

## تهیه کنژوگه‌های مختلف از سم T-2 و تولید آنتی‌بادی علیه T-2

محمدعلی عارف پور \* M.Sc.، محمد باقر صالحی \* M.Sc.، مهناز سجادی \* M.Sc.،  
جعفر سلیمیان \* M.Sc.

### چکیده

**هدف:** بررسی اثر کاربرهای مختلف بر تولید آنتی‌بادی علیه سم T-2.

**روش بررسی:** این ترکیب با وزن مولکولی پایین یک هاپتن (Hapten) محسوب می‌گردد، لذا لازم است به یک کاریر (Carrier) مناسب اتصال یابد. بدین منظور این مولکول به سه کاریر BSA, KLH و Poly Lysine متصل گردید. در این روش ابتدا BSA، Poly Lysine و KLH سوکسینه به گروه هیدروکسیل سم T-2 وصل شد. سپس برای تهیه آنتی‌بادی علیه T-2، کنژوگه‌های BSA-T-2 و KLH-T-2 به‌طور جداگانه به ده سر موش Balb/c تزریق گردید. در مرحله اول یک دوز ۲۰ میکروگرم از کنژوگه همراه CFA (ادجوان کامل فروند) به صفاق موشها تزریق گردید و بوسترها با فاصله سه هفته‌ای با IFA (ادجوان ناقص فروند) صورت گرفت. در فواصل بین بوسترها و پس از تزریق بوستر چهارم از موشها خونگیری به عمل آمد. سرم آنها جدا و الیزای غیر مستقیم انجام شد.

**یافته‌ها:** هر چند موشها در برابر کنژوگه BSA-T-2 ایمن شده بودند اما در نهایت سرم آنها BSA (کاریر) را به مراتب بهتر از T-2 (هاپتن) شناسایی می‌کردند. اما در مورد کانژوگه KLH-T-2، سرم موشها T-2 (هاپتن) را بهتر از KLH (کاریر) مورد شناسایی قرار می‌داد. همچنین سرم این موشها هنگامی که با کنژوگه‌های BSA-T-2 و Poly Lysine-T-2 مجاور می‌شدند به خوبی سم T-2 را مورد شناسایی قرار می‌دادند.

**نتیجه‌گیری:** نتیجه حاصل از این تحقیق نشان دهنده این بود که کاریر KLH از آنجایی که یک ادجوان قوی بوده و دارای جایگاههای اتصال بیشتری برای سم T-2 نسبت به کاریر BSA می‌باشد، لذا ایمنی زایی و تیتراژ آنتی‌بادی آن خیلی بیشتر است.

**واژه‌های کلیدی:** سم T-2، کنژوگه، BSA، KLH، آنتی‌بادی، الیزا

### مقدمه

دندروکوئیم تولید می‌شود، سم T-2 و مشتقات آن به خاطر سمیت بالا برای انسان و دام مورد توجه بیشتری قرار دارند. از آنجایی که زیستگاه قارچ‌ها و کپک‌های تولید کننده این سم غلات

در میان سموم قارچی تریکوآتسنی که توسط گونه‌های مختلف فوزاریوم، تریکودرما، آکرومونیم، تریکوآستیم، استاکی بوتریس،

دریافت مقاله: ۱۳۸۳/۹/۱۵، پذیرش مقاله: ۱۳۸۴/۹/۲۳

\* نویسنده مسئول: کارشناس ارشد گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین «ع»، تهران - ایران

آدرس: گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین «ع»

آدرس پست الکترونیکی: [Jsoleman@ihu.ac.ir](mailto:Jsoleman@ihu.ac.ir)

## روش بررسی

کلیه مواد از شرکت سیگما خریداری گردید.

T-2 Toxin (T4887), Succinylated KLH (H5654), KLH (H7017), IFA (F5506), CFA (F5881), Poly lysine (P 7890), Anti mouse Ig G-HRP (A0168), EDAC (E 1769), BSA (A 2058)

**تهیه کنژوگه KLH-T-2.** برای تهیه کنژوگه KLH-T-2

از روش (Chu F.S (1979) و همکاران با اعمال تغییرات خاصی استفاده شد. KLH سوکسینه حاوی تعداد زیادی اسید آمینه لیزین می باشد که شاخه های جانبی آنها می توانند در واکنش اتصال شرکت کنند و برای ایجاد اتصال مناسب تر یک Linker سوکسینیل به KLH وصل شده است. در ساختمان T-2 یک عامل هیدروکسیل در جایگاه کربن شماره سه حضور دارد که قابلیت پیوند استری با عامل سوکسینیل دارد و در حضور عوامل فعال کننده مانند کاربودی ایمیدها می توان این پیوند را برقرار کرد. به طور خلاصه این کار به شکل زیر صورت گرفت: مقدار ۵ میلی گرم از سم T-2 در آب و کلروفورم (۲۰٪) حل گردید و بتدریج و در حال هم زدن، به محلول ۵ میلی گرم Succinyl KLH افزوده شد و در نهایت به این محلول ۵ میلی گرم EDAC اضافه شد و سه ساعت مهلت داده شد تا واکنش پیشرفت کند. پایان واکنش در حال هم زدن از سوسپانسیون، نیم میلی لیتر از آن برای مطالعات HPLC برداشته شد و باقیمانده سوسپانسیون در مقابل آب مقطر دیالیز و سپس لیوفیلیز گردید. (۳)

HPLC. برای سنجش میزان T-2 آزاد در سوسپانسیون در پایان واکنش (T-2 اتصال نیافته)، از روش Omurtag GZ (2000) استفاده شد. (۵،۶) شرایط HPLC بدین شرح است:

- Mobile phase: Acetonitrile- H<sub>2</sub>O 1:1, TFA 0.1%
- Colum:Nucleosil, 10mm, C18, I.D=4.6 mm, L=250mm , c) Wave length: 200nm , S=0.02
- flow rate: 1ml/min

**تهیه کنژوگه BSA-T-2 و Poly Lysine-T-2.** از روش (Fan T.S.L (1988) و روش (Chu F.S 1979) با اندکی تغییرات استفاده شد. (۳-۵)

و غذای انسان و دام می باشد امکان مسمومیت انسان و دام با این سم زیاد می باشد. (۱،۲) این سم یک ترکیب شیمیایی از خانواده ترین ها (سزکوئی ترپنوئید) بوده و وزن ملکولی آن ۴۶۶ دالتون می باشد. سم T-2 علاوه بر مهار سنتز پروتئین، بر روی غشاء سلولی و اسیدهای نوکلئیک نیز تاثیر دارد و دارای اثرات کارسینوژنیک، تراژوژنیک و موتاژنیک است. مسمومیت با این سم عوارض خطرناکی برای انسان دارد که از علایم مسمومیت با آن می توان به اختلال در سیستم اعصاب مرکزی، شروع سریع تهوع و استفراغ، تب و لرز، نکروز اپیتلیومها، تضعیف مغز استخوان اشاره کرد که در نهایت به مرگ مسموم منتهی می شود. (۲،۳)

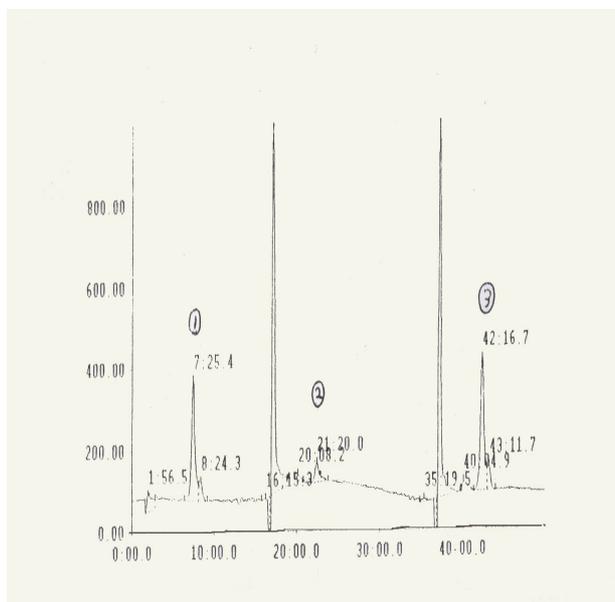
برای شناسایی این سم روشهای گوناگونی وجود دارد که می توان به روش کروماتوگرافی با لایه نازک (TLC)، گاز کروماتوگرافی (GC) و روش کروماتوگرافی مایع با کارکرد عالی (HPLC) اشاره کرد. محدوده تشخیص سم با روش TLC در حدود ۵۰ نانوگرم و با روش GC در حدود ۱۰ نانوگرم است و با روش HPLC تا میزان ۲۵ نانوگرم را می توان تشخیص داد. روش سنجش بیولوژیک در حیوانات نیز وجود دارد که بسته به نوع حیوان و نوع تزریق بین ۵۰۰-۱۰ نانوگرم از سم را می توان تشخیص داد. اما تمامی این روشها به نوعی به دستگاه و تجهیزات آزمایشگاهی وابسته و هزینه بر هستند و نیاز به پرسنل مجرب دارد. (۶-۹) امروزه روشهای جدید تشخیص بر مبنای واکنش آنتی ژن و آنتی بادی بنا نهاده شده است که از آن در تشخیص سم T-2 استفاده می شود. از این روشها می توان به روش رادیوایمونواسی، الایزای رقابتی و غیر مستقیم و نوارهای تشخیصی یک مرحله ای اشاره کرد. حساسیت این روشها عموماً در حد ۵-۱ نانوگرم می باشد و از مزایای این روشها سریع و ارزان بودن، سادگی و حساسیت آنهاست. (۱۰-۱۶)

در این تحقیق سعی بر این شده که ملکول هاپتن سم T-2 به حامل (Carrier) مناسب متصل شود و سپس علیه آن آنتی بادی پلی کلونال تهیه شود. در گامهای بعدی طراحی کیت الایزای پلی کلونال غیر مستقیم و رقابتی مدنظر بوده همچنین این تحقیق مبنایی برای تولید آنتی بادی منوکلونال و تهیه نوارهای تشخیص یک مرحله ای خواهد بود.

نانومتر خوانده شد. در تمامی آزمایشات الایزا از سرم موش نرمال به عنوان شاهد استفاده شد. (۱۷)

### یافته ها

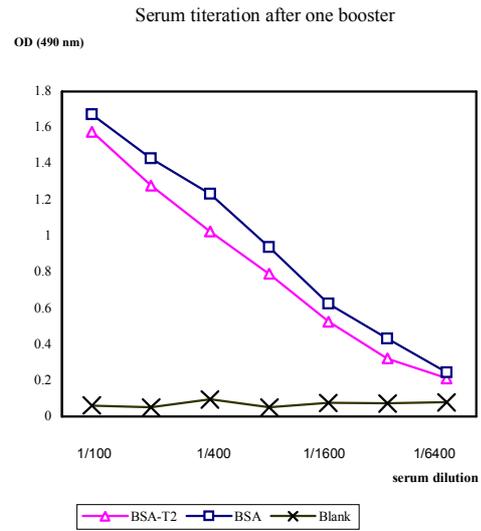
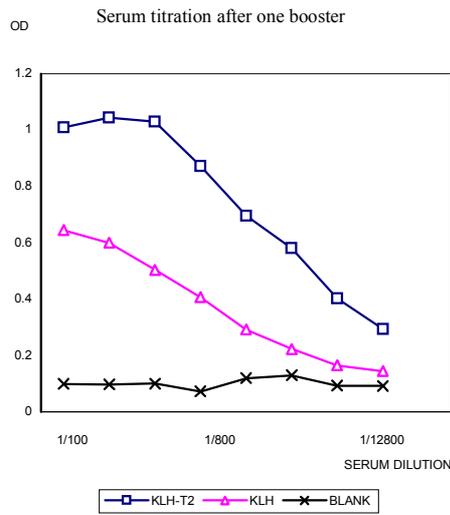
**تهیه کنژوگه** . پس از کانژوگاسیون، دیالیز و لیوفیلیزاسیون، وزن نمونه به میزان ۰/۶ میلی گرم افزایش یافته بود. این افزایش وزن می تواند مربوط به رطوبت نمونه و یا ملکول های T<sub>2</sub> باشد که بر روی پروتئین وصل شده اند. اما چون اولاً محصول تا حد امکان لیوفیلیز و خشک گردیده است و ثانیاً طبق محاسبه، امکان اتصال بیش از ۵۰۰ عدد مولکول T-2 بر روی هر مولکول KLH وجود دارد احتمال اینکه این افزایش وزن مربوط به رطوبت باشد رد می شود. همچنین آزمایش HPLC برای اندازه گیری میزان T-2 آزاد پس از پایان واکنش، نشان می دهد که مقدار T-2 آزاد در مقایسه با پیک استاندارد افت قابل



نمودار یک : نتایج کروماتوگرام HPLC : پیک شماره ۱: مربوط به T-2 استاندارد (سیگما) است. پیک شماره ۲: مربوط به نمونه ای است که پس از پایان اتصال برداشت شده است. پیک شماره ۳: مربوط به نمونه ای است که در ابتدای واکنش پیش از افزودن EDAC برداشت شده است.

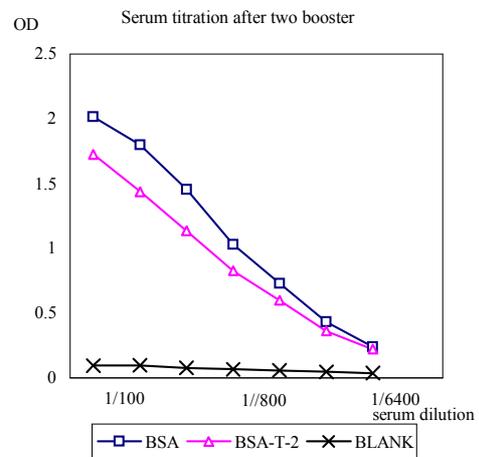
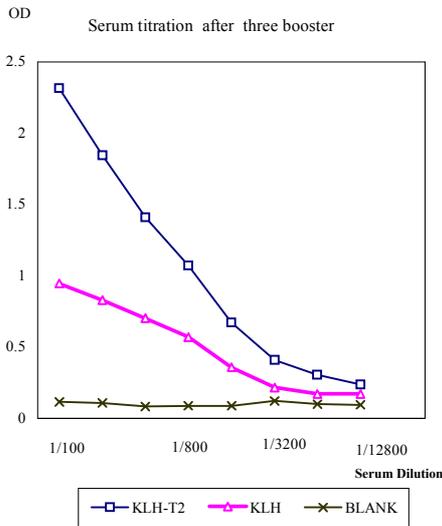
**تزریقات** . به دو گروه ده تایی از موشهای ۲۰ گرمی Balb/c به طور جداگانه مقدار ۲۰ میکروگرم از کنژوگه KLH-T-2 و BSA-T-2 همراه با ادجوان کامل فروند (CFA) در صفاق تزریق گردید و بوسترها با فاصله سه هفته ای با ادجوان ناقص فروند (IFA) صورت گرفت. خونگیری در فواصل بوسترها و در پایان بوستر چهارم انجام شد. (۳، ۱۷-۲۱)

**الایزای غیرمستقیم** . چاهک های میکروپلیت الایزا با کنژوگه های مختلف شامل KLH-T-2، BSA-T-2 و Poly Lysine-T-2 پوشانده شد. (بافر کربنات- بی کربنات سدیم pH 9.6، به میزان 5µg/100µl). چاهک های دیگری از میکروپلیت با KLH, BSA, Poly lysine تحت همان شرایط پوشانده شد. میکروپلیت به مدت یک شب در ۴ درجه سانتیگراد قرار گرفت. در مرحله بعدی چاهک ها با بافر PBST (بافر PBS حاوی ۰/۰۵٪ توئین ۲۰) شستشو داده شد و خشک گردید و چاهک ها با PBST حاوی ۳٪ ژلاتین بلاک گردیدند. (۱۰۰ میکرولیتر از بافر بلاکینگ به هر چاهک اضافه گردید و نیم ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت). پس از شستشو و خشک کردن پلیت، سرم موش را در چاهکها از بالا به پایین و از رقت ۱/۱۰ الی ۱/۶۴۰ در PBST رقیق شدند و میکروپلیت به مدت نیم ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت. در مرحله بعدی پس از شستشو و خشک کردن پلیت، رقت مناسب (۱/۱۳۰۰۰) از آنتی بادی کونژوگه (Anti mouse Ig G HRP Conjugated) در PBST تهیه کرده درون هر چاهک ۱۰۰ میکرو لیتر از آن ریخته شد. پس از انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت نیم ساعت، پلیت شستشو و خشک شد. در نهایت سوستر را ریخته شد. سوستر حاوی ۲ میلی گرم از OPD در ۵ میلی لیتر از بافر سترات فسفات (pH 5) است که به آن ۲/۵ میکرو لیتر آب اکسیژنه ۳۰٪ افزوده شده است. از سوستر، ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه و میکروپلیت به محل تاریک منتقل شد تا واکنش انجام گیرد. در پایان رنگ سوستر از بی رنگ به زرد تبدیل می شود و این رنگ از بالا به پایین ستون کاهش می یابد. چاهکهای کنترل واکنش بی رنگ باقی خواهند ماند که نشانه صحت کار است. پس از آن واکنش با اسید سولفوریک یک مولار متوقف و جذب در ۴۹۰



نمودار ۴. نتیجه الایزای سرم موش ایمن شده با کنژوگه KLH-T-2 پس از بوستر اول

نمودار ۲. نتیجه الایزای سرم موش ایمن شده با کنژوگه BSA-T-2 پس از بوستر اول



نمودار ۵. نتیجه الایزای سرم موش ایمن شده با کنژوگه KLH-T-2 از بوستر سوم

نمودار ۳. نتیجه الایزای سرم موش ایمن شده با کنژوگه BSA-T-2 پس از بوستر دوم

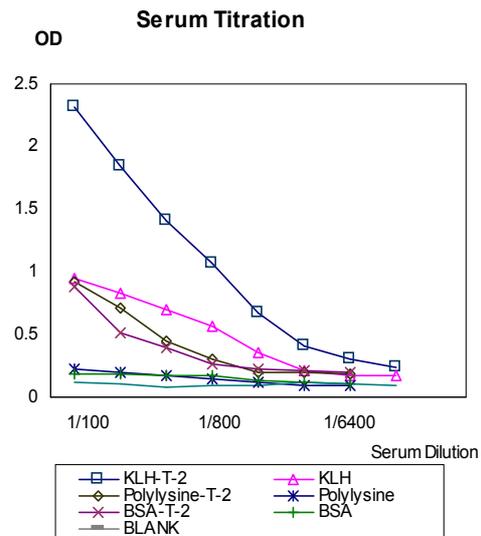
BSA-T-2: پس از خونگیری از موشهای ایمن شده با کنژوگه BSA-T-2 الایزای غیر مستقیم انجام شد. نتایج الایزای نشان می‌دهد که پس از بوستر اول آنتی‌بادی قادر به شناسایی BSA و BSA-T-2 است اما میزان اختلاف OD در

ملاحظه‌ای را (در حدود ۸۰٪) نشان می‌دهد پس می‌توان گفت که در اثر اتصال T-2 به ملکولهای پروتئین از میزان ملکولهای آزاد کاسته شده است (نمودار ۱).

نتایج الایزای غیر مستقیم. موشهای ایمن شده با کنژوگه

## بحث

مایکو توکسین‌ها تریکوتسنی متابولیت‌های قارچی هستند که از نظر کشاورزی و پزشکی حائز اهمیت‌اند. زیرا قارچ‌های تولید کننده این توکسین‌ها می‌توانند بر روی علوفه و غلات رشد کنند و این سموم را در آنها رها سازند و در صورت استفاده دام و انسان از علوفه و غلات موجب مسمومیت شدید و در نهایت موجب مرگ آنها شود. لذا داشتن سیستم سنجش و ردیابی برای این سموم می‌تواند از مسمومیتها جلوگیری نماید و یا در هنگام مسمومیت بتوان آنها را در مایعات بیولوژیک بدن شناسایی کرد. (۱-۳) به منظور ردیابی و سنجش این سموم و علی‌الخصوص سم T-2 در غلات، علوفه، مایعات بیولوژیک بدن تا کنون روشهای گوناگونی ابداع شده است که می‌توان به روشهای کروماتوگرافی با لایه نازک (TLC)، گاز کروماتوگرافی (GC) و روش کروماتوگرافی مایع با کارکرد عالی (HPLC) اشاره کرد. این روشها اگر چه روشهای دقیق و حساسی هستند اما دارای معایبی نیز هستند از جمله وقت‌گیر و نسبتاً گران هستند و نیاز به دستگاه و پرسنل مجرب دارد. (۴-۷) در دهه‌های گذشته روشهای رادیوایمونواسی، الایزای رقابتی و غیرمستقیم بر پایه آنتی‌بادی پلی‌کلونال و یا آنتی‌بادی مونوکلونال برای تشخیص سم T-2 بنا گذاشته شده است و امروزه نیز با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال روش تشخیص به کمک نوارهای یک مرحله‌ای ابداع شده است. (۹-۱۶) برای رسیدن به یک روش ایمنواسی داشتن آنتی‌بادی ضروری است. در این تحقیق ابتدا سعی شد که ملکول هاپتینیک سم T-2 به کاربرهای KLH، BSA، Poly Lysine متصل شود و سپس با تزریق آنتی‌ژنها به موشهای Balb/c علیه آن آنتی‌بادی به دست آید. همان طور که در نمودار ۱ آورده شده است بیش از ۸۰٪ از سم T-2 به ملکول KLH متصل شده است که با انجام محاسبات مشخص شد که به یک ملکول KLH در حدود ۴۳۷ ملکول سم T-2 اتصال یافته است که به نظر برای تولید آنتی‌بادی مناسب باشد. در مقابل برای ملکول BSA در حدود ۵۰ جایگاه اتصال در نظر می‌گیرند که در بهترین شرایط بین ۳۰-۲۰ ملکول به آن پیوند می‌یابد. از مزایای دیگر KLH این است که دارای وزن ملکولی بسیار بالا (۴۰۰Kd) است و از یک خرچنگ که قرابت



نمودار ۶. نتیجه الایزای سرم موش ایمن شده با کانژوگه KLH-T-2 در مقابل BSA-T-2 و Poly Lysine-T-2

چاهکهای حاوی BSA و چاهکهای BSA-T-2 بسیار ناچیز است و حتی میزان OD در ستون BSA بیشتر از ستون BSA-T-2 می‌باشد (نمودار ۲). پس از تزریق بوستر دوم هر چند تیتراژ آنتی‌بادی نسبت به قبل بسیار افزایش داشته است اما نتایج این الایزای، همانند می‌دهد که پس از بوستر اول آنتی‌بادی قادر به شناسایی KLH-T-2 و KLH است اما این آنتی‌بادی کانژوگه KLH-T-2 را به مراتب بهتر از KLH (در حدود نیم OD بیشتر) مورد شناسایی قرار می‌دهد (نمودار ۴). پس از تزریق بوستر سوم و چهارم تیتراژ آنتی‌بادی نسبت به قبل افزایش بیشتری نشان می‌دهد و آنتی‌بادی کانژوگه KLH-T-2 را با اختلاف بیش از یک OD مورد شناسایی قرار می‌دهد (نمودار ۵). در دیگر آزمایشات الایزای انجام شده، سرم موشهای ایمن شده با کانژوگه KLH-T-2 با آنتی‌ژنهای BSA و BSA-T-2 و با آنتی‌ژنهای Poly Lysine و Poly Lysine-T-2 مجاور گردید. این آنتی‌بادی توانست با اختلاف نزدیک به یک OD کانژوگه‌های BSA-T-2 و Poly Lysine-T-2 را نسبت به BSA و Poly Lysine مورد شناسایی قرار دهد (نمودار ۶).

contaminants 2001; 18(9): 844-9.

9. Smoragiewicz W, Cossete B. Trichotecenemycotoxins in the dust of ventilation systems in office buildings. *Int Arch Occup Environ Health* . 1993; 65: 113-117.

10. Fontelo PA, Beheler J. Detection of T-2 toxin by an improved radioimmuno assay. *Appl Environ Microb* 1983; 45(2): 640-3.

11. Gendloff EH, pestka jj. Detection of T-2 Toxin in *Fusarium sporotrichioides* Infected Corn by Enzyme linked Immunosorbent Assay. *Appl Environ Microb* 1984; 47(5): 1161-3.

12. Verto IB, Gyongyosl A. Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay of fusarium T- 2 and zearalenone toxins in cereals. *Appl Environ Microb* 1994; 60(2): 729-31.

13. Fan TSL. Simultaneous analysis of T-2 toxin and HT -2 toxin by an indirect enzyme-linked immunosobebent assay. *J Assoe off ANAL CHEM* 1987; 70 (4): 657-61.

14. Nagayama S, Kawamura O. Application of an enzyme linked immunosorbant assay for screening of T-2 toxin-producing *Fusarium* spp. *Appl Environ Microb* 1988; 54(5): 1302-3.

15. Kononenko GP, Burkin AA. Immunoenzyme assay for detection of T-2 toxin in contaminated grain. *Prikl Biokhim Mikrobiol* 1999; 35(4): 457-62.

16. De saeger S, Peteghem V. Dipstick enzyme immunoassay to detect fusarium T-2 toxin in wheat. *Appl Environ Microb* 1996; 62(6): 1880-4.

17. Harlow E, Lane D. Antibodies a laboratory manual. Cold spring harbor laboratory 1988. P. 53-113.

18. Fan TSL, Schubring R. Production and characterization of a Monoclonal Antibody Cross Reactive with Most Group A Trichothecenes. *Appl Environ Microb* 1988; 54(123): 2959-63.

19. Guang S, Schubring S. Improved method for production of antibodies against T-2 toxin and diacetoxyscirpenol in rabbits. *Appl Environ Microb*. 1986; 51(1): 132-7.

20. Juan I, Azcona Oliver A. Generation of antibodies reactive with Fumonisin B1, B2, and B3 by using Cholera toxin as the carrier-Adjuvant. *Appl Environ Microb* 1992. P. 169-73.

21. Chu FS, Zhang GS. Production and Characterization of antibody against diacetoxyscirpenol. *Appl Environ Microb* 1984; 48(4): 777-80.

کمتری با پستانداران دارد به دست می‌آید و اضافه بر آن دارای خاصیت ادجوانی است و می‌تواند سیستم ایمنی را تحریک نماید. اما در مقایسه، وزن ملکولسی BSA کم (67 Kd) و از پستاندار به دست می‌آید و دارای خاصیت ادجوانی نیست. (۱۷) بنا به دلایل گفته شده، همان‌گونه که از نتایج الیزا مشخص است کنژوگه KLH-T-2 توانسته است در مقایسه با کنژوگه BSA-T-2، سیستم ایمنی موش را به خوبی علیه سم T-2 تحریک و علیه آن آنتی‌بادی تولید کند. علاوه بر آن آنتی بادی به دست آمده علیه KLH-T-2 هنگامی که با کنژوگه‌های BSA-T-2 و Poly Lysine-T-2 مجاور می‌شود با حدود یک OD اختلاف و به خوبی سم T-2 را شناسایی می‌کند.

**نتیجه‌گیری:** بنابراین می‌توان امیدوار بود که بتوان از این آنتی‌بادی در طراحی کیت الیزای پلی کلونال استفاده نمود و با به دست آوردن آنتی بادی منوکلونال نسبت به تهیه نوارهای تشخیص یک مرحله‌ای اقدام کرد.

## References

۱. علامه ع، رزاقی ا. بیانه م. تریکوتسن‌ها در : مایکوتوکسین‌ها، چاپ اول، انتشارات دانشگاه امام حسین «ع»، ۱۳۸۰، صفحات ۹۷-۱۴۰.
2. Wannemacher R, Wiener S. Trichothecene ycotoxins IN: textbook of military Medicine. New York press; 2000. P. 5-32 .
3. Chu FS, Gyossman S. Production of Antibody Against T-2 Toxin. *Appl Environr Microb* 1979; 37(1): 104-8 .
4. Guo Y, Liu X, Liu J. Perparation and identification of anti-fumonisin B1 monoclonal antibody. *Wei Sheng Yan Jiu* 1999; 28(5): 297-9.
5. Christensen HR, Yu FY, Chu FS. Development of a poly clonal antibody-based sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for fumonisin B(4). *J Agric Food Chem* 2000; 48(5): 1977-84.
6. Cock RM, Vtley D. Analysis of some Trichothecene mycotoxins by liquid chromatography. *J Chromatog*. 1985; 347: 429-33 .
7. Omurtag GZ, Yazicioglu D. Determination of T-2 toxin in grain and grain products by HPLC and TLC. *J Inviron Sci Health B* 2000; 35(6): 797-807.
8. Omurtag GZ, Yazicioglu D. Occurance of T-2 inprocessed cereals and pulses in turkey determine by HPLC and TLC. *Food additives and*