

Evaluation of binding affinity and sensitivity of two specific *E. coli* O157:H7 aptamers using the ELISA method

Nafiseh Shafiei¹, Hamideh Mahmoodzadeh Hosseini^{2*}, Jafar Amani², Seyed Ali Mirhosseini²,
Hanieh Jafary¹

1. Department of Biology, Science and Research branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Applied Microbiology Research Center, Biomedicine Technologies institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Aim and Background: *Escherichia coli* O157:H7 is one of the most dangerous foodborne pathogenic bacteria transmitted through food worldwide. Many detection techniques based on molecular and serological detection have limitations. In recent years, aptamers as small nucleic acid molecules have been utilized in many different applications and played an essential role as screening tools in various diagnostic systems. In this study, two aptamers were compared and evaluated for the detection of *Escherichia coli* cells.

Material and Methods: Specific primers were designed for each aptamer using the Oligo 7 software. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determine the detection limit and optimal concentration of the aptamers. The binding affinity of the aptamers to O157:H7 bacterial cells was investigated using a surface plasmon resonance instrument.

Results: The detection limits for E. Coli 73 and E. Coli 81 aptamers were determined to be 10^3 CFU/mL. The binding affinities of the E. Coli 73 and E. Coli 81 aptamers were 1.8137×10^{-9} and 5.1674×10^{-8} mol/L, respectively.

Conclusion: Both aptamers showed good binding affinity to O157:H7 bacterial cells. However, the E. Coli 81 aptamer had higher sensitivity and specificity compared to the E. Coli 73 aptamer. Therefore, the E. Coli 81 aptamer could be a suitable candidate for the detection of O157:H7 bacterial cells in future applications.

Keywords: Aptamer, *Escherichia coli* O157:H7, ELISA, Surface resonance plasma.

بررسی قدرت اتصال و حساسیت دو آنتامر اختصاصی جهت تشخیص *E. coli* O157:H7 با استفاده از روش ELISA

نفیسه شفیعی^۱، حمیده محمودزاده حسینی^{۲*}، جعفر امانی^۲، سید علی میرحسینی^۲، هانیه جعفری^۱

۱. گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، پژوهشکده فناوری‌های زیست‌پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: باکتری /شریشیاکلی O157:H7 یکی از خطرناک‌ترین باکتری‌های بیماری‌زا است که از طریق غذا در سراسر جهان منتقل می‌شود. بسیاری از تکنیک‌های تشخیصی مبتنی بر تشخیص مولکولی و سرولوژیکی محدودیت‌هایی دارند. در چند سال اخیر، آنتامرها به‌عنوان یک نوع اسیدنوکلئیک کوچک، در بسیاری از کاربردهای مختلف به‌کار گرفته شده‌اند و در سیستم‌های مختلف تشخیص، نقش مهمی به‌عنوان ابزار غربالگری داشته‌اند. در این مطالعه، با هدف مقایسه دو آنتامر و شناسایی سلول باکتری /شریشیاکلی انجام شده‌است.

مواد و روش‌ها: طراحی آغازگر اختصاصی برای آنتامرها با نرم‌افزار Oligo 7 انجام شد. حد تشخیص و غلظت بهینه آنتامر با روش ELISA تعیین شد و میل ترکیبی آنتامر به سلول باکتری O157:H7 با استفاده از دستگاه پلاسمای رزونانس سطحی بررسی شد.

یافته‌ها: حد تشخیص برای آنتامر E. Coli 73 و E. Coli 81، 10^3 CFU/mL به‌دست آمد و میل اتصال آنتامر E. Coli 73 و E. coli 81 به سلول باکتری به‌ترتیب E-۸/۱۶۷۴ و E-۹/۱۸۱۳۷ مولار محاسبه شد.

نتیجه‌گیری: هر دو آنتامر میل اتصال خوبی را به سلول باکتری O157:H7 نشان دادند. اما آنتامر E. Coli 81 دارای حساسیت و ویژگی بیشتری نسبت به آنتامر E. Coli 73 بود. از این‌رو، آنتامر E. Coli 81 می‌تواند به‌عنوان یک پیشنهاد مناسب برای تشخیص سلول‌های باکتری O157:H7 در آینده مطرح شود.

واژگان کلیدی: آنتامر، باکتری /شریشیاکلی O157:H7، ELISA، پلاسمای رزونانس سطحی.

مقدمه

باکتری /شریشیاکلی O157:H7^۱ یک سویه شایع و خطرناک از عفونت باکتریایی است که در برخی از غذاهای انسانی اعم از محصولات گوشتی و لبنیات یافت می‌شود. این باکتری ماده ستی به‌نام شیگا توکسین تولید می‌کند که یک عامل کلیدی در ایجاد طیف وسیعی از بیماری‌های

گوارشی، از اسهال آبکی گرفته تا کولیت هموراژیک و سندرم اورمیک-همولیتیک است (۱، ۲). علاوه بر این، باکتری /شریشیاکلی O157:H7 حاوی دستگاه‌های سیستم ترشحی نوع ۳ (T3SS) و عوامل مؤثری مانند اینتیمین، گیرنده اینتیمین (Tir) و پروتئین‌های ترشح شده (Esps) است. این افکتورها (Effectors) منجر به اتصال باکتری به سلول‌های اپیتلیال روده میزبان و ایجاد ضایعات چسبنده و از بین برنده بافت می‌شوند (۱، ۳).

این سویه از طریق غذای آلوده، آب یا تماس مستقیم با افراد آلوده منتقل می‌شود. باکتری /شریشیاکلی O157:H7 در آمریکا و سایر کشورهای جهان شناخته شده‌است و به‌عنوان یک مشکل بهداشت عمومی در این کشورها در نظر گرفته می‌شود. مرکز کنترل و پیشگیری از بیماری‌ها (CDC) در

نویسنده مسئول:

مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، پژوهشکده فناوری‌های زیست‌پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران
پست الکترونیکی: hosseini361@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۵/۱۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۳۰

از طریق روشی به نام تکامل سیستماتیک لیگاندها توسط غنی‌سازیِ نمایی (SELEX) جدا می‌شوند (۱۳). این فرآیند تکاملی شامل چندین دور انتخاب و غنی‌سازی است تا آپتامرهایی با خواص اتصالِ بالا و ساختارهای سه‌بعدی منحصربه‌فرد به‌دست آید (۱۴). بر اساس همین ساختارهای سه‌بعدی است، که آن‌ها را قادر می‌سازد تا به‌طور اختصاصی به مولکول هدف (۱۵) از جمله مولکول‌های شیمیایی کوچک (۱۶)، یون‌ها (۱۴) ماکرومولکول‌ها (۱۷) و حتی سلول‌های کامل (۱۸) متصل شوند. این خصوصیت‌های آن‌ها درست مانند آنتی‌بادی‌ها است اما آن‌ها با اندازه‌های کوچکتر، پایداری بالاتر، اقتصادی‌تر هستند. بنابراین براساس این مزیتی که آپتامرها دارند، گزینه مناسبی به‌عنوان جایگزین آنتی‌بادی‌ها در بسیاری از کاربردهای بیولوژیک از جمله کاربردهای درمانی و تشخیصی هستند (۱۹-۲۱). از این‌رو این مطالعه به‌منظور مقایسه دو آپتامر اختصاصی با هدف شناسایی پروتئین‌های سطحی سلول‌های /شیرشیکلی O157:H7 به روش ELISA و پلاسمای سطحی رزونانس انجام شد تا در تحقیق‌های آینده از آن برای تست نواری استفاده گردد.

مواد و روش‌ها

تهیه سوپه باکتری

باکتری /شیرشیکلی سوپه O157:H7 از مرکز تحقیقات میکروبی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله دریافت شد.

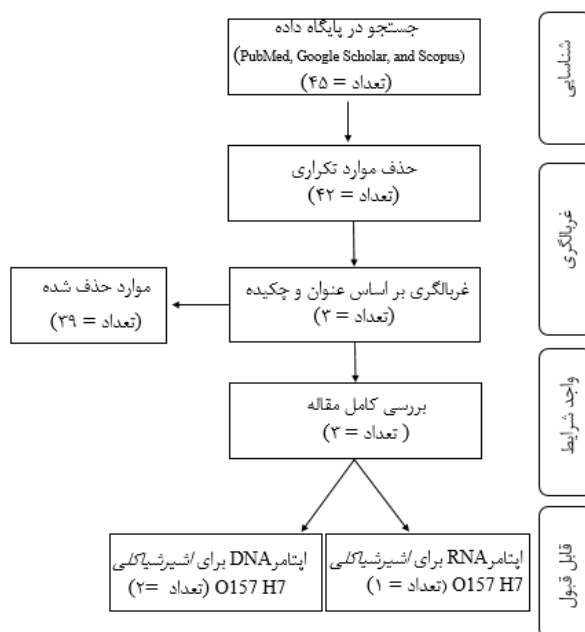
انتخاب آپتامرهای ssDNA اختصاصی باکتری

/شیرشیکلی سوپه O157:H7

آپتامر /شیرشیکلی O157:H7 در پایگاه‌های Scopus, Pubmed, Google scholar and google patent جست‌وجو شدند. تمامی موارد در نرم‌افزار مدیریت منابع به‌عنوان کتابخانه منابع ثبت شدند. مراحل انتخاب نهایی توسط پروتکل PRISMA هدایت شدند (شکل ۱).

ایالات متحده تخمین می‌زند که این بیماری سالانه باعث ۷۳۰۰۰ مورد بیماری، ۲۲۰۰ بستری شدن در بیمارستان و ۶۰ مرگ تنها در ایالات متحده می‌شود (۴). با توجه به اینکه تشخیص به‌موقع از عوارض بیماری، مرگ‌ومیر و هزینه‌های درمان می‌کاهد، استفاده از روش‌های مؤثر برای تشخیص ضروری است. برای شناسایی باکتری /شیرشیکلی O157:H7، روش‌های شناسایی مبتنی بر کشت و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) به‌عنوان روش‌های استاندارد در نظر گرفته می‌شوند (۵). روش‌های مبتنی بر کشت می‌توانند نتایج دقیق و درستی را ارائه دهند، درحالی‌که PCR حساسیت و اختصاصیت بیشتری دارد. با این حال، به‌دلیل پیش‌سازی لازم، هر دو روش زمان‌بر (تقریباً ۴۸-۵۶ ساعت) هستند و برای جلوگیری از آلودگی به شرایط آزمایشگاهی سخت‌گیرانه نیاز دارند (۶). در سال‌های اخیر، بسیاری از روش‌های تشخیص جدید، از جمله ژن‌چیپ (GeneChip) (۷)، ژنوسنسور (۸)، سنجش مبتنی بر تشدید پلاسمون سطحی (Surface plasma resonance) (SPR) (۹) و روش مبتنی بر طیف‌سنج مادون‌قرمز تبدیل فوری (FTIR) (۱۰) توسعه یافته‌اند. اگرچه این روش‌ها برخی از ویژگی‌های جذاب را مانند حساسیت و توان عملیاتی بالا و تشخیص سریع دارند، اما برای دستیابی به همه این ویژگی‌ها، نیاز به تجهیزات پرهزینه، پیچیده و نیروی فنی ماهر دارند. بنابراین، با این روش‌ها، تشخیص سریع در محل یا انجام آن در کشورهای در حال توسعه دشوار است. بنابراین، تقاضای زیادی برای توسعه روش تشخیص /شیرشیکلی O157:H7 ارزان، قابل حمل، سریع و بسیار حساس در محل برای کشورهای در حال توسعه و مناطق دورافتاده بدون آزمایشگاه پیشرفته وجود دارد (۱۱).

در سال ۱۹۸۰ ایده اتصال اسیدهای نوکلئیک به پروتئین‌ها مطرح شد که منجر به کشف مولکول‌های جدید به نام آپتامر شد (۱۲). آپتامر در واقع قطعات کوچک از توالی‌های پپتیدی یا اسیدنوکلئوتیکی است که در شرایط آزمایشگاهی



شکل ۱- مراحل انتخاب آپتامر براساس نمودار PRISMA

بررسی ساختار دوم آپتامرها

برای هر دو آپتامر انتخاب شده، ساختار ثانویه با استفاده از وب سرور mfold (<http://www.unafold.org/mfold>) پیش بینی شد.

طراحی آغازگرهای رفت و برگشت

طراحی آغازگرهای هریک از آپتامرها با استفاده از نرم افزار آنالیز 7 Oligo انجام شد. تمام ویژگی‌های مؤثر بر روی کارایی و اختصاصیت آغازگر از جمله طول آغازگر، دمای ذوب آن، دمای اتصال آغازگر به الگو، درصد GC در طول توالی آغازگر، کلامپ CG (clamp CG)، ساختارهای ثانویه،

توالی‌های تکراری موردبررسی قرار گرفت. از بین آن‌ها آغازگری که شرایط بهتری داشت انتخاب گردید (جدول ۱). سنتز هریک از آغازگرهای رفت و برگشت با روش تخلیص HPLC به شرکت آلمانی متابیون سفارش داده شد. آغازگر رفت به جهت ELISA بیوتینیل شده. طبق دستورالعمل شرکت سازنده به هرکدام از ویال‌ها آب مقطر استریل اضافه شد و با غلظت $100 \mu\text{M}$ به عنوان استوک در فریزر -20°C درجه سلسیوس نگهداری شد. برای به دست آوردن غلظت پایین‌تر در PCR، استوک‌ها مجدداً با آب مقطر استریل رقیق شدند تا به نسبت‌های مناسب برسند.

جدول ۱- توالی مربوط به آغازگرهای رفت و برگشت



آغازگرها	توالی (۳' - ۵')
رفت E. Coli 73	Biotin- ATCCGTCACACCTG CTCTAC
برگشت E. Coli 73	ATACGGGAGCCAA CACCATA
رفت E. Coli 81	Biotin- CATACGTTTCG ACTGCTACTC TG
برگشت E. Coli 81	CTAGTCTGTACATC TCACATTTTCGT

تکثیر توالی‌های آبتامری توسط واکنش زنجیره‌ای

پلیمرز (PCR)

به‌منظور تکثیر توالی‌های تک‌رشته‌ای برای اندازه‌گیری تمایل آبتامر گزینش‌شده با پروتئین غشای باکتری از PCR نامتقارن استفاده شده‌است. PCR نامتقارن از لحاظ شرایط واکنش، مشابه PCR معمولی است، با این تفاوت که به‌منظور تکثیر یکی از دو رشته، مقدار یکی از آغازگرها نسبت به آغازگر دیگر بیشتر است. تکثیر به کمک دستگاه ترمال سایکلر (بایورد، آمریکا) و طی روند دمایی تعیین‌شده مطابق با جدول ۲ و ۳ برای هر یک از آبتامرها انجام شد. در این پژوهش نیز برای تکثیر رشته هدف، آغازگر رفت با غلظت ۰/۱ نسبت به آغازگر برگشت در محلول واکنش اضافه شد (جدول ۴). محصولات PCR (۲۵ میکرولیتر)

روی ژل آگارز ۲ درصد با ولتاژ ۹۰ ولت بررسی شدند. سپس با استفاده از روش رسوب اتانول خالص‌سازی شدند. بدین ترتیب که ۵۰۰ میکرولیتر اتانول مطلق سرد (۲۰ درجه سلسیوس) به محصولات PCR اضافه شد و با ۳ مولار اسات سدیم و ۲۰ میلی گرم در میلی لیتر گلیکوژن مخلوط گردید. مخلوط به مدت یک شب در دمای ۲۰- درجه سلسیوس انکوبه شد. سپس مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه با ۱۴۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفوژ شد و مایع رویی دور ریخته شد. رسوب الیگونوکلوئیدی در ۲۰ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر، حل و غلظت محلول به کمک نانودراپ و با توجه به جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر تعیین شد.

جدول ۲- روند دمایی واکنش PCR برای آبتامر E. Coli 73

مراحل	مدت	دما	سیکل
واسرشت‌سازی اولیه DNA	۵ دقیقه	۹۵	۱
واسرشت‌سازی اولیه DNA	۳۰ دقیقه	۹۵	
اتصال آغازگرها	۳۰ دقیقه	۵۰	۱۸
طویل‌سازی DNA	۳۰ دقیقه	۷۲	
طویل‌سازی تکمیلی DNA	۵ دقیقه	۷۲	۱

جدول ۳- روند دمایی واکنش PCR برای آبتامر E. Coli 81

مراحل	مدت	دما	سیکل
واسرشت‌سازی اولیه DNA	۵ دقیقه	۹۵	۱
واسرشت‌سازی اولیه DNA	۳۰ دقیقه	۹۵	
اتصال آغازگرها	۳۰ دقیقه	۵۴	۱۹
طویل‌سازی DNA	۳۰ دقیقه	۷۲	
طویل‌سازی تکمیلی DNA	۵ دقیقه	۷۲	۱

جدول ۴- محتوای واکنش PCR در هر ویال برای تکثیر توالی‌های آبتامری DNA

مقدار	مواد
۱۰	Taqman master mix 10x
۰/۸	آغازگر رفت
۱	آغازگر برگشت
۰/۵	Template DNA(100pM)
۱۲/۷	آب دیونیزه
۲۵	حجم کل

آماده‌سازی سلول‌های باکتری /شریشیالکی O157:H7

باکتری /شریشیالکی O157:H7 در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت براث کشت داده و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شد. سپس، با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر، جذب نور در طول موج مشخصی (معمولاً ۶۰۰ نانومتر) اندازه‌گیری شد. برای این منظور، در ابتدا دستگاه با یک محیط کشت که جذب نوری باکتری آن صفر است (کنترل منفی) به عنوان بلانک صفر شد. سپس باکتری با آب مقطر رقیق شده و جذب نوری آن با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. زمانی که به OD موردنظر رسید، ۱۰۰۰ ماکرولیت از آن به داخل میکروتیوپ منتقل و با دور ۸۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی که حاوی محیط کشت بدون باکتری است خارج شد و به رسوب باکتری ۱۰۰۰ ماکرولیت PBS اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۸۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد تا سلول‌ها با PBS شسته شوند. این کار ۳ مرتبه تکرار شد. در آخر به رسوب باکتری ۱۰ ماکرولیت PBS اضافه و در آن حل شد تا باکتری‌ها برای ELISA آماده شوند.

بررسی حساسیت با روش indirect-ELISA

برای بررسی پتانسیل آبتامر گزینش شده، تعیین حداقل غلظت سلول باکتری که توسط آبتامر قابل شناسایی است ضروری می‌باشد. با استفاده از روش ELISA غیرمستقیم حد تشخیص تعیین شد. برای اینکار، ابتدا رقت‌های مختلف از سلول باکتری ۱۰^۸، ۱۰^۷، ۱۰^۶، ۱۰^۵ CFU/mL و ۱۰^۴ تهیه شد. درون چاهک‌های صفحات ۹۶ چاهکی الایزا پوشانده شد و به مدت یک ساعت در یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفت. پس از آن به چاهک‌ها فورم آلدهید ۲٪ اضافه کرده ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس سه مرتبه با بافر (pH=7.2) PBS که حاوی توئین ۰.۰۵٪ (PBST) است شسته شد. مرحله بعد به هر کدام از چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر بافر مسدودکننده اضافه و ۴۵ دقیقه در ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه گردید. چاهک‌ها همانند مرحله قبلی شست‌وشو داده شد، در این هنگام ۱۰۰ نانومول آبتامر رقیق شده در بافر اتصال را ۱۰ دقیقه حرارت داده سپس بر روی یخ قرار گرفت و در ادامه ۱۰۰ میکرولیتر از آبتامر به چاهک‌ها اضافه شدند و به مدت ۱۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با تکان ملایم انکوبه شدند. چاهک‌ها سه بار با PBST ۰.۰۵٪ شسته شدند و ۱۰۰ میکرولیتر استرپتواویدین - HRP با رقت ۱:۵۰۰۰ در بافر PBS به هر

چاهک اضافه شد. چاهک‌ها به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با تکان ملایم انکوبه و سپس چهار بار در PBST ۰.۰۲٪ شسته شدند. سپس، ۱۰۰ میکرولیتر محلول سوبسترا (TMB) به هر چاهک اضافه گردید. در نهایت پس از رنگ گرفتن، واکنش با H₂SO₄ ۲/۵ مولار متوقف شد و جذب در نانومتر ۴۵۰ نانومتر توسط میکروپلیت-ریدر Bio-Rad خوانده شد.

بهینه‌سازی غلظت آبتامر

به منظور اندازه‌گیری فعالیت بهینه آبتامر، غلظت‌های مختلف از آبتامر (۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ nmol) و غلظت باکتری O157:H7 (۱۰^۶ CFU/mL) تهیه شدند. سپس به روش ELISA غیرمستقیم برطبق بند بالا اندازه‌گیری شد.

تعیین میل ترکیبی با استفاده از روش پلاسمای

سطحی رزونانس

تعیین میل ترکیبی آبتامر گزینش شده توسط دستگاه رزونانس پلاسمون سطحی (Autolab ESPRIT) اندازه‌گیری شد. در طول اندازه‌گیری SPR، از بافر استات (۱۰ میلی‌مولار) به عنوان بافر Running buffer استفاده شد. باکتری O157:H7 (۱۰^۶ CFU/mL) بر روی سطح تراشه تثبیت شد. سرعت جریان ۳۰ میلی‌لیتر در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه بود. غلظت‌های مختلف آبتامرهای کانید از ۲۰ تا ۲۰۰۰ نانومولار در PBS با سرعت جریان ۲۵ میلی‌لیتر در دقیقه به مدت ۲ دقیقه تزریق شد. بازسازی سطح پوشش داده شده با آبتامر با Glycin-HCL ۱ میلی‌مولار (pH = 2) به دست آمد. مقادیر ثابت تفکیک یا KD (dissociation constant) با استفاده از مدل آنالیت برهم‌کنش لانگمویر ۱:۱ به عنوان نسبت ثابت‌های سرعت (ثابت نرخ غیرفعال، kon: ثابت نرخ ثابت) محاسبه شد.

تجزیه و تحلیل آماری

تمام آزمایش‌ها دوبار با شرایط مشابه تکرار شدند. نتایج کمی به عنوان میانگین $\pm$ انحراف معیار ارائه شد و داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Excel مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها

انتخاب، طراحی و سنتز آبتامرها

طی بررسی مقالات و نیز پایگاه‌های داده، دو توالی آبتامر تشخیصی E. Coli 81 و E. Coli 73 به عنوان دو آبتامر اختصاصی باکتری /شریشیالکی O157:H7 انتخاب شدند.

تعیین ساختار دوم

ساختار ثانویه آبتامرهای E. Coli 73 و E. Coli 81 و حداقل انرژی آزاد با استفاده از وب سرور Mfold پیش‌بینی شد. حداقل انرژی آزاد به‌ترتیب برای آبتامرهای E. Coli 73 و E. Coli 81 به‌ترتیب $-6/16$ Kcal.moL و $-5/34$ Kcal.moL است. بنابراین، آبتامر E. Coli 73 حداقل انرژی آزاد کمتری را دارد و پایدارتر است. نتایج در جدول ۵ ارائه شده‌است.

• توالی آبتامر تک‌رشته‌ای DNA، E. Coli 73

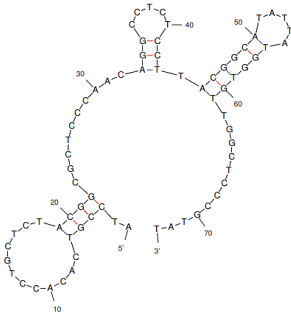
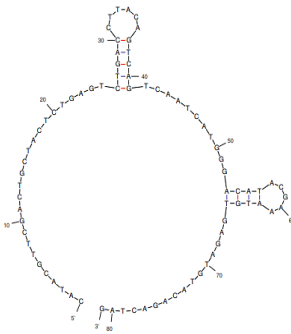
5'-
ATCCGTCACACCTGCTCTACGGCGCTCCCA
ACAGGCCTCTCCTTACGGCATATTATGGTG
TTGGCTCCCGTAT-3'

• توالی آبتامر تک‌رشته‌ای DNA، E. Coli 81

5'-
CATACGTTCGACTGCTACTCTGAGTCTGAC
CTTACAGTCAGTCAATCATGGGACATACGA
AATGTGAGATGTACAGACTAG-3'

برای سنتز با روش تخلیص HPLC به شرکت آلمانی متابیون سفارش داده شد.

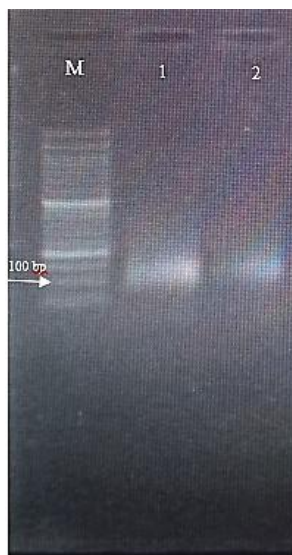
جدول ۵- پیش‌بینی ساختار ثانویه همراه با انرژی آزاد

نام آبتامر	ساختار دوم	$Kcal.moL^{-1}\Delta G$
E. Coli 73		-6.16
E. Coli 81		-5.34

شد. محصول PCR دارای تک‌باندی در محدوده ۵۰-۱۰۰ نوکلئوتید بوده که نشان‌دهنده تکثیر موفق توالی الیگونوکلئوتیدی با استفاده از آغازگرهای انتخابی است (شکل ۲).

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

به‌منظور تأیید تکثیر تک‌رشته‌ای توالی الیگونوکلئوتیدی محصولات PCR نامتقارن روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز



شکل ۲- تکثیر توالی گزینش شده با استفاده از PCR نامتقارن، M: نشانگر DNA (۵۰ bp)، ۱: آپتامر E. coli 73، ۲: آپتامر E. coli 81

تعیین حد تشخیص

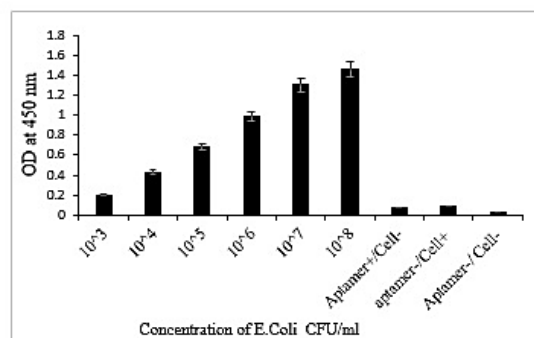
حد تشخیص باکتری /شریشیکلی از طریق ELISA با غلظت مختلف سلول باکتری /شریشیکلی O157:H7 (10^3 ، 10^4 ، 10^5 ، 10^6 ، 10^7 ، 10^8 CFU/mL) تعیین شد. همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده است، مقدار جذب با افزایش غلظت سلول باکتری /شریشیکلی O157:H7

افزایش می‌یابد. حد تشخیص برای E. coli و E. coli 81 به ترتیب 10^3 و 10^4 CFU/mL محاسبه شد. این نتیجه نشان داد که آپتامر E. coli 81 دارای حد تشخیص بسیار حساس‌تری نسبت به آپتامر E. coli 73 است. بنابراین، E. coli 81 دارای پتانسیل بیشتری برای استفاده در یک سیستم تشخیصی می‌باشد.

۱۰۲

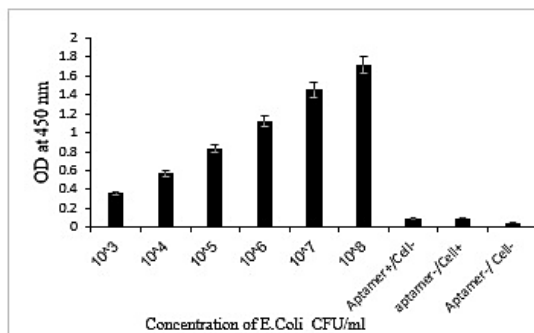
الف

الف



ب

ب



شکل ۳- بررسی حساسیت آپتامر با غلظت‌های مختلف سلول باکتری O157:H7 با استفاده از روش ELISA. الف) غلظت‌های مختلف سلول باکتری O157:H7 در برابر آپتامر E. coli 73، ب) غلظت‌های مختلف سلول باکتری O157:H7 در برابر آپتامر E. coli 81.

بهینه‌سازی غلظت آپتامرها

در مطالعه حاضر، غلظت‌های مختلف آپتامرهای E. coli 81 و E. coli 73 تهیه شدند و با استفاده از روش ELISA،

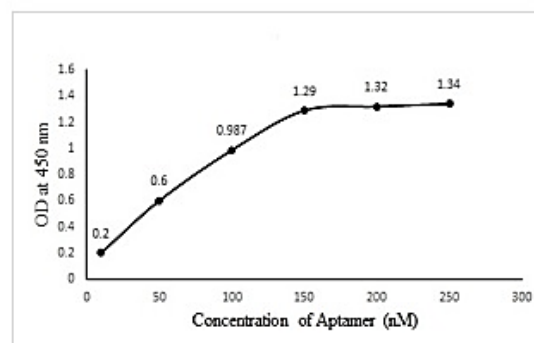
بهینه‌سازی غلظت آپتامرها محاسبه شد. همان‌طور که شکل ۴ نشان می‌دهد که در غلظت‌های پایین آپتامر، مقدار جذب کم است و به تدریج با افزایش غلظت، آپتامر نیز افزایش

خطی دیده نشد. غلظت بهینه برای آبتامر E. Coli 81 نیز حدود ۲۰۰ نانومولار است.

الف

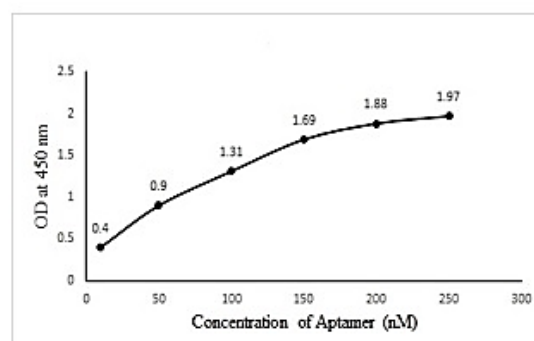
می‌یابد. بیشترین مقدار جذب برای E. Coli 73، در غلظت ۱۵۰ نانومولار به دست آمد و در غلظت‌های بالاتر رابطه

الف



ب

ب



شکل ۴- بهینه‌سازی غلظت آبتامر با استفاده از روش ELISA. الف) غلظت‌های مختلف آبتامر E. Coli 73 در برابر سلول باکتری O157:H7. ب) غلظت‌های مختلف آبتامر E. Coli 81 در برابر سلول باکتری O157:H7.

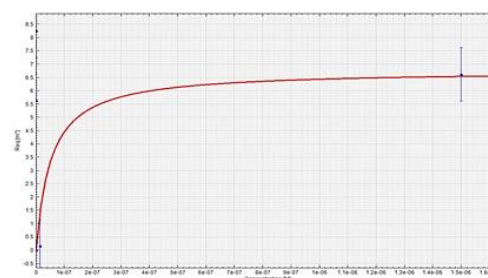
برای اتصال آبتامرهای E. Coli 73 و E. Coli 81 محاسبه شد و به ترتیب 5×10^{-8} و 1.8×10^{-9} مولار است (شکل ۵). آبتامر E. Coli 81 میل اتصال بالاتری را نشان داد.

الف

بررسی ثابت تفکیک (KD) با استفاده از SPR

میل اتصال بین سلول باکتری O157:H7 و آبتامرها E. Coli 73 و 81 با استفاده از روش SPR (رزونانس پلاسمون سطحی) ارزیابی شد. ثابت تفکیک تعادل (KD)

الف



ب



شکل ۵- ارزیابی KD با استفاده از دستگاه SPR. غلظت مختلف آبتامر (۱۵۰، ۱۵، ۲/۵، ۱۵۰ و ۲۰۰۰ نانومولار) در بافر PBST با غلظت ۱۰ میلی‌مولار (pH = 7.4) تهیه شده و از روی سطح سلول باکتری O157:H7 (10^6 CFU/mL) عبور کرد. الف) ارزیابی میل اتصال بین سلول باکتری O157:H7 با آبتامر E. Coli 73. ب) ارزیابی میل اتصال بین سلول باکتری O157:H7 با آبتامر E. Coli 81.

بحث

اشریشیاکلی ایجاد کردند و حد تشخیص 10^4 CFU/mL به‌دست آمد (۱۱). در سال ۲۰۲۰ Yuexin Liu و همکاران برای تشخیص اشریشیاکلی O157:H7 براساس واکنش زنجیره‌ای هیبریداسیون و آپتامر استفاده کردند و حد تشخیص 5×10^4 CFU/mL محاسبه شد (۲۵). به‌طور کلی، این نتایج نشان می‌دهند که هر دو آپتامر قادر به شناسایی سلول‌های باکتری O157:H7 هستند که بیانگر توانایی بالای اتصال هر دو آپتامر است. با این حال، آپتامر E. Coli 81 حساسیت و تمایل ترکیبی بالاتری نشان می‌دهد. بنابراین، آپتامر E. Coli 81 می‌تواند جایگزین مناسبی برای آنتی‌بادی در کیت‌های تشخیصی مبتنی بر آنتی‌بادی باشد.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، از آپتامرهای گزینش شده E. Coli 73 و E. Coli 81 به‌عنوان آپتامرهای اختصاصی برای اتصال به سلول‌های باکتری O157:H7 استفاده شد. اثربخشی (راندمان) آپتامرهای گزینش‌شده با استفاده از روش ELISA مورد ارزیابی قرار گرفت. مقدار LoD آپتامرهای E. Coli 73 و E. Coli 81 در حدود 10^3 CFU/mL با KD حدود 8×10^{-8} و 9×10^{-8} به ترتیب محاسبه شد. بنابراین حساسیت و ویژگی E. Coli 81 نسبت به آپتامر E. Coli 73 بیشتر است و به‌نظر می‌رسد انتخاب بهتری برای تشخیص سلول‌های باکتری O157:H7 باشد. از آنجایی که مولکول‌های آپتامر دارای مزایای منحصربه‌فرد در غربال‌گری، آماده‌سازی، پایداری بیولوژیکی و کاربرد هستند، انتظار می‌رود که در آینده به‌عنوان عوامل تشخیصی، چشم‌انداز کاربردی خوبی داشته باشند و با آنتی‌بادی‌ها رقابت کنند و در برخی موارد از آن‌ها پیشی بگیرند. البته، فناوری آپتامرها با چالش‌های متعددی از جمله ماهیت زمان‌بر روش SELEX مواجه است، زیرا غلظت‌های آپتامر پایین‌تر در هر دور جداسازی باقی می‌ماند تا در فاز تکرار بعدی استفاده شود. علاوه بر این، واکنش متقابل آپتامر و پایداری زیستی آپتامرها در داخل بدن از دیگر چالش‌های موجود در این زمینه است که باید در مطالعات آتی مورد بررسی قرار گیرد.

ملاحظات اخلاقی

ندارد.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که تعارض منافع وجود ندارند.

باکتری اشریشیاکلی O157:H7، یک پاتوژن مشترک بین انسان و دام است و از مهمترین عوامل باکتریایی ایجادکننده اسهال است که منجر به شرایط تهدیدکننده حیات در انسان می‌شود (۲۲). این باکتری در هنگام بروز عفونت قادر است که آسیب‌های تخریبی شدید در سلول‌های اپیتلیال روده ایجاد کند. حضور این باکتری در دامداری‌ها، متعاقب آن آلودگی فرآورده‌های لبنی و سپس جوامع انسانی، سبب ایجاد مشکلات اقتصادی و بهداشتی شده است. بنابراین توجه ویژه‌ای به روش‌های تشخیص معتبر و سریع برای اتخاذ درمان مناسب و پیشگیری از عفونت معطوف شده است (۲، ۲۳) طی چند سال اخیر، آپتامرها به‌عنوان ابزار غربالگری در سیستم‌های مختلف تشخیص پیشرفت قابل‌توجهی داشته‌اند و به روشی استاندارد در مطالعات تحقیقاتی بیوتکنولوژیکی و دارویی تبدیل شده‌اند (۱۷). این تحقیق با هدف بررسی اثربخشی دو آپتامر اختصاصی برای شناسایی پروتئین‌های غشای باکتری اشریشیاکلی O157:H7 با تکیه بر روش ELISA انجام شد تا نتایج به‌دست آمده در تحقیقات آینده برای تولید تست نواری یا طراحی روش‌های جدید برای تشخیص و درمان عفونت‌های باکتریایی مفید باشد. برای این منظور دو آپتامر انتخاب شدند. همچنین ساختار دوم پیش‌بینی‌شده توسط سرور Mfold برای هریک از آپتامرها، ساختارهای پیچیده stem-loop را نشان داد. ساختار دوم آپتامر E. Coli 73 از سه hairpin و یک لوپ بزرگ تشکیل شده است و آپتامر E. Coli 81 شامل دو hairpin و یک لوپ بزرگ است. حد تشخیص و غلظت بهینه آپتامر با روش ELISA سنجیده شد. نتایج ما نشان دادند که تمایل اتصال اندازه‌گیری‌شده با دستگاه پلاسمای سطحی رزونانس برای آپتامرهای گزینش‌شده E. Coli 73 و E. Coli 81 به مولکول هدف به ترتیب 8×10^{-8} و 9×10^{-8} بود. از این رو آپتامرها به سلول باکتری متصل می‌شوند اما آپتامر E. Coli 81 تمایل اتصال بالای آپتامر به سلول باکتری اشریشیاکلی O157:H7 را نشان داد. همچنین حد تشخیص، یکی از مهمترین ارقام شایستگی برای مقایسه روش‌های مختلف تجزیه‌ای است که در این مطالعه حد تشخیص 10^3 CFU/mL به‌دست آمد.

Susana Díaz-Amaya و همکاران در سال ۲۰۱۹ بیوسنسور SERS مبتنی بر آپتامر برای تشخیص سلول کامل O157:H7 طراحی و حد تشخیص را 10^2 CFU/mL گزارش کردند (۲۴). همچنین Bo Pang و همکاران در سال ۲۰۱۸، ELISA مبتنی بر کاغذ برای تشخیص سریع

سپاسگزاری

که ما را در اجرای بخشی از این تحقیق یاری نمودند
سپاس‌گزاری می‌گردد.

بدین وسیله از آقای دکتر رمضانعلی طاهری، رئیس مرکز
تحقیقات بیوتکنولوژی نانو دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله

1. Xue Y, Zhu M-J. Suppressing autophagy: a strategy by Escherichia coli O157: H7 for its survival on host epithelial cells. *Cell Death & Disease*. 2018;9(2):64.
2. Amani J, Ahmadpour A, Fooladi AAI, Nazarian S. Detection of E. coli O157: H7 and Shigella dysenteriae toxins in clinical samples by PCR-ELISA. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2015;19:278-84.
3. Stevens MP, Frankel GM. The locus of enterocyte effacement and associated virulence factors of enterohemorrhagic Escherichia coli. *Enterohemorrhagic Escherichia coli and Other Shiga Toxin-Producing E coli*. 2015:97-130.
4. Lim JY, Yoon JW, Hovde CJ. A brief overview of Escherichia coli O157: H7 and its plasmid O157. *Journal of microbiology and biotechnology*. 2010;20(1):5.
5. Xue Y, Wilkes JG, Moskal TJ, Williams AJ, Cooper WM, Nayak R, et al. Development of a flow cytometry-based method for rapid detection of Escherichia coli and Shigella spp. using an oligonucleotide probe. *PLoS One*. 2016;11(2):e0150038.
6. Buzatu DA, Moskal TJ, Williams AJ, Cooper WM, Mattes WB, Wilkes JG. An integrated flow cytometry-based system for real-time, high sensitivity bacterial detection and identification. *PloS one*. 2014;9(4):e94254.
7. Kim H, Kane MD, Kim S, Dominguez W, Applegate BM, Savikhin S. A molecular beacon DNA microarray system for rapid detection of E. coli O157: H7 that eliminates the risk of a false negative signal. *Biosensors and Bioelectronics*. 2007;22(6):1041-7.
8. Abdalhai MH, Fernandes AM, Xia X, Musa A, Ji J, Sun X. Electrochemical genosensor to detect pathogenic bacteria (Escherichia coli O157: H7) as applied in real food samples (fresh beef) to improve food safety and quality control. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2015;63(20):5017-25.
9. Wang Y, Ye Z, Si C, Ying Y. Monitoring of Escherichia coli O157: H7 in food samples using lectin based surface plasmon resonance biosensor. *Food chemistry*. 2013;136(3-4):1303-8.
10. Chen J, Shi X, Gehring AG, Paoli GC. Automated immunomagnetic separation for the detection of Escherichia coli O157: H7 from spinach. *International journal of food microbiology*. 2014;179:33-7.
11. Pang B, Zhao C, Li L, Song X, Xu K, Wang J, et al. Development of a low-cost paper-based ELISA method for rapid Escherichia coli O157: H7 detection. *Analytical Biochemistry*. 2018;542:58-62.
12. Song S, Wang L, Li J, Fan C, Zhao J. Aptamer-based biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2008;27(2):108-17.
13. Bayat P, Nosrati R, Alibolandi M, Rafatpanah H, Abnous K, Khedri M, et al. SELEX methods on the road to protein targeting with nucleic acid aptamers. *Biochimie*. 2018;154:132-55.
14. Lyu C, Khan IM, Wang Z. Capture-SELEX for aptamer selection: A short review. *Talanta*. 2021;229:122274.
15. Li L, Xu S, Yan H, Li X, Yazd HS, Li X, et al. Nucleic acid aptamers for molecular diagnostics and therapeutics: advances and perspectives. *Angewandte Chemie International Edition*. 2021;60(5):2221-31.
16. Li W, Luo Y, Gao T, Yang L, Wang J, Pei R. In vitro selection of DNA aptamers for a small-molecule porphyrin by gold nanoparticle-based SELEX. *Journal of Molecular Evolution*. 2019;87:231-9.
17. Sampson T. Aptamers and SELEX: the technology. *World Patent Information*. 2003;25(2):123-9.
18. Park KS. Nucleic acid aptamer-based methods for diagnosis of infections. *Biosensors and Bioelectronics*. 2018;102:179-88.
19. Thiviyanathan V, Gorenstein DG. Aptamers and the next generation of diagnostic reagents. *PROTEOMICS-Clinical Applications*. 2012;6(11-12):563-73.
20. Wang T, Chen C, Larcher LM, Barrero RA, Veedu RN. Three decades of nucleic acid aptamer technologies: Lessons learned, progress and opportunities on aptamer development. *Biotechnology advances*. 2019;37(1):28-50.
21. Liu Q, Zhang W, Chen S, Zhuang Z, Zhang Y, Jiang L, et al. SELEX tool: a novel and convenient gel-based diffusion method for monitoring of aptamer-target binding. *Journal of biological engineering*. 2020;14:1-13.
22. Ameer MA, Wasey A, Salen P. Escherichia Coli (E Coli 0157 H7). 2018.
23. Murphy M, Buckley J, Whyte P, O'mahony M, Anderson W, Wall P, et al. Surveillance of dairy production holdings supplying raw milk to the farmhouse cheese sector for Escherichia coli O157, O26 and O111. *Zoonoses and Public Health*. 2007;54(9-10):358-65.
24. Díaz-Amaya S, Lin L-K, Deering AJ, Stanciu LA. Aptamer-based SERS biosensor for whole cell analytical detection of E. coli O157: H7. *Analytica chimica acta*. 2019;1081:146-56.
25. Liu Y, Chen P, Yuan S, Sun B, Sun R, Meng X. A novel method for sensitive detection of Escherichia coli O157: H7 based on an aptamer and hybridization chain reaction. *Analytical Methods*. 2020;12(29):3734-40.