

Original Article

Targeting of M13 Phage Particles by Human Holotransferrin Using a Chemical Coupling Strategy

Mahboubeh Kavoochi¹, Mohammad Khalaj-kondori^{2*}, Mehdi Kadivar³

¹Department of Biology, School of basic Sciences, Research and Science Branch of Islamic Azad University, Zanzan, Iran

²Department of Animal Sciences, School of Natural Science, University of Tabriz, Tabriz, Iran

³Department of Biochemistry, Pasture Institute of Iran, Tehran, Iran

Received: 17 Oct, 2014 Accepted: 10 Jun, 2015

Abstract

Background & Objectives: Targeting transgene carriers and vectors to individual cells and tissues is one of the most important goals of gene therapy. Bacteriophages are of appropriate transgene carriers and there are different methods for their targeting to target cells. Present study reports preparation of targeted M13-based bacteriophage particles by a chemical coupling strategy.

Materials and Methods: First, the pCMV-Script-GFP construct was produced via in vivo excision protocol from λ -GFP Phage particles using ExAssist helper phage and XL0LR as specific host. Then, M13 phage particles bearing GFP (M13-GFP) were obtained by single stranded rescue using R408 helper phage. The human holotransferrin molecules were then coupled to the surface of phage particles by reductive amination chemistry. Transferrin molecules bind to the surface of phage particles were studied by phage-ELISA.

Results: Phage-ELISA tests showed that holotransferrin molecules were coupled to the surface of M13 phage particles in a correct way and the transferrin-targeted M13 phage particles were prepared. Further analysis showed that about 485 transferrin molecules coupled per phage particle.

Conclusion: The results show that chemical coupling might be considered as a suitable strategy for targeting of M13 particles via coupling of targeting molecules in high density to the phage surface.

Keywords: Chemical Coupling, M13 Phage, Holotransferrin, Targeting

*Corresponding author:

E-mail: khalaj@tabrizu.ac.ir

مقاله پژوهشی

هدف‌گیری ذرات فاژی M13 با پروتئین هولوترانسفرین انسانی به روش اتصال شیمیایی

محبوبه کاوسی^۱، محمد خلیج‌کندری^{۲*}، مهدی کدیور^۳

^۱ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی زنجان، زنجان، ایران

^۲ گروه علوم جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

^۳ گروه بیوشیمی، انیستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

دریافت: ۹۳/۷/۲۵ پذیرش: ۹۳/۱۰/۲۰

چکیده

زمینه و اهداف: انتقال هدفمند ناقل‌ها و حامل‌های ژنی به سلول‌ها و بافت‌های خاص یکی از مهمترین مسائل در آزمایش‌های ژن‌درمانی است. باکتریوفاژها حامل‌های ژنی مناسبی هستند و روش‌های مختلفی برای انتقال هدفمند آنها به سلول‌های مورد نظر وجود دارد. در این مطالعه تهیه ذرات فاژی هدفمند شده بر پایه فاژ M13 به روش اتصال شیمیایی ارائه می‌شود.

مواد و روش‌ها: ابتدا سازه فاژمیدی pCMV-Script-GFP از ذرات فاژی GFP- λ توسط فاژ کمکی ExAssist به روش برش درون سلولی با استفاده از سویه میزبان اختصاصی XL0LR برش و با استفاده از فاژ کمکی R408 ذرات فاژی M13-حاوی ژن GFP (M13-GFP) تولید شدند. سپس ملکول‌های پروتئین هولوترانسفرین انسانی با روش اتصال شیمیایی آمیناسیون احیایی به سطح ذرات فاژی حاصل اتصال داده شدند. اتصال ملکول‌های ترانسفرین به سطح ذرات فاژی با روش phage-ELISA بررسی شد.

یافته‌ها: آزمایشات phage-ELISA نشان داد که اتصال ملکول‌های ترانسفرین به سطح ذرات فاژی به درستی انجام گرفته و ذرات فاژی M13 هدف‌گیری شده با ترانسفرین تهیه شده است. بررسی‌های بیشتر نشان داد که تقریباً ۴۸۵ مولکول ترانسفرین به هر ذره فاژی متصل شده است.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل نشان می‌دهند که روش اتصالات شیمیایی می‌تواند به عنوان راهکاری مناسب در هدفمندسازی ذرات فاژی M13 با اتصال مولکول‌های هدف‌گیری به تعداد زیاد به سطح آنها مورد استفاده قرار گیرد.

کلیدواژه‌ها: اتصال شیمیایی، فاژ M13، هولوترانسفرین، هدف‌گیری

* ایمیل نویسنده رابط: khalaj@tabrizu.ac.ir

مقدمه

پروتئینی، تکثیر آسان و کم‌هزینه و پایداری فیزیکی آنها باعث شده است تا ذرات فاژی به عنوان حامل‌های ژنی جذابی مورد توجه قرار گیرند (۱). روش‌های مختلفی برای هدفمندسازی و ارسال آنها به سلول‌های هدف وجود دارد که از جمله آنها می‌توان به فرآیند فاژنمایی (Phage display) و نیز اتصال شیمیایی اشاره کرد. روش اتصال شیمیایی از طریق برقراری پیوندهای

یکی از مهمترین مسائل ژن‌درمانی دستیابی به حامل‌های ژنی کارآمد، بی‌خطر و هدفمند است. از جمله حامل‌های ژنی مناسب باکتریوفاژها هستند که به دلیل امکان هدفمندسازی آنها نسبت به رده خاصی از سلول‌ها و نیز عدم تمایل به سلول‌های پستانداران به عنوان حامل‌های ژنی ایمن مطرح می‌باشند. علاوه بر انعطاف-پذیری ژنتیکی، امکان حفاظت از ترانسژن در درون پوشش

شدند. پلاک‌ها به روش plaque-PCR تأیید شدند. بدین منظور مخلوط PCR شامل تمامی اجزاء به جز DNA الگو در ویال‌های ۰/۲ml به تعداد کافی توزیع شد. سپس تیپ‌های استریل را به پلاک‌های مورد نظر تماس داده تا به عنوان DNA الگو برای انجام واکنش PCR به کار رود. جهت غربالگری پلاک‌ها از آغازگرهای اختصاصی ژن GFP موجود در ژنوم ذرات فازی نو ترکیب استفاده شد. شرایط واکنش PCR عبارت بود از: واسرشت سازی اولیه ۹۶ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه و سپس ۳۵ تکرار چرخه ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه و گسترش نهایی ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد. در این واکنش از پلاسمید pEGFP-N1 (Biosciences Clontech, Heidelberg, Germany) به عنوان کنترل مثبت و از مخلوط PCR بدون DNA الگو به عنوان کنترل منفی استفاده شد. جهت بدست آوردن سازه فزومیدی pCMV-Script-GFP از روش برش و خارج‌سازی درون سلولی (In vivo-excision) استفاده شد. بدین منظور در دو ارلن حاوی ۵۰ml محیط کشت LB همراه با مکمل، باکتری‌های XL1-Blue MRF^۱ و نیز XL0LR در ۳۰ درجه سانتیگراد کشت شبانه داده شدند. باکتری‌ها در ۱۰۰۰gX به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و رسوب حاصل در ۲۵ ml از ۱۰mM MgSO₄ به طور جداگانه حل شدند. مقدار ۲۰۰ μl باکتری با ۲۵۰ μl از محلول فازی λ-GFP حاوی بیش از ۱۰^۵ ذره فازی و ۱ μl فز کمکی ExAssist (Stratagene) حاوی بیش از ۱۰^۶ ذره فازی در یک فالكون مخلوط و ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد بدون تکان انکوبه شدند تا فازه‌ها به باکتری‌ها متصل شوند. سپس ۳ ml محیط کشت LB به آن اضافه و ۳ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد همراه با تکان انکوبه شد. پس از آن فالكون در حمام آب گرم ۷۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه حرارت داده شد تا ذرات فز لامبدا و سلول‌های باکتری لیز شوند. اضافات سلولی با سانتریفوژ در ۱۰۰۰gX به مدت ۱۵ دقیقه رسوب داده شدند. محلول روی حاوی ذرات فازی M13-GFP است که از برش و خارج‌سازی سازه فزومیدی pCMV-Script-GFP و بسته‌بندی آن بدست آمده‌اند. محلول فازی حاصل به یک فالكون استریل منتقل و در ۴ درجه سانتیگراد ذخیره شد. مقدار ۵۰۰ μl از محلول باکتری E.Coli XL0LR (Stratagene) رشد یافته در محیط کشت LB مایع با ۱۰ μl از محلول فازی حاصل از فرآیند برش و خارج‌سازی درون سلولی تلقیح شدند. پس از ۱ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، ۱۰ μl از آن بر روی پلیت LB agar حاوی آنتی بیوتیک کانامیسین (Sigma) با غلظت ۵۰ μg/ml کشت چمنی داده شد. پس از ۱۲ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد کلنی‌های ظاهر شده با روش colony-PCR غربالگری شدند. بدین منظور کمی از کولونی‌های مورد نظر توسط سرسمپلرهای استریل به محلول‌های واکنش PCR اضافه شدند و مطابق با آنچه در مورد plaque-PCR توضیح داده شد کولونی‌ها غربالگری شدند. یکی از کولونی‌های تأیید شده توسط colony-PCR در ۵ml محیط کشت LB مایع حاوی ۵۰ μg/ml آنتی بیوتیک کانامیسین تلقیح شد.

عرضی پایدار میان گروه‌های فعال لیگاند مورد نظر با جایگاه‌های اتصال در سطح پروتئین‌های پوششی ذرات فازی انجام می‌پذیرد. در این روش با انجام یک سری واکنش‌های متنوع و ساده شیمیایی می‌توان به صورت مستقیم و بدون نیاز به انجام دستکاری‌های پیچیده ژنتیکی، حامل ژنی هدفمندی را طراحی کرد (۲). ترانسفرین یکی از ملکول‌های هدفگیری (Targeting molecules) مناسب برای انتقال هدفمند دارو و ژن درمانگر به سلول‌ها و بافت‌های سرطانی است. زیرا سلول‌های سرطانی برای تأمین آهن مورد نیاز خود برای رشد و تکثیر سریع، گیرنده ترانسفرین را در سطح خود بیشتر بیان می‌کنند در صورتی که سلول‌های طبیعی و تمایز یافته این گیرنده را در حد بسیار اندک بیان می‌کنند (۳). ترانسفرین برای انتقال هدفمند نانو داروها، نانو ذرات مختلف از قبیل لیپوزوم‌ها و نیز فازه‌ها مورد استفاده قرار گرفته است (۴). به عنوان مثال با فرمولاسیون نانوذرات لیپوزومی هدفگیری شده با ترانسفرین، امکان ارسال اختصاصی این ذرات به سلول‌ها و بافت توموری جامد به صورت برون‌تنی (In vitro) و درون‌تنی (In vivo) فراهم شده است (۵). همچنین از محصول کونژوگه آرتیمیسین-ترانسفرین جهت مهار رشد سلول‌های سرطانی پروستات بهره برده‌اند (۶). از سوی دیگر با هدف قرار دادن دومین SH- در اسید آمینه سیستئین و دومین -NH₂ در اسید آمینه لیزین موجود در پوشش پروتئینی باکتریوفاژ HK97 توسط ترکیبات هیدرازیدی، مال‌ایمیدی و استری موفق به اتصال ذرات پروتئین ترانسفرین و ذرات فلئورستی در سطح ذرات فازی شدند (۵). مطالعه حاضر با هدف ارزیابی کارایی روش اتصال شیمیایی در نمایش مولکول‌های هدفگیری هولوترانسفرین انسانی در سطح ذرات فازی M13 نو ترکیب انجام گرفت. بدین منظور ابتدا ذرات فازی M13 نو ترکیب حاوی توالی ژن GFP (M13-GFP) تولید و تکثیر شدند. سپس ملکول‌های هولوترانسفرین انسانی با روش اتصال شیمیایی به سطح ذرات فازی حاصل اتصال داده شدند. در نهایت کارایی اتصال و نمایش ملکول‌های هدفگیری مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

سلول‌های باکتری E.Coli XL1-Blue MRF (Stratagene) رشد یافته در محیط کشت LB مایع حاوی مکمل (۰/۲٪ W/V) مالتوز و ۱۰mM محلول سولفات منیزیم، با ذرات فازی λ-GFP آلوده و تا مشاهده لیز باکتری‌ها در ۳۷ درجه سانتیگراد با شدت تکان ۲۰۰rpm انکوبه شدند. تهیه ذرات فازی λ-GFP قبلاً توسط khalaj-kondori و همکاران گزارش شده است (۷) و این ذرات توسط آن گروه پژوهشی برای این مطالعه اهداء شده است. جهت تهیه پلاک و تأیید ذرات فازی تکثیر یافته، مقدار ۲۰۰ μl از محلول باکتری XL1-Blue MRF تازه با OD₆₀₀=۱، با رقت ۱۰^{-۴} از ذرات فازی تکثیر شده مخلوط و ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد بدون تکان انکوبه شدند. سپس آن‌ها با Top agar NZY ذوب و خنک شده تا ۴۸ درجه سانتیگراد مخلوط و بلافاصله بر روی پلیت حاوی محیط کشت NZY agar ریخته شدند. پس از حدود ۱۰ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد پلاک‌ها ظاهر

هدفگیری شده با هولوترانسفرین محاسبه شد. مقدار $100 \mu\text{l}$ آنتی M13 با غلظت $100 \mu\text{l}/\text{ml}$ در بافر PBS به هر چاهک پلیت الیزا (Nunc, Roskilde, Denmark) اضافه و یک شبانه‌روز در ۴ درجه سانتیگراد انکوبه شد. چاهک‌ها پس از تخلیه با بافر شستشو (Tween20 in PBS) 0.05% شستشو شدند و با بافر بلاک‌کننده (milk in PBS) 3% به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. چاهک‌ها تخلیه، شستشو و به هر کدام حدود 10^9 ذره فاژی M13-GFP هدفگیری شده با ترانسفرین یا M13-GFP طبیعی اضافه و یک ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند. چاهک‌ها پس از شستشو با $100 \mu\text{l}$ آنتی ترانسفرین متصل به HRP (رقت $1/100$ در بافر بلاکینگ) به مدت یک ساعت در دمای اتاق تیمار شدند. به هر چاهک پس از تخلیه و ۵ بار شستشو، $100 \mu\text{l}$ سوبسترای TMB اضافه و پس از ۳۰ دقیقه واکنش با افزودن $10 \mu\text{l}$ اسیدسولفوریک 0.5M متوقف شد. جذب رنگ تولید شده با دستگاه الیزا-ریدر (Bio-Rad Microplate Reader; Bio-Rad, Hercules, CA, USA) در طول موج 450 نانومتر اندازه‌گیری شد. به هر چاهک پلیت الیزا، مقدار $100 \mu\text{l}$ هولوترانسفرین با غلظت های 25 ، 50 ، 75 ، 100 نانوگرم در بافر PBS اضافه و یک شبانه‌روز در ۴ درجه سانتیگراد انکوبه شد. پس از تخلیه و شستشو با بافر PBS، به هر چاهک $150 \mu\text{l}$ بافر بلاک‌کننده 3% milk in PBS اضافه و به مدت یک ساعت در دمای اتاق برای بلاکینگ انکوبه شدند. چاهک‌ها پس از شستشو، با $100 \mu\text{l}$ آنتی ترانسفرین متصل به HRP (رقت $1/1000$ در بافر بلاکینگ) به مدت یک ساعت در دمای اتاق تیمار شدند. به هر چاهک پس از تخلیه و ۳ بار شستشو، $100 \mu\text{l}$ سوبسترای TMB اضافه و پس از ۳۰ دقیقه واکنش با افزودن $10 \mu\text{l}$ اسیدسولفوریک 0.5M متوقف شد. جذب رنگ تولید شده با الیزا-ریدر در 450 نانومتر اندازه‌گیری شد. سپس نمودار مقادیر جذب حاصل از هر کدام از غلظت‌های ترانسفرین نسبت به غلظت مورد استفاده از ترانسفرین در چاهک‌ها توسط نرم افزار Excel ترسیم و معادله آن بدست آمد. معادله حاصل برای محاسبه تعداد تقریبی ملکولهای ترانسفرین متصل به ذرات فاژی استفاده شد.

یافته‌ها

ابتدا ذرات فاژی M13-GFP مورد استفاده در پژوهش تکثیر و به روش plaque-PCR تأیید شدند. تأیید آن‌ها با انجام PCR برای نشان دادن حضور توالی GFP در آنها انجام گرفت. پلاک‌های نوترکیب مثبت تکثیر، تعیین تیترو و برای فرآیند برش و خارج-سازی درون سلولی استفاده شدند. کولونی‌های حاصل از فرآیند برش و خارج سازی درون سلولی که باید دارای سازه فاژمیدی pCMV-Script-GFP باشند توسط colony-PCR و با تکثیر توالی GFP غربالگری و تأیید شدند. در نهایت کولونی‌های مثبت کشت داده شدند و سازه ژنی pCMV-Script-GFP موجود در آن‌ها با استفاده از فاژ کمکی R408 بسته‌بندی و به صورت ذرات فاژی M13-GFP طبیعی به محیط کشت آزاد شدند. ذرات فاژی M13-GFP حاصل تکثیر و تیترو آن‌ها 1.4×10^{12} cfu/ml محاسبه شد. در اثر اکسیداسیون پروتئین هولوترانسفرین، اسیدآمین‌های لیزین

سپس 10^8 ذره فاژ کمکی R408 (Stragene) به محیط کشت اضافه شد. پس از یک شبانه‌روز انکوباسیون در دمای 37 درجه سانتیگراد با تکان شدید، مخلوط واکنش به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای 70 درجه سانتیگراد حرارت داده شد. اضافات سلولی توسط سانتریفیوژ رسوب داده شد. محلول رویی به یک فالكون استریل منتقل و در نهایت ذرات فاژی توسط محلول 1M سدیم کلرید و 10% پلی اتیلن گلیکول 8000 رسوب داده شدند. رسوب فاژی حاصل در بافر SM حل و جذب نوری آن در طول موج 269 نانومتر توسط دستگاه Nano Drop اندازه-گیری شد. فرمول زیر برای محاسبه تیترو محلول فاژی استفاده شد (۸).

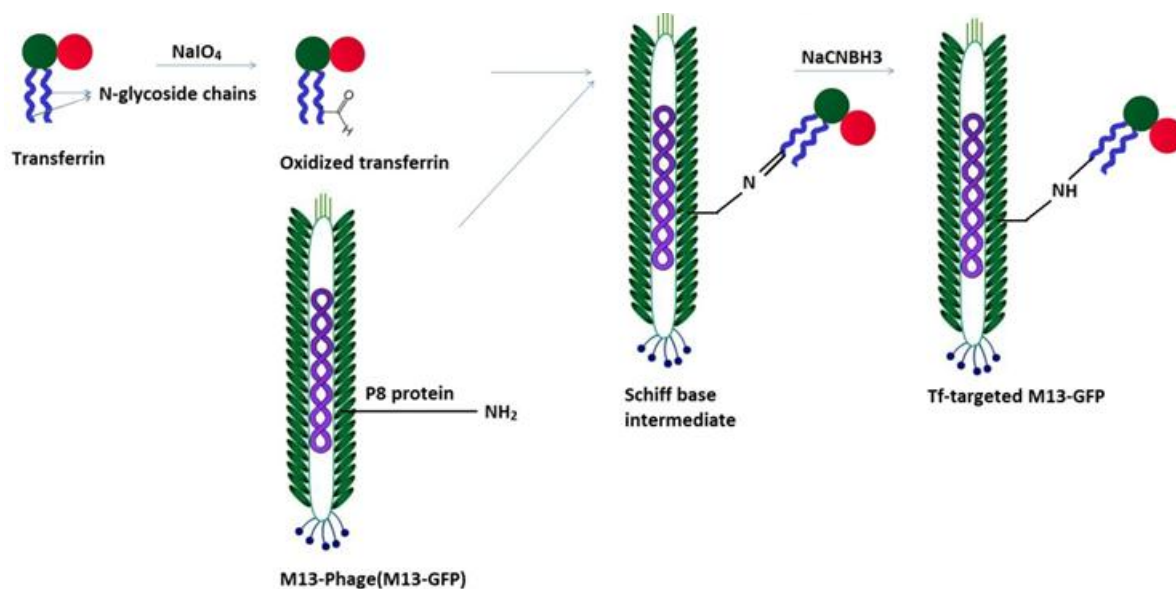
$$\text{Virions/ml} = A_{269} \times 6 \times 10^{16} / \text{number of nucleotides in the genome}$$

پروتئین هولوترانسفرین انسانی (Sigma-Aldrich) با غلظت 1mg/ml در محلول 0.1 مولار سدیم استات با $\text{pH}=5.5$ حل شد. محلول سدیم متاپریدات با غلظت نهایی 10mM به آن اضافه گردید و برای دور نگهداشتن از نور دور آن کاغذ آلومینیوم پیچانده شد. به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد تا زنجیره‌های قندی در ساختار پروتئین هولوترانسفرین، اکسید شده و گروه‌های فعال آلدهیدی بدست آیند. محصول واکنش توسط کیسه دیالیز تخلیص و بافر آن با بافر PBS 0.1 مولار سدیم فسفات با $\text{pH}=7.2$ تعویض شد. برای ارزیابی محتوای آهن پروتئین هولوترانسفرین، جذب آن در طول موج های 280 نانومتر و 470 نانومتر قبل و بعد از واکنش اکسیداسیون اندازه‌گیری و نسبت A_{470}/A_{280} با هم مقایسه شد. مقدار 5ml از ذرات فاژی M13-GFP با تیترو 1×10^{11} cfu/ml موجود در بافر SM را با استفاده از Thermo Scientific- Pierce, MWCO concentrator K150 (Rockford, IL, USA) تغلیظ و بافر آن با بافر PBS 0.1 مولار سدیم فسفات با $\text{pH}=7.2$ تعویض و به حجم نهایی 5ml رسانده شد. سپس جذب نوری محلول در طول موج 269 نانومتر، با دستگاه Nano Drop سنجیده شد و تیترو ذرات فاژی با استفاده از فرمول مذکور در بالا تعیین شد. پروتئین هولوترانسفرین اکسید شده تا غلظت نهایی 0.125mg/ml در بافر PBS رقیق شد. مقدار 2ml از آن با 5ml ذره فاژی M13-GFP حاوی حدود 5×10^{11} ذره فاژی مخلوط شد. سپس مقدار $70 \mu\text{l}$ محلول سدیم سیانوبروویدرید 5M (NaCNBH₃) تا غلظت نهایی 50mM اضافه و یک شبانه‌روز در ۴ درجه سانتیگراد قرار داده شد. برای متوقف کردن واکنش $200 \mu\text{l}$ از محلول Tris-Hcl با $\text{pH}=7.4$ به آن اضافه شد. محصول واکنش به وسیله تغلیظ کننده K MWCO concentrator 150 تا حجم 1ml تغلیظ شد. محلول باقی مانده در داخل تغلیظ‌کننده که حاوی ذرات فاژی M13-GFP هدفگیری شده (متصل شده) با ترانسفرین است، در 5ml بافر PBS با $\text{pH}=7.4$ رقیق شد. جذب محلول نهایی در طول موج های 260 ، 269 و 280 نانومتر اندازه‌گیری و تیترو ذرات فاژی M13-GFP هدفگیری شده با هولوترانسفرین محاسبه شد.

ذرات فاژی با آنتی‌ترانسفرین آشکارسازی شدند. میانگین جذب رنگ تولید شده حاصل از چاهک‌های تیمار شده با ۱۰۹ ذره Tf-targeted M13-GFP (با سه بار تکرار) برابر با ۰/۷۸۱، میانگین جذب رنگ تولید شده (در طول موج ۴۵۰ نانومتر) حاصل از چاهک‌های تیمار شده با ۱۰۹ ذره M13-GFP (با سه بار تکرار) برابر با ۰/۰۲۲ و میانگین جذب رنگ تولید شده حاصل از چاهک‌های تیمار شده با بافر بلاک‌کننده بدون فاژ به عنوان کنترل منفی (با سه بار تکرار) برابر با ۰/۰۱۹ بود. نتایج حاصل از بررسی فاژ-الیزا حاکی از موفقیت واکنش اتصال ملکول‌های ترانسفرین و تولید ذرات فاژی M13-GFP هدفگیری شده با ترانسفرین می‌باشد (نمودار ۲).

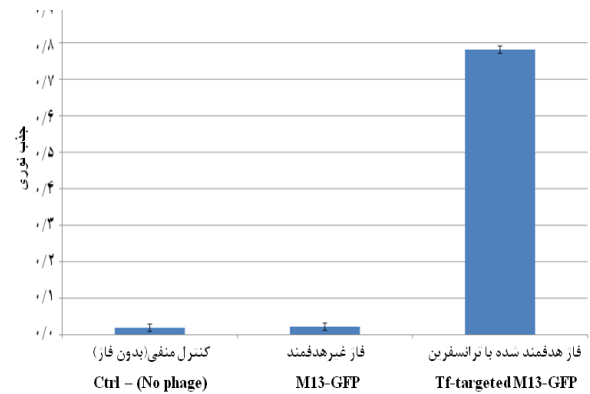
جهت بررسی تعداد متوسط مولکول‌های ترانسفرین متصل شده به ازای هر ذره فاژی از الیزا استفاده شد. بدین منظور چاهک‌های پلیت الیزا توسط غلظت‌های مختلف از هولوترانسفرین پوشانده شدند و پس از شستشو و بلوکه کردن توسط آنتی-ترانسفرین تیمار شدند. جذب رنگ تولید شده در اثر واکنش با سوبسترای TMB اندازه‌گیری شد و داده‌های حاصل برای ترسیم نمودار استاندارد به کار رفت (نمودار ۳). نمودار استاندارد حاصل و معادله آن برای محاسبه تعداد مولکول‌های متصل به سطح ذرات فاژی استفاده شد. (جدول ۱) روش محاسبات را نشان می‌دهد. بررسی‌ها نشان می‌دهد که تقریباً ۴۸۵ مولکول ترانسفرین به هر ذره فاژی متصل شده است.

موجود در جایگاه اتصال آهن تحت تأثیر قرار گرفته و منجر به جدا شدن یون‌های آهن می‌شوند که این امر می‌تواند باعث کاهش تمایل اتصال ترانسفرین به گیرنده خود در سطح سلول شود (۹). لذا تأثیر واکنش اکسیداسیون بر میزان آهن موجود در هولوترانسفرین با بررسی جذب آن در طول موج‌های ۲۸۰ و ۴۷۰ نانومتر قبل و بعد از واکنش اکسیداسیون مورد بررسی قرار گرفت. بررسی نسبت A470/A280 (با سه بار تکرار) قبل و بعد از واکنش اکسیداسیون نشان داد که میزان اشباع هولوترانسفرین بعد از اکسیداسیون در مقایسه با قبل از اکسیداسیون ۶۴٪ می‌باشد. اکسیداسیون هولوترانسفرین با سدیم‌متاپریدات به ایجاد گروه‌های آلدهیدی در زنجیره‌های قندی ترانسفرین انجامید که در ادامه واکنش، این گروه‌های فعال با گروه‌های آمین موجود در اسیدآمینه-های بازی پروتئین‌های پوششی فاژ واکنش داده و ساختار شیف-باز تشکیل دادند. ساختارهای شیف-باز تشکیل شده، با افزودن سدیم‌سیانویدرید احیاء شده و باعث اتصال کووالان ترانسفرین به سطح ذرات فاژی شدند. نتیجه این واکنش، ایجاد ذرات فاژی M13-GFP هدفگیری شده با ترانسفرین می‌باشد. شکل ۱ مراحل اتصال شیمیایی ترانسفرین و تولید ذرات فاژی M13-GFP هدفگیری شده را نشان می‌دهد. اتصال ملکول‌های ترانسفرین به سطح ذرات فاژی با phage-ELISA مورد بررسی قرار گرفت. در این روش از الیزای غیرمستقیم استفاده شد. به عبارتی ابتدا ذرات فاژی توسط آنتی‌بادی‌های پوشانده شده در سطح چاهک‌ها به دام افتادند و سپس حضور ملکول‌های ترانسفرین متصل به سطح

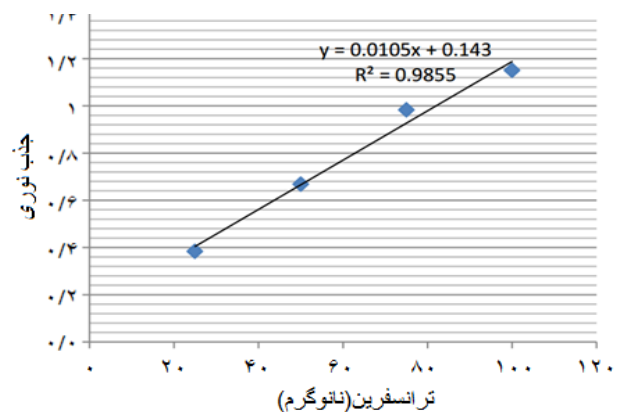


شکل ۱: شکل شماتیک از استراتژی اتصال شیمیایی برای ساخت ذرات فاژی M13-GFP هدفگیری شده با ترانسفرین: دایره سبز رنگ نشان دهنده دومین C-ترمینال که هر دو زنجیره N-گلیکوزیدی به آن متصل‌اند. دایره قرمز رنگ نشان دهنده دومین N-ترمینال است. زنجیره‌های گلیکوزیدی توسط NaIO4 اکسید شده و گروه آلدهیدی COH- بدست آمده با گروه آمین NH2- در اسیدآمینه لیزین موجود در پروتئین ۸ پوشش پروتئینی فاژ M13 واکنش می‌دهند. این تعامل منجر به تولید ساختارهای شیف-باز پایدار می‌شود که در حضور ماده NaCNBH3 احیاء شده و پیوند کووالانسی پایدار را ایجاد می‌کند.

پذیری در فرآیندهای اتصال به طور معمول ابتدا یک مولکول فاصله انداز (Spacer) و یا رابط (Linker) به کار می‌رود (۳). یکی از مزایای ترانسفرین آن است که در مولکول ترانسفرین زنجیره‌های قندی می‌توانند به عنوان رابط مورد استفاده قرار گیرند. به طوری که گروهی از محققین داروی آرتیمیسین را به زنجیره‌های قندی متصل و از ترانسفرین برای انتقال هدفمند این دارو به سلول‌های سرطانی بهره بردند (۱۴-۱۲). روش‌های مختلفی برای هدفگیری فازها وجود دارد که از جمله مهمترین آن‌ها فازنمایی و اتصال شیمیایی می‌باشند. در این مطالعه برای هدفگیری ذرات فاز Tf -targeted M13-GFP از روش اتصال شیمیایی استفاده شد. با اکسیداسیون زنجیره‌های قندی ترانسفرین گروه‌های فعال آلدهیدی ایجاد شدند که در اثر واکنش با گروه‌های آمین موجود در پروتئین‌های پوششی باعث اتصال کووالان ترانسفرین به سطح ذرات فاز می‌شدند. اما واکنش اکسیداسیون تا حدودی باعث آسیب ناحیه اتصال به آهن در ترانسفرین شده و در نتیجه آهن از ساختار آن جدا می‌شود (۹). این موضوع از آن جهت حائز اهمیت است که میزان اشباع ترانسفرین از آهن رابطه مستقیمی با تمایل اتصال آن به گیرنده ترانسفرین دارد (۱۲). در مطالعه حاضر بررسی نسبت جذب A_{470}/A_{280} قبل و بعد از اکسیداسیون نشان داد که حدود ۳۶٪ میزان اشباع آهن کاهش یافته است که تقریباً با مطالعات دیگر هماهنگی دارد (۷ و ۹). تعداد مولکول‌های ترانسفرین متصل به سطح هر ذره فاز توسط روش دانسیتومتری به کمک الیزا برآورد شد. نتایج حاصل حاکی از اتصال تقریباً ۴۸۵ مولکول ترانسفرین به ازای هر ذره فاز است. اتصال تعداد بالای مولکول هدفگیری به سطح فاز ارتباط مستقیمی با کارایی انتقال و ورود ذرات فاز به درون سلول‌های یوکاریوت دارد (۱۵). جهت درک بیشتر اهمیت این موضوع و نیز مقایسه با روش فازنمایی لازم به ذکر است که فازنمایی علی‌رغم مزایای زیاد، دارای نقاط ضعف و محدودیت‌هایی است. توسط فازنمایی فقط توالی‌های پپتیدی کوتاه (۱۲-۸ آمینو اسید) را می‌توان به سهولت در سطح فازها نمایش داد که احتمالاً به خاطر مداخله با سرهمبندی کارآمد ذرات فاز می‌باشد (۱۹-۱۶). رابطه معکوسی بین بزرگتر شدن لیگاند مورد نظر و پیچیده‌تر شدن ساختار مولکولی آن با میزان رشد کلون‌های فاز می‌وجود دارد زیرا فازهایی که پروتئین‌های بزرگی را با تراکم بالا نمایش می‌دهند از ضعف بیشتری رنج می‌برند (۲۰). با توجه به سهولت و نیز وجود مکانیسم‌های مختلف برای اتصال شیمیایی و از طرفی بی‌خطری نسبی فازها، دامنه کاربرد آنها روز به روز در حال افزایش است. به طوری که اخیراً با اتصال ذرات فاز به نانوذرات طلا، روشی کارآمد برای تشخیص و آشکارسازی باکتری‌های بیماری‌زا از قبیل استافیلوکوکوس اورئوس ارائه شده است (۲۱). همچنین، Roehnisch و همکاران ایدئوتایپ‌های توموری مربوط به بدخیمی‌های لنفوسیت‌های B را به صورت شیمیایی به سطح ذرات فاز M13 متصل کردند و آنها را برای واکنش‌های مدل موشی توموری استفاده نمودند. نتایج آنها نشان داد فازهایی که به روش شیمیایی به سطح آنها ایدئوتایپ توموری متصل شده بود در بهبود و واکنش‌های، در مقایسه با فازهایی که به روش



نمودار ۲: نمودار حاصل از نتایج واکنش الیزا مبنی بر آشکارسازی اتصال مولکول‌های ترانسفرین به سطح ذرات فاز: چاهک‌های پوشانده شده با آنتی‌بادی M13 با 10^9 ذره Tf -targeted M13-GFP و 10^9 ذره M13-GFP و بافر بلاک‌کننده بدون فاز به عنوان کنترل منفی (No-Phage) تیمار شدند.



نمودار ۳: منحنی استاندارد بدست آمده جهت محاسبه تعداد مولکول‌های هولوترانسفرین متصل به هر ذره فاز: محور افقی نشان‌دهنده مقادیر هولوترانسفرین پوشانده شده در چاهک‌های پلیت الیزا بر حسب نانوگرم (ng) و محور عمودی نشان‌دهنده میانگین مقادیر جذب‌های متناظر آن‌هاست.

جدول ۱: نحوه محاسبه تعداد متوسط مولکول‌های ترانسفرین متصل به هر ذره فاز

معادله	مقدار
$y = 0.0105x + 0.143$	
$y =$ میانگین جذب	~ 0.8
$x =$ مقدار تقریبی نانوگرم‌های ترانسفرین	$\sim 62 \text{ ng}$
یک نانوگرم ترانسفرین	$10^9 \times 7/8 \text{ molecules}$
تعداد کل مولکول‌های ترانسفرین موجود در هر چاهک	$10^9 \times 485 \text{ molecules}$
تعداد ذرات فاز هدفمند (Tf-targeted M13-GFP)	$\sim 10^9 \times 1$
میانگین تعداد مولکول‌های متصل به هر ذره فاز	۴۸۵

بحث

انتخاب یک مولکول هدفگیری مناسب بسته به شرایط و اهداف تحقیق می‌تواند در موفقیت و یا عدم موفقیت آن سهم بسزایی داشته باشد (۱۰). در مطالعه حاضر ترانسفرین به عنوان مولکول هدفگیری مورد استفاده قرار گرفت. ترانسفرین انسانی یک گلیکوپروتئین با دو زنجیره قندی متصل به دوین انتهایی C آن است (۱۱). جهت اجتناب از تحت‌الشعاع قرار گرفتن ساختار و عملکرد مولکول هدفگیری و نیز ایجاد فضای لازم برای انعطاف-

محدودیت است در روش اتصال شیمیایی محدودیت سایز و تعداد ملکول‌های هدفگیری بسیار کم‌رنگ‌تر است و بنابراین می‌توان از این روش در آزمایشات مختلف هدفگیری و انتقال هدفمند دارو و ژن بهره جست.

تقدیر و تشکر

این پژوهش با حمایت مالی معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری، صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور در دانشگاه تبریز انجام شده است. نویسندگان از آقای دکتر مجید صادقی‌زاده عضو هیأت علمی دانشگاه تربیت مدرس بابت در اختیار قرار دادن ذرات فاژی λ -GFP صمیمانه قدردانی می‌نمایند.

مهندسی، ایدیوتایپ در سطح آنها بروز داده شده بود به طور معنی‌داری کارآمدتر هستند (۲۲). با دستیابی به این نتیجه، آنها مطالعه خود را وارد فاز I و II بالینی کردند و با تهیه واکسنهای ایدیوتایپی فاژی، ۱۵ بیمار مبتلا به میلوما چندگانه در مرحله پیشرفته را واکسینه کردند (۲۳). نتایج حاصل نشان از عملکرد مطلوب و کارآمد این روش در درمان میلوما چندگانه می‌باشد.

نتیجه‌گیری

به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که روش اتصال شیمیایی یک روش کارآمد برای اتصال ملکول‌های هدفگیری به سطح ذرات فاژی است. بر خلاف فازنمایی که از نظر سایز و تعداد ملکول‌های هدفگیری برای نمایش در سطح ذرات فاژی دارای

References

- Piersanti S, Cherubini G, Martina Y, Salone B, Avitabile D, Grosso F, et.al. Mammalian cell transduction and internalization properties of lambda phage displaying the full-length adenoviral penton base or its central domain. *J Mol Med* 2004; **82**(7): 467-476.
- Boldt GE, Dickerson TJ, Janda KD. Emerging chemical and biological approaches for the preparation of discovery libraries. *Drug Discov Today* 2006; **11**(3-4): 143-148.
- Qian ZM, Li H, Sun H, Ho K. Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway. *Pharmacol Rev* 2002; **54**(4): 561-587.
- Ishida O, Maruyama K, Tanahashi H, Iwatsuru M, Sasaki K, Eriguchi M, et.al. Liposomes bearing polyethylene glycol-coupled transferrin with intracellular targeting property to the solid tumors in vivo. *Pharm Res* 2001; **18**(7): 1042-1048.
- Huang RK, Steinmetz NF, Fu CY, Manchester M, Johnson JE. Transferrin-mediated targeting of bacteriophage HK97 nanoparticles into tumor cells. *Nano Medicine* 2011; **6**(1): 55-68.
- Nakase I, Gallis B, Takatani-Nakase T, Oh S, Lacoste E, Singh NP, et.al. Transferrin receptor-dependent cytotoxicity of artemisinin-transferrin conjugates on prostate cancer cells and induction of apoptosis. *Cancer Lett* 2009; **274**(2): 290-298.
- Khalaj-Kondori M, Sadeghizadeh M, Behmanesh M, Saggio I, Monaci P. Chemical coupling as a potent strategy for preparation of targeted bacteriophage-derived gene nanocarriers into eukaryotic cells. *J Gene Med* 2011; **13**(11): 622-631.
- Mount JD, Samoylova TI, Morrison NE, Cox NR, Baker HJ, Petrenko VA. Cell targeted phagemid rescued by preselected landscape phage. *Gene* 2004; **341**: 59-65.
- Lai H, Sasaki T, Singh NP, Messay A. Effects of artemisinin-tagged holotransferrin on cancer cells. *Life Sci* 2005; **76**(11): 1267-1279.
- Eguchi A, Akuta T, Okuyama H, Senda T, Yokoi H, Inokuchi H, et.al. Protein transduction domain of HIV-1 Tat protein promotes efficient delivery of DNA into mammalian cells. *J Biol Chem* 2001; **276**(28): 26204-26210.
- Gomme PT, McCann KB, Bertolini J. Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions. *Drug Discov Today* 2005; **10**(4): 267-273.
- Lai H, Nakase I, Lacoste E, Singh NP, Sasaki T. Artemisinin-transferrin conjugate retards growth of breast tumors in the rat. *Anticancer Res* 2009; **29**(10): 3807-3810.
- Nakase I, Lai H, Singh NP, Sasaki T. Anticancer properties of artemisinin derivatives and their targeted delivery by transferrin conjugation. *Int J Pharm* 2008; **354**(1-2): 28-33.
- Weaver M, Laske DW. Transferrin receptor ligand-targeted toxin conjugate (TfCRM107) for therapy of malignant gliomas. *J Neurooncol* 2003; **65**(1): 3-13.
- Olofsson L, Ankarloo J, Andersson PO, Nicholls IA. Filamentous bacteriophage stability in non-aqueous media. *Chem Biol* 2001; **8**(7): 661-671.
- Ivanenkov V, Felici F, Menon AG. Uptake and intracellular fate of phage display vectors in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta (BBA). Mol Cell Res* 1999; **1448**(3): 450-462.
- Morris CJ, Smith MW, Griffiths PC, McKeon NB, Gumbleton M. Enhanced pulmonary absorption of a macromolecule through coupling to a sequence-specific phage display-derived peptide. *J Control Release* 2011; **151**(1): 83-94.
- Petrenko VA, Vodyanoy VJ. Phage display for detection of biological threat agents. *J Microbial Methods* 2003; **53**(2): 253-262.
- Smith J, Kontermann RE, Embleton J, Kumar S. Antibody phage display technologies with special reference to angiogenesis. *FASEB J* 2005; **19**(3): 331-341.
- Gupta A, Onda M, Pastan I, Adhya S, Chaudhary V.K. High-density functional display of proteins on

- bacteriophage lambda. *J Mol Biol* 2003; **334**(2): 241-254.
21. Tawil N, Sacher E, Boulais E, Mandeville R, Meunier M. X-ray Photoelectron Spectroscopic and Transmission Electron Microscopic Characterizations of Bacteriophage-Nanoparticle Complexes for Pathogen Detection. *J Phys Chemist* 2013; **117**(40): 20656-20665.
22. Roehnisch T, Then C, Nagel W, Blumenthal C, Braciak T, Donzeau M, et.al. Chemically linked phage idiotypic vaccination in the murine B cell lymphoma I model. *J Transl Med* 2013; **11**: 267.
23. Roehnisch T, Then C, Nagel W, Blumenthal C, Braciak T, Donzeau M, et.al. Phage idiotypic vaccination: first phase I/II clinical trial in patients with multiple myeloma. *J Transl Med* 2014; **12**: 119.