تشخیص نوروتوکسین *کلستریدیوم بوتولینوم* تیپ B به روش ساندویچ الایزا

حسین سمیعی ابیانه[2,1]، شهرام نظریان[3*]، جعفر امانی[4]، امیر سجاد حجتی رزگی[5]،محمدرضا رمضانی[6]، محمدرضا رحمانی[7]

1- کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، 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 زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین(ع)، تهران، ایران

4-استاد ، مرکز تحقیقات بیولوژی‌مولکولی، پژوهشکده سیستم بیولوژی مسمومیت‌ها، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... (عج) ، تهران، ایران

5- کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین(ع)، تهران، ایران

6- دکتری تخصصی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین(ع)، تهران، ایران

7- کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین(ع)، تهران، ایران

* نویسنده مسئول: nazarian@ihu.ac.ir

دریافت: 1401/1/20 پذیرش: 1401/6/2

چکیده

زمینه و هدف: سموم بوتولینوم (BoNTs) جزء کشنده‌ترین ترکیبات شناخته‌شده و عامل بیماری بوتولیسم می‌باشند. 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 زمان‌بر می‌باشد. روش تشخیصی ساندویچ الایزا، روشی سریع، اختصاصی و می‌تواند 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 روش‌ها: پروتئین نوترکیب 370 اسید آمینه‌ای از انتهای کربوکسیل بخش اتصال‌دهنده سم BoNT/B با وزن مولکولی 45 کیلو دالتون به‌عنوان آنتی‌ژن بیان و با روش کروماتوگرافی تمایلی ستون Ni-NTA تخلیص شد. آنتی‌بادی 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 طراحی‌شده جهت شناسایی آنتی‌ژن نوترکیب BoNT/B-HcC و توکسوئید بوتولینوم تیپ B ارزیابی شد.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-02-11]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.2.9.4]

نتایج: غلظت آنتی‌بادی موشی و خرگوشی تخلیص‌شده به‌ترتیب 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 میلی لیتر تعیین شد. با بهینه‌سازی روش ساندیچ الایزا حداقل 30 نانوگرم بر میلی لیتر از آنتی‌ژن نوترکیب BoNT/B-HcC و 146 پیکوگرم بر میلی لیتر از BoNT/B با اختصاصیت بالا شناسایی شد.

نتیجه‌گیری: روش ساندویچ 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: *کلستردیوم بوتولینوم*، نوروتوکسین بوتولینوم تیپ B، ساندویچ الایزا، آنتی‌بادی IgG.

مقدمه

سموم تولیدشده به‌وسیله باکتری *کلستریدیوم بوتولینوم*[1] جزء کشنده‌ترین ترکیباتی هستند که تاکنون شناخته شده‌اند و عامل بیماری بوتولیسم[2] 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 به‌وسیله مهار ترشح استیل کولین از پایانه‌های عصبی اعمال می‌کنند. بنابراین باعث ایجاد فلج شل و درنهایت 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 تظاهر می‌کند [4]. سموم عصبی بوتولینوم نخست در سیتوزول باکتری به‌صورت یک پلی‌پپتید تک‌زنجیره و غیرفعال با وزنی حدود 150 کیلو دالتون (طول 1200 تا 1300 اسیدآمینه) تولید می‌شوند. سپس پروتئازهایی که در سیتوزول باکتری وجود دارند، پلی‌پپتید را شکسته و به‌صورت دوزنجیره‌ای و فعال درمی‌آورند که به‌وسیله یک پیوند دی‌سولفیدی به هم متصل شده‌اند. بنابراین، سم مذکور دو زنجیره سبک (L) و زنجیره سنگین (H) دارد که وزن مولکولی آنان به‌ترتیب 50 و 100 کیلو دالتون است. زنجیره سنگین از دو ناحیه[3] تشکیل شده است: ناحیه اتصال‌دهنده[4] در C ترمینال (H_C)که موجب اتصال سم به گیرنده سلولی و ناحیه انتقال‌دهنده[5] در N ترمینال (H_N) که باعث فرار اندوزومی و انتقال زنجیره سبک (بخش کاتالیتیک سم) به درون سیتوزول سلول هدف می‌شود. زنجیره سبک BoNT، یک اندوپپتیداز[6] است و به پروتئین‌های خاصی در سلول‌های هدف حمله می‌کند و با شکستن آنها باعث مهار ترشح استیل کولین در سلول‌های هدف می‌شود و بدین‌صورت خاصیت سمی خود را اعمال می‌کند [5]. باکتری‌های مولد این سموم بی‌هوازی هستند و اسپور تولید می‌کنند.

[1]. *Clostridium botulinum*
[2]. botulism
[3]. domain
[4]. Binding domain
[5]. Translocation domain
[6]. Endopeptidase

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-02-11]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.2.9.4]

باکتری‌های *کلستریدیوم* به‌طور گسترده در خاک، گردوغبار، آب، لوله گوارش، فراورده‌های کنسروشده و به مقدار ناچیز در مجرای تناسلی حیوانات پراکنده‌اند [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 درنهایت تهیه به نسبت راحت آن را به‌عنوان سلاح زیستی مطرح ساخته است [7، 8]. بر این اساس دست‌یابی و بهینه‌سازی روش‌های تشخیص سم بوتولینوم حایز اهمیت است.

در حال حاضر روش استاندارد برای تشخیص BoNT در نمونه‌های غذایی، سنجش زیستی نمونه روی موش آزمایشگاهی است که یک روش بسیار حساس با محدوده تشخیص 7 تا 20 پیکوگرم بر میلی لیتر می‌باشد [9]. بااین‌حال، سنجش زیستی موش زمان‌بر بوده (تقریبا 4 روز) و نیازمند استفاده از تعداد زیادی حیوان آزمایشگاهی است که اغلب منجربه مرگ حیوانات تحت سنجش می شود. علاوه بر این برای تعیین تیپ سم نیاز به سنجش خنثی‌سازی سم با آنتی‌بادی اختصاصی است. با توجه به موارد بالا و ملاحظه‌های اخلاقی استفاده از حیوانات آزمایشگاهی طراحی روشی جایگزین به‌منظور رفع مشکلات ارائه‌شده ضروری به نظر می‌رسد. تاکنون، روش‌های 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، روش‌های تغییریافته الایزا مطرح شده است که پیشرفته‌ترین آنها روش ساندویچ الایزا است. این روش سریع، بسیار اختصاصی و حساسیتی معادل آزمایش روی موش آزمایشگاهی دارد. در ضمن امکان کمی‌سازی روش ساندویچ الایزا برای تعیین غلظت سم در نمونه‌های مختلف از جمله نمونه‌های زیستی نیز فراهم است.

با توجه به اهمیت شناسایی سریع و دقیق سم بوتولینوم هدف از پژوهش حاضر، طراحی و بهینه‌سازی یک روش تشخیصی سریع بر اساس تکنیک ساندویچ الایزا جهت شناسایی توکسوئید بوتولینوم تیپ B بود.

مواد و روش‌ها

میکرو پلیت الایزا (NUNC) ،آنتی‌بادی ضد IgG موش کانژوگه به آنزیم پراکسیداز (Dako)، آنتی‌بادی 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. موش‌های آزمایشگاهی BALB/c از مؤسسه واکسن و سرم‌سازی 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 شرکت‌های معتبر داخلی خریداری شد.

بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب BoNT/B

جهت تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال از آنتی‌ژن نوترکیب BoNT/B-HcC در بردارنده 370 اسیدآمینه انتهای کربوکسیل از بخش اتصال‌دهنده سم بوتولینوم تیپ B با وزن مولکولی معادل 45 کیلو دالتون استفاده شد. بیان آنتی‌ژن نوترکیب در میزبان *E. coli* BL21(DE3) در دمای 37 درجه سانتی‌گراد و غلظت نهایی 1 میلی‌مولار از IPTG به مدت 4 ساعت القا شد. در ادامه پروتئین نوترکیب، با استفاده از رزین Ni-NTA خالص گردید.

تهیه سرم و تخلیص آنتی‌بادی‌های موشی و خرگوشی ضد آنتی‌ژن BoNT/B-HcC

به‌منظور بررسی تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال علیه پروتئین نوترکیب BoNT/B از 20 عدد موش BALB/c به‌عنوان تست و 5 عدد به‌عنوان نمونه کنترل

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-02-11]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.2.9.4]

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 میلی مولار 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- پلی آکریل آمید براساس روش Laemmli [10] و بردفورد انجام شد[11؛ 12].

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 پلیت الایزا به مدت 18 ساعت در دمای 4 درجه سانتی‌گراد با $\mu g.ml^{-1}$ 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 بافرPBST (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 سوبسترا (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.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-02-11]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.2.9.4]

چاهک‌های الایزا با 500 نانوگرم بر میلی لیتر از آنتی‌بادی گیرنده موشی در بافر پوششی به مدت 18 ساعت در 4 درجه سانتی‌گراد 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 آنتی‌ژن نوترکیب 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 سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از شستشو 500 نانوگرم بر میلی لیتر آنتی‌بادی شناسایی‌کننده (خرگوشی) به هر چاهک اضافه شد و ادامه مراحل همانند الایزای غیر مستقیم نیز انجام شد.

تمام آزمودن‌ها با سه بار تکرار انجام‌شده و میانگین جذب نوری به‌دست‌آمده گزارش شد. چاهک‌های انکوبه‌شده با IgG غیر ایمن به‌عنوان کنترل منفی ارائه شدند و تمامی داده‌های بیشتر از دو برابر کنترل منفی به‌عنوان مثبت در شناسایی آنتی‌ژن نوترکیب 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 تنظیم‌شده، به تعیین حد شاهد (LOB) و حد تشخیص (LOD) در آن پرداخته شد. برای انجام این کار میکروپلیت الایزا با 100 میکرولیتر آنتی‌بادی IgG موشی ضد BoNT/B-HcC با غلظت 1 میکروگرم بر میلی‌لیتر پوشش‌دهی و مسدود شد. در مرحله بعد با استفاده از سم BoNT/B محلولی با غلظت 500 نانوگرم بر میلی‌لیتر تهیه شد و از این محلول شش رقت سریالی دوبرابری تا غلظت 160 پیکوگرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. سپس 100 میکرولیتر از رقت‌های سم تهیه‌شده به صورت دوتایی به چاهک‌ها اضافه شد و میکروپلیت به مدت یک ساعت در انکوباتور 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از چهار مرتبه شستشو مقدار 500 نانوگرم از آنتی‌بادی IgG خرگوشی ضد BoNT/B-HcC به چاهک‌ها اضافه شد و پس از انکوباسیون در 37 درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت مقدار 100 میکرولیتر آنتی‌بادی بزی ضد IgG خرگوشی کانژوگه با آنزیم HRP با رقت یک به 5000 به چاهک‌ها اضافه شد. تعداد 20 چاهک از پلیت نیز به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد و در آنها تنها بافر رقیق‌کننده نمونه (PBST) اضافه شد. پلیت‌ها دوباره به مدت یک ساعت در انکوباتور 37 درجه سانتی‌گراد 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 اضافه‌کردن 100 میکرولیتر از محلول متوقف‌کننده (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]:

$$LOB=Mean_{Blank}+1.645(SD_{Blank})$$
$$Ab_{LOD}=Mean_{Blank}+3(SD_{Blank})$$

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

برای بررسی میزان اختصاصی‌بودن روش ساندویچ الایزای تنظیم‌شده در شناسایی سم BoNT/B مقدار 5 میکروگرم بر میلی‌لیتر از آنتی‌بادی گیرنده (IgG موشی) کف چاهک‌ها پوشیده شد و در مرحله بعد سه غلظت 5، 2,5 و 1,25 میکروگرم بر میلی‌لیتر از سمهای BoNT/B، StxB و CtxB و پروتئین BSA به چاهک‌ها اضافه شده و مراحل ساندویچ الایزا تا انتها انجام شد. درنهایت با خواندن جذب نوری در 450 نانومتر و تکرار آزمایش به مدت سه مرتبه در دو روز پیاپی، میانگین نتایج گزارش شد.

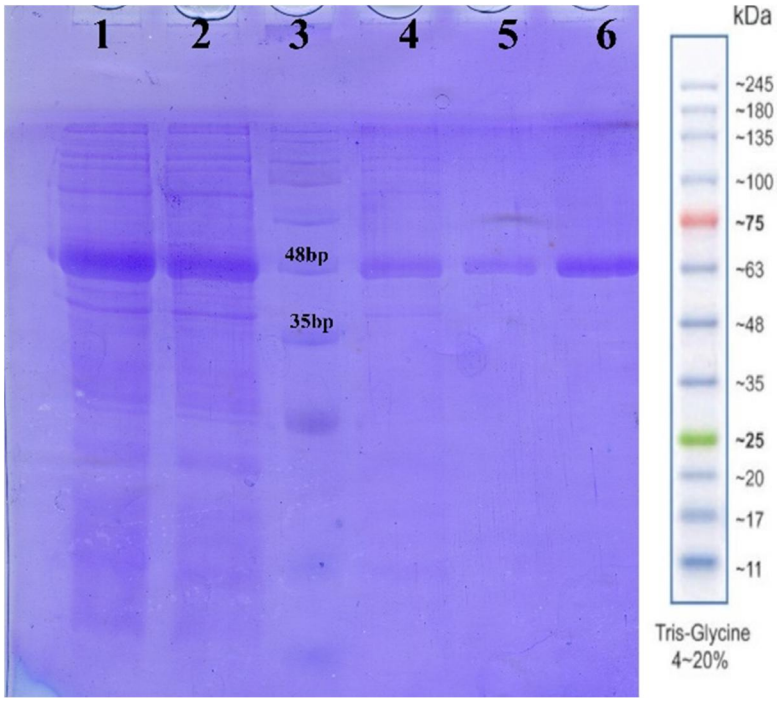
[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-02-11]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.2.9.4]

نتایج

بیان و تخلیص آنتی‌ژن نوترکیب BoNT/B-HcC

نتایج حاصل از تخلیص آنتی‌ژن نوترکیب نشان داد که آنتی‌ژن 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 میلی‌لیتر داشته است (شکل 1).



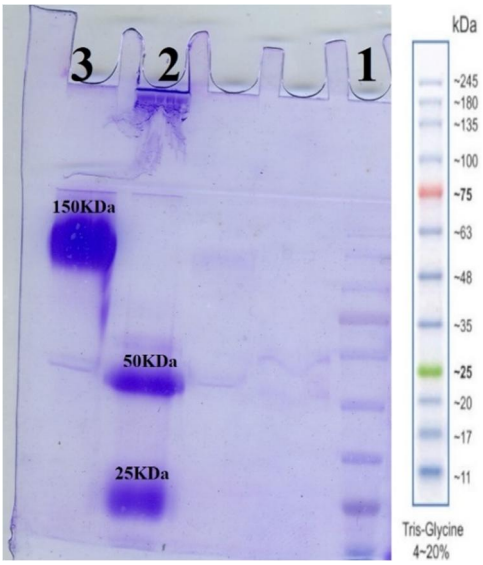
شکل 1 نتیجه تخلیص پروتئین نوترکیب با رزین کروماتوگرافی تمایلی Ni-NTA، ستون 1 نمونه سوپ حاوی پروتئین نوترکیب قبل از انتقال به ستون، ستون 2 نمونه عبوری پس از ستون، ستون 3 نمونه شستشوی ستون با بافر اوره 8 مولار pH برابر 7/2، ستون 4 مارکر پروتئینی سیناکلون(Cat. No.PR901641)، ستون 5 نمونه شستشوی ستون با بافر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

تخلیص آنتی‌بادی پلی کلونال

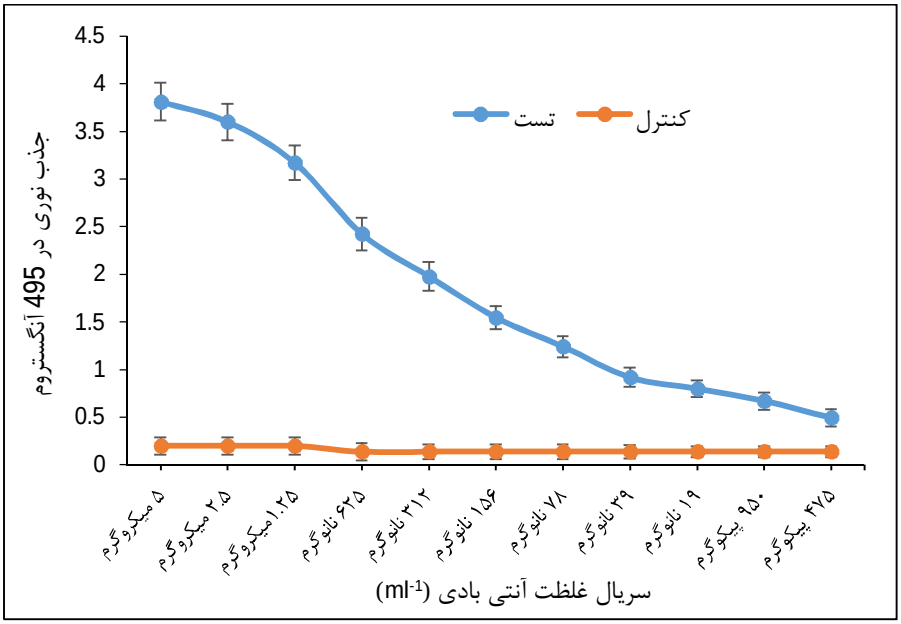
پس از تخلیص آنتی‌بادی جهت تأیید حضور آنتی‌بادی IgG الکتروفورز ژل پلی‌اکریل آمید همراه با SDS در شرایط احیا و غیراحیا انجام شد. نتایج نشان داد که در شرایط احیا با توجه به جدایی پیوندهای دی‌سولفیدی با استفاده از مرکاپتواتانول دو زیرواحد سبک و سنگین آنتی‌بادی از همدیگر جداشده و باندهای 50 و 25 کیلو دالتونی تأیید شد. همچنین در شرایط غیراحیا و عدم جدایی زیر واحدهای آنتی‌بادی باند 150 کیلو دالتونی مشاهده شد (شکل 2). در ادامه برای تأیید حضور آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن BoNT/B-HcC آزمون الایزا غیرمستقیم آنتی‌ژن نوترکیب با آنتی‌بادی تخلیص‌شده انجام شد. نتایج الایزا در مقایسه با کنترل نشان داد که آنتی‌بادی تخلیص‌شده علیه آنتی‌ژن نوترکیب BoNT/B-HcC است و توانایی شناسایی حداقل غلظت‌های 475 و 118 پیکوگرم از آنتی‌ژن به‌ترتیب به‌وسیله آنتی‌بادی‌های موشی و خرگوشی را دارد (نمودارهای 1 و 2).

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-02-11]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.2.9.4]



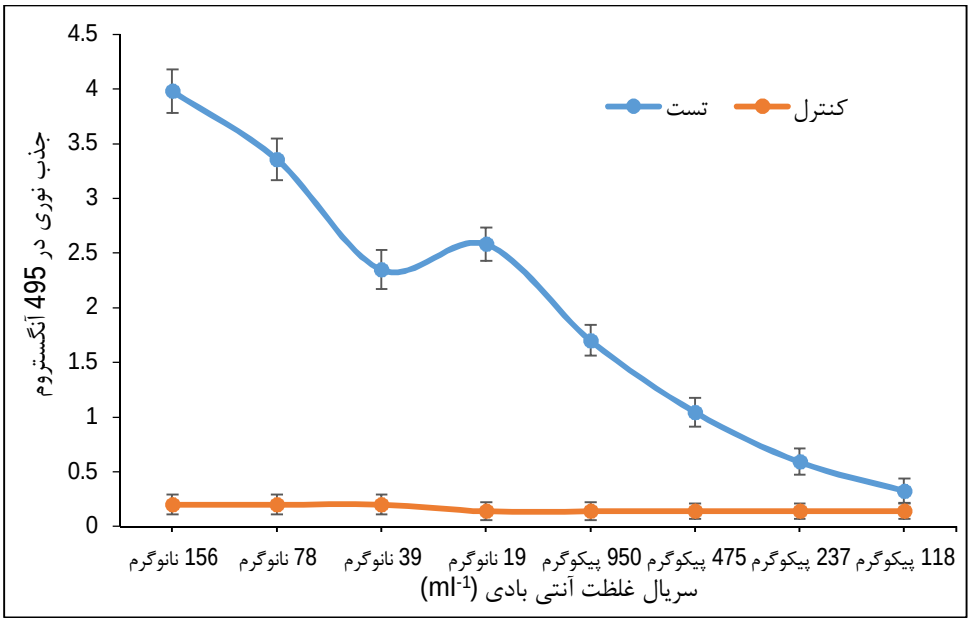
شکل 2 نتیجه الکتروفورز آنتی‌بادی تخلیص‌شده با رزین پروتئین G، ستون شماره 1 مارکر پروتئینی سیناکلون (Cat. No.PR901641)؛ ستون شماره 2 نمونه آنتی‌بادی تخلیص‌شده در شرایط احیا؛ ستون شماره 3 نمونه آنتی‌بادی تخلیص‌شده در شرایط غیراحیا



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

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-02-11]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.2.9.4]



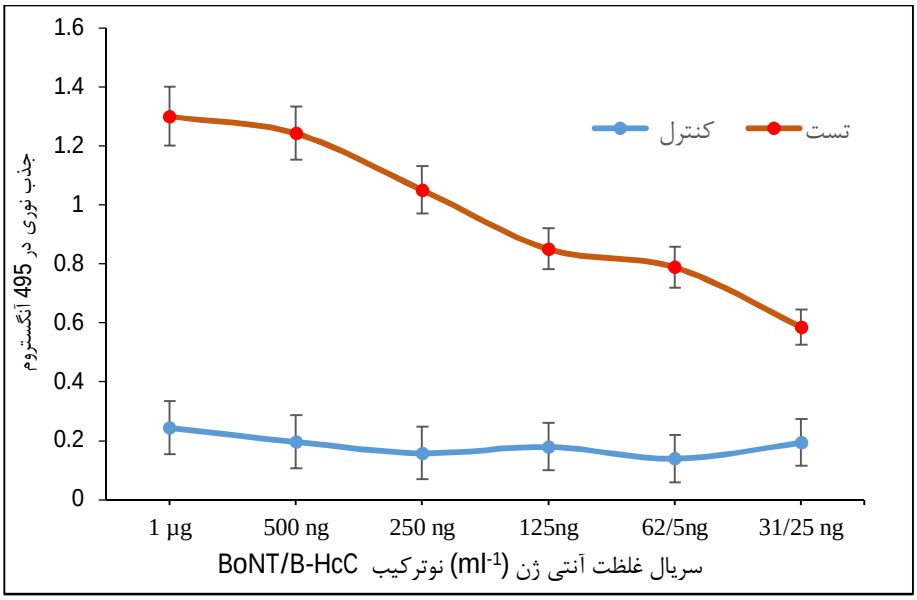
نمودار 2 نمودار الایزا غیرمستقیم آنتی‌بادی خرگوشی با آنتی‌ژن BoNT/B، نمونه کنترل شامل آنتی‌ژن BoNT/A و نمونه آزمون شامل آنتی‌ژن BoNT/B، نتایج نشان داد که آنتی‌بادی خرگوشی تا غلظت 475 پیکوگرم از آنتی‌ژن BoNT/B را در مقایسه با کنترل شناسایی کند.

محاسبه میزان حساسیت سازه ساندویچ الایزا در شناسایی آنتی‌ژن نوترکیب BoNT/B-HcC

با توجه به نمودار الایزای غیرمستقیم آنتی‌ژن نوترکیب با آنتی بادی‌های موشی و خرگوشی، مقدار 1 میکروگرم و 500 نانوگرم از آنتی‌بادی موشی و خرگوشی برای سازه ساندویچ الایزا بهینه می‌باشد. پس از آزمایش حالت‌های مختلف سازه ساندویچ الایزا برای شناسایی آنتی‌ژن مشخص شد که استفاده از آنتی‌بادی خرگوشی به‌عنوان آنتی‌بادی گیرنده و آنتی‌بادی موشی به‌عنوان آنتی‌بادی شناسایی‌کننده، نتایج بهتری مشاهده می‌شود (نتایج نشان داده‌نشده). با توجه به همین دلیل برای تعیین حساس سازه ساندویچ الایزا میزان 500 نانوگرم از آنتی‌بادی موشی کف چاهک‌ها پوشیده شد و در ادامه سریال غلظت از 1 میکروگرم از آنتی‌ژن درون چاهک‌ها اضافه و سپس 500 نانوگرم از آنتی‌بادی خرگوشی به چاهک‌ها اضافه شد. نتایج نشان داد که روش ساندویچ الایزای طراحی‌شده تا غلظت 31 نانوگرم از آنتی‌ژن را می‌تواند شناسایی کند (نمودار 3).

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-02-11]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.2.9.4]



نمودار 3 بررسی میزان حساسیت روش ساندویچ الایزای طراحی‌شده در شناسایی آنتی‌ژن نوترکیب BoNT/B-HcC، کف هر چاهک با مقدار 500 نانوگرم آنتی‌بادی موشی پوشانده و روی آن مقدار 1 میکروگرم آنتی‌ژن از چاهک اول تیتر شد. سپس در هر چاهک مقدار 500 نانوگرم آنتی‌بادی خرگوشی ریخته شد. در نمونه کنترل از پروتئین BSA به‌عنوان کنترل استفاده شده است.

میزان حساسیت و اختصاصیت سازه ساندویچ الایزا در شناسایی BoNT/B

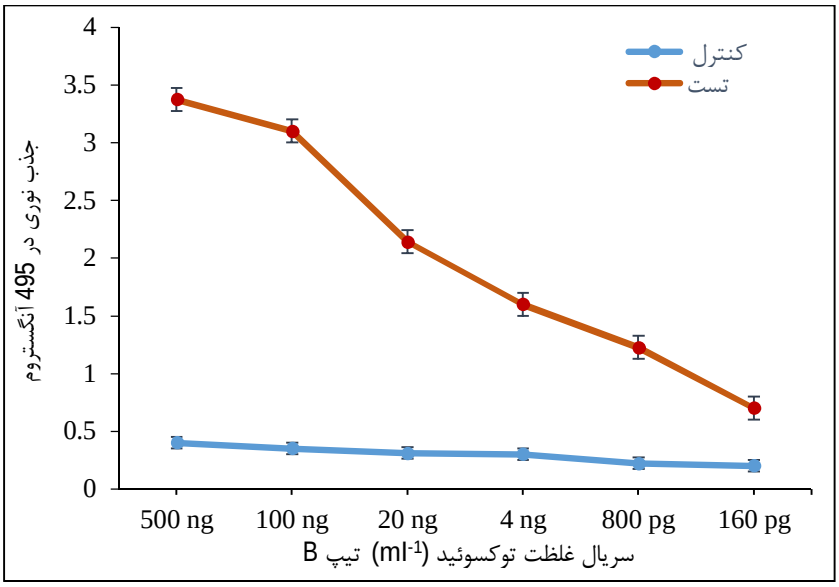
آزمایش تعیین حساسیت آنالیتیک روش الایزای تنظیم‌شده با استفاده از رقت‌های سریالی سم BoNT/B انجام شد. نمودار و فرمول خط حاصل‌شده برای محاسبه حد تشخیصی روش، استفاده شدند. علاوه بر این برای تعیین محدوده تشخیصی، میانگین سیگنال چاهک‌های شاهد و میزان انحراف معیار مربوطه نیز محاسبه شد. یافته‌های به‌دست‌آمده از این آزمایش در جدول 1 و نمودار 4 قابل مشاهده است. همچنین نتایج بررسی واکنش متقاطع ساندویچ الایزا نشان داد که روش تنظیم‌شده، اختصاصیت بالایی در شناسایی BoNT/B دارد (نمودار 5).

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

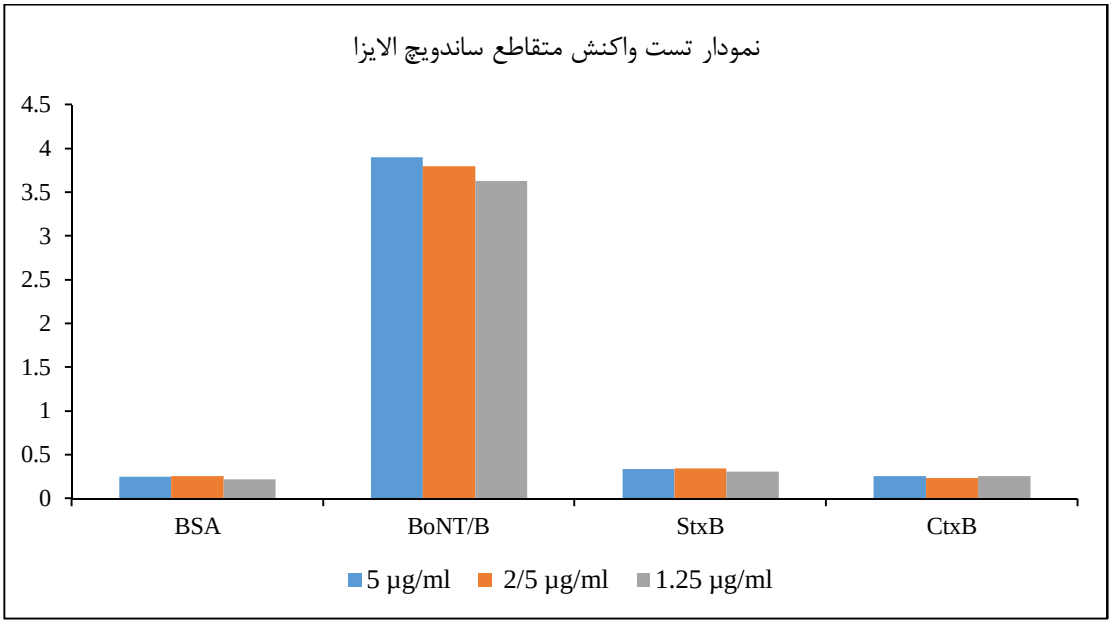
حد تشخیص	معادله خط	میزان جذب حد تشخیص	حد شاهد	انحراف معیار شاهدها	میانگین جذب شاهدها	ساندویچ الایزا
146/1	y=0/0041x +0/0908	0/69	0/57	0/09	0/42	سم BoNT/B

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-02-11]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.2.9.4]



نمودار 4 بررسی میزان حساسیت روش ساندویچ الایزای طراحی‌شده 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 تیتر شد. سپس در هر چاهک مقدار 1 میکروگرم آنتی‌بادی خرگوشی ریخته شد. سم در حد 1 نانوگرم قابل‌شناسایی 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.

بحث

با اینکه مطالعه‌های بسیاری در حوزه بیماری حاصل از سم بوتولینوم وجود دارد، اما تعداد مطالعه‌ها در حوزه شناسایی و تشخیص این سم در نمونه‌های آلوده کمتر بوده است. ازجمله علت‌های این موضوع می‌توان به نادر بودن این بیماری و همچنین تنوع سموم عصبی بوتولینوم

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-02-11]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.2.9.4]

اشاره کرد. باتوجه به این که دز کشندگی سم پایین بوده [13]، قابلیت استفاده در حوزه بیوتروریسم 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 *کلستریدیوم بوتولینوم* از آزمون‌های حساسی نظیر PCR و DNA-probe می‌توان استفاده کرد [9]. این روش‌ها حساسیت بسیار زیادی دارند، اما با وجود اینکه که نیاز به تجهیزات گران‌قیمت دارند، برای تشخیص سم باکتری کارایی ندارند. از دیگر روش‌های تشخیص سم بوتولینوم آزمایش روی موش آزمایشگاهی در شرایط درون تن برای شناسایی سموم بوتولینوم است که حساس‌ترین و بهترین روش است، اما این روش محدودیت‌هایی ازجمله زمان‌بر 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 بیماری‌ها بر استفاده از روش جایگزین برای شناسایی باکتری و سم بوتولینوم توجه دارند.

روش‌های سرولوژیکی برای تشخیص میزان آلودگی کارآمدی بالایی دارند، ازجمله مهم‌ترین این روش‌ها الایزا است که کاربرد زیادی در شناسایی عوامل بیماری‌زا در آب و غذا دارد [15]. همچنین برای بهبود روش الیزا و افزایش حساسیت آن از روش تغییریافته ساندویچ الایزا برای شناسایی سم با استفاده از دو آنتی‌بادی 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 آنتی‌ژن نوترکیب BoNT/B-HcC بوده است. در آغاز برای بیان آنتی‌ژن نوترکیب از سیستم وکتوری pET که پروموتور T7 lac دارد و یک پروموتور قوی محسوب می‌شود، استفاده شده است. ازجمله ویژگی دیگر این سیستم، وجود نشانگر 6xHis Tag در دو طرف MCS است که تخلیص پروتئین نوترکیب بیان‌شده را آسان می‌کند. برای نشان‌دادن قابلیت ایمنی‌زایی پروتئین در طول ایمنی‌زایی از روش الایزا بهره‌گیری شده است که تیتر آنتی‌بادی خنثی‌کننده پس از تزریق چهارم به روش الایزا بیانگر پاسخ تام بدن نسبت به آنتی‌ژن تجویزشده است که آنالیزهای آماری نمونه تست و شاهد با آزمون t نشان‌دهنده 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 پژوهش‌های دیگر انجام‌شده در شناسایی تیپ‌های مختلف، میزان کمتری از آنتی‌ژن نوترکیب طراحی‌شده را گزارش کرده‌اند، برای مثال در پژوهشی مینایی و همکاران برای شناسایی سم *کلستردیوم بوتولینوم* تیپ E از روش ساندویچ الایزایی استفاده کردند که توانسته 1 نانوگرم از سم را شناسایی کند. این موضوع در حالی است که میزان آنتی‌ژن شناسایی‌شده به‌وسیله ساندویچ الایزا کمتر از نتایج پژوهش حاضر بوده است [16]. در مثالی دیگر استانکر و همکاران از یک آنتی‌بادی مونوکلونال به‌عنوان آنتی‌بادی 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 *کلستردیوم بوتولینوم* تیپ B را شناسایی کند [17].

روش ساندویچ 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 این روش می‌تواند برای شناسایی آنتی‌ژن خاص در نمونه مجهول کاربرد بالایی داشته باشد.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-02-11]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.2.9.4]

منابع

[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.

[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.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-02-11]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.2.9.4]

Biotechnology-Tarbiat Modares University

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

Hossein Samiei Abianeh[1,2], Shahram Nazarizn[3]*, JafarAmani[4],Amir Sajjad Hojjati razgi[5], Mohammad Reza Ramezani[6] Mohammad Reza Rahmani[7]

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

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-02-11]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.2.9.4]

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

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-02-11]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.2.9.4]