# جدا سازی باکتری ویبریو کلرا O-1 با استفاده از نانوذرات مغناطیسی عامل‌دار شده

**جمال رشیدیانی[1]، مهدی کمالی[2]، رضا رنجبر[*3]، حمید رضا جوادی[1] سید حسن حسینی[1]**

1. پژوهشگر مرکز تحقیقات نانوبیوتکنولوژی، دانشگاه بقیه‌اله(عج)
2. استادیار مرکز تحقیقات نانوبیوتکنولوژی، دانشگاه بقیه‌اله(عج)
3. دانشیار باکتری شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه اله(عج)

*** نشانی برای مکاتبه:** تهران، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه اله(عج) ranjbarre@gmail.com

دریافت مقاله: شهریور نود پذیرش برای چاپ: خرداد نود و یک

## چکیده

**سابقه و هدف:** *وبا یک بیماری عفونی ناتوان‌کننده است که توسط گونه‌های ویبریو کلرا O-1 و ویبریو کلرا O-139 ایجاد می‌گردد. روش‌های شناسایی عامل این بیماری اغلب زمان‌بر بوده و مستلزم صرف هزینه های بسیاری است. هدف از این تحقیق جداسازی باکتری ویبریو کلرا O-1 با استفاده از روش جداسازی مغناطیسی زیستی بود.*

**روش کار:** *در این مطالعه آنتی‌بادی پلی‌کلونال علیه آنتی‌ژن سطحی باکتری (ompW) بر روی نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن تثبیت و توسط آن اقدام به جداسازی باکتری از محیط شد. فرایند تثبیت با استفاده از MUA-11 و در حضور EDC و NHS صورت گرفت. جهت تایید فرایند تثبیت از دو روش طیف سنجی با استفاده از FTIR و پروتئین سنجی با روش براد فورد استفاده شد. سویه‌های باکتری از نمونه‌های بالینی دو مرکز درمانی تهران جمع‌آوری و با استفاده از روش‌های بیوشیمیائی مورد شناسایی قرار گرفت.*

**یافته‌ها:** *عامل‌دار شدن نانوذرات اکسید آهن به وسیله‌ی آنتی‌بادی علیه ompW با موفقیت انجام گرفت. با افزودن نانوذرات به محیط حاوی باکتری و اعمال میدان مغناطیسی باکتری از محیط بافری جداسازی شد. این روش قادر به جداسازی باکتری ویبریو کلرا O-1 تا رقت 2cfu از محیط بافری بود. کشت باکتری‌های متصل شده به نانوذرات در محیط‌های اختصاصی صحت جداسازی را تایید کرد.*

**نتیجه‌گیری:** *نتایج نشان داد که این روش در مقایسه با سایر روش‌های جداسازی از قدرت بالایی برخوردار است.*

**واژگان کلیدی: *ویبریو کلرا، پروتئین‌های سطحی (omp)، آنتی‌بادی پلی‌کلونال، وبا، جداسازی مغناطیسی زیستی***

## مقدمه

بیماری وبا به صورت تک‌گیر، همه‌گیر و عالم‌گیر به وقوع پیوسته است. دوره‌ی نهفتگی آن از یک تا پنج روز می‌باشد. شروع بیماری معمولاً ناگهانی و با اسهال و استفراغ شدید همراه است، افت شدید درجه حرارت، از بین رفتن آب و املاح، کبودی پوست، انقباض شدید عضلات، فشارخون پائین، نبض تند و ضعیف، کاهش ادرار و تکرر مدفوع آبکی، دهان خشک و چشمان فرورفته و پوستی چروکیده را به دنبال دارد. بیماری 5-2 روز طول کشیده و مرگ و میر ناشی از آن در صورت عدم مداوا بسیار بالا می‌باشد(1و2).

رابرت کخ برای اولین بار طی پاندمی پنجم، این باکتری را از مدفوع بیماران مصری جدا نمود و سال بعد همان میکروب را از مدفوع بیماران هندی نیز بدست آورد(1و3). بیماری وبا از قرن‌ها پیش در برخی نواحی شرقی آسیا و خاور دور به صورت بومی وجود داشته و تا کنون هفت بار باعث همه گیری‌های وسیعی در نواحی مختلف دنیا شده است(4-2).

باکتری ایجاد کننده بیماری از خانواده‌ی ویبریوناسه‌ها می‌باشد که باسیل‌هایی هستند مستقیم یا خمیده، متحرک و دارای تار لرزان قطبی، فاقد کپسول و اسپور، کیموارگانوتروفو، بی‌هوازی اختیاری که مقدار گوانین+ سیتوزین آن‌ها 38 الی60 درصد می‌باشد. ویبریوکلرا در آب شور و شیرین یافت شده، pH=7-9 را تحمل می‌کند و برای انسان و برخی آب زیان بیماری‌زا می‌باشد(7-5). این باکتری بی‌هوازی اختیاری است و در غیاب کامل هوا رشد نمی‌کند. دامنه رشد آن بین 16 -42°C بوده و بهترین درجه حرارت برای رشد آن 37°C درجه می‌باشد. بر روی محیط‌های ساده مثل آب پپتونه به خوبی رشد کرده و پس از 12-6 ساعت پرده نازکی بر روی آن تشکیل می‌دهد. روی محیط (T.C.B.S) Thisoulfate Citrate Bile Salt Sucrose Agar پس از 24 ساعت پرگنه‌های شفاف زرد رنگ محدبی به قطر 1 تا 2 mm تولید می‌کند. انواع زیادی از باکتری‌ها در این گروه قرار می‌گیرند که متجاوز از صد نوع می‌باشند. اکثراً ساپروفیت بوده و تنها نوع O1 و O139 بیماری‌زا می‌باشند(7و8). شناسائی این باکتری به حداقل 3 الی 5 روز کاری نیاز دارد. روش‌های غربالگری و شناسائی کنونی مبتنی بر روش‌های سنتی بوده و تکنیک‌های نوین نیز هیچ یک قادر به کاهش زمان تشخیص تا زیر یک روز کاری و حذف مرحله غنی‌سازی نیستند(3).

می‌توان نانوذرات مغناطیسی را بسته به نوع نیاز تغییر داد، به عنوان مثال، خصوصیت شیمیایی ویژه، فعالیت نوری منحصربه‌فرد و یا پاسخ‌های آهن ربایی قوی از آن‌ها دریافت کرد. فن اوری جداسازی مغناطیسی روش قدرتمندی است که به طور وسیع برای تغلیظ و جداسازی طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زا از نمونه‌های محیطی، غذا، آب و نمونه‌های بالینی مورد استفاده قرار گرفته است(۵،۷،۸). مهم ترین مزیت جداسازی مغناطیسی زیستی یا Immuno Magnetic Separation (IMS) جداسازی سریع و هم زمان عوامل مورد نظر و مهار آن‌ها از محیط‌های آبی در حضور میدان مغناطیسی است. IMS جایگزین خوبی برای روش‌های جداسازی مرسوم فعلی است. مزایای این روش شامل: کمک به شناسائی باکتری، بهبود حساسیت تشخیص، تشخیص همزمان چند باکتری، سادگی مراحل کاری، صرفه جوئی در زمان و کاهش نیروی انسانی می شود.

این مطالعه با هدف جدا سازی باکتری ویبریو کلرا O-1 با استفاده از نانوذرات مغناطیسی عامل‌دار شده انجام شد.

## روش کار

مقدار 20µg از نانوذره اکسید آهن تولید شده در تحقیق قبلی انجام شده توسط تیم تحقیق کنونی به نسبت حجمی یک به دو با 11 - mercaptoundecanoic acid (11-MUA) مخلوط شد.- محلول 11-MUA در اتانول 96 درصد تهیه شد- و در شرایط خاص ( دور از نور مستقیم و اکسیژن آزاد ) به مدت 12 ساعت به هم‌زده شد. این عمل باعث اتصال 11–MUA از ناحیه گروه تیول خود به سطح طلای نانوذرات گردید، و سر دیگر آن که حاوی گروه‌های کربوکسیلی بود، در معرض عوامل محیطی دیگر قرار گرفت. قبل از انجام آزمایش، 200µl از بافر (N Morpholinoethanesulfonic acid ( MES)-2 نیم مولار با pH=6/1 و با 400µl محلول N- 50mg/ml Hydroxysuccinimide ester (NHS) به اندازه کافی هم‌زده شد. سپس 20mg/ml از نانوذره کربوکسیله فوق تحت شرایط هم زدن شدید به آن اضافه گردید. سپس 300µl محلول آبی EDC 10mg/mlسریعاً به آن افزوده شد و در دمای اتاق به مدت 45 دقیقه عمل هم‌زدن محلول بی‌وقفه ادامه یافت(9). پس از شستشو، نانوذرات را در 1/2 ml محلول MES حل کرده و 200µl از محلول IgG، تهیه شده در کار قبلی انجام شده توسط تیم تحقیق کنونی، با غلظت 10 mg/ml به آن افزوده و در دمای اتاق به مدت یک ساعت به آرامی هم‌زده شد. این عمل موجب اتصال نانوذرات به آنتی‌بادی گردید(10). نانوذرات متصل شده به آنتی‌بادی با استفاده از آهن‌ربا جمع آوری و با استفاده از بافر MES سه مرتبه به آرامی شستشو داده شد. نمونه در این حالت در بافر MES و درون یخچال قابل نگهداری بود. اتصال آنتی‌بادی به نانوذرات با دو تکنیک FTIR و پروتئین سنجی از نانوذرات در دو حالت: با حضور EDC و در غیاب EDC بررسی شد.

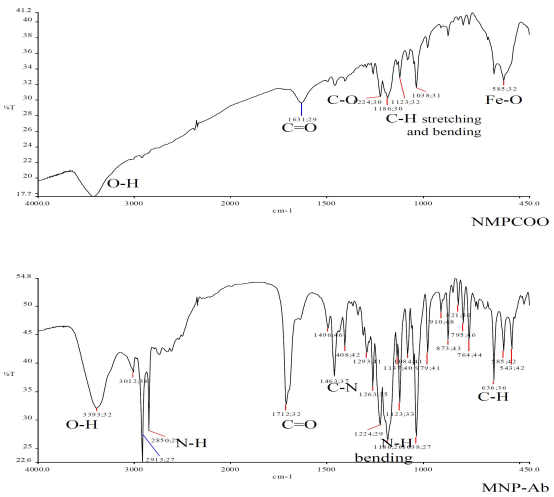
رقتی از باکتری ویبریو کلرا در محلول PBS که در $OD_{640\,nm}$ جذب 0/5 ایجاد نماید تهیه شد. بعد از نمونه‌ی فوق رقت‌های متوالی تهیه شد و به هریک از رقت‌های فوق از نانوذرات عامل‌دارشده مرحله قبلی 10µg افزوده و پس از 30 دقیقه گرماگذاری در 20 درجه‌ی سانتی‌گراد اقدام به آزمایش گردید.

با اعمال میدان مغناطیسی اقدام به شستشوی نانوذرات شد. رسوب حاصل از شستشو در محیط TCBS کشت داده شد.

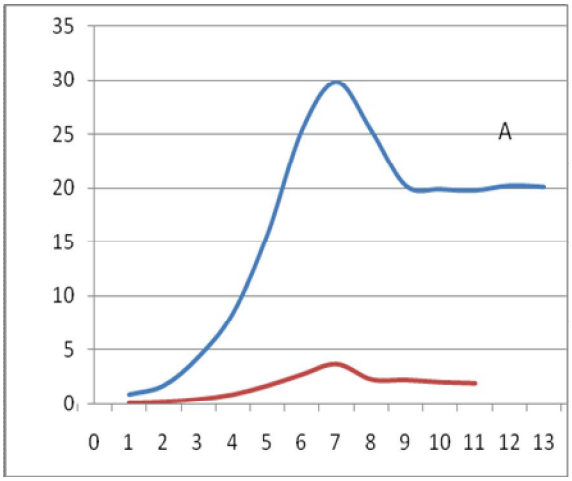
## یافته‌ها

آزمایش برادفورد غلظت آنتی‌بادی علیه ompW را به میزان 0/25µg/µl نشان داد. آزمون طیف‌سنجی FTIR عامل‌دار شدن نانوذرات را تایید نمود که نتیجه‌ی آن در شکل 1 ارائه شده است. همچنین آزمون برادفورد میزان اتصال کولانسی IgG به نانوذرات را 10 برابر جذب سطحی نشان داد (نمودار1). بررسی کشت 24 ساعته ویبریو کلرا O1، قدرت جداسازی باکتری توسط نانوذرات را 2cfu ارزیابی کرد.

**شکل1 عامل‌دار شدن نانوذرات: در طیف پایینی وجود پیک‌های کششی و خمشی N-H و C-N که در طیف قبلی نبود تائیدی بر تثبیت پروتئین می باشد.**




**نمودار 1 : سنجش پروتئین با روش برادفورد نشان داد که اتصال IgG به نانوذرات در حضور EDC (نمودارA)،10 برابر بیشتر از حالت بدون EDC (نمودارB) بود.**



## بحث

روش‌های مختلف از قبیل از قبیل جذب سطحی، پیوند الکترواستیکینگ و یا اتصال کووالانی برای عامل‌دار نمودن نانوذرات ارائه شده است. اتصال کوولانی گروه‌های عاملی بر روی نانوذرات محکم و ثابت بوده، و در دما و pH طبیعی کاملاً پایدار می‌باشد. این روش اتصال باعث دوام بیشتر گروه‌های عاملی می‌شود.

برای اتصال آنتی‌بادی‌ها به نانوذرات عده‌ای از آویدین و یا استرپتوآویدین به همراه بیوتین استفاده نموده‌اند. تمایل اجزای بیوتین و آویدین، اتصال عامل به سطح را تسهیل می‌نماید. ولی اتصال منجر به بزرگ شدن سامانه ، در این راستا مرسوم شده است. این مولکول‌های تاجی شکل به مثابه قالبی برای نگهداری آنتی‌بادی عمل می‌نمایند و اجازه تثبیت غلط را از آن سلب می‌کنند(13).

هریک از روش‌های فوق مزایای بسیاری را به همراه دارند، ولی به دلیل بالا بودن هزینه‌ها، استفاده از روشی دیگر با کارایی بالا و هزینه‌ی کم در دستور کار قرارگرفت. استفاده از اتصال دهنده‌های مرکاپتوآندکانوئیک، برای اتصال بیومولکول‌ها بر روی الکترود طلا فراون مورد استفاده قرار گرفته است(14).

11-MUA، یک ترکیب اسیدی با 11 کربن و دو گروه عاملی، گروه کربوکسیلی در یک سر و گروه تیولی در سمت دیگر، می‌باشد. این ماده در دما و شرایط آزمایشگاه می‌تواند با خودآرائی بر روی نانوذرات قرار گرفته و از سمت تیول به طلا اتصال یابد و سر دیگر خود را در معرض واکنش با عوامل دیگر قرار دهد. بر خلاف گروه تیول که به راحتی با طلا اتصال برقرار می‌کند، گروه کربوکسیلی آن به حدی از نظر آنتاپی پایدار است که برای انجام واکنش با گروه های آمیدی نیاز به افزایش دما و یا استفاده از کاتالیزور دارد، که این شرایط برای محیط‌های زیستی کشنده است. EDC در حضور NHS و یا Sulfo-NHS باعث فعال شدن 11-MUA می‌شود. EDC پس از انجام واکنش پپتیدی بین 11-MUA و آنتی‌بادی مانند یک آنزیم از واکنش خارج می‌گردد(15).

روش جدا سازی زیستی تکنیکی کمکی است که جهت بالا بردن دقت و سرعت در کارهای تشخیصی به کار برده می‌شود ولی به تنهایی قادر به آشکار سازی نیست. گروه‌های تحقیقی دیگر، آن را به همراه روش‌های دیگر تشخیصی بکار برده و موجب بهبود و ارتقای تشخیص شده‌اند.

می‌گردد. از آنجا که جهت اتصال آنتی‌بادی به بستر بسیار حائز اهمیت است، اتصال باید حتی‌الامکان از ناحیه‌ی Fc انجام پذیرد در غیر این‌صورت آنتی‌بادی خاصیت خود را از دست خواهد داد(11). محققین برای حل این مسئله با استفاده از پروتئین G و یا پروتئین A استافیلوکوکی اقدام به تثبیت آنتی‌بادی روی بسترها نموده‌اند. این دو نوع پروتئین تمایل فراوانی به ناحیه Fc آنتی‌بادی از خود نشان می‌دهند، و از سوی دیگر با جذب سطحی روی بستر عملاً آنتی‌بادی را در جهت صحیح تثبیت می‌نمایند(12). اخیراً استفاده از کالیکس، سوپرامولکولی است با تعداد کربن‌های متفاوت

آرویلند و همکارانش آن را به همراه میکروسکوپ فلورسنس برای شناسائی اشرشیا کلی بکار بردند(16). چاپمنChapman و همکارانش از آن به همراه کشت مستقیم(17) و بلاک‌بورن، کوجو، مانسفیلد، کارلوس و دانکانسون از آن به همراه الایزا بهره گرفته‌اند(18). گانگمین وینتروب، ریسپن، جنی‌کاوا ، هیش، تسن، مرکانگلو ، فنوتزون، وارین، و موریرا از آن به همراه PCR استفاده کرده‌اند. فاو و همکارنش، از آن به همراه RT-PCR استفاده نموده‌اند، گرند و پیل آن را با کمی‌لومینسانس تواماً بکار برده‌اند. یو و برونو از آن به همراه فلوسایتومتری استفاده نموده‌اند. سانتونی به همراه اسپکتروسکوپی جرمی از آن استفاده نمود. لینگلی چن و همکارانش از MS/SPR برای شناسایی باکتری‌های آلوده کننده مواد غذایی استفاده نمودند. در این تحقیق از IMS به همراه کشت مستقیم استفاده شد که ضمن تغلیظ باکتری مرحله غنی سازی را حذف نموده است(19). روش فوق ضمن کاهش هزینه‌ها و کوتاه‌تر کردن زمان شناسایی قطعی باکتری، حد تشخیص زا تا حدود 2cfu ارتقاء بخشید.

## نتیجه‌گیری

عامل‌دار شدن این نانوذرات در غلظت 0/7 µg/µl آنتی‌بادی خالص بیشترین اتصال کووالانی را برقرار نمود. با استفاده از این سامانه باکتری ویبریو کلرا O1 به طور موفقیت آمیزی از محیط آبی جداسازی شد. این تکنیک در ترکیب با روش‌های تشخیصی دیگر می‌تواند برای شناسائی باکتری عامل وبا بکار رود و جایگزین روش‌های غنی سازی قبلی باشد.

## REFERENCES

1. Das, M., et al., Antisera to selected outer membrane proteins of Vibrio cholerae protect against challenge with homologous and heterologous strains of V. cholerae. FEMS Immunol Med Microbiol, 1998. 22(4): p. 303-8.

2. Finkelstein, R.A., Cholera, Vibrio cholerae O1 and O139, and Other Pathogenic. 1996.

3. Faruque, S.M., et al., Seasonal epidemics of cholera inversely correlate with the prevalence of environmental cholera phages. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(5): p. 1702-7.

4. TAKAHIRO, T., Improvement of the Immunomagnetic Separation Method Selective for Escherichia coli O157 Strains. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 1998. 64(1): p. 376–382.

5. Dryselius, R., K. Kurokawa, and I. Tetsuya, Identification and Strain Differentiation of Vibrio cholerae by Using Polyclonal Antibodies against Outer Membrane Proteins. Research in Microbiology 2007. 158: p. 479-480.

6. Huq, A., et al., Detection of Vibrio cholerae O1 in the aquatic environment by fluorescent-monoclonal antibody and culture methods. Appl Environ Microbiol, 1990. 56(8): p. 2370-3.

7. Mukerjee, S., Characterization of cholera typing phages. IV. Phage-resistant mutants of Vibrio cholerae. Ann Biochem Exp Med, 1962. 22: p. 1-4.

8. Chatterjee, S.N. and K. Chaudhuri, Lipopolysaccharides of Vibrio cholerae III. Biological functions. Biochimica et Biophysica Acta 2006: p. 1-16.

9. wenche, s.P., et al., Preparation and application of mono- sized particles in selective cell separation. 1997: p. 11-35.

10. Jeong, W.C., et al., Charge Storage in Redox-active Azurin Monolayer on 11-MUA Modified Gold Surface. biochip journal, 2009. 32(2).

11. Jung, k.C., et al., Immobilization of biomolecules on biotinylated magnetic ferrite nanoparticles. Chemical Physics Letters 2006. 428(1-3): p. 125-129.

12. Halfpenny, K.C. and D.W. Wright, Nanoparticle detection of respiratory infection. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol, 2010. 2(3): p. 277-90.

13. Grote Gansey, M.H., et al., Conjugation, immunoreactivity, and immunogenicity of calix[4]arenes; model study to potential calix[4]arene-based Ac3+ chelators. Bioconjug Chem, 1999. 10(4): p. 613-23.

14. Da, J.Y., et al., A biochemical sensing system using an 11-MUA/calix[6]arene bilayer to sense amine vapors. Micromechanics and Microengineering 2007. 17(8): p. 1435.

15. Chaiamnuay, S., et al., Health-related quality of life and disease severity of SLE patients in Phramongkutklao Hospital. J Med Assoc Thai, 2010. 93 Suppl 6: p. S125-30.

16. Lund, A., A.L. Hellemann, and F. Vartdal, Rapid isolation of K88+ Escherichia coli by using immunomagnetic particles. J Clin Microbiol, 1988. 26(12): p. 2572-5.

17. Olsvik, O., et al., Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology. Clin Microbiol Rev, 1994. 7(1): p. 43-54.

18. Patel, P.D. and C. Blackburn, Detection of foodpoisoning agents using mmunomagnetic particles, . Wordsmiths' Conference Publications, Somerset, England, 1991. 93-105.

19. Chen, L., et al., Immunomagnetic separation and MS/SPR end-detection combined procedure for rapid detection of Staphylococcus aureus and protein A. Biosens Bioelectron, 2007. 22(7): p. 1487-92.