Design and Production of Aptamer Against CholeraToxin Using SELEX Technique

Mahboobeh Hasani Fard[1], Gholamreza Olad[2], Jafar Amani[3*]

1. Department of Molecular Genetics, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Applied Biotechnology Research Center, Systems Biology and Poisonings Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
3.Applied Microbiology Research Center, Biomedicine Technologies Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Abstract

Aim and Background: Diarrhea is the second main cause of mortality in the world that produced by *vibrio cholera*. *Vibrio cholera* is the important microorganism related with pandemic and epidemic cholera outbreaks. Detection in the early stage is considered to prevent the distribution of disease. Cholera toxin (CT) is the major virulence factor of disease. Aptamers have emerged as highly efficient agents for the specific detection and binding of bacterial targets. These versatile molecules offer a promising alternative to antibodies, finding applications in biomarker discovery, diagnosis, imaging, and targeted therapy. They are produced by asymmetric PCR and selected through the Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX).

Material and Methods: In this study, aptamers generated by asymmetric PCR were utilized, after running 11 rounds of SELEX, numerous aptamers were selected and evaluated using ELASA to check their binding to CtxB and similar proteins.

Results: Appropriate aptamers were isolated and sequenced. Then the best aptamer with the highest affinity to CtxB (amount of OD was 1.8) and the least cross-reactivity to similar proteins were separated. Bioinformatics studies for this aptamer show the proper interaction between the aptamer and the CtxB.

Conclusion: Selected aptamer has high affinity and specificity to CtxB. We assessed the effectiveness of this aptamer using ELASA. It can be used for diagnostic purposes.

Keywords: Cholera toxin B, aptamer, Pr-SELEX, Asymmetric PCR, ELASA.

Corresponding author:
Applied Microbiology Research Center, Biomedicine Technologies Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Email:
jafar.amani@gmail.com

طراحی و تولید آپتامرعلیه کلرا توکسین با استفاده از تکنیک سلکس

محبوبه حسنی فرد[۱]، غلامرضا اولاد[۲]، جعفر امانی[۳]*

۱.گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد تهران شمال، تهران، ایران.
۲. مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)، تهران، ایران.
۳. مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، پژوهشکده فناوری‌های زیست پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)، تهران، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: اسهال، دومین عامل مرگ و میر در جهان محسوب می شود. مهمترین عامل ایجاد این بیماری کلرا توکسین می‌باشد که توسط باکتری با همین نام (ویبریو کلرا) تولید می‌شود. تشخیص سریع در مراحل اولیه بیماری، می‌تواند از مرگ و میر ناشی از آن جلوگیری کند. روش‌های تشخیصی بسیاری در این زمینه وجود دارد ولی این روش‌ها یا زمانبر بوده یا ارزش تشخیصی کمی دارند. آپتامرها، نوکلئوتیدهای تک رشته‌ای هستند که برای شناسایی طیف وسیعی از مولکول‌ها و بیومولکول‌ها استفاده می‌شوند. هدف از تحقیق حاضر، جداسازی آپتامری مناسب جهت تشخیص کلرا توکسین و استفاده از آن در کیت‌های تشخیصی سریع می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق، جداسازی آپتامر علیه کلرا توکسین صورت گرفت. ابتدا از تکنیک PCR نامتقارن برای تولید آپتامرها استفاده شد و سپس با استفاده از تکنیکSELEX (۱۱ دور)، جداسازی آپتامرهای اختصاصی انجام شد. در مراحل انجام کار، با کمک تکنیک الازا (ELASA) جداسازی آپتامر مناسب انجام شد.

یافته‌ها: آپتامرهای مناسب علیه کلرا توکسین جداسازی و توالی یابی شدند. از بین آپتامرهای جداشده یکی به عنوان آپتامر منتخب مورد بررسی قرار گرفت. این آپتامر، بیشترین تمایل به کلرا توکسین وکمترین تمایل را به پروتئین‌های مشابه نشان داد. این بررسی با کمک الازا انجام شد ومیزان جذب برای کلرا توکسین ۱/۸ به دست آمد. همچنین بررسی های بیوانفورماتیکی پایداری آپتامر را نشان دادند.

نتیجه‌گیری: آپتامر انتخاب شده دارای برهمکنش مناسب با کلرا توکسین بوده و به طور اختصاصی با میل ترکیبی بالا به مولکول هدف (کلرا توکسین) متصل می شود. با بکارگیری آپتامر به دست آمده در کیت های تشخیصی، می‌توان رقت‌های کم توکسین را در نمونه های مورد ارزیابی شناسایی و اقدام موثر و سریع انجام داد.

واژگان کلیدی: آپتامر، پروتئین سلکس، زیر واحد B ویبریوکلرا توکسین، PCR نامتقارن، الازا.

مقدمه

ویبریوکلرا باکتری گرم منفی غیرمهاجم روده‌ای عامل وبا که با کلرا توکسین، آثار پاتولوژیک خود را اعمال می‌کند. این باکتری از طریق آب آلوده با مدفوع منتقل می‌شود. پس از خورده شدن باکتری توسط انسان، این باکتری در روده کوچک کلونیزه می‌شود (۱) و تولید کلرا توکسین می‌کند. این توکسین بر روی مخاط روده اثر کرده و در نتیجه از دست دادن مقادیر بالای سدیم و کلر و آب، باعث اسهال شدید و در صورت عدم درمان، به دلیل دهیدراتاسیون شدید منجر به مرگ فرد می‌شود (۳-۱). اگرچه وبا در کشورهای توسعه یافته، تقریبا ریشه کن شده ولی در کشورهای در حال توسعه، همچنان باعث مرگ و میر می‌شود (۴). روش‌های تشخیصی متفاوتی برای شناسایی استفاده می‌شود مانند، روش‌های سنتی، بر پایه نوکلئیک اسید، ایمونولوژیکی و بیوسنسورها (۶-۴). روش سنتی با استفاده از نمونه مدفوع و کشت آن و آزمون‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی صورت می‌گیرد، همچنین آزمون‌های تکمیلی تخصصی نظیر الگوهای

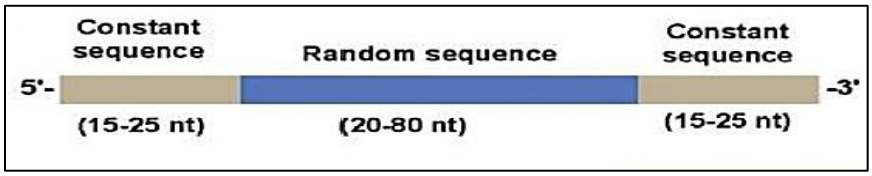
نویسنده مسئول:
مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، پژوهشکده فناوری‌های زیست پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)، تهران، ایران.
پست الکترونیکی: jafar.amani@gmail.com
تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۰۵
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۱/۱۹

حساسیت و مقاومت آنتی بیوتیکی در روش سنتی انجام می‌گیرد. معمولترین این روش‌ها رنگ‌آمیزی گرم و آنتی‌بیوگرام است (۷،۸). اگرچه برخی از این روش‌ها را در عرض چند دقیقه می‌توان انجام داد ولی اغلب این روش‌ها زمان بر بوده و از ۲-۳ روز الی یک هفته زمان می‌برد و نیاز به تجهیزات آزمایشگاهی و افراد مجرب دارد (۵)، همچنین از دقت و حساسیت کافی برای شناسایی میکروارگانیسم‌ها برخوردار نیست و در نتیجه تاخیر در تشخیص موجب تاخیر در درمان و دهیدراتاسیون بیمار و مشکلات بعدی در وی می‌گردد (۴،۹).

عوامل تشخیصی جهت شناسایی عوامل بیماریزا را می‌توان به دو دسته کلاسیک و عوامل جدید تقسیم کرد. عوامل تشخیصی کلاسیک (آنزیم، آنتی بادی، نوکلئیک اسید, سلول) که قبل از سال ۲۰۱۰ بیشتر مورد توجه بود ولی عوامل تشخیصی جدید (فاژ، آپتامر، پلیمر و...) بعد از سال ۲۰۱۰ کاربردشان مورد توجه قرارگرفت. جهت کاهش هزینه‌های درمان و همچنین تشخیص سریع بیماری، استفاده از روش‌های تستی تشخیص سریع در بالین بیمار، اهمیت زیادی دارد (۱۰). آپتامرها مولکول‌های تک رشته‌ای ریبونوکلئوتیدی هستند که می‌توانند از جنس DNA و یا RNA باشند. این مولکول‌ها خاصیت انعطاف پذیری خوبی دارند و می‌توانند اشکال دو و سه بعدی متفاوتی داشته باشند. از ویژگی‌های آپتامرها می‌توان به مقاومت آن‌ها در برابر تغییرات دمایی و pH، تولید آسان و سریع آن‌ها نسبت به آنتی‌بادی، سایز کوچک آن‌ها و امکان عبورآن‌ها از منافذ کوچک، همچنین دارا بودن سطح وسیع و امکان اصلاح سطح آسان این مولکول‌ها (این ویژگی در انتقال هدفمند دارو قابل توجه است) اشاره نمود. به همین دلایل کاربرد وسیعی در زمینه درمان، تشخیص، انتقال دارو و تصویربرداری‌های هدفمند پزشکی دارند (۱۱،۱۲). روش‌های مختلفی جهت تولید آپتامرها وجود دارد مانند روش حرارتی، استفاده از آنزیم اگزونوکلئاز، استفاده از بیدهای مغناطیسی، ژل پلی اکریل آمید حاوی اوره و PCR نامتقارن (۱۳،۱۴). اگرچه روش PCR نامتقارن با چالش های زیادی همراه است ولی به عنوان روشی موثر و سریع در تولید تک رشته های DNA و RNA مورد توجه قرار گرفته است. همانطور که اشاره شد اگرچه آپتامرها می‌توانند از جنس DNA یا RNA باشند ولی آپتامرهای DNA (ssDNA) نسبت به RNA ارجحیت دارند که این امر می‌تواند به دلیل پایدارتر بودن DNA و همچنین استفاده آسان تر از آن در واکنش PCR است (در RNA دو آنزیم جهت PCR نیاز است آنزیم Taq و RT) (۱۵).

همچنین وجود فراوان آنزیم RNase در طبیعت و داشتن یک گروه OH بیشتر در RNA، باعث ناپایداری این مولکول نسبت به DNA است (۱۶) از طرف دیگربه دلیل استفاده از آنزیم Reverse Transcriptase در مراحل استفاده از ssRNA و طولانی تر شدن پروسه، احتمال خطا افزایش می‌یابد، به همین جهت در فرایند تولید آپتامرها بیشتر از ssDNA استفاده می‌شود (۱۷). پس از آماده سازی ssDNAها، یکی از آن‌ها به عنوان آپتامر برتر برای هدف مورد نظر انتخاب می‌شود. به عبارتی از کتابخانه ssDNA تنها یک ssDNA به عنوان آپتامر هدف برای مقصود نهایی جدا می‌شود. کتابخانه اولیه DNA غالبا دارای ۲۰-۸۰ نوکلئوتید با توالی‌های متغیر در مرکز و ۱۵-۲۵ توالی ثابت در دو انتها می‌باشد. شکل ۱ توالی‌های ثابت دو انتها، جهت اتصال پرایمرها مورد استفاده قرار می‌گیرد و نواحی متغیر مرکزی که حاوی تعداد 10^{14}-10^{15} توالی متغیر است به مولکول هدف متصل می‌شود. هرچند کتابخانه‌هایی با طول بیشتر یا کمتر (۲۲-۲۲۰ نوکلئوتید) نیز مورد استفاده قرار می‌گیرند ولی آپتامرهای جدا شده از این کتابخانه‌ها میزان تمایل و اختصاصیت کمتری به هدف، نشان می‌دهند. برای داسازی آپتامر هدف، از فرآیند سلکس استفاده می‌شود (۱۵،۱۷). فرآیند سلکس دارای مراحلی شامل مجاورسازی، اتصال، تقسیم بندی و تکثیر است. طی فرآیند مجاور سازی، برخی توالی‌ها به مولکول هدف متصل می‌شوند، در حالیکه برخی، متصل نشده یا اتصال ضعیف دارند. در مرحله تقسیم بندی، توالی های اتصال یافته قوی از توالی‌های اتصال نیافته و اتصال ضعیف جدا می‌شوند و در مرحله تکثیر، آپتامرهای اتصال یافته جداسازی و تکثیر می‌شوند (۱۴). جهت تایید درستی روند آزمایش از تکنیک الازا استفاده شد. در خصوص تکنیک الازا, تقریبا مشابه تکنیک الایزا (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) می باشد با این تفاوت که در الایزا از آنتی بادی برای تشخیص آنتی ژن استفاده می‌شود در حالیکه در تکنیک الازا از آپتامر می‌توان جهت شناسایی آنتی ژن یا سایر بیومولکول‌ها استفاده نمود. تکنیک الازا روشی نوین بوده و فعلا در آزمایشگاه‌های تشخیصی بالینی راه پیدا نکرده است ولی در مقالات مختلف به عناوین متفاوت از آپتامر در تشخیص به شیوه الایزا نام برده شده است که عبارتند از ELASA (Enzyme- Linked Aptamer Sorbent Assay) (۱۸-۲۰) عبارت ELAA (Enzyme- Linked Aptamer Assay) (۲۱, ۲۲) عبارت

LFAA (Lateral Flow Aptamer Assay) (۱۶) همچنین عباراتی مانند AptaCapture Assay (۲۳) و Binding Assay (۱۲).



شکل ۱- نمایی از کتابخانه ssDNA، نواحی ثابت در دو انتها که محل اتصال پرایمرها می باشد و ناحیه متغیر در وسط که محل اتصال برخی توالی ها به مولکول هدف است (۱۴).

در تحقیق پیش‌رو، طراحی آپتامر علیه کلرا توکسین (CtxB) انجام شد. ابتدا از روش PCR نامتقارن، جهت دستیابی به ssDNA خالص استفاده شد. جهت کاهش خطا و افزایش سرعت PCR نامتقارن، ابتدا شرایط پایه PCR شامل میزان کتابخانه، پرایمر، بافر، انزیم و منیزیم بهینه سازی شدند و این شرایط در PCR نامتقارن لحاظ گردید. سپس طی ۱۱ مرحله سلکس، آپتامرهای هدف جدا شدند. برای این منظور از روش کروماتوگرافی میل ترکیبی با کمک بیدهای سیانوژن بروماید استفاده شد. همچنین از پروتئین‌های (Shiga-like toxin B) StxB و(Heat-labile enterotoxin B) LtB به عنوان پروتئین‌های مشابه CtxB, در ستون کروماتوگرافی استفاده‌گردید. پس از ارزیابی آپتامرها از نظر اختصاصیت و میزان اتصال، آپتامر نهایی معرفی گردید.

مواد و روش‌ها

مواد

پروتئین‌های CtxB, StxB, LtB خریداری شده از مرکز مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی ایران، دانه‌های سیانوژن بروماید (سیگما)، استرپتاویدین متصل به آنزیم HRP (سیگما)، کیت کلونینگ (Clone Jet PCR)، کیت الایزا (ترموفیشر)، نردبان DNA 50bp (ترموفیشر)، پرایمر بیوتیلینه و غیر بیوتیلینه، ssDNA library به طول ۸۲ نوکلئوتید که شامل ۴۰ نوکلئوتید متغیر در وسط و۲۱ نوکلئوتید ثابت در دو طرف می‌باشند (Metabion Germany).

(5-CCTAACCGATATCACACTCAC -N40- GTTGGTCGTCATTGGAGTATC -3)

آماده سازی آپتامرهای ssDNA

جهت دستیابی به آپتامرهای ssDNA، از روش PCR نامتقارن استفاده شد. جهت کاهش خطا و حصول ssDNA های خالص، ابتدا شرایط PCR بهینه سازی شد، برای این منظور اجزا PCR مورد بررسی و بهینه سازی قرار گرفتند. این اجزا شامل، غلظت کتابخانه ، پرایمر، آنزیم، بافر، منیزیم ، dNTPs بودند، همچنین برنامه دستگاه شامل تعداد چرخه و دمای اتصال و زمان هر کدام از مراحل مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت اجزا مورد استفاده در PCR نامتقارن شامل: الگو (کتابخانه ssDNA)، پرایمرها فوروارد و ریورس با نسبت ۱:۸۰ (پرایمر فوروارد با غلظت کاری ۱۰ پیکومول و پرایمر ریورس با غلظت کاری ۱ پیکومول تهیه شدند)، بافر ۱۰ میلی مول، منیزیوم کلراید ۵۰ میلی مول، dNTPs با غلظت ۱۰ میلی مول، آنزیم Taq polymerase و آب مقطر با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر (۱۱, ۱۳, ۱۹) بود که بر اساس برنامه زیر واکنش انجام گرفت: دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه ۵ دقیقه، تعداد ۲۰ سیکل (۹۴درجه ۲۰ ثانیه، ۵۷ درجه ۲۰ ثانیه، ۷۲ درجه ۱۰ ثانیه) و مرحله تکثیر نهایی ۷۲ درجه ۵ دقیقه. جهت آماده سازی ssDNA ها ، ابتدا میزان ۴ نانوگرم از الگوی مورد نظر در واکنش تحت گرما قرار گرفت (دمای ۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه) سپس درون ظرف یخ قرارداده شد. سپس طبق دستورالعمل فوق PCR نامتقارن انجام شد. محصولات جهت حذف ناخالصی ها، رسوبگذاری شدند. جهت رسوب گذاری ssDNA های تولید شده با روش PCR نامتقارن، از اتانل خالص سرد به همراه استات سدیم ۳ مولار و گلیکوژن استفاده شد. پس از مخلوط مواد با محصولات PCR نامتقارن، مواد در فریزر ۷۰- به مدت یک شبانه روز قرارداده شدند، پس از سانتریفیوژ (۱۲۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه)، سوپرناتانت خارج و رسوبات با اتانل ۷۰٪ شستشو و سانتریفیوژ شدند . پس از خشک شدن رسوبات در دمای اتاق، رسوبات که شامل محصولات PCR خالص بودند در آب مقطر حل شده و در فریزر ۲۰- جهت ادامه کار نگهداری شدند. این محصولات به

عنوان آپتامرهای ورودی چرخه سلکس استفاده خواهند شد. قبل از ورود به مرحله بعد سلکس، محصولات بر روی ژل پلی اکریل آمید (PAGE) ۱۰٪ مورد بررسی قرارگرفتند. برای این منظور میزان ۵ میکرولیتر از محصولات PCR نامتقارن بر روی ژل PAGE به همراه بافر TBE الکتروفورز شد و پس از رنگامیزی با اتیدیوم بروماید با دستگاه اسپکتروفتومتر مورد بررسی قرار گرفت (۱۱،۱۳،۱۹)

آماده سازی ستون‌های کروماتوگرافی (منفی، مشابه و مثبت)

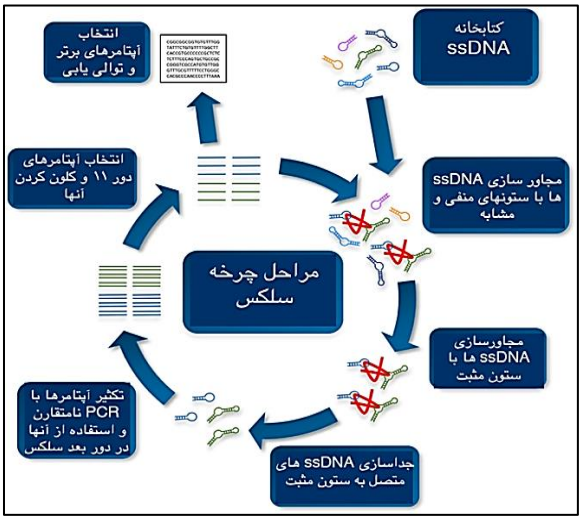
این ستون‌ها شامل ستون‌های مثبت، منفی و مشابه هستند. از ژل سیانوژن بروماید در این ستون‌ها استفاده شد. در ستون مثبت بر روی ژل، پروتئین CtxB قرار گرفت و در ستون مشابه، پروتئین‌های StxB و LtB قرار گرفتند ولی در ستون منفی هیچ پروتئینی بر روی ژل قرارداده نشد. فرآیند آماده سازی ژل بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده (سیگما) انجام شد. بافرهای مورد استفاده شامل، بافر فسفات، بافر استات، گلایسین ۰،۲ مولار، اسید کلریدریک ۱ میلی مولار و بافراتصال بود. غلظت پروتئین‌های مورد استفاده در بافر ۱ نانومول بوده که قبل از اتصال و بعد از اتصال از طریق اسپکتروفتومتر مورد ارزیابی قرار گرفت و در نهایت میزان غلظت پروتئین‌های متصل به ژل محاسبه شد. اتصال پروتئینها از طریق گروه‌های آمین موجود در پروتئین‌ها و گروه سیانات ژل سفارز صورت گرفت (۱۲،۱۵).

چرخه سلکس

پس از آماده سازی ستون‌ها، چرخه سلکس جهت جداسازی آپتامر مورد نظر جهت تشخیص CtxB انجام شد. این چرخه مراحل مختلفی دارد که شامل مراحل زیر است: ۱- اتصال کتابخانه ssDNA به ستون ۲- شستشوی ستون جهت جداسازی ssDNA های غیرمتصله ۳- جداسازی ssDNA متصل به ستون ۴- رسوبگذاری ssDNA های جدا شده و انجام PCR نامتقارن ۵- استفاده از این محصولات در مرحله بعد چرخه سلکس (شکل ۲).

چرخه سلکس در ۱۱ دور انجام می‌شود که دورهای سلکس تقریبا مشابه هم بوده و تکرار دورها، جهت جدا نمودن بهترین ssDNA (آپتامر) صورت می‌گیرد. برخی تغییرات در دورها اعمال می‌گردد که شامل: ۱- کاهش میزان ssDNAهای ورودی ۲ - کاهش زمان اتصال در ستون مثبت ۳- افزایش تعداد شستشوها ۴- افزودن تویین بعد از دور ۶ سلکس ۵- کاهش زمان جداسازی آپتامرهای متصل به ستون مثبت. تمام موارد فوق جهت افزایش اختصاصیت آپتامر صورت گرفت(۱۴،۲۰). جهت انجام دور اول سلکس، ابتدا ۷۵ میکروگرم از کتابخانه ssDNA با ۵۰۰ میکرولیتر بافر اتصال مخلوط شد وتحت گرما قرار گرفت (۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه و سپس درون ظرف سرد قرارگرفت) و سپس وارد ستون منفی شد، ستون به مدت ۶۰ دقیقه بر روی شیکر (دمای اتاق) قرار گرفت. پس از این زمان سانتریفیوژ انجام شد و سوپرناتانت که شامل آپتامرهای غیرمتصل بود به ستون مشابه وارد شد و بر روی شیکر به مدت ۶۰ دقیقه قرار گرفت. پس از این زمان مجددا سانتریفیوژ انجام شد و سوپرناتانت به درون ستون مثبت وارد شد و ستون ۳۰ دقیقه بر روی شیکر در دمای اتاق قرار گرفت. در این مرحله، آپتامرهای متصل به ستون، همان آپتامرهای مورد نیاز هستند، بنابراین پس از سانتریفیوژ، سوپرناتانت دور ریخته شد و ستون پس از ۵ بار شستشو با PBS، درون بافر گلایسین- HCl قرار داده شد و مجددا به مدت ۳۰ دقیقه بر روی شیکر قرار گرفت. اینکار جهت جداسازی آپتامرهای متصل به ستون مثبت (CtxB) انجام گرفت. پس از این زمان سانتریفیوژ انجام شد و سوپرناتانت که حاوی آپتامرهای متصل به CtxB بودند جدا شده و بر روی آن رسوبگذاری اتانل انجام شد. میزان ۵ میکرولیتر از محصولات بر روی ژل PAGE ۱۰٪ برده شد. وجود نمای دو بانده بیانگر وجود آپتامرهای مورد نظر است. این محصولات پس از تکثیر با PCR نامتقارن، به عنوان ورودی چرخه سلکس در دور دوم مورد استفاده قرار گرفت. تمام ۱۱ دور سلکس با همین شیوه و تغییرات گفته شده، انجام شد ولی استفاده از ستون‌های منفی و مشابه فقط در دورهای ۱،۴،۸ انجام شد.پس از جدا سازی آپتامرهای حاصل از سلکس ۱۱، تمامی محصولات دورهای مختلف از نظر اتصال به CtxB مورد ارزیابی قرار گرفتن تا بهترین دور سلکس جهت ادامه کار انتخاب گردد، جهت ارزیابی از روش الازا استفاده شد.تمام محصولات دورهای ۱۱ گانه سلکس با روش PCR نامتقارن و با استفاده از پرایمر فوروارد بیوتیلینه تکثیر شدند و جهت ارزیابی و میزان تمایل با مولکول هدف (CtxB) در تکنیک الازا مورد استفاده قرار گرفتند. مراحل واکنش الازا شامل: ۱- مرحله پوشاندن پروتئین CtxB به میزان ۲ میکروگرم در هر چاهک (به جز چاهک ها کنترل) ۲- شستشو با بافر PBS ۳- بلاک کردن نواحی خالی چاهک با skimmilk ۵٪ ۴ - مجددا شستشو ۵- استفاده از آپتامرهای بیوتیلینه

دورهای ۱۱ گانه سلکس در هر چاهک (به جز چاهک های کنترل) ۶- مجددا شستشو ۷- افزودن HRP-conjugated با رقت ۱:۵۰۰۰ (به جز چاهک های کنترل) ۸- شستشو ۹- افزودن بافر و سوبسترای OPD (O-Phenylenediamine Dihydrochloride) ۱۰- توقف واکنش با اسید سولفوریک ۲,۵ مولار. پس از انجام مراحل فوق، میزان OD با دستگاه الایزاریدر در ۴۵۰ نانومتر بررسی شد (۱۲،۱۸،۲۰). بیشترین میزان جذب بیانگر بهترین دور سلکس خواهد بود. این آپتامرهای منتخب، جهت کلون کردن در باکتری و آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.



شکل ۲- نمای شماتیک چرخه سلکس (۱۷)، اجزا و مراحل مختلف ان. ابتدا کتابخانه ssDNA با ستون‌های منفی و ستون‌های دارای پروتئین مشابه، مجاور می‌شود. پس از سانتریفیوژ، سوپرناتانت وارد ستون مثبت می‌شود (مرحله اتصال)، پس از شستشوی ستون، جداسازی ssDNA های متصل به ستون مثبت انجام می‌شود (مرحله جداسازی)، در نهایت تکثیر ssDNA های جدا شده وبررسی آن‌ها بر روی ژل PAGE ۱۰٪ و استفاده از آن‌ها در دور بعدی سلکس انجام می‌شود (مرحله تکثیر). استفاده از ستون‌های منفی و مشابه فقط در دورهای ۱،۴،۸ سلکس انجام می‌شود. پس از دور ۱۱ سلکس و بررسی محصولات ۱۱ دور، بهترین محصولات جهت کلون کردن و توالی یابی انتخاب می‌شوند. ارسال جهت توالی‌یابی شامل آپتامرهایی می‌شود که بیشترین تمایل به مولکول هدف را دارند که این ارزیابی توسط تکنیک الازا انجام می‌شود.

کلون نمودن آپتامرها

جهت کلون نمودن از کیت کلونینگ Clone Jet PCR استفاده شد و طبق پروتکل شرکت سازنده با استفاده از وکتور Pjet cloning vector مراحل انجام شد. پس از کلون کردن آپتامرهای منتخب به درون پلاسمید، پلاسمیدها به باکتری میزبان (E.coli DH5α) انتقال یافتند پس ازکشت بر روی محیط LB حاوی آمپی سیلین، به مدت یک شبانه روز در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفتند. تعداد ۴۱ کلونی از محیط کشت انتخاب شدند و پلاسمیدهایشان استخراج و شماره گذاری شدند. این پلاسمیدها از نظر وجود قطعات آپتامر مورد بررسی قرار گرفتند برای این کار از روش colony PCR استفاده شد. محصولات بر روی ژل PAGE ۱۰٪ برده شدند و از نظر وجود باند مورد بررسی قرار گرفتند. کلونی‌هایی که حاوی پلاسمید نوترکیب بودند ذخیره شدند.

توالی یابی آپتامرهای منتخب

کلونی‌های ذخیره شده مرحله قبل، از نظر اتصال به CtxB مورد ارزیابی قرارگرفتند جهت انجام این کار از روش الازا استفاده شد. (قبلا شرح داده شده است) همچنین کلونی ها از نظر اتصال به پروتئین‌های مشابه (StxB, LtB) هم با روش الازا مورد ارزیابی قرارگرفتند. درنهایت کلونی‌هایی که بیشترین میزان اتصال به CtxB و کمترین میزان اتصال به پروتئین‌های مشابه را داشتند انتخاب شدند. بهترین کلونی (بیشترین تمایل به CtxB و کمترین تمایل به LtB و StxB) جهت توالی یابی به شرکت فن‌آوران ارسال شد.

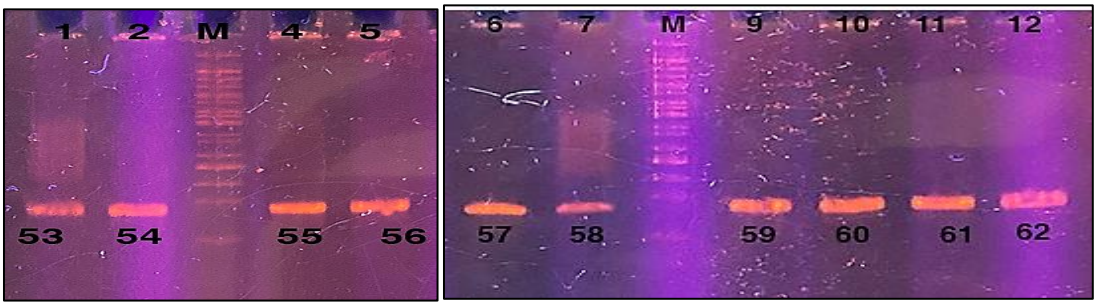
بررسی های آماری

تمامی محاسبات آماری در این مطالعه بعد از انجام آزمایش به صورت سه بار تکرار و به صورت میانگین ± انحراف معیار (SD) ارائه گردید، همچنین در این مطالعه مقادیر P-value کمتر از ۰،۰۵ به عنوان اختلاف معنی دار بین گروه‌ها در نظر گرفته شد.

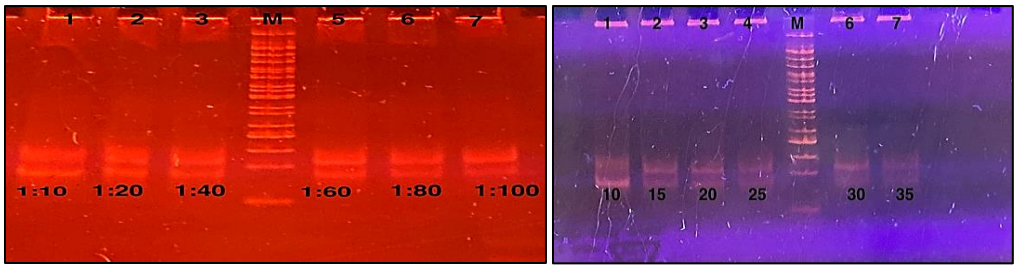
نتایج

آماده سازی آپتامرهای ssDNA

جهت آماده سازی ssDNA از روش PCR نامتقارن استفاده شد. برای انجام کار چندین واکنش PCR انجام شد تا بتوان به شرایط ایده آل دست یافت. سه فاکتور، غلظت‌های نابرابر پرایمر، تعداد سیکل‌های کمتر، دمای ایده آل درآزمایش مورد استفاده قرارگرفتند. سایراجزا PCR و همچنین سایر شرایط دستگاه ترموسایکلراز طریق واکنش PCR ساده به دست آمد. این عوامل در PCR نامتقارن بدون تغییر بودند ولی غلظت پرایمر فورووارد به ریورس ۸۰: ۱ با این شرایط بهترین باند با کمترین اسمیر و ناخالصی گزارش شد. برطبق شکل ۳ هرچه میزان آپتامرهای به دست آمده خالص تر باشد و میزان اسمیر و دایمر کمتری داشته باشند در مراحل بعد موانع کمتر و نتایج بهتر حاصل خواهد شد.



A



B C

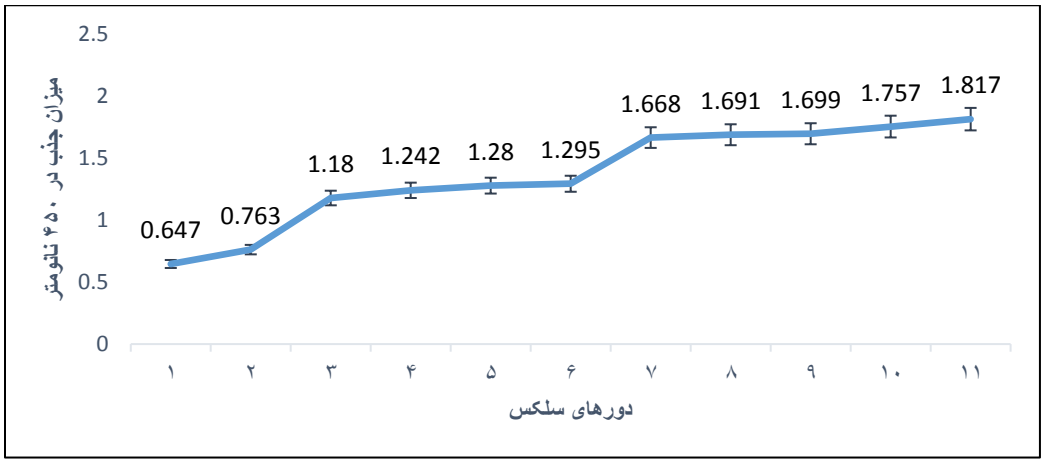
شکل۳- بهینه سازی شرایط PCR نامتقارن. شکل A: انجام واکنشPCR با گرادیانت دمایی، تمام فاکتورها ثابت در نظر گرفته شدند و فقط دما از چند درجه پایین تر و بالاتر از دمای ذوب پرایمر (۵۹ درجه) در نظر گرفته شد. در دمای ۵۷ باندی شارپ و بدون اسمیر مشاهده شد. چاهک های ۱-۱۲ دماهای متفاوت واکنش‌های PCR را نشان می‌دهد. چاهک ۶ که متعلق به دمای ۵۷ است به عنوان بهترین دمای واکنش در نظر گرفته شد. چاهک M همان مارکر DNA است. شکل B: انجام PCR نامتقارن با نسبت‌های متفاوت پرایمر فورووارد و ریورس، در این آزمایش تمام فاکتورها ثابت در نظر گرفته شد و فقط نسبت‌های متفاوت پرایمرها لحاظ گردید. بهترین نمای دوبانده با کمترین اسمیر در نسبت ۱:۸۰ پرایمر فورووارد به ریورس دیده شد (چاهک شماره ۶). شکل C: واکنش PCR نامتقارن با سیکل های متفاوت (بقیه عوامل ثابت) انجام شد. بهترین نمای دوبانده بدون اسمیر در سیکل ۲۰ دیده شد. در تمام ژل ها از مارکر ۵۰bp DNA استفاده شد. این فاکتورهای بهینه شده در واکنش PCR نامتقارن مورد استفاده قرار گرفت.

جداسازی آپتامرهای اختصاصی CTXB

جهت جداسازی آپتامرهای مورد نظر از روش سلکس استفاده شد. برای این‌کار از ستون‌های کروماتوگرافی سیانوژن بروماید استفاده گردید. این ستون‌ها روشی سریع و راحت و دقیق جهت جداسازی مولکول‌های هدف هستند. آماده سازی طبق روش شرکت سازنده (سیگما) انجام شد. بر روی ستون مثبت پروتئین CtxB، بر روی ستون مشابه پروتئین‌های StxB, LtB قرار داده شدند و بر روی ستون منفی پروتئینی قرار نگرفت. اتصال برای CtxB به میزان ۹۴٪ , برای StxB و LtB ۸۵٪ به دست آمد. جهت به دست اوردن میزان اتصال، غلظت پروتئین‌ها قبل از قرار گرفتن در مجاورت بیدهای سیانوژن بروماید، و بعد از مجاورت بیدها با استفاده از اسپکتروفتومتر به دست آمد (طبق دستورالعمل شرکت سیگما) و این کار با استفاده از پروتئین‌های موجود در سوپرناتانت انجام شد.

پس از آماده‌سازی ستون‌ها، با استفاده از روش سلکس، جداسازی آپتامرهای هدف (با میل ترکیبی بالا بهCtxB) انجام شد. برای این هدف ssDNA های حاصل از PCR نامتقارن (به دست آمده در مرحله قبل) وارد ستون‌ها گردید. ستون‌های منفی و مشابه، جهت افزایش اختصاصیت آپتامر مطلوب به کار رفت. این ستون‌ها باعث حذف آپتامرهای غیراختصاصی شدند. سلکس در ۱۱ دور انجام شد که در دورهای اول، چهارم و هشتم از هر سه ستون استفاده شد، در سایر دورها فقط از ستون مثبت استفاده شد. پس از یازدهمین دور، تمامی محصولات ۱۱ گانه با روش الازا بررسی شدند.

میزان جذب در دور۱۱ سلکس تقریبا ۲،۵ برابر میزان جذب در دور دوم سلکس بود (شکل ۴).



شکل۴- نمودار میزان تمایل آپتامرهای تولید شده در هر دور سلکس با مولکول هدف (CtxB) را نشان می‌دهد. این ارزیابی با تکنیک الازا انجام شد و بیشترین جذب (تمایل به CTXB) در دور ۱۱ سلکس دیده شد.

ارزیابی آپتامرها

آپتامرهای به دست آمده از دور ۱۱ سلکس، شامل تعدادزیادی آپتامر بود. جهت جدا نمودن این آپتامرها از روش کلون کردن استفاده شد. در این شرایط هر آپتامر در یک پلاسمید وارد شد. کلونینگ جهت دستیابی به اهداف مختلفی انجام می شود مانند، جدا نمودن آپتامرها از هم، توالی‌یابی آپتامرها و بررسی آپتامرها از نظر میزان اختصاصیت.

آپتامرهای حاصل از دور ۱۱ سلکس، با کمک کیت کلونینگ (Clone Jet PCR Cloning kit) به درون پلاسمید وارد شدند و سپس پلاسمیدها به باکتری *E. coli* (DH5-α) انتقال یافتند. تعداد زیادی کلونی به دست آمد که از این تعداد به طور تصادفی ۴۱ کلونی مورد بررسی قرار گرفت (با روش کلونی PCR) که تعداد ۳۹ کلونی از نظر پلاسمید نوترکیب مثبت بودند. تمام آپتامرهای موجود در این ۳۹ کلونی از نظر میزان اتصال به CtxB بررسی شدند که تعداد ۳ آپتامر که بیشترین میزان تمایل به CtxB را داشتند از نظر اتصال با پروتئین‌های مشابه StxB و LtB (با روش الازا. مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۱).

در نهایت بهترین آپتامر(آپتامر ۳) که بیشترین تمایل به CtxB و کمترین میزان اتصال به StxB, LtB را داشت به عنوان آپتامر برتر انتخاب شد. این آپتامر جهت توالی یابی فرستاده شد، توالی آپتامر منتخب به شرح زیر بود:

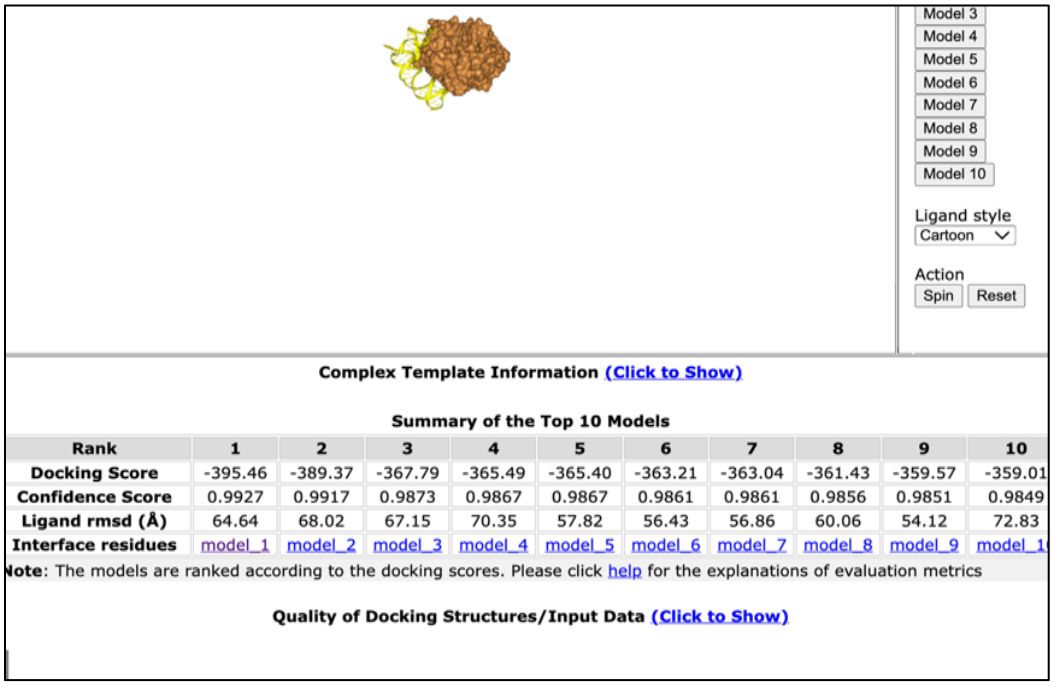
GTTGGTTGTCATTGGAGTATCAGTATACCGCT
CCCACTCCCGCTCCGCGTGAGTGTGATATCG
GTTAGG این آپتامر مورد ارزیابی بیوانفورماتیکی قرار گرفت.

جدول ۱- آپتامرهای منتخب از نظر میزان اتصال با CtxB و پروتئین‌های مشابه مورد ارزیابی قرار گرفتند این کار با کمک تکنیک الازا انجام شد که بهترین آپتامر، آپتامر شماره ۳ بود که بیشترین میزان OD را با CtxB و کمترین میزان OD با پروتئین‌های مشابه را داشت.

آپتامر	میزان OD با CtxB	میزان OD با StxB	میزان OD با LtB
۱	۱/۶۶۹	۱/۰۵۲	۰/۸۱۶
۲	۱/۵۹۵	۰/۹۵۹	۱/۰۵
۳	۱/۸۲۶	۰/۸۹	۰/۲۹۴

بررسی های بیوانفورماتیکی

آپتامر منتخب از نظر اتصال با CtxB مورد ارزیابی بیوانفورماتیکی قرارگرفت. برای این منظور PDB ID پروتئین از وبسایت (PDB) استخراج شد. سپس RNA ID آپتامر نیز از وبسایت (RNA composer web server) به دست آمد. در نهایت هر دو داده به Hdock server ارسال شد و نتیجه به دست آمده، برهمکنش مناسب بین آپتامر و پروتئین را نشان داد. شکل ۵ همچنین ساختار دوم و پایداری آپتامر از نظر میزان انرژی آزاد نیز در وبسایت RNAfold بررسی گردید (جدول ۲).



شکل ۵- برهمکنش پروتئین CtxB و آپتامر ۳ که توسط Hdock server پیش بینی شده است. میزان اتصال ۳۹۵/۴۶- محاسبه گردید.

جدول ۲- بررسی ساختار دوم آپتامر ۳ و میزان انرژی آزاد (با کمک وبسایت RNAfold انجام شد).

ساختار دو بعدی آپتامر	
حداقل انرژی آزاد	**- ۱۸,۵۵kcal/mol**

بحث

باکتری ویبریو کلرا، میکروارگانیسم گرم منفی که باعث بیماری اسهال می‌شود. این باکتری اثر بیماریزایی‌اش را از طریق کلرا توکسین ایجاد می‌کند. این توکسین دارای دو زیرواحد A، B است. زیرواحد A در بیماریزایی و زیرواحد B در اتصال باکتری به دیواره روده نقش دارد (۱۹, ۲۴, ۲۵). جهت پیشگیری از شیوع و اپیدمی، روش‌های تشخیصی بسیاری معرفی شده اند ولی روش‌های تشخیصی سریع و دقیق علی الخصوص در مراحل اولیه در پیشگیری از گسترش و انتشار بیماری نقش سزایی دارد (۴،۲۰،۲۶).

تحقیقات زیادی در زمینه شناسایی این باکتری انجام شد: سعید و همکارانش وسیله‌ای تشخیصی بر پایه آنتی بادی مونوکلونال معرفی کردند این وسیله را Cholkit نامیدند. از این نوار جهت تشخیص کلرا در نمونه مدفوع استفاده کردند. این نوار بر اساس آنتی بادی مونوکلونال طراحی شده بود که لیپوپلی ساکارید دیواره سلولی باکتری را مورد هدف قرار می‌داد. این محققین بر روی مدفوع ۷۶ بزرگسال بررسی انجام دادند و روش خود را با سایر روش‌های تشخیصی (کشت میکروب, PCR) مقایسه کردند و میزان دقت و حساسیت روش خود را ۹۷-۹۷٪ اعلام کردند (۲۶). اگرچه استفاده از آنتی‌بادی جهت تشخیص، روشی رایج و متداول است و امروزه به کارگیری روش‌های تشخیصی سریع، مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است ولی به دلیل برخی محدودیت‌های آنتی بادی مانند ناپایداری در دمای بالا، طراحی پیچیده، سایز بزرگ و شرایط خاص نگهداری باعث توجه بیشتر محققین به آپتامر گردید. با جایگزینی آپتامر به جای آنتی‌بادی در روش‌های تشخیصی سریع، می‌توان به راحتی در مناطق دور و به دور از امکانات از این روش سود جست. همچنین تحقیقات زیادی در مورد برتری آپتامر نسبت به آنتی بادی انجام شده است (۲۹-۲۷). در تحقیق‌های دیگر که توسط فرونمایر و همکارانش انجام شد، از آپتامر جهت تشخیص کلراتوکسین در مواد غذایی استفاده شد. این گروه از بیدهای مغناطیسی و امولسیون PCR (emPCR) جهت تکثیر DNA و در ادامه با کمک روش حرارتی اقدام به تولید ssDNA نمودند. این گروه با استفاده از تکنیک SELEX تعداد ۸ آپتامر جدا نمودند و در نهایت یک آپتامر را به عنوان آپتامر برتر معرفی نمودند. این گروه در ادامه از آپتامر به دست آمده و لیپوزوم و نانوذره طلا جهت شناسایی کلراتوکسین با کمک روش سنجش جریان جانبی (LFA) استفاده نمودند و آن را با آنتی بادی مقایسه نمودند. کمترین حد تشخیص در این روش ۲ ng/mL و با استفاده از آنتی‌بادی کمترین حد تشخیص ۵ ng/mL به دست آمد. این گروه اذعان داشتند که استفاده از آپتامر روشی مقرون به صرفه، ساده و سریع بوده و امکان انجام در مناطق دوردست را دارد. اگرچه در جهت تولید ssDNA روش‌های مختلفی وجود دارد و یکی ازآن‌ها استفاده از روش حرارتی است که به دلیل سهولت انجام آن، بسیاری از محققین از آن برای تولید ssDNA استفاده می‌کنند ولی مهمترین روش تولید ssDNA تکنیک PCR نامتقارن است که با بهینه‌سازی شرایط می‌توان به نتایج و محصولاتی با کیفیف بالا دست یافت (۱۱). در تحقیق حاضر، برخی از شرایط، بهینه سازی شد. این عوامل، شامل دمای اتصال، نسبت پرایمرها و تعدادسیکل‌های دستگاه ترموسایکلر بود.

جهت بهینه‌سازی دمای اتصال، با توجه به دمای ذوب پرایمرها (۵۹ ˚C) سریالی از دمای اتصال بین ۵۳-۶۲ در واکنش PCR مورد بررسی قرار گرفت که بهترین دما ۵۷ ˚C به دست آمد. همچنین پرایمرهای فوروارد به ریورس با نسبت‌های ۱:۱۰، ۱:۲۰، ۱:۴۰، ۱:۶۰، ۱:۸۰، ۱:۱۰۰ آماده شدند (پرایمر فوروارد با غلظت کاری ۱۰ پیکومول و پرایمر ریورس ۱ پیکومول مورد استفاده قرار گرفت). بهترین نمای دو بانده مربوط به نسبت ۱:۸۰ بود. در این واکنش پرایمر با غلظت بالاتر (فوروارد) مسئول تولید ssDNA و پرایمر با غلظت کمتر (ریورس) مسئول تولید dsDNA است. فاکتور آخر تعداد سیکل‌های چرخه PCR بود که تعداد چرخه‌ها بین ۱۰-۳۵ با فاصله ۵ انجام شد و بهترین باند در ۲۰ دورمشاهده گردید. در تمام مراحل بهینه سازی واکنش، فقط یک متغیر مورد بررسی قرار گرفت و سایر عوامل ثابت بودند همچنین برای تعیین مقدار سایر اجزا PCR نامتقارن، ابتدا PCR متقارن انجام شد و میزان سایر اجزا (میزان الگو، بافر، dNTPs، آنزیم و منیزیم) به دست آمد و این مقادیر در PCR نامتقارن مورد استفاده قرار گرفت. با بهینه سازی شرایط PCR نامتقارن می‌توان بر بسیاری از موانع و مشکلات آن غلبه نمود از جمله مشکلاتی که در PCR نامتقارن دیده می‌شود می‌توان به عدم تولید ssDNA، تولید dsDNA، وجود اسمیر و ایجاد دایمر اشاره نمود که با طراحی مناسب اجزا PCR می‌توان این موانع را برطرف نمود و ssDNA هایی با خلوص و کیفیت بالا به دست آورد که در بهتر شدن نتایج چرخه سلکس تاثیرگذار خواهد بود (۱۱). وجود نمای دوبانده در واکنش نشاندهنده انجام صحیح واکنش است که در این نما، یک باند شارپ تر از باند دیگر است. باند شارپ نمایانگر ssDNA و باند ضعیف بیانگر dsDNA می‌باشد.

مجرد و همکاران تحقیقی در مورد تشخیص باکتری ویبریوکلرا با تکنیک ساندویچ الازا انجام دادند. آن‌ها از سلکس بر پایه سلول جهت تشخیص استفاده نمودند. طی ۱۲ مرحله سلکس تعداد زیادی اپتامر جدا کردند که از این تعداد ۲ آپتامر را مورد ارزیابی قرار دادند میزان تمایل بین ۵۳-۵۶٪ و ثابت تفکیک ۱۵-۲۰ پیکومول گزارش شد. این محققین از باکتری‌های مشابه (یرسینیا، کلبسیلا، سالمونلا و شیگلا) به عنوان واکنش متقاطع استفاده نمودند و اعلام نمودند که می‌توان از روش الازا جهت تشخیص باکتری به عنوان روشی دقیق و حساس استفاده نمود (۱۹). اگرچه روش سلکس بر پایه سلول دارای مزایایی می‌باشد مانند عدم نیاز به تخلیص پروتئین و عدم نیاز به شناسایی کامل مولکول هدف، ولی نسبت به روش سلکس بر پایه پروتئین دارای محدودیت‌هایی می‌باشد از جمله این محدودیت‌ها می‌توان به محدود بودن سطح سلول، جذب غیراختصاصی آپتامر توسط سلول‌های مرده، جداسازی آپتامرها توسط مولکول‌های غیرهدف اشاره نمود (۱۴). در تحقیق پیش رو اگرچه از تکنیک سلکس جهت جداسازی آپتامر استفاده شد ولی آپتامر جدا شده علیه کلرا توکسین (سلکس بر پایه پروتئین) انتخاب شد. به عبارتی از روش سلکس بر پایه پروتئین که روشی دقیق و سریع و با حساسیت بالاست جهت شناسایی CtxB استفاده شد. استفاده از سلکس بر پایه پروتئین باعث افزایش دقت و اختصاصیت آپتامر جدا شده می‌شود. همچنین محدودیت‌های سلکس بر پایه سلول نیز در تحقیق حاضر به دلیل استفاده از کلراتوکسین به جای سلول، حذف گردید. جهت جدا نمودن آپتامرهای اختصاصی علیه CtxB، از ستون‌های کروماتوگرافی و ژل‌های سیانوژن بروماید استفاده‌گردید. استفاده از بافرهای مناسب در طراحی دقیق و صحیح ستون‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. بافر اتصال جهت اتصال پروتئین‌ها (CtxB ,StxB ,LtB) بر روی ژل ها استفاده شد، قبل از قرار دادن پروتئین‌ها در این بافر، ابتدا پروتئین‌ها درکیسه دیالیز و درون بافر واسط قرار داده شدند (اینکار جهت جلوگیری از رسوب پروتئین صورت گرفت) سپس کیسه دیالیز حاوی پروتئین‌ها درون بافر اتصال قرار گرفت. اتصال پروتئین‌ها بر روی ژل از طریق گروه آمین در پروتئین با گروه سیانات در سفارزژل صورت می‌گیرد. پروتئین CtxB جهت ستون مثبت و پروتئین‌های StxB , LtB جهت آماده سازی ستون مشابه استفاده شدند (۱۲, ۲۵). اتصال صحیح و کافی پروتئین بر روی ژل‌ها، در جداسازی صحیح آپتامرها اهمیت دارند. این مرحله (آماده سازی ستون‌ها) باید با دقت کافی انجام شود تا در مراحل ۱۱ گانه سلکس، مشکلی پیش نیاید. میزان اتصال پروتئین‌ها از طریق اسپکتروفتومتر و با بررسی غلظت پروتئین قبل از استفاده و بررسی سوپرناتانت بعد استفاده (از نظر وجود پروتئین) انجام شد (۱۲،۲۰). صدیقیان و همکارانش روش پروتئین سلکس را جهت شناسایی استافیلوکوک معرفی نمودند. آن‌ها از DNA آپتامر جهت شناسایی و خنثی‌سازی پروتئین SEA (Staphylococcal Enterotoxin Type A) استفاده نمودند. این توکسین توسط استافیلوکوک ایجاد شده و سبب مسمومیت غذایی گسترده می‌شود. این گروه با کمک تکنیک PCR نامتقارن و به استفاده از روش سلکس آپتامرهای ssDNA را علیه توکسین SEA جدا نمودند و آن را مورد ارزیابی قرار دادند. آن‌ها اذعان داشتند که استفاده از آپتامر

باعث کاهش هزینه و زمان، افزایش دقت و حساسیت می‌شود (۲۰). با استفاده از تکنیک SPR (surface plasmon resonance)، میزان ثابت تفکیک را ۰/۹ نانومول و کمترین حد تشخیص را ۵ ng/mL به دست آوردند. در تحقیقات دیگر از آپتامر جهت شناسایی توکسوپلاسما (۲۱) و بروسلا (۳۰) استفاده شد. مونیکا و همکاران از تکنیک سلکس جهت جداسازی آپتامر علیه پروتئین ROP 18 استفاده کردند. بیان این پروتئین که از انگل توکسوپلاسما منشا می‌شود باعث بیماری توکسوپلاسموز در حیوانات خانگی می‌گردد. کمترین حد تشخیص آپتار ۱/۵۶ µg/mL گزارش شد (۲۱). نوزاز و همکارانش از آپتامر جهت شناسایی گونه‌های مختلف بروسلا (آبورتوس و ملیتنسیس) استفاده کردند. این باکتری در انسان باعث عقیمی و سقط جنین می‌شود. این گروه جهت تولید ssDNA از آنزیم اگزونوکلئاز لامبدا استفاده کردند و جهت جداسازی آپتامر علیه باکتری از روش سلکس بر پایه سلول استفاده نمودند. آپتامر B20 علیه باکتری بروسلا ملیتنسیس و آپتامر B21 علیه باکتری بروسلا آبورتوس جدا شدند که به ترتیب ثابت تفکیک آن‌ها pM ۳/۰۶ ± ۴۰/۱۷۹ و pM ۴۶۵ ± ۱۸۴/۳۹۶ محاسبه گردید (۳۰). در تحقیق پیش رو، جهت شروع ابتدا کتابخانه ssDNA که با روش PCR نامتقارن تکثیر شده بود (شرایط بهینه سازی شده: نسبت ۱:۸۰ پرایمرها و دمای ۵۷ و تعداد سیکل ۲۰) مورد استفاده قرار گرفت. این محصولات تک رشته‌ای قبل از بردن بر روی ستون‌ها مجددا با روش حرارتی به صورت تک رشته‌ای درآمدند. اگرچه با PCR نامتقارن اغلب محصولات تک رشته‌ای هستند ولی وجود محصولات دورشته‌ای غیرقابل اجتناب بوده بنابراین با اینکار تمام محصولات به صورت تک رشته‌ای خواهند بود. اگرچه تمام مراحل دورهای سلکس تقریبا مشابه بود ولی برخی تغییرات جزئی در هر مرحله انجام شد که این تغییرات باعث افزایش اختصاصیت و دقت در جداسازی آپتامرها می‌شود مثلا افزودن توئین به PBS در مرحله شستشو، باعث جدا شدن آپتامرهای متصله ضعیف می‌شود و یا کاهش زمان اتصال آپتامر در ستون مثبت، باعث عدم اتصال آپتامرهای غیر اختصاصی و در نتیجه عدم ایجاد اسمیر می‌گردد. سلکس در ۱۱ دور انجام شد که در دورهای اول و چهارم و هشتم از هر سه ستون استفاده شد، در سایر دورها فقط از ستون مثبت استفاده گردید. اگرچه در هر دور از سلکس با اعمال برخی تغییرات مانند کاهش زمان اتصال، افزایش دفعات شستشوی بیدها و افزودن توئین به آن اختصاصیت آپتامر منتخب افزایش داده شد ولی استفاده از ستون‌های منفی و مشابه نیز در این امر بسیار کمک کننده بودند. جهت تایید درستی انجام چرخه سلکس، بعد از مرحله ۵ و ۸ آپتامرهای به دست آمده از نظر اتصال به پروتئین CtxB مورد ارزیابی قرارگرفتند این بررسی با تکنیک الازا انجام شد و نتایج نشاندهنده افزایش OD در هر مرحله سلکس بود که این امر باعث انجام ادامه کار شد. بعد از دور ۱۱ سلکس نیز مجددا آزمایش الازا برای تمام دورها انجام شد و میزان اتصال آپتامرهای جدا شده در هر دور، با CtxB مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان OD به دست آمده از آپتامرهای دور ۱۱،تقریبا ۲/۵ برابر آپتامرهای دور۲ سلکس بود بنابراین آپتامرهای دور ۱۱ سلکس جهت کلونینگ استفاده شد و نهایتا یک آپتامر به عنوان آپتامر اختصاصی CtxB معرفی گردید.

نتیجه‌گیری

آپتامر انتخاب شده دارای برهمکنش مناسب با کلرا توکسین بوده و به طور اختصاصی با میل ترکیبی بالا به مولکول هدف (کلرا توکسین) متصل می‌شود، با بکارگیری آپتامر به‌دست آمده در کیت‌های تشخیصی، می‌توان رقت‌های کم توکسین را در نمونه‌های مورد ارزیابی شناسایی و اقدام موثر و سریع را انجام داد.

ملاحظات اخلاقی

ندارد.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می دارند تعارض منافعی وجود ندارد.

منابع

1.Ganesan D, Gupta SS, Legros D. Cholera surveillance and estimation of burden of cholera. Vaccine. 2020;38:A13-A7.
2.Dittmer JB, Withey JH. Identification and characterization of the functional toxboxes in the Vibrio cholerae cholera toxin promoter. Journal of bacteriology. 2012;194(19):5255-63.
3.Yen M, Cairns LS, Camilli A. A cocktail of three virulent bacteriophages prevents Vibrio cholerae infection in animal models. Nature communications. 2017;8(1):1-7.
4.Ramamurthy T, Das B, Chakraborty S, Mukhopadhyay AK, Sack DA. Diagnostic techniques for rapid detection of Vibrio cholerae O1/O139. Vaccine. 2020;38:A73-A82.
5.Zhao X, Lin C-W, Wang J, Oh DH. Advances in rapid detection methods for foodborne pathogens. J Microbiol Biotechnol. 2014;24(3):297-312.
6.Hao M, Zhang P, Li B, Liu X, Zhao Y, Tan H, et al. Development and evaluation of an up-converting phosphor technology-based lateral flow assay for the rapid, simultaneous detection of Vibrio cholerae serogroups O1 and O139. PloS one. 2017;12(6).
7.Sadeghi M, Assar S. An in vitro antimicrobial activity of ten Iranian-made toothpastes. Dental research journal. 2009;6(2):87.
8.Khorasani MY, Assar S, Rezahosseini O, Assar S. Comparison of inhibitory dilutions of a thymol-based mouthwash (Orion®) with chlorhexidine on Streptococcus mutans and Streptococcus sanguis. مجله دانشکده دندانپزشکی اصفهان. ۹-۲۰۱۱:۱۲۲.
9.Pfaller MA. Molecular approaches to diagnosing and managing infectious diseases: practicality and costs. Emerging infectious diseases. 2001;7(2):312.
10.Justino CI, Freitas AC, Pereira R, Duarte AC, Santos TAR. Recent developments in recognition elements for chemical sensors and biosensors. TrAC Trends in Analytical Chemistry. 2015;68:2-17.
11.Heiat M, Ranjbar R, Latifi AM, Rasaee MJ, Farnoosh G. Essential strategies to optimize asymmetric PCR conditions as a reliable method to generate large amount of ssDNA aptamers. Biotechnology and applied biochemistry. 2017;64(4):541-8.
12.Hedayati Ch M, Amani J, Sedighian H, Amin M, Salimian J, Halabian R, et al. Isolation of a new ssDNA aptamer against staphylococcal enterotoxin B based on CNBr-activated sepharose-4B affinity chromatography. Journal of Molecular Recognition. 2016;29(9):436-45.
13.Nehdi A, Samman N, Aguilar-Sánchez V, Farah A, Yurdusev E, Boudjelal M, et al. Novel Strategies to Optimize the Amplification of Single-Stranded DNA. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 2020:401.
14.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.
15.Liang C, Li D, Zhang G, Li H, Shao N, Liang Z, et al. Comparison of the methods for generating single-stranded DNA in SELEX. Analyst. 2015;140(10):3439-44.
16.Chen A, Yang S. Replacing antibodies with aptamers in lateral flow immunoassay. Biosensors and bioelectronics. 2015;71:230-42.
17.Kohlberger M, Gadermaier G. SELEX: Critical factors and optimization strategies for successful aptamer selection. Biotechnology and Applied Biochemistry. 2022;69(5):1771-92.
18.Masoudipour E, Mousavi SL, Basiri M. Specific detection of Shigella sonnei by enzyme-linked aptamer sedimentation assay. 2011.
19.Mojarad AE, Gargaria SLM. Aptamer-nanobody based ELASA for detection of Vibrio cholerae O1. Iranian Journal of Microbiology. 2020;12(4):263.
20.Sedighian H, Halabian R, Amani J, Heiat M, Taheri RA, Fooladi AAI. Manufacturing of a novel double-function ssDNA aptamer for sensitive diagnosis and efficient neutralization of SEA. Analytical biochemistry. 2018;548:69-77.
21.Vargas-Montes M, Cardona N, Moncada DM, Molina DA, Zhang Y, Gómez-Marín JE. Enzyme-linked Aptamer assay (ELAA) for detection of Toxoplasma ROP18 protein in human serum. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2019;9:386.
22.Frohnmeyer E, Frisch F, Falke S, Betzel C, Fischer M. Highly affine and selective aptamers against cholera toxin as capture elements in magnetic bead-based sandwich ELAA. Journal of biotechnology. 2018;269:35-42.
23.Marimuthu C, Tang T-H, Tominaga J, Tan S-C, Gopinath SC. Single-stranded DNA (ssDNA) production in DNA aptamer generation. Analyst. 2012;137(6):1307-15.
24.Broeck DV, Horvath C, De Wolf MJ. Vibrio cholerae: cholera toxin. The international journal of biochemistry & cell biology. 2007;39(10):1771-5.

25.Kazemi R, Akhavian A, Amani J, Salimian J, Motamedi M-J, Mousavi A, et al. Immunogenic properties of trivalent recombinant protein composed of B-subunits of LT, STX-2, and CT toxins. Microbes and Infection. 2016;18(6):421-9.
26.Sayeed A, Amin J, Islam K, Hossain M, Sultana N, Akter NJ, et al., editors. DEVELOPMENT OF A NEW DIPSTICK FOR RAPID DETECTION OF VIBRIO CHOLERAE O1 IN ACUTE WATERY DIARRHEAL STOOLS. AMERICAN JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE; 2017: AMER SOC TROP MED & HYGIENE 8000 WESTPARK DR, STE 130, MCLEAN, VA 22101 USA.
27.Ali MH, Elsherbiny ME, Emara M. Updates on aptamer research. International journal of molecular sciences. 2019;20(10):2511.
28.Lee J-O, So H-M, Jeon E-K, Chang H, Won K, Kim YH. Aptamers as molecular recognition elements for electrical nanobiosensors. Analytical and bioanalytical chemistry. 2008;390:1023-32.
29.Yu H, Alkhamis O, Canoura J, Liu Y, Xiao Y. Advances and challenges in small-molecule DNA aptamer isolation, characterization, and sensor development. Angewandte Chemie International Edition. 2021;60(31):16800-23.
30.Nosaz Z, Rasoulinejad S, Gargari SM. Development of a DNA aptamer to detect Brucella abortus and Brucella melitensis through cell SELEX. Iranian Journal of Veterinary Research. 2020;21(4):294.