

APPLYING NANOBODY PHAGE DISPLAY TECHNOLOGY TO DISTINGUISH BETWEEN *Brucella* AND *Yersinia* LIPOPOLYSACCHARIDES

Naoufi, Alia **; Abeer Khdrawi**; A. Al-Mariri*; A. Mourad** and A. Abbady*

* Molecular Biology Dept. Fac. of Science, Demascus Univ.

** Biological (Zoology) Dept., Fac. of Science, Demascus Univ.

استخدام تقنية الفاجات العارضة للأضداد النانوية في التمييز بين متعدد السكريد الليبدي للبروسيللا واليرسينيا
علياء النعوفي **، عبير الخضراوي **، أيمن المريري *، عبد الرحمن مراد ** و
عبد القادر عبادي*

* قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية، هيئة الطاقة الذرية السورية

** قسم علم الحياة الحيوانية – كلية العلوم – جامعة دمشق

* للبريد الإلكتروني: aabady@aec.org.sy

المخلص

تعتبر داء البروسيلات (Brucellosis) من الأمراض المشتركة بين الإنسان والحيوان، وتسببه بكتيريا سالبة الغرام من جنس البروسيللا التي تحوي في غلافها الخارجي على طبقة سميكة من متعدد السكريد الليبدي الذي يعد من أهم عوامل الفوعة والاستمناعية. غير أنه يبدي شبيها كبيرا – تصل حتى نسبة 98% في بنية السلسلة O الداخلة في تركيبه- مع اليرسينيا ذات النمط المصلي O:9 مما يتسبب غالبا بالتباس في قراءة النتائج وصحتها.

تعتبر تقنية الفاجات العارضة للأضداد النانوية من طرائق البيولوجيا الجزيئية الحديثة التي تتم من خلال الهندسة المورثية لنوع خاص من الأضداد التي توجد حصريا عند عائلة الجمال، بحيث تنتج الحصول على جزيئات رابطة صغيرة الحجم تدعى بالأضداد النانوية (Nanobodies)، وهي تمتاز بكونها عالية الثباتية والانحلالية وسهولة الإنتاج بطرائق التعبير المورثي في الإشريكية القولونية. تنتج هذه الأشكال الضدية على شكل مكتبة مورثية (Gene Library) عالية التنوع بحيث يتم غربلتها وعزل الأشكال الضدية الفعالة منها بتقنية الفاجات العارضة، وتكون هذه الأشكال الضدية في مراحلها الأولى على شكل فاجات عارضة للأضداد النانوية.

أجري هذا العمل باستخدام مكتبة مورثية للأضداد النانوية منتجة من جمل ممنوع بخلصات بكتيرية للبروسيللا الضائفة، حيث تم غربلة هذه المكتبة المورثية بصورة طريحة بمتعدد السكريد الليبدي المحضر من اليرسينيا ومن ثم ذلك الخاص بالبروسيللا. نتيجة لذلك تم الحصول على عدد من الفاجات العارضة لأضداد نانوية مختلفة فيما بينها وقادرة على التمييز بين هذين الجنسين. يمكن لنتيجة هذا العمل أن تسهم بصورة فعالة في تطوير أطقم تشخيصية دقيقة وسريعة للتمييز بين الإصابات بالبروسيللا واليرسينيا.

الكلمات المفتاحية: متعدد السكريد الليبدي، البروسيللا، اليرسينيا، الأضداد النانوية و الفاجات العارضة.

المقدمة

البروسيللا بكتيريا ممرضة، سالبة الغرام داخل خلوية اختيارية، تخمج البالعات وغيرها من الخلايا متسببة بحدوث داء يدعى البروسيلات أو الحمى المالطية. وهي من العوامل الممرضة المشتركة (Zoonotic disease) بين الإنسان والحيوان حيث تصيب العديد من الحيوانات البرية والأهلية (Boschiroli et al., 2001)، وهناك أربعة أنواع ممرضة للإنسان هي: المجهضة (*B. abortus*)، والضائفة (*B. melitensis*)، والخنزيرية (*B. suis*) والكلبية (*B. canis*) (Corbel, 1997). تمتلك البروسيللا في غلافها الخارجي على متعدد السكريد الليبدي (Lipopolysaccharide, LPS)، الذي يساهم حيويًا في

حماية بنية ووظيفة الغشاء الخارجي ويعتبر من أهم عوامل الفوعة والاستمناعية (Tumurkhuu et al., 2006). يتألف متعدد السكريد الليبدي من ثلاث طبقات: الليبدي (Lipid A) A، السلسلة-O (O-Ag) و متعدد السكريد (Oligosacharide) (Tumurkhuu et al., 2006). يعد متعدد السكريد الليبدي من أهم المستضدات في تشخيص البروسيليا (Tumurkhuu et al., 2006). أظهرت الدراسات البنوية والمناعية أنّ البروسيليا والبرسينيا المعوية، ذات النمط المصلي O9 (YO:9)، تتشارك في العديد من المعينات المستضدية العامة المنتشرة على السلسلة O (Pappas et al., 2005)، حيث أن نسبة الارتباط بين ثمالات السكاكر في السلسلة O للبروسيليا ذات النمط α -1,2 هي 98% بينما هي 100% لدى البرسينيا ذات النمط المصلي O9. لهذا السبب فإن حساسية الاختبارات المصلية المستخدمة حالياً لتشخيص البروسيليا لدى الحيوان والإنسان تتراوح بين 56 و 79% (Weynants et al., 1996). إن وجود مثل هذه التشابهات هو ما يسبب المشاكل أثناء القيام بالاختبارات التشخيصية وهو ما يُظهر الحاجة الملحة للبحث عن أساليب بديلة عالية الحساسية والنوعية (Pappas et al., 2005). لعل من أهم هذه الأساليب هي تلك التي تعتمد طرائق البيولوجيا الجزيئية والتي تقوم على إنتاج أعداد تكون قادرة على الارتباط بصورة نوعية بمتعدد السكريد الليبدي للبروسيليا وتمييزه عن ذلك الخاص بالبرسينيا ذات النمط المصلي O9 أو العكس (Hayhurst et al., 2003; Laurent et al., 2004).

تعتبر تقنية الأضداد النانوية من طرائق البيولوجيا الجزيئية الحديثة التي تتم عبر الهندسة المورثية لنوع خاص من الأضداد التي توجد حصرياً عند عائلة الجمال، فهذه الحيوانات تتميز عن غيرها من الثدييات في أن نظامها المناعي قادر على تشكيل أجسام ضدية (Antibodies) بسيطة البنية تدعى بالأجسام الضدية ذات السلاسل الثقيلة (Heavy chain antibodies) إضافة إلى الأجسام الضدية الشائعة (Hamers-Casterman et al., 1993). هذا النوع الخاص من الأضداد يمتاز بفقدانه للسلاسل الخفيفة واحتوائه على نوع متطور من السلاسل الثقيلة التي تؤمن عملية الارتباط بالمستضد (Antigen). لقد تمكن الباحثون باستخدام الهندسة الوراثية من عزل وإنتاج المنطقة الفعالة من السلسلة الثقيلة لهذه الأضداد (Variable domain) والتي تدعى VHH أو (الضد النانوي) وهي عبارة عن بروتين صغير يبلغ وزنه الجزيئي 15 كيلودالتون وله القدرة الكاملة على الارتباط بمستضده النوعي (Wesolowski et al., 2009). يمكن إنتاج هذا النوع من الأضداد في غاية السهولة والسرعة باستخدام تقنيات البيولوجيا الجزيئية وخاصة تقنية الفاجات العارضة Phage display، وهي تقنية جزيئية تعتمد على عرض الأضداد النانوية على سطح الفاجات انطلاقاً من مكتبة مورثية لكامل التراكيب الضدية النانوية النوعية وذلك في خلايا البكتيريا (Winter et al., 1994).

بالنظر لكافة المزايا التي تتمتع بها الأضداد النانوية فقد تمت أمثلة تقانة الأضداد النانوية في مخابر قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية في هيئة الطاقة الذرية السورية، وكانت بداياتها من خلال مشروع إنتاج أضداد نانوية نوعية للبروسيليا لأغراض تشخيصية وبحثية بما قد يؤدي مستقبلاً لاستثمارها في تطوير لقاحات أو أساليب علاجية ناجعة للبروسيليا (Abbadly et al، قيد النشر).

المواد والطرائق

الاستنبات البكتيري لسلاسل البروسيليا والبرسينيا:

تم استنبات سلالة من البروسيليا من نوع الضائنية (*B. melitensis*)، كذلك تم استنبات سلالة من البرسينيا (*Y. enterocolitica* O9) التي استخدمت في التجارب كشاهد سلبي، وقد تم الاستنبات لكلا السلالتين على أطباق الزرع الصلبة (Acumedia Brucella broth). وبعد نمو المستعمرات، تمت تنميتها في دوارق الأوساط السائلة (Brucella broth + مصّل الحصان) حيث تم حضنها في شروطها المثلى للنمو من أجل الإكثار البكتيري في الدرجة 37 °م. وعند انتهاء فترة الحضانة، تم ترسيب البكتيريا من الوسط السائل بالتفيل (6000 دورة/دقيقة) ومن ثم تم غسلها مرتين بالمحلول الملحي الفوسفاتي الـ PBS تمهيداً لاستخدامها في المراحل اللاحقة من المشروع.

عزل متعدد السكريد الليبدي للبروسيليا والبرسينيا:

تم عزل طبقة متعدد السكريد الليبدي للخلايا باستخدام طريقة Guanidinium TRI reagent (Thiocyanate/Phenol/Chloroform)، حيث تم بهذه الطريقة فصل المعلق البكتيري إلى طورين، طور عضوي وطور مائي حاوي على متعدد السكريد الليبدي. أخذ الطور المائي وجفف باستخدام التجفيف بالتفريغ والدوران بجهاز (Eppendorf® speed vac)، وقد تم تحضير تركيز محدد من متعدد السكريد الليبدي (10 ملغ/مل) من خلال قياس الوزن الجاف.

بعد العزل، تم التأكد من نقاوة متعدد السكاريد الليبدي المحضر وخلوه من البقايا البروتينية باستخدام تقنية الترحيل عبر هلامة الأكريلاميد (12%) ومن ثم التلوين بنترات الفضة (Silver staining). حيث تم تثبيت الهلامة بمادة التثبيت (ميتانول وحمض الخل الثلجي) و الحضان لمدة عشرين دقيقة ثم تم الغسل بالماء المقطر ثلاث مرات، ثم أضيفت نترات الفضة لمدة عشر دقائق تلتها عملية غسل بالماء المقطر وإضافة المادة المظهرة (تيوسلفات الصوديوم) التي تمنح العصابات اللون البرتقالي.

تطبيق تقنية الفاجات العارضة للأضداد النانوية (Phage Display):

بعد الحصول على متعدد السكاريد الليبدي النقي من كل من البروسيلا والبرسينيا، تمت عملية غربلة المكتبة المورثية للأضداد النانوية، وذلك بتطبيق تقنية الفاجات العارضة. ففي البداية تم تثبيت المستضدات (متعدد السكاريد الليبدي للبروسيلا أو البرسينيا) ضمن صفيحة 96 بئر ELISA (TPP10[®]) وحُفظت في الدرجة 4 °م لليوم التالي. وفي اليوم ذاته، تم استنبات البكتيريا *E. coli* TG1 التي تحتوي على مكتبة الأضداد النانوية في الوسط السائل [2YT + غلوكوز 20% + امبسيلين]، من ثم تم إحداث العدوى بالـ *M13KO7 Helper phage* وتم الحضان بدرجة حرارة 37 °م. في اليوم الثاني ثفلت الفاجات العارضة للأضداد النانوية وحسب تركيزها، ومن ثم أضيفت لصفحة الإليزا المغطاة بشروط مختلفة من مستضدات البروسيلا أو البرسينيا. أضيفت بعد الحضان والغسيل مادة Triethylamine لفك ارتباط الفاجات العارضة للأضداد النانوية عن المستضدات ومن ثم استخدمت في إصابة خلايا بكتيرية جديدة (TG1) لتكون قاعدة انطلاق لدورة جديدة من عملية الغربلة بذات المستضد أو باستخدام مستضدات جديدة.

المقاييس المناعية الأنزيمية:

تم اختيار فعالية كل من الأمصال والأضداد المنقاة، وفق تراكيزها المشار إليها، باستخدام اختبار المقاييس المناعية الأنزيمية وذلك على متعدد السكاريد الليبدي المحضر من البروسيلا والبرسينيا بعد تثبيته على صفيحة الإليزا بالتراكيز المحددة بحسب التجربة. وبعد فترة من الحضان، تم الكشف عن الارتباط باستخدام الضد (Rabbit-anti-camel) ومن ثم الضد الموسوم بالبيروكسيداز (Goat-anti-rabbit-HRP) تبعاً للتراكيز المحدد بحسب الشركة الموردة (Bethyl Laboratories). بالنسبة لاختبار المقاييس المناعية للفاجات العارضة للأضداد النانوية، تم استنبات المستعمرات البكتيرية في وسط سائل LB broth (BioBasic Inc) + امبسيلين) ضمن صفيحة 24 بئر، ثم أحدثت العدوى بالفاجات المساعدة بغية تحريض البكتيريا الحاوية على مورثة الضد النانوي على إطلاقه على شكل بروتين معروض على سطح الفاجات المتكاثرة. بعد فترة من الحضان، تم تثليل الصفيحة ومن ثم أضيف الطافي الحاوي على الفاجات المحورة لصفحة مغطاة بشروط مختلفة من متعدد السكاريد الليبدي المحضر من البروسيلا والبرسينيا وفق الشروط المثلى. تم الكشف عن الارتباط باستخدام الضد (anti-M13-HRP) الموسوم بالبيروكسيداز. للكشف عن الفعالية في اختبار المقاييس، تمت إضافة مداد أنزيم البيروكسيداز (TMB) للحصول على تفاعل لوني، ثم تم تثبيت التفاعل بإضافة حمض الكبريت وقرئت النتائج بجهاز قارئ الصفائح (Thermo[®]) على طول موجة 450 نانومتر.

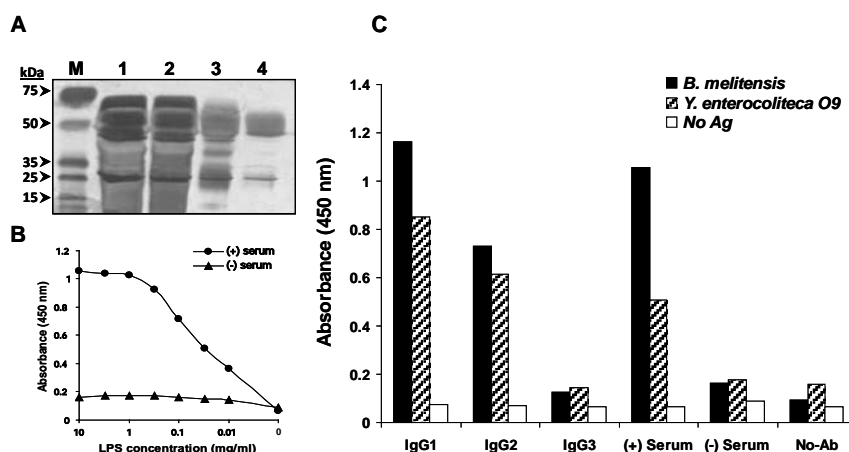
النتائج والمناقشة

الخلفية التاريخية لمكتبة الأضداد النانوية المستخدمة في البحث

لقد تم في أعمال سابقة تحضير مكتبة الأضداد النانوية المورثية من خلايا الجمل الممنوع بخلاصات البروسيلا العامة والتي منها وباستخدام تقنية الفيروسات العارضة تم عزل ثلاثة أشكال ضدية ذات نوعية متباينة لخلاصة البروسيلا العامة، وحالياً يستمر العمل على هذه الأضداد النانوية بغية توصيفها وتحديد مستضداتها النوعية المفردة. مما يدعو للدهشة هو كون هذه الأضداد النانوية غير نوعية لمتعدد السكاريد الليبدي النقي للبروسيلا بالرغم من أهميته الاستمناعية (Abbadly et al., قيد النشر). إن واحدة من الأفكار الجديدة والواعدة التي كانت في هذا المشروع منذ البداية هو إنشاء مكتبة أضداد نانوية عامة لخلاصة معقدة، بحيث يتم منها تدريجياً إنتقاء الأشكال الرابطة النوعية لبعض المكونات المفردة من هذه الخلاصة وبصورة تعكس في بعض الأحيان مدى تمثيل هذه المكونات ضمن الخلاصة أي بتعبير آخر مدى استمناعية كل من هذه المكونات (Saerens et al., 2008). لقد كانت فكرة هذا العمل أنه وباستخدام ذات المكتبة العامة، يمكننا عزل بعض الأضداد النانوية القادرة على ربط متعدد السكاريد الليبدي للبروسيلا، على الرغم من أنه لم يكن سبباً في إنشاء المكتبة ولكن باعتباره واحداً من أكثر مكونات البروسيلا استمناعية وتحفيزاً لتشكل الأضداد أثناء حدوث العدوى (Tumurkhuu et al., 2006).

اختبار فعالية مصل الجمل الممنع بالبروسيلاء تجاه متعدد السكاريد الليبيدي النقي

في هذا العمل تم تحضير مستخلص متعدد السكاريد الليبيدي بطريقة تم نشرها حديثاً وذلك للميزات والسهولة التي وصفت بها مقارنة مع غيرها من الطرائق التقليدية (Yi and Hackett, 2000). حيث قمنا باختبار نقاوة وكفاءة تحضير هذه المستخلصات عن طريق ترجيلها عبر هلامة الأكريلاميد (SDS-PAGE) ومن ثم صبغها بنترات الفضة (شكل 1A). بطريقة تم نشرها حديثاً أيضاً (al-Hendy et al., 1991). من ناحية أخرى فإن تحديد التركيز الأنسب من متعدد السكاريد الليبيدي النقي الذي يجب استخدامه تم بإجراء تفاعل مقايسة مناعية إنزيمية على تراكيز متدرجة (شكل B1). بنتيجة هذه التجربة وكما هو متوقع فإن مصل الجمل الممنع بخلصة البروسيلاء، والذي منه كان قد تم تحضير المكتبة المورثية، قادر على الارتباط وكفاءة بمتعدد السكاريد الليبيدي وذلك بخلاف مصل الجمل الشاهد وهذا يؤكد على أهميته الاستمناعية ومقدرته الكامنة على تحريض تشكل الأضداد أثناء عملية تشكيل الاستجابة المناعية (Tumurkhuu et al., 2006). من ناحية أخرى، فقد تبين بنتيجة هذه التجربة أن التركيز (0.1µg/µl) هو الأنسب حيث تنخفض بعده قدرة مصل الجمل على الارتباط بمتعدد السكاريد الليبيدي النقي، وهو الذي سيتم اعتماده لاحقاً في كافة اختبارات المقايسة مناعية الإنزيمية وفي عملية غربلة المكتبة المورثية.



الشكل 1: اختبار فعالية مصل الجمل الممنع بخلصة البروسيلاء نحو متعدد السكاريد الليبيدي النقي

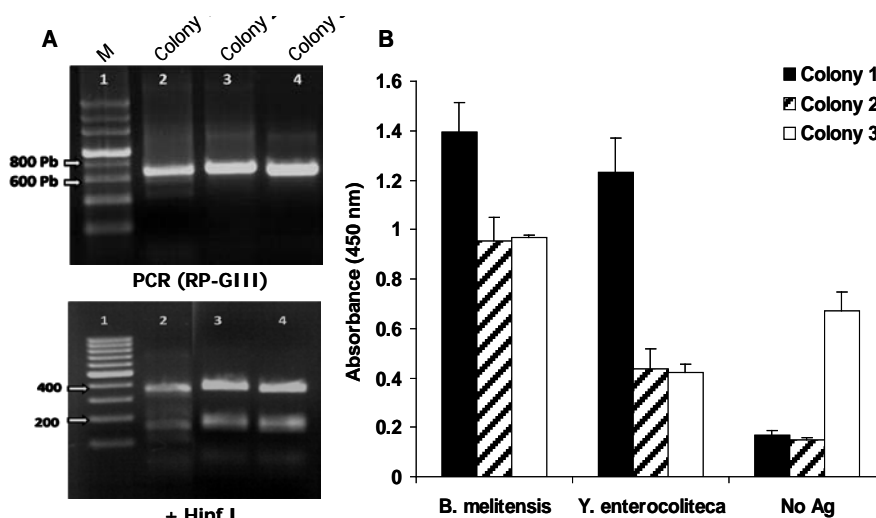
(A) ناتج ترجيل كميتين مختلفتين (40 µg في المسارين 1، 2 و 10 µg في المسارين 3، 4) من متعدد السكاريد الليبيدي، المحضر من البروسيلاء (مسار 1، 3) والبروسيليا (مسار 2، 4)، عبر هلامة الأكريلاميد ومن ثم صبغها بنترات الفضة. يمثل المسار الأول البروتينات المحددة الطول في سلم البروتينات الجزئي (Protein marker). (B) اختبار الإليزا لتحديد فعالية مصل جمل (بتمديد 5000/1)، ممنع بالبروسيلاء (+) وآخر شاهد (-)، نحو تراكيز متدرجة (من 0 لغاية 10 ملغ/مل) من متعدد السكاريد الليبيدي المحضر من البروسيلاء. (C) اختبار الإليزا لتحديد فعالية مجموعة الأضداد المختلفة، التي تم تنقيتها من مصل دم الجمل الممنع بالبروسيلاء، وذلك بغيب (No Ag) أو وجود متعدد السكاريد الليبيدي (بتركيز 1 ملغ/مل) المحضر من البروسيلاء والبروسيليا. وقد استخدم المصل ككل (بتمديد 5000/1) من جمل ممنع (+) وآخر شاهد (-) للمقارنة وكان الشرط (No Ab) بمثابة دليل على غياب الفعالية بغيب الأضداد.

إن عائلة الجمال، والتي تعود إليها الجمال الإفريقية ذات السنم الواحد والأسبوية ذات السنمين وحتى حيوانات اللاما، جميعها تحتوي في أمصالها إضافة للأضداد التقليدية نوع الأضداد ذات السلسلة الثقيلة التي منها تشتق الأضداد النانوية (De Genst et al., 2006). يمكن فصل هذه الأنواع المختلفة من الأضداد من المصل الدموي باستخدام الكروماتوغرافيا التفاضلية ذات الإلفة (protein A and G affinity chromatographic) (Hamers-Casterman et al., 1993). لقد تم فصل هذه المكونات الضدية المختلفة، التقليدية (IgG1) وذات السلسلة الثقيلة (IgG2 and IgG3)، مسبقاً من مصل الجمل الممنع وتم اختبار فعاليتها على الخلاصة العامة للبروسيلاء (Abbadly et al)، قيد النشر). للإجابة عن التساؤل الذي يتعلق بمدى إسهام كل من هذه الأنواع المختلفة من الأضداد في التعرف على متعدد السكاريد الليبيدي النقي فقد تم اختبارها جميعاً في تجربة للمقايسة المناعية الإنزيمية وتمت مقارنتها مع فعالية المصل ككل من الجمل

المنع ومن آخر شاهد نحو متعدد السكريد الليبي لكل من البروسيل والبرسينيا (شكل C1). لقد أظهرت هذه التجربة قدرة مختلف الأشكال الضدية على ربط متعدد السكريد الليبي للبروسيل بصورة فعالة مقارنة بفعالية المصل الشاهد أو الشرط حين غياب الأضداد (No Ag)، أيضا فإن هذه الأضداد كان لها القدرة على ربط متعدد السكريد الليبي للبرسينيا وإن بدرجة أقل مما هو الحال مع البروسيل. هذه النتيجة من جهة تدعم حقيقة التشابه الكبير في البنية العامة بين السلالتين من جهة (Weynants *et al.*, 1996; Tumurkhuu *et al.*, 2006) ومن جهة أخرى تصب في نطاق الاستنتاج التي تم توصل إليه مسبقا حول قدرة مصل الجمل حديث التمنيع بخلاصات البروسيل على تمييزها عن تلك المحضرة من البرسينيا في حين أنه بعد مضي أكثر من ثلاثة أشهر على بدأ عملية التمنيع تتلاشى هذه القدرة التمييزية (Abbadly *et al.*, قيد النشر).

انتقاء أشكال ضدية نانوية نوعية لمتعدد السكريد الليبي باستخدام تقنية الفيروسات العارضة:

تعتبر تقنية الفيروسات العارضة من أشهر التقنيات التي تستخدم بغرض العزل الإنتقائي لبعض الأشكال الرابطة الفعالة وذلك انطلاقا من مكتبات مورثية عالية التنوعية (Clackson *et al.*, 1991). لقد كان استخدام هذه التقنية ركزا في السابق على عزل الأضداد المؤشبة الناتجة عن دمج المجالين المتنوعين لكل من السلسلتين الثقيلة والخفيفة من الأضداد التقليدية أو ما يعرف اختصارا بالشدفة المتنوعة احادية السلسلة (single-chain variable fragment scFv). وقد كان هناك الكثير من المحاولات لعزل أمثال هذه التراكيب النوعية للعديد من المستضدات والتي من بينها متعدد السكريد الليبي العائد للعديد من الأنماط البكتيرية (). أيضا تم بنجاح مؤخرا عزل عدد من هذه الأضداد المؤشبة النوعية للبروسيل بالرغم من المشاكل التي تلت وتعلقت بانحلاليتها وثباتيتها (Hayhurst *et al.*, 2003). إن تقنية الأضداد النانوية وفرت حلا بديلا لمثل هذه المشاكل التي ترافق إنتاج شدف الأضداد المؤشبة التقليدية ولدى دمجها مع بالمكتبة المورثية الاستمناعية وتقنية الفيروسات العارضة فإنه يمكننا عزل العديد من الأضداد ذات النوعية العالية والثباتية المشجعة (Wesolowski *et al.*, 2009). لقد تم حديثا ابتداء تقنية الفيروسات العارضة الطرحية و باستخدامها عزلت أضداد نانوية قادرة على التعرف على أحد أنواع الديدان الشريطية وتمييزه عن نوع شبيه من نفس الجنس (Deckers *et al.*, 2009). في هذا العمل، لجأنا لنفس الأسلوب الطرحي، حيث أنه وانطلاقا من المكتبة المورثية ذاتها، طبقنا تقنية الفيروسات العارضة بداية بمتعدد السكريد الليبي للبرسينيا واسترجعنا كامل الفيروسات العارضة للأضداد النانوية الغير مرتبطة لعزل منها الأشكال الضدية النوعية للبروسيل. لقد آتت هذه الطريقة أكلها وحصلنا على العديد من المستعمرات البكتيرية الحاوية على مورثات كاملة للأضداد النانوية بحيث تقع أطوالها ضمن المجال المتوقع (700pb) كما أكدته اختبار البلمرة باستخدام مرئسات محاوطة لموقع مورثة الضد النانوية في بلازميد التعبير الفيروسي، وبشكل عام كانت جميعها تتبع لواحد من ثلاثة أشكال ضدية متكررة. ومورثات الأضداد النانوية تلك بالرغم من تشابه الهيئة الشدفية التي نتجت بتقطيعها بأنزيم التقبيد (HinfI)، والتي تعد طريقة تقليدية سريعة لكشف اختلاف – وليس بالضرورة تشابه - الأنماط الضدية النانوية المعزولة، فإن تفاعل السلسلة (PCR) أكد اختلافها فيما بينها في التسلسل الداخلي. قد يكون مرد ذلك التشابه الجزئي فيما بينها إلى كون متعدد السكريد الليبي فقير في بنيته الفراغية بالمعينات المستضدية مما يستدعي كون الأضداد النانوية نتجت عن ذات السلف المشترك من الخلايا البائية التي تطورت خلال عملية الاستجابة المناعية لدى الجمل. لدى اختبار فعالية الأضداد النانوية المعبر عنها من ممثلين من كل من هذه الأنماط الضدية الثلاثة، تبين أن النمط الأول ذو فعالية محافظة تجاه متعدد السكريد الليبي لكل من البروسيل والبرسينيا في حين أن النمطين الآخرين أبديا فعالية مغايرة تجاه هذين النوعين من متعدد السكريد الليبي (الشكل 4B).



الشكل 2: انتقاء بعض الأشكال الضدية النانوية المتباينة في نوعيتها نحو متعدد السكريد الليبدي للبروسيلا (A) ناتج ترحيل شدة الدنا الناتجة عن تفاعل البلمرة، باستخدام المرستين (RP, GIII)، اجري على المستعمرات البكتيرية الحاوية على مورثات الأضداد النانوية الناتجة عن عملية غريلة المكتبة المورثية وذلك بعد ترحيلها عبر هلامة الأغروز. (إلى الأسفل) ناتج ترحيل ذات الشدة ولكن بعد أن اجري لها عملية تقطيع باستخدام أنزيم التقطيع (Hinf I). في كلا الهلامتين يمثل المسار الأول واسم الدنا الجزئي (DNA marker). (B) ناتج اختبار الإليزا لتحديد فعالية الفاجت للعرضة للأضداد النانوية، والتي نتجت عن المستعمرات البكتيرية الثلاث، نحو متعدد السكريد الليبدي المحضر من كل من البروسيلا واليرسينيا (1 µg/well) وذلك مقارنة بفعاليتها في غياب المستضدات ككل (No Ag).

لقد تمكنا في هذا البحث ولأول مرة من إنتاج أضداد نانوية نوعية لمتعدد السكريد الليبدي للبروسيلا، و حتى فيما يخص الضد النانوي ذو المقدره العامة على ربط متعدد السكريد الليبدي للبروسيلا واليرسينيا بما يدعو للتفاعل بقدرته على الربط العام لمتعدد السكريد الليبدي من العديد من الأنماط البكتيرية بما يشجع على استثماره كأداة قيمة في تطوير أدوات وأطقم تشخيصية لكشف تلوث العديد من العينات الطبية والدوائية بمتعددات السكريد الليبدي العائد من مصادر بكتيرية مختلفة (Hurley, 1995). بالنظر إلى كون جميع هذه الأشكال الضدية لا تزال معروضة على سطح الفيروسات، فإن من أولويات المرحلة القادمة هو تحريرها والتعبير عنها كبروتينات صغيرة منحلّة و قابلة للتنقية بالكروماتوغرافيا ذات الإلفة الشاردية (Arbabi Ghahroudi et al., 1997) وذلك بكميات كبيرة بما يتيح اختبار فعاليتها وتوصيفها والتأكد من نوعيتها، ومثل هذه الأضداد يمكن لها مستقبلا أن تكون بمثابة أدوات فعالة للتغلب على مشكلة التفاعلية التصالبية التي غالبا ما تصادف في اختبارات تشخيص هذين الجنسين. كما ستتم محاولات لتحديد العنصر الأستمناعي الهدف لهذه الأضداد النانوية من بنية متعدد السكريد الليبدي من خلال اختبار فعالية الأضداد النانوية النقية مع كل من هذه الأجزاء على حدى. إن محاولة إنتاجنا لأضداد نانوية قادرة على تمييز متعدد السكريد الليبدي للبروسيلا واليرسينيا يعتبر بمثابة تحد هائل وذلك نظرا لدرجة التشابه العالية في البنية، إذ تبلغ حد الـ 98 %، أي أننا نناور بنجاح ضمن نطاق الـ 2% المتاحة من الاختلاف البنيوي، وهذا ما يبرهن مجددا على كفاءة هذه التقنية التي يمكن تخيل نجاح تطبيقها في مجالات ما كنا لنحلم بها في حالة الأضداد العادية إضافة إلى الميزات البنيوية الإضافية التي يتمتع بها الضد النانوية مقارنة بشبيهه scFv.

REFERENCES

- Al-Hendy, A.; P. Toivanen and M. Skurnik (1991) Rapid method for isolation and staining of bacterial lipopolysaccharide. *Microbiol Immunol* 35, 331-3.

- Arbabi Ghahroudi, M.; A. Desmyter; L. Wyns; R. Hamers and S. Muyldermans (1997) Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. *FEBS Lett* 414, 521-6.
- Boschiroli, M.L.; V. Foulongne and D. O'Callaghan (2001) Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Curr Opin Microbiol* 4, 58-64.
- Clackson, T.; H.R. Hoogenboom; A.D.Griffiths and G. Winter (1991) Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* 352, 624-8.
- Corbel, M.J. (1997) Brucellosis: an overview. *Emerg Infect Dis* 3, 213-21.
- De Genst, E.; D. Saerens; S. Muyldermans and K. Conrath (2006) Antibody repertoire development in camelids. *Dev Comp Immunol* 30, 187-98.
- Deckers, N.; D. Saerens; K. Kanobana; K. Conrath; B. Victor; U. Wernery; J. Vercruyse; S. Muyldermans and P. Dorny (2009) Nanobodies, a promising tool for species-specific diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis. *Int J Parasitol* 39, 625-33.
- Hamers-Casterman, C.; T. Atarhouch; S. Muyldermans; G. Robinson; C. Hamers; E.B. Songa; N. Bendahman and R. Hamers (1993) Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 363, 446-8.
- Hayhurst A.; S. Happe; R. Mabry; Z. Koch; B.L. Iverson and G. Georgiou (2003) Isolation and expression of recombinant antibody fragments to the biological warfare pathogen *Brucella melitensis*. *J Immunol Methods* 276, 185-96.
- Hurley, J.C. (1995) Endotoxemia: methods of detection and clinical correlates. *Clin Microbiol Rev* 8, 268-92.
- Laurent, T.C.; P. Mertens; J.F. Dierick; J.J. Letesson; C. Lambert and X. De Bolle (2004) Functional, molecular and structural characterisation of five anti-*Brucella* LPS mAb. *Mol Immunol* 40, 1237-47.
- Pappas, G.; N. Akritidis; M. Bosilkovski and E. Tsianos (2005) Brucellosis. *N Engl J Med* 352, 2325-36.
- Saerens, D.; B. Stijlemans; T.N. Baral; G.T. Nguyen Thi; U. Wernery; S. Magez; P. De Baetselier; S. Muyldermans and K. Conrath (2008) Parallel selection of multiple anti-infectome Nanobodies without access to purified antigens. *J Immunol Methods* 329, 138-50.
- Tumurkhuu, G.; N. Koide; K. Takahashi; F. Hassan; S. Islam; H. Ito; I. Mori; T. Yoshida and T. Yokochi (2006) Characterization of biological activities of *Brucella melitensis* lipopolysaccharide. *Microbiol Immunol* 50, 421-7.
- Wesolowski, J.; V. Alzogaray; J. Reyelt; M. Unger; K. Juarez; M. Urrutia; A. Cauerhff; W. Danquah; B. Rissiek; F. Scheuplein; N. Schwarz; S. Adriouch; O. Boyer; M. Seman; A. Licea; D.V. Serreze; F.A. Goldbaum; F. Haag and F. Koch-Nolte (2009) Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Med Microbiol Immunol* 198, 157-74.
- Weynants, V.; A. Tibor; P.A. Denoel; C. Saegerman; J. Godfroid; P. Thiange and J.J. Letesson (1996) Infection of cattle with *Yersinia enterocolitica* O:9 a cause of the false positive serological reactions in bovine brucellosis diagnostic tests. *Vet Microbiol* 48, 101-12.
- Winter, G.; A.D. Griffiths; R.E. Hawkins and H.R. Hoogenboom (1994) Making antibodies by phage display technology. *Annu Rev Immunol* 12, 433-55.

Yi, E.C. and M. Hackett (2000) Rapid isolation method for lipopolysaccharide and lipid A from gram-negative bacteria. *Analyst* 125, 651-6.

APPLYING NANOBODY PHAGE DISPLAY TECHNOLOGY TO DISTINGUISH BETWEEN *Brucella* AND *Yersinia* LIPOPOLYSACCHARIDES

Naoufi, Alia **; Abir Khdrawi; A. Al-Mariri*; A. Mourad** and A. Abbady***

* Molecular Biology Dept. Fac. of Science, Demascus Univ.

** Biological (Zoology) Dept., Fac. of Science, Demascus Univ.

ABSTRACT

Brucellosis is a zoonotic disease caused by negative gram bacteria belonging to the genus *Brucella*. These bacteria contain in their outer cell wall a thick layer of lipopolysaccharides (LPS). LPS are considered as a very important elements for *Brucella* pathogenicity and immunogenicity. Furthermore, LPS appear a high similarity with *Yersinia* serotype O:9 which can reach 98% in their internal structure, mainly the O chain component, causing regularly serum cross reactivity and confusion in results reading and analysis.

Nanobody phage display technology is considered as a recent molecular biology technique performed by means of the genetic engineering of special type of antibodies, existing exclusively in *Camelidae*. It enables the obtaining of small binders, referred to as Nanobodies (Nb). Nbs, characterized with their high stability and solubility, are produced by gene expression in *E. coli*. In fact, they are extracted from a gene library of a high diversity, from which active binders are isolated by panning with phage display. In the early steps of this procedure, Nanobodies are present as displayed molecules on the surface of phages, or Nanobody-displaying phages (Nb-phages).

In this work, a previously established Nanobody library, created from Arabian camel immunized with *Brucella melitensis* total antigens, was subjected to a subtractive panning with LPS from *Yersinia* followed with those from *Brucella*. This resulted in several Nb-phages able to distinguish efficiently between the LPS of these two genus. Results of this work could be invested in the development of precise and rapid diagnostic kits to discriminate between *Brucella* and *Yersinia* infections.

Keywords: LPS, *Brucella*, *Yersinia*, Nanobodies and phage display

قام بتحكيم البحث

أ.د / محمود محمد عوض الله السواح
أ.د / عبد الحميد مليجي عبد الحميد

كلية الزراعة – جامعة المنصورة
كلية الزراعة – جامعة كفر الشيخ