J. of Agricultural Chemistry and Biotechnology, Vol.1 (3): 185 - 192, 2010

ISOLATION OF DIFFERENT TYPES OF NANOBODY-DISPLAYING PHAGES CAPABLE OF DISTINGUISHING BETWEEN THE MOST TWO IMPORTANT SPECIES OF BRUCELLA (*B. melitensis* AND *B. abortus*) IN SYRIA

Khdrawi, Abeer; Aliaa El-Naoufi**; A. Al-Mariri* M. Quider** and A. Abbady***

*** Department of Molecular Biology and Biotechnology, Atomic Energy Commission of Syria (AECS), Damascus, Syria**

**** Dept. of Animal Biology- Fac. of Science- Damascus University- Syria**

عزل عدة أنماط مختلفة من الفاجات العارضة لأضداد نانوية قادرة على التمييز بين نوعي البروسيلا –الضأنية والمجهضة – الأكثر انتشارا في سوريا

عبير الخضراوي [**]، علياء النعوفي [**]، أيمن المريري [*]،محمود قويدر [**] و عبد القادر عبادي[*+]

[1] قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية، هيئة الطاقة الذرية السورية

[2] قسم علم الحياة الحيوانية – كلية العلوم – جامعة دمشق

+ للبريد الإلكتروني: aabady@aec.org.sy

الملخص

تعتبر تقنية الفاجات العارضة للأضداد النانوية من طرائق البيولوجيا الجزيئية الحديثة التي تتم عبر الهندسة المورثية لنوع خاص من الأضداد التي توجد حصرياً عند عائلة الجمال، بحيث تتيح الحصول على جزيئات رابطة (Binders) صغيرة الحجم تدعى بالأضداد النانوية (Nanobodies) التي تمتاز بكونها **عالية الثباتية والانحلالية** وسهلة الإنتاج بطرائق التعبير المورثي في الإشريكية القولونية. تنتج هذه الأشكال الضدية على شكل مكتبة مورثية (Genetic library) عالية التنوع بحيث يتم غربلتها وعزل الأشكال الضدية الفعالة منها بتقنية الفاجات العارضة (Phage Display)، حيث تكون هذه الأشكال الضدية في مراحلها الأولى على شكل فاجات تعرض على سطحها الأضداد النانوية المختلفة.

لقد أجري هذا العمل على مكتبة مورثية للأضداد النانوية المنتجة من جمل ممنع بخلاصات بكتيرية للبروسيلا الضأنية، التي تنتمي لجنس البروسيلا الذي يعتبر عاملاً ممرضاً له أهمية خاصة بسبب آثارها الصحية على الإنسان والحيوان بما يتسبب بخسائر اقتصادية فادحة في الجمهورية العربية السورية.

والبروسيلا الضأنية تعد أكثر انتشارا من البروسيلا المجهضة محليا والتمييز بينهما لا يزال مشكلة بسبب التشابه الكبير بالبنية الخارجية والمحتوى البروتيني. لقد تم غربلة هذه المكتبة المورثية بصورة طرحية بخلاصات البروسيلا المجهضة ومن ثم الضأنية لنحصل بنتيجة ذلك على عدد من الفاجات العارضة لأضداد نانوية مختلفة فيما بينها وقادرة على التمييز بصورة فعالة بين هذين النوعين من البروسيلا. يمكن لنتيجة هذا العمل أن تسهم بصورة فعالة في تطوير أطقم تشخيصية دقيقة وسريعة لكشف الإصابات بالبروسيلا وتحديد النمط المسؤول عنها.

الكلمات المفتاحية: البروسيلا، اليرسينيا، الأضداد النانوية و الفاجات العارضة.

المقدمة

تتميز عائلة الإبل (*Camelidea*) عن غيرها من الثدييات في أن نظامها المناعي قادر على تشكيل أضداد (Antibodies) بسيطة البنية تدعى بالأضداد ذات السلاسل الثقيلة (Heavy chain antibodies) إضافة إلى الأضداد الأخرى الشائعة (Hamers-Casterman *et al.*, 1993). لقد تمكن الباحثون باستخدام الهندسة الوراثية من عزل وإنتاج المنطقة الفعالة من السلسلة الثقيلة لهذه الأضداد (Variable domain) والتي تدعى VHH أو الضد النانوي (Nanobody). وهو عبارة عن بروتين صغير يبلغ وزنه الجزيئي 15 كيلو دالتون وله القدرة الكاملة على الارتباط بمستضده النوعي (Frenken *et al.*, 2000).

تعد الأضداد النانوية من الأدوات الجزيئية الواعدة في العديد من التطبيقات البيولوجية والطبية، فحجمها الصغير و بنيتها البروتينية المستقرة والعالية الإنحلالية يعدان مصدر الكفاءة العالية والأداء المتميز الذي تتصف به (Nguyen *et al.*, 2000). فهذه الأضداد قادرة على الالتصاق بأهداف لا يستطيع الضد العادي الارتباط بها، كما هي الحال بالنسبة للمواقع الفعالة للأنزيمات (active sites) أو الصدوع في الأغشية الخلوية، الأمر الذي يستعصي في أغلب الأحيان على الأضداد التقليدية (Spinelli *et al.*, 2000). إضافة إلى كل ذلك، فإن إنتاج هذا النوع من الأضداد يمكن أن يتم في غاية السهولة والسرعة باستخدام تقنيات البيولوجيا الجزيئية وذلك في خلايا **البكتيريا المخبرية**. لهذا تصنف كأفضل الطرق لإنتاج الواسمات البكتيرية المختلفة. وبالفعل فقد تم إنتاج العديد من الأضداد النانوية القادرة على تشخيص العديد من العوامل الممرضة إنطلاقا من الفيروسات مرورا بأنواع من البكتيريا وحتى أنواع من الديدان الطفيلية (Wesolowski *et al.*, 2009). وكان لهذه الأضداد القدرة في بعض الأحيان على التمييز بين أنواع متشابهة من الطفيليات التي تنتمي لنفس الجنس (Deckers *et al.*, 2009).

إن الخصائص الفريدة للأضداد النانوية جعلت منها أداة مغرية يمكن استخدامها في تشخيص بعض العوامل الممرضة ذات الأهمية المحلية كما هو الحال بالنسبة للبروسيلا (*Brucella*). فهذه البكتيريا السالبة الغرام تتسبب بداء البروسيلات (Brucellosis)أو مايعرف بالحمى المالطية (Corbel, 1997). وهي من الأمراض المشتركة بين الإنسان والحيوان (zoonotic disease) وهناك أربعة أنواع ممرضة للإنسان هي: البروسيلا المجهضة *B. abortus*، البروسيلا الضأنية *B. melitensis*، البروسيلا الخنزيرية *B. suis* والبروسيلا الكلبية *B. canis* (Boschiroli *et al.*, 2001). ولا تزال سورية تعاني من آثارها من الناحية الصحية والاقتصادية، حيث تصيب البروسيلا المجهضة الأبقار بشكل أساسي وتصيب البروسيلا الضأنية الأغنام والماعز وهي الأكثر انتشارا محلياً و يتشابه كلا النوعين بنسبة 87%، وينسب الاختلاف بالمضيف النوعي والشكل الخارجي عموماً لبروتينات مختلفة وبشكل خاص بروتينات الغشاء الخارجي (Pappas *et al.*, 2005).

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، وكانت بداياتها من خلال مشروع إنتاج أضداد نانوية نوعية للبروسيلا لأغراض تشخيصية وبحثية بما قد يؤدي مستقبلا لاستثمارها في تطوير لقاحات أو أساليب علاجية **ناجحة للبروسيلا**. في هذا العمل سنحاول باستخدام تقنية الأضداد النانوية استهداف وكشف مستضدات نوعية من البروسيلا بحيث نستثمرها في التشخيص الدقيق والتمييز بين نوعيها الأكثر انتشاراً محلياً، الضأنية والمجهضة، حيث ستستخدم مكتبة مورثية عالية التنوع تم تحضيرها انطلاقا من جمل ممنع بالبروسيلا الضأنية. حيث يتم اصطفاء الأشكال الضدية الفعالة وعزلها بصورة نوعية من هذه المكتبة باستخدام تقنية الفاجات العارضة (Phage Display) وهي عبارة عن تقنية جزيئية تستخدم لعرض البروتينات والببتيدات الغريبة على سطح الفاج (Willats, 2002)، وبالتالي الحصول على أضداد نانوية نوعية لبروتينات البروسيلا معروضة على سطح الفاجات.

المواد والطرائق

الاستنبات البكتيري لسلالات البروسيلا واليرسينيا:

تم استنبات عدة سلالات من البروسيلا (البروسيلا الضأنية والبروسيلا المجهضة) وسلالة من اليرسينيا ذات النمط المصلي O9 (*Yersinia entirocoliteca O9*) التي تم استخدامها كشاهد سلبي. جميع هذه السلالات تمت تنميتها على أطباق الزرع الصلبة 2YT (يحوي في كل ليتر 10 غرام yeast extract و16 غرام Trypton و5 غرام NaCL و15 غرام آغار بدرجة حموضة معتدلة)، وبعد نموها نقلت مستعمرات مفردة منها إلى دوارق الأوساط السائلة التي تحوي وسط 2YT السائل و المزود بـ 5% مصل الحصان وتم حضنها في الدرجة 37°م. وعند انتهاء فترة الحضن، تم ترسيب البكتيريا من الوسط السائل بالتثفيل ومن ثم غسلها مرتين بالمحلول الملحي الفوسفاتي PBS تمهيداً لاستخدامها في المراحل اللاحقة.

تحديد نقاوة السلالات البكتيرية باستخدام التفاعل السلسلي البوليميرازي:

تم عزل الـ DNA الجينومي من جزء من البكتيريا المغسولة بالـ PBS بطريقة CTAB/Nacl (Ctyle Trimityle Amino Bromide) ومن ثم تحديد تركيزه بجهاز Nanodrop (Thermo®)، بغية استخدامه في نوع خاص من تفاعلات الـ PCR يدعى بتفاعل Multiplex PCR الذي تمت أمثلته مسبقاً في دائرة الميكروبيولوجيا والمناعيات في هيئة الطاقة الذرية السورية بغرض التأكد من السلالات

المستخدمة. وقد ضم أنبوب تفاعل الـ (PCR) المكونات التالية: 5µl DNA، (10mM) 0.5µl dNTPs، 1µl primer، 0.2µl Taq polymerase، (50 mM) 1µl $MgSO_4$، 10x2.5µl buffer، 14.8µl H_2O. استمرت فترة التفاعل 35 دورة على جهاز الـ PCR (Bio-RAD®)، تم تحضير العينات للترحيل على هلامة الأغاروز 1.5%، وبعد الرحلان تم الكشف عن شدف الـ DNA بالأشعة فوق البنفسجية UV.

عزل بروتينات البروسيلا واليرسينيا:

بعد التأكد من نقاوة السلالات، وباستخدام الجزء المتبقي من البكتيريا المغسولة بالـ PBS، تم عزل الخلاصة البروتينية للخلايا باستخدام 5 مل lysis buffer 2x و5.7 غ غوانيدين هيدروكلورايد و 100µl PMSF(100mM) و400µl PIK(25X) (Protease inhibitor Kocktail) لتفكيك الخلايا وتحرير البروتينات وثم تحطيم الخلايا بالأمواج فوق الصوتية. بعدها تم حساب تركيز البروتينات باستخدام كاشف الـ Bradford وبوجود BSA (ألبومين مصل البقر) كبروتين عياري وجرى قياس الامتصاصية بطول موجة 595 nm ومن ثم تم حساب التركيز حسب معادلة المستقيم العياري standard curve.

عزل الأضداد النانوية باستخدام تقنية الفيروسات العارضة (Phage Display):

تم تثبيت المستضدات (بروتينات البروسيلا واليرسينيا) ضمن صفيحة ELISA 96 بئر (TPP10®) وحُفِظَت في الدرجة 4°م لليوم التالي. وفي اليوم ذاته، تم استنبات البكتيريا TG1 *E. coli* التي تحتوي على مكتبة الأضداد النانوية في الوسط السائل [2YT + غلوكوز 20% + امبسيلين (مضاد حيوي)]، من ثم تم إحداث العدوى بـ $M_{13}KO_7$ Helper phage بغية الحصول على فاجات يعرض كل منها على سطحه ضد نانوي، بعد فترة من الحضن تم التثفيل والتخلص من الطافي ثم حل الرسابة بـ [200 ml من 2YT + كاناماسين (مضاد حيوي)] وحُضن لليوم الثاني.

في اليوم الثاني تم تثفيل الفاجات العارضة للأضداد النانوية ومن ثم حساب تركيزها، ومن ثم أُضيفت لصفيحة 96 بئر المغطاة بشروط مختلفة من مستضدات البروسيلا واليرسينيا. بعد الحضن والغسيل تم إضافة مادة Triethylamine لفك ارتباط الضد النانوي النوعي مع البروسيلا ثم تمت إضافة موقي الـTris لتعديل الوسط. بعدها جرى حضن هذه الفاجات مع TG1 لمدة 30 دقيقة طبعاً بعد تخفيف هذه الفاجات إلى التراكيز التالية 10^3 و10^4 و10^5. بعد ذلك تم زراعة البكتيريا على وسط (LB agar + امبسيلين). تعاد الغربلة عدة مرات بنفس الطريقة.

تم التأكد من صحة أطوال مورثات الأضداد النانوية بإجراء التفاعل التضخيمي السلسلي PCR، باستخدام المرئستين (المرئسة الموجهة RP والمرئسة العكسية GIII). ثم جرى تقطيع مورثات الأضداد النانوية باستخدام أنزيم التقييد (HinfI) وترحيل ناتج القطع على هلامة الآغاروز 2%.

المقايسة المناعية الانزيمية للفاجات العارضة للأضداد النانوية:

تم استنبات المستعمرات البكتيرية الحاوية على مورثات الأضداد نانوية في وسط سائل (2YT + أمبسيلين) ضمن صفيحة 24 بئر (TPP10®)، ثم تم إحداث العدوى بـ Helper Phage بغية تحريض البكتيريا الحاوية على مورثة الضد النانوي على إطلاقه على شكل بروتين معروض على سطح الفاجات المتكاثرة بنتيجة العدوى. بعد فترة من الحضن، تم تثفيل الصفيحة والتخلص من الطافي ثم حل الرسابة بـ (2YT + كاناماسين) وحُضن لليوم الثاني. وبنفس الوقت تم تثبيت بروتينات البروسيلا واليرسينيا ضمن صفيحة 96 بئر.

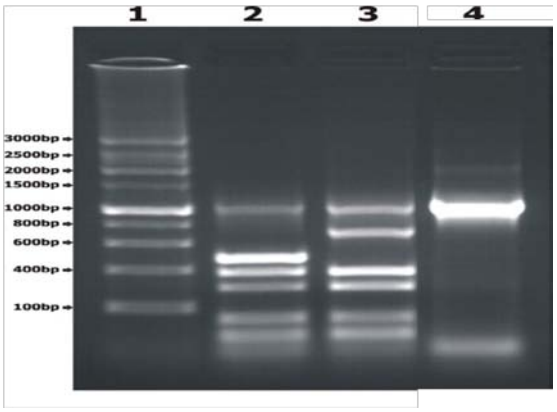
في اليوم الثاني تم تثفيل صفيحة 24 بئر، ومن ثم أُضيف الطافي الحاوي على الفاجات المحورة للصفيحة المغطاة بمستضدات البروسيلا واليرسينيا. وتم الكشف عن ارتباط الضد النانوي المعروض على سطح الفاج بمستضده النوعي باستخدام الأضداد النوعية للفاج (anti-M13) والموسومة بأنزيمة البيروكسيداز. للكشف عن الفعالية في اختبار المقايسة تم إضافة مداد أنزيم البيروكسيداز (TMB) للحصول على تفاعل لوني ومن ثم تثبيت التفاعل بإضافة حمض الكبريت وقرئت النتائج بجهاز قارئ الصفائح (Thermo®) على طول موجة 450 نانو متر.

النتائج والمناقشة

تحضير الخلاصات البروتينية العامة للبروسيلا لاستخدامها في البحث

لقد تم في أعمال سابقة تحضير مكتبة الأضداد النانوية الموروثة من خلايا الجمل الممنع بخلاصات البروسيلا الضأنية العامة وقد امتازت هذه المكتبة باتساعها واحتوائها على نسبة عالية من المستعمرات البكتيرية الحاوية على مورثات لأضداد نانوية بأطوال تقريبية نظامية. من هذه المكتبة تم باستخدام تقنية الفيروسات العارضة عزل ثلاثة أشكال ضدية ذات نوعية متباينة لخلاصة البروسيلا البروتينية السيتوبلازمية، وجميعها كانت نوعية لكافة أنواع البروسيلا التي تم اختبارها (Abbady *et al*، قيد النشر).

إن كون هذه المكتبة المورثية قد إنشئت بعد التمنيع بخلاصة معقدة، بحيث يتم منها تدريجيا 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 بعض المستضدات المميزة للبروسيلا الضأنية، وحتى لا تغيب أي من مكونات الخلية، والتي من بينها البروتينات الغشائية أو السيتوبلازمية وحتى الجدارية، عن نطاق البحث فقد لجأنا لطريقة خاصة لاستحصال المحتوى الخلوي العام لكل من البروسيلا الضأنية والمجهضة وذلك من خلال استخدام محلول موقي حاوي على تركيز عال من الغوانيدين الذي يعتبر المركب الفعال من محلول تجاري يدعى (TRIzol)، وهاذا المركب يعمل في نفس الوقت على حل الجدر والأغشية الخلوية وتمسيخ البروتينات بصورة جزئية وعكوسة بحيث يكون سببا في استرداد نسبة عالية من المحتوى البروتيني العام للخلية، إضافة إلى قدرته على المحافظة على خصائص البروتينات العامة خلال فترات التخزين الطويلة (Hummon *et al.*, 2007). من ناحية أخرى فإن وجود هذا المركب في الخلاصات البروتينية، وبتراكيزه العالية، لم يكن له أي أثر على تقنية المعايرة البروتينية (Bradford) من جهة أو حتى على كفاءة ارتباط البروتينات على صفيحة الإليزا من جهة أخرى بما يمكن اعتباره بمثابة طريقة مثالية لتحضير البروتينات لمثل هذا النوع من الأعمال البحثية. من ناحية أخرى من ذات السلالات البكتيرية تم تحضير الدنا بغية استخدامه في نوع خاص من تفاعلات البلمرة بغية التأكد من نقاوتها وتبعيتها لجنس البروسيلا من جهة ولكل من النوعين البروسيلا المجهضة والبروسيلا الضانية من جهة أخرى. وقد تم استخدام اليرسينيا ذات النمط المصلي O9 في ذات التفاعل كشاهد سلبي (شكل . 1). بنتيجة هذا التفاعل وبعد إجراء الترحيل على هلامة الأغاروز تظهر مجموعة من شدف الدنا الخاصة بجنس البروسيلا بطول (bp 393 و 302) وتظهر شدفة مميزة للبروسيلا المجهضة بطول (bp 498) واخرى مميزة للبروسيلا الضأنية بطول (bp 792) وذلك بحسب العينة البكتيرة التي أجري عليها التفاعل. أيضا يظهر لدى كل السلالات المختبرة العصابة العامة (bp 1000) التي تنتج عن تضخيم المورثة (16S rRNA) الشديدة المحافظة في الجينوم البكتيري بشكل عام (شكل1).



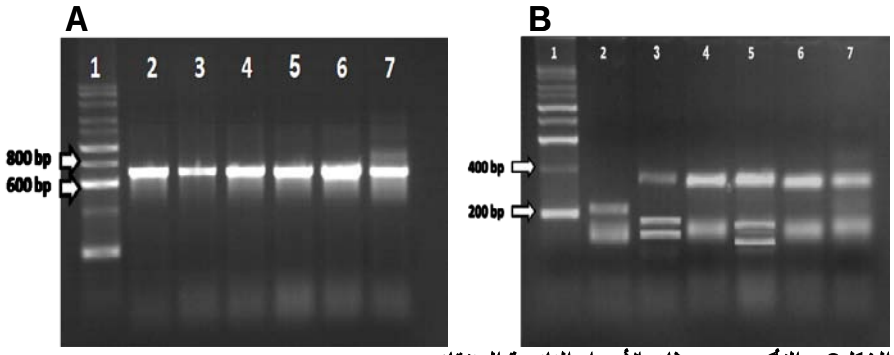
الشكل 1: تمييز السلالات البكتيرية المستخدمة باستخدام تفاعل البلمرة متعدد الشدف (Multiplex PCR).

صورة لهلامة الأغاروز 1.5% بعد ترحيل نواتج تفاعل البلمرة المتعدد الشدف الذي أجري على الدنا المحضر من سلالتي البروسيلا المجهضة (مسار2) والضأنية (مسار3) وكذلك اليرسينيا ذات النمط المصلي O9 (مسار4)، التي استخدمت كشاهد سلبي، وقد تم تفاعل البلمرة هذا باستخدام مرئسلت نوعية لمورثات محافظة في جنسي البروسيلا واليرسينيا. الواسم الجزيئي للدنا DNA marker تم ترحيله في المسار(1).

غربلة المكتبة المورثية بتقنية الفيروسلت العارضة

تعتبر تقنية الفيروسات العارضة من أشهر التقنيات التي تستخدم بغرض العزل الإنتقائي لبعض الأشكال الرابطة الفعالة وذالك انطلاقا من مكتبات مورثية عالية التنوعية (Clackson *et al.*, 1991). لقد كان استخدام هذه التقنية مركزا في السابق على عزل الأضداد المؤشبة الناتجة عن دمج المجالين المتنوعين لكل من السلسلتين الثقيلة والخفيفة من الأضداد التقليدية أو مايعرف اختصارا بالشدفة المتنوعة احادية السلسلة (single-chain variable fragment **scvp**,). وقد كان هناك الكثير من المحاولات لعزل أمثال هذه التراكيب النوعية للعديد من المستضدات والتي من بينها متعدد السكاريد الليبيدي العائد للعديد من الأنماط

البكتيرية). أيضا تم بنجاح مؤخرا عزل عدد من هذه الأضداد المؤشبة النوعية للبروسيلا 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 أبتداع 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 على الخلاصات البروتينية للبروسيلا المجهضة ومن ثم استرجعنا كامل الفيروسات العارضة للأضداد النانوية الغير مرتبطة لنعزل منها الأشكال الضدية النوعية للخلاصات البروتينية المحضرة من البروسيلا الضأنية. أثمرت هذه الطريقة في الحصول على العديد من المستعمرات البكتيرية الحاوية على مورثات كاملة للأضداد النانوية بحيث تقع أطوالها ضمن المجال المتوقع (700pb) كما أكده اختبار البلمرة باستخدام مرئستين (المرئسة الموجهةRP والمرئسة العكسية GIII) مطوقتين لموقع مورثة الضد النانوية في بلازميد التعبير الفيروسي، وبشكل عام كانت جميعها تتبع لواحد من ستة أشكال ضدية متكررة (شكل. 2A). بالرغم من أن بعض مورثات الأضداد النانوية تلك تبدي تشابه الهيئة الشدفية التي نتجت بتقطيعها بأنزيم التقييد (HinfI) (شكل. 2B)، والتي تعد طريقة تقليدية سريعة لكشف أختلاف – وليس بالضرورة تشابه - الأنماط الضدية النانوية المعزولة، فإن تفاعل السلسلة (sequencing) أكد اختلافها جميعا فيما بينها.



الشكل2 : التأكد من مورثات الأضداد النانوية المنتقاة

ناتج الـ PCR باستخدام المرئيستين RP, GIII حيث يمثل المسار الأول واسم الدنا الجزيئي (DNA marker) وتحوي باقي المسارات على شدف الدنا المضخمة ، الحاوية على مورثات الأضداد النانوية، من المستعمرات البكتيرية الست و جميع هذه العصابات لها ذات الطول تقريباً. (B) بعد تضخيم مورثات الأضداد النانوية تم تقطيعها بأنزيم التقييد Hinf1 ومن ثم ترحيلها عبر هلامة الأغاروز. يمثل المسار الأول واسم الدنا الجزيئي (DNA marker)، بينما تحوي المسارات الأخرى (2-7) شدف الدنا الناتجة عن عملية قطع مورثة الاضداد النانوية من كل من المستعمرات الست المنتقاة.

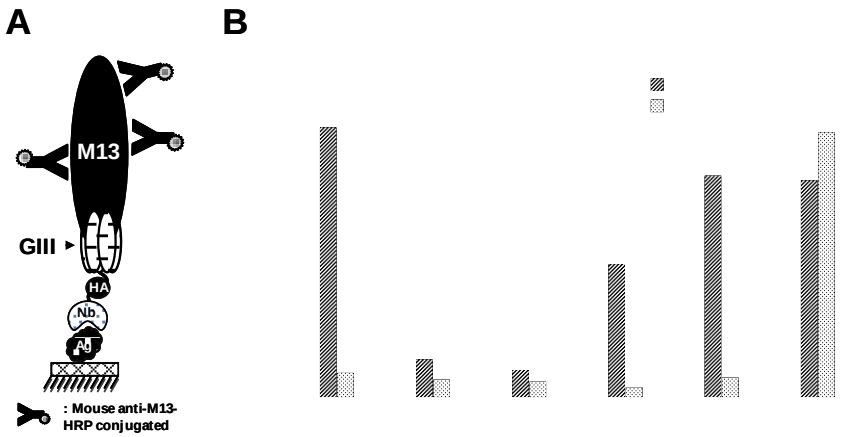
اختبار نوعية الأضداد النانوية المعروضة على سطح الفاجات نحو مستضدات البروسيلا:

في الخطوة التالية تم أختبار نوعية هذه الأضداد النانوية المرمزة من قبل المورثات التي تحويها المستعمرات البكتيرية الست المعزولة بتقنية الفاجات العارضة وذلك نحو مستضدات البروسيلا. لهذه الغاية تم استخدام طريقة تعتمد على إنتاج هذه الأضداد على شكل بروتينات معروضة على سطح الفاجات واستخدامها ككل في تفاعل مقايسة إنزيمية، وقد تم التحقق من حدوث الارتباط بين الضد النانوي المعروض والمستضد المثبت باستخدام الضد النوعي للفاج الموسوم بالبيروكسيداز (شكل. 3A). أجري هذا الاختبار على مجموعة من المستضدات البكتيرية المحضرة من كل من البروسيلا الضأنية والمجهضة، كما تم استخدام المستضدات المحضرة من اليرسينيا ذات النمط المصلي O9 كشاهد سلبي وذلك نظرا للشبه الكبير الذي تبديه مع البروسيلا (شكل. 3B).

تبين بنتيجة هذا الاختبار أن جميع الأضداد النانوية من المستعمرات البكتيرية الست قادرة على ربط مستضدات البروسيلا الضأنية والتعرف عليها مقارنة بالشاهد السلبي (بدون مستضدات). من ناحية أخرى، يمكن اعتبار الأضداد النانوية من المستعمرات NbBruc04 وNbBruc05 وNbBruc06 و

NbBruc07 وNbBruc08 نوعية للبروسيلا فقط. بينما تلك من المستعمرة رقم NbBruc09 عامة للبروسيلا واليرسينيا. أيضاً، يمكن للضدين النانويين من المستعمرتين رقم NbBruc05 و NbBruc06التمييز بوضوح بين نوعي البروسيلا الضأنية والمجهضة (شكل. 3B).

لقد تمكنا في هذا البحث ولأول مرة من إنتاج أضداد نانوية نوعية ليس فحسب للبروسيلا كجنس وإنما لنوع البروسيلا الضأنية تحديدا. إن معظم الدراسات السابقة اعتمدت في التمييز بين أنوع البروسيلا على إضداد وحيدة النسيلة تستهدف بصورة متعدد السكاريد اللبيدي الذي يعد من أهم عوامل الفوعة والاستمناعية في بنية البروسيلا (Laurent *et al.*, 2004). وبالتالي فإن تحديد المستضدات البروتينية الهدف لكل من هذه الأضداد النانوي القادرة على تمييز نوعي البروسيلا الضأنية والمجهضة يعتبر على درجة عالية **من** الأهمية. بالنظر إلى كون جميع هذه الأشكال الضدية لا تزال معروضة على سطح الفيروسات، فإن من أولويات المرحلة القادمة هو تحريرها والتعبير عنها كبروتينات صغيرة منحلة 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 للتمييز بين نوعي البروسيلا في الاختبارات التشخيصية.



الشكل 3: اختبار نوعية الأضداد النانوية المعروضة على سطح الفاجات نحو مستضدات البروسيلا.
(A) شكل تمثيلي يوضح بنية الفاج العارض للضد النانوي الذي ينتج عن إصابه المستعمرة البكتيرية الحاوية على مورثة هذا الضد بالفاج المساعد، حيث يكون الضد النانوية مرتبط بالبروتين (GIII) الذي يعتبر واحد من المكونات الأساسية لغلاف الفاج. يمكن الكشف عن هذه البنية المعقدة بعد ارتباطها بالمستضدات المثبتة، من خلال الضد النانوي، وذلك باستخدام ضد الفاج الموسوم بالبيروكسيداز (Anti-M13 HRP). (B) يمثل الشكل نتائج اختبار المقايسة المناعية الإنزيمية لتحديد قدرة الفاجات العارضة لكل من الأضداد النانوية الستة، بعد إنتاجها من مستعمراتها البكتيرية، على التعرف على المستضدات (10µg/wel) المحضرة من نوعين من جنس البروسيلا (هما الضأنية والمجهضة) وكذلك قدرتها على تمييز مستضدات البروسيلا عموما عن اليرسينيا. وقد تم كشف ارتباط الأضداد النانوية النوعي بالمستضدات باستخدام الضد الفاج الموسوم بالبيروكسيداز.

REFERENCES

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.

Deckers, N.; D. Saerens; K. Kanobana; K. Conrath; B. Victor; U. Wernery; J. Vercruysse; S. Muyldermans and P. Dorny (2009) Nanobodies, a promising tool for species-specific diagnosis of Taenia solium cysticercosis. *Int J Parasitol* 39, 625-33.

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

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.

Hummon, A.B.; S.R. Lim; M.J. Difilippantonio and T. Ried (2007) Isolation and solubilization of proteins after TRIzol extraction of RNA and DNA from patient material following prolonged storage. *Biotechniques* 42, 467-70, 472.

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.

Nguyen, V.K.; R. Hamers; L. Wyns and S. Muyldermans (2000) Camel heavy-chain antibodies: diverse germline V(H)H and specific mechanisms enlarge the antigen-binding repertoire. *Embo J* 19, 921-30.

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.

Spinelli, S.; L.G. Frenken; P. Hermans; T. Verrips; K. Brown; M. Tegoni and C. Cambillau (2000) Camelid heavy-chain variable domains provide efficient combining sites to haptens. *Biochemistry* 39, 1217-22.

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.

Willats, W.G. (2002) Phage display: practicalities and prospects. *Plant Mol Biol* 50, 837-54.

ISOLATION OF DIFFERENT TYPES OF NANOBODY-DISPLAYING PHAGES CAPABLE OF DISTINGUISHING BETWEEN THE MOST TWO IMPORTANT SPECIES OF BRUCELLA (*B. melitensis* AND *B. abortus*) IN SYRIA

Khdrawi, Abeer; Aliaa El-Naoufi**; A. Al-Mariri* M. Quider** and A. Abbady***

*** Department of Molecular Biology and Biotechnology, Atomic Energy Commission of Syria (AECS), Damascus, Syria**
**** Dept. of Animal Biology- Fac. of Science- Damascus University- Syria**

ABSTRACT

Nanobody phage display technology is considered as recent molecular biology technique performed through the genetic engineering of special type of antibodies existing exclusively in Camelidea. It enables the obtaining of small binders, referred to as Nanobodies, conferred with high stability and solubility and are produced by gene expression system in E. coli. Nanobodies are extracted form gene library of 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).

This work was established on Nanobody library previously created from Arabian camel immunized with Brucella melitensis total antigens. It is a member of the genus Brucella which is considered as a very important infectious agent because of its impact on human and animal health with the concomitant economical loses in Syria. Locally, cases of infection with B. melitensis are more redundant than with B. abortus. Distinguishing between these two types of bacteria is still considered as a problem because of the big similarity in their outer structure and protein content. In this work, a subtractive panning with B. abortus antigens followed with those from B. melitensis was performed on the Nanobody library resulting in several Nb-phages able to distinguish efficiently between these two species of Brucella. Results of this work could be invested in the development of precise and rapid diagnostic kits for detecting Brucellosis and defining its responsible type of bacteria

Keywords: Brucella, Yersinia, Nanobodies and phage display

قام بتحكيم البحث
أ. د / سامية مرسى بيومى — **كلية الزراعة – جامعة المنصورة**
أ. د/ عبد الحميد مليجى عبد الحميد — **كلية الزراعة – جامعة كفر الشيخ**