

Designing an ELISA Method for Measurement of Human IgG and IgM Antibodies against SARS-CoV-2

Saeid Taghilo¹,
Mina Dabiri²,
Reza Valadan³,
Hossein Asgarian-Omran⁴

¹ PhD in Medical Immunology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² MSc in Medical Immunology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Assistant Professor, Department of Immunology, Molecular and Cell-Biology Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Associate Professor, Department of Immunology, Gastrointestinal Cancer Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received October 31, 2022 ; Accepted May 29, 2022)

Abstract

Background and purpose: Coronavirus disease 2019 (COVID-19) is a respiratory disease caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). In this study, an indirect ELISA method was designed to measure the human IgM and IgG antibodies against SARS-CoV-2.

Materials and methods: Protein sequence of nucleocapsid antigen from SARS-CoV-2 was expressed in *E. coli* BL21 and then was purified by chromatography. The purified protein was confirmed by SDS-PAGE and Western blotting. An indirect ELISA method was designed to measure the specific IgG and IgM antibodies against SARS-CoV-2 using recombinant N protein. The optimized ELISA method was then applied to measure the IgG and IgM antibodies in 61 infected or recovered COVID-19 patients and in 31 healthy controls. Finally, data obtained from the designed ELISA method were compared with those of a commercially approved ELISA kit.

Results: The recombinant nucleocapsid protein was successfully expressed and purified which was confirmed by SDS-PAGE and Western blotting. The amount of optical densities obtained from the designed ELISA method was similar to those of the commercial kit in 61 patients and 31 controls. The sensitivity and specificity of the designed ELISA method for IgG were 100% compared with the commercial ELISA kit, while the sensitivity and specificity for IgM were 96.72 and 96.77, respectively.

Conclusion: Serological tests alone are not suitable for diagnosis; however, their combination with molecular tests increases the accuracy and sensitivity of the COVID-19 diagnosis. These tests are also valuable for epidemiological studies.

Keywords: nucleocapsid, IgG, IgM, ELISA, SARS-CoV-2

J Mazandaran Univ Med Sci 2022; 32 (210): 26-36 (Persian).

Corresponding Author: Hossein Asgarian-Omran - Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. (E-mail: asgarianhossein@yahoo.com)

طراحی روش ELISA برای سنجش آنتی بادی های IgM و IgG انسانی علیه SARS-CoV-2

سعید تقی لو^۱مینا دبیری^۲رضا ولدان^۳حسین عسگریان عمران^۴

چکیده

سابقه و هدف: بیماری کووید-۱۹، یک بیماری تنفسی است که به وسیله‌ی گونه‌ای از کروناویروس تحت عنوان SARS-CoV-2 ایجاد می‌شود. این مطالعه با هدف طراحی یک روش الایزای غیرمستقیم برای سنجش آنتی‌بادی‌های IgM و IgG علیه SARS-CoV-2، انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، توالی پروتئین نوترکیب نوکلئوکپسید SARS-CoV-2 در باکتری E. coli BL21 بیان شد. پروتئین تولیدی با استفاده از SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ تایید شد. در ادامه، از پروتئین نوترکیب نوکلئوکپسید تولید شده، روش ELISA غیرمستقیم برای سنجش آنتی‌بادی‌های IgM و IgG علیه SARS-CoV-2 طراحی شد. سپس از این روش برای سنجش آنتی‌بادی‌های IgM و IgG در ۶۱ بیمار مبتلا یا بهبود یافته از بیماری COVID-19 به همراه ۳۱ نمونه سرم فرد سالم استفاده شد. در انتها نتایج به‌دست آمده از روش ELISA طراحی شده بر روی نمونه‌ها با کیت تجاری مورد تایید وزارت بهداشت مقایسه شد.

یافته‌ها: پروتئین نوترکیب نوکلئوکپسید بیان و تخلیص شد و سپس به کمک SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ مورد تایید قرار گرفت. میزان جذب نوری به‌دست آمده از روش ELISA طراحی شده در ۶۱ بیمار و ۳۱ فرد سالم در مقایسه با کیت تجاری هم راستا بوده است. حساسیت و ویژگی روش ELISA طراحی شده برای سنجش IgG ۱۰۰ درصد تعیین شد، این در حالی است که حساسیت ۹۶/۷۲ و ویژگی ۹۶/۷۷ برای سنجش IgM گزارش شد.

استنتاج: تست‌های سرولوژیک به تنهایی ابزاری مناسب برای تشخیص نیستند، با این حال همراهی با تست‌های مولکولی موجب افزایش صحت و حساسیت در تشخیص بیماری می‌شود. هم‌چنین این آزمایشات برای بررسی‌های اپیدمیولوژیکی بسیار ارزشمند می‌باشند.

واژه های کلیدی: نوکلئوکپسید، IgM، IgG، الایزای، سارس کرونا ویروس-۲

مقدمه

ویروس سارس کرونا ۲ (SARS-CoV-2) بعد از ویروس سارس (Sever Acute Respiratory Syndrome) جدیدترین عضو از خانواده کرونا ویریده (Coronaviridae) و مرس (Middle-East Respiratory Syndrome)،

مؤلف مسئول: حسین عسگریان عمران - ساری: کیلومتر ۱۷ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی
۱. دکترای تخصصی ایمونولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. کارشناس ارشد ایمونولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. استادیار، گروه ایمونولوژی پزشکی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۴. دانشیار، گروه ایمونولوژی پزشکی، مرکز تحقیقات دستگاه گوارش، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
* تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۸/۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۰/۱۲/۱ تاریخ تصویب: ۱۴۰۱/۳/۸

E-mail: asgarianhossein@yahoo.com

نمود(۱۱). در حال حاضر از تکنیک‌های Real Time-PCR و سرولوژی برای بررسی بیماران مشکوک به عفونت SARS-CoV-2 کمک گرفته می‌شود(۱۲،۱۱). آزمایش مولکولی RT-PCR که به یک روش استاندارد برای تشخیص عفونت SARS-CoV-2 از زمان شناسایی این ویروس تبدیل شده است، دارای محدودیت‌های بسیاری بوده و میزان بالایی از نتایج منفی کاذب از آن گزارش شده است(۵). تکنیک RT-PCR در مراحل اولیه عفونت ویروسی که در آن ویروس به سرعت در حال تکثیر بوده ایفای نقش می‌کند، که تشخیص مستقیم پاتوژن را امکان‌پذیر می‌کند(۱۳). در شرایط بهبودی بیمار و همچنین کاهش میزان تکثیر ویروس، امکان شناسایی دقیق و صحیح تعداد زیادی از بیماران آلوده، افراد ناقل بدون علامت و همچنین تشخیص عفونت احتمالی COVID-19 در بیماران بهبود یافته وجود ندارد(۱۳). آزمایشات سرولوژیک توانایی شناسایی آنتی‌بادی‌های مختلف علیه ویروس در خون و سایر مایعات بدن را دارند. بر خلاف آزمون‌های مبتنی بر شناسایی ژنوم ویروس مانند RT-PCR که پس از پاکسازی ویروس کارا نخواهند بود و از آنجا که آنتی‌بادی‌های تولید شده در بدن میزبان تا مدت‌ها باقی می‌مانند، لذا آزمایش‌های سرولوژیکی مبتنی بر اندازه‌گیری آنتی‌بادی اختصاصی علیه ویروس توانایی شناسایی طیف وسیعی از بیماران، افراد بهبود یافته از این بیماری و همچنین افراد ناقل بدون علامت را دارد(۱۴). لذا این آزمون‌ها در بررسی‌های سرواپیدمیولوژیکی و تعیین میزان تماس افراد جامعه با این ویروس بسیار کمک کننده خواهند بود. در این راستا، چند کیت ELISA برای تشخیص آنتی‌بادی‌های ضد SARS-CoV-2 از کلاس‌های IgA، IgM، و IgG توسط شرکت‌های معتبر بین‌المللی ارائه شده است. شناسایی آنتی‌بادی‌های IgG نشان‌دهنده یک عفونت مداوم یا حتی گذشته است، در حالی که آنتی‌بادی‌های IgA و IgM به‌عنوان نشانگرهای اولیه عفونت‌های حاد دستگاه تنفسی توصیف می‌شوند(۱۴). با توجه به اپیدمی گسترده این بیماری در ایران، این

است که موجب طیفی از بیماری‌ها به ویژه پنومونی‌های کشنده در انسان می‌شود و عامل همه‌گیری اخیر در سطح جهان است(۲۰). ویروس SARS-CoV-2 در دسامبر سال ۲۰۱۹ توسط سازمان بهداشت جهانی به عنوان عامل بیماری Coronavirus Disease of 2019(COVID-19) معرفی شد(۲۰). ویروس SARS-CoV-2 یک ویروس RNA دار است که به‌طور گسترده در انسان و سایر پستانداران و پرندگان پخش می‌شود و سبب بیماری‌های سیستم تنفسی، روده، کبد و اعصاب می‌شود(۳). علائم شایع در افراد آلوده به ویروس SARS-CoV-2 شامل علائم تنفسی، تب و سرفه خشک بوده و در موارد شدیدتر، عفونت می‌تواند منجر به پنومونی و سندرم حاد تنفسی شود(۴). مسیرهای شناخته شده انتقال بیماری COVID-19 توسط قطرات تنفسی و انتقال تماسی است، در حالی که آئروسل و انتقال مدفوعی-دهانی نیز گزارش شده است(۵). ویروس SARS-CoV-2 دارای آنتی‌ژن‌های متعددی بوده که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به آنتی‌ژن‌های Envelope (E)، Membrane (M)، Spike (S) و Nucleocapsid (N) اشاره نمود(۶،۷). از این بین، دو آنتی‌ژن S و N بیش‌تر مورد توجه قرار گرفته‌اند. پروتئین S یک پروتئین سطحی ویروس است که پس از سنتز گلیکوزیله شده و به صورت ساختارهای سه تایی در سطح ویروس قرار می‌گیرد. دومین‌های مختلف این پروتئین در اتصال ویروس به رسپتور سلولی و فیوژن نقش دارند، پروتئین N یک فسفو پروتئین دارای دومین‌های متصل شونده به RNA است که پس از اتصال به ژنوم ویروسی، نوکلئوکپسید ماریچی ویروس را شکل می‌دهد و به جایگیری نوکلئوکپسید شکل گرفته در ذره ویروسی منجر می‌شود(۸،۹). هر دو پروتئین S و N قادر به القای پاسخ ایمنی در بدن انسان بوده و در تست‌های سرولوژیک جهت تشخیص ویروس به کار می‌روند(۱۰). برای تشخیص این بیماری همانند سایر بیماری‌های عفونی، می‌توان از آزمایشات مختلف مبتنی بر شناسایی ژنوم ویروس و همچنین سنجش آنتی‌ژن‌ها و آنتی‌بادی‌های علیه آن استفاده

مطالعه با هدف تولید نوترکیب آنتی ژن ویروس یک روش الیزای مناسب برای سنجش آنتی بادی های IgM و IgG علیه SARS-CoV-2 طراحی گردید که در ادامه این آزمایش در جهت تشخیص و پایش بیماران مبتلا و همچنین بررسی سرواپیدمیولوژی جمعیت های مختلف مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش ها

تولید و تخلیص آنتی ژن نوکلئوکسپید ویروس SARS-CoV-2 در این مطالعه تجربی، با کد اخلاق IR.MAZUMS.REC.1399.114 اصول اخلاقی طبق دستورالعمل کمیته اخلاق کشوری و آیین نامه COPE رعایت شد، و توالی ژن نوکلئوکسپید کرونا ویروس جدید که در بانک اطلاعاتی NCBI موجود می باشد، استخراج گردید. این ژن ۱۲۶۰ نوکلئوتید بوده و پروتئین تولیدی آن به طول ۴۱۹ اسید آمینه می باشد. به منظور تولید پروتئین نوکلئوکسپید، از پلاسمید بیانی pET-28 حاوی توالی His-tag استفاده شد. توالی مورد نظر جهت سنتز و کلونینگ در وکتور بیانی pET-28 به شرکت Genscript Biotech ارسال شد. در ابتدا، سویه باکتری *E-coli BL21 (DE3)* به مدت ۱۵ ساعت در محیط LB مایع بدون آنتی بیوتیک در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و با هوادهی در سرعت ۲۵۰ دور در دقیقه انکوبه شد. ۵۰۰ میکرو لیتر از محیط کشت فوق به ۵۰ میلی لیتر محیط LB مایع تلقیح و در شیکر انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۲۵۰ دور در دقیقه انکوبه شد. پس از این که جذب نوری محیط کشت در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۵ رسید، رسوب سلولی جمع آوری و با استفاده از کلرید کلسیم ۱۰۰ میلی مولار، سلول های مستعد تهیه شدند. پلاسمید بیانی نوترکیب حاوی ژن نوکلئوکسپید ویروس با روش شوک حرارتی به سلول های مستعد ترانسفورم شد. رسوب باکتری ها بر روی محیط LB آگار حاوی کانامایسین کشت داده شد و به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. پس از تأیید ترانسفورماسیون پلاسمید

نوترکیب به باکتری های *E-coli* از کلون های رشد کرده در محیط LB براث به صورت شبانه، ۵۰ میکرو لیتر به ۵ میلی لیتر محیط LB براث استریل حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین منتقل گردید. با توجه به این که بیان پروتئین نوترکیب در سویه BL21 تحت کنترل اپرون lac می باشد، پس از این که جذب نوری محیط کشت در طول موج ۶۰۰ نانومتر به حدود ۰/۵ رسید، برای القای بیان پروتئین از ایزوپروپیل - β -D-1- گالاکتوپیرانوزید (IPTG) با غلظت ۰/۵ میلی مولار استفاده شد. پس از آن سلول ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و سرعت ۱۲۰ rpm در شیکر انکوباتور نگه داری گردید. نتایج بیان بر روی ژل ۱۲ درصد SDS-PAGE بررسی گردید. برای تخلیص پروتئین از ستون نیکل-نیترویلو استیک اسید (Ni-NTA) استفاده شد. با توجه به این که پروتئین نوترکیب حاصل به صورت نامحلول بود، قبل از عبور از ستون با استفاده محلول اوره ۸ مولار پروتئین نامحلول به حالت محلول تبدیل گردید. پس از عبور دادن عصاره سلولی از ستون تمایلی، از بافر حاوی ایمیدازول ۴۰ میلی مولار برای شستشو و از بافر حاوی ایمیدازول ۲۵۰ میلی مولار به عنوان بافر الوشن خارج کننده پروتئین نوترکیب استفاده گردید. جهت تأیید تخلیص پروتئین نوترکیب، خروجی های ستون بر روی ژل ۱۲ درصد SDS-PAGE الکتروفورز شد. پس از تخلیص پروتئین به منظور حذف ایمیدازول و تا خوردگی مجدد پروتئین پس از مواجهه با اوره، از روش دیالیز استفاده شد. برای این منظور، بشر حاوی بافر PBS و کیسه دیالیز محتوی نمونه روی همزن مغناطیسی قرار داده شد و بافر به طور دائم با استفاده از مگنت یکنواخت گردید. این کار در دمای اتاق به صورت شبانه انجام گرفت. پس از طی این مراحل، محتویات کیسه دیالیز سانتریفیوژ شد و رسوب و مایع رویی جداگانه بر روی SDS-PAGE الکتروفورز گردید. در مرحله بعد به منظور تخلیص نهایی پروتئین مورد نظر، محلول رویی به دست آمده از مرحله قبل، از فیلترهای آمیکون با منافذ ۱۰ کیلو دالتونی عبور داده شد.

برای تایید خلوص و اختصاصیت پروتئین نو ترکیب تولید و تخلیص شده، از روش های SDS-PAGE و وسترن بلائینگ استفاده گردید. برای تایید پروتئین نو ترکیب از تکنیک وسترن بلائینگ با آنتی بادی anti-His-tag کونژوگه با HRP استفاده شد. عصاره سلولی نمونه تخلیص شده و پروتئین BSA به عنوان کنترل منفی بر روی ژل ۱۲ درصد SDS-PAGE الکتروفورز شدند. لکه گذاری بر روی کاغذ PVDF با استفاده از سیستم BioRad و بافر مخصوص انتقال حاوی گلیسین ۱۹۲ میلی مولار، تریس ۲۵ میلی مولار، SDS ۱ درصد و متانول ۲۰ درصد انجام شد. پس از اتمام انتقال و منتقل شدن ladder به کاغذ، کاغذ PVDF به مدت ۲ ساعت در محلول TBST حاوی ۵ درصد شیر خشک بر روی شیکر انکوبه گردید. سپس کاغذ ۲ مرتبه با TBST شستشو داده شد و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق با آنتی بادی ضد (سایتومتین ژن - اصفهان - ایران) با رقت ۱/۱۰۰۰ در حالت shaking انکوبه شد. آنتی بادی ها در محلول TBST رقیق شدند. پس از انکوباسیون با آنتی بادی، آنتی بادی خارج و کاغذ ۳ مرتبه و هر بار به مدت ۵ دقیقه با TBST شستشو داده شد. جهت نمایان کردن باندهای پروتئین های مورد نظر از کیت ECL (سایتومتین ژن) استفاده شد. میزان مساوی از یک میلی لیتر از محلول A و B کیت با یکدیگر مخلوط و به مدت ۳ دقیقه با کاغذ انکوبه گردید. کاغذ از محلول خارج و توسط دستگاه G:Box شرکت Syngene خوانده شد. در انتها، با استفاده از روش BCA، پروتئین نو ترکیب تولید شده تعیین غلظت گردید. در نهایت پروتئین تخلیص شده مورد نظر تا انجام آزمایشات دیگر در ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

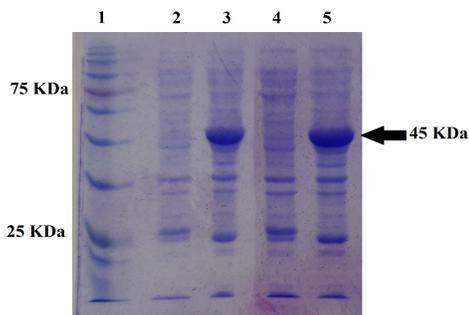
طراحی روش ELISA غیرمستقیم برای شناسایی آنتی بادی های اختصاصی IgG و IgM علیه ویروس SARS-CoV-2 پس از خالص سازی آنتی ژن نوکلئوکپسید و تعیین

خصوصیت آن، از آنتی ژن به دست آمده برای طراحی روش ELISA غیرمستقیم برای شناسایی آنتی بادی های اختصاصی علیه ویروس SARS-CoV-2 استفاده شد. برای انجام الایزای غیرمستقیم، هر چاهک پلیت ۹۶ تایی الایزا پس از بهینه سازی مراحل مختلف، با غلظت ۵ µg/ml پروتئین نو ترکیب نوکلئوکپسید در بافر PBS به صورت شبانه انکوبه کوت شد. پس از مرحله ی بلائینگ با کازئین ۱ درصد در بافر PBS به مدت ۱/۵ ساعت انکوبه روی شیکر، به چاهک ها ۱۰۰ میکرولیتر از سرم رقیق شده با رقت ۱/۱۰۰ گروه بیماران و کنترل اضافه گردید، و سپس به مدت ۱ ساعت انکوبه شدند. مرحله شناسایی توسط کونژوگه HRP متصل به آنتی بادی بزی ضد آنتی بادی انسانی (Sigma, Missouri, USA) به صورت انکوباسیون ۳۰ دقیقه ای در ۳۷ درجه سانتی گراد انجام گرفت. سپس از محلول سوپسترا - کروموژن TMB به عنوان ماده رنگزا در واکنش استفاده شد و از محلول اسید H₂SO₄ با نرمالیتی ۲ به عنوان محلول متوقف کننده واکنش استفاده شد. در انتها چاهک ها با طول موج ۴۵۰ نانومتر به همراه ۶۳۰ نانومتر به عنوان طول موج رفرنس خوانش شد. بر اساس جذب نوری (OD) به دست آمده نتایج مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای شناسایی IgG از کونژوگه اختصاصی anti-human IgG متصل به HRP، و برای شناسایی IgM از کونژوگه اختصاصی anti-human IgM متصل به HRP استفاده گردید.

مقایسه روش الایزای طراحی شده با نمونه کیت تجاری در سنجش آنتی بادی های اختصاصی علیه ویروس SARS-CoV-2

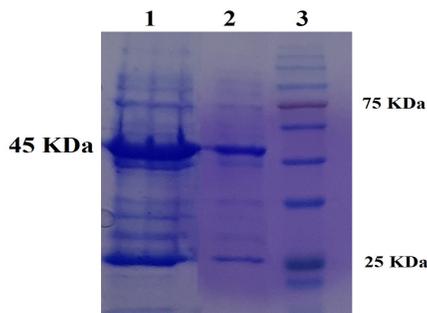
پس از طراحی روش ELISA غیرمستقیم، ویژگی های آزمون طراحی شده در شناسایی آنتی بادی های اختصاصی IgG و IgM علیه ویروس در مقایسه با کیت سنجش SARS-CoV IgM و سنجش SARS-CoV IgG شرکت دیازیس (تهران، ایران) مورد تایید وزارت بهداشت که در آن از پروتئین نوکلئوکپسید به عنوان

مولار جهت محلول کردن پروتئین تولیدی قبل از تخلیص استفاده شد (تصویر شماره ۲). نتایج حاصل از تخلیص پروتئین با استفاده از ستون Ni-NTA بیانگر وجود پروتئین نوترکیب با وزن ۴۵ کیلو دالتون در خروجی شستشوی ایمیدازول ۲۵۰ میلی مولار با درجه خلوص بالا بود (تصویر شماره ۳). در انتها، پس از تخلیص نهایی با استفاده از عبور از فیلتر آمیکون ۱۰ کیلو دالتون تغلیظ گردید و سپس غلظت پروتئین تولیدی با روش BCA محاسبه شد.



تصویر شماره ۱: الگوی الکتروفورز پروتئین بیان شده توسط باکتری روی ژل ۱۲ درصد SDS-PAGE

۱. نشانگر مولکولی پروتئین (Protein Ladder)
۲. عصاره باکتری القاء نشده با IPTG
۳. عصاره باکتری القاء شده با IPTG
۴. فاز محلول در باکتری های القا شده با IPTG
۵. فاز غیر محلول در باکتری های القا شده با IPTG



تصویر شماره ۲: الگوی الکتروفورز تبدیل پروتئین نامحلول به محلول با اوره ۸ مولار بر روی ژل ۱۲ درصد SDS-PAGE

۱. فاز محلول باکتری بعد از مواجهه با اوره ۸ مولار،
۲. فاز غیر محلول باکتری بعد از مواجهه با اوره ۸ مولار،
۳. نشانگر مولکولی پروتئین (Protein Ladder).

آنتی ژن و لایه اول الایزا استفاده شده بود، سنجیده شد. بدین منظور از ۶۱ نمونه سرم افراد بهبود یافته از بیماری COVID-19 (سرم مثبت) استفاده گردید. این افراد بیمارانی بودند که بهبود یافته و دارای آنتی بادی اختصاصی IgM و IgG علیه ویروس SARS-CoV-2 در خون خود بودند. همچنین از ۳۱ نمونه سرم افرادی که فاقد آنتی بادی اختصاصی می باشند (سرم منفی) نیز استفاده شد. در انتها، پارامترهای مختلف حساسیت، ویژگی و تکرارپذیری برای روش طراحی شده در مقایسه با کیت تجاری مورد بررسی قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل داده ها

در این مطالعه برای تجزیه و تحلیل داده ها از دو نرم افزار SPSS-25 و Graphpad Prism-6 استفاده شد و برای بررسی همبستگی بین نتایج از آزمون پیرسون استفاده گردید. همچنین برای بررسی حساسیت و ویژگی روش طراحی شده از آنالیز ROC Curve استفاده شد.

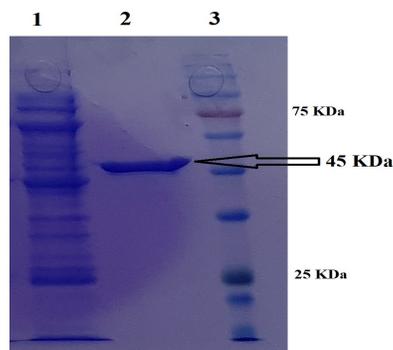
یافته ها

بیان و تخلیص پروتئین نوکلئوکپسید ویروس SARS-CoV-2 با القای بیان پروتئین N تحت کنترل اپرون lac در شرایط انکوباسیون استاندارد، باکتری های القاء شده و القاء نشده جمع آوری و شکسته شدند. سپس کل محتوای پروتئینی باکتری روی ژل ۱۲ درصد SDS-PAGE الکتروفورز شد. در نمونه های القاء شده، پروتئین N با بیان بالا مشاهده گردید و در نمونه های القاء نشده باند مربوط به پروتئین هدف وجود نداشت (تصویر شماره ۱).

بعد از بیان پروتئین، فاز محلول و نامحلول حاصل از سانتیفریژ لیزات سلولی، بر روی ژل ۱۲ درصد SDS-PAGE ران شد. همان طور که در تصویر شماره ۱ نشان داده شده است، باند بیانی مربوط به پروتئین مورد نظر در ستون مربوط به فاز نامحلول قابل رویت است و بنابراین بیان پروتئین به صورت کنجاله های نامحلول (Inclusion Bodies) است. به همین دلیل، از اوره ۸

مقایسه سنجش میزان آنتی بادی های IgM و IgG علیه SARS-CoV-2 با استفاده از کیت طراحی شده و تجاری در ابتدا لایه های مختلف روش ELISA اعم از غلظت آنتی ژن برای لایه کوتینگ، محلول بلاکینگ، محلول رقیق کننده نمونه سرم، رقت مورد استفاده از سرم و در نهایت رقت کوئز و گه مورد نظر بهینه سازی شد. بر اساس نتایج به دست آمده از آزمون های انجام شده سریالی مناسب ترین غلظت آنتی ژن متصل شده به فاز جامد در هر دو روش سنجش IgM و IgG مقدار ۵ میکروگرم بر میلی لیتر بود، که در حجم ۱۰۰ میکرولیتر در هر چاهک با بافر فسفات سالین (PBS) بهینه شد. در این مطالعه برای انتخاب محلول بلاکینگ مناسب از پروتئین های مختلفی از قبیل BSA، کازئین و ژلاتین با درصدهای ۱ و ۳ در بافر PBS استفاده شد. نتایج حاصل از این آزمایشات نشان داد که مناسب ترین محلول بلاک کننده کازئین ۱ درصد در بافر PBS بوده است. همچنین بهترین رقت سرم به منظور شناسایی IgG و IgM پس از انجام آزمایش با رقت های مختلف سریالی از سرم، ۱/۱۰۰ انتخاب گردید. علاوه بر این مناسب ترین تیتراژ آنتی بادی کوئز و گه علیه IgG و IgM انسانی ۱/۳۰۰۰ تعیین شد.

پس از بهینه سازی آزمون ELISA با آنتی ژن تولید شده در این مطالعه، سنجش آنتی بادی های IgG و IgM علیه SARS-CoV-2 برای ۶۱ فرد بیمار و ۳۱ فرد سالم به عنوان گروه کنترل مورد مطالعه انجام گرفت. به منظور بررسی صحت و دقت این روش طراحی شده، میزان آنتی بادی های IgG و IgM علیه SARS-CoV-2 با کیت تجاری مورد تایید وزارت بهداشت (شرکت دیازست) مطابق پروتکل شرکت سازنده سنجیده و با نتایج به دست آمده با روش طراحی شده مقایسه گردید. همان طور که در تصویر شماره ۵ مشاهده می شود، همبستگی کاملاً مثبت و معنی داری بین OD های به دست آمده در سنجش IgG و IgM با روش طراحی شده و کیت دیازست وجود دارد. علاوه بر این، از آنالیز منحنی راک (ROC Curve) برای بررسی حساسیت و ویژگی روش طراحی شده در

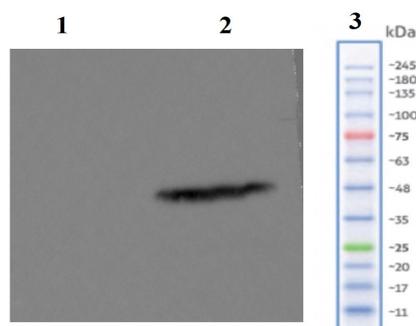


تصویر شماره ۳: الگوی الکتروفورز پروتئین نوترکیب تخلیص شده با ستون Ni-NTA بر روی ژل ۱۲ درصد SDS-PAGE
 ۱. خروجی شستشوی ستون با ایمیدازول ۴۰ میلی مولار،
 ۲. خروجی الوشن ستون با ایمیدازول ۲۵۰ میلی مولار (پروتئین نوترکیب تخلیص شده)
 ۳. نشانگر مولکولی پروتئین (Protein Ladder).

تایید پروتئین نوترکیب با روش وسترن بلاکینگ با

استفاده از آنتی بادی ضد His-tag

در پایان به منظور بررسی صحت پروتئین نوترکیب N از آنالیز وسترن بلاکینگ استفاده شد. برای این منظور باند رنگ گرفته بر روی کاغذ نیترو سلولز در مقایسه با نمونه کنترل منفی (BSA) بررسی شد و مشخص گردید که باند رنگی مربوط به پروتئین N در جایگاه درست خودش در مقابل باند ۴۵ کیلو دالتونی نشانگر مولکولی پروتئین قرار گرفته است (تصویر شماره ۴).

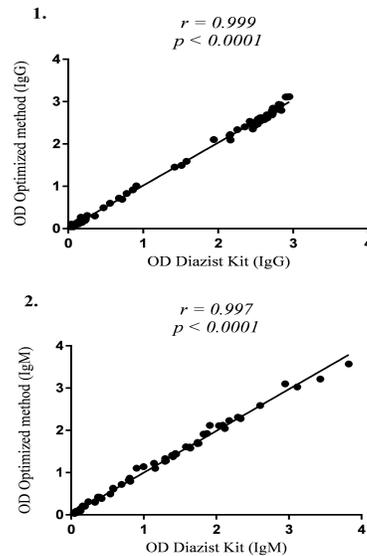


تصویر شماره ۴: تایید پروتئین نوترکیب با روش وسترن بلاکینگ و با استفاده از anti-His-Tag antibody
 ۱. کنترل منفی (پروتئین BSA)،
 ۲. پروتئین نوکلئوکسپید نوترکیب تخلیص شده،
 ۳. نشانگر مولکولی پروتئین (Protein Ladder).

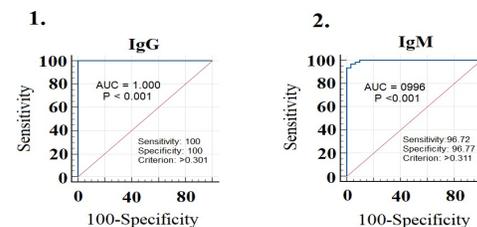
بحث

یکی از راه‌های کنترل همه‌گیری SARS-CoV-2، تشخیص سریع افراد آلوده و جداسازی آن‌ها از افراد دیگر جامعه برای جلوگیری از انتقال ویروس به افراد سالم است. همان‌طور که اشاره شد، روش‌های کنونی تشخیص شامل تست‌های مولکولی، CT Scan، روش‌های سرولوژی و بررسی فاکتورهای خونی می‌باشد (۱۵). از بین این روش‌ها، تست مولکولی مطمئن‌ترین روش جهت تایید حضور ژنوم ویروس است، اما این روش با محدودیت‌هایی همراه است که از جمله آن‌ها می‌توان به زمان بر بودن آماده شدن نتایج، نیازمندی به فضای آزمایشگاهی مناسب، تجهیزات گران قیمت و نیروی کار با تجربه و آموزش دیده و نتایج منفی کاذب به علت جمع‌آوری نامناسب نمونه‌ها یا استخراج نامناسب اسید نوکلئیک اشاره کرد (۱۴۱۶). از طرف دیگر، تست‌های مولکولی نیز فقط قدرت تشخیص عفونت فعال را دارند و برای مطالعات گذشته‌نگر مناسب نیستند. به طوری که نتیجه منفی این تست برای یک فرد می‌تواند به هر دو صورت ابتلا نشدن به ویروس یا ابتلا به ویروس و عبور از مرحله فعال عفونت و بهبودی تفسیر شود. بنابراین تست‌های مولکولی روشی مناسب برای غربالگری افراد جامعه و تشخیص‌های ساده، ارزان قیمت و سریع نیستند و استفاده از روش‌های سریع‌تر و ارزان‌تر یک نیاز ضروری است (۱۴۱۷). همان‌طور که اشاره شد، پاسخ ایمنی و آنتی‌بادی تولید شده علیه ویروس اختصاصی است و تا مدتی در بدن باقی می‌ماند، بنابراین، بررسی آن می‌تواند به عنوان یک راهکار در تشخیص مطرح باشد. طراحی تست‌های سرولوژیکی از قبیل ELISA به گونه‌ای است که علاوه بر سرعت آماده شدن نتیجه تست، انجام تست به تجهیزات گران و نیروی کار با تجربه چندان وابسته نیست، بنابراین مقرون به صرفه ترند و نمونه‌گیری برای این تست‌ها، با توجه به استفاده از خون کامل یا سرم، سخت و تهاجمی نیست. همچنین به دلیل پایداری پاسخ‌های ایمنی، این تست‌ها برای مطالعات گذشته‌نگر

برابر روش استاندارد (کیت دیازيست) انجام گرفت. نتایج این آنالیز حاکی از این بود که سنجش IgG با روش طراحی شده دارای حساسیت ۱۰۰ درصد و ویژگی ۱۰۰ درصد بوده است (تصویر شماره ۶). همچنین حساسیت ۹۶/۷۲ درصد و ویژگی ۹۶/۷۷ درصد برای سنجش IgM با روش طراحی شده گزارش شد (تصویر شماره ۶).



تصویر شماره ۵: همبستگی نتایج سنجش IgG (۱) و IgM (۲) اختصاصی علیه SARS-CoV-2 در نمونه‌های مورد مطالعه با دو روش الیزای طراحی شده در این مطالعه و کیت تجاری مورد تایید وزارت بهداشت (شرکت دیا زیست). ۹۲ نمونه مورد مطالعه که شامل ۶۱ نمونه سرم افراد بهبود یافته از بیماری COVID-19 (سرم مثبت) و ۳۱ نمونه سرم افرادی که فاقد آنتی بادی اختصاصی بوده‌اند، با دو روش الیزای طراحی شده و کیت تجاری مورد تایید وزارت بهداشت (شرکت دیازيست) مورد سنجش قرار گرفت. جذب نوری (OD) به دست آمده از نتایج الیزای هر دو روش در آزمون آماری همبستگی پیرسون با هم مقایسه شدند.



تصویر شماره ۶: منحنی راک (ROC Curve) روش طراحی شده در مقایسه با کیت تجاری ۱. سنجش IgG، ۲. سنجش IgM

و ارزیابی سابقه ابتلای فرد به ویژه در افرادی که بیماری بدون علامت داشتند یا در زمان بیماری امکان انجام تست مولکولی برای آن‌ها فراهم نبوده است، مفید است. انجام همزمان تست‌های مولکولی و سرولوژیکی به طور معنی داری موجب افزایش حساسیت و صحت تشخیص SARS-CoV-2 می‌شود (۱۸۱۹). انجام همزمان تست‌های سرولوژیکی در مواردی از جمله نتایج منفی کاذب در تست مولکولی، تطابق نداشتن نتایج تست مولکولی با CT-Scan و تست‌ها یا علائم دیگر، نداشتن همخوانی دو تست مولکولی با هم به دلیل نتیجه مثبت یا منفی کاذب یکی از دو تست، می‌تواند کمک کننده باشد. همچنین با توجه به این که به طور میانگین میزان ژنوم ویروس از روز یازدهم روند کاهشی و میزان تولید آنتی بادی در همین زمان روند افزایشی می‌یابد، همراهی تست‌های مولکولی و سرولوژیک روند تشخیص را کارآمدتر می‌کند.

امروزه در تشخیص بسیاری از عفونت‌ها و همچنین در بررسی حضور آنتی ژن‌ها و آنتی بادی‌های ویروسی از تست‌های سرولوژیک بر پایه ELISA استفاده می‌شود. از این رو بیماری COVID-19 نیز از این قاعده مستثنی نیست. امروزه کیت‌های تجاری متعددی برای اندازه‌گیری سطوح آنتی بادی IgM و IgG به طور غیرمستقیم در خون طراحی و تولید شدند. مطالعات محدودی حاکی از این هستند که کیت‌های سنجش آنتی بادی IgM و IgG بر علیه SARS-CoV-2 مبتنی بر ELISA بیش از ۹۵ درصد ویژگی را برای تشخیص این بیماری دارند (۲۰). نکته قابل توجه در طراحی این کیت‌ها نوع آنتی ژن استفاده شده در این کیت‌ها است که غالباً بر پایه پروتئین S و N می‌باشند. در همین راستا، در مطالعه‌ای که روی بیماران مبتلا به SARS انجام گرفت، تفاوت معنادار تولید آنتی بادی علیه پروتئین S و N را نشان دادند، به طوری که پاسخ آنتی بادی علیه پروتئین N بالاتر از پروتئین S بود (۲۱). این در حالی است که در مطالعات اندک انجام شده درباره SARS-CoV-2 چنین اختلافی گزارش نشده است و مقایسه حساسیت تست‌های سرولوژیک

طراحی شده بر اساس پروتئین S و پروتئین N نشان دهنده حساسیت مشابه در آن‌ها بوده است (۲۱۲۲). در مطالعه Wangbing Liu و همکاران نشان داده شد که دو روش ELISA طراحی شده بر اساس پروتئین‌های N و S تفاوتی در شناسایی IgG از خود به نمایش نگذاشت، این در حالی است که حساسیت این روش با پروتئین‌های S برای شناسایی IgM به طور معنی داری بیش تر از روش طراحی شده با پروتئین‌های N بوده است (۲۲). با توجه به عدم وجود تفاوت معنادار در نتایج مطالعات مختلف در استفاده از پروتئین N و S در طراحی کیت ELISA برای اندازه‌گیری آنتی بادی‌های IgG و IgM علیه SARS-CoV-2، در مطالعه حاضر تصمیم به استفاده از پروتئین N گرفته شد. به همین دلیل به جهت مقایسه صحیح نتایج حاصل از این مطالعه از کیت شرکت دیازیست که از پروتئین N در طراحی کیت استفاده شده است، به عنوان کنترل استاندارد انتخاب گردید. با این حال، به نظر می‌رسد استفاده تلفیقی از هر دو پروتئین S و N موجب می‌شود درصد نتایج مثبت افزایش یابد. همچنین، در مطالعه Jie Xiang و همکاران که به بررسی تشخیص SARS-CoV-2 با روش‌های ELISA و ایمونوکروماتوگرافی طلا کلونیدال (colloidal gold-immunochromatographic assay) پرداختند، نشان داده شد که حساسیت تشخیص ELISA IgM و ELISA IgG به صورت ترکیبی ۸۷/۳ درصد، و حساسیت تشخیص ترکیبی GICA IgM و GICA IgG، ۸۲/۴ درصد بود. همچنین بین حساسیت روش‌های ELISA (IgM + IgG) و GICA تفاوت معنی داری وجود نداشت (۲۳). با این حال، حساسیت و ویژگی روش ELISA طراحی شده در این مطالعه در مقایسه با کیت تجاری مورد تایید برای سنجش IgG ۱۰۰ درصد و برای سنجش IgM بالای ۹۶ درصد گزارش شده است. تفاوت در میزان حساسیت گزارش شده در مطالعه حاضر و مطالعه Jie Xiang می‌تواند به دلیل تفاوت در کیت استاندارد که برای مقایسه نتایج انتخاب شده است، باشد.

تاثیر تست‌های سرولوژیک در جنبه‌های مختلف مرتبط با کنترل اپیدمی SARS-CoV-2، استفاده صحیح و به‌جا از این تست‌ها به مدیریت بهتر این اپیدمی کمک می‌کند.

سپاسگزاری

به این وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مازندران به دلیل تصویب اعتبار پژوهشی لازم برای این طرح، تقدیر و تشکر می‌گردد (کد طرح: ۷۵۶۰ سامانه سیات).

در نهایت، اگرچه تست‌های سرولوژیک به تنهایی ابزاری مناسب برای تشخیص نیست، همراهی آن‌ها با تست‌های مولکولی موجب افزایش صحت و حساسیت در تشخیص بیماری شده که می‌تواند به ایزوله کردن به موقع افراد مبتلا و جلوگیری از گسترش بیماری منجر شود. ذکر این نکته نیز بسیار مهم است که تست‌های سرولوژیکی مثبت، نشان دهنده ایمن شدن و مصونیت قطعی افراد نیست، چرا که هنوز مصونیت‌زا بودن و مدت زمان پایداری پاسخ ایمنی مصونیت‌زا مشخص نشده است. با توجه به

References

1. Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *lancet* 2020; 395(10223): 507-513.
2. Wu D, Wu T, Liu Q, Yang Z. The SARS-CoV-2 outbreak: what we know *Int J Infect Dis* 2020; 94: 44-48.
3. Taghiloo S, Aliyali M, Abedi S, Mehravaran H, Sharifpour A, Zaboli E, et al. Apoptosis and immunophenotyping of peripheral blood lymphocytes in Iranian COVID-19 patients: clinical and laboratory characteristics. *J Med Virol* 2021; 93(3): 1589-1598.
4. Taghiloo S, Soltanshahi M, Aliyali M, Abedi S, Mehravaran H, Ajami A, et al. Cytokine profiling in Iranian patients with COVID-19; association with clinical severity. *Iran J Immunol* 2021; 18(1): 54-64.
5. Diao B, Wen K, Chen J, Liu Y, Yuan Z, Han C, et al. Diagnosis of acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection by detection of nucleocapsid protein. *MedRxiv preprint*. 2020.
6. Zeng W, Liu G, Ma H, Zhao D, Yang Y, Liu M, et al. Biochemical characterization of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein *Biochem Biophys Res Commun* 2020; 527(3): 618-623.
7. Yurkovetskiy L, Wang X, Pascal KE, Tomkins-Tinch C, Nyalile TP, Wang Y, et al. Structural and functional analysis of the D614G SARS-CoV-2 spike protein variant. *Cell* 2020; 183(3): 739-751. e8.
8. Cai Y, Zhang J, Xiao T, Peng H, Sterling SM, Walsh RM, et al. Distinct conformational states of SARS-CoV-2 spike protein. *Science* 2020; 369(6511): 1586-1592.
9. Carlson CR, Asfaha JB, Ghent CM, Howard CJ, Hartooni N, Safari M, et al. Phosphoregulation of phase separation by the SARS-CoV-2 N protein suggests a biophysical basis for its dual functions. *Mol Cell* 2020; 80(6): 1092-1103. e4.
10. Kumar S, Nyodu R, Maurya VK, Saxena SK. Host immune response and immunobiology of human SARS-CoV-2 infection In: Saxena, S. (eds) *Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). Medical Virology: From Pathogenesis to Disease Control*. Singapore, Springer; 2020. P. 43-53.
11. Jin Y, Wang M, Zuo Z, Fan C, Ye F, Cai Z, et al. Diagnostic value and dynamic variance of serum antibody in coronavirus disease

2019. *Int J Infect Dis* 2020; 94: 49-52.
12. Machado BAS, Hodel KVS, Barbosa-Júnior VG, Soares MBP, Badaró R. The main molecular and serological methods for diagnosing COVID-19: an overview based on the literature. *Viruses* 2021; 13(1): 40.
13. Carter LJ, Garner LV, Smoot JW, Li Y, Zhou Q, Saveson CJ, et al. Assay techniques and test development for COVID-19 diagnosis. *ACS Cent Sci* 2020; 6(5): 591-605.
14. Li Z, Yi Y, Luo X, Xiong N, Liu Y, Li S, et al. Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis. *J Med Virol* 2020; 92(9): 1518-1524.
15. Jin Y-H, Cai L, Cheng Z-S, Cheng H, Deng T, Fan Y-P, et al. A rapid advice guideline for the diagnosis and treatment of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) infected pneumonia (standard version). *Mil Med Res* 2020; 7(1): 1-23.
16. van Kasteren PB, van Der Veer B, van den Brink S, Wijsman L, de Jonge J, van den Brandt A, et al. Comparison of seven commercial RT-PCR diagnostic kits for COVID-19. *J Clin Virol* 2020; 128: 104412.
17. Ghaffari A, Meurant R, Ardakani A. COVID-19 serological tests: how well do they actually perform? *Diagnostics* 2020; 10(7): 453.
18. Liu L, Liu W, Zheng Y, Jiang X, Kou G, Ding J, et al. A preliminary study on serological assay for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in 238 admitted hospital patients. *Microbes Infect* 2020; 22(4-5): 206-211.
19. Zhao J, Yuan Q, Wang H, Liu W, Liao X, Su Y, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with novel coronavirus disease 2019. *Clin Infect Dis* 2020; 71(16): 2027-2034.
20. Hou H, Wang T, Zhang B, Luo Y, Mao L, Wang F, et al. Detection of IgM and IgG antibodies in patients with coronavirus disease 2019. *Clin Transl Immunology* 2020; 9(5): e1136.
21. Schnurra C, Reiners N, Biemann R, Kaiser T, Trawinski H, Jassoy C. Comparison of the diagnostic sensitivity of SARS-CoV-2 nucleoprotein and glycoprotein-based antibody tests. *J Clin Virol* 2020; 129: 104544.
22. Liu W, Liu L, Kou G, Zheng Y, Ding Y, Ni W, et al. Evaluation of Nucleocapsid and Spike Protein-based ELISAs for 2 detecting antibodies against SARS-CoV2. *J Clin Microbiol* 2020; 58(6): e00461-e00420.
23. Xiang J, Yan M, Li H, Liu T, Lin C, Huang S, et al. Evaluation of enzyme-linked immunoassay and colloidal gold-immunochromatographic assay kit for detection of novel coronavirus (SARS-Cov-2) causing an outbreak of pneumonia (COVID-19). *MedRxiv preprint*. 2020.