

تشخیص نورو توکسین کلسترید یوم بوتولینوم تیپ B به روش ساندویچ الایزا

حسین سمیعی ابیانه^{2,1}، شهرام نظریان^{3*}، جعفر امانی⁴، امیر سجاد حجتی رزگی⁵، محمدرضا رمضانی⁶، محمدرضا رحمانی⁷

- 1- کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین (ع)، تهران، ایران
- 2- کارشناس ارشد، گروه بیوتکنولوژی پزشکی و نانوتکنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
- 3- دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین (ع)، تهران، ایران
- 4- استاد، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، پژوهشکده سیستم بیولوژی مسمومیت ها، دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (عج)، تهران، ایران
- 5- کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین (ع)، تهران، ایران
- 6- دکتری تخصصی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین (ع)، تهران، ایران
- 7- کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین (ع)، تهران، ایران

* نویسنده مسئول: nazarian@ihu.ac.ir

پذیرش: 1401/6/2

دریافت: 1401/1/20

چکیده

زمینه و هدف: سموم بوتولینوم (BoNTs) جزء کشنده ترین ترکیبات شناخته شده و عامل بیماری بوتولیسم می باشند. در حال حاضر، تشخیص BoNT در غذا با استفاده از سنجش زیستی روی موش آزمایشگاهی است که یک روش بسیار حساس (محدوده تشخیص 7 pg.mL^{-1} تا 20)، اما زمان بر می باشد. روش تشخیصی ساندویچ الایزا، روشی سریع، اختصاصی و می تواند حساسیتی معادل سنجش روی موش آزمایشگاهی در آنالیز سمیت مواد غذایی داشته باشد. هدف از این پژوهش استفاده از روش ساندویچ الایزا جهت شناسایی BoNT/B بود.

مواد و روش ها: پروتئین نو ترکیب 370 اسید آمینه ای از انتهای کربوکسیل بخش اتصال دهنده سم BoNT/B با وزن مولکولی 45 کیلو دالتون به عنوان آنتی ژن بیان و با روش کروماتوگرافی تمایلی ستون Ni-NTA تخلیص شد. آنتی بادی IgG از سرم موشی و خرگوشی با روش کروماتوگرافی تمایلی ستون پروتئین G جداسازی و با روش SDS-PAGE و آزمون الایزا تأیید شد. حساسیت و اختصاصیت روش طراحی شده جهت شناسایی آنتی ژن نو ترکیب BoNT/B-HcC و توکسوئید بوتولینوم تیپ B ارزیابی شد.

نتایج: غلظت آنتی‌بادی موشی و خرگوشی تخلیص‌شده به ترتیب 3 و 4/5 میلی‌گرم از هر میلی‌لیتر سرم بود. حداقل غلظت پروتئین قابل شناسایی به روش الایزا غیرمستقیم با آنتی‌بادی تخلیص‌شده موشی و خرگوشی 475 و 118 پیکوگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. با بهینه‌سازی روش ساندریج الایزا حداقل 30 نانوگرم بر میلی‌لیتر از آنتی‌ژن نو ترکیب BoNT/B-HcC و 146 پیکوگرم بر میلی‌لیتر از BoNT/B با اختصاصیت بالا شناسایی شد.

نتیجه‌گیری: روش ساندریج الایزای طراحی‌شده می‌تواند برای شناسایی دقیق و حساس سم کلستریدیوم بوتولینوم تیپ B استفاده شود. لازم است در آینده کارایی این روش برای تشخیص سم بوتولینوم در نمونه‌های محیطی و غذایی ارزیابی شود.

کلید واژگان: کلستریدیوم بوتولینوم، نوروتوکسین بوتولینوم تیپ B، ساندریج الایزا، آنتی‌بادی IgG.

مقدمه

سموم تولیدشده به وسیله باکتری کلستریدیوم بوتولینوم¹ جزء کشنده‌ترین ترکیباتی هستند که تاکنون شناخته شده‌اند و عامل بیماری بوتولیسم² می‌باشند [1]. سموم بوتولینوم (BoNTs) که از A تا G نامگذاری می‌شوند، از نظر ساختار به هم مرتبط ولی از نظر آنتی‌ژنیسیته با یکدیگر متفاوت هستند [2]. انواع A, B, E, F در انسان بیماری ایجاد می‌کنند و انواع C و D در حیوانات موجب بیماری می‌شوند و تاکنون از تیپ G بیماری خاصی مشاهده نشده است [3]. بیشترین موارد مسمومیت بوتولیسم در ایران مربوط به تیپ E است. با این وجود هنوز هیچ‌گونه واکسن مؤثری برای مقابله با این عوامل در دسترس نیست. سموم عصبی بوتولینوم اثر خود را به وسیله مهار ترشح استیل کولین از پایانه‌های عصبی اعمال می‌کنند. بنابراین باعث ایجاد فلج شل و در نهایت مرگ در انسان و حیوانات می‌شوند. انسان در اثر مصرف آب و مواد غذایی آلوده به سم، به بیماری بوتولیسم مبتلا می‌شود. این بیماری به‌طور طبیعی به شکل‌های مسمومیت غذایی، بوتولیسم زخم و بوتولیسم روده‌ای در شیرخواران و بالغین ظاهر می‌کند [4]. سموم عصبی بوتولینوم

نخست در سیتوزول باکتری به صورت یک پلی‌پپتید تک‌زنجیره و غیرفعال با وزنی حدود 150 کیلو دالتون (طول 1200 تا 1300 اسید آمینه) تولید می‌شوند. سپس پروتئازهایی که در سیتوزول باکتری وجود دارند، پلی‌پپتید را شکسته و به صورت دوزنجیره‌ای و فعال درمی‌آورند که به وسیله یک پیوند دی‌سولفیدی به هم متصل شده‌اند. بنابراین، سم مذکور دو زنجیره سبک (L) و زنجیره سنگین (H) دارد که وزن مولکولی آنان به ترتیب 50 و 100 کیلو دالتون است. زنجیره سنگین از دو ناحیه³ تشکیل شده است: ناحیه اتصال‌دهنده⁴ در C ترمینال (Hc) که موجب اتصال سم به گیرنده سلولی و ناحیه انتقال‌دهنده⁵ در N ترمینال (HN) که باعث فرار اندوزومی و انتقال زنجیره سبک (بخش کاتالیتیک سم) به درون سیتوزول سلول هدف می‌شود. زنجیره سبک BoNT، یک اندوپپتیداز⁶ است و به پروتئین‌های خاصی در سلول‌های هدف حمله می‌کند و با شکستن آنها باعث مهار ترشح استیل کولین در سلول‌های هدف می‌شود و بدین صورت خاصیت سمی خود را اعمال می‌کند [5]. باکتری‌های مولد این سموم بی‌هوازی هستند و اسپور تولید می‌کنند.

³. domain

⁴. Binding domain

⁵. Translocation domain

⁶. Endopeptidase

¹. *Clostridium botulinum*

². botulism

یک روش تشخیصی سریع بر اساس تکنیک ساندویچ الایزا جهت شناسایی توکسوئید بوتولینوم تیپ B بود.

مواد و روش ها

میکرو پلیت الایزا (NUNC)، آنتی بادی ضد IgG موش کانژوگه به آنزیم پراکسیداز (Dako)، آنتی بادی ضد IgG خرگوش کانژوگه به آنزیم پراکسیداز (sigma) برای تخلیص پروتئین نوترکیب از ستون Ni-NTA agarose resin استفاده شد که از شرکت شاین ژن (چین) خریداری شد. موش های آزمایشگاهی BALB/c از مؤسسه واکسن و سرم سازی رازی ایران تهیه شدند و از اجوانت کامل و ناقص فروند مؤسسه انستیتو پاستور استفاده شد. OPD (O-Phenylenediamine)، رزین پروتئین G (Shine Gene: G00209)، اسیدسیتریک، سدیم هیدروژن فسفات و سدیم کلرید که تمامی موارد از شرکت های معتبر داخلی خریداری شد.

بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب BoNT/B

جهت تولید آنتی بادی پلی کلونال از آنتی ژن نوترکیب BoNT/B-HcC در بردارنده 370 اسید آمینه انتهایی کربوکسیل از بخش اتصال دهنده سم بوتولینوم تیپ B با وزن مولکولی معادل 45 کیلو دالتون استفاده شد. بیان آنتی ژن نوترکیب در میزبان *E. coli* BL21(DE3) در دمای 37 درجه سانتی گراد و غلظت نهایی 1 میلی مولار از IPTG به مدت 4 ساعت القا شد. در ادامه پروتئین نوترکیب، با استفاده از رزین Ni-NTA خالص گردید.

تهیه سرم و تخلیص آنتی بادی های موشی و خرگوشی

ضد آنتی ژن BoNT/B-HcC

به منظور بررسی تولید آنتی بادی پلی کلونال علیه پروتئین نوترکیب BoNT/B از 20 عدد موش BALB/c به عنوان تست و 5 عدد به عنوان نمونه کنترل

باکتری های کلستریدیوم به طور گسترده در خاک، گردوغبار، آب، لوله گوارش، فراورده های کنسرو شده و به مقدار ناچیز در مجرای تناسلی حیوانات پراکنده اند [6].

به علت توان بالای کشندگی این سم عصبی (LD_{50} آن در انسان بین 0/1 تا 1 نانوگرم در هر کیلوگرم است)، نرخ بالای موارد منجر به مرگ نسبت به موارد ابتلا و در نهایت تهیه به نسبت راحت آن را به عنوان سلاح زیستی مطرح ساخته است [7؛ 8]. بر این اساس دستیابی و بهینه سازی روش های تشخیص سم بوتولینوم حایز اهمیت است.

در حال حاضر روش استاندارد برای تشخیص BoNT در نمونه های غذایی، سنجش زیستی نمونه روی موش آزمایشگاهی است که یک روش بسیار حساس با محدوده تشخیص 7 تا 20 پیکوگرم بر میلی لیتر می باشد [9]. با این حال، سنجش زیستی موش زمان بر بوده (تقریباً 4 روز) و نیازمند استفاده از تعداد زیادی حیوان آزمایشگاهی است که اغلب منجر به مرگ حیوانات تحت سنجش می شود. علاوه بر این برای تعیین تیپ سم نیاز به سنجش خنثی سازی سم با آنتی بادی اختصاصی است. با توجه به موارد بالا و ملاحظه های اخلاقی استفاده از حیوانات آزمایشگاهی طراحی روشی جایگزین به منظور رفع مشکلات ارائه شده ضروری به نظر می رسد. تاکنون، روش های مختلفی براساس سنجش سرولوژیکی ارائه شده است؛ در این بین روش الایزا بیشترین کاربرد را برای آنالیز سمیت مواد غذایی دارد. برای بهبود حساسیت سنجش، روش های تغییر یافته الایزا مطرح شده است که پیشرفته ترین آنها روش ساندویچ الایزا است. این روش سریع، بسیار اختصاصی و حساسیتی معادل آزمایش روی موش آزمایشگاهی دارد. در ضمن امکان کمی سازی روش ساندویچ الایزا برای تعیین غلظت سم در نمونه های مختلف از جمله نمونه های زیستی نیز فراهم است.

با توجه به اهمیت شناسایی سریع و دقیق سم بوتولینوم هدف از پژوهش حاضر، طراحی و بهینه سازی

غربالگری آنتی‌بادی‌ها با الایزای غیرمستقیم

برای تأیید آنتی‌بادی‌های خالص‌شده علیه آنتی‌ژن BoNT/B-HcC از آزمون الایزای غیرمستقیم استفاده شد. برای این منظور، چاهک‌های میکرو پلایت الایزا به مدت 18 ساعت در دمای 4 درجه سانتی‌گراد با $\mu\text{g.ml}^{-1}$ 5 آنتی‌ژن در بافر پوششی (0/2 مولار Na_2CO_3 و 0/2 مولار NaHCO_3 - pH 9.6) پوشانده شدند. مکان‌های غیراختصاصی به مدت یک ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد با 150 میکرولیتر به ازای هر چاهک شیر بدون چربی 5 درصد در بافر PBST (8 گرم NaCl ، 2/9 گرم Na_2HPO_4 ، 0/2 گرم KCl ، 0/2 گرم KH_2PO_4 ، 500 میکرولیتر Tween20 و تا حجم یک لیتر آب مقطر) مسدود شد. سپس صفحه‌ها با 100 میکرولیتر به ازای هر چاهک از سریال رقت‌های آنتی‌بادی در بافر PBST به مدت 1 ساعت در 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در ادامه رقت 1 در 10000 از آنتی‌بادی بزی کانژوگه به HRP ضد IgG موشی یا خرگوشی با بافر PBST مخلوط و 100 میکرولیتر به هر چاهک اضافه شد. درنهایت پس از انکوباسیون یک ساعت در 37 درجه سانتی‌گراد محلول سوپسترا (6 میلی‌گرم OPD در 10 میلی‌لیتر بافر سیترات فسفات 0/1 مولار حل و 10 میکرولیتر آب‌اکسیژنه) اضافه شد و پس از گذشت زمان و توقف رنگ‌دهی میزان جذب نوری واکنش الایزا در 495 نانومتر خوانده شد.

شناسایی آنتی‌ژن BoNT/B-HcC به روش ساندویچ

الایزا

روش ساندویچ ELISA با استفاده از دو آنتی‌بادی پلی‌کلونال موشی و خرگوشی علیه آنتی‌ژن نوترکیب BoNT/B-HcC یکی به‌عنوان آنتی‌بادی شناسایی‌کننده و دیگری به‌عنوان آنتی‌بادی گیرنده طراحی شد.

استفاده شد. به هر موش مقدار 20 میکروگرم از پروتئین نوترکیب تخلیص‌شده با حجم یکسان از ادجوانت کامل فروند در تزریق اول و ادجوانت ناقص فروند برای تزریق‌های بعدی در چهار نوبت به‌صورت زیرجلدی تزریق شد. برای بررسی و تأیید نتایج حاصل و همچنین جلوگیری از پاسخ مثبت کاذب، به یک گروه پنج‌تایی به‌عنوان شاهد فقط بافر PBS (8 گرم NaCl ، 2/9 گرم Na_2HPO_4 ، 0/2 گرم KCl ، 0/2 گرم KH_2PO_4 ، در یک لیتر آب مقطر) استریل همراه با ادجوانت تزریق شد. به‌منظور خون‌گیری از پیپت‌های پاستور استریل استفاده شد و به‌وسیله آن‌ها از گوشه چشم هر موش خون‌گیری به عمل آمد. قطره‌های خون به داخل میکروتیوپ استریل منتقل و میکروتیوپ‌ها برچسب زده شد. سپس به مدت یک ساعت درون گرم‌خانه با دمای 37 درجه سانتی‌گراد و یک شب نیز در دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از آن، نمونه‌ها در دمای 4 درجه سانتی‌گراد با سرعت 1000 دور در دقیقه به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ شده و مایع شفاف زردرنگ به‌دست‌آمده (سرم) جداسازی شد. پس از ساخت ستون پروتئین G برای متعادل‌سازی رزین از 5 میلی‌لیتر بافر اتصال (20 میلی‌مولار Na_2HPO_4 و 0/15 مولار NaCl با pH=7) استفاده شد. در ادامه سرم رقیق‌شده با نسبت برابر بافر اتصال به ستون اضافه شد. برای شستشوی ستون و حذف پروتئین‌های سرم، 15 میلی‌لیتر بافر اتصال از ستون عبور داده شد. درنهایت برای جداسازی آنتی‌بادی‌ها از محلول سیتریک اسید 0/1 مولار با pH برابر 3 استفاده شد. به سرعت خنثی‌سازی pH محلول اسید سیتریک با اضافه‌کردن بافر Tris با pH برابر 10 انجام شد. خلوص آنتی‌بادی و تعیین غلظت آنتی‌بادی به‌ترتیب با الکتروفورز ژل SDS- پلی‌آکریل آمید براساس روش Laemmli [10] و بردفورد انجام شد [11؛ 12].

چاهک‌های الایزا با 500 نانوگرم بر میلی لیتر از آنتی بادی گیرنده موشی در بافر پوششی به مدت 18 ساعت در 4 درجه سانتی گراد پوشانده شدند. پس از مسدود سازی چاهک‌ها با شیر بدون چربی 5 درصد در بافر PBST و سه بار شستشو در PBST، محلولی با غلظت 10 میکروگرم بر میلی لیتر از آنتی ژن نو ترکیب در بافر PBST تهیه شد و از این محلول 14 رقت سریالی دوبرابری تا غلظت 90 پیکوگرم بر میلی لیتر تهیه و به چاهک‌ها اضافه و پلیت الایزا به مدت دو ساعت در دمای 37 درجه سانتی گراد انکوبه شد. پس از شستشو 500 نانوگرم بر میلی لیتر آنتی بادی شناسایی کننده (خرگوشی) به هر چاهک اضافه شد و ادامه مراحل همانند الایزای غیر مستقیم نیز انجام شد.

تمام آزمون‌ها با سه بار تکرار انجام شده و میانگین جذب نوری به دست آمده گزارش شد. چاهک‌های انکوبه شده با IgG غیر ایمن به عنوان کنترل منفی ارائه شدند و تمامی داده‌های بیشتر از دو برابر کنترل منفی به عنوان مثبت در شناسایی آنتی ژن نو ترکیب BoNT/B-HcC در نظر گرفته شد.

میزان حساسیت و اختصاصیت روش ساندویچ الایزا در

شناسایی توکسوئید BoNT/B

در این مرحله برای تعیین حساسیت آنالیتیکی روش الایزای تنظیم شده، به تعیین حد شاهد (LOB) و حد تشخیص (LOD) در آن پرداخته شد. برای انجام این کار میکروپلیت الایزا با 100 میکرولیتر آنتی بادی IgG موشی ضد-BoNT/B-HcC با غلظت 1 میکروگرم بر میلی لیتر پوشش دهی و مسدود شد. در مرحله بعد با استفاده از سم BoNT/B محلولی با غلظت 500 نانوگرم بر میلی لیتر تهیه شد و از این محلول شش رقت سریالی دوبرابری تا غلظت 160 پیکوگرم بر میلی لیتر تهیه شد. سپس 100 میکرولیتر از رقت‌های سم تهیه شده به صورت دوتایی به چاهک‌ها اضافه شد و میکروپلیت به مدت

یک ساعت در انکوباتور 37 درجه سانتی گراد انکوبه شد. پس از چهار مرتبه شستشو مقدار 500 نانوگرم از آنتی بادی IgG خرگوشی ضد BoNT/B-HcC به چاهک‌ها اضافه شد و پس از انکوباسیون در 37 درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت مقدار 100 میکرولیتر آنتی بادی بزی ضد IgG خرگوشی کانژوگه با آنزیم HRP با رقت یک به 5000 به چاهک‌ها اضافه شد. تعداد 20 چاهک از پلیت نیز به عنوان شاهد در نظر گرفته شد و در آنها تنها بافر رقیق کننده نمونه (PBST) اضافه شد. پلیت‌ها دوباره به مدت یک ساعت در انکوباتور 37 درجه سانتی گراد قرار داده شدند و پس از چهار مرتبه شستشو، میزان 100 میکرولیتر از محلول OPD داخل هر چاهک ریخته شد. پس از 5 دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق و تاریکی، واکنش با اضافه کردن 100 میکرولیتر از محلول متوقف کننده (H_2SO_4) به هر چاهک متوقف شد. جذب نوری هر چاهک در طول موج 450 نانومتر خوانده شد. میانگین و انحراف معیار جذب نوری 20 چاهک مربوط به شاهد تعیین و مقادیر LOB و جذب نوری LOD با استفاده از معادلات زیر محاسبه شد [13؛ 14]:

$$LOB = \text{Mean}_{\text{Blank}} + 1.645(\text{SD}_{\text{Blank}})$$

$$Ab_{\text{LOD}} = \text{Mean}_{\text{Blank}} + 3(\text{SD}_{\text{Blank}})$$

در مرحله بعد با استفاده از داده‌های حاصل از رقت سریالی آنتی ژن، منحنی و معادله خط مربوط به آن رسم و میزان LOD برای روش طراحی شده تعیین شد.

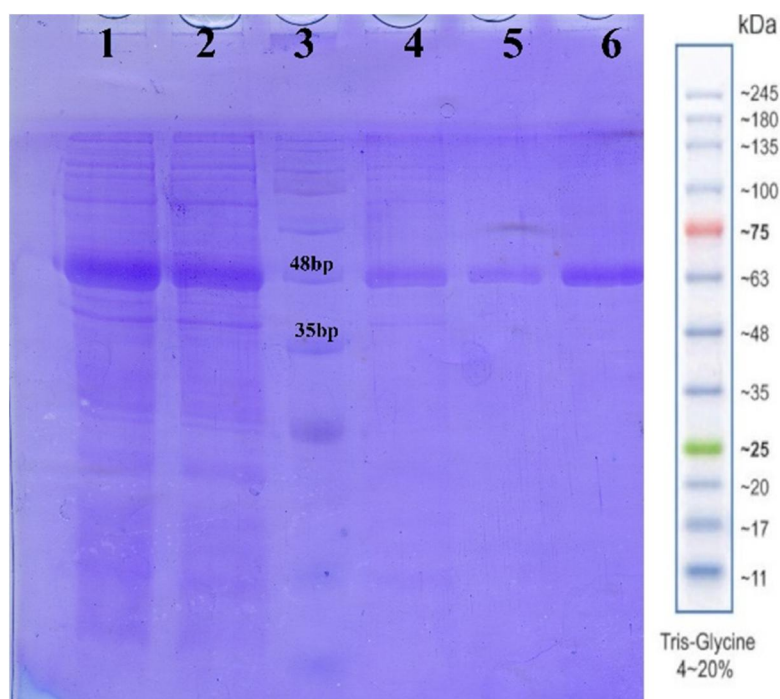
برای بررسی میزان اختصاصی بودن روش ساندویچ الایزای تنظیم شده در شناسایی سم BoNT/B مقدار 5 میکروگرم بر میلی لیتر از آنتی بادی گیرنده (IgG موشی) کف چاهک‌ها پوشیده شد و در مرحله بعد سه غلظت 5، 2.5 و 1.25 میکروگرم بر میلی لیتر از سمهای BoNT/B، StxB و CtxB و پروتئین BSA به چاهک‌ها اضافه شده و مراحل ساندویچ الایزا تا انتها انجام شد. در نهایت با خواندن جذب نوری در 450 نانومتر و تکرار آزمایش به مدت سه مرتبه در دو روز پیاپی، میانگین نتایج گزارش شد.

نتایج

بیان و تخلیص آنتی ژن نوترکیب BoNT/B-HcC

نتایج حاصل از تخلیص آنتی ژن نوترکیب نشان داد که آنتی ژن نوترکیب در مرحله چهارم از شستشوی ستون با

بافر اوره 8 مولار و pH برابر 5 تخلیص شد و خلوص 90 درصدی و غلظت 600 میکروگرم بر میلی لیتر داشته است (شکل 1).

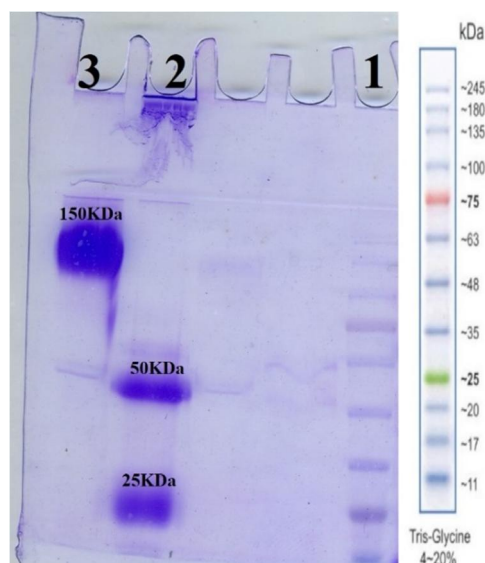


شکل 1 نتیجه تخلیص پروتئین نوترکیب با رزین کروماتوگرافی تمایلی Ni-NTA، ستون 1 نمونه سوپ حاوی پروتئین نوترکیب قبل از انتقال به ستون، ستون 2 نمونه عبوری پس از ستون، ستون 3 نمونه شستشوی ستون با بافر اوره 8 مولار pH برابر 7/2، ستون 4 مارکر پروتئینی سیناکلون (Cat. No.PR901641)، ستون 5 نمونه شستشوی ستون با بافر اوره 8 مولار pH برابر 6/4، ستون 6 نمونه شستشوی ستون با بافر اوره 8 مولار pH برابر 5

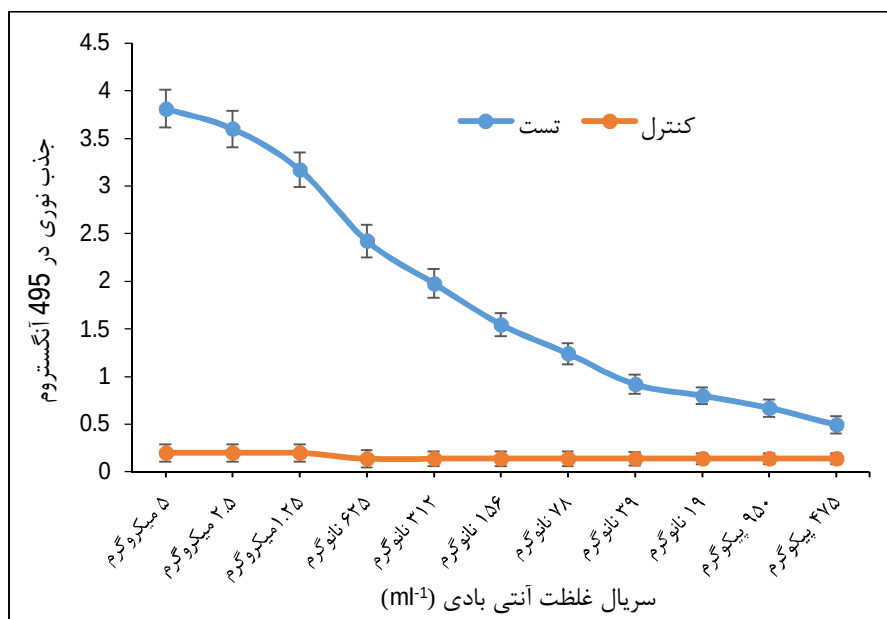
تخلیص آنتی بادی پلی کلونال

پس از تخلیص آنتی بادی جهت تأیید حضور آنتی بادی IgG الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید همراه با SDS در شرایط احیا و غیراحیا انجام شد. نتایج نشان داد که در شرایط احیا با توجه به جدایی پیوندهای دی سولفیدی با استفاده از مرکاپتواتانول دو زیر واحد سبک و سنگین آنتی بادی از همدیگر جدا شده و باندهای 50 و 25 کیلو دالتونی تأیید شد. همچنین در شرایط غیراحیا و عدم جدایی زیر واحدهای آنتی بادی باند 150 کیلو دالتونی

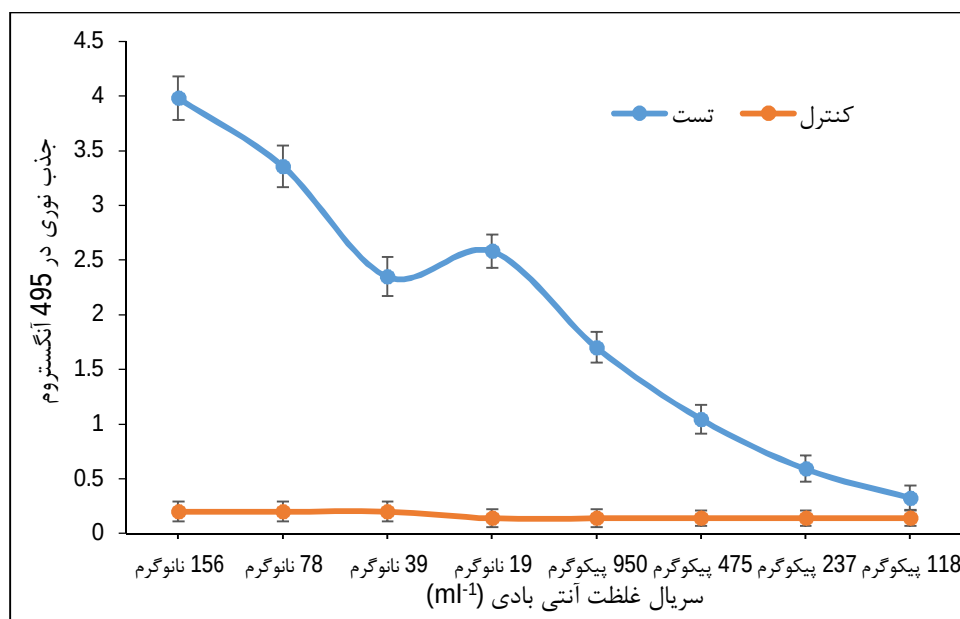
مشاهده شد (شکل 2). در ادامه برای تأیید حضور آنتی بادی علیه آنتی ژن BoNT/B-HcC آزمون الایزا غیرمستقیم آنتی ژن نوترکیب با آنتی بادی تخلیص شده انجام شد. نتایج الایزا در مقایسه با کنترل نشان داد که آنتی بادی تخلیص شده علیه آنتی ژن نوترکیب BoNT/B-HcC است و توانایی شناسایی حداقل غلظت های 475 و 118 پیکوگرم از آنتی ژن به ترتیب به وسیله آنتی بادی های موشی و خرگوشی را دارد (نمودارهای 1 و 2).



شکل 2 نتیجه الکتروفورز آنتی بادی تخلیص شده با رزین پروتئین G، ستون شماره 1 مارکر پروتئینی سیناکلون (Cat. No.PR901641)؛ ستون شماره 2 نمونه آنتی بادی تخلیص شده در شرایط احیا؛ ستون شماره 3 نمونه آنتی بادی تخلیص شده در شرایط غیر احیا



نمودار 1 نمودار الایزا غیرمستقیم آنتی بادی موشی با آنتی ژن نو ترکیب BoNT/B-HcC، نمونه کنترل شامل آنتی ژن BoNT/A و نمونه آزمون شامل آنتی ژن BoNT/B، نتایج نشان داد که آنتی بادی موشی تا غلظت 475 پیکوگرم از آنتی ژن BoNT/B را در مقایسه با کنترل شناسایی کند.



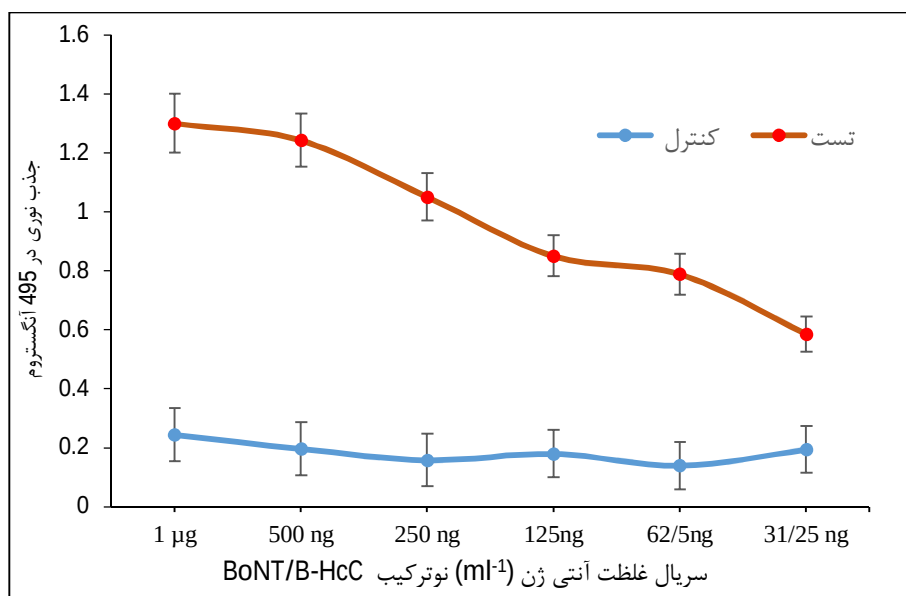
نمودار 2 نمودار الایزا غیرمستقیم آنتی بادی خرگوشی با آنتی ژن BoNT/B، نمونه کنترل شامل آنتی ژن BoNT/A و نمونه آزمون شامل آنتی ژن BoNT/B، نتایج نشان داد که آنتی بادی خرگوشی تا غلظت 475 پیکوگرم از آنتی ژن BoNT/B را در مقایسه با کنترل شناسایی کند.

محاسبه میزان حساسیت سازه ساندویچ الایزا در

شناسایی آنتی ژن نو ترکیب BoNT/B-HcC

با توجه به نمودار الایزای غیرمستقیم آنتی ژن نو ترکیب با آنتی بادی های موشی و خرگوشی، مقدار 1 میکروگرم و 500 نانوگرم از آنتی بادی موشی و خرگوشی برای سازه ساندویچ الایزا بهینه می باشد. پس از آزمایش حالت های مختلف سازه ساندویچ الایزا برای شناسایی آنتی ژن مشخص شد که استفاده از آنتی بادی خرگوشی به عنوان آنتی بادی گیرنده و آنتی بادی موشی به عنوان آنتی بادی

شناسایی کننده، نتایج بهتری مشاهده می شود (نتایج نشان داده نشده). با توجه به همین دلیل برای تعیین حساس سازه ساندویچ الایزا میزان 500 نانوگرم از آنتی بادی موشی کف چاهک ها پوشیده شد و در ادامه سریال غلظت از 1 میکروگرم از آنتی ژن درون چاهک ها اضافه و سپس 500 نانوگرم از آنتی بادی خرگوشی به چاهک ها اضافه شد. نتایج نشان داد که روش ساندویچ الایزای طراحی شده تا غلظت 31 نانوگرم از آنتی ژن را می تواند شناسایی کند (نمودار 3).



نمودار 3 بررسی میزان حساسیت روش ساندویچ الایزای طراحی شده در شناسایی آنتی ژن نو ترکیب BoNT/B-HcC. کف هر چاهک با مقدار 500 نانوگرم آنتی بادی موشی پوشانده و روی آن مقدار 1 میکروگرم آنتی ژن از چاهک اول تیترا شد. سپس در هر چاهک مقدار 500 نانوگرم آنتی بادی خرگوشی ریخته شد. در نمونه کنترل از پروتئین BSA به عنوان کنترل استفاده شده است.

محدوده تشخیصی، میانگین سیگنال چاهک های شاهد و میزان انحراف معیار مربوطه نیز محاسبه شد. یافته های به دست آمده از این آزمایش در جدول 1 و نمودار 4 قابل مشاهده است. همچنین نتایج بررسی واکنش متقاطع ساندویچ الایزا نشان داد که روش تنظیم شده، اختصاصیت بالایی در شناسایی BoNT/B دارد (نمودار 5).

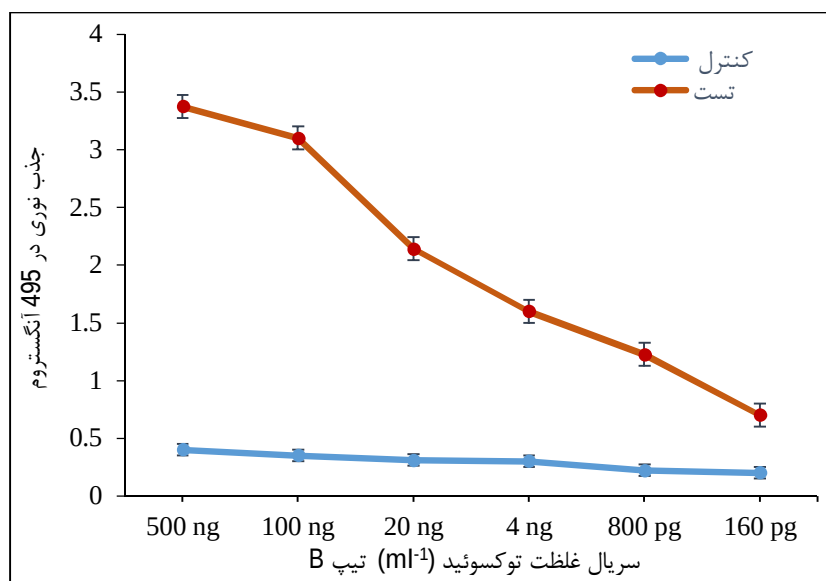
میزان حساسیت و اختصاصیت سازه ساندویچ الایزا در

شناسایی BoNT/B

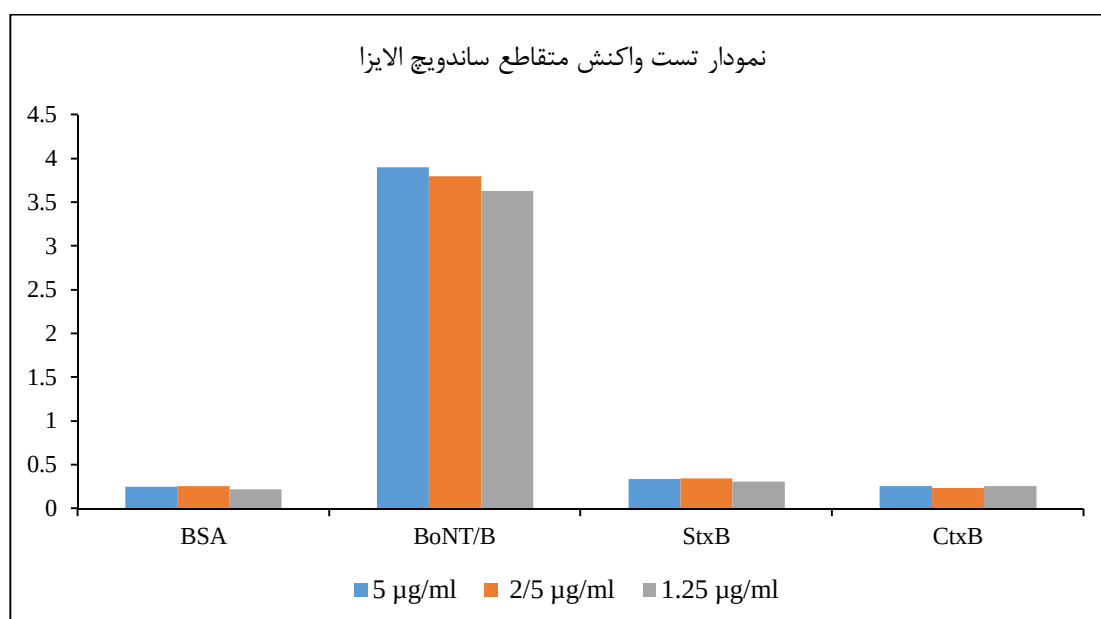
آزمایش تعیین حساسیت آنالیتیک روش الایزای تنظیم شده با استفاده از رقت های سریالی سم BoNT/B انجام شد. نمودار و فرمول خط حاصل شده برای محاسبه حد تشخیصی روش، استفاده شدند. علاوه بر این برای تعیین

جدول 1 نتایج مربوط به محاسبه حساسیت آنالیتیکی روش ساندویچ الایزای تنظیم شده در شناسایی سم BoNT/B

حد تشخیص	معادله خط	میزان جذب حد تشخیص	حد شاهد	انحراف معیار شاهد ها	میانگین جذب شاهد ها	ساندویچ الایزا
146/1	$y=0/0041x + 0/0908$	0/69	0/57	0/09	0/42	سم BoNT/B



نمودار 4 بررسی میزان حساسیت روش ساندویچ الایزا طراحی شده در شناسایی سم بوتولینوم تیپ B، کف هر چاهک با مقدار 1 میکروگرم آنتی‌بادی موشی پوشانده و روی آن مقدار 500 نانوگرم سم از چاهک اول تیترا شد. سپس در هر چاهک مقدار 1 میکروگرم آنتی‌بادی خرگوشی ریخته شد، سم در حد 1 نانوگرم قابل شناسایی است.



نمودار 5 بررسی میزان اختصاصیت سازه ساندویچ الایزا در شناسایی BoNT/B، نتایج مقایسه آماری واکنش متقاطع ساندویچ الایزا در شناسایی سم BoNT/B در مقایسه با دیگر سموم نشان داد که نتایج OD در سموم متفرقه با نمونه‌های شاهد نزدیک بوده است و با سم BoNT/B از لحاظ آماری تفاوت معناداری دارند.

شناسایی و تشخیص این سم در نمونه‌های آلوده کمتر بوده است. از جمله علت‌های این موضوع می‌توان به نادر بودن این بیماری و همچنین تنوع سموم عصبی بوتولینوم

بحث

با اینکه مطالعه‌های بسیاری در حوزه بیماری حاصل از سم بوتولینوم وجود دارد، اما تعداد مطالعه‌ها در حوزه

اشاره کرد. باتوجه به این که دز کشندگی سم پایین بوده [13]، قابلیت استفاده در حوزه بیوتورورسم را دارا بوده و از طرفی روش درمانی غیر از استفاده از آنتی سرم برای آن وجود ندارد [14]، طراحی و بهینه سازی یک روش تشخیصی دقیق با حساسیت و اختصاصیت بالا برای سم حائز اهمیت می باشد.

برای تشخیص باکتری کلستری دیوم بوتولینوم از آزمون های حساسی نظیر PCR و DNA-probe می توان استفاده کرد [9]. این روش ها حساسیت بسیار زیادی دارند، اما با وجود اینکه که نیاز به تجهیزات گران قیمت دارند، برای تشخیص سم باکتری کارایی ندارند. از دیگر روش های تشخیص سم بوتولینوم آزمایش روی موش آزمایشگاهی در شرایط درون تن برای شناسایی سموم بوتولینوم است که حساس ترین و بهترین روش است، اما این روش محدودیت هایی از جمله زمان بر بودن و نیاز به تعداد زیادی حیوان آزمایشگاهی دارد. با توجه به این دلایل، سازمان های بهداشتی از سازمان غذا و دارو و مرکز کنترل و پیشگیری بیماری ها بر استفاده از روش جایگزین برای شناسایی باکتری و سم بوتولینوم توجه دارند.

روش های سرو لوژیکی برای تشخیص میزان آلودگی کارآمدی بالایی دارند، از جمله مهم ترین این روش ها الایزا است که کاربرد زیادی در شناسایی عوامل بیماری زا در آب و غذا دارد [15]. همچنین برای بهبود روش الایزا افزایش حساسیت آن از روش تغییر یافته ساندویچ الایزا برای شناسایی سم با استفاده از دو آنتی بادی از دو گونه مختلف استفاده شده است. این روش حساسیت، اختصاصیت مطلوب و همچنین هزینه پایین دارد.

این پژوهش به دنبال یک روش سریع و با اختصاصیت بالا برای شناسایی آنتی ژن نو ترکیب BoNT/B-HcC بوده است. در آغاز برای بیان آنتی ژن نو ترکیب از سیستم وکتوری pET که پروموتور T7 lac

دارد و یک پروموتور قوی محسوب می شود، استفاده شده است. از جمله ویژگی دیگر این سیستم، وجود نشانگر 6xHis Tag در دو طرف MCS است که تخلیص پروتئین نو ترکیب بیان شده را آسان می کند. برای نشان دادن قابلیت ایمنی زایی پروتئین در طول ایمنی زایی از روش الایزا بهره گیری شده است که تیتراژ آنتی بادی خنثی کننده پس از تزریق چهارم به روش الایزا بیانگر پاسخ تام بدن نسبت به آنتی ژن تجویز شده است که آنالیزهای آماری نمونه تست و شاهد با آزمون t نشان دهنده این فرضیه بود. در ادامه با استفاده از آزمایش ساندویچ الایزا توانستیم مقدار 146 پیکوگرم از توکسوئید بوتولینوم تیپ B شناسایی شد. این در حالی است که پژوهش های دیگر انجام شده در شناسایی تیپ های مختلف، میزان کمتری از آنتی ژن نو ترکیب طراحی شده را گزارش کرده اند، برای مثال در پژوهشی مینایی و همکاران برای شناسایی سم کلستری دیوم بوتولینوم تیپ E از روش ساندویچ الایزی استفاده کردند که توانسته 1 نانوگرم از سم را شناسایی کند. این موضوع در حالی است که میزان آنتی ژن شناسایی شده به وسیله ساندویچ الایزا کمتر از نتایج پژوهش حاضر بوده است [16]. در مثالی دیگر استانکر و همکاران از یک آنتی بادی مونوکلونال به عنوان آنتی بادی گیرنده در سازه ساندویچ الایزا استفاده کردند که همین موضوع باعث افزایش میزان حساسیت روش ساندویچ الایزا شده بود و توانسته بود تا غلظت 20 پیکوگرم از سم کلستری دیوم بوتولینوم تیپ B را شناسایی کند [17].

روش ساندویچ الایزی طراحی شده می تواند برای شناسایی دقیق و حساس سم کلستری دیوم بوتولینوم تیپ B استفاده شود. لازم است در آینده کارایی این روش برای تشخیص سم بوتولینوم در نمونه های محیطی و غذایی ارزیابی شود این روش می تواند برای شناسایی آنتی ژن خاص در نمونه مجهول کاربرد بالایی داشته باشد.

- [9] Grenda, T., E. Kukier, and K. Kwiatek, *Methods and difficulties in detection of Clostridium botulinum and its toxins*. Polish journal of veterinary sciences, 2014. 17(1).
- [10] He, F., *Laemmli-sds-page*. Bio-protocol, 2011: p. e80-e80.
- [11] Kielkopf, C. L., Bauer, W., & Urbatsch, I. L. Bradford assay for determining protein concentration. Cold Spring Harbor Protocols, 2020(4), pdb-prot102269.
- [12] He, F., *Bradford protein assay*. Bio-protocol, 2011: p. e45-e45.
- [13] Dolman, C. and L. Murakami, *Clostridium botulinum type F with recent observations on other types*. The Journal of Infectious Diseases, 1961: p. 107-128.
- [14] Janik, E., et al., *Biological toxins as the potential tools for bioterrorism*. International journal of molecular sciences, 2019. 20(5): p. 1181.
- [15] Singh, A., et al., *Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit for the detection of botulinum neurotoxins A, B, E, and F in selected food matrices*. Health security, 2015. 13(1): p. 37-44.
- [16] Saadati, M., *Double Sandwich ELISA Modified Method for the Detection of Clostridium Botulinum Type E*. Journal of Fasa University of Medical Sciences, 2013. 3(2): p. 136-142.
- [17] Stanker, L.H., et al., *A monoclonal antibody based capture ELISA for botulinum neurotoxin serotype B: toxin detection in food*. Toxins, 2013. 5(11): p. 2212-2226.
- [1] Simpson, L., *Botulinum neurotoxin and tetanus toxin*. 2012: Elsevier.
- [2] Smits, W.K., et al., *Clostridium difficile infection*. Nature reviews Disease primers, 2016. 2(1): p. 1-20.
- [3] Smith, T.J., K.K. Hill, and B.H. Raphael, *Historical and current perspectives on Clostridium botulinum diversity*. Research in Microbiology, 2015. 166(4): p. 290-302.
- [4] Eklund, M., et al., *Bacteriophage and the toxigenicity of Clostridium botulinum type C*. Science, 1971. 172(3982): p. 480-482.
- [5] Rossetto, O., Pirazzini, M., Lista, F., & Montecucco, C.. The role of the single interchains disulfide bond in tetanus and botulinum neurotoxins and the development of antitetanus and antibotulism drugs. Cellular Microbiology. 2019, 21(11), e13037.
- [6] Lindstrom, M. and H. Korkeala, *Laboratory diagnostics of botulism*. Clinical microbiology reviews, 2006. 19(2): p. 298-314.
- [7] Shi, D. Y., Chen, B. Y., Mao, Y. Y., Zhou, G., Lu, J. S., Yu, Y. Z., ... & Sun, Z. W. Development and evaluation of candidate subunit vaccine against botulinum neurotoxin serotype B. Human Vaccines & Immunotherapeutics. 2019, 15(3), 755-760.
- [8] Moreira Jr, C., et al., *Protective efficacy of recombinant bacterin vaccine against botulism in cattle*. Vaccine, 2020. 38(11): p. 2519-2526.

Detection of *Clostridium botulinum* type B neurotoxin by Sandwich ELISA method

Hossein Samiei Abianeh^{1,2}, Shahram Nazarizn^{3*}, Jafar Amani⁴, Amir Sajjad Hojjati razgi⁵, Mohammad Reza Ramezani⁶, Mohammad Reza Rahmani⁷

1- Master of Science, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran

2- Department of Medical Biotechnology and Nanotechnology, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

3- Associate professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran

4- Professor, Applied Microbiology Research Center, Systems Biology and Poisonings Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

5- Master of Science, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran

6- Assistant professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran

7- Master of Science, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran

*Corresponding Author: nazarian@ihu.ac.ir

Received: 2022/4/9

Accepted: 2022/8/24

Abstract

Background and Aim: botulinum neurotoxins (BoNTs) are among the deadliest compounds known to cause botulism. Currently, the detection of BoNTs in food using bioassays on laboratory mice is a very sensitive method with a detection range of 7 to 20 pg.mL⁻¹. However, bioassay for mice is time-consuming. The sandwich ELISA diagnostic method is known for being fast, highly specific, and equally sensitive as bioassays using mice for detecting food toxicity. The aim of this study was to use a modified Sandwich ELISA method to detect BoNT/B toxin.

Materials and Methods: Recombinant protein of 370 amino acid from the carboxyl terminus of the binding domain of BoNT/B toxin with a molecular weight of 45-kDa as antigen was expressed and purified by Ni-NTA affinity chromatography. IgG antibodies were isolated from mouse and rabbit sera by affinity chromatography using protein G. The sensitivity and specificity of the method designed to detect recombinant BoNT/B-HcC antigen and botulinum toxin type B were evaluated.

Results: The purified rat and rabbit antibody concentrations were 3 and 4.5 mg.mL⁻¹ serum, respectively. The minimum concentrations of detectable protein were determined by indirect ELISA with purified mouse and rabbit antibodies at 475 and 118 pg.mL⁻¹. By optimizing the sandwich ELISA

method, we were able to detect at least at least 30 ng.mL⁻¹ of recombinant BoNT/B-HcC antigen and 146 pg.mL⁻¹ of BoNT/B toxoid.

Conclusion: sandwich ELISA method can be used for accurate and sensitive identification of *Clostridium botulinum* toxin type B. Further studies are needed to evaluate the effectiveness of this method in detecting botulinum toxin in environmental and food samples.

Keyword: *Clostridium botulinum*, toxin botulinum type B, Sandwich ELISA, IgG antibody