J. of Agricultural Chemistry and Biotechnology, Vol. 1 (3): 177 – 184 , 2010

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 السكاريد الليبيدي للبروسيلا 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**

الملخص

تعتبر داء البروسيلات (Brucellosis) من الأمراض المشتركة بين الإنسان والحيوان، وتسببه بكتيريا سالبة الغرام من جنس البروسيلا التي تحوي في غلافها الخارجي على طبقة سميكة من متعدد السكاريد الليبيدي الذي يعد من أهم عوامل الفوعة والاستمناعية. غير أنه يبدي شبها 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 حصرياً عند عائلة الجمال، بحيث تتيح الحصول على جزيئات رابطة صغيرة الحجم تدعى بالأضداد النانوية (Nanobodies)، وهي تمتاز بكونها عالية الثباتية والانحلالية وسهلة 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، و تكون هذه الأشكال الضدية في مراحلها الأولى على شكل فاجات عارضة للأضداد النانوية.

أجري هذا العمل باستخدام مكتبة مورثية للأضداد النانوية منتجة من جمل ممنع بخلاصات بكتيرية للبروسيلا الضأنية، حيث تم غربلة هذه المكتبة المورثية بصورة طرحية بمتعدد السكاريد الليبيدي المحضر من اليرسينيا ومن ثم ذاك الخاص بالبروسيلا.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 بالبروسيلا واليرسينيا.

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

المقدمة

البروسيلا بكتيريا ممرضة، سالبة الغرام داخل خلوية اختيارية، تخمج البالعات وغيرها من الخلايا متسببة بحدوث داء يدعى البروسيلات أو الحمى المالطية. و هي 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*) والضأنية (*B. melitensis*) والخنزيرية (*B. suis*) والكلبية (*B. canis*) (Corbel, 1997). تمتلك البروسيلا في غلافها الخارجي على متعدد السكاريد الليبيدي (Lipopolysacharide, LPS)، الذي يساهم حيوياً في

حماية بنية ووظيفة الغشاء الخارجي ويعتبر من أهم عوامل الفوعة والاستمناعية (Tumurkhuu *et al.*, 2006). يتألف متعدد السكاريد اللبيدي من ثلاث طبقات: الليبيد A (Lipid A)، السلسلة-O (O-Ag) و متعدد السكاريد (Oligosacharide) (Tumurkhuu *et al.*, 2006). يعد متعدد السكاريد اللبيدي من أهم المستضدات في تشخيص البروسيلا (Tumurkhuu *et al.*, 2006). أظهرت الدراسات البنيوية والمناعية أنّ البروسيلا واليرسينيا المعوية، ذات النمط المصلي O9 (YO:9)، تتشاركان في العديد من المعينات المستضدية العامة المنتشرة على السلسلة O (Pappas *et al.*, 2005)، حيث أن نسبة الارتباط بين ثمالات السكاكر في السلسلة O للبروسيلا ذات النمط α-1,2 هي 98% بينما هي 100% لدى اليرسينيا ذات النمط المصلي O9. لهذا السبب فإن حساسية الاختبارات المصلية المستخدمة حالياً لتشخيص البروسيلا 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 أضداد تكون قادرة على الارتباط بصورة نوعية بمتعدد السكاريد اللبيدي للبروسيلا وتمييزه عن ذلك الخاص باليرسينيا 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 للبروسيلا لأغراض تشخيصية وبحثية بما قد يؤدي مستقبلا لاستثمارها في تطوير لقاحات أو أساليب علاجية ناجعة للبروسيلا (Abbady *et al*، قيد النشر).

المواد والطرائق

الاستنبات البكتيري لسلالات البروسيلا واليرسينيا:

تم استنبات سلالة من البروسيلا من نوع الضأنية (*B. melitensis*)، كذلك تم استنبات سلالة من اليرسينيا (*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 + مصل الحصان) حيث تم حضنها في شروطها المثلى للنمو من أجل الإكثار البكتيري في الدرجة 37 °م. وعند انتهاء فترة الحضن، تم ترسيب البكتيريا من الوسط السائل بالتثفيل (6000 دورة/دقيقة) ومن ثم تم غسلها مرتين بالمحلول الملحي الفوسفاتي الـ PBS تمهيداً لاستخدامها في المراحل اللاحقة من المشروع.

عزل متعدد السكاريد اللبيدي للبروسيلا واليرسينا:

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

بعد العزل، تم التأكد من نقاوة متعدد السكاريد الليبيدي 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 الحضن 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 للاضداد النانوية (Phage Display):

بعد الحصول على متعدد السكاريد الليبيدي النقي من كل من البروسيلا واليرسينيا، تمت عملية غربلة المكتبة المورثية للأضداد النانوية، وذلك بتطبيق تقنية الفاجات العارضة. ففي البداية تم تثبيت المستضدات (متعدد السكاريد الليبيدي للبروسيلا أواليرسينيا) ضمن صفيحة 96 بئر ELISA (TPP10®) وحُفِظَت 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 $M_{13}KO_7$ Helper phage وتم الحضن بدرجة حرارة 37° م. في اليوم الثاني ثفلت الفاجات العارضة للأضداد النانوية وحسب تركيزها، ومن ثم أضيفت لصفيحة الإليزا المغطاة بشروط مختلفة من مستضدات البروسيلا أو اليرسينيا. أضيفت بعد الحضن 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.

المقايسة المناعية الأنزيمية:

تم اختبار فعالية كل من الأمصال والأضداد المنقاة، وفق تراكيزها المشار إليها، باستخدام اختبار المقايسة المناعية الإنزيمية وذلك على متعدد السكاريد الليبيدي المحضر من البروسيلا واليرسينيا بعد تثبيته على صفيحة الإليزا بالتراكيز المحددة بحسب التجربة. وبعد فترة من الحضن، 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 المقايسة المناعية للفاجات العارضة للأضداد النانوية، تم استنبات المستعمرات البكتيرية في وسط سائل LB broth (BioBasic Inc) + أمبسيلين) 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 الحضن، تم تثفيل الصفيحة ومن ثم أضيف الطافي الحاوي على الفاجات المحورة لصفيحة مغطاة بشروط مختلفة من متعدد السكاريد الليبيدي المحضر من البروسيلا واليرسينيا وفق الشروط المثلى. تم الكشف عن الارتباط باستخدام الضد (anti-M_{13}-HRP) الموسوم بالبيروكسيداز. للكشف عن الفعالية في اختبار المقايسة، 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

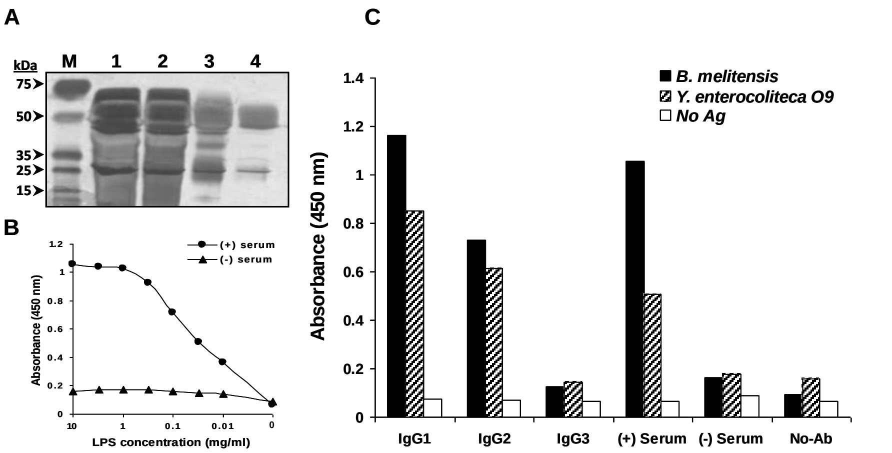
الخلفية التاريخية لمكتبة الأضداد النانوية المستخدمة في البحث

لقد تم في أعمال سابقة تحضير مكتبة الأضداد النانوية المورثية من خلايا الجمل الممنع بخلاصات البروسيلا العامة والتي منها وباستخدام تقنية الفيروسات العارضة تم عزل ثلاثة أشكال ضدية ذات نوعية متباينة لخلاصة البروسيلا العامة، وحاليا يستمر العمل على هذه الأضداد النانوية بغية توصيفها وتحديد مستضداتها النوعية المفردة. مما يدعو للدهشة هو كون هذه الأضداد النانوية غير نوعية لمتعدد السكاريد الليبيدي النقي للبروسيلا بالرغم من أهميته الاستمناعية (Abbady *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 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 متعدد السكاريد الليبيدي للبروسيلا، على الرغم من أنه لم يكن سببا في إنشاء المكتبة ولكن باعتباره واحدا من أكثر مكونات البروسيلا استمناعية وتحفيزا لتشكل الأضداد أثناء حدوث العدوى (Tumurkhuu *et al.*, 2006).

اختبار فعالية مصل الجمل الممنع بالبروسيلا تجاه متعدد السكاريد الليبيدي النقي

في هذا العمل تم تحضير مستخلص متعدد السكاريد الليبيدي بطريقة تم نشرها حديثا 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 ترحيلها عبر هلامة الأكريلاميد (SDS-PAGE) ومن ثم صبغها بنترات الفضة (شكل. 1A) بطريقة تم نشرها حديثا أيضا (al-Hendy *et al.*, 1991). من ناحية اخرى 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 بخلاصة البروسيلا، والذي منه كان قد تم تحضير المكتبة المورثية، قادر على الارتباط وبكفاءة 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 الأرتباط بمتعدد السكاريد الليبيدي النقي، و هو الذي سيتم اعتماده لاحقا في كافة اختبارات المقايسة مناعية الإنزيمية وفي عملية غربلة المكتبة المورثية.



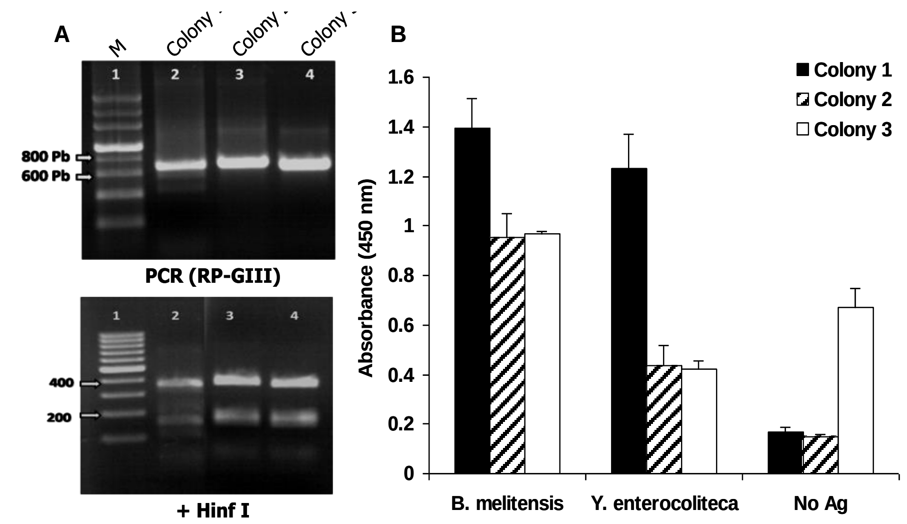
الشكل.1: اختبار فعالية مصل الجمل الممنع بخلاصة البروسيلا نحو متعدد السكاريد الليبيدي النقي
(A) ناتج ترحيل كميتين مختلفتين (40 μg في المسارين 2،1 و10 μg في المسارين 3، 4) من متعدد السكاريد الليبيدي، المحضر من البروسيلا (مسار 1، 3) واليرسينيا (مسار 2، 4)، عبر هلامة الأكريلاميد ومن ثم صبغها بنترات الفضة. يمثل المسار الأول البروتينات المحددة الطول في سلم البروتينات الجزيئي (Protein marker). (B) اختبار الإليزا لتحديد فعالية مصل جمل (بتمديد 5000/1)، ممنع بالبروسيلا (+) وآخر شاهد (-)، نحو تراكيز متدرجة (من 0 لغاية 10 ملغ/مل) من متعدد السكاريد الليبيدي المحضر من البروسيلا. (C) اختبار الإليزا لتحديد فعالية مجموعة الأضداد المختلفة، التي تم تنقيتها من مصل دم الجمل الممنع بالبروسيلا، وذلك بغياب (No Ag) أو وجود متعدد السكاريد الليبيدي (بتركيز 1 ملغ/مل) المحضر من البروسيلا واليرسينيا. وقد استخدم المصل ككل (بتمديد 5000/1) من جمل ممنع (+) وآخر شاهد (-) للمقارنة وكان الشرط (No Ab) بمثابة دليل على غياب الفعالية بغياب الأضداد.

إن عائلة الجمال، والتي تعود إليها الجمال الافريقية ذات السنم الواحد والآسيوية 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)، مسبقا من مصل الجمل الممنع وتم اختبار فعاليتها على الخلاصة العامة للبروسيلا (Abbady *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 جميعا في تجربة للمقايسة المناعية الإنزيمية وتمت مقارنتها مع فعالية المصل ككل من الجمل

الممنع ومن آخر شاهد نحو متعدد السكاريد اللبيدي لكل من البروسيلا واليرسينيا (شكل. C1). لقد أظهرت هذه التجربة قدرة مختلف الأشكال الضدية على ربط متعدد السكاريد اللبيدي للبروسيلا بصورة فعالة مقارنة بفعالية المصل الشاهد أو الشرط حين غياب الأضداد (No Ag)، أيضا فإن هذه الأضداد كان لها القدرة على ربط متعدد السكاريد اللبيدي لليرسينيا وإن بدرجة أقل مما هو الحال مع البروسيلا. 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 البروسيلا على تمييزها عن تلك المحضرة من اليرسينا في حين أنه بعد مضي أكثر من ثلاثة أشهر على بدأ عملية التمنيع تتلاشى هذه القدرة التمييزية (Abbady *et al*، قيد النشر).

انتقاء أشكال ضدية نانوية نوعية لمتعدد السكاريد اللبيدي باستخدام تقنية الفيروسات 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 scFv,). وقد كان هناك الكثير من المحاولات لعزل أمثال هذه التراكيب النوعية للعديد من المستضدات والتي من بينها متعدد السكاريد اللبيدي 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 بمتعدد السكاريد اللبيدي لليرسينيا واسترجعنا كامل الفيروسات العارضة للأضداد النانوية الغير مرتبطة لنعزل منها الأشكال الضدية النوعية للبروسيلا. 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 أكده 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 التقييد (Hinfl)، والتي تعد طريقة تقليدية سريعة لكشف أختلاف – 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 السكاريد اللبيدي فقير في بنيته الفراغية بالمعينات المستضدية مما يستدعي كون الأضداد النانوية نتجت عن ذات السلف المشترك من الخلايا البائية التي تطورت خلال عملية الأستجابة 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 السكاريد اللبيدي لكل من البروسيلا واليرسينيا في حين أن النمطين الآخرين أبديا فعالية مغايرة تجاه هذين النوعين من متعدد السكاريد اللبيدي (الشكل. 4B).



الشكل 2: انتقاء بعض الأشكال الضدية النانوية المتباينة في نوعيتها نحو متعدد السكاريد اللبيدي للبروسيلا (A) ناتج ترحيل شدف الدنا الناتجة عن تفاعل البلمرة، باستخدام المرئستين (RP, GIII)، اجري على المستعمرات البكتيرية الحاوية على مورثات الأضداد النانوية الناتجة عن عملية غربلة المكتبة المورثية وذلك بعد ترحيلها عبر هلامة الأغاروز. (إلى الأسفل) ناتج ترحيل ذات الشدف ولكن بعد أن إجري لها عملية تقطيع باستخدام أنزيم التقييد (Hinf I). في كلا الهلامتين يمثل المسار الأول واسم الدنا الجزيئي (DNA marker). (B) ناتج اختبار الإليزا لتحديد فعالية الفاجات العارضة للأضداد النانوية، و التي نتجت عن المستعمرات البكتيرية الثلاث، نحو متعدد السكاريد اللبيدي 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 السكاريد اللبيدي للبروسيلا، و حتى فيما يخص الضد النانوي ذو المقدرة العامة على ربط متعدد السكاريد اللبيدي للبروسيلا واليرسينيا بما يدعو للتفاءل بقدرته على الربط العام لمتعدد السكاريد اللبيدي من العديد من الأنماط البكتيرية بما يشجع على استثماره كأداة قيمة في تطوير أدوات وأطقم تشخيصية لكشف تلوث العديد من العينات الطبية والدوائية بمتعددات السكاريد اللبيدي 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 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 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 السكاريد اللبيدي من خلال اختبار فعالية الأضداد النانوية النقية مع كل من هذه الأجزاء على حدى. إن محاولة إنتاجنا لأضداد نانوية قادرة على تمييز متعدد السكاريد اللبيدي 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. 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.

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 *Camelidea*. 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 form 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	**كلية الزراعة – جامعة المنصورة**
أ.د / عبد الحميد مليجي عبد الحميد	**كلية الزراعة – جامعة كفر الشيخ**