

کاربرد آپتامر در شناسایی باکتری‌های بیماریزا

● مژگان خیراندیش

کارشناسی ارشد میکروب شناسی، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران



● دکتر حبیب ضیغمی

دانشیار باکتری شناسی، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران



zeighami@zums.ac.ir

باکتری‌های بیماریزا اهمیت تحقیق و مطالعه هرچه بیشتر این زمینه را نشان می‌دهد.

کلمات کلیدی: آپتامر، باکتری‌های بیماریزا، تکنیک SELEX

□ مقدمه

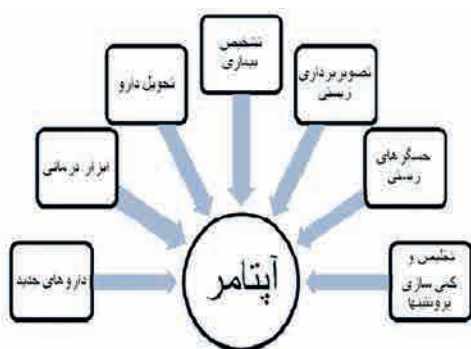
تشخیص، شناسایی و اندازه‌گیری کمی پاتوژن‌های میکروبی برای محافظت از سلامت عمومی حیاتی است. تست‌های بر پایه کشت میکروبی و آزمایش‌های مولکولی (تکنولوژی‌های ایمنی شناسی یا نوکلئیک اسید) متداول‌ترین روش‌هایی هستند که در حال حاضر مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱). این تکنیک‌ها زمان بر بوده و نیاز به ابزار پیچیده و افراد آموزش دیده دارند، بنابراین منجر به افزایش هزینه آنالیز می‌شوند. تکنیک‌های تشخیص سریع باید شناسایی قابل اعتماد، به موقع، با کاربرد آسان و ارزان، همراه با حساسیت، اختصاصیت و قابلیت تکرار پذیری برابر یا بیشتر را فراهم کنند (۲).

شناسایی و تعیین مقدار مولکول‌ها در پیشرفت مطالعات پایه و بررسی‌های کلینیکی نقش حیاتی دارد. تکنولوژی‌هایی که امکان شناسایی اختصاصی و تعیین دقیق مولکول‌ها را فراهم می‌نمایند در پی یافتن آنالیت‌های جدید برای بهبود تکنیک‌های موجود می‌باشد. امروزه این تکنولوژی‌های پیشرفته به محققان این امکان را می‌دهد

□ چکیده

تشخیص، شناسایی و اندازه‌گیری کمی پاتوژن‌های میکروبی برای محافظت از سلامت عمومی حیاتی است. علیرغم این که در حال حاضر تست‌های مبتنی بر کشت میکروبی و تکنیک‌های مولکولی متداول‌ترین روش‌های مورد استفاده هستند، این تکنیک‌ها زمان بر بوده و نیاز به ابزار پیچیده و افراد آموزش دیده دارند. در نتیجه، آنالیز این تکنیک‌ها هزینه بر می‌باشد. پیدایش آپتامر، منجر به بر طرف نمودن نواقص سایر روش‌های مولکولی گردید. همچنین، توانایی اتصال اختصاصی آپتامرها به اهداف مختلف، پتانسیل بزرگی در آن‌ها به وجود آورده است که می‌توان از آن‌ها در شناسایی پاتوژن‌های گوناگون استفاده کرد. آپتامرها توسط یک فرآیند آزمایشگاهی تدریجی به نام SELEX از کتابخانه‌های ترکیبی جدا می‌شوند. مراحل SELEX شامل تکرار مراحل ساخت کتابخانه، اتصال/ جداسازی و تکثیر است. این مطالعه مروری بر روی کاربرد آپتامرها به عنوان عامل شناسایی و درمانی باکتری‌های بیماریزا است. آپتامرها با توجه به پایداری بالا و همچنین میل ترکیبی بالا در استفاده‌های بالینی در درمان و تشخیص باکتری‌های بیماریزا کاربردهای وسیع و گسترده‌ای دارند. قابلیت‌ها و کاربردهای آپتامرها و حسگرهای ساخته شده از آن‌ها در زمینه‌های علوم مختلف به خصوص تشخیص و شناسایی ویروس‌ها، توکسین‌ها و

SELEX شامل پروتئین‌ها، آنزیم‌ها، آنتی‌بادی‌ها، آنتی‌بیوتیک‌ها و توکسین‌ها می‌باشند. همچنین اهداف کمپلکس شامل سلول کامل، مولکول‌های سطح سلولی، قطعات غشایی، لیزات باکتریایی و ذرات ویروس هستند که می‌توانند به عنوان هدف باشند (۹،۱۰). امروزه آپتامرها در دو کلاس عمده آپتامرهای DNA/RNA و آپتامرهای پپتیدی تقسیم بندی می‌شوند (۱۱). آپتامرهای پیشرفته به طور اولیه به عنوان ابزار درمانی و تشخیصی مطرح شدند. آغاز استفاده از آپتامرها به عنوان درمان در سال ۱۹۹۰ بود، اما ۱۵ سال طول کشید تا اولین آپتامر درمانی به بهره برداری بالینی برسد (۱۲). در حال حاضر آپتامرها برای درمان ماکولار دجنریشن، سندرم کرونری حاد، اختلال مربوط به فاکتور ون ویلبراند، لوکمی میلوئید حاد، سرطان سلول کلیوی، سرطان ریه، پورپورای ترومبوتیک ترومبوسیتوپنیک، دیابت نوع ۲، نفروپاتی، لوپوس و همچنین آپتامرهایی علیه ویروس‌ها در مراحل مختلف توسعه و بالین هستند، بنابراین آینده روشنی برای آپتامرها به عنوان عوامل درمانی در پیش است (۴). تکنولوژی آپتامر به عنوان یک تکنولوژی معتبر و مؤثر گسترش یافته و مطالعات زیادی از کاربردهای آپتامرها انجام گرفته است و امروزه آپتامرها در جنبه‌های مختلف به عنوان یک ابزار تشخیصی و درمانی، در گسترش داروهای جدید و سیستم‌های تحویل دارو و غیره به کار می‌روند (۴) (شکل ۱).



شکل ۱. کاربردهای مختلف آپتامرها

که هویت مولکول‌ها را بنا بر خواست خود تغییر دهند و بنابراین مولکول‌های جدیدی تولید نمایند که کاربردهای متنوعی دارند به گونه‌ای که حتی گاهی این کاربردها می‌تواند کاملاً متفاوت با طبیعت اولیه این مولکول‌ها باشد. برای مثال مولکول‌های آنتی‌بادی که آنتی‌ژن‌ها را با تمایل و اختصاصیت بالا شناسایی می‌کنند در حال حاضر دچار تغییرات درونی برای کاتالیز کردن واکنش‌های مختلف شده‌اند تا همانند یک آنزیم عمل نمایند (۳).

بر اساس مطالعه Lazcka و همکاران در سال ۲۰۰۷، تکنولوژی بیسنسور^۱ یک زمینه با سریع‌ترین پیشرفت در شناسایی پاتوژن‌ها است. آپتامرها، الیگونوکلئوتیدهایی از جنس مولکول‌های تک رشته‌ای RNA و ssDNA یا مولکول‌های پپتیدی هستند که به علت ساختار سه بعدی خاصشان می‌توانند با اختصاصیت و تمایل بالا به اهدافشان متصل شوند (۴).

در آزمون‌های تشخیصی، آپتامرها می‌توانند به عنوان یک عامل تشخیصی جایگزین برای آنتی‌بادی‌ها باشند. آپتامرها از طریق فرآیندهایی در *in vivo* انتخاب می‌شوند که هزینه و تنوع کمتری نسبت به آنتی‌بادی‌های تولید شده در شرایط *in vivo* نشان می‌دهند. علاوه بر این توکسین‌ها و مولکول‌هایی که موجب پاسخ ایمنی خوبی نمی‌شوند، می‌توانند برای تولید آپتامرهایی با افینیتی بالا استفاده شوند (۵).

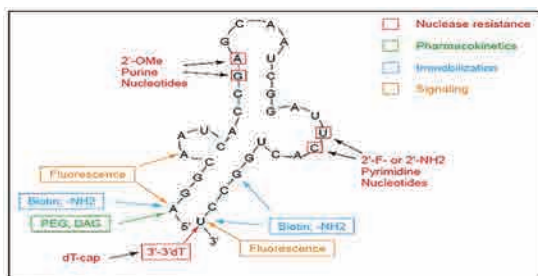
مطالعات معتبر فراوانی روی آپتامرها انجام گرفت تا این که فرآیند انتخاب در محیط آزمایشگاه اولین بار در سال ۱۹۹۰ توسط گروه محققین Gold و گروه Szostak SELEX^۲ نامیده شد (۷،۶) با گسترش SELEX که امروزه یک تکنیک پایه ایی برای جدا سازی آپتامرهاست، بسیاری از آپتامرها مستقیماً به صورت *in vitro* علیه اهداف مختلف از بیومولکول‌های کوچک گرفته تا پروتئین‌ها و حتی سلول‌ها انتخاب می‌گردند (۸).

آپتامرها می‌توانند برای تنوع گسترده‌ای از اهداف، از مولکول‌های کوچک تا سلول کامل انتخاب شوند. اهداف

- 1- biosensor technology
- 2- Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment



شد که نه تنها روی مقاومت و پایداری آن‌ها، بلکه روی عملکرد آن‌ها نیز تأثیر مثبت گذاشت. پایدار سازی می‌تواند با پوشاندن سرهای ۳' و ۵' الیگونوکلئوتیدها و همچنین ایجاد اصلاحات روی قند ریبوز و گروه فسفات میسر شود (شکل ۳) (۱۷).



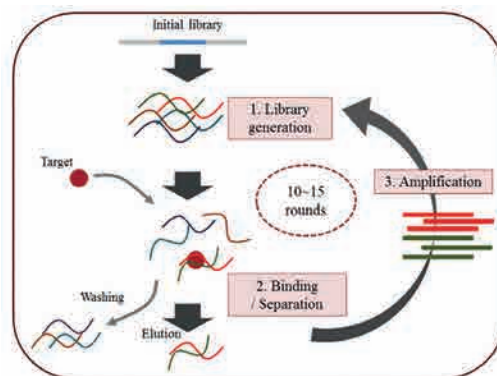
شکل ۳. اصلاحات سرهای ۳' و ۵' الیگونوکلئوتیدها (۱۷)

از آنجا که آپتامرها همانند آنتی بادی‌ها قدرت اتصال به مولکول‌های آنتی ژن را دارند بنابراین اکثر روش‌های تشخیصی کمی آنتی ژن به کمک آنتی بادی می‌تواند برای آپتامرها نیز مورد استفاده قرار گیرند. از جمله این روش‌ها می‌توان به الیزا بر پایه آپتامر، فلوسایتومتری، الکتروفورز لوله موئین، کروماتوگرافی فاز مایع با کارایی بالا (HPLC)، روش‌های اسپکترومتری جرمی مانند (MALDI-TOF) و (LC-MS) اشاره کرد (۱۸، ۱۹).

باکتری‌ها میکروارگانیسم‌هایی هستند که طول آن‌ها چند میکرومتر است و از نظر مورفولوژیکی به صورت میله‌ای، کروی یا مارپیچ دیده می‌شوند. آن‌ها می‌توانند به تغییرات دما و pH، گرسنگی تغذیه‌ای یا منابع غذایی جدید، سموم، تنش‌ها و سیگنال‌ها حساس باشند. تشخیص و شناسایی پاتوژن‌های میکروبی برای سلامت عمومی و ایمنی مواد غذایی حیاتی است. مناطقی که تشخیص پاتوژن‌های میکروبی حیاتی است شامل تشخیص بالینی، تجزیه و تحلیل آب و محیط زیست و ایمنی مواد غذایی است (۲۰). در حال حاضر، آزمایش‌های مبتنی بر کشت میکروبی و آزمایش‌های مولکولی (تکنولوژی‌های ایمونولوژیک یا اسید نوکلئیک) یکی از روش‌های رایج در تشخیص و شناسایی پاتوژن‌های میکروبی هستند و یکی از دلایل اصلی که منجر به دنبال روش جدید می‌شود ممکن است پیچیدگی این روش‌ها باشد، زیرا این روش‌ها شامل تکنیک‌های

کاربردهای کلینیکی آپتامرها شامل استفاده آن‌ها به عنوان عوامل درمانی (۱۳)، عوامل ضد عفونی (۱۴) و مولکول‌های تحویل دارو (۱۵) می‌باشد.

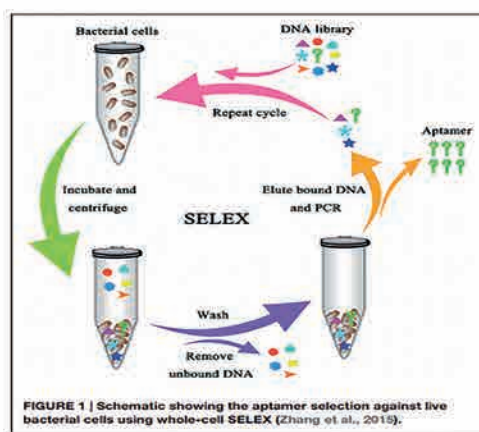
آپتامرها طی چرخه‌ای به نام SELEX به طور شیمیایی سنتز می‌شوند، در واقع این چرخه یک تکنیک قدرتمند در انتخاب آپتامر با اختصاصیت بالا نسبت به هدف از میان کتابخانه‌ای از تعداد زیادی الیگونوکلئوتیدهای تصادفی می‌باشد. در این چرخه ابتدا یک کتابخانه شامل 10^{13} - 10^{15} الیگونوکلئوتید به طور شیمیایی سنتز می‌شود. هر یک از این قطعات دارای یک قسمت میانی تصادفی است که حدود ۶۰ نوکلئوتید را شامل می‌شوند. در مرحله بعد این کتابخانه در معرض هدف مورد نظر (به عنوان مثال پروتئین تخلیص شده یا سلول سرطانی) قرار می‌گیرد. بدین ترتیب آپتامرهای دارای تمایل و اختصاصیت به هدف مورد نظر به آن متصل می‌شوند. قطعات متصل شده از متصل نشده جداسازی شده و سپس قطعات متصل شده تکثیر می‌شوند و به عنوان کتابخانه جدید در معرض هدف قرار می‌گیرد. این چرخه چندین بار تکرار می‌شود تا نهایتاً قطعه‌ای با بیشترین اختصاصیت انتخاب، تکثیر و توالی یابی می‌شود (۱۶).



شکل ۲. تصویری از سه مرحله فرآیند SELEX

اولین آپتامرها از کتابخانه‌های DNA و RNA ای جدا شدند که اسیدهای نوکلئیک طبیعی داشتند بنابراین این آپتامرها طول عمر کوتاهی در محیط‌های فیزیولوژیک داشتند. در سال‌های بعد اصلاحاتی روی آپتامرها انجام

مختلفی در فرآیند تهیه و تشخیص نمونه مانند استخراج نمونه، تصفیه، غنی سازی و جداسازی است. به همین دلیل در حال حاضر، روش تشخیص مبتنی بر آپتامر می تواند در سلامت عمومی و ایمنی مواد غذایی محدود شود. اکثر آپتامر انتخاب شده در برابر باکتری های بیماریزا، با استفاده از روش های SELEX معمولی در شکل ۴ نشان داده شده است.



شکل ۴. آپتامر انتخاب شده بر علیه باکتری های بیماریزا با استفاده از SELEX

دشواری در تشخیص زود هنگام عفونت های خاصی که توسط باکتری ها ایجاد می شود، نیاز به جستجوی تکنیک های جدید برای این منظور را به دنبال داشته است، زیرا این فنون نیاز به درمان طولانی با آنتی بیوتیک ها دارند.

پاتوژن ها گونه های مضر از باکتری ها هستند که باعث آلودگی و شیوع بیماری های واگیردار می شوند و در نتیجه بسیاری از مشکلات جدی را به وجود می آورند. از میان این باکتری ها می توان اشرشیا کلی و سالمونلا، هلیکوباکتریلوری، نایسریا گونوره آ، نایسریا مننژیتیدیس، استافیلوکوکوس اورئوس (عامل شایع مسمومیت های غذایی، جوش، سلولیت، آبسه، عفونت زخم، سندرم شوک سمی، پنومونی) و استرپتوکوک (پنومونی، مننژیت، عفونت گوش و فارنژیت) و غیره را نام برد (۲۱، ۲۲).

بیماری های عفونی یکی از علل عمده مرگ و میر در

سرتاسر جهان هستند و باعث مرگ میلیون ها نفر در سال و بستری شدن آن ها می شوند. سازمان بهداشت جهانی (WHO) بیماری های عفونی و انگلی را در سال ۲۰۰۴ به عنوان دومین علت مرگ در سراسر جهان شناسایی کرده است. این بیماری های عفونی یا مسری و پاتوژن های منتقل شده از غذا در کشورهای کم درآمد، مانند کشورهای در آفریقا، که در آن فاقد تجهیزات پزشکی و روش های تشخیصی و درمانی است نیز جدی هستند. اشرشیا کلی O157: H7، سالمونلا، کمپیلوباکتر ژژونی و لیستریا مونوسیتوژنز علل اصلی بیماری های غذایی باکتریایی و آب هستند (۲۳).

بیماری های عفونی در سرتاسر جهان تقریباً ۴۰٪ است که سالانه ۵۰ میلیون مرگ و میر را در بر می گیرد. با توجه به این آمار، شناسایی پاتوژن های میکروبی برای سلامت عمومی و امنیت غذایی بسیار مهم و حیاتی است. حوزه هایی که شناسایی پاتوژن های میکروبی در آن ها حائز اهمیت است عبارتند از: تشخیص بیماری های درمانگاهی (کلینیکی)، آنالیزهای محیطی و آب، امنیت غذایی و دفاع زیستی. تست های میکروبی و تجزیه و تحلیل های مولکولی (ایمنی شناسی یا تکنولوژی های اسید نوکلئیک) در میان روش های به کار رفته معمولی در شناسایی و تعیین پاتوژن های میکروبی رایج تر است (۲۴). روش های معمول تشخیص و شناسایی مبتنی بر آزمایشگاه باکتری ها معمولاً زمان پردازش طولانی دارند، ممکن است حساسیت و ویژگی خاصی نداشته باشند و نیاز به تجهیزات تخصصی و کاربردهای آموزشی داشته باشند و در نتیجه هزینه زیادی در پی دارد. به طور مثال، نمونه ها (به عنوان مثال خون، بزاق، ادرار یا نمونه غذایی) برای تجزیه و تحلیل میکروبیولوژی باید با استفاده از تکنیک های مختلف مانند میکروسکوپ و کشت سلولی، آزمایش های بیوشیمیایی، آزمایش های ایمونولوژیک و یا تجزیه و تحلیل ژنتیکی بررسی شوند. مشاهده میکروسکوپی شامل رنگ آمیزی باکتری ها و الگوی رنگ آمیزی آن ها و نسبتاً سریع است اما مشخص نیست، در حالی که ممکن است کشت باکتری ها بر روی محیط های کشت انتخابی تا چند روز طول بکشد. علاوه بر این، تمام باکتری ها نمی توانند در آزمایشگاه کشت داده



بیماری‌ها، تکنیک SELEX در پایگاه‌های اطلاعاتی PubMed، Google scholar، Scopus و جستجوی کاملی انجام گرفت سپس مطالعات مرتبط و معتبر طی بیست سال اخیر گردآوری و مورد بررسی قرار گرفت.

□ یافته‌ها

□ کاربرد آپتامر در شناسایی کمپیلوباکتر ژوژنی
Stratis-Cullum و همکاران در سال ۲۰۰۵ (۲۵) استفاده از آپتامرها برای شناسایی سلول کامل کمپیلوباکتر ژوژنی را گزارش کردند. در این گزارش، ارزیابی اختصاصیت آپتامر نشان داد که هیچ واکنش متقاطع با سالمونلا تیفی موریوم ندارد، اما واکنش متقاطع محدودی با E.coli O157:H7 دارد. با این حال، برخی واکنش‌های متقاطع با هلیکوباکتر پیلوری و گونه‌های لیستریا در غلظت بالا نشان داده شد. در این مطالعات نه فرآیند SELEX و نه توالی آپتامر کمپیلوباکتر ژوژنی شرح داده شده بودند (۲۶، ۲۷).

□ کاربرد آپتامر در شناسایی باسیلوس تورینجنسیس
شناسایی باکتری‌ها با استفاده از اپتاسنسورها یک زمینه نسبتاً جدید است. اخیراً دو استراتژی متفاوت برای شناسایی سلول کامل با استفاده از QDs^۳ و CNTs^۴ گزارش شده است. QDs برای شناسایی اسپورهای باسیلوس تورینجنسیس استفاده شد. در آن مطالعه، QDs با استفاده از یک آپتامر اختصاصی شده برای باسیلوس تورینجنسیس کاربردی شده بود. بعد از آنکوآپتامر QD-aptamer با هدف، اسپورها شسته شده بودند و برای اندازه‌گیری فلورسنس جمع‌آوری شده بودند. چندین کنترل با QDs و بدون اسپور برای اندازه‌گیری اتصال غیر اختصاصی QDs به اسپور و فلورسانس تست شده بود. حساسیت گزارش شده ۱۰^۳CFU/ml بود. برای منظور اختصاصیت، اسپور B.globigii و B.subtilis نیز تست شده بود. این سیستم قادر به تمایز B.thuringiensis از B.globigii در غلظت بالای ۱۰^۵CFU/ml بود (۲۸).

شوند. آزمایش‌های بیوشیمیایی شامل تشخیص آنزیم‌های خاصی است. آزمایش‌های ایمونولوژیکی شامل آنزیم‌های مرتبط با ایمنی بدن می‌باشند (ELISA) و تست‌های آگلوتیناسیون معمولاً برای شناسایی اپی توپ‌های سطحی خاص استفاده می‌شود. این فرآیندها به علت کارکنان فنی و تجهیزات مورد نیاز، تمام وقت و با هزینه زیاد هستند. ظهور تکنیک‌های مولکولی مانند تجزیه و تحلیل ژنتیکی باعث شناسایی سریع‌تر گونه‌های باکتریایی شده است. PCR تکنیک فوق‌العاده حساس که امکان شناسایی باکتری‌ها را بر اساس مواد ژنتیکی خود فراهم می‌کند، با توجه به حجم نمونه کوچک مورد نیاز، به مرحله کشت باکتری نیاز ندارد. PCR نیاز به پروب‌های ژنتیکی پیشین دارند تا بتوانند به طور صحیح با دنباله باکتری‌های هدف جفت شوند. جفت شدن اشتباه ممکن است منجر به نتایج مثبت کاذب شود و جهش‌های ژنتیکی جهش یافته ممکن است از تطبیق پروب صحیح فرار کنند. با این حال، این هنوز یک روش طولانی و گران قیمت است که می‌تواند چندین روز طول بکشد. تجزیه و تحلیل واقعی PCR در عرض چند ساعت می‌تواند سریع‌تر انجام شود، اما همچنان نیاز به تجهیزات و واکنش‌های ویژه دارد. به طور بحرانی، تمام این تکنیک‌ها زمان می‌گیرند، نیاز به تهیه نمونه و واکنش دهنده‌های خاص و تجهیزات دارند و از این رو پر هزینه هستند، بنابراین یک تقاضای فوری برای آزمایش سریع‌تر، کارآمد و حساس وجود دارد که می‌تواند کل باکتری‌ها را در حوزه و یا در حین مراقبت شناسایی کند و از پردازش چند مرحله‌ای جلوگیری کند، به ویژه برای تشخیص و درمان بالینی و همچنین تشخیص سریع باکتری‌ها می‌تواند برای نتایج بالینی بسیار حیاتی باشد (۲۳).

□ روش بررسی

مطالعه بر روی آپتامر و کاربردهای آن به عنوان عامل شناسایی باکتری‌های بیماری‌زا است. در این مطالعه مروری با استفاده از کلمات کلیدی آپتامر، باکتری‌های

3- quantum dots
4- carbon nanotubes

کردن لومینول، دومی با پراکسید هیدروژن واکنش می‌دهد که یک سیگنال شیمیایی توسط یک اسپکتروفتومتری فلورسنت تشخیص داده می‌شود (۳۲).

□ کاربرد آپتامر در شناسایی استافیلوکوک اورئوس

استافیلوکوک اورئوس یک باکتری گرم مثبت است که می‌تواند طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها را از عفونت‌های خفیف به بیماری‌های خطرناک مانند پنومونی، اندوکاردیت، سپتی سمی و سندرم شوک سمی ایجاد کند. تا به امروز، دو مطالعه در مورد انتخاب DNA آپتامر در برابر استاف اورئوس منتشر شده است. Chang و همکاران در سال ۲۰۱۳ تمام سلول‌های باکتریایی را به عنوان اهداف SELEX مورد استفاده قرار دادند، جایی که هر دور انتخابی شامل مرحله انتخاب منفی علیه استاف اپیدرمیدیس بود.

آپتامرهای ۶۲ نوکلئوتیدی SA17 و SA61 در مقایسه با تعدادی از باکتری‌های دیگر مانند: باسیلوس سوبتیلیس، سیتروباکتر فروندی، اشرشیا کلی، کلبسیلا پنومونیه، لیستریا مونوسیتوزنز، موراکسلا کاتارالیس، سالمونلا انتریکا، شیگلا بوییدی، شیگلا فلکسنری، استرپتوکوکوس بوویس، استرپتوکوکوس پنومونیه، استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس و استافیلوکوکوس همولیتیکوس انتخاب شد. با این وجود، اتصال هر چند در حد بسیار پایین‌تر، با S₁ اپیدرمیدیس و سودوموناس مشاهده شد. جالب توجه است که بی حرکت شدن آپتامرهای SA17 و SA61 روی سطح نانو ذرات طلا منجر به افزایش وابستگی هدف شد. برای توسعه داروهای بالقوه در برابر عفونت‌های استافیلوکوکی، آپتامرها DNA قادر به شناخت یک توکسین از استافیلوکوکوس اورئوس انتخاب شدند. انتروتوکسین B از استاف اورئوس نیز به عنوان یک لیگاند برای انتخاب استفاده شد. با استفاده از روش آپتامر و هدف انتروتوکسین B استاف توانستند این باکتری را تشخیص دهند، همچنین توسط این روش، آپتامر توانست انتروتوکسین B را خنثی کند. در واقع علاوه بر کاربرد تشخیص در این باکتری، کاربرد درمانی نیز داشت (۳۳). انتروتوکسین A از استاف اورئوس همانند

□ کاربرد آپتامر در شناسایی باسیلوس آنتراسیس

اسپوره‌های سویه باسیلوس آنتراسیس نیز به عنوان اهداف سلولی کامل در SELEX مورد استفاده قرار گرفته بودند. با روش آپتامر و با استفاده از هدف اسپوره‌های باکتری توانستند این باکتری را تشخیص دهند (۲۹-۳۱). بهینه‌سازی‌های post-SELEX بیشتر به منظور استفاده از آپتامرهای DNA جدا شده در پلتفرم‌های توسعه تشخیص ضروری است.

□ کاربرد آپتامر در شناسایی سالمونلا

برخی از اجزای باکتری و همچنین کل سلول‌های باکتریایی می‌تواند به عنوان لیگاند برای انتخاب آپتامر استفاده شود. RNA آپتامر S-PS8.4 به طور خاص پیلی IVB را از نوع سالمونلا انتریکا سرووار تیفی با استفاده از یک پروتئین ساختاری پیلین به عنوان هدف انتخابی به دست آمده را شناسایی کرده بود. پیشنهاد شده بود که این آپتامرها به طور بالقوه می‌تواند به عنوان جایگزین برای درمان مبتنی بر آنتی بیوتیکی استفاده شود. آپتامر S-PS8.4 بر روی سطح نانو لوله‌های کربنی تک سلولی کربوکسیل شده کوانتومی تحمیل شده به عنوان یک عنصر تشخیصی از یک سنسور پتانسیومتری^۵ برای تشخیص باکتری در محلول استفاده شده بود.

برای انتخاب DNA آپتامر در برابر سالمونلا انتریکا سرووار تیفی موریوم، مخلوطی از پروتئین غشای خارجی (OMP) به عنوان هدف انتخاب مثبت مورد استفاده قرار گرفته بود. طرح تشخیص بسیار پیچیده بود و شامل چندین مرحله می‌شدند. ابتدا، یک مولکول کایمر ساخته شده از DNA آپتامر و پراکسیداز DNazyme به صورت ناقص کوانتومی به نانو لوله‌های کربنی تک محور متصل شد. پس از اضافه کردن یک کشت باکتریایی که باید آنالیز شود، آپتامر به هدف متصل می‌شود و از سطح نانو لوله‌ها جدا می‌شود. بعد همین به مخلوط تجزیه، که مولکول DNazyme را تشکیل می‌دهد و ساختار فعال DNazyme را ایجاد می‌کند، اضافه می‌شود. در مرحله نهایی، پس از اضافه



انتروتوکسین B نیز به عنوان یک لیگاند برای انتخاب استفاده شد و آپتامر برای این انتروتوکسین هم در تشخیص و هم در درمان نیز کاربرد داشت (۳۴).

□ کاربرد آپتامر در شناسایی اشرشیا کلی

اشرشیا کلی یکی از رایج‌ترین و بی‌خطرترین باکتری‌های موجود در دستگاه گوارش حیوانات خون گرم است. با این حال، برخی از سویه‌های اکلاهی پاتوژن‌های خطرناک غذایی هستند. به عنوان مثال *E. coli* O157: H7 می‌تواند باعث ایجاد طیف گسترده‌ای از بیماری‌هایی مانند اسهال هموراژیک و غیر هموراژیک، نارسایی ناگهانی کلیه یا سندرم اورمیک همولیتیک شود. به منظور به دست آوردن آپتامرهای جدید علیه اشرشیا کلی، هم کل باکتری و هم اجزای باکتری می‌تواند به عنوان اهداف SELEX استفاده شوند. DNA آپتامر در برابر لیپوپلی ساکراید *E. coli* O111: B4 انتخاب شد و به عنوان پایه‌ای برای یک اتصال با پروتئین C1qrs انسان است که سیستم کمپلمان مسئول مقاومت غیر اختصاصی به باکتری را فعال می‌کند. اتصال حاصل از آن یک فعالیت ضد باکتریایی را در حضور پروتئین‌های مکمل نشان داد و توانست به عنوان یک داروی ضد باکتریایی در نظر گرفته شود. متأسفانه این رویکرد تاکنون توسعه نیافته است. DNA آپتامر اتصال پروتئین فیمبریه از اکلاهی انتروپاتوژنیک K88 توسط Lee و همکاران دریافت شد. از آنجایی که این سویه تنها سویه با فیمبریه است، آپتامر به دست آمده می‌تواند برای تشخیص پاتوژن خاص استفاده شود. سویه K88 انتروپاتوژنیک اکلاهی نیز برای سلول SELEX یک آپتامر DNA استفاده شد (۳۵).

So و همکاران در سال ۲۰۰۸ یک آپتامر 20-F-RNA را در برابر سلول‌های *E. coli* DH5a به دست آوردند که بعدها به عنوان یک عنصر شناخته شده باکتری شناخته شد (۳۶). ابتدا سلول‌های باکتری بر روی دانه‌های مغناطیسی پوشانده شده با آنتی بادی‌های خاصی جایگزین شدند، پس از آن آپتامر اضافه شد و پس از دناتوراسیون حرارتی

مجموعه‌های هدف آپتامر، آن را با روش RT-PCR شناسایی کرد (۳۷).

□ کاربرد آپتامر در شناسایی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

سل (MTB) یک عفونت خطرناک گسترده است، به ویژه به دلیل وجود تعداد زیادی از گونه‌های مقاوم MTB مقاوم به دارو، توسعه عوامل دارویی جدید می‌تواند درمان در این زمینه را بهبود بخشد. مطالعات بیشتر نشان داد که همه آپتامرها دارای وابستگی بالایی نسبت به یکدیگر هستند، در حالی که آپتامر NAP2 موثرترین گیرنده ($K_d=31$ نانومتر) و توانایی مهار تهاجم MTB به ماکروفاژها است. این آپتامر می‌تواند به عنوان عامل درمانی امیدوار کننده در نظر گرفته شوند و همچنین برای توسعه پروب‌های مولکولی برای مطالعه مکانیسم حمله باکتریایی به سلول‌ها مورد توجه است. یکی دیگر از رویکردهای به دست آوردن آپتامرهای ضد توبرکلوزیس توسط Shum و همکاران در سال ۲۰۱۱ توسعه یافت (۳۸). آپتامرهای با کاربر بالقوه درمانی برای مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با استفاده از استراتژی سلول کامل SELEX شناسایی شدند (۳۹). توالی‌های آپتامر انتخاب شده، که ۳۰ درصد مخزن نهایی را تشکیل می‌دادند، به طور اختصاصی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس استرین H37Rv را از مایکوباکتریوم بوویس شناسایی کردند. مولکول‌های هدف اختصاصی با استفاده از یک آنالیز پروتئاز تا اندازه‌ای به عنوان پروتئین‌های غشایی شناخته شده بودند. سلول‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با استفاده از تریپسین و پروتئیناز K قبل از مرحله انکوباسیون با توالی آپتامر تیمار شده بودند. برای واکنش اتصال بین سلول‌های تیمار شده و آپتامر نتایج منفی به دست آمده بود. این مطلب نشان داد که سایت اتصال به وسیله تیمار پروتئاز برداشته شده بود و به احتمال زیاد این سایت اتصال پروتئین‌های غشایی می‌باشد. این ارزیابی پروتئازی می‌تواند برای شناسایی اولیه مولکول‌های هدف در رویکردهای سلول کامل SELEX استفاده شود. آنزیم پلی فسفات کیناز ۲ (PPK2) به عنوان هدف

SELEX مورد استفاده قرار گرفت. PPK2 یک نوکلئوتید کیناز دی فسفات وابسته به پلی فسفات است که نقش مهمی در سنتز اسید مایکولیک و دیگر پلی ساکارید سطح برای بقا باکتریایی در طول رشد فعال حیاتی ایفا می کند. آپتامر همچنین می تواند به عنوان پایه ای برای یک سیستم جدید تشخیص MTB استفاده شود. آپتامر L64QA که در این کار انتخاب شده بود بر روی سطح میکروپلیت پلیستیرول^۷ برای جابجایی مولکول های آنالایزر قرار گرفت و یک آپتامر دیگری M64RA به عنوان یک عامل reporter مورد استفاده قرار گرفت.

این سیستم در ۷ نمونه از فیلترهای کشت شامل مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و سایر گونه های مایکوباکتریوم آزمایش شده بود و حساسیت و ویژگی خاصی از آزمون را نشان داد. پروتئین های DNA نیز در مقایسه با دیگر نشانگرهای بیولوژیک سل، پروتئین هتروداایمر CFP-10.ESAT-6 انتخاب شده بودند.

□ کاربرد آپتامر در شناسایی هموفیلوس آنفولانزا

هموفیلوس آنفولانزا یک باکتری مهم است که سبب ایجاد طیف بیماری های عفونی می شود. سوسپانسیون های H.influenzae یکی از شش کپسول متمایز ساختاری و آنتی ژنیک (a-f) را تولید می کند که Hib^۸ یکی از علل مهم بیماری باکتری های مهاجم خون در کودکان زیر ۲ سال است. اغلب موارد مرگ و میر ناشی از Hib ناشی از مننژیت و پنومونی است. Hib و ترکیبات پلی ساکاریدی کپسول اجزای مهم واکسن هستند. هموفیلوس آنفولانزا، استرپتوکوکوس پنومونیه، استرپتوگروه B، لیستریا مونوسیتوز، نایسریا مننژیتیدیس و استرپتوکوک آگالاکتیه پاتوژن های شایع مننژیت باکتریال حاد (ABM) هستند. با استفاده از روش آپتامر همانند سایر باکتری ها توانستند این باکتری را از سایر باکتری ها تشخیص دهند (۴۰).

□ بحث و نتیجه گیری

یکی از مشکلات بهداشت عمومی، مقاومت در حال

رشد داروهای مختلف برای پاتوژن های میکروبی است. انتخاب آپتامرهای ضد میکروبی علیه باکتری های بیماریزا نشان دهنده یک راه جدید برای غلبه بر این مشکل است. سیستم های تشخیص مبتنی بر آپتامر امکان تشخیص پروتئین های بیماریزا یا باکتری های کامل را به طور مستقیم در یک ماتریس پیچیده واقعی بدون غلظت اولیه یا تصفیه هدف میکروبی فراهم می کنند. این تشخیص مستقیم امکان سنجی زمان و هزینه را کاهش می دهد.

در سال های اخیر، بیوسنسور به عنوان یک تکنیک سریع، حساس، بسیار خاص و کم هزینه برای تشخیص پاتوژن ها مورد استفاده قرار گرفته است (۴۰). تشخیص سریع پاتوژن های باکتریایی و سموم در مواد غذایی ضروری است تا نتایج در زمان واقعی برای کاهش شیوع بیماری های خوراکی ضروری باشد. روش های غنی سازی کشت، هر چند که بیشتر مورد استفاده قرار می گیرند، زمان گیر هستند و بنابراین برای تشخیص سریع بیماری از نمونه های غذا ناکافی هستند. توسعه روش های جدید تشخیصی سریع زمان را به طور چشمگیری کاهش داده است.

علیرغم پیشرفت قابل توجه در تشخیص و درمان بیماری های عفونی در طول نیم قرن گذشته، هنوز هم بسیاری از مشکلات مربوط به توسعه روش های سریع تشخیص هزینه ای و جلوگیری از عوارض جانبی عوامل درمانی و مقاومت دارویی پاتوژن وجود دارد. آپتامرها می توانند یک ابزار قدرتمند برای توسعه هر دو روش جدید تشخیصی و عوامل درمانی که قادر به مسدود کردن توابع میکرو ارگانسیم های بیماریزا هستند را ارائه دهند. امروزه تکنولوژی SELEX شامل تکنیک های متنوعی می شود و به اندازه کافی قابل انعطاف و قابل تنظیم است تا هر پروتئینی مورد علاقه یا کل یک باکتری یا ذرات ویروسی را هدف قرار دهد. همچنین تعدادی از راه های افزایش ثبات بیولوژیکی آپتامرها با استفاده از تغییرات شیمیایی مختلف وجود دارد (۳۷).

RNA و DNA آپتامر که قادر به اتصال به طور خاص به عوامل تعیین کننده میکرو ارگانسیم ها و ویروس ها می توانند

7- polystyrol microplate

8- H influenzae type b



مداخله با آپتامر، راهکار بسیار مناسبی برای پیشگیری از بیماری‌زایی پاتوژن‌ها و مداوای عفونت‌های ایجاد شده توسط آن‌ها خواهد بود. از طرفی به علت مقاومت یافتن اکثر باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها، نیاز به روش درمانی جدید به شدت احساس می‌شود. تا به امروز آپتامرهای جدا شده بر علیه میکروارگانیسم‌ها برای کاربردهای کلینیکی انتخاب شده‌اند. کاربرد آپتامرها در شناسایی پاتوژن‌های محیطی و منتقله از راه غذا یک زمینه نوید بخش برای تحقیق است. همه این داده‌ها نشان می‌دهد که در آینده نزدیک تکنولوژی مبتنی بر آپتامر می‌تواند جایگزین واقعی برای روش‌های سنتی جهت تشخیص و درمان بیماری‌های عفونی شود. از آنجا که احتمال مقاومت یافتن باکتری‌ها به این روش درمانی هم وجود دارد، یکی از زمینه‌های تحقیقاتی بسیار مهم در آینده بررسی این موضوع خواهد بود که آیا پس از این که مدتی روش آپتامر به کار رفت، پاتوژن‌هایی که تحت تشخیص و درمان با این روش قرار گرفته‌اند نسبت به آن مقاومت حاصل می‌نمایند یا خیر.

به عنوان عناصر تشخیص برای سیستم‌های تشخیصی جدید مورد استفاده قرار گیرند. چنین خصوصیتی از آپتامرها به عنوان پایداری حرارتی و شیمیایی، هزینه پایین و تنوع کمتر رویکرد مبتنی بر آپتامر را جایگزین امیدوار کننده برای روش‌های ایمونولوژیک می‌کند. علاوه بر این، وابستگی بالا به آپتامر اجازه می‌دهد تا اهداف مرتبط بسیار نزدیک را تشخیص دهد (به عنوان مثال ایزوفرم‌های مختلف پروتئین در بعضی از موارد). آپتامرها همچنین می‌توانند توابع پروتئین‌های هدف را مسدود کنند و در نتیجه می‌توانند به عنوان پایه‌ای برای توسعه درمان‌های جدید برای درمان عفونت باشند (۳۷).

از مطالب بیان شده می‌توان چنین استنباط نمود که توانایی عملکرد باکتری‌های پاتوژن در روش آپتامر مزیت‌های قابل توجهی برای آن‌ها دارد، به عنوان مثال آپتامر در باکتری‌های پاتوژن آن‌ها را برای مقابله با اهداف مهم مجهز می‌سازد. از آنجایی که بسیاری از باکتری‌های پاتوژن از آپتامر استفاده می‌کنند، طراحی تکنیک‌هایی به منظور

References

- 1- Lazcka O, Del Campo FJ, Munoz FX. Pathogen detection: a perspective of traditional methods and biosensors. *Biosensors and bioelectronics*. 2007;22(7):1205-17.
- 2- Alocilja EC, Radke SM. Market analysis of biosensors for food safety. *Biosensors and Bioelectronics*. 2003;18(5-6):841-6.
- 3- Sun H, Zu Y. A highlight of recent advances in aptamer technology and its application. *Molecules*. 2015;20(7):11959-80.
- 4- Dollins CM, Nair S, Sullenger BA. Aptamers in immunotherapy. *Human gene therapy*. 2008;19(5):443-50.
- 5- Proske D, Blank M, Buhmann R, Resch A. Aptamers—basic research, drug development, and clinical applications. *Applied microbiology and biotechnology*. 2005;69(4):367-74.
- 6- Ellington AD, Szostak JW. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *nature*. 1990;346(6287):818.
- 7- Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*. 1990;249(4968):505-10.
- 8- Han K, Liang Z, Zhou N. Design strategies for aptamer-based biosensors. *Sensors*. 2010;10(5):4541-57.

- 9- Chu T, Ebright J, Ellington AD. Using aptamers to identify and enter cells. *Current opinion in molecular therapeutics*. 2007;9(2):137-44.
- 10- Shamah SM, Healy JM, Cload St. Complex target SELEX. *Accounts of chemical research*. 2008;41(1):130-8.
- 11- Bock LC, Griffin LC, Latham JA, Vermaas EH, Toole JJ. Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature*. 1992;355(6360):564.
- 12- Bunka DH, Stockley PG. Aptamers come of age—at last. *Nature Reviews Microbiology*. 2006;4(8):588.
- 13- Ng EW, Shima DT, Calias P, Cunningham Jr ET, Guyer DR, Adamis AP. Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Nature reviews drug discovery*. 2006;5(2):123.
- 14- Ulrich H, Magdesian MH, Alves MJM, Colli W. In vitro selection of RNA aptamers that bind to cell adhesion receptors of *Trypanosoma cruzi* and inhibit cell invasion. *Journal of Biological Chemistry*. 2002.
- 15- Xiao Z, Shangguan D, Cao Z, Fang X, Tan W. Cell-specific internalization study of an aptamer from whole cell selection. *Chemistry—A European Journal*. 2008;14(6):1769-75.
- 16- I Hernandez L, Machado I, Schafer T, J Hernandez F. Aptamers overview: selection, features and applications. *Current topics in medicinal chemistry*. 2015;15(12):1066-81.
- 17- Kusser W. Chemically modified nucleic acid aptamers for in vitro selections: evolving evolution. *Reviews in Molecular Biotechnology*. 2000;74(1):27-38.
- 18- Richards SL, Cawley AT, Cavicchioli R, Suann CJ, Pickford R, Raftery MJ. Aptamer based peptide enrichment for quantitative analysis of gonadotropin-releasing hormone by LC-MS/MS. *Talanta*. 2016;150:671-80.
- 19- Toh SY, Citartan M, Gopinath SC, Tang TH. Aptamers as a replacement for antibodies in enzyme-linked immunosorbent assay. *Biosensors & bioelectronics*. 2015;64:392-403.
- 20- Teng J, Yuan F, Ye Y, Zheng L, Yao L, Xue F, et al. Aptamer-based technologies in foodborne pathogen detection. *Frontiers in microbiology*. 2016;7:1426.
- 21- Yoo SM, Lee SY. Optical Biosensors for the Detection of Pathogenic Microorganisms. *Trends in biotechnology*. 2016;34(1):7-25.
- 22- Li Y, Yang L, Fu J, Yan M, Chen D, Zhang L. Microbial pathogenicity and virulence mediated by integrins on Gram-positive microorganisms. *Microbial pathogenesis*. 2017;111:48. 1-6.
- 23- Ahmed A, Rushworth JV, Hirst NA, Millner PA. Biosensors for whole-cell bacterial detection. *Clinical microbiology reviews*. 2014;27(3):631-46.
- 24- Torres-Chavolla E, Alocilja EC. Aptasensors for detection of microbial and viral pathogens. *Biosensors & bioelectronics*. 2009;24(11):3175-82.
- 25- Stratis-Cullum DN, Wade KL, Pellegrino PM, editors. Development of a rapid method for the detection of biological threats in water. *Chemical and Biological Sensors for Industrial and Environmental Security; 2005: International Society for Optics and Photonics*.
- 26- Stratis-Cullum DN, McMasters S, Sooter LJ, Pellegrino PM, editors. Investigation of synthetic molecular recognition for biosensing applications. *Chemical and Biological Sensing VIII; 2007: International Society for Optics and Photonics*.
- 27- McMasters S, Stratis-Cullum DN, editors. Evaluation of aptamers as molecular recognition elements for pathogens using capillary electrophoretic analysis. *Smart Medical and Biomedical Sensor Technology IV; 2006: International Society for Optics and Photonics*.
- 28- Ikanovic M, Rudzinski WE, Bruno JG, Allman A, Carrillo MP, Dwarakanath S, et al. Fluorescence assay based on





aptamer-quantum dot binding to *Bacillus thuringiensis* spores. *Journal of Fluorescence*. 2007;17: (29-193).

29- Bruno JG, Kiel JL. In vitro selection of DNA aptamers to anthrax spores with electrochemiluminescence detection. *Biosensors and Bioelectronics*. 1999;14(5):457-64.

30- Zhen B, Song Y-J, Guo Z-B, Wang J, Zhang M-L, Yu S-Y, et al. In vitro selection and affinity function of the aptamers to *Bacillus anthracis* spores by SELEX. *Sheng wu hua xue yu sheng wu wu li xue bao Acta biochimica et biophysica Sinica*. 2002;34(5):635-42.

31- Kiel JL, Holwitt EA, Parker JE, Vivekananda J, Franz V, editors. Nanoparticle-labeled DNA capture elements for detection and identification of biological agents. *Optically Based Biological and Chemical Sensing for Defence; 2004: International Society for Optics and Photonics*.

32- Zelada-Guillén GA, Bhosale SV, Riu J, Rius FX. Real-time potentiometric detection of bacteria in complex samples. *Analytical chemistry*. 2010;82(22):9254-60.

33- DeGrasse JA. A single-stranded DNA aptamer that selectively binds to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B. *PloS one*. 2012;7(3):e33410.

34- Huang Y, Chen X, Xia Y, Wu S, Duan N, Ma X, et al. Selection, identification and application of a DNA aptamer against *Staphylococcus aureus* enterotoxin A. *Analytical Methods*. 2014;6(3):690-7.

35- Lee H-J, Kim BC, Kim K-W, Kim YK, Kim J, Oh M-K. A sensitive method to detect *Escherichia coli* based on immunomagnetic separation and real-time PCR amplification of aptamers. *Biosensors and Bioelectronics*. 2009;24(12):3550-5.

36- So HM, Park DW, Jeon EK, Kim YH, Kim BS, Lee CK, et al. Detection and titer estimation of *Escherichia coli* using aptamer-functionalized single-walled carbon-nanotube field-effect transistors. *Small*. 2008;4(2):197-201.

37- Davydova A, Vorobjeva M, Pyshnyi D, Altman S, Vlassov V, Venyaminova A. Aptamers against pathogenic microorganisms. *Critical reviews in microbiology*. 2016;42(6):847-65.

38- Rotherham LS, Maserumule C, Dheda K, Theron J, Khati M. Selection and application of ssDNA aptamers to detect active TB from sputum samples. *PloS one*. 2012;7(10):e46862.

39- Chen F, Zhou J, Luo F, Mohammed A-B, Zhang X-L. Aptamer from whole-bacterium SELEX as new therapeutic reagent against virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemical and biophysical research communications*. 2007;357(3):743-8.

40- Bitaraf F, Rasooli I, Gargari SM. DNA aptamers for the detection of *Haemophilus influenzae* type b by cell SELEX. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2016;35(3):503-10.