

Identification of B subunit of Cholera Toxin Using ELISA Technique |

Mahboobeh Hassanifard¹, Gholamreza Olad², Jafar Amani^{3*}

1-Department of Molecular Genetics, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2-Applied Biotechnology Research Center, New Health Technologies Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3-Applied Microbiology Research Center, Biomedicine Technologies Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

*Corresponding Author: Jafar Amani, Applied Microbiology Research Center, Biomedicine Technologies Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Email: jafar.amani@gmail.com

| Received | 1404/01/24

| Revised | 1404/02/21

| Accepted | 1404/01/04

| Abstract |

Background and Aim: *Vibrio cholerae* is a Gram-negative bacterium that causes cholera, a disease characterized by severe diarrhea and dehydration due to the production of cholera toxin. Rapid and accurate detection of this toxin is essential for effective disease control. This study presents an ELISA-based method that is rapid, accurate, and cost-effective for detecting *V. cholerae*. This method involves producing a recombinant cholera toxin B subunit (CtxB) protein and generating specific antibodies in mice and rabbits.

Materials and Methods: The recombinant *CtxB* gene was expressed in *E. coli* BL21 (DE3) using IPTG induction and confirmed by Western blot analysis. The purified rCtxB protein was then administered subcutaneously to rabbits and mice. The antibodies were then isolated and purified. Their sensitivity was assessed using a sandwich ELISA, and their specificity was evaluated using an indirect ELISA against similar toxins.

Results: In this study, we used the ELISA technique with antibodies extracted and purified from the sera of mice and rabbits. Following colorimetric analysis, the optical density results demonstrated that the produced antibodies could specifically recognize the CtxB toxin. The method's high sensitivity (detecting eight nanograms of toxin) and minimal cross-reactivity with other toxins (StxB and LtB) confirm the antibodies' suitable specificity.

Conclusion: The protein- and antibody-based ELISA technique offers a rapid, accurate, and cost-effective approach for detecting *V. cholerae* compared to microbial culture methods or advanced molecular techniques. This method enables rapid detection of cholera toxin in clinical and environmental samples due to its high sensitivity, suitable specificity, and lack of requirement for advanced laboratory equipment.

| Keywords |

Diarrhea|
Vibrio Cholerae Toxin B
Subunit|
Sandwich ELISA|
Indirect ELISA|

| Iau Science |

شناسایی زیرواحد B توکسین کلرا با استفاده از تکنیک الایزا

محبوبه حسینی فرد^۱، غلامرضا اولاد^۲، جعفر امانی^{۳*}

۱- گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد تهران شمال، تهران، ایران

۲- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، پژوهشکده فناوری‌های نوین سلامت، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، تهران، ایران

۳- مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، پژوهشکده فناوری‌های زیست پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، تهران، ایران

*نویسنده مسئول: دکتر جعفر امانی، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، پژوهشکده فناوری‌های زیست پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله

(عج)، میدان ونک، خیابان ملاصدرا؛ پست الکترونیکی: jafar.amani@gmail.com

تاریخ پذیرش | ۱۴۰۴/۰۱/۰۴

تاریخ ویرایش | ۱۴۰۴/۰۲/۲۱

تاریخ دریافت | ۱۴۰۴/۰۱/۲۴

چکیده

زمینه و هدف: ویبریو کلرا (*Vibrio cholerae*) باکتری گرم منفی عامل بیماری وباست که از طریق تولید توکسین کلرا باعث اسهال شدید و کم آبی می‌شود. تشخیص سریع و دقیق این توکسین برای کنترل بیماری ضروری است. این مطالعه با تولید آنتی‌بادی‌های اختصاصی از موش و خرگوش، روشی سریع، دقیق و مقرون به صرفه برای تشخیص ویبریو کلرا با استفاده از تکنیک الایزا ارائه می‌دهد.

مواد و روش‌ها: ژن نو ترکیب *CtxB* با استفاده از IPTG در *E.coli* BL21 (DE3) بیان و با وسترن بلات تأیید شد. پروتئین rCtxB خالص شده به صورت زیرجلدی به خرگوش و موش تزریق شد. آنتی‌بادی‌ها جدا و تخلیص شدند، سپس حساسیت آنتی‌بادی خالص شده با تکنیک الایزای ساندریج و ارزیابی اختصاصیت آن، با تکنیک الایزای غیرمستقیم با استفاده از توکسین‌های مشابه انجام شد.

نتایج: در این مطالعه، آنتی‌بادی‌های استخراج و تخلیص شده از سرم موش و خرگوش در تکنیک الایزا مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج جذب نوری نشان داد که آنتی‌بادی‌های تولید شده قادر به شناسایی اختصاصی توکسین *CtxB* هستند. میزان حساسیت بالای این روش (شناسایی میزان ۸ نانوگرم توکسین) و حداقل واکنش متقاطع با توکسین‌های مشابه StxB و LtB، بیانگر اختصاصیت مناسب آنتی‌بادی‌ها می‌باشد. **نتیجه گیری:** تکنیک الایزا مبتنی بر پروتئین و آنتی‌بادی روشی سریع، دقیق و مقرون به صرفه برای شناسایی ویبریو کلرا نسبت به روش‌های کشت میکروبی یا مولکولی پیشرفته محسوب می‌شود. این روش با حساسیت بالا، اختصاصیت مناسب و عدم نیاز به تجهیزات پیشرفته آزمایشگاهی، امکان تشخیص سریع توکسین کلرا را در نمونه‌های بالینی و محیطی فراهم می‌کند.

واژگان کلیدی

اسهال

زیرواحد B ویبریو کلرای توکسین

الایزای ساندریج

الایزای غیرمستقیم

علوم Iau

۱ | مقدمه

بر اساس سازمان جهانی بهداشت (WHO) در صورت گزارش ۱۰ مورد تست مثبت، اهمیت نظارت از نظر اپیدمی ضروری می‌باشد. تمام این موارد نشان‌دهنده این است که هنوز در کشورهای در حال توسعه، وبا یک بلائی بومی است (۶).

برای شناسایی ویبریو کلرا، روش‌های مختلفی وجود دارد که شامل کشت میکروبی نمونه‌های بالینی روی محیط‌های انتخابی، تأیید کلنی‌ها با آزمایش‌های بیوشیمیایی و سرولوژیکی، استفاده از میکروسکوپ زمینه تاریک، روش‌های مولکولی مانند PCR و Real-Time PCR، توالی‌یابی نسل جدید (NGS) برای بررسی تغییرهای ژنتیکی سویه‌ها، همچنین روش‌های نوین (مانند بیوسنسورها که حساسیت بالایی دارند اما هزینه‌بر هستند) و تست‌های تشخیصی سریع مبتنی بر آنتی‌بادی مونوکلونال یا آپتامر مورد استفاده قرار می‌گیرند. هر کدام از این روش‌ها مزایا و محدودیت‌های خاص خود را دارند، روش‌هایی مانند کشت زمان‌بر، همچنین روش‌های مولکولی و نوین نیازمند تجهیزات پیشرفته و هزینه بالا هستند؛ بنابراین، تست‌های سریع و مقرون‌به‌صرفه مانند ایلیزا به دلیل سادگی، سرعت و تکرارپذیری به‌ویژه در مناطق با امکانات محدود، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند (۹-۶).

با وجود روش‌های متنوع، تشخیص ویبریو کلرا، اغلب آن‌ها نیازمند تجهیزات گران‌قیمت، زمان‌بر و تخصص فنی بالا هستند که در کشورهای در حال توسعه محدودیت ایجاد می‌کند. در مطالعه پیش رو، طراحی سیستم تشخیصی مبتنی بر CtxB نو ترکیب، استفاده هم‌زمان از دو مدل حیوانی (موش و خرگوش) برای تولید آنتی‌بادی، توانایی تشخیص توکسین در غلظت بسیار پایین و کاهش واکنش متقاطع با توکسین‌های مشابه (StxB و LtB) و با استفاده از روش ایلیزای غیرمستقیم، راه‌کاری ساده، سریع و اقتصادی برای تشخیص توکسین ارائه کرده که می‌تواند در مناطق محروم و با امکانات محدود در شناسایی زودهنگام عفونت کاربرد گسترده داشته باشد.

وبا، یک بیماری اسهالی حاد است که در اثر مصرف غذا یا آب آلوده ایجاد می‌شود. ویبریو کلرا پاتوژن اصلی، مسئول اسهال که غالباً کشورهای جهان سوم را تهدید می‌کند، جز باکتری‌های گرم‌منفی از خانواده ویبریوناسه است. در مناطقی که از نظر بهداشتی ضعیف هستند، افراد ناقل باعث شیوع همه‌گیری وبا می‌شوند. توکسین کلرا هتروژن بوده و دارای یک زیرواحد ۲۸ و چند زیرواحد ۱۰ کیلودالتونی است. زیرواحد‌های کوچک در اتصال به گانگلیوزیدهای GM1 روده نقش دارند در حالی که زیرواحد بزرگ در ایجاد عوارض توکسین نقش دارد. دو بخش زیرواحد بزرگ (CtxA1 و CtxA2) با پیوند دی‌سولفید به هم متصل شده‌اند و زیرواحد‌های کوچکتر (CtxB) توسط پیوندهای هیدروژنی کنارهم قرار گرفته‌اند. سم وبا، به‌ویژه زیرواحد B آن (CtxB)، با تسهیل ورود سم به سلول‌های میزبان از طریق اتصال به گانگلیوزیدهای GM1، نقش مهمی در پاتوژن بیماری ایفا می‌کند. پس از ترشح توکسین توسط باکتری، فعالیت توکسین آغاز می‌شود. توکسین از طریق زیرواحد B به گیرنده‌های روده کوچک متصل می‌شود و باعث انتقال زیرواحد A به درون سیتوزول می‌شود. پس از ورود زیرواحد A به سیتوپلاسم، به دلیل خاصیت ADP-ریبوزیل ترانسفیری، باعث ADP ریبوزیله شدن پروتئین G می‌شود، این امر باعث افزایش آدنیلات سیکلاز می‌شود که در نهایت افزایش cAMP و خروج یون‌ها و متعاقباً دفع آب، الکترولیت و ایجاد اسهال را سبب می‌شود (۴-۱).

وبا، با اسهال آبکی شدید و کم‌آبی سریع بدن مشخص می‌شود که در صورت عدم درمان می‌تواند طی ۱۲ تا ۲۴ ساعت منجر به مرگ شود و درمان آن بر پایه جبران آب و الکترولیت، مایعات وریدی و آنتی‌بیوتیک است (۲ و ۵). تشخیص وبا نقش اساسی در مدیریت بیماری وبا دارد یعنی ضرورت یک آزمایش تشخیصی سریع و خاص که بیماری را آسان تشخیص دهد وجود دارد که این امر باعث کاهش هزینه‌های درمان و همچنین مرگ‌ومیر خواهد شد.

سانتى گراد قرار داده شد. باكتري‌ها از نظر آلودگى و كارايى بررسى شدند (۱۱ و ۱۲).

۲-۲-۳ | بيان پروتئين

براي انجام بيان، *E. coli* BL21(DE3) حاوى pET28a-ctxb با ۰/۵ ميلي مولار ايزوپروپيل-d-1-تيوگالاکتوپيرانوسيد (IPTG) القا شد و خالص‌سازى طبق دستورالعمل‌هاى سازنده انجام شد. به‌طور خلاصه (*E. coli* BL21(DE3) در دماى ۳۷ درجه سانتى گراد در محيط LB (با ۵۰ ميكروگرم بر ميلي ليتر كاناميسين) كشت داده شد. هنگامى كه ۰/۷ IPTG = 600 nm OD شد، به ميزان ۱ ميلي مول براي القاي توليد پروتئين اضافه شد و در انكوباتور ۳۷ درجه سانتى گراد با دور ۱۵۰ به مدت ۴ ساعت قرار داده شد. پس از گذشت ۴ ساعت باكتري‌ها سانترفوژ شدند (۱۰ و ۱۲).

۲-۳ | تخليص پروتئين نوتركيب CtxB

خالص‌سازى پروتئين نوتركيب CtxB با پرچسب His₆ با استفاده از کروماتوگرافي ميل تركيبي در شرايط دناتوراسيون با ستون Ni-NTA (QIAGEN، ايالات متحده آمريكا) انجام شد، براي اين منظور ۵۰ ميلي ليتر باكتري *E. coli* BL21(DE3) حاوى pET28a-ctxb القاشده توسط IPTG به مدت ۱۰ دقيقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقيقه سانترفوژ شد. محلول باكتري در ۶ ميلي ليتر بافر ليز (۵۰ NaH₂PO₄ ميلي مولار با pH = 8.0، NaCl ۳۰۰ ميلي مولار، ايميدازول ۱۰ ميلي مولار، ليزوزيم ۰/۲ ميلي گرم بر ميلي ليتر) به مدت ۳۰ دقيقه معلق شد. پس از سانترفوژ در ۱۴۰۰۰ دور در دقيقه به مدت ۲۰ دقيقه، مايع روبي جمع‌آورى و پس از سوپرناتانت بر روى ستون Ni-NTA (Thermo Fisher Scientific) بارگذاري شد. ستون با بافر شست‌وشو (۳۰ ميلي مولار ايميدازول حاوى ۵ درصد گليسروئول) داده شد. در نهايت با ۲ ميلي ليتر بافر استخراج (۳۰۰ ميكرومتر ايميدازول حاوى ۵ درصد گليسروئول) شسته شد. نمونه‌ها توسط روى ژل پلي‌آكريل‌آميد ۱۴ درصد آناليز و غلظت پروتئين خالص‌شده با روش برادفورد تعيين و در دماى ۲۰- درجه سانتى گراد نگهدارى شد (۱۰ و ۱۳).

۲-۴ | آزمايش وسترن بلات

۲ | مواد و روش‌ها

۲-۱ | مواد

باكتري *E. coli* BL21 (DE3) و *E. coli* DH5a (حاوى پلاسميد pET28a-ctxb) خريدارى شده از مركز ملي بيوتكنولوژى و مهندسي ژنتيك ايران، تهران. HRP-conjugated streptavidin (سيگما، آمريكا). كيت الايزا (eBioscience، آمريكا).

۲-۲ | بيان پروتئين نوتركيب CtxB

۲-۲-۱ | استخراج پلاسميد pET28a-ctxb از باكتري *E. coli* DH5a باكتري *E. coli* DH5a حاوى پلاسميد pET28a-ctxb مورد استفاده قرار گرفت. جهت جداسازى پلاسميد pET28a-ctxb از روش دستى استفاده شد، پلاسميد استخراج شده بر روى ژل آگارز ۱ درصد برده و الكترفورز انجام شد (۱۰). جهت ادامه كار، تايد سازه از نظر صحت ژن CTXB و همچنين قرارگيري ژن در جايگاه صحيح در وكتور بايد انجام مى‌شد. به اين منظور دو واكنش PCR انجام شد، يك واكنش با پرايمرهاى عمومي T7 و واكنش ديگر با پرايمرهاى دو سر ژن CTXB. واكنش‌ها با حجم نهايي ۲۵ ميكروليتر با ۲ ميكروليتر از پلاسميد استخراج شده و ۵/۵ ميكروليتر مسترميكس با پرايمرهاى فوروارد و ريورس متفاوت (در واكنش اول پرايمرهاى T7 و در واكنش دوم پرايمرهاى ژن CTXB) و برنامه دستگاه ترموسايكلر ۹۵ درجه به مدت ۵ دقيقه با ۳۰ چرخه با دماى ۷۲ و زمان نگهدارنده ۵ دقيقه با دماى ۷۲ درجه ادامه يافت.

۲-۲-۲ | انتقال پلاسميد pET28a-ctxb به سوبه بياني *E. coli* BL21(DE3)

جهت انتقال ناقل نوتركيب به درون باكتري مستعد از روش شوک حرارتى استفاده شد كه روش كار به اين صورت انجام شد: ابتدا باكتري مستعدشده از فريزر خارج و بر روى يخ قرار داده شد تا به آرامى ذوب شود. حدود ۱۰ نانوگرم از ناقل نوتركيب به لوله حاوى سلول‌هاى مستعد اضافه شد و به مدت ۳۰ دقيقه بر روى يخ قرار داده شد. لوله بيان شده به مدت ۵ دقيقه در حمام آب گرم در دماى ۳۷ درجه سانتى گراد قرار داده شد و مجدداً ۵ دقيقه بر روى يخ قرار گرفت. يك ميلي ليتر محيط كشت LB مايع، به لوله اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در شيكر انكوباتور با دماى ۳۷ درجه

نمونه‌گیری خون دوبار و دو هفته پس از تزریق سوم و چهارم انجام شد. برای جداسازی سرم، نمونه‌ها با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند (۱۷-۱۵).

۲-۶ | تیتراسیون آنتی بادی با کمک الایزای غیرمستقیم

پاسخ آنتی‌ژن-آنتی‌بادی اختصاصی با روش الایزا تعیین شد. میزان ۱ میکروگرم آنتی‌ژن، در ۱۰۰ میکرولیتر بافر پوشاننده (بافر کربنات-بی کربنات سدیم ۰/۰۵ مولار، pH=۹/۶) حل و در هر چاهک از میکروپلیت ریخته شد و سپس در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد یک شبانه‌روز نگهداری شد. به دنبال شست‌وشو و مسدود کردن با محلول مسدودکننده بافر PBST (بافر PBS به اضافه توئین ۲۰ با غلظت ۰/۰۵ درصد) حاوی ۵ درصد Skim milk به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی موش و ضد خرگوش استخراج شده (با رقت‌های سریالی از ۱:۵۰ تا ۱:۴۰۰۰۰۰ رقیق شده در PBST) به هر چاهک افزوده و به مدت ۱ ساعت درون انکوباتور قرار گرفت. به دنبال شست‌وشو، به هر چاهک آنتی‌بادی‌های ضد موش و خرگوش با برچسب HRP با رقت ۱:۲۰۰۰ در PBST اضافه شد. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و سه بار با PBST شسته شدند. پس از توقف آزمایش با اسیدسولفوریک ۲/۵ مولار، جذب نمونه در طول موج ۴۹۲ نانومتر توسط میکروپلیت خوان ELISA ثبت شد (۲۴). تمام ELISA حداقل سه بار برای تأیید انجام شد.

۲-۷ | تخلیص آنتی‌بادی با استفاده از ستون G

برای خالص‌سازی آنتی‌بادی IgG از ستون پروتئین G استفاده شد. ابتدا ستون با محلول ۱۰۰ میلی‌مولار Tris-HCl (pH=8) شست‌وشو شد. سپس ستون با بافر ۱۰ میلی‌مولار Tris-HCl (pH=8) متعادل شد. نمونه‌های سرم به ستون بارگذاری شده و با بافر ۱۰۰ میلی‌مولار Tris-HCl (pH=8) و بافر ۱۰ میلی‌مولار Tris-HCl (pH=8) شسته شدند. آنتی‌بادی‌ها با ۱۰۰ میلی‌مولار گلیسین (pH=3) شسته شدند (۱۷ و ۱۸). آنتی‌بادی خالص شده توسط ژل پلی‌آکریل‌امید ۱۴ درصد تأیید شد.

۲-۸ | بررسی حساسیت آنتی‌بادی

پروتئین‌های خالص شده از ژل پلی‌آکریل‌امید (PAGE) با استفاده از بافر انتقال (۳۹ میلی‌مولار گلیسین، ۴۸ میلی‌مولار Tris-base، ۰/۳۷ درصد SDS و ۲۰ درصد متانول) روی یک غشای PVDF^۱ منتقل شدند. غشای PVDF به ابعاد ۱۷ بریده و روی ژل قرار داده شد. سپس ساندریج حاصل، در داخلِ تانکِ حاوی بافرِ بلاتینگ قرار داده شد و انتقال به مدت ۱۲۰ دقیقه با ولتاژ ۱۰۰ انجام شد. پس از انتقال، کاغذ PVDF به مدت ۲ ساعت، در داخلِ بافرِ بلاکینگ (۵ درصد Skim milk) شناور شد. سپس با بافرِ PBST (بافرِ PBS به اضافه توئین ۰/۰۵ درصد) شست‌وشو داده شد. پس از بلاک کردن غشا، آنتی‌بادی‌ها با رقت مناسب در داخلِ بافرِ PBST تهیه و روی کاغذ نیتروسولوز ریخته شدند. ابتدا آنتی‌بادی اولیه که آنتی‌بادی موشی ضد CT^۲ (خریداری شده از شرکت سیگما - آمریکا) با رقت ۱:۲۰۰۰ افزوده شد و پس از شست‌وشو آنتی‌بادی ثانویه متصل به آنزیم پراکسیداز (Secondary Antibody HRP-Conjugated) با رقت ۱:۲۰۰۰۰ استفاده شد. سپس غشا به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد روی دستگاه لرزاننده قرار گرفت و سپس سه بار با بافرِ PBST و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه شست‌وشو داده شد. قرص سوبسترای DAB در ۲۰ میلی‌لیتر محلول PBS (1X) به طور کامل حل و پس از افزودن ۴۰ میکرولیتر H₂O₂ روی کاغذ PVDF ریخته شد. پس از ظهور باندها، واکنش توسط آب مقطر مهار شد (۱۱ و ۱۴).

۲-۵ | تولید آنتی‌بادی در حیوان

در این مطالعه موش‌های BALB/c (با سن ۶-۸ هفته تهیه شده از انستیتو پاستور تهران-ایران) مورد آزمایش قرار گرفتند. موش‌ها به دو گروه ۵ تایی (گروه آزمایش و گروه کنترل) تقسیم شدند. هر گروه شامل ۵ موش در گروه آزمایش، ۲۰ میکروگرم CtxB^۲ نوترکیب به صورت زیرجلدی در سه نوبت صفر، ۱۴ و ۲۸ روز با آدجوانت کامل و ناقص به موش‌ها تزریق شد. به گروه کنترل PBS تزریق شد. همچنین ۲۰۰ میکروگرم پروتئین نوترکیب CtxB با آدجوانت کامل و ناقص فروند در سه مرحله به خرگوش نیوزیلندی تزریق شد.

² Cholera Toxin

¹ Polyvinylidene Fluoride or Polyvinylidene Difluoride

۱-۳ | بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب و تأیید آن با کمک آزمایش وسترن بلات

جهت دستیابی به پروتئین CtxB باکتری *E. coli* DH5a حاوی pET28a-ctxb مورد استفاده قرار گرفت. جداسازی پلاسمید انجام شد و بررسی آن بر روی ژل آگاروز نشان دهنده تخلیص کامل آن بود. پلاسمید جدا شده با دو واکنش PCR مستقل از نظر صحت سازه ژنی و همچنین قرارگیری سازه در موقعیت صحیح، مورد ارزیابی قرار گرفت. طول ۳۲۰ bp برای ژن ctxb و طول ۶۵۰ bp برای ژن درون سازه ژنی دیده شد. شکل ۱-الف (محصولات ۶۵۰ bp در شکل نشان داده نشده است) انتقال ناقل نوترکیب به درون باکتری مستعد شده به روش شوک حرارتی انجام شد. بررسی باکتری از نظر کارایی و عدم آلودگی انجام شد. بیان ژن با القای IPTG انجام شد و پروتئین نوترکیب CtxB با وزن مولکولی حدود ۱۴ کیلودالتون بر روی ژل پلی آکریل آمید ۱۴ درصد دیده شد. نتایج بهینه سازی بیان ژن نشان داد که بهترین بیان در ۴ ساعت پس از القا با IPTG انجام شد. پروتئین نوترکیب CtxB با استفاده از ستون Ni-NTA خالص سازی شد و بر روی ژل پلی آکریل آمید برده شد. شکل ۱-ب جهت تأیید بیان محصول پروتئینی از وسترن بلات استفاده شد (شکل ۱-ج).

جهت ارزیابی میزان حساسیت آنتی بادی، از روش ایزای ساندویچ طبق مراحل شرح داده شده (۶-۲) استفاده شد. برای این منظور میزان ۱ میکروگرم آنتی بادی خرگوشی به همراه بافر پوشاننده در کف چاهک قرار داده شد. همچنین از رقت های مختلف توکسین (۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ... نانوگرم) و ۱ میکروگرم آنتی بادی موشی به عنوان شناساگر استفاده گردید. سایر مراحل طبق ۱-۶ انجام و جذب نمونه در طول موج ۴۹۲ نانومتر توسط میکروپلیت خوان ELISA ثبت شد. همچنین آزمایش سه بار جهت تأیید انجام شد.

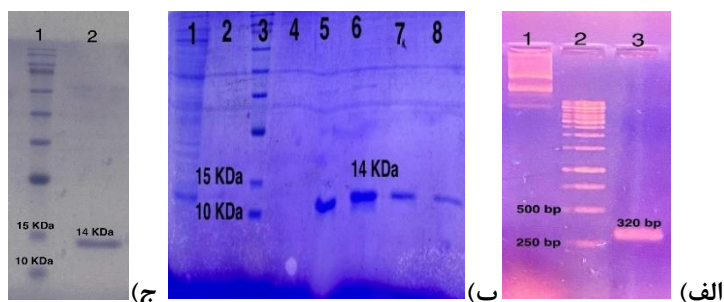
۲-۹ | بررسی اختصاصیت آنتی بادی تولید شده

برای ارزیابی واکنش متقاطع، ELISA غیرمستقیم با کمک توکسین های مشابه StxB و LtB انجام شد. آزمایش طبق مرحله قبل (۶-۲) انجام شد و فقط در مرحله نخست از توکسین های CtxB، StxB و LtB جهت پوشاندن کف چاهک های ایزا استفاده شد.

۲-۸ | آنالیز آماری

داده های مربوط به هر آزمایش در سه تکرار مستقل انجام شد و به صورت میانگین \pm انحراف معیار (SD) نشان داده شدند. تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۲/۰ انجام شد. مقایسه های چندگروهی با استفاده از آزمون Two-way ANOVA انجام شد. سطح معناداری $p < 0/05$ در نظر گرفته شد.

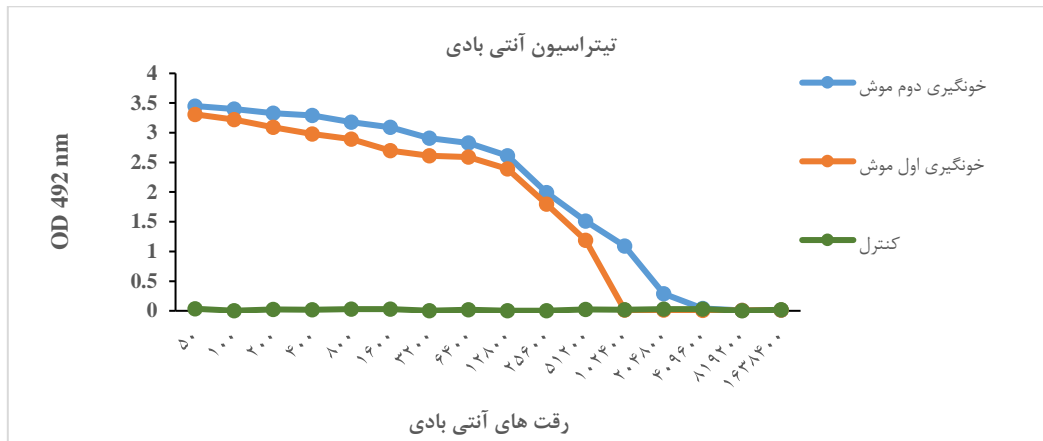
۳ | نتایج



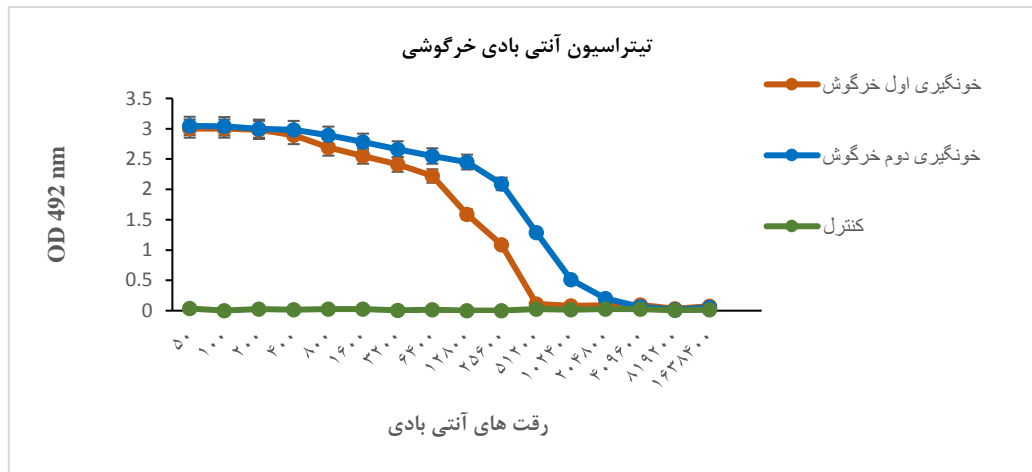
شکل ۱- بیان پروتئین نوترکیب CtxB و تأیید آن. شکل الف: جداسازی پلاسمید و تأیید وجود سازه ژنی درون آن. چاهک ۱ تخلیص پلاسمید از باکتری *E. coli* DH5a. چاهک ۲ نشانگر DNA چاهک ۳ واکنش PCR با پرایمرهای دو طرف ژن CTXB. شکل ب: تخلیص پروتئین با استفاده از ستون G. چاهک ۳ نشانگر پروتئین و چاهک های ۵، ۶، ۷ و ۸ که در محدوده ۱۴ کیلودالتون دارای باند پرن رنگ است نشان دهنده پروتئین نوترکیب CtxB است. شکل ج نیز آزمایش وسترن بلات و تأیید بیان پروتئین نوترکیب CtxB است.

۳-۲ | تیتراسیون آنتی بادی ها با کمک ایزا

پس از خون‌گیری از موش و خرگوش ایمن‌شده، نتایج ایذا نشان داد که افزایش تیتراژ آنتی‌بادی پس از هر مرحله از تزریق نسبت به شاهد، دارای افزایش معنی‌دار بود. خون‌گیری در دو مرحله انجام شد (شکل ۲).



(الف)

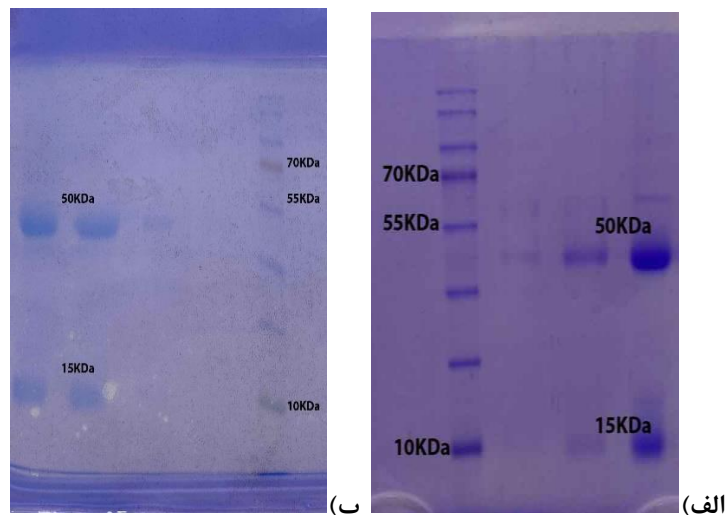


(ب)

شکل ۲- تیتراسیون آنتی‌بادی‌های موشی و خرگوشی. شکل الف: واکنش توکسین با رقت‌های متفاوت آنتی‌بادی موشی (۱:۵۰-۱:۱۶۳۸۴۰۰) که نمونه‌گیری در دو نوبت انجام شد و به رنگ‌های آبی و نارنجی در شکل نشان داده شده است. در نمونه‌گیری دوم موش (رنگ آبی) میزان تولید آنتی‌بادی بیشتر بوده است. شکل ب: واکنش توکسین با رقت‌های متفاوت آنتی‌بادی خرگوشی (۱:۵۰-۱:۱۶۳۸۴۰۰) که نمونه‌گیری در دو نوبت انجام شد و به رنگ‌های آبی و نارنجی در شکل نشان داده شده است. در نمونه‌گیری دوم خرگوش (رنگ آبی) میزان تولید آنتی‌بادی بیشتر بوده است.

۳-۳ | تخلیص آنتی‌بادی‌های موشی و خرگوشی با کمک ستون G

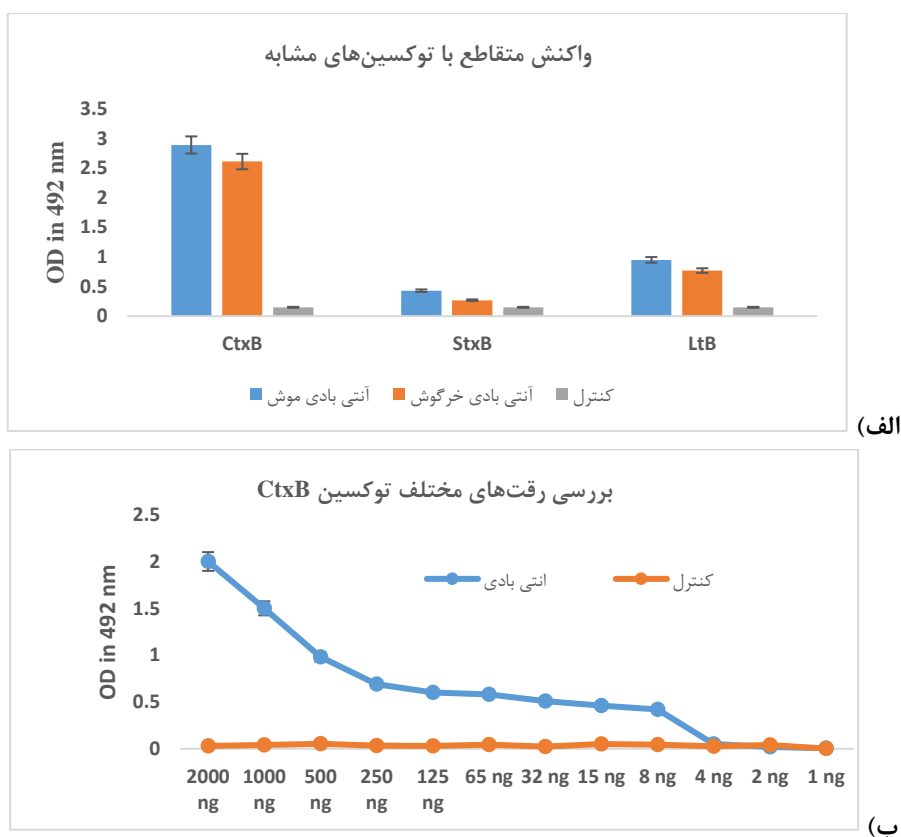
از ستون پروتئین G برای خالص‌سازی آنتی‌بادی IgG استفاده شد. همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، آنتی‌بادی IgG دارای دو زنجیره سبک و دو زنجیره سنگین است که به دو باند ۵۰ و ۱۵ کیلودالتون شکسته شد.



شکل ۳- تخلصِ آنتی‌بادی‌های موشی و خرگوشی با استفاده از ستون G. شکل الف تخلصِ آنتی‌بادی‌های موشی است. شکل ب تخلصِ آنتی‌بادی‌های خرگوشی است. همان‌طوری‌که در شکل دیده می‌شود آنتی‌بادی IgG دارای دو زنجیرهٔ سبک و دو زنجیرهٔ سنگین است که به دو باند ۱۵ و ۵۰ کیلوالتون شکسته شد.

۳-۴ | بررسی حساسیت و اختصاصیت آنتی‌بادی تولیدشده

میزان حساسیت ایذا جهت شناسایی پروتئین نوترکیب CtxB ۸ نانوگرم ارزیابی شد. همچنین میزان تمایل آنتی‌بادی‌ها به توکسین CtxB بسیار بیشتر از سایر توکسین‌های مشابه دیده شد (شکل ۴).



شکل ۴- بررسی حساسیت و اختصاصیت آنتی‌بادی تولیدشده. شکل الف: رقت‌های مختلف توکسین (۸ تا ۲۰۰۰ نانوگرم) در سه تکرار مستقل ثبت شد. داده‌ها در نسخهٔ ۱۲ SPSS اجرا گردیدند. نتایج نشان دادند که تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های بالاتر از ۳۲ نانوگرم با

غلظت‌های پایین‌تر وجود دارد ($p < 0/05$). اما بین ۸ و ۱۶ نانوگرم، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. حد تشخیص (LOD) براساس میانگین جذب نوری بلانک به علاوه سه برابر انحراف معیار آن محاسبه شد و معادل ۸ نانوگرم تعیین گردید. شکل ب: بررسی اختصاصیت آنتی‌بادی‌ها، جذب نوری حاصل از واکنش با توکسین‌های CtxB، StxB و LtB در سه تکرار مستقل اندازه‌گیری شد و در SPSS مقایسه میانگین جذب نوری سه گروه اجرا شد. نتایج نشان دادند که تفاوت معنی‌داری بین جذب نوری CtxB با دو توکسین دیگر وجود دارد ($p < 0/05$). میزان واکنش متقاطع با استفاده از نسبت جذب نوری توکسین‌های مشابه با CtxB محاسبه شد که کمتر از ۲۰ درصد بود. این نتایج نشان‌دهنده اختصاصیت بالای آنتی‌بادی‌های تولیدشده است.

۴ | بحث

انجام شد که نتایج نشان دادند آنتی‌بادی‌ها بیشترین واکنش را با CtxB داشته و حداقل واکنش متقاطع با توکسین‌های مشابه نشان دادند. آنتی‌بادی‌های جداشده از موش و خرگوش، پس از تخلیص با تکنیک الیزای ساندویچ و غیرمستقیم جهت بررسی حساسیت و اختصاصیت درمقابل CtxB مورد ارزیابی قرار گرفتند. همچنین آنتی‌بادی‌ها با توکسین‌های StxB و LtB نیز مورد سنجش قرار گرفتند که نتایج تمایل بالای آنتی‌بادی‌ها را به CtxB نشان دادند که این امر نمایانگر اختصاصیت ایمونوگلوبولین جداشده می‌باشد.

پژوهش‌های بسیاری درخصوص تشخیص باکتری با تکنیک الیزا صورت گرفته است. در تحقیقی Chaicumpa از روش الیزا جهت شناسایی ویبریو کلا/ استفاده نمودند (۲۲). این گروه نمونه‌های مدفوع بیماران آلوده به باکتری را جهت جداسازی لیپوپلی‌ساکارید دیواره باکتری مورد بررسی قرار دادند. سپس با استفاده از لیپوپلی‌ساکارید و آنتی‌بادی مونوکلونال با کمک تکنیک الیزا باکتری را شناسایی کردند. آن‌ها از روش کشت سنتی و الیزا استفاده نمودند و نشان دادند که استفاده از آنتی‌بادی و الیزا در تشخیص سریع و دقیق باکتری مؤثرتر از روش سنتی است. اگرچه شباهت‌هایی بین کار این گروه و تحقیق پیش رو وجود دارد اما استفاده از توکسین نوترکیب خطر انتقال بیماری را تا حد زیادی کاهش می‌دهد و همچنین تولید توکسین در مقیاس بالا در محیط آزمایشگاه امکان‌پذیر می‌باشد. همچنین واکنش متقاطع آنتی‌بادی‌های تولیدشده با سایر سموم مرتبط StxB و LtB جهت اختصاصی بودن آنتی‌بادی‌ها در کاربردهای تشخیصی و اجتناب از نتایج مثبت کاذب بسیار مهم است. در تحقیقی دیگر ورجان گارسیا^۱ و همکارانش جداسازی دو آنتی‌بادی مونوکلونال درمقابل CtxB را با استفاده از موش انجام دادند (۲۳). این گروه CtxB را عامل مهمی در شناسایی و تحریک سیستم‌ایمنی معرفی کردند که می‌تواند در تهیه واکسن و همچنین شناسایی باکتری مورد توجه قرار بگیرد. آن‌ها از

وبا، یک بیماری اسهالی حاد است که در اثر مصرف غذا یا آب آلوده ایجاد می‌شود. اتصال به سلول میزبان یک مرحله مهم و شروع بیماری‌زایی است. توکسین وبا، به‌ویژه زیرواحد B آن (CtxB)، با تسهیل ورود سم به سلول‌های میزبان از طریق اتصال به گانگلیوزیدهای GM1، نقش مهمی در پاتوژنز بیماری ایفا می‌کند. تشخیص دقیق و به‌موقع وبا برای درمان مؤثر و کنترل شیوع بیماری ضروری است. برای این منظور، ژن نوترکیب CtxB در باکتری *E. coli* BL21DE3 بیان شد و پروتئین خالص‌شده rCtxB به‌صورت زیرجلدی به موش و خرگوش تزریق شد. پس از اینکه حیوان‌های آزمایشگاهی با پروتئین CtxB ایمن شدند، برای بررسی پاسخ ایمنی سیستمی و مخاطی، میزان آنتی‌بادی IgG سرم به کمک الیزای غیرمستقیم مورد بررسی قرار گرفت. تیتراسیون آنتی‌بادی‌ها در دومین خون‌گیری افزایش نشان داده بودند که بیانگر تحریک بالای سیستم‌ایمنی حیوان بود. برای ارزیابی اختصاصیت آنتی‌بادی، واکنش متقاطع ELISA غیرمستقیم با کمک توکسین‌های StxB و LtB انجام شد. سم Lt توسط ETEC و سم Stx توسط EHEC ترشح می‌شود. زیرواحد B این توکسین‌ها به‌همراه توکسین کلا/ نقش عمده‌ای در اتصال باکتری به روده و در نهایت بروز علائم اسهال دارند (۲، ۱۰، ۱۹-۲۱). توکسین‌های StxB و LtB به‌عنوان توکسین‌های مشابه با CtxB انتخاب شدند، زیرا این توکسین‌ها از نظر ساختاری و عملکردی شباهت‌هایی با زیرواحد B توکسین کلا/ (CtxB) دارند و معمولاً در آزمایش‌های اختصاصیت آنتی‌بادی به‌کار می‌روند تا واکنش متقاطع احتمالی آنتی‌بادی‌ها با توکسین‌های مشابه بررسی شود. این انتخاب به‌منظور اطمینان از اختصاصیت آنتی‌بادی‌های تولیدشده درمقابل CtxB و کاهش احتمال واکنش غیراختصاصی صورت گرفته است (۷) و (۸). در مطالعه حاضر، ارزیابی اختصاصیت آنتی‌بادی‌ها با استفاده از الیزای غیرمستقیم و توکسین‌های StxB و LtB

¹ Verjan Garcia

دقیق و مقرون به صرفه برای شناسایی ویبریو کلرا نسبت به روش‌های سنتی مانند کشت میکروبی یا روش‌های مولکولی پیشرفته محسوب می‌شود. این روش با حساسیت بالا، اختصاصیت مناسب (حداقل واکنش متقاطع با توکسین‌های مشابه) عدم نیاز به تجهیزات پیشرفته آزمایشگاهی، امکان تشخیص سریع توکسین کلرا را در نمونه‌های بالینی و محیطی فراهم می‌کند.

۶ | ملاحظات اخلاقی و کد اخلاق

کد اخلاق مقاله به شرح زیر می‌باشد:
IR.IAU.TNB.REC.1400.114

۷ | تشکر و قدردانی

این مطالعه برگرفته از رساله تخصصی می‌باشد و بدین وسیله از همکار محترم جناب دکتر روح الله کاظمی صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

۸ | تعارض منافع

هیچگونه تعارض منافع بین نویسندگان وجود ندارد.

۹ | سهم نویسندگان

محبوبه حسینی فرد: طراحی آپتامر و آنالیزهای بیوانفورماتیکی، انجام آزمایش‌ها، جمع‌آوری و تحلیل داده‌ها و ویرایش نهایی مقاله.
غلامرضا اولاد: مشاوره پژوهش و ویرایش مقاله.
جعفر امانی: طراحی ایده پژوهش، نظارت علمی، طراحی آپتامر و آنالیزهای بیوانفورماتیکی و ویرایش نهایی مقاله.

تکنیک ایزا و رزونانس پلاسمون سطحی (SPR) جهت بررسی اتصال CtxB و آنتی‌بادی‌های مونوکلونال استفاده نمودند. اگرچه استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال از نظر اختصاصیت ارزش بالایی دارند اما از نظر هزینه و محدود بودن امکانات، استفاده از آنتی‌بادی پلی‌کلونال ارزشمند است. استفاده از دو گونه مختلف (موش و خرگوش) برای تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال می‌تواند منجر به تولید آنتی‌بادی‌هایی با طیف گسترده‌تر جهت شناسایی اپی‌توپ‌های مختلف بر روی مولکول CtxB شود و در نتیجه، حساسیت و کارایی تست ایزا را افزایش دهد. همچنین واکنش متقاطع آنتی‌بادی‌های تولیدشده با سایر سموم مرتبط StxB و LtB نیز در اختصاصیت این پژوهش مورد توجه است. در تحقیقی مشابه نیز نامور و همکارانش از آنتی‌بادی‌های خرگوشی و زرده تخم‌مرغ جهت شناسایی توکسین کلرا استفاده نمودند (۲۴). این گروه از روش ایزای ساندویچ جهت بررسی اختصاصیت و حساسیت آنتی‌بادی‌های استخراج شده استفاده نمودند و میزان حساسیت ایزا جهت شناسایی پروتئین نوترکیب را ۳۹ نانوگرم اعلام نمودند؛ اگرچه شباهت‌هایی بین پژوهش بیان‌شده و این مطالعه دیده می‌شود اما در تحقیق پیش‌رو، طراحی سیستم تشخیصی مبتنی بر CtxB نوترکیب، استفاده هم‌زمان از دو مدل حیوانی (موش و خرگوش) برای تولید آنتی‌بادی و توانایی تشخیص توکسین در غلظت بسیار پایین (۸ نانوگرم) است که اهمیت این پژوهش را در شناسایی زود هنگام عفونت برجسته می‌کند. از طرفی عدم تمایل آنتی‌بادی‌های تولیدشده با سایر سموم مشابه (StxB و LtB) بیانگر اختصاصی بودن آنتی‌بادی‌ها در شناسایی CtxB و اهمیت آن‌ها در کاربردهای تشخیصی و اجتناب از نتایج مثبت کاذب است؛ این امر می‌تواند نویدبخش توسعه کیت‌های تشخیصی مبتنی بر ایزا با قابلیت کاربرد بالینی و محیطی باشد.

۵ | نتیجه‌گیری

در نهایت این پژوهش، با ارائه آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال در مقابل CtxB جهت تشخیص سم وبا انجام شده است. آنتی‌بادی‌های تولیدشده در موش و خرگوش، روشی سریع،

| Extended Abstract

Cholera is a major waterborne infectious disease caused by *Vibrio cholerae*, a Gram-negative bacterium that produces cholera toxin (CT), the main virulence factor responsible for severe diarrhea and dehydration. Rapid and accurate detection of this toxin is crucial for disease diagnosis, outbreak monitoring, and public health interventions. Conventional culture-based and molecular diagnostic methods are often expensive, time-consuming, and require specialized laboratory facilities. Therefore, the development of a simple, sensitive, and cost-effective diagnostic method is highly desirable. This study aimed to develop an ELISA-based assay for cholera toxin detection using the recombinant cholera toxin B subunit (rCtxB) and specific polyclonal antibodies. The CtxB gene was expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) following induction with IPTG. Expression of the recombinant protein was confirmed by Western blot analysis. Purified rCtxB protein was used to immunize rabbits and mice via subcutaneous injections. Following immunization, serum samples were collected, and antibodies were purified. The sensitivity of the generated antibodies was evaluated using sandwich ELISA, while their specificity was assessed by indirect ELISA against structurally related toxins, including heat-labile enterotoxin B subunit (LtB) and Shiga toxin B subunit (StxB). The purified antibodies obtained from rabbits and mice demonstrated strong and specific reactivity toward CtxB. ELISA results confirmed successful recognition of cholera toxin with high sensitivity. The developed assay was able to detect as little as 8 ng of toxin. In addition, minimal cross-reactivity was observed with LtB and StxB, indicating excellent specificity. These findings demonstrate the effectiveness of the produced antibodies for cholera toxin detection. The developed ELISA method provides a rapid, sensitive, accurate, and affordable approach for detecting cholera toxin. Compared with conventional microbiological and advanced molecular methods, this assay offers significant advantages in terms of simplicity, low cost, and ease of implementation. The method does not require sophisticated laboratory equipment and can be effectively applied for the detection of *Vibrio cholerae* toxin in clinical and environmental samples, supporting cholera surveillance and outbreak control programs.

| Keywords

Diarrhea, *Vibrio Cholerae*, Toxin B Subunit, Sandwich ELISA, Indirect ELISA

1. Ganesan D, Gupta SS, Legros D. Cholera surveillance and estimation of burden of cholera. *Vaccine*. 2020;38:A13-A7.
2. Sanchez J, Holmgren J. Cholera toxin structure, gene regulation and pathophysiological and immunological aspects. *Cellular and molecular life sciences*. 2008;65:1347-60.
3. Gautman P, Gupta P, Sharma P, Dangwal P. Virtuous aspects of vicious bacterial toxins. *J Chem Pharm Res*. 2015;8:279-89.
4. Berkmen M. Production of disulfide-bonded proteins in *Escherichia coli*. *Protein expression and purification*. 2012;82(1):240-51.
5. Tamaki Y, Harakuni T, Yamaguchi R, Miyata T, Arakawa T. Cholera toxin B subunit pentamer reassembled from *Escherichia coli* inclusion bodies for use in vaccination. *Vaccine*. 2016;34(10):1268-74.
6. Cecchini F, Fajs L, Cosnier S, Marks RS. *Vibrio cholerae* detection: Traditional assays, novel diagnostic techniques and biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2016;79:199-209.
7. Dick MH, Guillermin M, Moussy F, Chagnat C-L. Review of two decades of cholera diagnostics—how far have we really come? *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(10):e1845.
8. Li J, Zhu Y, Wu X, Hoffmann MR. Rapid detection methods for bacterial pathogens in ambient waters at the point of sample collection: a brief review. *Clinical Infectious Diseases*. 2020;71(Supplement_2):S84-S90.
9. Ramamurthy T, Das B, Chakraborty S, Mukhopadhyay AK, Sack DA. Diagnostic techniques for rapid detection of *Vibrio cholerae* O1/O139. *Vaccine*. 2020;38:A73-A82.
10. Kazemi R, Akhavian A, Amani J, Salimian J, Motamedi M-J, Mousavi A, et al. Immunogenic properties of trivalent recombinant protein composed of B-subunits of LT, STX-2, and CT toxins. *Microbes and Infection*. 2016;18(6):421-9.
11. de Mattos Arêas AP, de Oliveira MLS, Ramos CRR, Sbrogio-Almeida ME, Raw Ia, Ho PL. Synthesis of cholera toxin B subunit gene: cloning and expression of a functional 6XHis-tagged protein in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*. 2002;25(3):481-7.
12. Huy N-X, Yang M-S, Kim T-G. Expression of a cholera toxin B subunit-neutralizing epitope of the porcine epidemic diarrhea virus fusion gene in transgenic lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Molecular biotechnology*. 2011;48:201-9.
13. Lebens M, Johansson S, Osek J, Lindblad M, Holmgren J. Large-scale production of *Vibrio cholerae* toxin B subunit for use in oral vaccines. *Bio/Technology*. 1993;11(12):1574-8.
14. Zhao Y, Xu B, Zhu B, Liu X, Yan D, Zhang Q. B subunit of cholera toxin fused with VP7 from GCRV (grass carp reovirus) was expressed in *E. coli* and folds into an active protein. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020;151:814-20.
15. Marandi BHG, Zolfaghari MR, Kazemi R, Motamedi MJ, Amani J. Immunization against *Vibrio cholerae*, ETEC, and EHEC with chitosan nanoparticle containing LSC chimeric protein. *Microbial pathogenesis*. 2019;134:103600.
16. Rosadini CV, Kagan JC. Early innate immune responses to bacterial LPS. *Current opinion in immunology*. 2017;44:14-9.
17. Sanchez J, Holmgren J. Recombinant system for overexpression of cholera toxin B subunit in *Vibrio cholerae* as a basis for vaccine development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1989;86(2):481-5.
18. Sayeed A, Amin J, Islam K, Hossain M, Sultana N, Akter NJ, et al., editors. development of a new dipstick for rapid detection of *vibrio cholerae* o1 in acute watery diarrheal stools. *american journal of tropical medicine and hygiene*; 2017: amer soc trop med & hygiene 8000 westpark dr, ste 130, mclean, va 22101 usa.
19. Lebens M, Shahabi V, Bäckström M, Houze T, Lindblad N, Holmgren J. Synthesis of hybrid molecules between heat-labile enterotoxin and cholera toxin B subunits: potential for use in a broad-spectrum vaccine. *Infection and immunity*. 1996;64(6):2144-50.
20. Sánchez J, Holmgren J. Virulence factors, pathogenesis and vaccine protection in cholera and ETEC diarrhea. *Current opinion in immunology*. 2005;17(4):388-98.
21. Sandvig K, Van Deurs B. Transport of protein toxins into cells: pathways used by ricin, cholera toxin and Shiga toxin. *FEBS letters*. 2002;529(1):49-53.
22. Chaicumpa W, Srimanote P, Sakolvaree Y, Kalampaheti T, Chongsa-Nguan M, Tapchaisri

- P, et al. Rapid diagnosis of cholera caused by *Vibrio cholerae* O139. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998;36(12):3595-600.
23. Verjan Garcia N, Santisteban Celis IC, Dent M, Matoba N. Characterization and utility of two monoclonal antibodies to cholera toxin B subunit. *Scientific Reports*. 2023;13(1):4305.
24. Namvar Vansofla A, Nazarian S, Sadeghi D, Minae ME, Hajizade A. Development of an IgG/IgY Sandwich-ELISA for the Detection of Cholera Toxin Subunit B. *Journal of Applied Biotechnology Reports*. 2021;8(4):421-7.