

معرفی DNA آپتامر کوتاه‌شده به عنوان پروب مولکولی جدید برای ردیابی آفلاتوکسین B₁ به کمک تکنیک‌های شبیه‌سازی محاسباتی

مریم موسیوند^{۱،۲}، محمد جوان نیکخواه^{۱*}، کوثر باقرزاده^۳، لورا آنفوسی^۴ و امیر میرزادی گوهری^۱

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۲/۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۲/۲۷)

چکیده

توالی‌های تک رشته DNA یا RNA که تحت عنوان آپتامر شناخته می‌شوند قادرند مولکول هدف را با اختصاصیتی در حد آنتی بادی‌های مونوکلونال ردیابی نمایند. با این وجود قرارگیری مایکوتوکسین‌ها در گروه مولکول‌های کوچک و تفاوت بالای وزن مولکولی آنها با توالی‌های آپتامری تبدیل به چالشی جدی در معرفی پروب‌های آپتامری برای آنها شده است. در بررسی حاضر با هدف دستیابی به توالی آپتامری جدید و کوتاه‌تر برای آفلاتوکسین B₁ (AFB₁)، ابتدا به کمک الگوریتم ژنتیک یک کتابخانه الیگونوکلئوتیدی اولیه (Lib₁) براساس توالی آپتامری اختصاصی آفلاتوکسین B₁ (Apt₁, ۵۰ bp) طراحی گردید. قدرت اتصال توالی‌های آپتامری کتابخانه Lib₁ به مولکول AFB₁ با روش داکینگ مولکولی ارزیابی و بهترین توالی آپتامری (C52) با هدف ایجاد کتابخانه جدید (Lib₂) و با استراتژی کوتاه کردن تغییر داده شد. غربال مجازی توالی‌های آپتامری کتابخانه Lib₂ از نظر قدرت اتصال به مولکول AFB₁ منجر به معرفی توالی آپتامری کوتاه‌شده C52-T با طول ۱۹ bp گردید. پایداری و نوع تعاملات در کمپلکس آپتامری C52-T و مولکول AFB₁ با روش‌های شبیه‌سازی دینامیک مولکولی و MM-PBSA مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از تخمین ثابت اتصال برای توالی‌های آپتامری C52-T، Apt₁ و C52-T با روش رنگ‌سنجی مبتنی بر نانوذرات تغییر نیافته طلا در مطابقت کامل با نتایج مطالعات درون رایانه‌ای بود. به نظر می‌رسد که تکنیک‌های محاسباتی از پتانسیل بسیار خوبی در معرفی پروب‌های مولکولی و حساس جهت طراحی آپتامسورهای اختصاصی مایکوتوکسین‌ها برخوردار باشند.

کلیدواژه: مایکوتوکسین، الگوریتم ژنتیک، داکینگ مولکولی، دینامیک مولکولی، نانوذرات طلا

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: jnikkhah@ut.ac.ir

۱. گروه گیاهپزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران.

۲. بخش بیوتکنولوژی میکروبی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج، ایران.

۳. مرکز تحقیقات چشم، پژوهشگاه حواس پنجگانه، بیمارستان رسول اکرم (ص)، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی ایران، تهران، ایران.

۴. دانشکده شیمی، دانشگاه تورین ایتالیا.

Introducing truncated DNA aptamer as a new molecular probe for aflatoxin B₁ detection using computational simulation techniques

M. Mousivand^{1,2}, M. Javan-Nikkhah^{1*}, K. Bagherzadeh³, L. Anfossi⁴, and A. Mirzadi Gohari¹

(Received: 26.2.2020; Accepted: 16.5.2020)

Abstract

Single strand DNA or RNA known as aptamers, are able to detect the target molecule with specificity at the monoclonal antibody level. However, the placement of mycotoxins in small molecule groups and their high molecular weight differences with aptamers have become a serious challenge in introducing aptameric probes for them. In the present study, in order to achieve a new and shorter aptameric sequence for aflatoxin B₁ (AFB₁), an initial oligonucleotide library (Lib₁) was designed based on the sequence of a known AFB₁ aptamer (named Apt1, 50 bp) using the genetic algorithm. The best aptamer from the Lib₁ library was selected based on the molecular docking results and has been modified to create a new library (Lib₂) using the truncating strategy. Virtual screening of the Lib₂ library in terms of their binding affinity over AFB₁ molecule led to obtain the truncated aptamer, C52-T, with 19 bp in length. Type of interaction and stability of C52-T-AFB₁ complex were investigated using molecular dynamics simulations (MD) and MM-PBSA method. The affinity constant of C52, C52-T and Apt1 aptamers over AFB₁ were estimated through unmodified gold nanoparticle-based colorimetric assay. The experimentally founding and in silico results were completely consistent. It seems that the computational techniques have the great potential to introduce sensitive molecular probes to design specific mycotoxins aptasensors.

Keywords: mycotoxin; genetic algorithm; molecular docking; molecular dynamics; gold nanoparticles

*Corresponding author's E-mail: jnikkhah@ut.ac.ir

1. Department of Plant Protection, College of Agricultural Sciences & Engineering, University of Tehran, Karaj 31587-77871, Iran.
2. Microbial Biotechnology Department, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization, 3135933151, Karaj, Iran.
3. Eye Research Center, the Five Senses Institute, Rassoul Akram Hospital, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
4. Department of Chemistry, University of Turin, Via Giuria, 5, I-10125 Turin, Italy. Tel.: + 39 011 670 7846.

مقدمه

مناسب برای آنتی بادی‌ها در ساخت بیوسنسورها مورد استفاده قرار گیرد (Mascini, 2009).

آپتامر یک توالی الیگونوکلئوتیدی و تک رشته‌ای (۲۰ تا ۹۰ نوکلئوتید) است که طی پروسه سلکس^۲ (SELEX) از یک کتابخانه الیگونوکلئوتیدی و طی چرخه‌های متوالی انتخاب و تکثیر بدست آمده و با تبدیل شدن به ساختار سه بعدی خود قادر است به صورت اختصاصی مولکول هدف را ردیابی نماید (Tuerk & Gold, 1990). شناسایی توالی‌های آپتامری و اختصاصی برای مایکوتوکسین‌ها زمینه تحقیقاتی نسبتاً جدیدی می‌باشد که از سال ۲۰۰۸ و با شناسایی توالی آپتامری و اختصاصی برای اکرآتوکسین (Cruz-Aguado & Penner, 2008) آغاز شده و برای مایکوتوکسین‌های دیگری چون فومونیزین (Mckeague et al. 2010)، زیرانون (Chen et al. 2013)، پاتولین (Wu et al. 2016)، آفلاتوکسین B₁ (NeoVentures Biotechnology, 2013) و آفلاتوکسین M₁ (Malhotra et al. 2014) توسعه پیدا کرده است.

نرخ موفقیت پروسه سلکس در انتخاب آپتامرهایی با توان اتصال بالا به مولکول هدف تقریباً ۵۰٪ تخمین زده می‌شود. تنوع پایین کتابخانه الیگونوکلئوتیدی در شروع آزمایشات و دشواری حفظ تنوع در چرخه‌های سلکس به دلیل تکثیر نامتعادل توالی‌های الیگونوکلئوتیدی طی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از دلایل اصلی راندمان پایین فرایند سلکس محسوب می‌شوند (Mayer et al. 2010). در این میان قرارگیری مایکوتوکسین‌ها در گروه مولکول‌های کوچک (Mw < 900 g/mol) و تفاوت زیاد وزن مولکولی آنها با آپتامرها بر مشکلات انتخاب آپتامر اختصاصی این گروه از ترکیبات با استفاده از پروسه سلکس افزوده و

آفلاتوکسین‌ها از نظر شیمیایی دارای دو حلقه فوران مرتبط با سمیت و یک گروه کومارین مرتبط با سرطانزایی می‌باشند. قرارگیری آفلاتوکسین B₁ در گروه یک ترکیبات سرطان‌زا و سهم ۷۵ درصدی آن از آلودگی‌های آفلاتوکسینی در مواد غذایی و خوراک دام (Stroka & Anklam, 2002) منجر به تلاش برای دستیابی به ابزارهای تشخیصی و قابل کاربرد در محل برای آن شده است. در سال‌های اخیر تلاش برای دستیابی به تکنولوژی ردیابی مایکوتوکسین‌ها در محل منجر به توسعه روش‌های آنالیتیکی مانند الیزا (ELISA)، ارزیابی فلورسنت پولاریزاسیون مبتنی بر ایمنولوژی (FPIA^۱)، ارزیابی‌های ایمنوگروماتوگرافی و نیز ایمنوسنسورها شده که همگی مبتنی بر اصول ایمنولوژی می‌باشند (Wang et al. 2011).

علیرغم سرعت و دقت بالای تکنیک‌های ایمنولوژیکی، نیاز به سیستم زنده برای تولید آنتی بادی، بالا بودن قیمت تولید آنتی ژن کامل مایکوتوکسین و آنتی بادی اختصاصی آن، کوتاه بودن دوره نگهداری، زمان بر بودن و سختی فرایند تولید آن، محدودیت ایجاد تغییرات شیمیایی در آنتی بادی‌ها به منظور طراحی بیوسنسور و حساسیت ساختاری آنها به حلال‌های آلی مورد استفاده در استخراج مایکوتوکسین‌ها از موانع اصلی کاربرد عملی تکنیک‌های مذکور در ردیابی مایکوتوکسین‌ها به شمار می‌رود (Huang et al. 2012). بسیاری از مشکلات فوق با ایجاد پروبی که منشا سنتتیک داشته باشد و در عین حال اختصاصیت و قدرت اتصال بالایی در برابر مولکول هدف داشته باشد قابل رفع است. همین مسئله باعث شده تا تکنولوژی نسبتاً جدید آپتامرها به عنوان یک جایگزین

² Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment

¹ Fluorescence Polarization Immunoassays

ارزیابی قدرت اتصال آنها به مولکول هدف در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد که از نظر هزینه و زمان برای بسیاری از آزمایشگاهها مقرون به صرفه نیست. همچنین بررسی بسیاری از تعاملات ممکن میان آپتامرها و مولکول هدف از طریق روش‌های آزمایشگاهی محض امکان پذیر نمی‌باشد (Cowan et al. 2000).

غربال مجازی توالی‌های آپتامری به کمک تکنیک‌های درون‌رایانه‌ای مانند داکینگ و دینامیک مولکولی نقش غیر قابل انکاری در شفاف‌سازی مکانیزم‌ها دارند بدون آنکه مستلزم صرف هزینه‌ای باشند. دانشی که براساس تکنیک‌های کامپیوتری مانند داکینگ مولکولی و شبیه‌سازی دینامیک مولکولی حاصل می‌شود تحت عنوان شبیه‌سازی درون‌رایانه‌ای (In silico) شناخته می‌شود که به شدت مکمل نتایج آزمایشگاهی بوده و در کنار هم تصویر کاملی از عملکرد و مکانیسم سیستم‌های بیومولکولی ایجاد می‌کند (Li et al. 2014).

اگر چه کاربرد تکنیک‌های محاسباتی در صنایعی چون داروسازی در دو دهه اخیر نقش اساسی در شناسایی مکانیزم بیماری‌ها، کشف و توسعه داروهای جدید داشته است (Taylor, 2015) اما کاربرد چنین تکنیک‌هایی در عرصه بیماری شناسی گیاهی هنوز یک زمینه تحقیقاتی بسیار جدید محسوب می‌شود که کمتر مورد توجه قرار گرفته است. شناسایی یک فیتوالکسین جدید با خاصیت ضد قارچی در برابر قارچ عامل بیماری بلاست برنج (Yang et al. 2002)، شبیه‌سازی ساختار و عملکرد پروتئین عامل مقاومت به بلاست باکتریایی برنج (xa5) ناشی از *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Dehury et al., 2013)، شناسایی ترهالو-6-فسفات سنتتاز ۱ به عنوان مولکول هدف در قارچ *Magnaporthe oryzae* و معرفی ترکیبات بازدارنده برای آنزیم مذکور (Xue et al. 2014)،

منجر به عدم موفقیت در دستیابی به توالی‌های آپتامری با قدرت اتصال بالا برای آنها می‌گردد (Ruscito & DeRosa, 2016).

از جمله استراتژی‌های امیدوار کننده برای غلبه بر مشکل از دست رفتن تنوع توالی‌ها طی فرایند سلکس و دستیابی به آپتامرهای کاربردی، روش بلوغ شبیه‌سازی شده (ISM³) است. این روش که نوعی فرایند تکمیلی پس از سلکس و مبتنی بر الگوریتم ژنتیک می‌باشد طی یک پروسه تکراری و با استفاده از سه اپراتور الگوریتم ژنتیک (شامل انتخاب افراد با بهترین شایستگی، کراس اوور و جهش) امکان جستجوی بیشتر در درون توالی‌های آپتامری منتخب را فراهم نموده است. در روش مذکور توالی‌های آپتامری حاصل از سلکس پس از تغییر به کمک اپراتورهای الگوریتم ژنتیک در شرایط آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گرفته و توالی‌های آپتامری منتخب مجدداً وارد این چرخه می‌شوند. این مراحل تا ارزیابی چندین نسل از توالی‌ها و تا زمانی که همچنان منجر به افزایش توان اتصال آپتامرهای مورد مطالعه شوند قابل ادامه است (Ikebukuro et al. 2005).

از دیگر راهکارهای موثر به منظور کاهش مشکلات انتخاب آپتامر اختصاصی برای ترکیباتی با وزن مولکولی پایین مانند مایکوتوکسین‌ها استفاده از کتابخانه الیگونوکلئوتیدی با توالی‌های کوتاه‌تر می‌باشد که منجر به کاهش تفاوت وزن آپتامر و مولکول کوچک و افزایش کارایی فرایند سلکس می‌گردد (Neves et al. 2015).

غربال آزمایشگاهی کتابخانه‌های الیگونوکلئوتیدی حاصل از کاربرد استراتژی‌های مختلفی چون بلوغ شبیه‌سازی شده یا کوتاه‌سازی نیازمند سنتز تمام توالی‌ها و

³ In Silico Maturation (ISM)

نرم افزاری متلب (MATLAB R2013B) و بهره‌گیری از اپراتورهای مختلف الگوریتم ژنتیک شامل جهش تک نقطه و دونقطه و کراسینگ اوورهای تک نقطه، دو نقطه و یونیفرم انجام شده بود. غربال مجازی کتابخانه الیگونوکلئوتیدی Lib1 به کمک داکینگ مولکولی انجام و توالی‌های آپتامری براساس میزان انرژی اتصال و نوع تعاملات با مولکول آفلاتوکسین B₁ مرتب‌سازی شده بودند (Mousivand et al. 2020).

ایجاد کتابخانه الیگونوکلئوتیدی Lib₂ با استراتژی کوتاه‌سازی

براساس نتایج حاصل از غربال مجازی، بهترین توالی آپتامری در کتابخانه Lib₁ برای ایجاد کتابخانه الیگونوکلئوتیدی جدید (Lib₂) مورد استفاده قرار گرفت. با هدف دستیابی به توالی‌های آپتامری کوتاه‌تر، توالی آپتامری منتخب با استراتژی کوتاه‌سازی تغییر داده شد و کتابخانه جدیدی از توالی‌های آپتامری که از نظر طول با یکدیگر متفاوت بودند ایجاد گردید.

پیش‌بینی ساختار دو بعدی و سه بعدی توالی‌های آپتامری

ساختار ثانویه توالی‌های آپتامری در کتابخانه الیگونوکلئوتیدی حاصل از استراتژی کوتاه‌سازی با نرم‌افزار Mfold و کاربرد تابع می نیمم انرژی آزاد^۴ در دمای ۳۷°C، غلظت یک مولار Na⁺ و غلظت صفر مولار Mg²⁺ پیش‌بینی گردید (Zuker, 2003). ساختارهای ثانویه توالی‌های آپتامری از نظر حداقل انرژی آزاد تشکیل ساختار ثانویه^۵ (ΔG) و همین‌طور تنوع ساختار با یکدیگر

بررسی تعامل فیتوالکسین گیاه کلم در برابر برخی از پروتئین‌های قارچ *Alternaria brassicicola* از قبیل بتا توپولین، کیتیناز و ABC transporter با هدف دستیابی به ترکیبات ضد قارچی (Pathak et al., 2016)، معرفی چند نماتد کش برای کنترل نماتد *Bursaphelenchus xylophilus* (Shanmugam et al., 2018) و طراحی آبتانانوسنسور ردیابی کننده استامپیرید (Jokar et al., 2015) و دیازینون (Jokar et al., 2016) با روش داکینگ مولکولی و دینامیک مولکولی مثال‌هایی از کاربرد تکنیک‌های محاسباتی و شبیه‌سازی در عرصه گیاهپزشکی محسوب می‌شوند.

این پژوهش با هدف معرفی آپتامر اختصاصی و کوتاه‌شده برای مولکول آفلاتوکسین B₁ به کمک استراتژی‌های درون‌رایانه‌ای و محاسباتی انجام گردید. قدرت اتصال توالی آپتامری جدید و توالی‌های آپتامری والد به مولکول آفلاتوکسین B₁ در شرایط آزمایشگاهی اندازه‌گیری و با نتایج درون‌رایانه‌ای مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

مطالعات درون‌رایانه‌ای (In silico)

ایجاد کتابخانه الیگونوکلئوتیدی (Lib1) با استفاده از روش ISM

در کار پژوهشی که قبلاً صورت پذیرفت یک کتابخانه الیگونوکلئوتیدی (Lib1) به کمک روش بلوغ شبیه‌سازی شده و با هدف جستجوی بیشتر در درون توالی آپتامری و اختصاصی آفلاتوکسین B₁ (شماره ثبت پتنت Apt1;PCT/CA2010/001292) ایجاد گردید. شایان ذکر است که تغییر در توالی آپتامری Apt1 و ایجاد کتابخانه الیگونوکلئوتیدی با برنامه نویسی الگوریتم ژنتیک در محیط

⁴ Free Energy Minimization Function

⁵ Minimum Free Energy of Secondary Structure Formation

مقایسه شدند.

(mb/olson /doc / autodock) انجام شد. برای هر باکس از کمپلکس آپتامر-آفلاتوکسین B₁ تعداد اجراهای الگوریتم ژنتیک ۱۰۰، اندازه افراد جمعیت ۱۵۰، حداکثر تعداد ارزیابی‌ها ۲۵۰۰۰۰۰، ماکزیمم تعداد نسل‌ها ۲۷۰۰۰، نرخ جهش ۰/۰۲ و نرخ کراسینگ اوور ۰/۸ در نظر گرفته شد. پس از انجام داکینگ برای هر توالی آپتامری، فراوانترین کونفورماسیون با پایین‌ترین میزان انرژی اتصال و کمترین میزان ثابت بازدارندگی (k_i) انتخاب شد. بهترین توالی آپتامری براساس انرژی اتصال، نوع تعاملات (پیوندهای هیدروژنی، الکتروستاتیک و هیدروفوبیک)، میزان ثابت بازدارندگی (k_i) و جایگاه اتصال انتخاب شد. جهت بررسی انواع تعاملات بین آپتامر و مولکول آفلاتوکسین B₁ از نرم افزار Discovery studio (Biovia, 2015) استفاده شد. کمپلکس آپتامر منتخب-آفلاتوکسین B₁ به عنوان فایل ورودی در مطالعات شبیه‌سازی دینامیک مولکولی مورد استفاده قرار گرفت.

شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

پایداری کمپلکس آپتامر منتخب-آفلاتوکسین B₁ در مدت زمان ۵۰ نانو ثانیه با روش شبیه‌سازی دینامیک مولکولی مورد مطالعه قرار گرفت. به منظور بررسی پایداری کمپلکس نهایی و تعیین نوع تعاملات بین آپتامر و آفلاتوکسین B₁ از پکیج گرومکس 5.1.2 Gromacs (Berendsen *et al.* 1995) و میدان نیروی آمبر (amber99sb-ildn) (Perez *et al.* 2007) استفاده شد. پارامترهای لیگاند توسط پایگاه swissparam محاسبه شدند (Zoete *et al.* 2011). با حفظ شرایط مرزی متناوب در تمام جهات، کمپلکس آپتامر-آفلاتوکسین B₁ در مرکز یک باکس به شکل دودکاه‌درون و درون محلول آبی به فرمت TIP3P قرارداد شد. فاصله کمپلکس با لبه باکس

به منظور پیش‌بینی ساختار سه بعدی هر توالی آپتامری در کتابخانه الیگونوکلئوتیدی مذکور از مسیر نرم افزاری پیشنهادشده توسط جدی و همکاران (Jeddi & Saiz, 2017) با اندکی تغییرات استفاده شد. به طور خلاصه پس از پیش‌بینی ساختار ثانویه هر توالی آپتامری با نرم افزار Mfold، ساختار سه بعدی ssRNA معادل هر توالی الیگونوکلئوتیدی با نرم افزار RNA composer (Popenda *et al.* 2012) پیش‌بینی و بهینه‌سازی انرژی ساختارها با نرم افزار Chimera (Pettersen *et al.* 2004) انجام شد. تبدیل ساختار سه بعدی ssRN به ساختار سه بعدی ssDNA و بهینه‌سازی انرژی ساختار نهایی با نرم افزار MOE (MOE 2013.08) انجام شد (Mousivand *et al.* 2020).

غربال مجازی توالی‌های آپتامری از نظر قدرت اتصال به

آفلاتوکسین B₁

ارزیابی تمایل توالی‌های آپتامری به مولکول آفلاتوکسین B₁ با استفاده از فرایند غربالگری مجازی و با روش داکینگ مولکولی انجام گردید (Morris *et al.* 2009). در این فرایند ساختار سه بعدی توالی‌های آپتامری به عنوان گیرنده انعطاف ناپذیر و آفلاتوکسین B₁ به عنوان لیگاند انعطاف پذیر معرفی شدند. ساختار سه بعدی آفلاتوکسین B₁ از پایگاه PubChem (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov) دریافت و پس از بهینه‌سازی انرژی با نرم افزار Chimera به عنوان لیگاند استفاده گردید. جعبه گرید با ابعاد ۱۲۶×۱۲۶×۱۲۶ ساخته شد و فاصله بین نقاط تشکیل دهنده باکس ۰/۳۷۵ آنگستروم در نظر گرفته شد. برای توالی‌های آپتامری با طولی بلندتر از جعبه گرید، دو باکس ایجاد گردید. داکینگ مولکولی با استفاده از نرم افزار AutoDock 4.2.0 (<http://www.scripps.edu/>)

2014). برای کمپلکس آپتامری مورد بررسی، اجزای مختلف انرژی آزاد اتصال شامل برهمکنش‌های الکتروستاتیک، برهمکنش‌های واندروالس، انرژی حلالپوشی قطبی و انرژی حلالپوشی غیر قطبی در طول ۵۰ نانو ثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی اندازه‌گیری شد. شایان ذکر است که با استفاده از روش MM-PBSA اجزای انرژی آزاد اتصال برای نوکلئوتیدهای تشکیل دهنده آپتامر در کمپلکس با مولکول آفلاتوکسین B₁ نیز اندازه‌گیری و نوکلئوتیدهای موثر در برقراری واکنش اتصالی نیز مشخص گردیدند.

مطالعات آزمایشگاهی

مواد آزمایشگاهی و دستگاهها

تمام مواد آزمایشگاهی شامل Gold (III) chloride Sodium Citrate (C₆H₅Na₃O₇) trihydrate Chloride (NaCl) و آفلاتوکسین B₁ از کمپانی سیگما خریداری شدند (Italy, Milan). پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای از کمپانی Nunc خریداری شدند. توالی‌های آپتامری منتخب توسط کمپانی TAG Copenhagen A/S (Denmark) در مقیاس ۰/۲ μM و غلظت نهایی ۱۰۰ μM سنتز شدند. به منظور اندازه‌گیری طیف جذبی در محدوده مرئی از دستگاه میکروپلیت ریدر (Tecan, Swiss) استفاده شد. در تمام آزمایشات از آب فوق خالص (۱۸MΩ) که توسط سیستم میلی کیو تهیه شده بود استفاده گردید (Millipore, Bedford, MA, USA).

سنتز نانو ذرات طلا

جهت سنتز نانو ذرات طلا با قطر تقریبی ۱۳ نانومتر، تمام ظروف پس از قرارگیری در محلول Aqua regia (نسبت ۱:۳ HCl/HNO₃) به مدت ۱۵ دقیقه با آب مقطر

۱nm در نظر گرفته شد. بار کلی سیستم با جایگزینی مولکول‌های آب با یون‌های Na⁺ و Cl⁻ خنثی شد. برای محاسبه کامل تعاملات الکتروستاتیک دور برد از روش پارتیکل - مش ایوالد^۶ استفاده شد (Darden et al. 1993). انرژی کل سیستم با الگوریتم Steepest descent تا رسیدن به مقدار انرژی ۱۰۰۰ kJ/mol/nm به حداقل رسانده شد. سپس سیستم به مدت ۲۰ پیکو ثانیه تحت شبیه‌سازی دینامیک مولکولی با هنگرد کانونیک^۷ قرار گرفت. شبیه‌سازی دینامیک مولکولی با هنگرد کانونیک بزرگ^۸ و اعمال شرایط مرزی متناوب ادامه داده شد. برای کنترل فشار سیستم از ترموستات و باروستات برندنسن استفاده شد. طول پیوندها با به کارگیری الگوریتم لینکز (LINCS) و با زمان انتگرال‌گیری ۱fs محدود شدند. در نهایت شبیه‌سازی دینامیک مولکولی به مدت ۵۰ نانو ثانیه در دمای ۳۰۰ درجه کلونین و فشار یک بار انجام شد. به منظور مشاهده و آنالیز نتایج از نرم افزار VMD و جهت ترسیم گراف‌ها از اکسل استفاده شد. شبیه‌سازی دینامیک مولکولی با استفاده از ماشین مجازی تحت لینوکس با ۱۶ هسته پردازنده در مرکز ابر رایانه دانشگاه امیر کبیر <http://hpcrc.aut.ac.ir> انجام شد.

محاسبه انرژی آزاد اتصال با استفاده از روش MM-

PBSA^۹

قدرت اتصال آپتامر منتخب به مولکول آفلاتوکسین B₁ با اندازه‌گیری انرژی آزاد اتصال در طول شبیه‌سازی دینامیک مولکولی با نرم افزار گرومکس و روش MM-PBSA مورد بررسی دقیق‌تر قرار گرفت (Kumari et al.).

⁶ Particle Mesh Ewald (PME)

⁷ Canonic Ensemble (NVT)

⁸ Grand Canonic Ensemble (NPT)

⁹ Molecular Mechanics – Poisson Boltzmann Surface Area (MM-PBSA)

اتصال اختصاصی تک جایگاهی^{۱۱} محاسبه شد.

نتایج

بهینه سازی توالی آپتامری اختصاصی آفاتوکسین B₁ با

روش ISM

کتابخانه الیگونوکلئوتیدی حاصل از الگوریتم ژنتیک (Lib₁) در مطالعه قبلی (Mousivand et al. 2020) شامل ۶۵ توالی آپتامری بود که براساس قدرت اتصال به مولکول آفاتوکسین B₁ و به کمک روش داکینگ مولکولی غربال شده بودند. براساس نتایج داکینگ مولکولی انرژی اتصال توالی آپتامری والد (Apt₁) با ساختار لوپ هارپینی^{۱۲} معادل ۵/۲۱ Kcal/mol - برآورد گردید. نوکلئوتیدهای C27 و T26.G25 در ناحیه لوپ آپتامر Apt₁ به عنوان جایگاههای اتصال شناسایی شدند که با گروه فوران و کومارین مولکول آفاتوکسین B₁ از طریق پیوندهای هیدروژنی و هیدروفوبیک در تعامل بودند. در میان توالی های آپتامری در کتابخانه مذکور، توالی آپتامری C52 براساس میزان انرژی اتصال، تعداد پیوندهای هیدروژنی، جایگاه اتصال، نوع و تعداد تعاملات با مولکول آفاتوکسین B₁ بالاترین قدرت اتصال را به خود اختصاص داد. جایگاه اتصال توالی آپتامری C52، با ساختار لوپ چند شاخه^{۱۳}، خارج از ناحیه لوپ و شامل نوکلئوتیدهای G6 و C7 در ناحیه ساقه و نوکلئوتیدهای C40.G39 و T41 در ناحیه تک رشته ای آپتامر بود. نوکلئوتیدهای مذکور با پیوندهای هیدروژنی، هیدروفوبیک و الکتروستاتیک با گروه های کومارین، فوران و کربونیل مولکول آفاتوکسین B₁ در تعامل بودند (شکل ۱ و جدول ۱).

شسته شدند. سپس در یک ارلن ۲۵۰ میلی لیتری میزان ۹۸ mL آب مقطر و ۲ mL از محلول H₂AuCl₄ (۵۰ mM) با هم مخلوط و در حالیکه با مگنت به هم زده می شد تا زمان به جوش آمدن حرارت دید. پس از افزودن ۱۰ mL محلول سیترات سدیم (۳۸ mM)، حرارت دهی تا ۲۰ دقیقه دیگر و تغییر رنگ سوسپانسیون به قرمز ادامه پیدا کرد. سپس ارلن در حالیکه به هم زده می شد تا خنک شدن در دمای اتاق نگهداری گردید. نانوذرات سنتز شده با ماکزیمم جذب در ۵۲۰ نانومتر تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند (Luan et al. 2015).

ارزیابی قدرت اتصال آپتامرهای منتخب با روش رنگ سنجی مبتنی بر نانوذرات تغییر نیافته طلا^{۱۰}

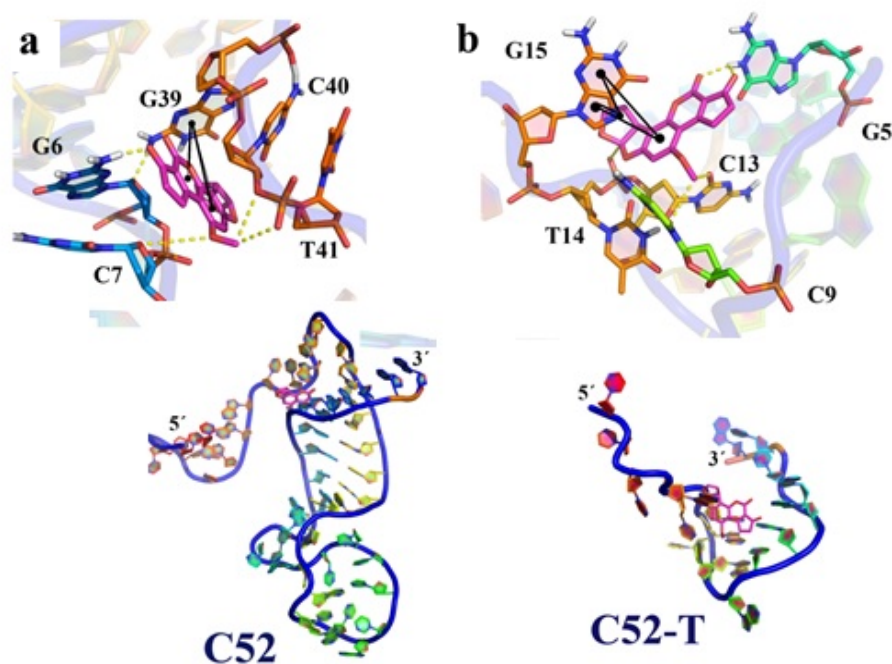
قدرت اتصال آپتامرهای منتخب از کتابخانه Lib₂, Lib₁ و نیز آپتامر اولیه و والد (Apt₁) به مولکول آفاتوکسین B₁ با روش رنگ سنجی مبتنی بر نانوذرات تغییر نیافته طلا (Luan et al. 2015) مورد ارزیابی قرار گرفت. ابتدا ۵۰ میکرولیتر آپتامر (با غلظت های ۲۰۰، ۴۰۰ و ۱۰۰۰ nM) با ۵۰ میکرولیتر آفاتوکسین B₁ (غلظت ۱۰ ng/ml) به چاهک های میکروپلیت اضافه و به مدت پنج دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. پس از افزودن ۵۰ میکرولیتر نانوذرات طلا (GNPs) به محلول مذکور انکوباسیون پنج دقیقه دیگر ادامه یافت. در مرحله بعد به آرامی ۱۰ میکرولیتر NaCl (۱M) به هر چاهک افزوده شد و ۶۰ ثانیه بعد میزان جذب در طول موج ۵۴۰ و ۶۲۰ nm با میکروپلیت ریدر اندازه گیری شد. پس از محاسبه نسبت جذبی ۶۲۰/۵۴۰ nm، ثابت اتصال (K_a) به کمک نرم افزار Origin pro 8.6.1 و آنالیز رگرسیون غیر خطی و معادله

¹¹ One site specific binding equation

¹² Hairpin Loop

¹³ Multibranch Loop

¹⁰ Unmodified AuNPs based colorimetric assay



شکل ۱. مقایسه ساختار سه بعدی آپتامر C52 (a) و C52-T (b) در کمپلکس با مولکول آفلاتوکسین B₁ از نظر جایگاه اتصال، نوع و تعداد تعاملات.

Fig 1. Comparison of three-dimensional structure of C52 and C52-T aptamers in complex with aflatoxin B₁ molecule in terms of binding sites, type and number of interactions.

که با حذف نوکلئوتیدها از انتهای ۳'، ۵' یا هر دو انتها ایجاد شده بودند (جدول ۲).

غریب مجازی توالی‌های آپتامری در کتابخانه Lib₂

ساختار سه بعدی مولکول آفلاتوکسین B₁ به عنوان لیگاند انعطاف پذیر با استفاده از روش داکینگ مولکولی درون ساختار سه بعدی هر توالی آپتامری کوتاه شده داک شد. پس از ۱۰۰ ران الگوریتم ژنتیک فراوانترین کونفورماسیون با پایین ترین میزان انرژی اتصال برای هر توالی آپتامری انتخاب گردید. براساس نتایج، انرژی اتصال توالی‌های آپتامری در کتابخانه Lib₂ در محدوده ۵/۲۴- تا ۴/۰۲- کیلوکالری بر مول قرار می‌گرفت و تنها یک توالی دارای انرژی اتصال بهتری در مقایسه با توالی آپتامری Apt1 بود. توالی‌های آپتامری براساس میزان انرژی اتصال،

ایجاد توالی آپتامری کوتاه شده و اختصاصی آفلاتوکسین B₁

ایجاد کتابخانه الیگونوکلئوتیدی با استراتژی کوتاه سازی (Lib₂)

با هدف کاهش تفاوت در اندازه آپتامر و مولکول آفلاتوکسین B₁، از استراتژی کوتاه کردن طول توالی آپتامری استفاده گردید. براساس نتایج داکینگ مولکولی، بهترین توالی آپتامری کتابخانه C52، Lib₁، به عنوان توالی والد جهت ایجاد کتابخانه جدید (Lib₂) مورد استفاده قرار گرفت. با استفاده از استراتژی کوتاه سازی، ۱۹ توالی آپتامری جدید براساس توالی آپتامر C52 ایجاد گردید که از نظر طول با یکدیگر متفاوت بودند. طول توالی‌های آپتامری در کتابخانه ایجاد شده در محدوده ۱۰ تا ۴۰ bp بود

جدول ۱ برهمکنش های موجود بین نوکلئوتیدهای آپتامرهای C52 و C52-T در کمپلکس با مولکول آفلاتوکسین B₁.

Table 1. Principal interactions between residues of C52 and C52-T aptamers with AFB₁ .

Aptamer	Carbone and conventional hydrogen binding	Hydrophobic interaction	Electrostatic interaction
	H-Donor-H-Acceptor	Pi-Orbitals- π/σ /alkyl	Negative-Pi-Orbitals
C52-T	G5:H1 - AFB1:O5	G15 - AFB1	
	G5:H1 - AFB1:O6	G15 - AFB1	
	AFB1:C3 - T14:OP2	G15 - AFB1	
	AFB1:C17 - C9:O2	G15 - AFB1	
	AFB1:C17 - C13:O2		
C52	G6:H21 - AFB1:O5	G6:C2' - AFB1	C7:OP1 - AFB1
	G39:H21 - AFB1:O6	G39 - AFB1	
	C7:C4' - AFB1:O4	G39 - AFB1	
	AFB1:C17 - C40:O3'	G39 - AFB1	
	AFB1:C17 - T41:OP1		

جدول ۲. امتیاز داکینگ توالی های آپتامری کوتاه شده در کتابخانه Lib₂ بر اساس انرژی اتصال (Kcal/mol)، تعداد نوکلئوتیدهای سایت اتصال، تعداد تعاملات آپتامر با مولکول آفلاتوکسین B₁ و طول آپتامر.

Table 2. Docking score of the truncated aptamers in the library Lib₂ based on binding energy (kcal/mol), the number of nucleotides in the binding site, the number of aptamer interaction with aflatoxin B₁ molecule and aptamer length.

Aptamer	Binding energy (Kcal/mol)	binding pocket	Interaction with AFB1 (Num.)	Length (bp)	Docking Score
C52-10-5	-4.75	A2,C8,G3	8	10	3.12
C52-20-5	-4.95	G9,T11,C10,T6	7	20	2.78
C52-30-5	-5.24	G19,C20,T16	5	30	2.32
C52-40-5	-5.03	G29,C30,T26	5	40	2.19
C52-19-5	-4.58	G12,C4,C3	6	19	2.46
C52-18-5	-4.45	C13,T5,T4,A10,G11	8	18	3.02
C52-17-5	-4.51	C12,G10,A9	4	17	2.36
C52-16-5	-4.02	A8,T16,T7	8	16	2.61
C52-15-5	-5.11	G8,C14,T15,C10	5	15	2.83
C52-10-3	-4.79	G5,A8,G6	3	10	2.74
C52-20-3	-4.47	G10,T11,C13,G12	7	20	2.69
C52-30-3	-4.55	G25,A8,	6	30	2.06
C52-40-3	-4.93	G6,C7,C33,A8	6	40	2.45
C52-19-3	-5.02	G5,T14,C9,C13,G15	9	19	3.18
C52-18-3	-4.38	G15,T16,C17,G4	6	18	2.65
C52-17-3	-4.62	T11,C13,G10,G12	7	17	2.81
C52-16-3	-4.56	T11,G12,C13,	4	16	2.40
C52-15-3	-4.55	G15,G4,T3	7	15	2.67
C52-5-3	-4.44	G29,C30,T26,C28	13	30	2.98

انرژی اتصال ۰/۲-۵ Kcal/mol بالاترین امتیاز داکینگ را در مقایسه با سایر توالی های آپتامری در کتابخانه Lib₂ به خود اختصاص داد و به عنوان توالی آپتامری کوتاه شده و اختصاصی آفلاتوکسین B₁ انتخاب گردید (جدول ۲).

تعداد جایگاه های اتصال، طول توالی آپتامری و نوع تعاملات آپتامر با مولکول آفلاتوکسین B₁ امتیاز دهی شدند. براساس نتایج، توالی آپتامری C52-19-3 (که تحت عنوان C52-T ناگذاری شد) با طولی معادل ۱۹bp و

موفق الگوریتم ژنتیک جهت ایجاد تنوع در کتابخانه الیگونوکلئوتیدی Lib₁ بود.

بررسی ویژگی‌های ترمودینامیکی و ساختار ثانویه توالی‌های آپتامری در کتابخانه الیگونوکلئوتیدی Lib₂ نشان داد که تمام توالی‌های کوتاه‌شده دارای ساختار لوپ ساده هارپینی بوده و شاخص ΔG برای آنها در محدوده ۱/۵ تا -۸/۰۱ کیلو کالری بر مول قرار می‌گیرد.

شایان ذکر است که کوتاه شدن طول توالی‌های آپتامری اگر چه منجر به کاهش تفاوت وزن مولکولی بین آپتامر و مولکول آفلاتوکسین می‌گردد که مسئله بسیار مهمی در طراحی آپتاسنسورها به شمار می‌رود اما بلندتر بودن طول آپتامر امکان ایجاد تغییرات کونفورماسیونی بیشتری را فراهم می‌نماید. در واقع امکان تطابق بیشتر آپتامرهای بلندتر با مولکول هدف، شانس دستیابی به توالی‌های آپتامری با قدرت اتصال بالا را نیز افزایش می‌دهد (Neves et al. 2015). نتایج بررسی حاضر نیز موید کاهش تعداد توالی‌های آپتامری با قدرت اتصال بالا به مولکول آفلاتوکسین B₁ در کتابخانه Lib₂ بود. مقایسه قدرت اتصال توالی‌های آپتامری در دو کتابخانه مورد بررسی با توالی آپتامری Apt1 نشان داد که تنها یک توالی آپتامری در کتابخانه Lib₂ دارای انرژی اتصال بهتری در مقایسه با آپتامر Apt1 می‌باشد در حالیکه ۵۳/۸۴ درصد از توالی‌ها در کتابخانه Lib₁ (با طول ۵۰bp) قدرت اتصال بهتری در مقایسه با آپتامر والد داشتند. اگر چه در کتابخانه‌های آپتامری حاصل از استراتژی کوتاه‌سازی ممکن است شانس دستیابی به توالی‌های آپتامری بهتر کاهش یابد اما ایجاد و غربال مجازی چنین کتابخانه‌هایی می‌تواند با معرفی آپتامرهای کوتاه‌تری که قدرت اتصال بهتری دارند امکان طراحی بیوسنسورهای ارزان‌قیمت‌تر با حساسیت بیشتر را فراهم آورد. ضمناً می‌توان از این نوع آپتامرها به

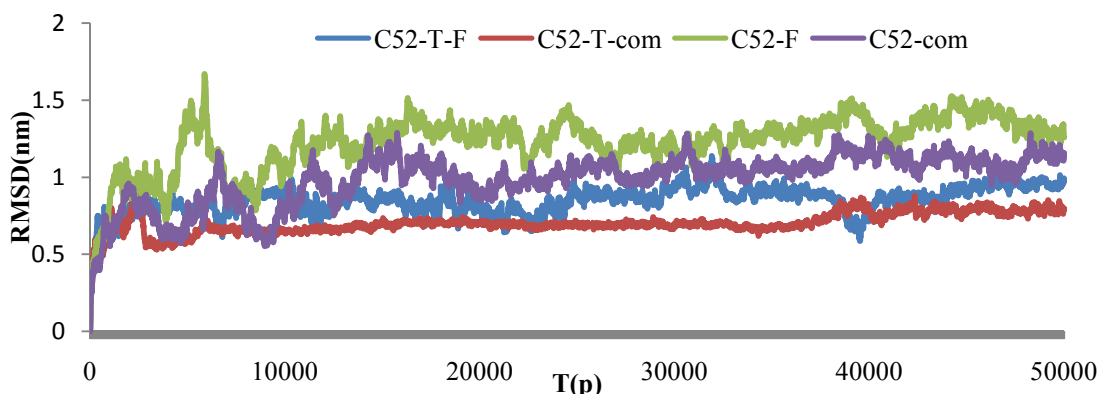
توالی آپتامری C52-T با ساختار لوپ هارپینی از طریق نوکلئوتیدهای T14، C9، C13، G15 و G5 و به کمک برهمکنش‌های هیدروژنی و هیدروفوبیکی با گروه‌های کومارین، فوران و کربونیل مولکول آفلاتوکسین B₁ در تعامل بود.

کاهش طول توالی آپتامری C52-T اگر چه منجر به کاهش ۲/۶۲ برابری وزن آپتامر در مقایسه با مولکول آفلاتوکسین B₁ شد اما در مقابل منجر به کاهش تعداد کونفورماسیون‌های توالی آپتامری مذکور نیز گردید. شایان ذکر است که برابر بودن تعداد جایگاه‌های اتصال و نیز تشابه تقریبی نوع و تعداد تعاملات در دو توالی آپتامری C52-T و C52 با مولکول آفلاتوکسین B₁ منجر به افزایش امتیاز داکینگ آپتامر C52-T در مقایسه با سایر توالی‌های آپتامری کتابخانه Lib₂ گردید (جدول ۱ و شکل ۱).

ویژگی‌های ترمودینامیکی توالی‌های آپتامری در کتابخانه‌های Lib₁ و Lib₂

پیش‌بینی ساختار ثانویه و بررسی ویژگی‌های ترمودینامیکی توالی‌های آپتامری در دو کتابخانه الیگونوکلئوتیدی با نرم افزار Mfold نشان داد که ۶۴/۶۱ درصد از توالی‌های آپتامری در کتابخانه الیگونوکلئوتیدی Lib₁ دارای ساختار ساده لوپ هارپینی، ۲۹/۲۳ درصد دارای ساختار لوپ چند شاخه و ۶/۱۵ درصد نیز دارای ساختار لوپ داخلی^{۱۴} می‌باشند. همچنین حداقل انرژی تشکیل ساختار ثانویه (ΔG) برای کتابخانه الیگونوکلئوتیدی Lib₁ در محدوده -۲/۲۰ تا -۱۱/۳۰ کیلوکالری بر مول قرار می‌گرفت. حضور سه نوع ساختار ثانویه و قرارگیری شاخص ΔG در یک دامنه گسترده نشان دهنده عملکرد

¹⁴ Internal Loop



شکل ۲. نمودارهای RMSD برای آپتامر C52-T در حالت آزاد (آبی) و در کمپلکس با آفلاتوکسین B₁ (قرمز); برای آپتامر C52 در حالت آزاد (سبز) و در کمپلکس با آفلاتوکسین B₁ (بنفش) در طول زمان شبیه سازی.

Fig 2. RMSD plots of the lone C52-T (Blue) and C52-T in complex with aflatoxin B₁ (Red), the lone C52 (Green) and C52 in complex with aflatoxin B₁ (Purple), during the simulation time.

در حالت کمپلکس در مقایسه با حالت آزاد مویید پایدار شدن ساختار آپتامر پس از تشکیل کمپلکس با مولکول آفلاتوکسین می باشد. شایان ذکر است که تغییرات کونفورماسیونی آپتامر C52-T در دو حالت آزاد و در کمپلکس با مولکول آفلاتوکسین به مراتب کمتر از آپتامر C52 بود که با کوتاه تر بودن طول آپتامر و پایدارسازی بیشتر آن پس از اتصال به مولکول آفلاتوکسین در ارتباط می باشد (شکل ۲). شاخص RMSD برای مولکول آفلاتوکسین B₁ در کمپلکس با دو توالی آپتامری C52-T و C52 به ترتیب ۳/۵ و ۳/۸ آنگستروم تخمین زده شد که مویید پایداری بسیار خوب مولکول آفلاتوکسین در کمپلکس با هر دو توالی آپتامری در طول زمان شبیه سازی بود.

بررسی تغییرات کونفورماسیونی پاکت اتصال در دو آپتامر مذکور در طول زمان شبیه سازی نشان داد که در آپتامر C52-T مولکول آفلاتوکسین در بین صفحات بازی نوکلئوتیدهای تشکیل دهنده پاکت اتصال قرار گرفته و مکانیسم تشکیل کمپلکس از نوع تداخل (intercalation)

عنوان واحدهای آپتامری در ایجاد پروب های آپتامری چند واحده با قدرت اتصال چند برابر به مولکول هدف استفاده نمود (Hasegawa et al. 2016).

شبیه سازی دینامیک مولکولی

با هدف بررسی تغییرات ساختاری و آنالیز پایداری کمپلکس آپتامر C52-T و مولکول آفلاتوکسین B₁، شبیه سازی دینامیک مولکولی یک بار برای آپتامر آزاد و بار دیگر برای آپتامر در تعامل با آفلاتوکسین انجام و نتایج حاصله با آنالیز پایداری کمپلکس C52 و مولکول آفلاتوکسین B₁ مورد مقایسه قرار گرفت. لازم به ذکر است که معنی دار نبودن تغییرات انرژی پتانسیل در طول زمان شبیه سازی به منزله همگرایی سیستم شبیه سازی دینامیک مولکولی تلقی گردید.

جهت تعیین میزان پایداری کمپلکس آپتامر C52-T با مولکول آفلاتوکسین B₁ از شاخص انحراف جذر میانگین مربع (RMSD¹⁵) استفاده گردید. کاهش شاخص مذکور

¹⁵ Root Mean Square Deviation

جدول ۳. برهمکنش های هیدروژنی بین آپتامرهای C52 و C52-T و مولکول آفلاتوکسین B₁ و میزان پایداری آنها در طول ۵۰ نانو ثانیه شبیه سازی دینامیک مولکولی.

Table 3. Hydrogen bond interactions and occupancy of C52- aflatoxin B₁ and C52-T – aflatoxin B₁ complexes during 50ns of MD simulations.

Aptamer	Donor	Acceptor	Occupancy (%)	Number (mean±SD)
C52-T	12DG (H ₂₁)	AFB1(O ₆)	9.3	0.154±0.37
	12DG (H ₂₁)	AFB1(O ₅)	0.4	
	12DG (H ₂₁)	AFB1(O ₂)	1.7	
	12DG (H ₂₁)	AFB1(O ₁)	2.4	
	10DG (H ₂₁)	AFB1(O ₁)	0.4	
	9DC (H ₄₁)	AFB1(O ₅)	0.4	
C52	G6 (H ₂₁)	AFB1(O ₅)	10.9	0.83±0.51
	G5 (H ₂₁)	AFB1(O ₄)	6.3	
	G5 (H ₂₁)	AFB1(O ₃)	65.3	

اندازه گیری شاخص RMSF^{۱۹} برای هر دو آپتامر در طول زمان شبیه سازی نشان داد که میزان نوسانات اتم های مربوط به نوکلئوتیدهای تشکیل دهنده کل آپتامر و نیز اتم های تشکیل دهنده پاکت اتصال در حالت کمپلکس نسبت به حالت آزاد کاهش می یابد. براساس نتایج، شاخص مذکور برای نوکلئوتیدهای تشکیل دهنده پاکت اتصال در آپتامر C52 از ۰/۲۰۷±۰/۱۱۴ به ۰/۱۴±۰/۰۵۱ نانومتر و برای نوکلئوتیدهای پاکت اتصال در آپتامر C52-T از ۰/۳۷۱±۰/۱۶۱ به ۰/۲۶۲±۰/۱۵۰ نانومتر کاهش پیدا می کرد.

براساس نتایج، میانگین پیوندهای هیدروژنی تشکیل شده بین آپتامر-آفلاتوکسین B₁ در طول زمان شبیه سازی برای آپتامر C52 به مراتب بیشتر از آپتامر C52-T (۵/۳۶ برابر) برآورد گردید. همچنین مقایسه پایداری پیوندهای هیدروژنی در طول زمان شبیه سازی نشان داد که درصد اشغال پیوندهای هیدروژنی در کمپلکس آپتامری C52 به مراتب بیشتر از کمپلکس C52-T می باشد (جدول ۳).

بررسی تعداد پیوندهای هیدروژنی تشکیل شده بین

بوده که مشابه مکانیزم جفت شدن القایی^{۱۶} بوده و منجر به افزایش شاخص RMSD پس از تشکیل کمپلکس با مولکول آفلاتوکسین می گردد در حالیکه مکانیسم تشکیل کمپلکس در آپتامر C52 از نوع قرارگیری مولکول آفلاتوکسین در شیار کوچک بوده که مشابه مکانیزم قفل و کلید^{۱۷} بوده و تغییرات ساختاری چندانی در آپتامر ایجاد نمی کند (Lin & Patel, 1997). کاهش جزئی شاخص شعاع چرخش (Rg^{۱۸}) برای نوکلئوتیدهای ناحیه پاکت اتصال آپتامر C52 و افزایش جزئی شاخص مذکور برای آپتامر C52-T پس از تشکیل کمپلکس با مولکول آفلاتوکسین نیز مویید مکانیزم های مذکور در تشکیل کمپلکس با مولکول آفلاتوکسین B₁ می باشد. شایان ذکر است که شاخص شعاع چرخش نشان دهنده میزان فشردگی ساختار مولکول می باشد. اتصال پایدار لیگاند به آپتامر منجر به تغییرات کونفورماسیونی در ساختار سه بعدی آپتامر، کاهش شعاع چرخشی و افزایش میزان فشردگی ساختاری می گردد (Stoddard et al. 2010).

¹⁶ Induced-fit

¹⁷ Lock-and-key

¹⁸ Radius of gyration

¹⁹ Root Mean Square Fluctuation

جدول ۴: تعداد و میزان پایداری برهمکنش های هیدروژنی بین مولکول های آب- پاکت اتصال آپتامر و مولکول های آب- آفلاتوکسین B₁ (انحراف معیار ± میانگین) در طول ۵۰ نانوثانیه شبیه سازی دینامیک مولکولی در کمپلکس آپتامری C52 و C52-T.

Table 4. Hydrogen bond interactions and occupancy of the binding pocket –water molecules and aflatoxin B₁- waret molecules (mean ±SD) in C52 and C52-T complexes during 50ns of MD simulations.

Aptamer	Hydrogen bonding		Hydrogen bonding	
	Binding pocket-water molecules		Aflatoxin B ₁ - water molecules	
	Number (mean±SD)	Occupancy range (%)	Number (mean±SD)	Occupancy range (%)
C52-T	46.5 ±4.48	0.1-34.8	3.28 ±1.21	0.1 -1
C52	71.27 ±4.7	1- 6.3	2.11±1.25	1.1-5.9

آزاد اتصال کمپلکس آپتامری C52-T معادل ۲۷/۵۳- کیلوکالری بر مول تخمین زده شد که به مراتب کمتر از انرژی آزاد اتصال کمپلکس آپتامری C52 ارزیابی گردید. آنالیز اجزا تشکیل دهنده انرژی آزاد اتصال در کمپلکس آپتامری C52-T نشان داد که انرژی واندروالس، انرژی الکتروستاتیک و انرژی حلالپوشی غیر قطبی به ترتیب موثرترین اجزای انرژی در پایداری کمپلکس تشکیل شده می باشند. بررسی ها نشان داده است که انرژی حلالپوشی غیر قطبی به دلیل ماهیت هیدروفوبیک آفلاتوکسین B₁ نقش تاثیر گذاری در حفظ لیگاند در پاکت اتصال آپتامر دارد (Almeida et al. 2018). شایان ذکر است که مقادیر انرژی واندروالس و انرژی حلال پوشی غیر قطبی در پایداری کمپلکس آپتامری C52 به مراتب بیشتر از کمپلکس آپتامری C52-T برآورد گردید. مثبت بودن انرژی حلالپوشی قطبی در هر دو کمپلکس آپتامری نشان دهنده تاثیر ناچیز آن بر پایداری کمپلکس های تشکیل شده می باشد (جدول ۵).

آنالیز اجزای انرژی آزاد اتصال با روش MM-PBSA در طول ۵۰ نانوثانیه شبیه سازی برای نوکلئوتیدهای آپتامر C52-T در کمپلکس با مولکول آفلاتوکسین B₁ نشان داد که نوکلئوتیدهای C13, G15, C9, A8, G12, T14 و C7 به ترتیب مهم ترین نوکلئوتیدهای تشکیل دهنده پاکت اتصال

پاکت اتصال و مولکول های آب در دو آپتامر مورد بررسی نشان داد که میانگین پیوندهای هیدروژنی تشکیل شده در آپتامر C52 (۷۱/۲۷ ± ۴/۷) به مراتب بیشتر از آپتامر C52-T (۶۷/۵ ± ۴/۴۸) می باشد اگر چه پیوندهای هیدروژنی مذکور برای آپتامر C52-T پایدارتر ارزیابی گردید.

بررسی تشکیل پیوند هیدروژنی بین مولکول آفلاتوکسین B₁ و مولکول های آب در دو کمپلکس آپتامری مورد بررسی نشان دهنده بالاتر بودن میانگین پیوند هیدروژنی در کمپلکس C52-T بود که معادل ۳/۲۸ ± ۱/۲۱ برآورد گردید با این وجود طول عمر پیوندهای هیدروژنی مذکور در مقایسه با کمپلکس C52 کوتاه تر و در محدوده ۰/۱ تا ۱ نانوثانیه برآورد گردید (جدول ۴).

بررسی ها نشان داده است که پیوندهای هیدروژنی که مولکول آب با DNA و نیز لیگاند تشکیل می دهد برای هیدراته شدن DNA و نیز کمپلکس DNA - لیگاند ضروری بوده و نقش تعیین کننده ای در حفظ پایداری کمپلکس دارند (Dolenc et al. 2005).

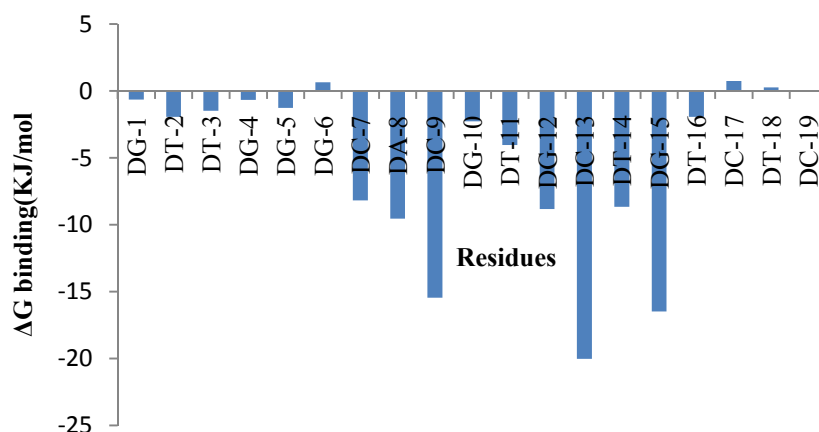
آنالیز انرژی آزاد اتصال با استفاده از روش MM-PBSA

با هدف تعیین و آنالیز انرژی های دخیل در پایداری کمپلکس آپتامری C52-T در طول زمان شبیه سازی از روش MMPBSA استفاده گردید. براساس نتایج، انرژی

جدول ۵. مقایسه اجزای انرژی آزاد اتصال کمپلکس های آپتامری C52-T و C52 در تعامل با مولکول آفلاتوکسین B₁ با روش MM-PBSA بر حسب کیلوکالری بر مول.

Table 5. Comparison of free binding energy components of C52 and C52-T complexes obtained from MM-PBSA method given in kcal/mol.

Aptamer	$\Delta E_{\text{van der Waals}}$	$\Delta E_{\text{electrostatic}}$	ΔG_{polar}	$\Delta G_{\text{non-polar}}$	$\Delta G_{\text{binding}}$
C52-T	-24.63±3.09	-10.87±5.40	10.44±5.95	-2.47±0.27	-27.53
C52	-42.06±4.07	-9.30±8.13	1.29±27.75	-9.44±6.37	-59.51



شکل ۳. آنالیز انرژی آزاد اتصال به تفکیک برای نوکلئوتیدهای آپتامر C52-T در برهمکنش با مولکول آفلاتوکسین B₁ در طول ۵۰ نانوثانیه شبیه سازی با روش MM-PBSA.

Fig 3. Analysis of the free binding energy components for C52-T residues interacting with aflatoxin B₁ through MM-PBSA method during 50ns of MD simulation .

می‌کنند) بعد از افزودن نمک می‌باشد (Alivisatos *et al.* 1996). بررسی‌ها نشان داده است که جذب توالی‌های تک‌رشته‌ای DNA، مانند توالی‌های آپتامری، بر روی نانوذرات طلا به عنوان فاکتور پایدار کننده آنها پس از افزودن نمک عمل نموده و مانع از تجمع و تغییر رنگ نانوذرات می‌گردد. افزودن مولکول هدف آپتامر به چنین سوسپانسیونی منجر به تغییر ساختاری توالی‌های آپتامری به علت واکنش با مولکول هدف (در این بررسی مولکول آفلاتوکسین B₁) و جدا شدن آنها از سطح نانوذرات طلا می‌گردد. افزودن نمک به سوسپانسیون مذکور تحت شرایط فوق منجر به تجمع نانوذرات طلا و تغییر رنگ از قرمز به ارغوانی می‌گردد (Luan *et al.* 2015).

می‌باشند. نوکلئوتیدهای تشکیل دهنده پاکت اتصال براساس آنالیز MM-PBSA با پاکت اتصال تعیین شده در مطالعات داکینگ مولکولی ۸۰ درصد مطابقت داشت و انرژی آزاد اتصال آنها در محدوده -۸/۱۸ تا -۲۰/۰۲ کیلوژول بر مول قرار می‌گرفت (شکل ۳).

ارزیابی آپتامرهای منتخب به روش رنگ‌سنجی مبتنی بر نانوذرات تغییر نیافته طلا

کاربرد نانوذرات طلا به عنوان شناساگر رنگی در ردیابی‌های مبتنی بر آپتامر به دلیل تغییر رنگ قابل مشاهده یا قابل ردیابی آنها از قرمز (در حالتی که نانو ذرات پراکنده هستند) به ارغوانی (در حالتی که نانو ذرات تجمع پیدا

سنتز آنها و نیز طراحی و ساخت آپتاسنسورهای مبتنی بر آنها تاثیر خواهد گذاشت. کاهش قدرت اتصال آپتامر کوتاه شده (C52-T) در مقایسه با آپتامر C52 به دلیل کاهش تعداد کونفورماسیون های آپتامر و متعاقبا کاهش تطابق آپتامر با مولکول هدف کاملا قابل انتظار بوده و در بررسی های دیگر نیز مورد تایید قرار گرفته است (Neves *et al.* 2015). براساس نتایج این بررسی به نظر می رسد که اعمال روش بلوغ شبیه سازی شده قبل از کاربرد استراتژی کوتاه سازی مرحله ای ضروری و تاثیر گذار در دستیابی موفقیت آمیز به توالی های آپتامری کوتاه تر با توان اتصال بیشتر یا معادل با توالی آپتامری اولیه باشد.

تطابق کامل نتایج آزمایشگاهی با یافته های حاصل از شبیه سازی درون رایانه ای (In silico) نشان داد که می توان با ضریب اطمینان بالایی از روش های محاسباتی برای بهبود ساختار و عملکرد آپتامرهای حاصل از سلکس بهره برد. کاربرد تکنیک های شبیه سازی در مورد مایکوتوکسین ها به دلیل قرارگیری این ترکیبات در گروه مولکول های کوچک و چالش های مرتبط با انتخاب آپتامر اختصاص آنها طی فرایند سلکس از اهمیت بیشتری برخوردار می باشد. به کارگیری تکنیک های درون رایانه ای در مورد مایکوتوکسین ها منجر به کاهش تعداد ارزیابی های آزمایشگاهی و متعاقب آن کاهش ریسک کار با این گروه از ترکیبات در شرایط آزمایشگاهی شده بدون اینکه مستلزم صرف هزینه ای باشند (جدول ۶).

نتیجه گیری کلی

در این تحقیق تلفیق موفقیت آمیز استراتژی بلوغ شبیه سازی شده مبتنی بر الگوریتم ژنتیک و استراتژی کوتاه سازی با روش داکینگ مولکولی منجر به دستیابی به توالی آپتامری C52-T گردید که ضمن داشتن طولی بسیار

در بررسی حاضر میزان تمایل آپتامرهای C52 (منتخب از کتابخانه Lib₁)، C52-T (منتخب از کتابخانه Lib₂) و Apt1 با روش رنگ سنجی مبتنی بر نانوذرات تغییر نیافته طلا مورد ارزیابی قرار گرفت. براساس نتایج در حضور آفلاتوکسین B₁ و پس از افزودن نمک میزان جذب در طول موج ۵۴۰ نانومتر کاهش و در ۶۲۰ نانومتر افزایش می یافت. تغییر طیف جذبی در حضور مولکول آفلاتوکسین B₁ نشان دهنده بروز تغییرات ساختاری در آپتامر و کاهش اثر پایدارکنندگی آن بر نانوذرات طلا می باشد.

به منظور آنالیز دقیق تر نتایج، ثابت اتصال (K_a) آپتامرهای مورد ارزیابی براساس نسبت جذبی و نرمال شده ۶۲۰/۵۴۰ نانومتر در حضور غلظت های مختلف آپتامری محاسبه گردید. ثابت اتصال (K_a) آپتامرهای C52-T، C52 و Apt1 به مولکول آفلاتوکسین B₁ به ترتیب $3/15 \times 10^{-5}$ ، $1/75 \times 10^{-5}$ و $1/30 \times 10^{-5}$ نانو مولار تخمین زده شد. افزایش ۲/۴ برابری قدرت اتصال آپتامر C52 در مقایسه با آپتامر والد (Apt₁) نشان دهنده عملکرد موفقیت آمیز روش بلوغ شبیه سازی شده در دستیابی به یک پاسخ بهینه در فضای جستجو درون توالی آپتامری والد بود. شایان ذکر است که اخیرا از روش بلوغ شبیه سازی شده در بهبود عملکرد و افزایش قدرت اتصال آپتامرهای مختلفی استفاده شده است (Noma *et al.* 2006; Savory *et al.* 2014 & Hasegawa *et al.* 2016).

افزایش قدرت اتصال آپتامر کوتاه شده (C52-T) در مقایسه با آپتامر اولیه (Apt1) نیز مویید عملکرد موفق استراتژی کوتاه سازی در معرفی پروب های آپتامری حساس تر برای ردیابی مولکول های کوچک مانند مایکوتوکسین ها بود. شایان ذکر است که کوتاه شدن طول پروب های آپتامری به صورت معنی داری بر کاهش هزینه

آزمایشگاهی موید این نکته است که این استراتژی‌ها با قابلیت شفاف‌سازی برهمکنش‌های موجود بین آپتامر و لیگاند در سطح مولکولی و حتی اتمی می‌توانند به عنوان ابزاری تکمیلی و کارآمد در طراحی و بهینه‌سازی توالی‌های آپتامری بویژه برای مولکول‌های کوچک مانند میکروتوکسین‌ها مورد استفاده قرار گیرند. شایان ذکر است که کاربرد موفقیت آمیز استراتژی‌های محاسباتی در تکمیل مطالعات آزمایشگاهی زمینه تحقیقاتی نسبتاً جدیدی است که به تازگی در حوزه گیاهپزشکی مورد توجه قرار گرفته است. بررسی‌های انجام‌شده با هدف شناسایی ترکیبات جدید با خاصیت قارچکشی (Yang et al., 2014, Xue et al., 2002, Pathak et al., 2016, al., 2002)، معرفی چند نماتد کش جدید (Shanmugam et al., 2018)، شبیه‌سازی عملکرد و ساختار پروتئین عامل مقاومت برنج به بلایت باکتریایی (Dehury et al., 2013) و طراحی آبتانوبیوسنسور با هدف ردیابی باقیمانده سموم (Jokar et al., 2015, al., 2016) به کمک روش داکینگ مولکولی و مطالعات شبیه‌سازی دینامیک مولکولی مثال‌هایی از پژوهش‌های انجام‌شده در این زمینه می‌باشد.

قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه تهران در قالب رساله دکتری و بخشی از آن در قالب فرصت مطالعاتی در دانشکده شیمی دانشگاه تورین ایتالیا انجام شده است.

جدول ۶. تعیین ثابت اتصال (K_a) بر حسب نانومولار با روش رنگ سنجی مبتنی بر نانوذرات تغییر نیافته طلا برای آپتامرهای C52، C52-T و Apt1 در مقایسه با یافته‌های حاصل از روش شبیه‌سازی درون رایانه‌ای.

Table 6. Binding affinity (K_a) values (nM) for C52, C52-T and Apt1 aptamers calculated using unmodified AuNPs-based colorimetric assay and comparison with the in silico approach.

Aptamer	Colorimetric assay	In silico score	R^2
C52	3.15E-05	3.02	0.99
C52-T	1.75E-05	2.713	0.99
Apt1	1.30E-05	2.209	0.98

کمتر از آپتامر اولیه (Apt1)، دارای قدرت اتصال بیشتری در اتصال به مولکول آفلاتوکسین B_1 نیز بود. شایان ذکر است که تعیین جایگاه‌های اتصال آپتامر به مولکول آفلاتوکسین B_1 در مطالعات داکینگ مولکولی از یک سو و ارزیابی پایداری کمپلکس آپتامری کوتاه‌شده در مقایسه با کمپلکس آپتامری والد از سوی دیگر اهمیت بسیار بالایی در تایید آپتامر منتخب داشت که به سادگی قابل حصول از طریق مطالعات آزمایشگاهی نبود. در واقع مطالعات داکینگ مولکولی، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی و روش MM-PBSA امکان محاسبه انرژی اتصال به مولکول هدف، تعیین جایگاه‌های اتصال، بررسی انواع برهمکنش‌ها با مولکول هدف و آنالیز پایداری کمپلکس‌های آپتامری مورد مطالعه را در سطح اتمی و به صورت معتبری فراهم می‌آورند بدون اینکه مستلزم صرف هزینه خاصی باشند (Li et al. 2014).

مطابقت بالای نتایج درون‌رایانه‌ای با یافته‌های

منابع

- Alivisatos A.P. Johnsson K.P. Peng X. Wilson T.E. Loweth C.J. Bruchez M.P. Schultz P.G. 1996. Organization of nanocrystal molecules using DNA. *Nature* 382: 609-611
- Almeida J. S. F. Dolezal R. Krejcar O. Kuca K. Musilek K. Jun D. França T.C. C. 2018. Molecular modeling studies on the interactions of aflatoxin b1 and its metabolites with human acetylcholinesterase. part ii:

- interactions with the catalytic anionic site (CAS). *Toxins*. 10(10): 389
- Berendsen H.J.C. van der Spoel D. van Drunen R. 1995. GROMACS – A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Computer Physics Communications* 91: 43–56
- Biovia D.S. 2015. Discovery studio modeling environment. San Diego, Dassault Systemes, Release, 4
- Chen X. Huang Y. Duan N. Wu S. Ma X. Xia Y. Zhu C. Jiang Y. Wang Z. 2013. Selection and identification of ssDNA aptamers recognizing zearalenone. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405: 6573–6581
- Cowan J. A. Ohyama T. Wang D. Natarajan K. 2000. Recognition of a cognate RNA aptamer by neomycin B: quantitative evaluation of hydrogen bonding and electrostatic interactions. *Nucleic Acids Research* 28: 2935–2942
- Cruz-Aguado J. A. Penner G. 2008. Fluorescence polarization based displacement assay for the determination of small molecules with aptamers. *Analytical Chemistry* 80: 8853–8855
- Darden T. York D. Pedersen L. 1993. Particle Mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald Sums in Large Systems. *The Journal of Chemical Physics* 98: 10089–10092
- Dehury B. Sahu M. Sarma K. Sahu J. Sen P. Modi M. K. Sharma G. D. Choudhury M. D. Barooah M. 2013. Molecular phylogeny, homology modeling, and molecular dynamics simulation of race-specific bacterial blight disease resistance protein (xa5) of rice: a comparative agriproteomics approach. *OMICS* 17:423–438
- Dolenc J. Borstnik U. Hodosecek M. Koller J. Janezic D. 2005. An ab initio QM/MM study of the conformational stability of complexes formed by netropsin and DNA. The importance of van der Waals interactions and hydrogen bonding. *Journal of Molecular Structure* 718 : 77–85
- Hasegawa H. Savory N. Abe K. Ikebukuro K. 2016. Methods for improving aptamer binding affinity. *Molecules* 21: 421
- Huang Y. Zhao S. Chen Z. F. Shi M. Liang H. 2012. Amplified fluorescence polarization aptasensors based on structure-switching-triggered nanoparticles enhancement for bioassays. *Chemical Communications* 48(60): 7480–7482
- Ikebukuro K. Okumura Y. Sumikura K. Karube I. 2005. A novel method of screening thrombin-inhibiting DNA aptamers using an evolution-mimicking algorithm. *Nucleic Acids Research* 33(12): e108
- Jeddi I. Saiz L. 2017. Three-dimensional modeling of single stranded DNA hairpins for aptamer-based biosensors. *Scientific Reports* 7:1178.
- Jokar M. Safaralizadeh M. Hadizadeh F. Rahmani F. Kalani M. R. 2016. Aptamers-nano-sensor preparation and in vitro assay for rapid diazinon detection using a computational molecular approach. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 34:343–353
- Jokar M. Safaralizadeh M. Hadizadeh F. Rahmani F. Kalani M. R. 2015. Design and evaluation of an aptamers-nano-sensor to detect acetamiprid in vitro and in silico. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 36(6): 1402–1416
- Kumari R. Kumar R. Lynn A. 2014. g_mmpbsa - A GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations. *Journal of Chemical Information and Modeling* 54:1951–62
- Li B.Q. Zhang Y.C. Huang G.H. Cui W.R. Zhang N. Cai Y.D. 2014. Prediction of aptamer-target interacting pairs with pseudo-amino acid composition. *PloS One* 9(1): e86729
- Lin C. H. Patel. D. J. 1997. Structural basis of DNA folding and recognition in an AMP-DNA aptamer complex: distinct architectures but common recognition motifs for DNA and RNA aptamers complexed to AMP. *Chemical biology* 4: 817–832
- Luan Y. Chen Z. Xie G. Chen J. Lu A. Li C. Fu H. Ma Z. Wang J. 2015. Rapid visual detection of aflatoxin b₁ by label-free aptasensor using unmodified gold nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 15: 1357–1361
- Malhotra S. Pandey A. K. Rajput Y. S. Sharma R. 2014. Selection of aptamers for aflatoxin M₁ and their characterization. *Journal of Molecular Recognition* 27: 493–500
- Mascini M. 2009. Aptamers in bioanalysis. Hoboken, New Jersey, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Mayer G. Ahmed M. S. Dolf A. Endl E. Knolle P. A. Famulok M. 2010. Fluorescence-activated cell sorting for aptamer SELEX with cell mixtures. *Nature Protocols* 5(12):1993–2004
- McKeague M. Bradley C.R. De Girolamo A. Visconti A. Miller J. D. Derosa M. C. 2010. Screening and initial binding assessment of fumonisin b(1) aptamers. *International Journal of Molecular Sciences* 11(12):4864–81

- Molecular Operating Environment (MOE). 2014.0901. By Chemical Computing Group Inc.
- Morris G. M. Huey R. Lindstrom W. Sanner M. F. Belew R. K. Goodsell D. S. Olson A. J. 2009. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry* 30: 2785–2791
- Mousivand M. Anfossi L. Bagherzadeh K. Barbero N. Mirzadi-Gohari A. Javan-Nikkhah M. 2020. In silico maturation of affinity and selectivity of DNA aptamers against aflatoxin B1 for biosensor development. *Analytica Chimica Acta* 1105:178-186
- Neves M. A. Blaszykowski C. Bokhari S. Thompson M. 2015. Ultra-high frequency piezoelectric aptasensor for the label-free detection of cocaine. *Biosensors and Bioelectronics* 72: 383–392
- Noma, T. Sode K. Ikebukuro K. 2006. Characterization and application of aptamers for Taq DNA polymerase selected using an evolution-mimicking algorithm. *Biotechnology Letters* 28(23):1939-44
- Patent:PCT/CA2010/001292, NeoVentures Biotechnology Inch.
- Pathak R. K. Taj G. Pandey D. Kasana V. K. Baunthiyal M. and Kumar A. 2016. Molecular modeling and docking studies of phytoalexin(s) with pathogenic protein(s) as molecular targets for designing the derivatives with anti-fungal action on *Alternaria* spp. of *Brassica*. *Plant Omics* 9:172-182
- Perez A. Marchan I. Svozil D. Sponer J. Cheatham T. E. Laughton C. A. Orozco M. 2007. Refinement of the AMBER Force Field for Nucleic Acids: Improving the Description of alpha/gamma Conformers. *Biophysical Journal* 92: 3817–3829
- Pettersen E. F. Goddard T. D. Huang C. C. Couch G. S. greenblatt D. M. Meng E. C. Ferrin T. E. 2004. UCSF Chimera– A Visualization System for Exploratory Research and Analysis *Journal of Computational Chemistry* 25:1605–1612
- Popenda M. Szachniuk M. Antczak M. Purzycka K. J. Lukasiak P. Bartol N. Adamiak R. W. 2012. Automated 3D structure composition for large RNAs. *Nucleic Acids Research* 40(14): e112
- Ruscito A. DeRosa M. 2016. Small-Molecule Binding Aptamers: Selection Strategies, Characterization, and Applications. *Frontiers in Chemistry* 4:14
- Shanmugam G. Lee S. K. Jeon J. 2018. Identification of potential nematocidal compounds against the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* through an in silico approach. *Molecules* 23: 1828
- Stoddard C. D. Montange R. K. Hennelly S. P. Rambo R. P. Sanbonmatsu K. Y. Batey R. T. 2000. Free state conformational sampling of the SAM-I riboswitch aptamer domain. *Structure* 18: 787-797
- Stroka J. Anklam E. 2002. New strategies for the screening and determination of aflatoxins and the detection of aflatoxin-producing moulds in food and feed. *Trac-trends in analytical chemistry* 21: 90–95
- Taylor D. 2015. The pharmaceutical industry and the future of drug development. In: *Pharmaceuticals in the environment*, eds. by R. E. Hester and R. M. Harrison, pp. 1-33. The Royal Society of Chemistry, London
- Tuerk C. Gold L. 1990. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* 249(4968): 505–510
- Wang L. Ma W. Chen W. Liu L. Ma W. Zhu Y. Xu L. Kuang H. Xu C. 2011. An aptamer-based chromatographic strip assay for sensitive toxin semi-quantitative detection. *Biosensors and Bioelectronics* 26: 3059–3062
- Wu S. Duan N. Zhang W. Zhao S. Wang Z. 2016. Screening and development of DNA aptamers as capture probes for colorimetric detection of patulin. *Analytical Biochemistry* 508: 58-64
- Xue Y. Shui G. Wenk M. R. 2014. TPS1 drug design for rice blast disease in *Magnaporthe oryzae*. *Springerplus* 3:18.
- Yang G. F. Jiang X. H. Ding Y. Yang H. Z. 2002. Three dimensional quantitative structure-activity relationships of novel 2-heteroaryl-4-chromanone derivatives. *Acta Chimica Sinica* 60:134-138
- Zoete V. Cuendet M. Grosdidier A. Michielin O. 2011. SwissParam: A fast force field generation tool for small organic molecules. *Journal of Computational Chemistry* 32: 2359–2368
- Zuker M. 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction *Nucleic Acids Research* 31(13): 3406–3415.