

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 Khajavi¹, Fatemeh Yarian², Shahrzad Ahangarzadeh³, Mojgan Bandehpour⁴, Mohsen Mohammadpour⁵, Akram Jalali⁶

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

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

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 آنتی‌بادی تک زنجیره هیبریدی برای شناسایی باکتری نایسریا مننژیتیدیس، عامل بیماری مننگوکوک، 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 بلائینگ تأیید شد. پس از خالص سازی آنتی بادی و آنتی ژن fHbp در بررسی‌های الایزا، میل اتصال این فرم هیبریدی 1.0×10^{-7} 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

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).

باکتری نایسریا مننژیتیدیس (Neisseria meningitidis) نوعی پاتوژن مهم انسانی است که باعث ایجاد گروهی از بیماری

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

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 الیزا مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روشها

مواد مورد استفاده

محیط نوترین براث و نوترین آگار (مرک)، تریس، متانول، استون، اوره، گلیسین (مرک آلمان)، آمپی سیلین، کانامایسین، BSA، Isopropyl β -d-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (سیگما)، Ni-NTA Anti-his Tag HRP (abcam)، رزین Ni-NTA (کیژن)، توئین ۲۰، تریتون X-100 (مرک)، NaH_2PO_4 ، کلرید سدیم، ایمیدازول (مرک)، کیت TMB (سیتومتین ژن اصفهان)، کاغذ نیتروسولوز (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 (VL1-VH2 و VL2-VH1) طراحی شد. با توجه به ساختار خاص آنتی بادیها از نظر وجود نواحی متغیر Complementarity-determining regions (CDRs) و حساسیت برای مدل سازی مناسب این ساختارها، چندین وب سایت برای

این باکتری کوکسی گرم منفی است و بر اساس پلی ساکاریدهای کپسولی به ۱۲ سروگروه طبقه بندی می شود که شش مورد از آنها (A, B, C, ۱۳۵W, X, و Y) عامل بیماری مننگوکوک در سراسر جهان هستند (۲). این باکتری چندین فاکتور بیماری زایی دارد، مانند لیپولیگوساکارید، که به عنوان اندوتوکسین عمل می کند، یک کپسول پلی ساکارید که از فاگوسیتوز جلوگیری می کند، یک پروتئاز برای تجزیه IgA، زائده های مو مانند به نام پیلی، و پروتئین های سطحی Opa و Opc که به سلول های 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 پلاسما 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 مننگوکوک در نظر گرفته می شود. fhbp همچنین کاندید مناسبی برای طراحی واکسن است، زیرا به طور گسترده به عنوان جزئی از واکسن های طراحی شده علیه سروگروه B باکتری N. meningitidis استفاده شده است. این پروتئین بسیار ایمونوژن است، به طوری که باعث تحریک سیستم ایمنی هومورال و ترشح آنتی بادی بر علیه آن می گردد (۵). بنابراین مطالعات نشان داده اند که پروتئین fhbp یک هدف مناسب برای تهیه آنتی بادیهای ضد باکتریایی است که از اتصال باکتری به فاکتور H انسانی جلوگیری می کنند.

آنتی بادی های ضد نایسریا مننژیتیدیس علاوه بر محافظت در برابر بیماری مننگوکوک، برای تشخیص ایمونولوژیک آنها نیز استفاده می شوند. از سوی دیگر، فناوری های جدید، امکان تولید آنتی بادی هایی با میل ترکیبی بالا و فعالیت ضد میکروبی بهینه را فراهم می کنند (۶، ۷). آنتی بادی های تک زنجیره ای (Single Chain Fragment Antibody scFv) (Chain Fragment Antibody scFv) 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 شده اند. این آنتی بادی ها توانایی بالایی در خنثی کردن عفونت را نشان داده اند و بنابراین می توانند به عنوان یک جایگزین قابل اعتماد برای درمان یا تشخیص بیماری های عفونی باکتریایی

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/abodybuilder>) 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). 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 PDBsum داکینگ مولکولی در وب سایت (<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 در محیط 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، ۱٪ Triton-X100) اضافه شد و با استفاده از دستگاه سونیکاتور لیز شدند. لیزات بدست آمده 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 نیتروسولوز 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 NaH₂PO₄ 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، ۲ میکروگرم/میلی لیتر 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 مجدداً 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، ۰/۶۲۵ میکروگرم/میلی لیتر) افزوده شد. مدت زمان انکوباسیون ۵ ساعت در نظر گرفته شد. پس از شستشو، از

بررسی توسط وب سایت تخصصی PDBSum، برهمکنش اسید آمینه‌های مختلف هر دو فرم scFv مورد بررسی قرار گرفتند که در جدول‌های (VL2-VH1) (1b) و (VL2-VH1) (1c) مشخص شده‌اند. همان طور که در شکل (1c) 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 می‌دهد. در قسمت (2a) بیان پروتئین scFv در زمانهای ۴،۲ و ۶ ساعت پس از القا با IPTG را نشان می‌دهد. نمونه‌ها 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

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 تترامتیل 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 نمونه‌ها با استفاده از دستگاه الایزایدر و در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانش شد. از فرمول زیر برای محاسبه K_{aff} scFv در برابر پروتئین fHbp استفاده شد (۹).

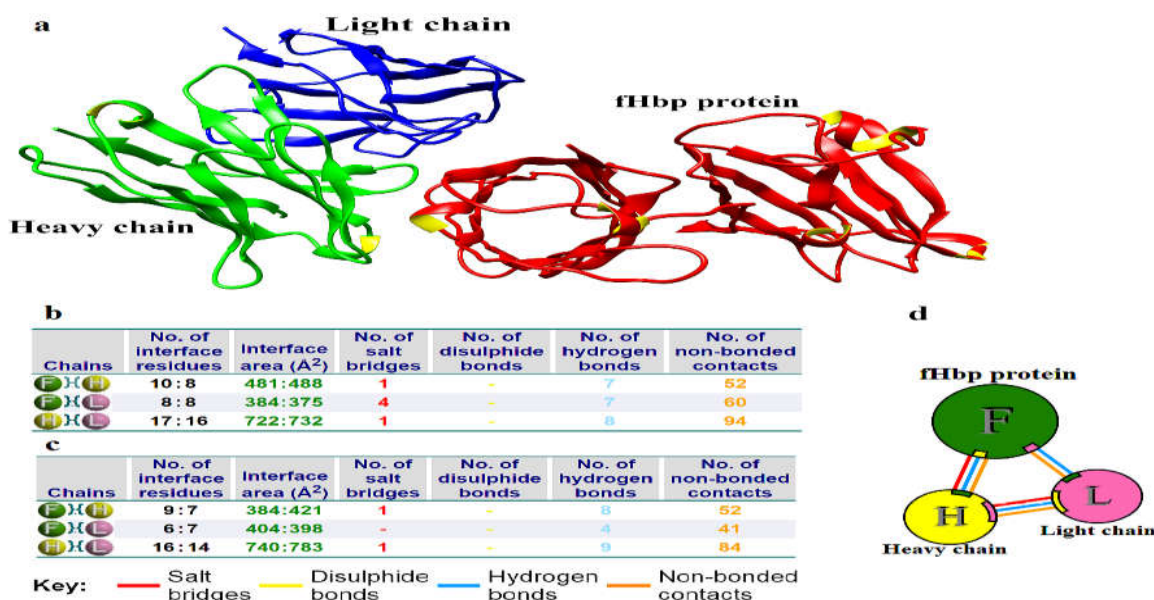
$$K_{\text{aff}} = 1/2(2[\text{Ab}]_i - [\text{Ab}]_f)$$

$$n = [\text{Ag}]/[\text{Ag}]_f$$

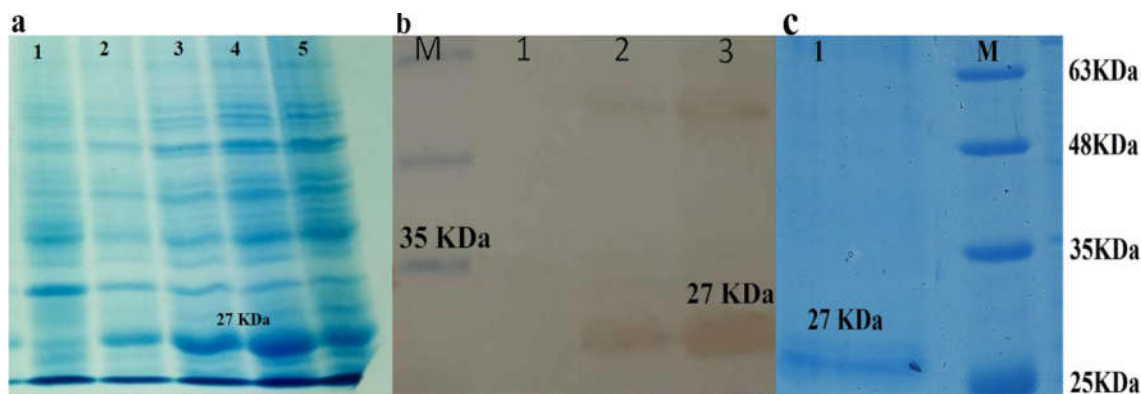
یافته‌ها

مطالعات محاسباتی

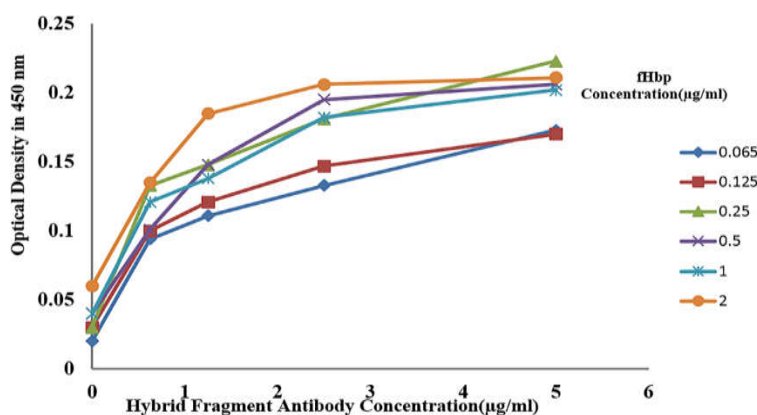
اتصال کمپلکس آنتی بادی‌های هیبریدی به فرم scFv (دو فرم طراحی شده) با fHbp توسط روش‌های محاسباتی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج این برهمکنش‌ها با استفاده از وب سایت PDBsum نشان داده شده است (شکل ۱). در قسمت (a) فایل PDB حاصل از داکینگ مولکولی آنتی بادی هیبریدی با استفاده از نرم افزار کایمرا بصورت 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



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 اسیده‌های آمینه فرم هیبریدی (VL2-VH1) با آنتی ژن fHbp شکل (c) نتایج برهمکنش اسیده‌های آمینه فرم هیبریدی (VL2-VH1) با آنتی ژن fHbp شکل (d) دیاگرام اتصال آنتی بادی هیبریدی فرم (VL2-VH1) با آنتی ژن



شکل ۲. بررسی بیان آنتی بادی هیبرید با استفاده از ژل SDS-PAGE 12% 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 کیلوالتون 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 کیلوالتون است.



شکل ۳- دیاگرام میل اتصال آنتی بادی هیبرید با پروتئین fHbp. با استفاده از تکنیک الیزا، 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.

بادی در ۵۰٪ مقدار جذب ماکزیمم در غلظتهای خاصی از آنتی ژن برای محاسبه‌ی میل اتصال تعیین شد. معادله‌ی (۱) برآوردی از ثابت میل اتصال برهمکنش آنتی-بادی-آنتی ژن است، که تنها بر اساس غلظت آنتی بادی کل در OD-۵۰ برای دو مقدار آنتی ژن است که یکی ([Ag']_i) نصف دیگری ([Ag]_i) است. رابطه‌ی (۲) فرمول کلی برای وقتی است که غلظتهای مختلف آنتی ژن استفاده شوند.

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

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

که $n = [Ag]/[Ag']$ است.

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 آنتی بادی متصل به آنتی ژن در چاهک به صورت منحنی سیگموئیدی جذب نوری در مقابل غلظت آنتی بادی اضافه شده به هر چاهک نمایش داده می شود. غلظت آنتی-

غلظت آنتی‌بادی در OD-۵۰ 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 آنتی‌بادی هیبرید فرم (VL2-VH1) 1.0×10^{-9} 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 مننژیت از چند نظر حائز اهمیت است: ۱- با توجه به سیر صعودی مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی، تشخیص قطعی ویروسی یا باکتریال بودن عفونت ایجاد شده، کمک شایانی به پزشکان در تجویز مناسب آنتی‌بیوتیک و دوز مصرفی خواهد کرد. ۲- پراکندگی سویه‌های نایسریا مننژیتیدیس مولد بیماری در کشور و منطقه متفاوت است. ۳- موفقیت در تولید روش تشخیصی، توجه به ویژگی و اختصاصیت آن بر علیه سویه خاصی که در آن منطقه یا کشور بیماری‌زایی ایجاد نموده است، می‌تواند 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 نو ترکیب ایجاد گردیده‌اند که فاقد دومین Fc هستند. این انواع شامل قطعات تک‌رشته‌ای ناحیه متغیر هستند که به وسیله یک اتصال‌دهنده آمینواسیدی قابل انعطاف 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 مورد نظر است (۸). با اتصال زنجیره‌های مختلف VH و VL آنتی‌بادی‌های مختلف می‌توان اشکال دیگری از scFvها به نام اشکال هیبریدی را طراحی کرد. در این آنتی‌بادی‌های 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 مننژیتیدیس جداسازی شده بود (۹) که تمایل مناسبی به آنتی‌ژن fhbp داشتند، با توجه به اهمیت آنتی‌بادی‌های 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 آنتی‌بادی بر علیه fhbp باکتری نایسریا مننژیتیدیس دست یافتند که این نتایج با استفاده از روش‌های آزمایشگاهی نیز تأیید شد (۱۱). پاینده و همکارانش طی چند مطالعه مشابه، بر روی بهبود آنتی‌بادی‌های مونوکلونال مطالعاتی را انجام دادند (۲۰). در این تحقیق دو مدل آنتی‌بادی از scFvهای جداسازی شده طراحی گردید (VL1-VH2 و VL2-VH1) و در شرایط *insilico* برهمکنش این آنتی‌بادی‌های هیبرید مورد بررسی قرار گرفتند. پس از بررسی‌های محاسباتی که بر روی هر دو مدل از آنتی‌بادی هیبرید صورت گرفت و با توجه به اینکه هرچه پیوندهای هیدروژنی و پل‌های نمکی بیشتری در کمپلکس آنتی‌ژن-آنتی‌بادی مشاهده شود، میل اتصال آنتی‌بادی به آنتی‌ژن 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 آنتی‌بادی هیبرید 1.0×10^{-9} بدست آمد که عدد بالایی برای یک آنتی‌بادی محسوب می‌شود. از سوی دیگر، این آنتی‌بادی هیبرید از اتصال دو زنجیره از دو scFv متفاوت طراحی شده است که در مطالعات قبلی ثابت اتصال برای هر یک از آنها، scFv1 1.0×10^{-9} و scFv2 $8/5 \times 10^{-9}$ 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 آنتی‌بادی می‌توان اشکال متنوعی از آنتی‌بادیها را طراحی کرد. از سوی دیگر گام بعدی می‌تواند ایجاد جهش‌های هدفمند در یک یا هر دو قطعه (VH, VL) از آنتی‌بادی هیبرید یا هر یک از scFvهای اولیه باشد که به این

نوترکیب علاوه بر تشخیص، می‌توان در تهیه بیوسنسور و یا طراحی ستون برای جداسازی باکتری مننژیت مننگوکوکی نیز استفاده کرد.

طریق می‌توان فرم‌های با قدرت اتصال بالاتری نیز به دست آورد. از آنجایی که هر دو استراتژی، ایجاد مولکول‌های هیبریدی (یا دو گونه‌ای) 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

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.

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. Roupheal 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.