New Cellular and Molecular Biotechnology Journal
ISSN : 2228-6926

NCMBJ | VOLUME 16 | ISSUE 62 | MAY 2026 |

ORIGINAL ARTICLE |

Identification of B subunit of Cholera Toxin Using ELISA Technique |

Mahboobeh Hassanifard[1], Gholamreza Olad[2], 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 | 13/04/2025 | Revised | 11/05/2025 | Accepted |22/06/2025

| 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 |

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-10-19]

فصلنامهٔ تازه‌های بیوتکنولوژی سلولی‌ومولکولی | دورهٔ ۱۶ | شمارهٔ ۶۲ | بهار ۱۴۰۵|

New Cellular and Molecular Biotechnology Journal
ISSN : 2228-6926

مقالهٔ اصیل پژوهشی |

شناسایی زیرواحد B توکسین کلرا با استفاده از تکنیک اِلایزا|

محبوبه حسنی فرد[۱]، غلامرضا اولاد[۲]، جعفر امانی[۳*]

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

۲- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژیِ کاربردی، پژوهشکدهٔ فناوری‌های نوین سلامت، دانشگاه علوم‌پزشکی بقیةالله (عج)، تهران، ایران

۳- مرکز تحقیقات میکروبیولوژیِ کاربردی، پژوهشکدهٔ فناوری‌های زیست‌پزشکی، دانشگاه علوم‌پزشکی بقیةالله (عج)، تهران، ایران

*نویسندهٔ مسئول: دکتر جعفر امانی، مرکز تحقیقات میکروبیولوژیِ کاربردی، پژوهشکدهٔ فناوری‌های زیست‌پزشکی، دانشگاه علوم‌پزشکی بقیةالله (عج)، میدان ونک، خیابان ملاصدرا؛ پست الکترونیکی: jafar.amani@gmail.com

|تاریخ دریافت | ۱۴۰۴/۰۱/۲۴ | تاریخ ویرایش | ۱۴۰۴/۰۲/۲۱ | تاریخ پذیرش| ۱۴۰۴/۰۴/۰۱

|چکیــده |

زمینه و هدف: *ویبریو کلرا* (*Vibrio cholerae*) باکتریِ گرم‌منفی عاملِ بیماریِ وباست که از طریقِ تولیدِ توکسینِ کلرا باعث اسهالِ شدید و کم‌آبی می‌شود. تشخیصِ سریع و دقیقِ این توکسین برای کنترلِ بیماری ضروری است. این مطالعه با تولیدِ آنتی‌بادی‌های اختصاصی از موش و خرگوش، روشی سریع، دقیق و مقرون‌به‌صرفه برای تشخیص *ویبریو کلرا* با استفاده از تکنیک اِلایزا ارائه می‌دهد.

مواد و روش‌ها: ژن نوترکیب *CtxB* با استفاده از IPTG در *E.coli* BL21 (DE3) بیان و با وسترن‌بلات تأیید شد. پروتئینِ rCtxB خالص‌شده به‌صورت زیرجلدی به خرگوش و موش تزریق شد. آنتی‌بادی‌ها جدا و تخلیص شدند، سپس حساسیتِ آنتی‌بادیِ خالص‌شده با تکنیک اِلایزای ساندویچ و ارزیابیِ اختصاصیتِ آن، با تکنیک اِلایزای غیرمستقیم با استفاده از توکسین‌های مشابه انجام شد.

نتایج: در این مطالعه، آنتی‌بادی‌های استخراج و تخلیص‌شده از سرمِ موش و خرگوش در تکنیک اِلایزا مورداستفاده قرار گرفتند. نتایجِ جذبِ نوری نشان داد که آنتی‌بادی‌های تولیدشده قادر به شناساییِ اختصاصیِ توکسینِ CtxB هستند. میزان حساسیتِ بالای این روش (شناساییِ میزانِ ۸ نانوگرمِ توکسین) و حداقل واکنشِ متقاطع با توکسین‌های مشابه StxB و LtB، بیانگر اختصاصیتِ مناسبِ آنتی‌بادی‌ها می‌باشد.

نتیجه‌گیری: تکنیک اِلایزا مبتنی‌بر پروتئین و آنتی‌بادی روشی سریع، دقیق و مقرون‌به‌صرفه برای شناساییِ *ویبریو کلرا* نسبت به روش‌های کشتِ میکروبی یا مولکولیِ پیشرفته محسوب می‌شود. این روش با حساسیتِ بالا، اختصاصیتِ مناسب و عدم‌نیاز به تجهیزاتِ پیشرفتهٔ آزمایشگاهی، امکانِ تشخیصِ سریعِ توکسینِ کلرا را در نمونه‌های بالینی و محیطی فراهم می‌کند.

|واژگان کلیدی|

اسهال|
زیرواحدِ B*ویبریو کلرای* توکسین|
اِلایزای ساندویچ|
اِلایزای غیرمستقیم|

|علوم Iau |

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-10-19]

۱ | مقدمه

وبا، یک بیماریِ اسهالیِ حاد است که در اثر مصرفِ غذا یا آبِ آلوده ایجاد می‌شود. *ویبریو کلرا* پاتوژنِ اصلی، مسئولِ اسهال که غالباً کشورهای جهانِ سوم را تهدید می‌کند، جز باکتری‌های گرم‌منفی از خانوادهٔ *ویبریوناسه* است. در مناطقی که از نظرِ بهداشتی ضعیف هستند، افرادِ ناقل باعث شیوع همه‌گیریِ وبا می‌شوند. توکسینِ کلرا هتروژن بوده و دارای یک زیرواحد ۲۸ و چند زیرواحد ۱۰ کیلودالتونی است. زیرواحدهای کوچک در اتصال به گانگلیوزیدهای GM1 روده نقش دارند درحالی‌که زیرواحدِ بزرگ در ایجادِ عوارضِ توکسین نقش دارد. دو بخشِ زیرواحدِ بزرگ (CtxA1 و CtxA2) با پیوندِ دی‌سولفید به‌هم متصل شده‌اند و زیرواحدهای کوچکتر (CtxB) توسط پیوندهای هیدروژنی کنارهم قرار گرفته‌اند. سمِ وبا، به‌ویژه زیرواحدِ B آن (CtxB)، با تسهیلِ ورودِ سم به سلول‌های میزبان از طریقِ اتصال به گانگلیوزیدهای GM1، نقشِ مهمی در پاتوژنزِ بیماری ایفا می‌کند. پس از ترشحِ توکسین توسط باکتری، فعالیتِ توکسین آغاز می‌شود. توکسین از طریقِ زیرواحدِ B به گیرنده‌های رودهٔ کوچک متصل می‌شود و باعثِ انتقالِ زیرواحدِ A به درونِ سیتوزول می‌شود. پس از ورودِ زیرواحدِ A به سیتوپلاسم، به‌دلیلِ خاصیتِ ADP-ریبوزیل ترانسفری، باعث ADP ریبوزیله‌شدنِ پروتئینِ G می‌شود، این امر باعثِ افزایشِ آدنیلاتِ سیکلاز می‌شود که در نهایت افزایشِ cAMP و خروجِ یون‌ها و متعاقباً دفعِ آب، الکترولیت و ایجادِ اسهال را سبب می‌شود (۴-۱).

وبا، با اسهالِ آبکیِ شدید و کم‌آبیِ سریعِ بدن مشخص می‌شود که درصورت عدم‌درمان می‌تواند طی ۱۲ تا ۲۴ ساعت منجر به مرگ شود و درمانِ آن بر پایهٔ جبرانِ آب و الکترولیت، مایعات وریدی و آنتی‌بیوتیک است (۲ و ۵).

تشخیصِ وبا نقشِ اساسی در مدیریتِ بیماریِ وبا دارد یعنی ضرورت یک آزمایشِ تشخیصیِ سریع و خاص که بیماری را آسان تشخیص دهد وجود دارد که این امر باعثِ کاهشِ هزینه‌های درمان و همچنین مرگ‌ومیر خواهد شد.

براساسِ سازمانِ جهانیِ بهداشت (WHO) درصورتِ گزارشِ ۱۰ مورد تستِ مثبت، اهمیتِ نظارت از نظرِ اپیدمی ضروری می‌باشد. تمام این موارد نشان‌دهندهٔ این است که هنوز در کشورهای درحال توسعه، وبا یک بلایِ بومی است (۶).

برای شناساییِ *ویبریو کلرا*، روش‌های مختلفی وجود دارد که شاملِ کشتِ میکروبیِ نمونه‌های بالینی روی محیط‌های انتخابی، تأیید کلنی‌ها با آزمایش‌های بیوشیمیایی و سرولوژیکی، استفاده از میکروسکوپِ زمینهٔ تاریک، روش‌های مولکولی مانند PCR و Real-Time PCR، توالی‌یابیِ نسلِ جدید (NGS) برای بررسیِ تغییرهای ژنتیکیِ سویه‌ها، همچنین روش‌های نوین (مانند بیوسنسورها که حساسیّتِ بالایی دارند امّا هزینه‌بَر هستند) و تست‌های تشخیصیِ سریعِ مبتنی‌بر آنتی‌بادیِ مونوکلونال یا آپتامر مورداستفاده قرار می‌گیرند. هرکدام از این روش‌ها مزایا و محدودیت‌های خاص خود را دارند، روش‌هایی مانند کشت زمان‌بَر، همچنین روش‌های مولکولی و نوین نیازمندِ تجهیزاتِ پیشرفته و هزینهٔ بالا هستند؛ بنابراین، تست‌های سریع و مقرون‌به‌صرفه مانند اِلایزا به‌دلیلِ سادگی، سرعت و تکرارپذیری به‌ویژه در مناطقِ با امکاناتِ محدود، از اهمیتِ ویژه‌ای برخوردار هستند (۹-۶).

با وجودِ روش‌های متنوع، تشخیصِ *ویبریو کلرا*، اغلب آن‌ها نیازمندِ تجهیزاتِ گران‌قیمت، زمان‌بَر و تخصصِ فنّیِ بالا هستند که در کشورهای درحال توسعه محدودیت ایجاد می‌کند. در مطالعهٔ پیشِ رو، طراحیِ سیستمِ تشخیصیِ مبتنی‌بر CtxB نوترکیب، استفادهٔ همزمان از دو مدلِ حیوانی (موش و خرگوش) برای تولیدِ آنتی‌بادی، توانایی تشخیصِ توکسین در غلظتِ بسیار پایین و کاهشِ واکنشِ متقاطع با توکسین‌های مشابه (StxB و LtB) و با استفاده از روش اِلایزای غیرمستقیم، راه‌کاری ساده، سریع و اقتصادی برای تشخیصِ توکسین ارائه کرده که می‌تواند در مناطقِ محروم و با امکاناتِ محدود در شناساییِ زودهنگامِ عفونت کاربردِ گسترده داشته باشد.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-10-19]

۲| مواد و روش‌ها

۲-۱| مواد

باکتری *E. coli* BL21 (DE3) و *E. coli* DH5a (حاویِ پلاسمیدِ pET28a-ctxb) خریداری‌شده از مرکزِ ملّیِ بیوتکنولوژی و مهندسیِ ژنتیکِ ایران، تهران. HRP-conjugated streptavidin (سیگما، آمریکا). کیت اِلایزا (eBioscience، آمریکا).

۲-۲| بیانِ پروتئینِ نوترکیبِ CtxB

۲-۲-۱| استخراجِ پلاسمیدِ pET28a-ctxb از باکتریِ *E. coli* DH5a

باکتریِ *E. coli* DH5a حاویِ پلاسمیدِ pET28a-ctxb مورداستفاده قرار گرفت. جهتِ جداسازیِ پلاسمید pET28a-ctxb از روش دستی استفاده شد، پلاسمیدِ استخراج‌شده بر روی ژل آگارز ۱ درصد بُرده و الکتروفورز انجام شد (۱۰). جهتِ ادامهٔ کار، تأییدِ سازه از نظرِ صحّتِ ژنِ *CTXB* و همچنین قرارگیریِ ژن در جایگاهِ صحیح در وکتور باید انجام می‌شد. به این منظور دو واکنشِ PCR انجام شد، یک واکنش با پرایمرهای عمومیِ T7 و واکنشِ دیگر با پرایمرهای دو سرِ ژنِ *CTXB*. واکنش‌ها با حجمِ نهاییِ ۲۵ میکرولیتر با ۲ میکرولیتر از پلاسمید استخراج‌شده و ۵/۵ میکرولیتر مسترمیکس با پرایمرهای فوروارد و ریورسِ متفاوت (در واکنشِ اول پرایمرهای T7 و در واکنشِ دوم پرایمرهای ژن *CTXB*) و برنامهٔ دستگاهِ ترموسایکلر ۹۵ درجه به‌مدت ۵ دقیقه با ۳۰ چرخه با دمای ۷۲ و زمانِ نگهدارنده ۵ دقیقه با دمای ۷۲ درجه ادامه یافت.

۲-۲-۲| انتقالِ پلاسمیدِ pET28a-ctxb به سویهٔ بیانیِ *E. coli* BL21(DE3)

جهتِ انتقالِ ناقلِ نوترکیب به درونِ باکتریِ مستعد از روشِ شوکِ حرارتی استفاده شد که روشِ کار به این‌صورت انجام شد: ابتدا باکتریِ مستعدشده از فریزر خارج و بر روی یخ قرار داده شد تا به‌آرامی ذوب شود. حدود ۱۰ نانوگرم از ناقلِ نوترکیب به لولهٔ حاویِ سلول‌های مستعد اضافه شد و به‌مدتِ ۳۰ دقیقه بر روی یخ قرار داده شد. لولهٔ بیان‌شده به‌مدتِ ۵ دقیقه در حمامِ آبِ گرم در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد و مجدداً ۵ دقیقه بر روی یخ قرار گرفت. یک میلی‌لیتر محیط‌کشتِ LB مایع، به لوله اضافه شد و به‌مدت ۱ ساعت در شیکرِ انکوباتور با دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد. باکتری‌ها از نظرِ آلودگی و کارایی بررسی شدند (۱۱ و ۱۲).

۲-۲-۳| بیانِ پروتئین

برای انجامِ بیان، *E. coli* BL21(DE3) حاویِ pET28a-ctxb با ۰/۵ میلی‌مولار ایزوپروپیل-1-d-تیوگالاکتوپیرانوسید (IPTG) القا شد و خالص‌سازی طبقِ دستورالعمل‌های سازنده انجام شد. به‌طور خلاصه *E. coli* BL21(DE3) در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد در محیطِ LB (با ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کانامایسین) کشت داده شد. هنگامی‌که ۰/۷ OD = 600 nm شد، IPTG به‌میزان ۱ میلی‌مول برای القای تولیدِ پروتئین اضافه شد و در انکوباتورِ ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد با دورِ ۱۵۰ به‌مدت ۴ ساعت قرار داده شد. پس از گذشتِ ۴ ساعت باکتری‌ها سانتریفوژ شدند (۱۰ و ۱۲).

۲-۳| تخلیصِ پروتئینِ نوترکیبِ CtxB

خالص‌سازیِ پروتئینِ نوترکیبِ CtxB با برچسبِ His×۶ با استفاده از کروماتوگرافیِ میلِ ترکیبی در شرایطِ دناتوراسیون با ستونِ Ni-NTA (QIAGENE، ایالات متحدهٔ آمریکا) انجام شد، برای این منظور ۵۰ میلی‌لیتر باکتریِ *E. coli* BL21(DE3) حاویِ pET28a-ctxb القاشده توسطِ IPTG به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. محلولِ باکتری در ۶ میلی‌لیتر بافرِ لیز (NaH2PO4 ۵۰ میلی‌مولار با pH = 8.0، NaCl ۳۰۰ میلی‌مولار، ایمیدازول ۱۰ میلی‌مولار، لیزوزیم ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به‌مدت ۳۰ دقیقه معلّق شد. پس از سانتریفوژ در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدتِ ۲۰ دقیقه، مایعِ رویی جمع‌آوری و پس از بررسی بر روی ژلِ پلی‌آکریل‌آمید ۱۴ درصد مابقیِ سوپرناتانت بر روی ستون Ni-NTA(Thermo Fisher Scientific) بارگذاری شد. ستون با بافر شست‌وشو (۳۰ میلی‌مولار ایمیدازول حاویِ ۵ درصد گلیسرول) داده شد. در نهایت با ۲ میلی‌لیتر بافر استخراج (۳۰۰ میکرومتر ایمیدازول حاویِ ۵ درصد گلیسرول) شسته شد. نمونه‌ها توسط روی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۱۴ درصد آنالیز و غلظتِ پروتئینِ خالص‌شده با روشِ برادفورد تعیین و در دمای ۲۰- درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۰ و ۱۳).

۲-۴| آزمایش وسترن‌بلات

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-10-19]

پروتئین‌های خالص‌شده از ژل پلی‌آکریل‌آمید (PAGE) با استفاده از بافرِ انتقال (۳۹ میلی‌مولار گلیسین، ۴۸ میلی‌مولار Tris-base، ۰/۰۳۷ درصد SDS و ۲۰ درصد متانول) روی یک غشای PVDF[1] منتقل شدند. غشای PVDF به ابعادِ ژل بریده و روی ژل قرار داده شد. سپس ساندویچِ حاصل، در داخلِ تانکِ حاویِ بافرِ بلاتینگ قرار داده شد و انتقال به‌مدتِ ۱۲۰ دقیقه با ولتاژِ ۱۰۰ انجام شد. پس از انتقال، کاغذِ PVDF به‌مدت ۲ ساعت، در داخلِ بافرِ بلاکینگ (۵ درصد Skim milk) شناور شد. سپس با بافرِ PBST (بافرِ PBS به‌اضافهٔ توئین ۰/۰۵ درصد) شست‌وشو داده شد. پس از بلاک کردنِ غشا، آنتی‌بادی‌ها با رقّت مناسب در داخلِ بافرِ PBST تهیه و روی کاغذِ نیتروسلولز ریخته شدند. ابتدا آنتی‌بادیِ اولیه که آنتی‌بادیِ موشی ضد CT[2] (خریداری‌شده از شرکت سیگما -آمریکا) با رقّت ۱:۲۰۰۰ افزوده شد و پس از شست‌وشو آنتی‌بادیِ ثانویه متصل به آنزیم پراُکسیداز (Secondary Antibody HRP-Conjugated) با رقّت ۱:۲۰۰۰۰ استفاده شد. سپس غشا به‌مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد روی دستگاه لرزاننده قرار گرفت و سپس سه بار با بافرِ PBST و هربار به‌مدت ۱۰ دقیقه شست‌وشو داده شد. قرص سوبسترای DAB در ۲۰ میلی‌لیتر محلول PBS (1X) به‌طور کامل حل و پس از افزودنِ ۴۰ میکرولیتر H_2O_2 روی کاغذ PVDF ریخته شد. پس از ظهورِ باندها، واکنش توسطِ آب مقطر مهار شد (۱۱ و ۱۴).

۲-۵| تولید آنتی‌بادی در حیوان

در این مطالعه موش‌های BALB/c (با سنِ ۶-۸ هفته تهیه‌شده از انستیتو پاستور تهران-ایران) موردآزمایش قرار گرفتند. موش‌ها به دو گروهِ ۵تایی (گروهِ آزمایش و گروهِ کنترل) تقسیم شدند. هر گروه شامل ۵ موش در گروهِ آزمایش، ۲۰ میکروگرم CtxB نوترکیب به‌صورت زیرجلدی در سه نوبت صفر، ۱۴ و ۲۸ روز با اَدجوانت کامل و ناقص به موش‌ها تزریق شد. به گروهِ کنترلِ PBS تزریق شد. همچنین ۲۰۰ میکروگرم پروتئینِ نوترکیبِ CtxB با اَدجوانتِ کامل و ناقص فروند در سه مرحله به خرگوش نیوزیلندی تزریق شد.

نمونه‌گیریِ خون دوبار و دو هفته پس از تزریقِ سوم و چهارم انجام شد. برای جداسازیِ سرم، نمونه‌ها با سرعتِ ۱۵۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند (۱۷-۱۵).

۲-۶| تیتراسیونِ آنتی بادی با کمک اِلایزای غیرمستقیم

پاسخ آنتی‌ژن-آنتی‌بادیِ اختصاصی با روش اِلایزا تعیین شد. میزان ۱ میکروگرم آنتی‌ژن، در ۱۰۰ میکرولیتر بافرِ پوشاننده (بافر کربنات-بی‌کربنات سدیم ۰/۰۵ مولار، pH =۹/۶) حل و در هر چاهک از میکروپلیت ریخته شد و سپس در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد یک شبانه‌روز نگهداری شد. به‌دنبالِ شست‌وشو و مسدودکردن با محلولِ مسدودکنندهٔ بافر PBST (بافر PBS به‌اضافهٔ توئین ۲۰ با غلظت ۰/۰۵ درصد) حاویِ ۵ درصد Skim milk به‌مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد، ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادیِ موش و ضد خرگوش استخراج شده (با رقّت‌های سریالی از ۱:۵۰ تا ۱:۴۰۰۰۰۰ رقیق‌شده در PBST) به هر چاهک افزوده و به‌مدت ۱ ساعت درون انکوباتور قرار گرفت. به‌دنبالِ شست‌وشو، به هر چاهکِ آنتی‌بادی‌های ضد موش و خرگوش با برچسب HRP با رقّت ۱:۲۰۰۰ در PBST اضافه شد. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه شدند و سه بار با PBST شسته شدند. پس از توقف آزمایش با اسیدسولفوریک ۲/۵ مولار، جذبِ نمونه در طول‌موج ۴۹۲ نانومتر توسط میکروپلیت‌خوانِ ELISA ثبت شد (۲۴). تمام ELISA حداقل سه بار برای تأیید انجام شد.

۲-۷| تخلیصِ آنتی‌بادی با استفاده از ستونِ G

برای خالص‌سازیِ آنتی‌بادیِ IgG از ستونِ پروتئینِ 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 بافرِ 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). آنتی‌بادیِ خالص‌شده توسط ژل پلی‌آکریل‌آمید ۱۴ درصد تأیید شد.

۲-۸| بررسی حساسیت آنتی‌بادی

[1] Polyvinylidene Fluoride or Polyvinylidene Difluoride

[2] Cholera Toxin

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-10-19]

جهتِ ارزیابیِ میزانِ حساسیتِ آنتی‌بادی، از روش اِلایزای ساندویچ طبق مراحل شرح داده‌شده (۶-۲) استفاده شد. برای این منظور میزان ۱ میکروگرم آنتی‌بادیِ خرگوشی به‌همراهِ بافرِ پوشاننده در کفِ چاهک قرار داده شد. همچنین از رقّت‌های مختلف توکسین (۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ... نانوگرم) و ۱ میکروگرم آنتی‌بادیِ موشی به‌عنوان شناساگر استفاده گردید. سایر مراحل طبقِ ۱-۶ انجام و جذبِ نمونه در طول‌موج ۴۹۲ نانومتر توسط میکروپلیت‌خوانِ ELISA ثبت شد. همچنین آزمایش سه‌بار جهتِ تأیید انجام شد.

۲-۹| بررسیِ اختصاصیتِ آنتی‌بادیِ تولیدشده

برای ارزیابیِ واکنشِ متقاطع، ELISA غیرمستقیم با کمک توکسین‌های مشابه StxB و LtB انجام شد. آزمایش طبقِ مرحلهٔ قبل (۶-۲) انجام شد و فقط در مرحلهٔ نخست از توکسین‌های CtxB، StxB و LtB جهتِ پوشاندنِ کفِ چاهک‌های اِلایزا استفاده شد.

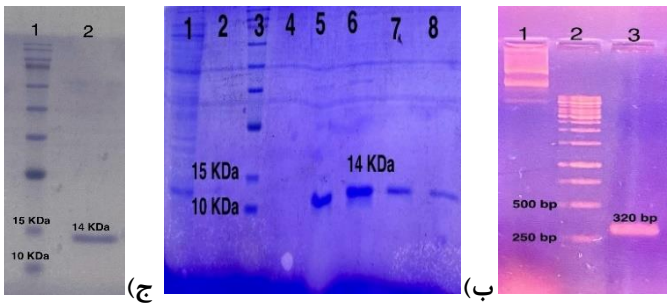
۲-۸| آنالیز آماری

داده‌های مربوط به هر آزمایش در سه تکرارِ مستقل انجام شد و به‌صورتِ میانگین ± انحراف‌معیار (SD) نشان داده شدند. تجزیه‌وتحلیلِ داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارِ SPSS نسخهٔ ۱۲/۰ انجام شد. مقایسه‌های چندگروهی با استفاده از آزمونِ Two-way ANOVA انجام شد. سطحِ معناداریِ $p < ۰/۰۵$ درنظر گرفته شد.

۳| نتایج

۳-۱| بیان و تخلیصِ پروتئینِ نوترکیب و تأیید آن با کمک آزمایشِ وسترن‌بلات

جهتِ دستیابی به پروتئینِ CtxB باکتریِ *E. coli* DH5a حاویِ pET28a-ctxb مورداستفاده قرار گرفت. جداسازیِ پلاسمید انجام شد و بررسیِ آن بر روی ژلِ آگاروز نشان‌دهندهٔ تخلیصِ کاملِ آن بود. پلاسمیدِ جداشده با دو واکنشِ PCR مستقل ازنظر صحّتِ سازهٔ ژنی و همچنین قرارگیریِ سازه در موقعیّت صحیح، موردارزیابی قرار گرفت. طولِ ۳۲۰bp برای ژنِ ctxb و طولِ ۶۵۰bp برای ژنِ درونِ سازهٔ ژنی دیده شد. شکل ۱-الف (محصولاتِ ۶۵۰bp در شکل نشان داده نشده است) انتقالِ ناقلِ نوترکیب به درونِ باکتریِ مستعدشده به روشِ شوکِ حرارتی انجام شد. بررسیِ باکتری از نظرِ کارایی و عدم‌آلودگی انجام شد. بیان‌ژن با القای IPTG انجام شد و پروتئینِ نوترکیبِ CtxB با وزنِ مولکولیِ حدود ۱۴ کیلودالتون بر روی ژلِ پلی‌آکریل‌آمید ۱۴ درصد دیده شد. نتایجِ بهینه‌سازیِ بیان‌ژن نشان داد که بهترین بیان در ۴ ساعت پس از القا با IPTG انجام شد. پروتئینِ نوترکیبِ CtxB با استفاده از ستونِ Ni-NTA خالص‌سازی شد و بر روی ژلِ پلی‌آکریل‌آمید بُرده شد. شکلِ ۱-ب جهتِ تأییدِ بیانِ محصولِ پروتئینی از وسترن‌بلات استفاده شد (شکل ۱-ج).

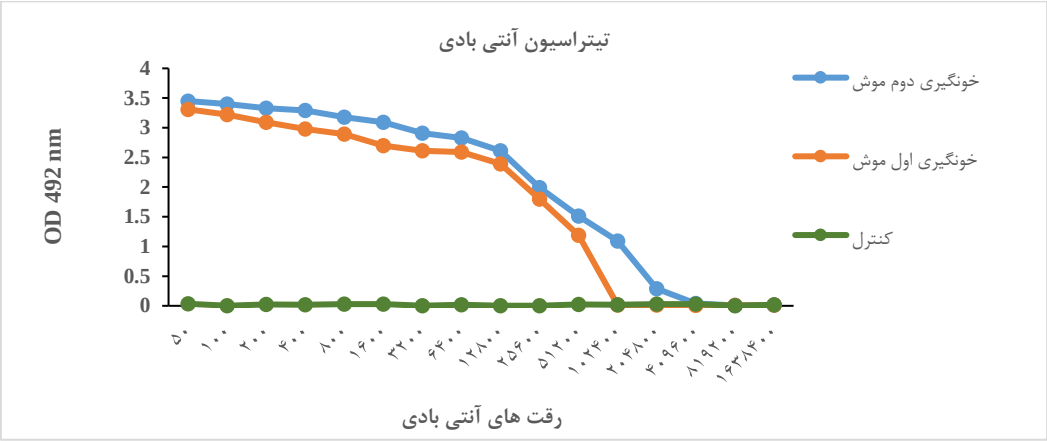


شکل ۱- بیانِ پروتئینِ نوترکیبِ CtxB و تأیید آن. شکلِ الف: جداسازیِ پلاسمید و تأییدِ وجودِ سازهٔ ژنی درونِ آن. چاهکِ ۱ تخلیصِ پلاسمید از باکتریِ *E. coli* DH5a. چاهکِ ۲ نشانگرِ DNA چاهکِ ۳ واکنشِ PCR با پرایمرهای دو طرفِ ژنِ *CTXB*. شکلِ ب: تخلیصِ پروتئین با استفاده از ستونِ G. چاهکِ ۳ نشانگرِ پروتئین و چاهک‌های ۵، ۶، ۷ و ۸ که در محدودهٔ ۱۴ کیلودالتون دارای باندِ پُررنگ است نشان‌دهندهٔ پروتئینِ نوترکیبِ CtxB است. شکلِ ج نیز آزمایشِ وسترن‌بلات و تأییدِ بیانِ پروتئینِ نوترکیبِ CtxB است.

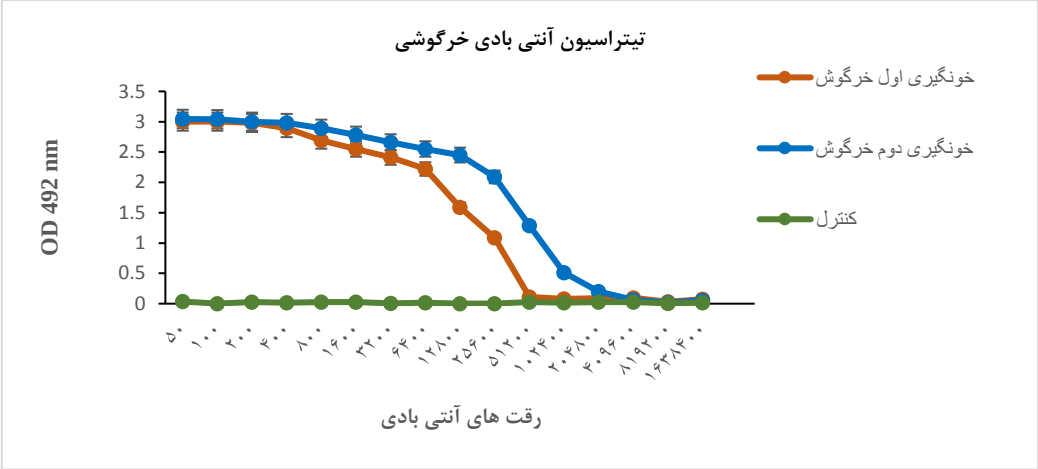
۳-۲|تیتراسیونِ آنتی‌بادی‌ها با کمک اِلایزا

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-10-19]

پس از خون‌گیری از موش و خرگوشِ ایمن‌شده، نتایج اِلایزا نشان داد که افزایشِ تیترِ آنتی‌بادی پس از هر مرحله از تزریق نسبت به شاهد، دارای افزایشِ معنی‌دار بود. خون‌گیری در دو مرحله انجام شد (شکل ۲).



الف)



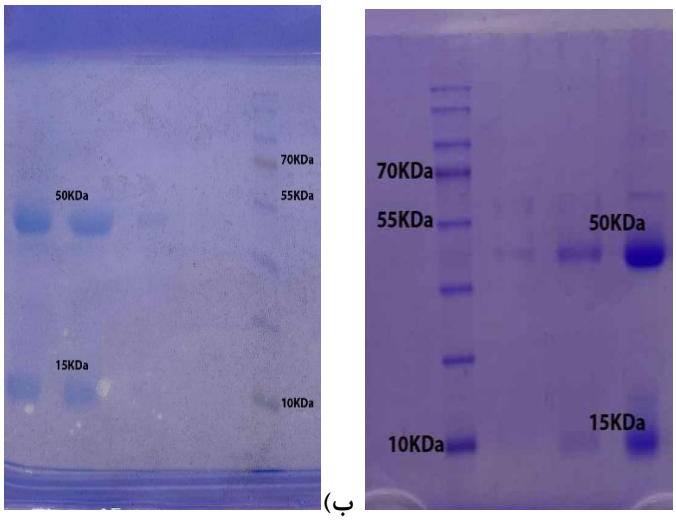
ب)

شکل ۲- تیتراسیونِ آنتی‌بادی‌های موشی و خرگوشی. شکلِ الف: واکنشِ توکسین با رقّت‌های متفاوتِ آنتی‌بادیِ 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 نمونه‌گیریِ دومِ موش (رنگِ آبی) میزانِ تولیدِ آنتی‌بادی بیشتر بوده است. شکلِ ب: واکنشِ توکسین با رقّت‌های متفاوتِ آنتی‌بادیِ 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 نمونه‌گیریِ دومِ خرگوش (رنگِ آبی) میزانِ تولیدِ آنتی‌بادی بیشتر بوده است.

۳-۳| تخلیصِ آنتی‌بادی‌های موشی و خرگوشی با کمکِ ستونِ G

از ستونِ پروتئینِ G برای خالص‌سازیِ آنتی‌بادیِ IgG استفاده شد. همان‌طورکه در شکلِ ۳ مشاهده می‌شود، آنتی‌بادیِ IgG دارای دو زنجیرهٔ سبک و دو زنجیرهٔ سنگین است که به دو باندِ ۵۰ و ۱۵ کیلودالتون شکسته شد.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-10-19]

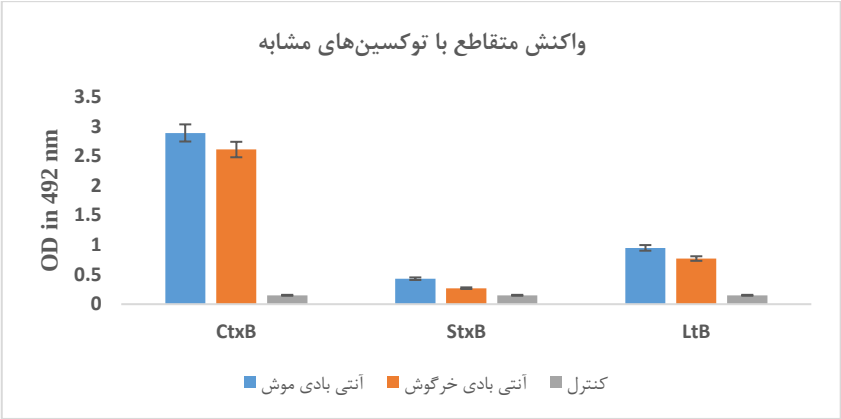


ب) الف)

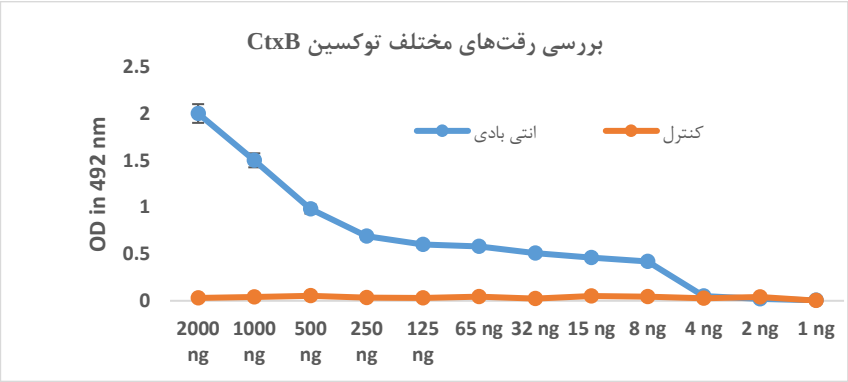
شکل۳- تخلیصِ آنتی‌بادی‌های موشی و خرگوشی با استفاده از ستونِ G. شکلِ الف تخلیصِ آنتی‌بادی‌های موشی است. شکلِ ب تخلیصِ آنتی‌بادیِ خرگوشی است. همان‌طوری‌که در شکل دیده می‌شود آنتی‌بادیِ IgG دارای دو زنجیرهٔ سبک و دو زنجیرهٔ سنگین است که به دو باندِ ۵۰ و ۱۵ کیلودالتون شکسته شد.

۳-۴| بررسیِ حساسیت و اختصاصیتِ آنتی‌بادیِ تولیدشده

میزان حساسیت اِلایزا جهتِ شناساییِ پروتئینِ نوترکیبِ CtxB ۸ نانوگرم ارزیابی شد. همچنین میزانِ تمایلِ آنتی‌بادی‌ها به توکسینِ CtxB بسیار بیشتر از سایر توکسین‌های مشابه دیده شد (شکل ۴).



الف)



ب)

شکل۴- بررسیِ حساسیت و اختصاصیتِ آنتی‌بادیِ تولیدشده. شکلِ الف: رقّت‌های مختلفِ توکسین (۸ تا ۲۰۰۰ نانوگرم) در سه تکرار مستقل ثبت شد. داده‌ها در SPSS نسخهٔ ۱۲ اجرا گردیدند. نتایج نشان دادند که تفاوتِ معنی‌داری بین غلظت‌های بالاتر از ۳۲ نانوگرم با

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-10-19]

غلظت‌های پایین‌تر وجود دارد (p <۰/۰۵). امّا بین ۸ و ۱۶ نانوگرم، تفاوتِ معنی‌داری مشاهده نشد. حدّ تشخیص (LOD) براساسِ میانگینِ جذبِ نوریِ بلانک به‌علاوه سه برابر انحراف‌معیارِ آن محاسبه شد و معادلِ ۸ نانوگرم تعیین گردید. شکلِ ب: بررسیِ اختصاصیتِ آنتی‌بادی‌ها، جذبِ نوریِ حاصل از واکنش با توکسین‌های CtxB، StxB و LtB در سه تکرارِ مستقل اندازه‌گیری شد و در SPSS مقایسهٔ میانگینِ جذبِ نوریِ سه گروه اجرا شد. نتایج نشان دادند که تفاوتِ معنی‌داری بین جذبِ نوریِ CtxB با دو توکسینِ دیگر وجود دارد (p <۰/۰۵). میزانِ واکنشِ متقاطع با استفاده از نسبتِ جذبِ نوریِ توکسین‌های مشابه با CtxB محاسبه شد که کمتر از ۲۰ درصد بود. این نتایج نشان‌دهندهٔ اختصاصیتِ بالای آنتی‌بادی‌های تولیدشده است.

۴| بحث

وبا، یک بیماریِ اسهالیِ حاد است که در اثر مصرفِ غذا یا آبِ آلوده ایجاد می‌شود. اتصال به سلولِ میزبان یک مرحلهٔ مهم و شروعِ بیماری‌زایی است. توکسینِ وبا، به‌ویژه زیرواحد B آن (CtxB)، با تسهیلِ ورودِ سم به سلول‌های میزبان از طریقِ اتصال به گانگلیوزیدهای GM1، نقشِ مهمی در پاتوژنزِ بیماری ایفا می‌کند. تشخیصِ دقیق و به‌موقعِ وبا برای درمان مؤثر و کنترلِ شیوعِ بیماری ضروری است. برای این منظور، ژنِ نوترکیبِ *CtxB* در باکتری *E. coli* BL21DE3 بیان شد و پروتئینِ خالص‌شدهٔ rCtxB به‌صورتِ زیرجلدی به موش و خرگوش تزریق شد. پس از اینکه حیوان‌های آزمایشگاهی با پروتئینِ CtxB ایمن شدند، برای بررسیِ پاسخِ ایمنیِ سیستمی و مخاطی، میزانِ آنتی‌بادیِ IgG سرم به کمکِ اِلایزای غیرمستقیم موردبررسی قرار گرفت. تیتراسیونِ آنتی‌بادی‌ها در دومین خون‌گیری افزایش نشان داده بودند که بیانگر تحریکِ بالای سیستم‌ایمنیِ حیوان بود. برای ارزیابیِ اختصاصیتِ آنتی‌بادی، واکنشِ متقاطعِ ELISA غیرمستقیم با کمکِ توکسین‌های StxB و LtB انجام شد. سم Lt توسط ETEC و سم Stx توسط EHEC ترشح می‌شود. زیرواحدِ B این توکسین‌ها به‌همراهِ توکسینِ *کلرا* نقش عمده‌ای در اتصالِ باکتری به روده و درنهایت بروز علائم اسهال دارند (۲، ۱۰، ۱۹-۲۱). توکسین‌های StxB و LtB به‌عنوانِ توکسین‌های مشابه با CtxB انتخاب شدند، زیرا این توکسین‌ها از نظرِ ساختاری و عملکردی شباهت‌هایی با زیرواحدِ B توکسینِ *کلرا* (CtxB) دارند و معمولاً در آزمایش‌های اختصاصیتِ آنتی‌بادی به‌کار می‌روند تا واکنشِ متقاطعِ احتمالیِ آنتی‌بادی‌ها با توکسین‌های مشابه بررسی شود. این انتخاب به‌منظورِ اطمینان از اختصاصیتِ آنتی‌بادی‌های تولیدشده درمقابلِ CtxB و کاهشِ احتمالِ واکنشِ غیراختصاصی صورت گرفته است (۷ و ۸). در مطالعهٔ حاضر، ارزیابیِ اختصاصیتِ آنتی‌بادی‌ها با استفاده از اِلایزای غیرمستقیم و توکسین‌های StxB و LtB انجام شد که نتایج نشان دادند آنتی‌بادی‌ها بیشترین واکنش را با CtxB داشته و حداقل واکنشِ متقاطع با توکسین‌های مشابه نشان دادند. آنتی‌بادی‌های جداشده از موش و خرگوش، پس از تخلیص با تکنیک اِلایزای ساندویچ و غیرمستقیم جهتِ بررسیِ حساسیت و اختصاصیت درمقابلِ CtxB موردارزیابی قرار گرفتند. همچنین آنتی‌بادی‌ها با توکسین‌های StxB و LtB نیز مورد سنجش قرار گرفتند که نتایجِ تمایلِ بالای آنتی‌بادی‌ها را به CtxB نشان دادند که این امر نمایانگرِ اختصاصیتِ ایمونوگلوبولینِ جداشده می‌باشد.

پژوهش‌های بسیاری درخصوصِ تشخیصِ باکتری با تکنیک اِلایزا صورت گرفته است. در تحقیقی Chaicumpa از روش اِلایزا جهت شناساییِ *ویبریو کلرا* استفاده نمودند (۲۲). این گروه نمونه‌های مدفوعِ بیمارانِ آلوده به باکتری را جهت جداسازیِ لیپوپلی‌ساکاریدِ دیوارهٔ باکتری موردبررسی قرار دادند. سپس با استفاده از لیپوپلی‌ساکارید و آنتی‌بادیِ مونوکلونال با کمکِ تکنیک اِلایزا باکتری را شناسایی کردند. آن‌ها از روش کشت سنّتی و اِلایزا استفاده نمودند و نشان دادند که استفاده از آنتی‌بادی و اِلایزا در تشخیصِ سریع و دقیقِ باکتری مؤثرتر از روش سنّتی است. اگرچه شباهت‌هایی بینِ کار این گروه و تحقیقِ پیشِ رو وجود دارد امّا استفاده از توکسینِ نوترکیب خطرِ انتقالِ بیماری را تا حد زیادی کاهش می‌دهد و همچنین تولیدِ توکسین در مقیاسِ بالا در محیطِ آزمایشگاه امکان‌پذیر می‌باشد. همچنین واکنشِ متقاطعِ آنتی‌بادی‌های تولیدشده با سایرِ سمومِ مرتبط StxB و LtB جهتِ اختصاصی بودنِ آنتی‌بادی‌ها در کاربردهای تشخیصی و اجتناب از نتایجِ مثبتِ کاذب بسیار مهم است. در تحقیقی دیگر ورجان گارسیا[1] و همکارانش جداسازیِ دو آنتی‌بادیِ مونوکلونال درمقابلِ Ctx را با استفاده از موش انجام دادند (۲۳). این گروه CtxB را عاملِ مهمی در شناسایی و تحریکِ سیستم‌ایمنی معرفی کردند که می‌تواند در تهیهٔ واکسن و همچنین شناساییِ باکتری موردتوجه قرار بگیرد. آن‌ها از

[1] Verjan Garcia

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-10-19]

تکنیک اِلایزا و رزونانسِ پلاسمونِ سطحی (SPR) جهتِ بررسیِ اتصالِ CtxB و آنتی‌بادی‌های مونوکلونال استفاده نمودند. اگرچه استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال از نظرِ اختصاصیت ارزشِ بالایی دارند امّا از نظر هزینه و محدود بودنِ امکانات، استفاده از آنتی‌بادیِ پلی‌کلونال ارزشمند است. استفاده از دو گونهٔ مختلف (موش و خرگوش) برای تولیدِ آنتی‌بادیِ پلی‌کلونال می‌تواند منجر به تولیدِ آنتی‌بادی‌هایی با طیفِ گسترده‌تر جهت شناساییِ اپی‌توپ‌های مختلف بر روی مولکولِ CtxB شود و در نتیجه، حساسیّت و کاراییِ تست اِلایزا را افزایش دهد. همچنین واکنشِ متقاطعِ آنتی‌بادی‌های تولیدشده با سایرِ سمومِ مرتبط StxB و LtB نیز در اختصاصیّتِ این پژوهش موردتوجه است. در تحقیقی مشابه نیز نامور و همکارانش از آنتی‌بادی‌های خرگوشی و زردهٔ تخم‌مرغ جهتِ شناساییِ توکسینِ *کلرا* استفاده نمودند (۲۴). این گروه از روش اِلایزای ساندویچ جهت بررسیِ اختصاصیت و حساسیتِ آنتی‌بادی‌های استخراج‌شده استفاده نمودند و میزانِ حساسیت اِلایزا جهتِ شناساییِ پروتئینِ نوترکیب را ۳۹ نانوگرم اعلام نمودند؛ اگرچه شباهت‌هایی بین پژوهش بیان‌شده و این مطالعه دیده می‌شود امّا در تحقیقِ پیشِ رو، طراحیِ سیستمِ تشخیصیِ مبتنی‌بر CtxB نوترکیب، استفادهٔ هم‌زمان از دو مدلِ حیوانی (موش و خرگوش) برای تولیدِ آنتی‌بادی و تواناییِ تشخیصِ توکسین در غلظتِ بسیار پایین (۸ نانوگرم) است که اهمیت این پژوهش را در شناساییِ زودهنگامِ عفونت برجسته می‌کند. از طرفی عدمِ تمایلِ آنتی‌بادی‌های تولیدشده با سایرِ سمومِ مشابه (StxB و LtB) بیانگرِ اختصاصی بودنِ آنتی‌بادی‌ها در شناساییِ CtxB و اهمیتِ آن‌ها در کاربردهای تشخیصی و اجتناب از نتایجِ مثبتِ کاذب است؛ این امر می‌تواند نویدبخشِ توسعهٔ کیت‌های تشخیصیِ مبتنی‌بر اِلایزا با قابلیتِ کاربردِ بالینی و محیطی باشد.

۵| نتیجه‌گیری

درنهایت این پژوهش، با ارائهٔ آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال درمقابلِ CtxB جهتِ تشخیصِ سمِ وبا انجام شده است. آنتی‌بادی‌های تولیدشده در موش و خرگوش، روشی سریع، دقیق و مقرون‌به‌صرفه برای شناساییِ *ویبریو کلرا* نسبت به روش‌های سنّتی مانند کشتِ میکروبی یا روش‌های مولکولیِ پیشرفته محسوب می‌شود. این روش با حساسیّت بالا، اختصاصیت مناسب (حداقل واکنشِ متقاطع با توکسین‌های مشابه) عدم‌نیاز به تجهیزاتِ پیشرفتهٔ آزمایشگاهی، امکانِ تشخیصِ سریعِ توکسینِ کلرا را در نمونه‌های بالینی و محیطی فراهم می‌کند.

۶| ملاحظات اخلاقی و کد اخلاق

کُد اخلاق مقاله به‌شرح زیر می‌باشد:
IR.IAU.TNB.REC.1400.114.

۷| تشکر و قدردانی

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

۸| تعارض منافع

هیچگونه تعارضِ منافع بین نویسندگان وجود ندارد.

۹| سهم نویسندگان

محبوبه حسنی فرد: طراحیِ آپتامر و آنالیزهای بیوانفورماتیکی، انجام آزمایش‌ها، جمع‌آوری و تحلیلِ داده‌ها و ویرایشِ نهاییِ مقاله.
غلامرضا اولاد: مشاورهٔ پژوهش و ویرایشِ مقاله.
جعفر امانی: طراحیِ ایدهٔ پژوهش، نظارتِ علمی، طراحیِ آپتامر و آنالیزهای بیوانفورماتیکی و ویرایشِ نهاییِ مقاله.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-10-19]

| 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

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-10-19]

| منابع

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, Guillerm M, Moussy F, Chaignat 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

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-10-19]

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.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-10-19]