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

Nafiseh Shafiei[1], Hamideh Mahmoodzadeh Hosseini[2]*, Jafar Amani[2], Seyed Ali Mirhosseini[2], Hanieh Jafary[1]

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 E -9 and 5.1674E-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.

Corresponding author:
Applied Microbiology Research Center, Biomedicine Technologies institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Email: hosseini361@yahoo.com

بررسی قدرت اتصال و حساسیت دو آپتامر 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، پژوهشکدهٔ فناوری‌های زیست‌پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: باکتری *اشریشیاکلی* 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، آپتامرها 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 مقایسهٔ دو آپتامر و شناسایی سلول باکتری *اشریشیاکلی* انجام شده‌است.

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

یافته‌ها: حد تشخیص برای آپتامر E. Coli 73 و E. Coli 81، 10^3 CFU/mL به‌دست آمد و میل اتصال آپتامر E. Coli 73 و *E. coli 81* به سلول باکتری به‌ترتیب ۵/۱۶۷۴ E-۸ و ۱/۸۱۳۷ E -۹ مولار محاسبه شد.

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

واژگان کلیدی: آپتامر، باکتری *اشریشیاکلی* O157:H7، ELISA، پلاسمای رزونانس سطحی.

مقدمه

باکتری *اشریشیاکلی* O157:H7[۱] یک سویهٔ شایع و خطرناک از عفونت باکتریایی است که در برخی از غذاهای انسانی اعم از محصولات گوشتی و لبنیات یافت می شود. این باکتری مادهٔ سمّی به‌نام شیگا توکسین تولید می‌کند که یک عامل کلیدی در ایجاد طیف وسیعی از بیماری‌های گوارشی، از اسهال آبکی گرفته تا کولیت هموراژیک و سندم اورمیک- همولیتیک است(۱, ۲). علاوه‌بر این، باکتری *اشیرشیاکلی* O157:H7 حاوی دستگاه‌های سیستم ترشحی نوع ۳ (T3SS) و عوامل مؤثری مانند اینتیمین، گیرندهٔ اینتیمین (Tir) و پروتئین‌های تر شح شده (Esps) است. این افکتورها (Effectors) منجر به اتصال باکتری به سلول‌های اپیتلیال رودهٔ میزبان و ایجاد ضایعات چسبنده و از بین برندهٔ بافت می‌شوند (۱, ۳).

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

نویسنده مسئول:
مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، پژوهشکدهٔ 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

[۱] *Escherichia coli* O157:H7

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 *اشریشیاکلی* O157:H7، روش‌های شناسایی مبتنی بر کشت و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) به‌عنوان روش‌های استاندارد درنظر گرفته می‌شوند (۵). روش‌های مبتنی بر کشت می‌توانند نتایج دقیق و درستی را ارائه دهند، درحالی‌که PCR حساسیت و اختصاصیت بیشتری دارد. بااین‌حال، به‌دلیل پیش غنی‌سازیِ لازم، هر دو روش زمان‌بر (تقریباً ۵۶-۴۸ 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 فوریه (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 همهٔ 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 درحال توسعه دشوار است. بنابراین، تقاضای زیادی برای توسعهٔ روش تشخیص *اشریشیاکلی* O157:H7 ارزان، قابل‌حمل، سریع و بسیار حساس در محل برای کشورهای درحال توسعه و مناطق دورافتاده بدون آزمایشگاه پیشرفته وجود دارد (۱۱).

در سال ۱۹۸۰ ایدهٔ اتصال اسیدهای نوکلئیک به پروتئین‌ها مطرح شد که منجر به کشف مولکول‌های جدید به‌نام آپتامر شد (۱۲). آپتامر در واقع قطعات کوچک از توالی‌های پپتیدی یا اسیدنوکلئوتیکی است که در شرایط آزمایشگاهی از طریق روشی به‌نام تکامل سیستماتیک لیگاندها توسط غنی‌سازیِ نمایی (SELEX) جدا می‌شوند (۱۳). این فرآیند تکاملی شامل چندین دور انتخاب و غنی‌سازی است تا آپتامرهایی با خواص اتصالی بالا و ساختارهای سه‌بُعدی منحصربه‌فرد به‌دست آید (۱۴). بر اساس همین ساختارهای سه‌بُعدی 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، گزینهٔ مناسبی به‌عنوان جایگزین آنتی‌بادی‌ها در بسیاری از کاربردهای بیولوژیک از جمله کابردهای درمانی و تشخیصی هستند (۲۱-۱۹). ازاین‌رو این مطالعه به‌منظور مقایسهٔ دو آپتامر اختصاصی با هدف شناسایی پروتئین‌های سطحی سلول‌های *اشیرشیاکلی* O157:H7 به روش ELISA و پلاسمای سطحیِ رزونانس انجام شد تا در تحقیق‌های آینده از آن برای تست نواری استفاده گردد.

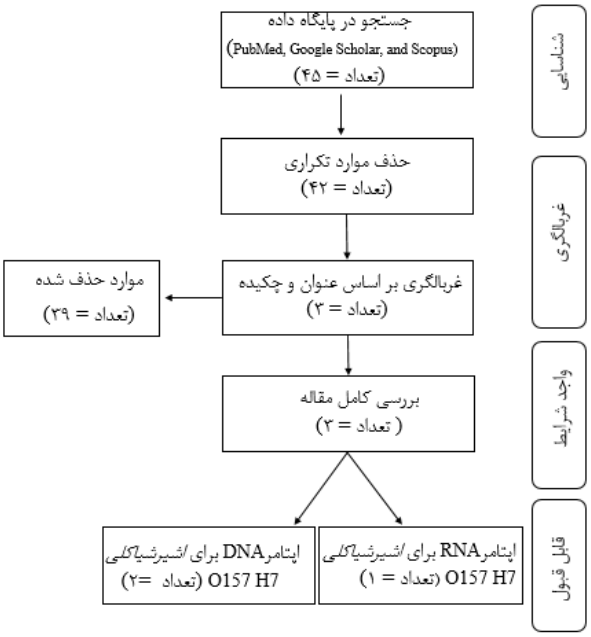
مواد و روش‌ها

تهیهٔ سویهٔ باکتری

باکتری *اشریشیاکلی* سویهٔ O157:H7 از مرکز تحقیقات میکروبی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله دریافت شد.

انتخاب آپتامر های ssDNA اختصاصیِ باکتری *اشریشیاکلی* سویهٔ O157:H7

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



شکل ۱- مراحل انتخاب آپتامر براساس نمودار PRISMA

بررسی ساختار دوم آپتامرها

برای هر دو آپتامر انتخاب‌شده، ساختار ثانویه با استفاده از وب ســـــرور mfold (http://www.unafold.org/mfold) پیش‌بینی شد.

طراحی آغازگرهای رفت و برگشت

طراحی آغازگرهای هریک از آپتامرها با استفاده از نرم‌افزار آنالیز Oligo 7 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 آلمانیِ متابیون سفارش داده شد. آغازگر رفت به جهت ELISA بیوتینیله شد. طبق دستورالعمل شرکت سازنده به هرکدام از ویال‌ها آب‌مقطر استریل اضافه شد و با غلظت ۱۰۰ µM به‌عنوان استوک در فریزر ۲۰- درجهٔ سلسیوس نگهداری شد. برای به‌دست آوردن غلظت پایین‌تر در PCR، استوک‌ها مجدداً با آب‌مقطر 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-ATCCGTCACACCTGCTCTAC
برگشت E. Coli 73	ATACGGGAGCCAACACCATA
رفت E. Coli 81	Biotin-CATACGTTCGACTGCTACTCTG
برگشت E. Coli 81	CTAGTCTGTACATCTCACATTTCGT

[1]Primer

تکثیر توالی‌های آپتامری توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

به‌منظور تکثیر توالی‌های تک‌رشته‌ای برای اندازه‌گیری تمایل آپتامر گزینش‌شده با پروتئین غشای باکتری ازPCR 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 هریک از آپتامرها انجام شد. در این پژوهش نیز برای تکثیر رشتهٔ 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 درجهٔ سلسیوس) به محصولات PCRاضافه شد و با ۳ مولار استات سدیم و ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر گلیکوژن مخلوط گردید. مخلوط به‌مدت یک شب در دمای ۲۰- درجهٔ سلسیوس انکوبه شد. سپس مخلوط به‌مدت ۳۰ دقیقه با ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس سانتریفوژ شد و مایع رویی دور ریخته شد. رسوب الیگونوکلئوتیدی در ۲۰ میکرولیتر آب‌مقطر دوبار تقطیر، حل و غلظت محلول به کمک نانودراپ و با توجه به جذب در طول‌موج ۲۶۰ نانومتر تعیین شد.

جدول ۲- روند دماییِ واکنش PCR برای آپتامر 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 دماییِ واکنش PCR برای آپتامر 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 آپتامری DNA

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

آماده‌سازی سلول‌های باکتری *اشریشیاکلی* O157:H7

باکتری *اشریشیاکلی* O157:H7 در ۵ میلی‌لیتر محیط‌کشت براث کشت داده و در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس به‌مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شد. سپس، با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر، جذب نور در طول‌موج مشخصی (معمولاً ۶۰۰ نانومتر) اندازه‌گیری شد. برای این منظور، در ابتدا دستگاه با یک محیط‌کشت که جذب نوری باکتری آن صفر است (کنترل منفی) به‌عنوان بلانک صفر شد. سپس باکتری با آب مقطر رقیق‌شده و جذب نوری آن با اسپکتروفتومتر اندازگیری شد. زمانی‌که به OD موردنظر رسید، ۱۰۰۰ ماکرولیتر از آن به‌داخل میکروتیوپ منتقل و با دور ۸۰۰۰rpm به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. مایع‌رویی که حاوی محیط‌کشت بدون باکتری است خارج شد و به رسوب باکتری ۱۰۰۰ ماکرولیتر PBS اضافه و به‌مدت 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 ماکرولیتر PBS اضافه و در آن حل شد تا باکتری‌ها برایELISA آماده شوند.

بررسی حساسیت با روشindirect-ELISA

برای بررسی پتانسیل آپتامر گزینش‌شده، تعیین حداقل غلظت سلول باکتری که توسط آپتامر قابل‌شناسایی است ضروری می‌باشد. با استفاده از روش ELISA غیرمستقیم حد تشخیص تعیین شد. برای اینکار، ابتدا رقت‌های مختلف از سلول باکتری CFU/mL ۱۰۸، ۱۰۷، ۱۰۶، ۱۰۵ و ۱۰۴ تهیه شد. درون چاهک‌های صفحات ۹۶ چاهکی الایزا پوشانده شد و به‌مدت یک ساعت در یخچال (۴ درجهٔ 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 PBS (pH=7.2) که حاوی توئین ۰٪/۰۵ (PBST) است شسته شد. مرحلهٔ بعد به هرکدام از چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر بافر مسدودکننده اضافه و ۴۵ دقیقه در ۳۷ درجهٔ سلسیوس انکوبه گردید. چاهک‌ها همانند مرحلهٔ قبلی شست‌وشو داده شد، در این هنگام ۱۰۰ نانومول آپتامر رقیق شده در بافر اتصال را ۱۰ دقیقه حرارت داده سپس بر روی یخ قرار گرفت و در ادامه ۱۰۰ میکرولیتر از آپتامر به چاهک‌ها اضافه شدند و به‌مدت ۱۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد با تکان ملایم انکوبه شدند. چاهک‌ها سه بار با PBST ۰/۰۵٪ شسته شد ند و ۱۰۰ میکرولیتر استرپتاویدین - HRP با رقت ۱:۵۰۰۰ در بافر PBS به هر چاهک اضافه شد. چاهک‌ها به‌مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجهٔ 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 H_2SO_4 ۲/۵ مولار متوقف شد و جذب در نانومتر ۴۵۰ نانومتر توسط میکروپلیت-ریدر Bio-Rad خوانده شد.

بهینه‌سازی غلظت آپتامر

به‌منظور اندازه‌گیری فعالیت بهینهٔ آپتامر، غلظت‌های مختلف از آپتامر (۱۰ nmol، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰) و غلظت باکتری O157:H7 (۱۰۶ CFU/mL) تهیه شدند. سپس به روش ELISA غیرمستقیم برطبق بند بالا اندازه‌گیری شد.

تعیین میل‌ترکیبی با استفاده از روش پلاسمای سطحیِ رزونانس

تعیین میل‌ترکیبی آپتامر گزینش‌شده توسط دستگاه رزونانس پلاسمون سطحی (Autolab ESPRIT) اندازه‌گیری شد. در طول اندازه‌گیری SPR، از بافر استات (۱۰ میلی‌مولار) به‌عنوان بافر Running buffer استفاده شد. باکتری O157:H7 (۱۰۶ CFU/mL) بر روی سطح تراشه تثبیت شد. سرعت جریان ۳۰ میلی‌لیتر در دقیقه به‌مدت ۱۵ دقیقه بود. غلظت‌های مختلف آپتامرهای کاندید از ۲۰ تا ۲۰۰۰ نانومولار در PBS با سرعت جریان ۲۵ میلی‌لیتر در دقیقه به‌مدت ۲ دقیقه تزریق شد. بازسازی سطح پوشش داده‌شده با آپتامر با ۱Glycin-HCL میلی‌مولار (pH = 2) به‌دست آمد. مقادیر ثابت تفکیک یا KD (dissociation constant) با استفاده از مدل آنالیت برهم‌کنش لانگمویر ۱:۱ به‌عنوان نسبت ثابت‌های سرعت (ثابت نرخ غیرفعال، :kon ثابت نرخ ثابت) محاسبه شد.

تجزیه‌وتحلیل آماری

تمام آزمایش‌ها دوبار با شرایط مشابه تکرار شدند. نتایج کمّی به‌عنوان میانگین ± انحراف‌معیار ارائه شد و داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Excel مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها

انتخاب، طراحی و سنتز آپتامرها

طی بررسی مقالات و نیز پایگاه‌های داده، دو توالی آپتامر تشخیصی E. Coli 73 و E. Coli 81 به‌عنوان دو آپتامر اختصاصی باکتری *اشریشیاکلی* O157:H7 انتخاب شدند.

- **توالی آپتامر تک‌رشته‌ای DNA، E. Coli 73:**

5'-
ATCCGTCACACCTGCTCTACGGCGCTCCCA
ACAGGCCTCTCCTTACGGCATATTATGGTG
TTGGCTCCCGTAT-3'

- **توالی آپتامر تک‌رشته‌ای DNA، E. Coli 81:**

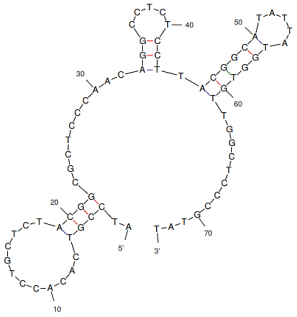
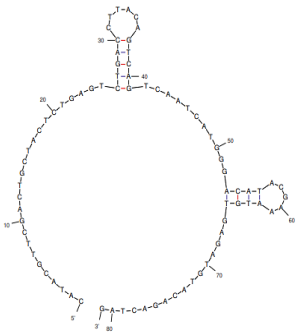
5'-
CATACGTTCGACTGCTACTCTGAGTCTGAC
CTTACAGTCAGTCAATCATGGGACATACGA
AATGTGAGATGTACAGACTAG-3'

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

تعیین ساختار دوم

ساختار ثانویهٔ آپتامرهای E. Coli 73 و E. Coli 81 و حداقل انرژی آزاد با استفاده از وب سرور Mfold پیش‌بینی شد. حداقل انرژی آزاد به‌ترتیب برای آپتامرهای E. Coli 73 و E. Coli 81 و به‌ترتیب Kcal.moL ۶/۱۶- و Kcal.moL ۵/۳۴- است. بنابراین، آپتامر E. Coli 73 حداقل انرژی آزاد کمتری را دارد و پایدارتر است. نتایج در جدول ۵ ارائه شده‌است.

جدول ۵- پیش‌بینی ساختار ثانویه همراه با انرژی آزاد

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

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

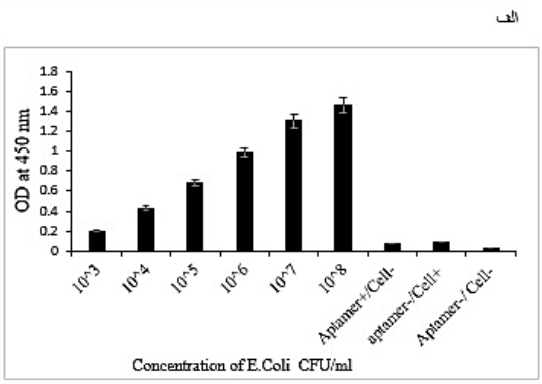
به‌منظور تأیید تکثیر تک‌رشته‌ای توالی الیگونوکلئوتیدی محصولات PCR نامتقارن روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شد. محصول PCR دارای تک‌باندی در محدودهٔ ۱۰۰-۵۰ نوکلئوتید بوده که نشان‌دهندهٔ تکثیر موفق توالی الیگونوکلئوتیدی با استفاده از آغازگرهای انتخابی است (شکل ۲).

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

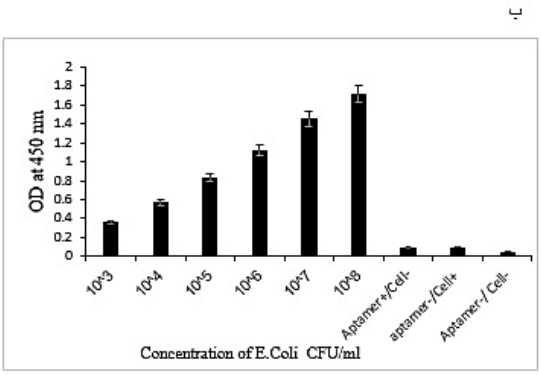
تعیین حد تشخیص

حد تشخیص باکتری *اشریشیاکلی* از طریق ELISA با غلظت مختلف سلول باکتری *اشریشیاکلی* O157:H7 (CFU/mL ۱۰۸، ۱۰۷، ۱۰۶، ۱۰۵، ۱۰۴، ۱۰۳) تعیین شد. همان‌طورکه در شکل ۳ نشان داده شده‌است، مقدار جذب با افزایش غلظت سلول باکتری *اشریشیاکلی* O157:H7 افزایش می‌یابد. حد تشخیص برای E. Coli 81 و E. Coli 73به‌ترتیب CFU/mL ۱۰۳ و ۱۰۴ 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.

الف



ب



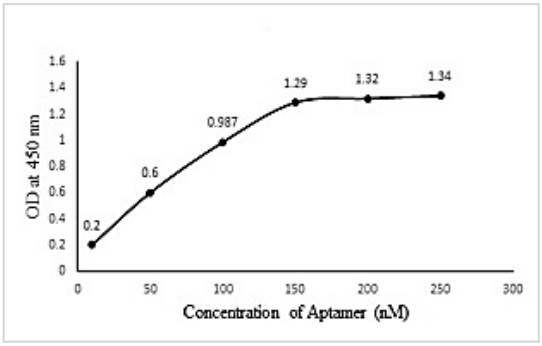
شکل ۳- بررسی حساسیت آپتامر با غلظت‌های مختلف سلول باکتری O157:H7 با استفاده از روش ELISA. الف) غلظت‌های مختلف سلول باکتری O157:H7در برابر آپتامر E. Coli 73 ، ب) غلظت‌های مختلف سلول باکتری O157:H7 در برابر آپتامر E. Coli 81.

بهینه‌سازی غلظت آپتامرها

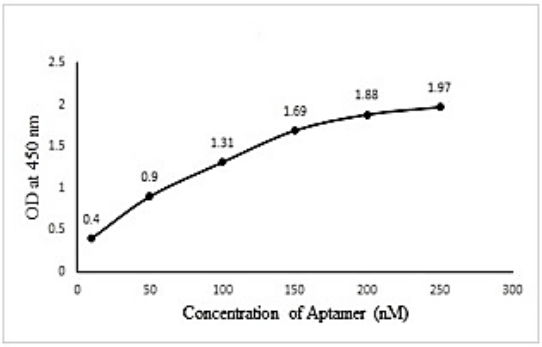
در مطالعهٔ حاضر، غلظت‌های مختلف آپتامرهای E. Coli 81 و E. Coli 73 تهیه شدند و با استفاده از روش ELISA، بهینه‌سازیِ غلظت آپتامرها محاسبه شد. همان‌طورکه شکل ۴ نشان می‌دهد که در غلظت‌های پایین آپتامر، مقدار جذب کم است و به‌تدریج با افزایش غلظت، آپتامر نیز افزایش

می‌یابد. بیشترین مقدار جذب برای E. Coli 73، در غلظت ۱۵۰ نانومولار به‌دست آمد و در غلظت‌های بالاتر رابطهٔ خطی دیده نشد. غلظت بهینه برای آپتامر E. Coli 81 نیز حدود ۲۰۰ نانومولار است.

الف



ب

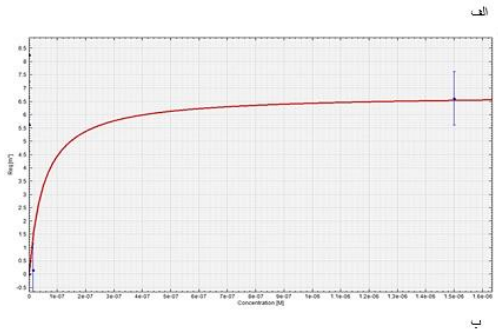


شکل۴- بهینه‌سازی غلظت آپتامر با استفاده از روش ELISA. الف) غلظت‌های مختلف آپتامر E. Coli 73 در برابر سلول باکتری O157:H7. ب) غلظت‌های مختلف آپتامر E. Coli 81 در برابر سلول باکتری O157:H7.

بررسی ثابت تفکیک (KD) با استفاده از SPR

میل اتصال بین سلول باکتری O157:H7 و آپتامرها E. Coli (73 و E. Coli 81) با استفاده از روش SPR (رزونانس پلاسمون سطحی) ارزیابی شد. ثابت تفکیک تعادل (KD) برای اتصال آپتامرهای E. Coli 73 و E. Coli 81 محاسبه شد و به‌ترتیب ۵/۱۶۷۴ E-۸ و ۱/۸۱۳۷ E-۹ مولار است (شکل۵). آپتامر E. Coli 81 میل اتصال بالاتری را نشان داد.

الف



ب

شکل ۵- ارزیابی KD با استفاده از دستگاه SPR. غلظت مختلف آپتامر (۲/۵، ۱۵، ۱۵۰ و ۲۰۰۰ نانومولار) در بافر PBST با غلظت ۱۰ میلی‌مولار (pH = 7.4)تهیه شده و از روی سطح سلول باکتری O157:H7 (۱۰^{۶} CFU/mL) عبور کرد. الف) ارزیابی میل اتصال بین سلول باکتری O157:H7 با آپتامر E. Coli 73، ب) ارزیابی میل اتصال بین سلول باکتری O157:H7 با آپتامر E. Coli 81.

بحث

باکتری *اشریشیاکلی* O157:H7، یک پاتوژن مشترک بین انسان و دام است و از مهمترین عوامل باکتریایی ایجادکنندهٔ اسهال است که منجر به شرایط تهدیدکنندهٔ حیات در انسان می‌شود (۲۲). این باکتری در هنگـام بـروز عفونت قادر است که آسـیب‌هـای تخریبـیِ شـدید در سـلول‌هـای اپیتلیال روده ایجـاد کنـد. حضور این باکتری در دامداری‌ها، متعاقب آن آلودگی فرآورده‌های لبنی و سپس جوامع انـسانی، سبب ایجاد مشکلات اقتصادی و بهداشتی شده‌است. بنابراین توجه ویژه‌ای به روش‌های تشخیص معتبر و سریع برای اتخاذ درمان مناسب و پیشگیری از عفونت معطوف شده‌است (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 پیچیدهٔ stem-loop را نشان داد. ساختار دوم آپتامر E. Coli 73 از سه hairpin و یک لوپ بزرگ تشکیل شده‌است و آپتامر E. Coli 81 شامل دو hairpin و یک لوپ بزرگ است. حد تشخیص و غلظت بهینهٔ 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 به‌ترتیب ۵/۱۶۷۴ E-۸ و ۱/۸۱۳۷ E-۹ بود. ازاین‌رو آپتامرها به سلول باکتری متصل می‌شوند اما آپتامر E. Coli 81تمایل اتصال بالای آپتامر به سلول باکتری *اشریشیاکلی* O157:H7 را نشان داد. همچنین حد تشخیص، یکی از مهمتـرین ارقـام شایسـتگی بـرای مقایسهٔ روش‌های مختلف تجزیه‌ای است کـه در ایـن مطالعه حد تشخیص CFU/mL ۱۰۳ بـه‌دسـت 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 CFU /mL ۱۰۲ گزارش کردند (۲۴). همچنین Bo Pang و همکاران در سال ۲۰۱۸، ELISA مبتنی بر کاغذ برای تشخیص سریع *اشریشیاکلی* ایجاد کردند و حد تشخیص CFU/mL ۱۰۴ 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 CFU/mL ۵×۱۰ محاسبه شد (۲۵).

به‌طور کلی، این نتایج نشـــان می‌دهند که هر دو آپتامر قادر به شناساییِ سلول‌های باکتری O157:H7 هستند که بیانگر توانایی بالای اتصـال هر دو آپتامر اسـت. بااین‌حال، آپتامر E. Coli 81 حســاســیت و تمایل ترکیبیِ بالاتری نشـــان می‌دهد. بنابراین، آپتامر E. Coli 81 می‌تواند جایگزین مناسبی برای آنتی‌بادی در کیت‌های تشخیصی مبتنی بر آنتی‌بادی باشد.

نتیجه‌گیری

در مطالعهٔ حاضر، از آپتامر های 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 موردارزیابی قرار گرفت. مقدار LoD آپتامرهای E. Coli 73 و E. Coli 81 در حدود CFU/mL ۱۰۳ با KD حدود ۵/۱۶۷۴ E-۸، ۱/۸۱۳۷ E-۹ به‌ترتیب 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. ازآنجایی‌که مولکول‌های آپتامر دارای مزایای منحصربه‌فرد در غربال‌گری، آماده‌سازی، پایداری بیولوژیکی و کاربرد هستند، انتظار می‌رود که در آینده به‌عنوان عوامل تشخیصی، چشم‌انداز کاربردیِ 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 SELEXمواجه است، زیرا غلظت‌های آپتامر پایین‌تر در هر دور جداسازی باقی می‌ماند تا در فاز تکرار بعدی استفاده شود. علاوه‌بر این، واکنش متقابل آپتامر و پایداریِ زیستی آپتامرها در داخل بدن از دیگر چالش‌های موجود در این زمینه است که باید در مطالعات آتی موردبررسی قرار گیرد.

ملاحظات اخلاقی

ندارد.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که تعارض منافعی وجود ندارند.

سپاسگزاری

بدین وسیله از آقای دکتر رمضانعلی طاهری، رئیس مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی نانو دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله که ما را در اجرای بخشی از این تحقیق یاری نمودند سپاس‌گزاری می‌گردد.

منابع

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.