص سازی شده، از ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد، استفاده شد. پروتئین fHbp نیز مانند پروتئین scFv بیان و خالص سازی شد (۱۷).

بررسی میل اتصال scFv هیبرید با پروتئین fHbp با استفاده از الایزا

بررسی میل اتصال آنتی بادی هیبرید با پروتئین fHbp، با استفاده از روش الایزا انجام گرفت. به طور خلاصه، کف پلیت الایزا با غلظتهای مختلف پروتئین fHbp (۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میکروگرم/ میلی‌لیتر در بافر بیکربنات) پوشانده شد و به مدت ۱۶ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. پس از سه بار شستشو با بافر PBST، تمامی چاهکها با محلول BSA٪۳، به مدت ۲ ساعت پوشانده شد. مراحل شستشو مجددا بعد از این مرحله تکرار شد. پس از این مرحله، برای هر غلظت از چاهک پوشیده شده با fHbp، ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی بادی هیبریدی scFv استخراج شده با غلظتهای (۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۶۲۵میکروگرم/میلی لیتر) افزوده شد. مدت زمان انکوباسیون ۵ ساعت در نظر گرفته شد. پس از شستشو، از

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-18]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1402.33.1.6.8]
[DOI: 10.52547/iau.33.1.50]

آنتی بادی ثانویه بر علیه تگ هیستیدین کنژوگه با HRP، به تمام چاهکها افزوده شد. در انتها، ۵۰ میکرولیتر سوبسترای آنزیم، ۳،۳،۵،۵ تترا متیل بنزیدین (TMB) به چاهکها افزوده شد و پس از ۲۰ دقیقه برای توقف واکنش، ۵۰ میکرولیتر NaH_2PO_4 2N به تمامی چاهکها افزوده شد. OD نمونه ها با استفاده از دستگاه الایزاریدر و در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانش شد. از فرمول زیر برای محاسبه K_{aff} scFv در برابر پروتئین fHbp استفاده شد (۹).

$K_{aff} = 1/2(2[Ab']_t - [Ab]_t)$

$n= [Ag]/[Ag']$.

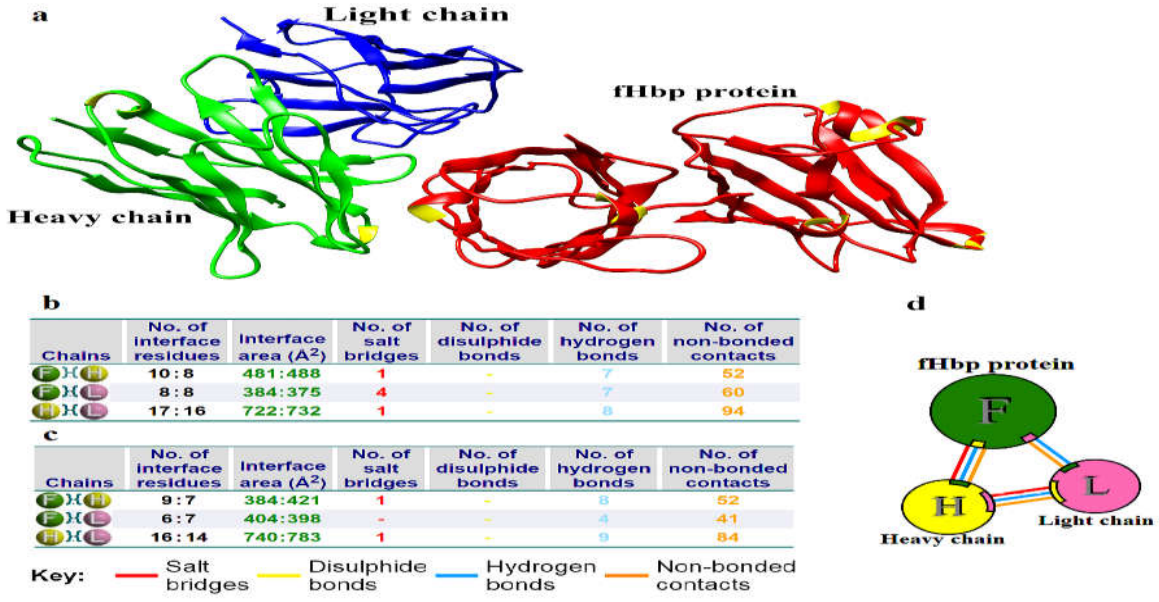
یافته‌ها

مطالعات محاسباتی

اتصال کمپلکس آنتی بادی‌های هیبریدی به فرم scFv (دوفرم طراحی شده) با fHbp توسط روش‌های محاسباتی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج این برهمکنش‌ها با استفاده از وب سایت PDBsum نشان داده شده است (شکل ۱). در قسمت (a) فایل PDB حاصل از داکینگ مولکولی آنتی بادی هیبریدی با استفاده از نرم افزار کایمرا بصورت شکل سه بعدی پروتئینی نمایش داده شده است. در این شکل زنجیره‌های پروتئین fHbp، و زنجیره VL و VH آنتی بادی به صورت رنگی مشخص شده است. پس از بررسی توسط وب سایت تخصصی PDBSum، برهمکنش اسید آمینه‌های مختلف هر دو فرم scFv مورد بررسی قرار گرفتند که در جدول‌های (1b) (VL2-VH1) و (VL2-VH1) (1c) مشخص شده‌اند. همان طور که در شکل مشخص شده است در فرمت هیبریدی (VL2-VH1)، تعداد پل‌های نمکی و همچنین پیوندهای هیدروژنی بیشتری نسبت به فرم (VL1-VH2)، در تعامل با آنتی ژن مشاهده می‌شود. بنابراین این فرم هیبریدی برای مطالعات بعدی انتخاب شد. در قسمت (1d) نیز دیاگرام اتصال آنتی بادی هیبریدی فرم (VL2-VH1) با آنتی ژن نشان داده شده است.

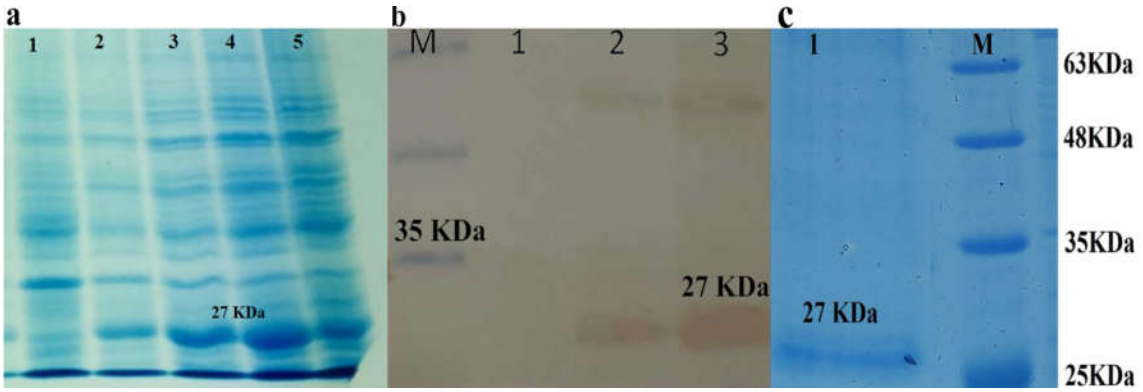
بیان و خالص سازی آنتی بادی هیبریدی (VL2-VH1):

شکل ۲ نتایج بیان و خالص سازی آنتی بادی هیبریدی (VL2-VH1)، بر روی ژل SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ را نشان می دهد. در قسمت (2a) بیان پروتئین scFv در زمانهای ۴،۲ و ۶ ساعت پس از القا با IPTG را نشان می دهد. نمونه ها بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲٪ بارگزاری شدند. پروتئین مورد نظر ۲۷ کیلودالتون بود. در قسمت (2b) سلول BL21 به عنوان نمونه کنترل و نمونه القایی ۴ ساعته در کنار نمونه خالص سازی شده بر روی ژل PAGE ۱۲٪ بارگذاری شدند و در نهایت با استفاده از

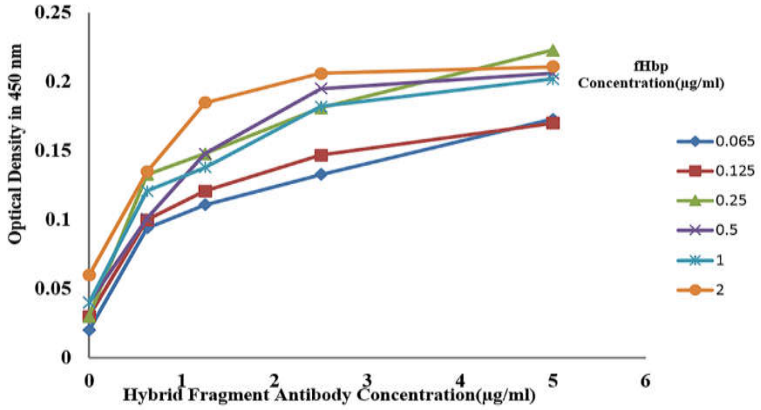


شکل ۱. داکینگ مولکولی دو فرم آنتی بادی هیبریدی با پروتئین fHbp، شکل (a) تصویر سه بعدی داکینگ مولکولی آنتی بادی هیبریدی با پروتئین fHbp. شکل (b) نتایج برهمکنش اسیدهای آمینه فرم هیبریدی (VL2-VH1) با آنتی ژن fHbp شکل (c) نتایج برهمکنش اسیدهای آمینه فرم هیبریدی (VL2-VH1) با آنتی ژن fHbp شکل (d) دیاگرام اتصال آنتی بادی هیبریدی فرم (VL2-VH1) با آنتی ژن

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-18]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1402.33.1.6.8]
[DOI: 10.52547/iau.33.1.50]



شکل ۲. بررسی بیان آنتی بادی هیبرید با استفاده از ژل SDS-PAGE12% و وسترن بلاتینگ. شکل (a) بیان آنتی بادی هیبرید بر روی ژل با غلظت ۱ میلی مولار از القاگر IPTG، شماره های ۱-۴ به ترتیب: سلول کنترل BL21، القا در زمانهای صفر، ۲،۴ و ۶ ساعت پس از اضافه نمودن القاگر. وزن مولکولی پروتئین آنتی بادی ۲۷ کیلودالتون است. شکل (b) وسترن بلاتینگ با آنتی بادی بر علیه تگ هیستیدینی آنتی بادی هیبرید، M. مارکر وزن مولکولی، چاهکهای ۱-۳ به ترتیب کنترل (سلول BL21)، پروتئین خالص سازی شده، بیان آنتی بادی در زمان ۴ ساعت. شکل (c) ژل SDS-PAGE برای بررسی آنتی بادی خالص سازی شده.M. مارکر وزن مولکولی، چاهک ۱، آنتی بادی هیبرید خالص سازی شده با استفاده از ستون کروماتوگرافی Ni-NTA. وزن مولکولی پروتئین ۲۷ کیلودالتون است.



شکل ۳- دیاگرام میل اتصال آنتی بادی هیبرید با پروتئین fHbp. با استفاده از تکنیک الایزا، غلظتهای مختلف از آنتی بادی هیبرید با غلظتهای مختلف از آنتی ژن در مواجهه با هم قرار گرفتند و پس از خوانش جذب در طول موج ۴۵۰ نانومتر، با استفاده از فرمول، ثابت اتصال آنتی بادی با آنتی ژن محاسبه گردید.

وسترن بلاتینگ توسط آنتی بادی علیه تگ هیستیدینی کنژوگه با HRP تائید شد. در شکل (2c) scFv خالص سازی شده با استفاده از ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی و رزین Ni-NTA مشخص شده است.

سنجش اتصال آنتی بادی scFv خالص شده توسط ELISA:

مقدار آنتی‌بادی متصل به آنتی‌ژن در چاهک به صورت منحنی سیگموئیدی جذب نوری در مقابل غلظت آنتی‌بادی اضافه شده به هر چاهک نمایش داده می‌شود. غلظت آنتی-بادی در ۵۰٪ مقدار جذب ماکزیمم در غلظت‌های خاصی از آنتی‌ژن برای محاسبه‌ی میل اتصال تعیین شد.

معادله‌ی (۱) برآوردی از ثابت میل اتصال برهمکنش آنتی-بادی- آنتی‌ژن است، که تنها بر اساس غلظت آنتی‌بادی کل در OD-۵۰ برای دو مقدار آنتی‌ژن است که یکی ([Ag′]) نصف دیگری ([Ag]) است. رابطه‌ی (۲) فرمول کلی برای وقتی است که غلظتهای مختلف آنتی‌ژن استفاده شوند.

$$K_{aff} = 1/2(2[Ab']_t - [Ab]_t) \quad (1)$$

$$K_{aff} = (n-1)/2(n\,[Ab']_t - [Ab]_t) \quad (2)$$

که $n = [Ag]/[Ag']$ است.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-18]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1402.33.1.6.8]
[DOI: 10.52547/iau.33.1.50]

غلظت آنتی‌بادی در ۵۰ -OD از روی نمودار ترسیم شده، برای سه غلظت از آنتی‌ژن به دست آمد. مقدار K_{aff} با استفاده از رابطه‌ی ۱ محاسبه شد (غلظت‌های ۰/۵ و ۱ آنتی‌ژن با هم و غلظت‌های ۱ و ۲ نیز با هم در نظر گرفته شدند). ثابت میل اتصال نهایی بصورت میانگین محاسباتی تعیین شد. براساس این محاسبات، ثابت میل اتصال آنتی بادی هیبرید فرم (VL2-VH1) ۱۰M $^{-۹}$ ×۷/۶ به دست آمد (شکل ۳).

بحث

تشخیص سریع و شناسایی پاتوژنها به ویژه در نمونه‌های مواد غذایی با مدت نگهداری کوتاه و همچنین فراهم نمودن عامل ضد میکروبی مناسب برای درمان عفونتهای بالقوه کشنده، بسیار حائز اهمیت هستند. در برخی از موارد ممکن است پاتوژن بدخیم به تعداد کم در نمونه موجود باشد که در این صورت فراهم نمودن روش‌های تشخیصی مناسب با حساسیت و ویژگی بالا، ضرورت مطلق است (۱۸).

باکتری *Neisseria meningitides* یکی از مهم‌ترین پاتوژن‌های انسانی محسوب می‌شود. شناسایی این باکتری در مراحل اولیه بیماری‌زایی از نظر درمانی بسیار حائز اهمیت است. موفقیت در تشخیص عامل منتژیت از چند نظر حائز اهمیت است:۱- با توجه به سیر صعودی مقاومت‌های آنتی بیوتیکی، تشخیص قطعی ویروسی یا باکتریال بودن عفونت ایجاد شده، کمک شایانی به پزشکان در تجویز مناسب آنتی بیوتیک و دوز مصرفی خواهد کرد. ۲- پراکندگی سویه‌های نایسریامنتژیتیدیس مولد بیماری در کشور و منطقه متفاوت است. ۳- موفقیت در تولید روش تشخیصی، توجه به ویژگی و اختصاصیت آن برعلیه سویه خاصی که درآن منطقه یا کشور بیماریزایی ایجاد نموده است، می تواند در مطالعات تهیه واکسن و پیشگیری از بروز بیماری توسط سویه یا سویه‌های مولد بیماری، مورد استفاده قرارگیرد (۳, ۱۹). آنتی‌بادی‌های منوکلونال به خاطر اختصاصیت بالا، سمیت پائین، تنوع و داشتن طیفی از تأثیرات به عنوان ابزاری قدرتمند، برای تشخیص انواع بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند (۶, ۷). در سال‌های اخیر اشکالی از آنتی‌بادی‌های نوترکیب ایجاد گردیده‌اند که فاقد دومین Fc هستند. این انواع شامل قطعات تک‌رشته‌ای ناحیه متغیر هستند که به‌وسیله یک اتصال‌دهنده آمینواسیدی قابل‌انعطاف به هم متصل شده‌اند. این اشکال در مواردی نظیر کاربردهای تشخیصی، تحویل دارو و خنثی‌سازی ویروس‌ها به کار می‌روند که اعمال بیولوژیکی مربوط به دومین Fc مدنظر نبوده و فقط اتصال به آنتی‌ژن موردنظر است (۸). با اتصال زنجیره‌های مختلف VH و VL آنتی بادی‌های مختلف می‌توان اشکال دیگری از scFvها به نام اشکال هیبریدی را طراحی کرد. در این آنتی بادی‌های هیبرید، زنجیره VH از یک scFv با استفاده از یک لینکر به زنجیره VL از scFv دیگری متصل می‌شود.

در مطالعه قبلی دو scFv اختصاصی بر علیه پروتئین fHbp باکتری نایسریا منتژیتیدیس جداسازی شده بود (۹) که تمایل مناسبی به آنتی ژن fHbp داشتند، با توجه به اهمیت آنتی بادی‌های جداسازی شده و اهداف مورد نظر در تهیه کیت تشخیصی، ارزیابی‌های محاسباتی نیز برای هر دو scFv صورت گرفت (۱۰). در همین راستا، یاریان و همکارانش با استفاده از این روش‌ها، به قطعه VH از آنتی بادی بر علیه fHbp باکتری نایسریا منتژیتیدیس دست یافتند که این نتایج با استفاده از روش‌های آزمایشگاهی نیز تائید شد (۱۱). پاینده و همکارانش طی چند مطالعه مشابه، بر روی بهبود آنتی بادی-های مونوکلونال مطالعاتی را انجام دادند (۲۰). در این تحقیق دو مدل آنتی‌بادی از scFv های جداسازی شده طراحی گردید (VL2-VH1 و VL1-VH2) و در شرایط *insilico* برهمکنش این آنتی بادی‌های هیبرید مورد بررسی قرارگرفتند. پس از بررسی‌های محاسباتی که بر روی هر دو مدل از آنتی بادی هیبرید صورت گرفت و با توجه به اینکه هرچه پیوندهای هیدروژنی و پل‌های نمکی بیشتری در کمپلکس آنتی ژن-آنتی بادی مشاهده شود، میل اتصال آنتی بادی به آنتی ژن بیشتر خواهد بود، در فرم هیبریدی (VL2-VH1) نسبت به فرم (VL2-VH1)، پیوندهای هیدروژنی و پل‌های نمکی بیشتری وجود داشت، بنابراین این فرم برای بررسی‌های بیشتر در شرایط آزمایشگاهی انتخاب شد. میل اتصال آنتی بادی هیبرید ۱۰M $^{-۹}$ ×۷/۶ بدست آمد که عدد بالایی برای یک آنتی بادی محسوب می‌شود. از سوی دیگر، این آنتی بادی هیبرید از اتصال دو زنجیره از دو scFv متفاوت طراحی شده است که در مطالعات قبلی ثابت اتصال برای هر یک از آنها، scFv1 ۱۰M $^{-۹}$ ×۸/۵ و scFv2 ۱۰ M $^{-۹}$ ×۷ بوده است. هر چند میل اتصال برای فرم اصلی یکی از scFvها بیشتر از فرم هیبریدی است، اما این مطالعه نشان داد که با استفاده از روش‌های محاسباتی و مهندسی آنتی بادی می‌توان اشکال متنوعی از آنتی بادیها را طراحی کرد. از سوی دیگر گام بعدی می‌تواند ایجاد جهش‌های هدفمند در یک یا هر دو قطعه (VH,VL) از آنتی بادی هیبرید یا هر یک از scFvهای اولیه باشد که به این

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-18]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1402.33.1.6.8]
[DOI: 10.52547/iau.33.1.50]

طریق می‌توان فرم‌های با قدرت اتصال بالاتری نیز به دست آورد. از آنجایی که هر دو استراتژی، ایجاد مولکول‌های هیبریدی (یا دو گونه ای) و ایجاد جهش‌های هدفمند بر روی قطعات scFv امکان پذیر است، scFvها را می‌توان به عنوان عوامل درمانی با پتانسیل بالا به ویژه برای آنتی ژن‌های در حال ظهور استفاده کرد. تلاش ما در این مطالعه افزایش میل اتصال و بهبود کارایی scFvهایی بود که قبلاً جداسازی شده بودند. از این رو با تغییرات مطلوب‌تر، می‌توان به مولکول‌های قوی‌تری در مطالعات آینده دست یافت. از این آنتی بادی‌های نوترکیب علاوه بر تشخیص، می‌توان در تهیه بیوسنسور و یا طراحی ستون برای جداسازی باکتری مننژیت منگوکوکی نیز استفاده کرد.

تقدیر و تشکر

با تشکر از مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی که امکانات خود را برای انجام این تحقیق در اختیار ما قرار دادند.

REFERENCES

1. Read RC. Neisseria meningitidis and meningococcal disease: recent discoveries and innovations. Curr Opin Infect Dis 2019;32:601-8.
2. Booy R, Gentile A, Nissen M, Whelan J, Abitbol V. Recent changes in the epidemiology of Neisseria meningitidis serogroup W across the world, current vaccination policy choices and possible future strategies. Hum Vaccin Immunother 2019;15:470-80.
3. Gasparini R, Amicizia D, Lai PL, Panatto D. Neisseria meningitidis, pathogenetic mechanisms to overcome the human immune defences. J Prev Med Hyg 2012;53:50-5.
4. Gasparini R, Amicizia D, Lai PL, Panatto D. Meningococcal B vaccination strategies and their practical application in Italy. J Prev Med Hyg 2015;56:E133-9.
5. McNeil LK, Zagursky RJ, Lin SL, Murphy E ,Zlotnick GW, Hoiseth SK, et al. Role of factor H binding protein in Neisseria meningitidis virulence and its potential as a vaccine candidate to broadly protect against meningococcal disease. Microbiol Mol Biol Rev 2013;77:234-52.
6. Goulet DR, Atkins WM. Considerations for the Design of Antibody-Based Therapeutics. J Pharm Sci 2020;109:74-103.
7. Chiu ML, Gilliland GL. Engineering antibody therapeutics. Curr Opin Struct Biol 2016;38:163-73.
8. Bemani P, Mohammadi M, Hakakian A. ScFv Improvement Approaches. Protein Pept Lett 2018;25:222-9.
9. Yarian F, Kazemi B, Bandehpour M. Identification and characterization of a novel single-chain variable fragment (scFv) antibody against Neisseria meningitidis factor H-binding protein (fHbp). J Med Microbiol 2018;67:820-7.
10. Bandehpour M, Yarian F, Ahangarzadeh S. Bioinformatics evaluation of novel ribosome display-selected single chain variable fragment (scFv) structure with factor H binding protein through docking. Journal of Theoretical and Computational Chemistry 2019;16:1750021.
11. Rafighdoust H, Ahangarzadeh S, Yarian F, Taheri RA, Lari A, Bandehpour M, et al. Bioinformatics prediction and experimental validation of VH antibody fragment interacting with Neisseria meningitidis factor H binding protein. Iran J Basic Med Sci 2020;23:1053-8.
12. Bandehpour M, Yarian F, Lari A, Farnia P. In silico evaluation of the interactions among two selected single chain variable fragments (scFvs) and ESAT-6 antigen of Mycobacterium tuberculosis. Journal of Theoretical and Computational Chemistry.2017;16:1750069.
13. Dunbar J, Krawczyk K, Leem J, Marks C, Nowak J, Regep C, et al. SAbPred: a structure-based antibody prediction server. Nucleic Acids Res 2016;44:W474-78.
14. Vajda S, Yueh C, Beglov D, Bohnuud T, Mottarella SE, Xia B, et al. New additions to the ClusPro server motivated by CAPRI. Proteins 2017;85:435-44.
15. Desta IT, Porter KA, Xia B, Kozakov D, Vajda S. Performance and Its Limits in Rigid Body Protein-Protein Docking. Structure 2020;28:1071-81.e3.
16. Laskowski RA, Jabłońska J, Pravda L, Vařeková RS, Thornton JM. PDBsum: Structural summaries of PDB entries. Protein Sci 2018;27:129-34.
17. Yarian F, Bandehpour M, Seyed N, Kazemi B. Cloning, expression and purification of the factor H binding protein and its interaction with factor H. Iran J Microbiol 2016;8:29-35.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-18]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1402.33.1.6.8]
[DOI: 10.52547/iau.33.1.50]

18. Byrne B, Stack E, Gilmartin N, O'Kennedy R. Antibody-based sensors: principles, problems and potential for detection of pathogens and associated toxins. Sensors 2009;9:4407-45.

19. Rouphael NG, Stephens DS. Neisseria meningitidis: biology, microbiology, and epidemiology. Methods Mol Biol 2012;799:1-20.

20. Payandeh Z, Rajabibazl M, Mortazavi Y, Rahimpour A ,Taromchi AH, Dastmalchi S. Affinity maturation and characterization of the ofatumumab monoclonal antibody. J Cell Biochem 2019;120:940-50.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-18]

[DOR: 20.1001.1.10235922.1402.33.1.6.8]

[DOI: 10.52547/iau.33.1.50]