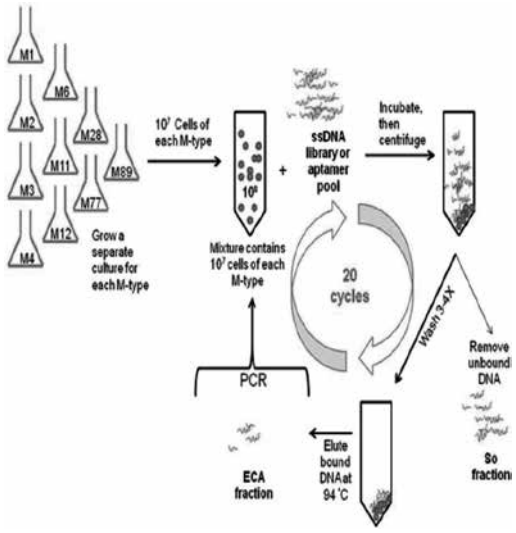
بابک عباس زاده اصل، دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی واحد علوم دارویی، دانشکده علوم و فناوری های نوین
دکتر طاهره ناجی، دانشیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی تهران

فن آوری های مبتنی بر آپتامر برای شناسایی پاتوژن های غذایی

آپتامرها لیگاند های تک رشته ای از DNA یا RNA هستند که می توانند بصورت اختصاصی به اهداف مختلفی متصل شوند. برای انتخاب این آپتامر ها از روشی بنام SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) استفاده می شود. توانایی اتصال اختصاصی آپتامر ها به اهداف مختلف، پتانسیل بزرگی در آنها به وجود آورده است که می توان از آنها در شناسایی پاتوژن های گوناگون مخصوصا پاتوژن های مواد غذایی استفاده کرد. پتانسیل آپتامر ها در تعیین بهداشت مواد غذایی و سلامت عمومی امر مهمی در گزینش بشمار می آید. در این بررسی روش ها و توسعه ی روش های انتخاب آپتامری شامل SELEX تمام سلولی و SELEX ژنومی مورد ارزیابی قرار گرفته است. امروزه یکی از انواع روش ها برای شناسایی پاتوژن ها بیوسنسورهای (حسگرهای زیستی) است. ما در این بررسی روش های بیوسنسوری نظیر بیوسنسورهای فلوریورسانس، رزونانس پلاسمون سطحی، بیوسنسورهای الکتروشیمیایی و نوار های تست کروماتوگرافی جانبی و کاربردشان در شناسایی پاتوژن ها و نمایش بیومولکولی را مد نظر قرار داده ایم. اما هنوز چالش ها و عیب و ایراد هایی در کارایی آنها در شناسایی پاتوژن و نمایش بیومولکولی آنها باقی مانده است که باید بر آنها فایق آمد.



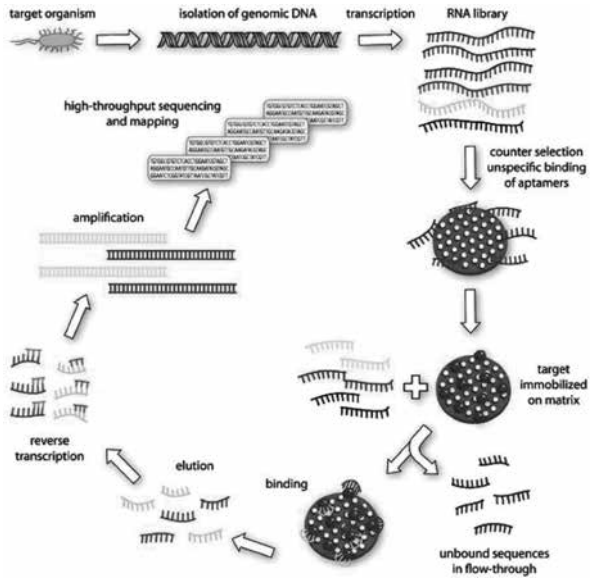
شکل(۱) شکلی شماتیک از نحوه ی انتخاب آپتامر ها در برابر باکتری های پاتوژن توسط روش SELEX تمام سلولی

باکتری ها میکروارگانیسم هایی در اندازه ی میکرومتر هستند و از لحاظ مورفولوژی به انواع کوکوس ها و باسیل ها و اسپریل ها تقسیم بندی می شوند. این میکروارگانیسم ها می توانند به تغییرات PH و تغییرات دما و همچنین به انواع استرس ها واکنش دهند(Salis et al., ۲۰۰).

پاتوژن ها گونه های مضری 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 به Esherichia coli و Salmonella (مسمومیت غذایی)، Helico bacter pylori (زخم معده)، Neisseria gonorrhoeae (بیماری های مقاربتی)، N.meningitides (مننژیت)، Staphylococcus aureus (عامل شایع مسمومیت های غذایی) و غیره را نام برد.

بیماری های عفونی در سرتاسر جهان تقریبا ۴۰٪ است که سالانه ۵۰ میلیون مرگ و میر را در بر می گیرد(Ivnitski et al., ۱۹۹) 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 آنها حایز اهمیت است عبارتند از: تشخیص بیماری های درمانگاهی(کلینیکی)، آنالیزهای محیطی و آب، امنیت غذایی و دفاع زیستی. به تازگی تست های جامع میکروبی و تجزیه و تحلیل های مولکولی(ایمنی شناسی یا تکنولوژی های اسید نوکلئیکی) در میان روش های به کار رفته معمولی در شناسایی و تعیین پاتوژن های میکروبی رایج تر است.(Torres-Chavolla and Alocilja, 2009)

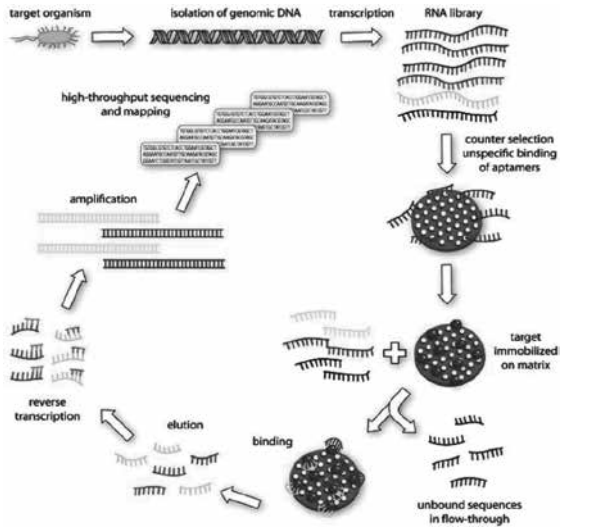
آپتامر ها لیگاند های تک رشته ای DNA یا RNA هستند که می توانند برای اهداف مختلفی انتخاب شوند. این انتخاب از یک کتابخانه ای که دارای توالی های تصادفی و تکراری آغاز



شکل(۲) :تصویری از SELEX ژنتیکی، استخراج DNA سلول هدف جهت انتخاب آپتامر اختصاصی

می شود(Tombelli et al, ۲۰۰۵). آپتامرها بیشتر بین ۲۵-۹۰ باز متغیر هستند(Tok and Cho, ۲۰۰۰) و از لحاظ ساختاری آنها را می توان در دسته هایی مانند:حلقه های درونی، برآمدگی های غنی از باز های پورینی، ساختار های نعلی شکل، گره های کاذب، مجموعه های چهارتایی، قرار داد(Boiziau et al.,۱۹۹۹).این خصوصیات منحصر به فرد آپتامر ها و محدودیت مخصوص به اهداف مختلف بیانگر پتانسیل های بزرگی در توسعه ی سریع و موثر تکنیک های مبتنی بر آپتامر است (Jayasena, ۱۹۹۹).

روش انتخاب آپتامر ها تکامل سیستماتیک لیگاند های غنی سازی نمایی یا به اصطلاح SELEX نامیده می شود. غنی



شکل(۳) : شکلی شماتیک از تشخیص پاتوژن توسط خاصیت فلورسانس.
الف) آماده سازی آپتامر و نانو ذره با خاصیت فلورسانس
ب)شناسایی A-FNP وابسته به باکتری اشیرشیاکلای با شمارشگر ذرات نوری و میکروکانال ها

سازی نمایی توسط دو گروه مستقل در سال ۱۹۹۰ گسترس یافته است (Tuerk and Gold, ;۱۹۹۰ ,Ellington and Szostak ۱۹۹۰). همچنین تلاش برای پیشرفت ها و توسعه ی روش های آپتامری انجام شده است. از آن پس SELEX یک وسیله ی مهم و اصلی در انتخاب آپتامر ها و تبدیل پتانسیل بزرگ آپتامر ها و تکنولوژی های مربوط به آنها در زمینه ی شناسایی پاتوژن ها و نمایش بیومولکولی به یک واقعیت تبدیل شده است.

انتخاب آپتامر ها در برابر باکتری های پاتوژن

- **SELEX معمولی**

آپتامر ها از راه یک فرآیند تکراری SELEX انتخاب می شود(Hamula et al., ۲۰۰٦). این روش SELEX شامل ارایه مجموعه های اولیگونوکلیوتید های تکراری از میان مجموعه های تکراری(کتابخانه DNA) و تقویت آنزیمی است(Ellington and Szostak, ۱۹۹۰; Tuerk and Gold, ۱۹۹۰). به گونه چکیده، انتخاب مجموعه های زیاد در هر مجموعه شامل سه مرحله می باشد: ۱- کتابخانه ی آپتامری DNA یا RNA با هدف آمیخته می کنیم. ۲- آپتامر های پیوند شده به هدف از آپتامر های پیوند نشده جدا می شوند و آپتامر های پیوند نشده حذف می شوند. ۳- آپتامر های متصل شده به هدف توسط فرآیند PCR تکثیر پیدا می کنند. این چرخه انتخاب تا زمانی که خلوص مورد دلخواه به دست آید ادامه پیدا می کند.

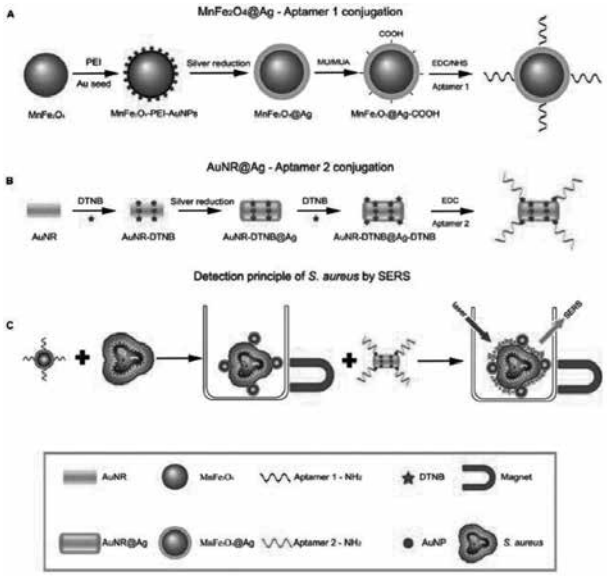
بیشترآپتامر های انتخابی علیه پاتوژن های باکتریایی از روشهای SELEX قابل استفاده تشکیل شده است، که نمونه اش در شکل (۱) آمده است(Zhang et al., ۲۰۱۵) که انتخاب آپتامر های DNA با هدف مخصوص باکتری E.coli را توصیف می کند. وابستگی بالای آپتامر به E.coli در هشت دور SELEX انتخاب شده است. افزون بر این پروسه های متداول SELEX در شناسایی پاتوژن های متنوع است مانند:

Vibrio parahaemolyticus(Hamula et al., 2011)
,Salmonella typhimurium (Duan et al., 2012)
,Listeria monocytogenenes (Duan et al., 2013)

این آپتامر ها برای باکتری های بالا می توانند در ۱۰ دور انتخاب شوند (Liu G.Q. et al., ۲۰۱٤).

انواع دیگر SELEX

افزون بر روش متداول SELEX،چند روش جدید SELEX نیز معرفی شده است. در یکسری از پژوهش ها، کوتاه سازی ردیف های انتخاب مراحل فرآوری و تولید در آپتامر ها به دست آمده است.در نتیجه روش های متنوعی با روند انتخاب آپتامر با یک دور چرخش توسعه یافته اند.روش ASEXP با استفاده از مکانیسم



شکل(٤): مراحل تکنیک SPR جهت شناسایی باکتری s.aureus . الف) سنتز نانوذرات مغناطیسی نقره و اتصال آپتامر شماره یک به این نانوذرات. ب)سنتز نانوذرات پلاسمونیک (AuNR-DTNB & Ag-DTNB)

مغناطیس ذرات ریز را جدا می کند(Fan et al., ۲۰۰۸).

یک روش مصنوعی در سیستم های اطلاعاتی ژنتیکی SELEX توسعه یافته که نامش AEGIS–SELEX است. این روش به صورت مصنوعی سیستم های اطلاعاتی ژنتیکی را برای انتخاب گسترده ی آپتامر ها مهیا می سازد (Sefah et al., ۲۰۱٤)

SELEX ژنتیکی

به غیر از SELEX تمام سلول، SELEX می تواند در سطح اسید نوکلییک ها نیز انجام گیرد(Lorenz et al۲۰۰٦). در این روش ابتدا DNA سلول هدف استخراج می شود. این DNA تحت فرآیند رونویسی تبدیل به RNA می شود. با استفاده از کتابخانه ی آپتامری، آپتامر های متصل شده باقی می مانند و آپتامر های متصل نشده از محیط حذف می شوند.

و در نهایت با استفاده از یک آنزیم ریورس ترانس کریپتاز DNA ساخته می شود (Lorenz et al., ۲۰۱۰). جزییات این روش از SELEX در شکل(۲) آمده است.

افزون بر این، یک روش رونوشتی SELEX شبیه SELEX ژنتیکی گسترش یافته است. هرچند که SELEX ژنتیکی افق جدیدی را برای تعیین عملکرد درون مایه ای فعال در ژنتیک گسترده است، اما یکی از نقاط ضعف این روش قابل اجرا بودن آن بصورت معمولی و غیر اختصاصی در آزمایش ها می باشد. این اشکالات در روش یاد شده رفع شده اند (Jin–Der and Gray ۲۰۰٤).

برنامه های کاربردی در تشخیص پاتوژن ها و غربالگری های بیومولکولار

بیشتر روش های کشف و شناسایی آپتامری مورد استفاده در سلامت عمومی و امنیت غذایی محدود شده است. علت اولیه اش ممکن است پیچیدگی این روش ها باشد. شناسایی پاتوژن ها برای سلامتی عمومی و وامنیت غذایی اهمیت دارد.

سه حوزه کاربردی برای دو سوم همه ی تحقیقات در زمینه ی شناسایی پاتوژن به شمار می رود که این سه محدوده شامل صنایع غذایی، پایش کیفیت محیط و آب است(Emde et al., 1992; Theron et al., 2000) . تلاش های بر جای مانده شامل مطالعات اساسی و روش مطالعات اجرایی و توسعه ی روش های کاربردی جدید می باشد.

آپتامر ها و پادتن ها به خاطر خواص منحصر به فردشان در تست های شناسایی متنوعی کاربرد دارند. تمایل آپتامر ها به اهداف اختصاصی اشان بیشتر از آنتی بادی های مونوکلونال است (Hamula et al., ۲۰۰٦). بنابراین آپتامرهای نوکلییک اسیدی مزایای فراوانی نسبت به آنتی بادی ها، جهت استفاده به عنوان عناصر شناسایی در بیوسنسور ها دارند. آپتامرها از لحاظ اندازه کوچک و از لحاظ شیمیایی ثابت و کارا می باشند. مهمتر اینکه این آپتامر ها دارای قابلیت انعطاف پذیری قابل ملاحظه ای هستند و مهندسی ساختارشان آسان و راحت است(Song et al., ۲۰۰۸).

با توجه به ویژگی های آپتامر ها، توسعه ی بیوسنسورهای مبتنی بر آپتامر با اختصاصیت و دقت بالایی انجام خواهد شد. افزون بر موارد یاد شده، آپتامر ها برخی خصوصیات متمایزی را به عنوان شناساگر بیولوژیکی دارند، برای نمونه آپتامر های انتخاب شده توانایی ترکیب با خلوص و تکثیر پذیری بالایی دارند.افزون بر این از لحاظ شیمیایی نیز ثبات بیشتری دارند. آپتامر های نوکلییک اسیدی در زمینه ی بیوسنسور ها کاربرد های گسترده ای دارند. بدینروی بیوسنسور های مبتنی بر آپتامرهای گوناگون برای شناسایی پاتوژن های باکتریایی گسترش یافته اند (Song et al., ۲۰۰۸; Binnin et al., ۲۰۱۱).

بیوسنسور های نوری

بیوسنسور های نوری به خاطر انتخابی بودن و بالا بودن حساسیت، در آنالیزهای زیستی رایج ترند(Willardsonetal.,1998;Tschmelaketal.,2004).بیوسنسورهای نوری برای شناسایی سریع آلاینده ها، توکسین ها، داروها (Bae et al., ۲۰۰٤) و پاتوژن های باکتریایی(Baeumner et al., ۲۰۰۳) به وجود آمده و گسترش یافته اند.

بیوسنور های بدون برچسب(Label–Free)

چندین تکنیک به عنوان راهنما برای بازبینی و کنترل آزاد و مستقیم سلول ها در سطح های مایع و جامد توصیف شده است (Ebato et al., 1994; Morgan et al., 1996; Piehler et al., 1996; Medina et al., 1997; Ghindilis et al., 1998; Frat-amico et al., 1998). این تکنیک ها مبتنی بر معیار های مستقیم و دقیق استقامت فیزیکی که در طول واکنش های بیوشیمیایی بر روی سطح فیزیکی اتفاق می افتد(Ivnitski et al., ۱۹۹۹) این می تواند تغییراتی در PH، مصرف اکسیژن و اختلاف پتانسیل، چگالی یونی و خصوصیات نوری و بصری داشته باشد و به عنوان معیار اندازه گیری و شناسایی اهداف مورد نظر باشد.

شناسایی پاتوژن ها با استفاده از خاصیت فلورسانس

هنگامی که یک الکترون ظرفیتی با دریافت انرژی برانگیخته می شود، در این حالت به لایه های الکترونی بالاتر می رود ولی در حالت ناپایدار است، و با از دست دادن انرژی جذب شده بصورت فوتون به حالت اولیه خود برمیگردد. انرژی ازاد شده به صورت فوتون را خاصیت فلورسانس می گویند (Chung et al., ۲۰۱٤).

امروزه مواد فلورسانس کاربرد های گسترده ای دارد(Vigneshvar et al., 2015) . باکتری ها از راه ذرات فلورسانس مورد شناسایی قرار می گیرند شکل (۳). در زمان فعلی یک روش شناسایی غیر مخرب سلولی گسترش پیدا کرده است. در این روش نانوذرات آپتامری با هدف مخصوصی جفت می شوند (A–FNPs) و این اتصال توسط یک پلت فرم اپتی فلودیک پاتوژن های باکتریایی را شناسایی می کند.

شناسایی با پلاسمون رزونانس سطحی (SPR)

بیوسنسور های پلاسمون رزونانس سطحی (Cooper, ۲۰۰۳)، تغییرات ساختاری حاصل از اتصال آپتامر ها به پاتوژن های هدف در مجاورت سطح فلزی (اکثرا طلا) را با استفاده از یک فیلم حساس اندازه گیری می کند. روش SPR در زمینه های متعددی کاربرد دارد. امروزه شناسایی میکروارگانیسم های بیماری زا با استفاده از این تکنیک به خاطر پتانسیل بالا و حساسیت و دقت زیاد این تکنیک، کاربرد فراوانی دارد.(Nie and Emory, 1999; Cao et al., 2002; Li et al., 2010)

شکل (٤) مراحل شناسایی a.aureus با استفاده از تکنیک SPR نشان می دهد.

بیوسنسور های الکتروشیمیایی

نانوزیست حسگرهای الکتروشیمیایی: حسگرهایی هستند که در آنها از عنصر زیستی به عنوان جزو تشخیص دهنده و از الکترود به

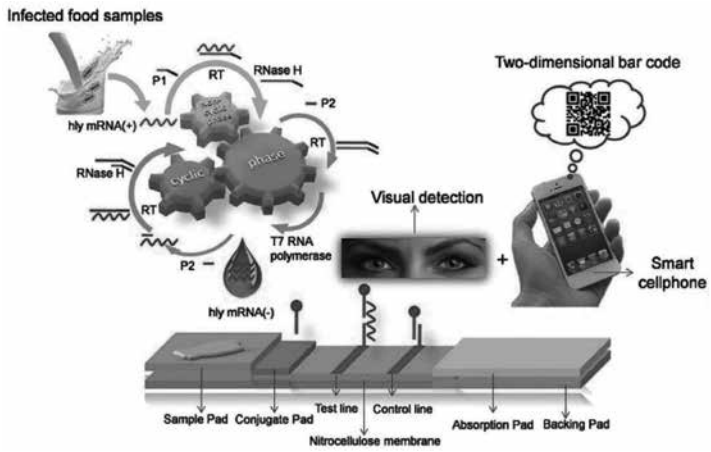
شکل(۵): شکلی شماتیک از شناسایی باکتری Salmonella Typhimurium توسط بیوسنسور الکتروشیمیایی

عنوان مبدل استفاده می شود. کاربرد نانوساختارها در این سیستم ها بیشتر برای پر کردن شکاف بین مبدل و گیرنده زیستی، که در مقیاس نانو است، انجام می شود(Mahmoud et al., 2012). با در نظر گرفتن طبیعت فرآیند تشخیص بواسطه مواد زیستی، زیست حسگرهای الکتروشیمیایی به دو دسته کاتالیزی و تمایلی تقسیم می شوند. تکنیک های رایج الکتروشیمی که در حسگری رایج هستند شامل پتانسیومتری، کرونوآمپرومتری، ولتامتری، سنجش امپدانس و ترانزیستور اثر میدان (FET) است. استفاده همزمان از مزایای نانوساختارها و تکنیک های الکتروشیمیایی به ظهور سنسورهای با حساسیت و قدرت تجزیه ای بالا منجر شده است.

در شکل (۵) اساس کار تکنیک بیوسنسور های الکتروشیمیایی برای تشخیص پاتوژن ها نمایش داده می شود. بیوسنوسرهای الکتروشیمیایی راهکار جدیدی برای تشخیص باکتری های غیر قابل کشت را ارایه می کنند که دارای دقت و سرعت و حساسیت بالایی می باشد و از لحاظ اقتصادی نیز مناسب است (Jenkins et al. ۱۹۸۸).

نوار های کروماتوگرافی جانبی

نوار های تست کروماتوگرافی جانبی ابزاری هستند که امروزه کاربرد فراوانی دارند. نمونه این ابزار در شکل (٦) آمده است. Liu H.X و همکارانش روش ساده و حساس و قابل مشاهده برای شناسایی باکتری های پاتوژن طراحی کردند. مبنای این روش تقویت هم دمایی RNA و واکنش پلت فرم کاغذی بیواکتیو و با به کار گیری دو بارکد برای دریافت و انتقال رسانه ای می باشد که شناسایی سریع و دقیق پاتوژن هارا



شکل (۶) تصویری از تقویت همدمایی RNA و پیکربندی از یک پلت فرم کاغذ بیواکتیو

امکان پذیر می سازد.

آزمایش های متعدد مبتنی بر پیوند اختصاصی، مانند پیوند آنتی بادی به آنتی ژن یا پیوندهای آنزیمی در روش های ایمونو اسی، مانند ELISA (Zunabovic et al., 2011; Hsu et al., 2014) و همچنین روش های ایمونوکروماتوگرافی پیشرفت هایی داشته اند، ولی به خاطر حساسیت پایینشان و نیز سرعت کم، این تکنیک ها برای شناسایی پاتوژن های غذایی مناسب نیستند (Liu H.X. et al., 2014).

در سیستم نوارهای کروماتوگرافی جانبی یک پلت فرم کم هزینه برای شناسایی پاتوژن های زنده با چشم غیر مسلح ساخته شده است. این سیستم برای فرآورده های پیشرفته استفاده می شود و برای شناسایی پاتوژن های غذایی بسیار مناسب است.

نتیجه گیری

در این بررسی ما رایج ترین روش های کاربردی SELEX را در انتخاب آپتامر هایی بر علیه پاتوژن های باکتریایی غذایی و کاربرد سنسور های آپتامری را برای نمایش بیومولکولی ارایه دادیم. اگرچه تکنیک SELEX پیشرفت کمتری داشته اما انتخاب آپتامرها بر علیه باکتری های پاتوژنی پیشرفت چشمگیری در این دهه ی آخر داشته و امروزه این تکنولوژی به ابزاری سودمند و موثر برای شناسایی پاتوژن ها و نمایش بیومولکولی آنها تبدیل شده است.

در سال های اولیه روش PCR در تکنیک SELEX کاربرد داشت. به عبارت دیگر سلول های باکتریایی مورد هدف برای شناسایی اهداف به وسیله ی SELEX با نقطه ضعف هایی مواجه شد. این نقطه ضعف ها به خاطر تنوع بالای باکتریایی و نیز ساختار های پیچیده که گویا تحت تاثیر آپتامر ها قرار دارند، ایجاد شده است. بنابراین توسعه و پیشرفت روش های ساده تر و موثرتر SELEX برای ایجاد آپتامرهای مخصوص پاتوژن های غذایی مختلف ضروری است.

در مقایسه با مراحل تولید پادتن، SELEX قادر است به طور موثری اسیدنوکلییک های یاخته را در مقابل روش های آنالیز مختلف در دوره ی زمانی کوتاه مدت تهیه نماید. مهمتر اینکه خصوصیات شگفت انگیزآپتامر ها همانند مقیاس و معیار تولید، تعدیل و اصلاح، راحتی استفاده و ثبات و استحکام بلند مدت، آپتامر ها را به جایگزینی ایده آل به جای پادتن ها تبدیل کرده است. اما با این همه بهسازی در روش های انتخاب آپتامر ها به وسیله SELEX به تلاش فراوانی در آینده نیاز دارد.

سایر پلت فرم ها شامل تکنیک های جداسازی مغناطیسی، ردیف بندی و ریز سیالی ها می تواند با SELEX برای کارایی وسیعتری از این تکنولوژی تکمیل شود. در حال حاضر تکنیک های شناسایی و بیوسنسور های مبتنی بر آپتامر فقط برای نیاز های اساسی آزمایش در کلینیک ها و آزمایشگاه ها مورد استفاده قرار می گیرد. امید است با تلاش در ارتقای کمی و کیفی این روش های تشخیصی، گامی بلند در راستای تشخیص و پیشگیری از انتقال و بیماری زایی پاتوژن های غذایی برداشته شود.

منابع:

1. Abbaspour A., Norouz–Sarvestani F., Noori A., Soltani N. (۲۰۱۵). Aptamer–conjugated silver nanoparticles for electrochemical dual–aptamer–based sandwich detection of Staphylococcus aureus. Biosens. Bioelectron
2. Atlas R. M. (۱۹۹۹). Legionella: from environmental habitats to disease pathology, detection and control.
3. Bae Y. M., Oh B. K., Lee W. W., Choi J. (۲۰۰٤). Detection of insulin–antibody binding on a solid surface using imaging ellipsometry. Biosens. Bioelectron
4. Baeumner A. J., Cohen R. N., Miksic V., Min J. (۲۰۰۳). RNA biosensor for the rapid detection of viable Escherichia coli in drinking water. Biosens. Bioelectron
5. Binnin J. M., Leung D. W., Amarasinghe G. K. (۲۰۱۱). Aptamers in virology: recent advances and challenges.
6. Bock L. C., Griffin L. C., Latham J. A., Vermaas E. H., Toole J. J. (۱۹۹۲). Selection of single–stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. Nature
7. Boiziau C., Dausse E., Yurchenko L., Toulmé J. J. (۱۹۹۹). DNA aptamers selected against the HIV–۱ trans–activation–responsive RNA element form RNA–DNA kissing complexes.
8. Lorenz C., Gesell T., Zimmermann B., Schoeberl U., Bilusic I., Rajkowitsch L., et al. (۲۰۱۰). Genomic SELEX for Hfq–binding RNAs identi-