ORIGINAL ARTICLE

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

Saeid Taghiloo[1],
Mina Dabiri[2],
Reza Valadan[3],
Hossein Asgarian-Omran[4]

[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 vauable 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)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-05]

[DOR: 20.1001.1.17359260.1401.32.210.4.7]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی و دوم شماره ۲۱۰ تیر سال ۱۴۰۱ (۲۶-۳۶)

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

سعید تقی لو[۱]
مینا دبیری[۲]
رضا ولدان[۳]
حسین 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 IgG و IgM 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 بررسی های اپیدمیولوژیکی بسیار ارزشمند می باشند.

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

مقدمه

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

مولف مسئول: حسین عسگریان عمران- ساری: کیلومتر ۱۷ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی E-mail: asgarianhossein@yahoo.com
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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.17359260.1401.32.210.4.7]

است که موجب طیفی از بیماری‌ها به ویژه پنومونی‌های کشنده در انسان می‌شود و عامل همه‌گیری اخیر در سطح جهان است(۲،۱). ویروس *SARS-CoV-2* در دسامبر سال ۲۰۱۹ توسط سازمان بهداشت جهانی به عنوان عامل بیماری Coronavirus Disease of 2019(COVID-19) معرفی شد(۲،۱). 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). علایم شایع در افراد آلوده به ویروس *SARS-CoV-2* شامل علایم 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 آنتی ژن‌های متعددی بوده که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به آنتی‌ژن‌های Envelope (E)، Membrane (M)، Spike (S) و Nucleocapsid (N) اشاره نمود(۷،۶). 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 مارپیچی ویروس را شکل می‌دهد و به جایگیری نوکلئوکپسید شکل گرفته در ذره ویروسی منجر می‌شود(۹،۸). هر دو پروتئین S و N قادر به القای پاسخ ایمنی در بدن انسان بوده و در تست‌های سرولوژیک جهت تشخیص ویروس به‌کار می‌روند(۱۰). برای تشخیص این بیماری همانند سایر بیماری‌های عفونی، می‌توان از آزمایشات مختلف مبتنی بر شناسایی ژنوم ویروس و همچنین سنجش آنتی‌ژن‌ها وآنتی‌بادی‌های علیه آن استفاده نمود(۱۱). در حال حاضر ازتکنیک‌های 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 محدودیت های 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 می کند، 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 احتمالیCOVID-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 IgM، IgA و IgG توسط شرکت‌های معتبر بین‌المللی ارائه شده است. شناسایی آنتی‌بادی‌های IgG نشان‌دهنده یک عفونت مداوم یا حتی گذشته است، در حالی که آنتی‌بادی‌های IgM و IgA به‌عنوان نشانگرهای اولیه عفونت‌های حاد دستگاه تنفسی توصیف می‌شوند(۱۴). با توجه به اپیدمی گسترده این بیماری در ایران، این

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-05]

[DOR: 20.1001.1.17359260.1401.32.210.4.7]

مطالعه با هدف تولید نوترکیب آنتی‌ژن ویروس یک روش الایزای مناسب برای سنجش آنتی‌بادی‌های 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 جمعیت‌های مختلف مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش ها

تولید و تخلیص آنتی ژن نوکلئوکپسید ویروس SARS-CoV-2

در این مطالعه تجربی، با کد اخلاق IR.MAZUMS.REC.1399.114، اصول اخلاقی طبق دستورالعمل کمیته اخلاق کشوری و آیین‌نامه COPE رعایت شد، و توالی ژن نوکلئوکپسید کرونا ویروس جدید که در بانک اطلاعاتی NCBI موجود می‌باشد، استخراج گردید. این ژن ۱۲۶۰ نوکلئوتید بوده و پروتئین تولیدی آن به طول ۴۱۹ اسید آمینه می‌باشد. به منظور تولید پروتئین نوکلئوکپسید، 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 آنتی‌بیوتیک در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و با هوادهی در سرعت ۲۵۰ دور در دقیقه انکوبه شد. ۵۰۰ میکرو لیتر از محیط کشت فوق به ۵۰ میلی‌لیتر محیط LB مایع تلقیح و در شیکر انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد 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 جمع‌آوری و با استفاده از کلرید کلسیم ۱۰۰میلی‌مولار، سلول‌های مستعد تهیه شدند. پلاسمید بیانی نوترکیب حاوی ژن نوکلئوکپسید ویروس با روش شوک حرارتی به سلول‌های مستعد ترانسفورم شد. رسوب باکتری‌ها بر روی محیط LB آگار حاوی کانامایسین کشت داده شد و به‌مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. پس از تائید ترانسفورماسیون پلاسمید نوترکیب به باکتری‌های *E-coli* از کلون‌های رشد کرده در محیط LB براث به صورت شبانه، ۵۰ میکرولیتر به ۵ میلی‌لیتر محیط LB براث استریل حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین منتقل گردید. با توجه به این‌که بیان پروتئین نوترکیب در سویه BL21 تحت کنترل اپرون lac می‌باشد، 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 میلی‌مولار استفاده شد. پس از آن سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۲۰rpm در شیکر انکوباتور نگه‌داری گردید. نتایج بیان بر روی ژل ۱۲ درصد SDS-PAGE بررسی گردید. برای تخلیص پروتئین از ستون نیکل- نیتریلو استیک اسید (Ni-NTA) استفاده شد. با توجه به این‌که 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 میلی‌مولار برای شستشو و از بافر حاوی ایمیدازول ۲۵۰ میلی‌مولار به عنوان بافر الوشن خارج کننده پروتئین نوترکیب استفاده گردید. جهت تایید تخلیص پروتئین نوترکیب، خروجی‌های 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 به‌طور دائم با استفاده از مگنت یکنواخت گردید. این کار در دمای اتاق به‌صورت 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 موردنظر، محلول رویی به دست آمده از مرحله قبل، از فیلترهای آمیکون با منافذ ۱۰ کیلو دالتونی عبور داده شد.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.17359260.1401.32.210.4.7]

برای تایید خلوص و اختصاصیت پروتئین نوترکیب تولید و تخلیص شده، از روش‌های SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ استفاده گردید. برای تایید پروتئین نوترکیب از تکنیک وسترن بلاتینگ با آنتی‌بادی 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 گلایسین ۱۹۲ میلی‌مولار، تریس ۲۵ میلی‌مولار، 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 آنتی‌بادی ضد His-tag (HRP-conjugated mouse His-tag antibody) (سایتومتین ژن- اصفهان- ایران) با رقت ۱/۱۰۰۰ در حالت shaking انکوبه شد. آنتی‌بادی‌ها در محلول TBST رقیق شدند. پس از انکوباسیون با آنتی‌بادی، آنتی‌بادی خارج و کاغذ ۳ مرتبه و هر بار به مدت ۵ دقیقه با TBST شستشو داده شد. جهت نمایان کردن باندهای پروتئین‌های مورد نظر از کیت ECL (سایتومتین ژن) استفاده شد. میزان مساوی از یک میلی‌لیتر 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 نوترکیب 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 آنتی‌بادی های اختصاصی IgG و IgM علیه ویروس SARS-CoV-2

پس از خالص‌سازی آنتی‌ژن نوکلئوکپسید و تعیین خصوصیت آن، از آنتی ژن به دست آمده برای طراحی روش ELISA غیرمستقیم برای شناسایی آنتی‌بادی‌های اختصاصی علیه ویروس *SARS-CoV-2* استفاده شد. برای انجام الایزای غیرمستقیم، هر چاهک پلیت ۹۶ تایی الایزا پس از بهینه‌سازی مراحل مختلف، با غلظت ۵ µg/ml پروتئین نوترکیب نوکلئوکپسید در بافر PBS به صورت شبانه انکوبه کوت شد. پس از مرحله‌ی بلاکینگ با کازئین ۱ درصد در بافر PBS به‌مدت ۱/۵ ساعت انکوبه روی شیکر، به چاهک‌ها 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 آنتی‌بادی بزی ضد آنتی‌بادی انسانی (Sigma, Missouri, USA) به صورت انکوباسیون ۳۰ دقیقه‌ای در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. سپس از محلول سوبسترا- کروموژن TMB به عنوان ماده رنگ‌زا در واکنش استفاده شد و از محلول اسید H_2SO_4 با نرمالیتی ۲ به عنوان محلول متوقف کننده واکنش استفاده شد. در انتها چاهک‌ها با طول موج ۴۵۰ نانومتر به همراه ۶۳۰ نانومتر به عنوان طول موج رفرنس خوانش شد. بر اساس جذب نوری (OD) به‌دست آمده نتایج مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای شناسایی IgG از کونژوگه اختصاصی anti-human IgG متصل به HRP، وبرای شناسایی IgM از کونژوگه اختصاصی anti-human IgM متصل به HRP استفاده گردید.

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

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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-05]

[DOR: 20.1001.1.17359260.1401.32.210.4.7]

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 آنتی‌بادی اختصاصی IgM و IgG علیه ویروس *SARS-CoV-2* در خون خود بودند. همچنین از ۳۱ نمونه سرم افرادی که فاقد آنتی‌بادی اختصاصی می‌باشند (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 داده‌ها

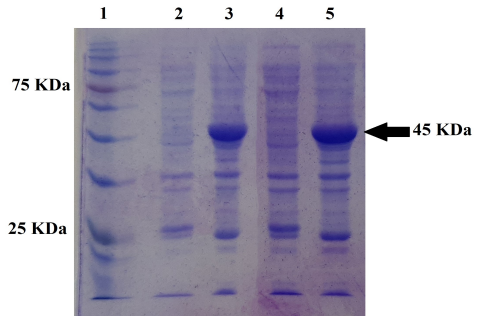
در این مطالعه برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از دو نرم‌افزار SPSS-25 و Graphpad Prism-6 استفاده شد و برای بررسی همبستگی بین نتایج از آزمون پیرسون استفاده گردید. همچنین برای بررسی حساسیت و ویژگی روش طراحی شده از آنالیز ROC Curve استفاده شد.

یافته ها

بیان و تخلیص پروتئین نوکلئوکپسید ویروس SARS-CoV-2

با القای بیان پروتئین N تحت کنترل اپرون lac در شرایط انکوباسیون استاندارد، باکتری‌های القاء شده و القاء نشده جمع‌آوری و شکسته شدند. سپس کل محتوای پروتئینی باکتری روی ژل ۱۲ درصد SDS-PAGE الکتروفورز شد. در نمونه‌های القاء شده، پروتئین N با بیان بالا مشاهده گردید و در نمونه‌های القاء نشده باند مربوط به پروتئین هدف وجود نداشت (تصویر شماره ۱).

بعد از بیان پروتئین، فاز محلول و نامحلول حاصل از سانتریفوژ لیزات سلولی، بر روی ژل ۱۲ درصد SDS-PAGE ران شد. همان‌طورکه 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 کنجاله‌های نامحلول (Inclusion Bodies) است. به همین دلیل، از اوره ۸ 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 میلی‌مولار 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

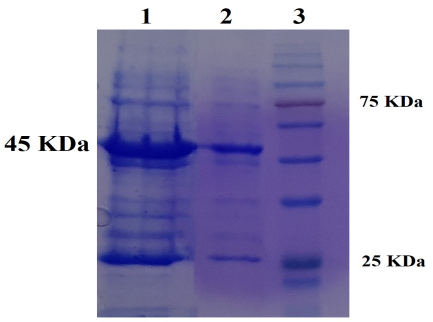
۱. نشانگر مولکولی پروتئین (Protein Ladder)

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.



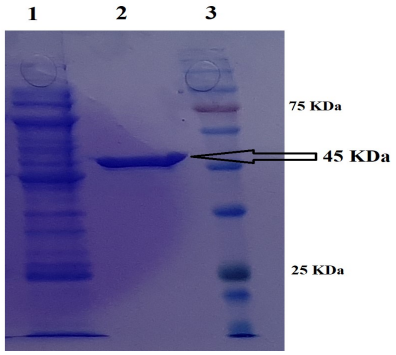
تصویر شماره ۲: الگوی الکتروفورز تبدیل پروتئین نامحلول به محلول با اوره ۸ مولار بر روی ژل ۱۲ درصد SDS-PAGE

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).

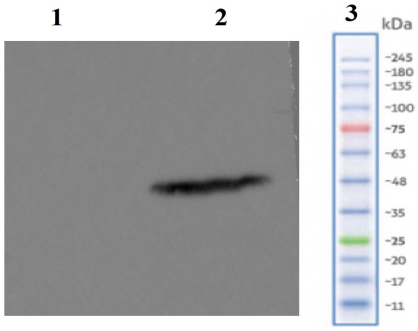
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.17359260.1401.32.210.4.7]



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 بلاتینگ با استفاده از آنتی بادی ضد His-tag

در پایان به منظور بررسی صحت پروتئین نوترکیب N از آنالیز وسترن بلاتینگ 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 بلاتینگ و با استفاده از anti-His-Tag antibody
۱. کنترل منفی (پروتئین BSA)، ۲. پروتئین نوکلئوکپسید نوترکیب تخلیص شده، ۳. نشانگر مولکولی پروتئین (Protein Ladder).

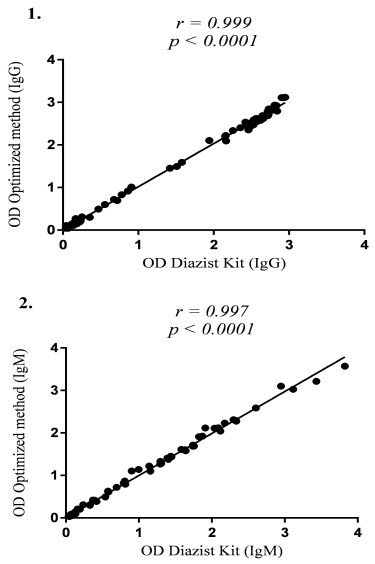
مقایسه سنجش میزان آنتی بادی های IgM و IgG علیه SARS-CoV-2 با استفاده از کیت طراحی شده و تجاری

در ابتدا لایه‌های مختلف روش ELISA اعم از غلظت آنتی‌ژن برای لایه کوتینگ، محلول بلاکینگ، محلول رقیق‌کننده نمونه سرم، رقت مورد استفاده از سرم و در نهایت رقت کونژوگه مورد نظر بهینه‌سازی شد. بر اساس نتایج به‌دست آمده از آزمون‌های انجام شده سریالی مناسب ترین غلظت آنتی‌ژن متصل شده به فاز جامد در هر دو روش سنجش IgG و IgM مقدار ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر 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 پروتئین‌های 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 مناسب‌ترین 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 رقت‌های مختلف سریالی از سرم، ۱/۱۰۰ انتخاب گردید. علاوه بر این مناسب‌ترین تیتر آنتی‌بادی کونژوگه علیه IgG و IgM انسانی ۱/۳۰۰۰ تعیین شد.

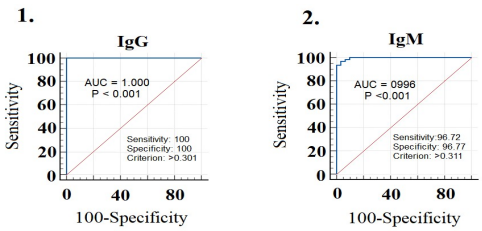
پس از بهینه‌سازی آزمون ELISA با آنتی‌ژن تولید شده در این مطالعه، سنجش آنتی‌بادی‌های IgG و IgM علیه *SARS-CoV-2* برای ۶۱ فرد بیمار و ۳۱ فرد سالم به‌عنوان گروه کنترل مورد مطالعه انجام گرفت. به منظور بررسی صحت و دقت این روش طراحی شده، میزان آنتی‌بادی‌های IgG و IgM علیه *SARS-CoV-2* با کیت تجاری مورد تایید وزارت بهداشت (شرکت دیازیست) مطابق پروتکل شرکت‌سازنده سنجیده و با نتایج به دست آمده با روش طراحی شده مقایسه گردید. همان‌طورکه در تصویر شماره ۵ مشاهده می‌شود، همبستگی کاملا مثبت و معنی‌داری بین OD های به‌دست آمده در سنجش IgG و IgM با روش طراحی شده و کیت دیازیست وجود دارد. علاوه بر این، از آنالیز منحنی راک (ROC Curve) برای بررسی حساسیت و ویژگی روش طراحی شده در

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.17359260.1401.32.210.4.7]

برابر روش استاندارد (کیت دیازیست) 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 الایزای 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 الایزای طراحی شده و کیت تجاری مورد تایید وزارت بهداشت (شرکت دیازیست) مورد سنجش قرار گرفت. جذب نوری (OD) به دست آمده از نتایج الایزای 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

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. همان‌طورکه 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 طوری‌که 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 گذشته نگر

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.17359260.1401.32.210.4.7]

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 به‌طور معنی‌داری 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 علایم دیگر، نداشتن همخوانی دو تست مولکولی با هم به‌دلیل نتیجه مثبت یا منفی کاذب یکی از دو تست، می‌تواند کمک‌کننده باشد. همچنین با توجه به این‌که به‌طور میانگین میزان ژنوم ویروس از روز یازدهم روند کاهشی و میزان تولید آنتی‌بادی 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 آنتی‌بادی‌های 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 آنتی‌بادی IgM و IgG به‌طور غیرمستقیم در خون طراحی و تولید شدند. مطالعات محدودی حاکی از این هستند که کیت‌های سنجش آنتی‌بادی 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 غالبا بر پایه پروتئین S و N می‌باشند. در همین راستا، در مطالعه‌ای که روی بیماران مبتلا به SARS انجام گرفت، تفاوت معنادار تولید آنتی‌بادی علیه پروتئین S و N را نشان دادند، به‌طوری‌که پاسخ آنتی‌بادی 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 ومقایسه 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 پروتئین های 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 به‌طور معنی‌داری بیش‌تر 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 آنتی‌بادی‌های 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 می شود 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 کلوئیدال (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 و GICA (IgM + IgG) تفاوت معنی‌داری 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 می تواند به دلیل تفاوت در کیت استانداردی که برای مقایسه نتایج انتخاب شده است، باشد.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-05]

[DOR: 20.1001.1.17359260.1401.32.210.4.7]

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 مصونیت زا مشخص نشده است. با توجه به 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).

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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.17359260.1401.32.210.4.7]

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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-05]

[DOR: 20.1001.1.17359260.1401.32.210.4.7]