ISSN: 2476-6917; Modares Journal of Biotechnology. 2018;9(3):317-323

Detection of DNA Aptamer with High Affinity against Hepatitis B Surface Antigen by Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Anbari Meybodi S.[1] *MSc*,
Arjmand S.[2] *PhD*,
Rashedi H.[1] *PhD*,
Ranaei Siadat S.O.*[3] *PhD*,
Pouryaqubi M.[4] *PhD*

How to cite this article
Anbari Meybodi S, Arjmand S, Rashedi H, Ranaei Siadat S O, Pouryaqubi M. Detection of DNA Aptamer with High Affinity against Hepatitis B Surface Antigen by Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment Modares Journal of Biotechnology. 2018;9(3):317-323.

ABSTRACT

Aims Hepatitis B is a viral infection, which can cause serious liver problems. Hepatitis B surface antigen (HBsAg), which is produced as recombinant, is used to produce the Hepatitis B vaccine. The aim of this study was to detect DNA aptamer with high affinity against HBsAg by Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX).

Materials & Methods In the present experimental study, SELEX method was used to isolate and sequence a DNA aptamer with high affinity against HBsAg. The affinity of this monoclonal nucleotide sequence was calculated by fluorimetric method. The difference of initial absorption and residual value as a measure for the number of associated sequences were calculated with Prism 5 software by nonlinear regression method, Binding-saturation and one site-total model were performed, and the amount of electron affinity (Kd) was determined.

Findings After performing the SELEX procedure and evaluating the amplified sequence with agarose gel, the result was positive control sample containing a bond in the range of 72nucleotides, indicating successful amplification of the selected sequence, using selective primers. During cloning steps from existing colonies of PCR reaction with aptamer specific primers, the presence of aptamer was confirmed in Escherichia coli bacteria. The reported aptamer had a stable secondary structure with a free energy of ΔG of less than -6.9kJ and Tm higher than 45°C.

Conclusion The selected DNA aptamer has a high affinity to the target protein (HbsAg) and can be considered as an alternative for mAbs in chromatography column.

Keywords Hepatitis B Surface Antigen; SELEX; DNA Aptamer; Affinity Ligand

Archive

CITATION LINKS

[1] A highly efficient integrated chromatographic procedure for the purification of recombinant hepatitis B surface antigen from Hansenula polymorpha [2] Aggregation of recombinant hepatitis B surface antigen in Pichia pastoris [3] SELEX--a (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands [4] Protein purification: Principles, high resolution methods, and applications [5] Applications of aptamer affinity chromatography [6] Aptamers as molecular tools for bioanalytical methods [7] Aptamer affinity chromatography for rapid assay of adenosine in microdialysis samples collected in vivo [8] Current approaches in SELEX: An update to aptamer selection technology [9] Aptamer stationary phase for protein capture in affinity capillary chromatography [10] Aptamers in affinity separations: Stationary separation [11] Aptamers--basic research, drug development, and clinical applications [12] SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins [13] Comparative effects of sesame seed lignan and flaxseed lignan in reducing the growth of human breast tumors (MCF-7) at high levels of circulating estrogen in athymic mice [14] DNase-mediated single-cycle selection of aptamers for proteins blotted on a membrane [15] Comparison of different methods for generation of single-stranded DNA for SELEX processes [16] Single-stranded DNA (ssDNA) production in DNA aptamer generation [17] An optimized freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gels [18] Development of HBsAg-binding aptamers that bind HepG2. 2.15 cells via HBV surface antigen [19] Selection of HBsAg-specific DNA aptamers based on carboxylated magnetic nanoparticles and their application in the rapid and simple detection of hepatitis B virus infection [20] An aptamer against the matrix binding domain on the hepatitis B virus capsid impairs virion formation

[1]Biotechnology Department, Chemical Engineering Faculty, University of Tehran, Tehran, Iran
[2]Protein Research Center, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
[3]Biotechnology Department, Energy & New Technologies Faculty, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
[4]Nanobiotechnology Department, Biological Science Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

***Correspondence**
Address: Protein Research Center, Shahid Beheshti University, G. C., Tehran, Iran. Postal code:1983969411
Phone: +98 (21) 29905003
Fax: +98 (21) 22434500
o_ranaei@sbu.ac.ir

Article History
Received: January 20, 2016
Accepted: July 17, 2016
ePublished: September 22, 2018

Copyright© 2018, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

www.SID.ir

شناسایی آپتامر DNAای با تمایل بالا علیه آنتی‌ژن سطحی هپاتیت B با روش تکامل سیستماتیک لیگاند از طریق غنی‌سازی نمایی

سمیرا انباری‌میبدی MSc
گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
ساره ارجمند PhD
مرکز تحقیقات پروتئین، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
حمید راشدی PhD
گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
سید امید رعنایی‌سیادت* PhD
گروه بیوتکنولوژی، دانشکده فناوری‌های نوین، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
محمد پوریعقوبی PhD
گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده
اهداف: هپاتیت B عفونت ویروسی است که می‌تواند منجر به مشکلات جدی کبدی شود. برای تولید واکسن هپاتیت B از آنتی‌ژن سطحی ویروس هپاتیت B (HBsAg) که به‌صورت نوترکیب تولید می‌شود، استفاده می‌شود. هدف پژوهش حاضر شناسایی آپتامر DNAای با تمایل بالا علیه آنتی‌ژن سطحی هپاتیت B با روش تکامل سیستماتیک لیگاند با استفاده از غنی‌سازی نمایی بود.
مواد و روش‌ها: در پژوهش تجربی حاضر با استفاده از روش تکامل سیستماتیک لیگاند از طریق غنی‌سازی نمایی (SELEX) قطعه DNAای با قدرت اتصال بالا علیه HBsAg، جداسازی و توالی‌یابی شد. تمایل این توالی نوکلئوتیدی تک‌رشته‌ای با روش فلوریمتری محاسبه شد. اختلاف جذب اولیه و مقدار باقی‌مانده به‌عنوان معیاری از میزان توالی‌های متصل‌شده با کمک نرم‌افزار Prism 5 به روش رگرسیون غیرخطی، محاسبه Binding-saturation و مدل one site-total انجام و میزان میل ترکیبی (Kd) تعیین شد.
یافته‌ها: نتایج بعد از انجام رویه SELEX و ارزیابی توالی تکثیریافته با ژل آگارز، نمونه کنترل مثبت دارای باندی در محدوده ۷۲نوکلئوتید بود که نشان‌دهنده تکثیر موفق توالی گزینش‌شده با استفاده از آغازگرهای انتخابی بود. میل ترکیبی محاسبه‌شده ۸۱/۵۳نانومولار بود. طی مراحل همسانه‌سازی از روی کلنی‌های موجود واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی آپتامر، حضور قطعه آپتامر در باکتری *اشریشیا کلی* تایید شد. آپتامر گزارش‌شده دارای ساختار ثانویه پایدار با داشتن انرژی آزاد ΔG کمتر از ۶/۹-کیلوژول و T_m بالاتر از $45^{\circ}C$ بود.
نتیجه‌گیری: آپتامر DNAای گزینش‌شده دارای قدرت اتصال بالا به پروتئین هدف (HbsAg) است و می‌تواند به‌عنوان جایگزینی برای پادتن‌ها، در ستون‌های کروماتوگرافی تمایلی تخلیص HBsAg مورد توجه قرار بگیرد.
کلیدواژه‌ها: آنتی‌ژن سطحی هپاتیت B، غنی‌سازی نمایی، آپتامر DNAای، لیگاند تمایلی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۳۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۴/۲۷
*نویسنده مسئول: o_ranaei@sbu.ac.ir

مقدمه

هپاتیت B بیماری ویروسی است که با التهاب و ورم کبد همراه است و می‌تواند منجر به سرطان کبد یا سیروز کبدی شود. این بیماری یکی از عوامل مورد توجه در مرگ‌ومیر زودرس در انسان است و هم‌اکنون ۲۴۰میلیون نفر در سراسر جهان از این بیماری رنج می‌برند و سالانه بیش از یک‌میلیون مورد مرگ در اثر این بیماری اتفاق می‌افتد[1]. واکسیناسیون در سطح همگانی سبب کاهش چشمگیری در میزان حاملان بیماری شده است. در حال حاضر آنتی‌ژن سطحی هپاتیت (HBsAg) که به‌صورت نوترکیب و با فرآیندهای زیست‌فناوری تهیه و تولید می‌شود، به‌عنوان واکسن در پیشگیری از ابتلا به هپاتیت B مورد استفاده قرار می‌گیرد. HBsAg به شکل مونومر دارای وزن مولکولی متوسط ۲۴کیلودالتون و طول ۴۰۰-۳۲۰آمینواسید (بسته به زیرگونه ویروسی) است. همچنین این پروتئین دارای توانایی خودتجمعی با برقراری پیوند دی‌سولفیدی و تشکیل ذرات تا اندازه ۲۰نانومتر است[2].

تولید پروتئین HBsAg نیز مانند دیگر پروتئین‌های دارویی، متحمل هزینه‌های بسیار در مرحله خالص‌سازی است. در حوزه زیست‌فناوری، خالص‌سازی پروتئین‌ها با روش‌هایی مانند کروماتوگرافی، الکتروفورز و اولترافیلتراسیون رسوبی انجام می‌شود[3]. روش کروماتوگرافی تمایلی یکی از مهم‌ترین روش‌ها است. این تکنیک در حال حاضر، به‌دلیل انتخاب‌پذیری بالا و توانایی بازیابی، قوی‌ترین روش موجود در فرآیندهای پایین‌دستی به‌منظور خالص‌سازی نهایی پروتئین مورد نظر است[4]. در ستون‌های کروماتوگرافی به‌صورت رایج از پادتن‌های مونوکولونال به‌عنوان لیگاند تمایلی برای خالص‌سازی پروتئین هدف استفاده می‌شود، اما استفاده از پادتن‌ها دارای معایبی مانند سرعت تخریب بالای پادتن‌ها و هزینه بالای تولید آنها است[5]. توسعه روش‌های شیمی ترکیبی باعث تولید ترکیبات جایگزین برای پادتن‌ها در کروماتوگرافی تمایلی شده است. در مقایسه با پادتن‌ها، لیگاندهای جدید دارای ویژگی‌های عملکردی بهتری هستند. این ترکیبات جدید با تمایل بالاتر و اختصاصیت بیشتری به مولکول هدف خود متصل می‌شوند و دارای اندازه و پیچیدگی‌های کمتری نسبت به پادتن‌ها هستند. تولید آنها راحت‌تر و دارای هزینه پایین‌تری است[6].

یکی از روش‌های شیمی ترکیبی، روش فرآیند تکامل سیستماتیک لیگاندها توسط غنی‌سازی نمایی (SELEX) است. با این روش، تعداد زیادی توالی‌های کوتاه از جنس پروتئین، DNA یا RNA را که با تمایل و اختصاصیت بالا به مولکول هدف متصل می‌شوند، از میان یک کتابخانه سنتزی جدا می‌کنند و این توالی‌ها آپتامر نامیده می‌شوند[7]. این روش برای اولین بار در سال ۱۹۹۰ میلادی استفاده شده و روش مرسوم SELEX شامل چندین چرخه به‌منظور گزینش و تکثیر آپتامر با قدرت اتصال بالاست، اما این روش از زمان اولین کاربرد SELEX تاکنون تغییرات و بهبودهای زیادی پیدا کرده است، به‌گونه‌ای که امروزه گزینش آپتامر جدید تنها چند ساعت به‌جای چندین هفته که در روش مرسوم SELEX رایج است، طول می‌کشد[8].

در مقایسه با پادتن‌های مورد استفاده در کروماتوگرافی تمایلی، آپتامرهای DNAای، پایداری و ماندگاری بیشتری دارند که هنگام استفاده از بافرهای شست‌وشوی دارای ترکیبات دناتوره‌کننده اهمیت پیدا می‌کند. همچنین دناتوراسیون آپتامرها در دمای بالا قابل برگشت است، ولی در مورد پادتن‌ها غیرقابل برگشت است[5]. ایجاد تغییرات روی آپتامرها برای تثبیت روی بستر جامد نسبت به پادتن‌ها ساده‌تر است و به‌دلیل اندازه کوچک‌تر آپتامرها تراکم آپتامرهای تثبیت‌شده روی بستر جامد بیشتر است و باعث افزایش ظرفیت ستون می‌شود[9]. اختصاصی‌بودن، تمایل بسیار زیاد و سهولت اتصال آپتامرها به مولکول‌های هدفشان، آپتامرها را قادر به اتصال اختصاصی با مقادیر پیکو تا نانومولار به مولکول‌های هدفشان می‌کند[10]. برخلاف پادتن‌های مونوکلونال، آپتامرهای DNAای پاسخ ایمنی بدن را تحریک نمی‌کنند. این ویژگی باعث کارآیی بیشتر در درمان بیماری‌ها و کاربردهای پزشکی طولانی‌مدت توسط آنها می‌شود[11]. به‌دلیل اهمیت بالای کارآیی و هزینه‌های مربوط به خالص‌سازی HBsAg در مراحل تولید واکسن، در این

Archive of SID
www.SID.ir

تحقیق گزینش یک آپتامر DNAای مناسب با تمایل بالا نسبت به این آنتی‌ژن بررسی شد. آپتامر جداشده می‌تواند در ادامه مراحل تحقیقات به‌عنوان یک روش مکمل یا جایگزین برای پادتن‌های مونوکلونال استفاده شود. بنابراین هدف پژوهش حاضر شناسایی آپتامر DNAای با تمایل بالا علیه آنتی‌ژن سطحی هپاتیت B با روش تکامل سیستماتیک لیگاند از طریق غنی‌سازی نمایی بود.

مواد و روش‌ها

در پژوهش تجربی حاضر، پروتئین هدف (HBsAg) با درصد خلوص بالای ۹۸% و تولیدشده به‌صورت نوترکیب (پروتئین نوترکیب سبحان؛ ایران) تهیه شد و از محلول رویی تخریب سلولی میزبان تولیدی فاقد ژن خارجی به‌منظور کنترل منفی استفاده شد. پروتئین HBsAg و محلول رویی تخریب سلولی فاقد ژن خارجی با استفاده از آزمایش الکتروفورز روی ژل پلی‌آکریل‌آمید-سدیم‌دودسیل‌سولفات (SDS-PAGE) مطابق روش *اسمیت*[12] مورد بررسی قرار گرفتند. دو قطعه کوچک از غشای پلی‌وینیلیدین‌فلوئورید (PVDF) به‌منظور تثبیت پروتئین روی غشا، یکی درون محلول حاوی پروتئین هدف و دیگری درون محلول کنترل منفی قرار گرفت.

کتابخانه DNA تک‌رشته اولیه: کتابخانه DNA تک‌رشته با طول ۷۲نوکلئوتید شامل ۳۰نوکلئوتید تصادفی احاطه‌شده با دو ناحیه ثابت ۲۱نوکلئوتیدی با توالی 5'-TACCAAGAGAACTACATATCC(N30)GGACTACTAGA CACTGTATGA-3' (دنازیست؛ ایران) خریداری شد. آغازگر رفت با توالی 5'-TACCAAGAGAACTACATATCC-3' و آغازگر برگشت با توالی 5'- TCATACAGTGTCTAGTAGTCC-3' متناسب با نواحی ثابت در توالی آپتامر با استفاده از نرم‌افزار Oligo 7 طراحی شدند. همچنین آغازگر رفت دارای رنگدانه فلورسنتی فلورسین‌آمیدیت (FAM) در انتهای 5' تهیه شد. آغازگرهای مورد استفاده نیز (ژن‌فناوران؛ ایران) خریداری شدند.

توالی که در کادر زیر قرار گرفته‌اند مربوط به توالی آپتامری ۷۲نوکلئوتیدی و نواحی پُررنگ، آغازگرهای رفت و برگشت عمومی هستند:

pTG19-apt S1_M13F-pUC:
AGCAGGCGTGATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCA AGATT***TACCAAGAGAACTACATATCC***GGCACGTCCC CCTACGTGGGCCGCAGGAGA***GGACTACTAGACACTG TATGA***AATCTTGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCA GGCATGCAAGCTTTCCCTATAGTGAGTCGTATTAGA GCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGT GAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATA

توالی‌یابی با استفاده از هر دو آغازگر T7promoter و M13R یکسان و به‌صورت مکمل معکوس توالی گزارش‌شده با استفاده از آغازگر M13F-pUC بود که قسمتی از آنالیز توالی‌یابی بعد از مکمل معکوس‌شدن برای آغازگر T7promoter در زیر آمده است:

pTG19-apt S1_T7promoter:
CGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCCAGT CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTCGA GCTCGGTACCCGGGGATCCAAGATT*TACCAAGAGA ACTACATATCC***GGCACGTCCCCCTACGTGGGCCGCA GGAGA***GGACTACTAGACACTGTATGA***AATCTTGGGG ATCCTCTAGAGTCGACTGCAGTTGACGG**

رویه گزینش آپتامر

ایجاد ساختار سه‌بُعدی در توالی‌های الیگونوکلئوتیدی: ایجاد ساختمان‌های ثانویه در مخزن تصادفی الیگونوکلئوتیدی یکی از مراحل اصلی در فرآیند انتخاب آپتامرهای اسیدنوکلئیکی محسوب می‌شود. برای ایجاد ساختار سه‌بُعدی به‌صورت قابل تکرار از اعمال روند دمایی مشخص استفاده می‌شود[13]. برای این منظور، مقدار ۰/۳نانومول از DNA درون یک‌میلی‌لیتر از بافر اتصال (۰/۰۲% توئین ۲۰، یک‌میلی‌مولار کلریدکلسیم ($CaCl_2$)، ۵میلی‌مولار کلریدمنیزیوم ($MgCl_2$)، ۱۰۰میلی‌مولار کلریدسدیم، ۵میلی‌مولار کلریدپتاسیم و ۲۰میلی‌مولار تریس هیدروکلراید با pH برابر با ۷/۶) ریخته شد و به‌مدت ۱۰دقیقه در دمای ۹۵°C قرار داده شد. سپس بلافاصله به‌مدت ۱۰دقیقه روی یخ انکوبه و متعاقب آن به دمای محیط منتقل و قبل از انکوباسیون به‌مدت ۸دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد.

انکوباسیون کتابخانه تک‌رشته‌ای با پروتئین هدف: به‌منظور بررسی تثبیت پروتئین روی غشای PVDF، دو قطعه غشا یکی در محلول پروتئین HBsAg و دیگری درون بافر اتصال به‌مدت یک شبانه‌روز قرار گرفتند. سپس مراحل رنگ‌آمیزی با کوماسی‌بلوی G-250 و رنگ‌بری آن برای تایید تثبیت پروتئین‌ها روی غشا انجام گرفت. دو غشای PVDF جدید هر کدام در یک ظرف، یکی حاوی پروتئین هدف HBsAg و دیگری حاوی محلول روماند تخریب سلولی میزبان فاقد ژن خارجی به‌مدت یک شبانه‌روز قرار گرفتند. بعد از مرحله تثبیت پروتئین، غشاها درون بافر مسدودکننده (محلول توئین ۱% رقیق‌شده در بافر اتصال) به‌مدت یک ساعت در دمای ۲۵°C قرار داده شدند تا سطحی از غشاها که پروتئین‌ها روی آن تثبیت نشده بود، پوشانده شود.

به‌منظور حذف توئین ۲۰ اضافی، غشاها سه‌مرتبه با بافر اتصال شسته شدند. سپس غشایی که پروتئین‌های موجود در محلول رویی تخریب سلولی روی آن تثبیت شده بود، درون ویال مرحله قبل که حاوی DNA و بافر اتصال بود، قرار گرفت و فرآیند انکوباسیون به‌مدت دو ساعت روی شیکر در دمای اتاق انجام شد. در مرحله بعدی محلول حاوی DNA به ویال جدید منتقل شد و بعد از آن برای برهم‌کنش توالی‌های الیگونوکلئوتیدی و پروتئین هدف، غشای حاوی پروتئین درون ویال مربوطه قرار داده شد و مجدداً فرآیند انکوباسیون به‌مدت دو ساعت روی شیکر در دمای اتاق انجام گرفت. بعد از دو ساعت واکنش اتصال، سه مرحله شست‌وشو با بافر اتصال انجام شد. سپس غشای دارای پروتئین هدف به ویال جدید حاوی ۵۰میکرولیتر آنزیم DNase I منتقل شد تا توالی‌هایی با اتصال ضعیف حذف شوند. بعد از یک ساعت، واکنش آنزیمی با افزودن ۵میکرولیتر از ۲۵میلی‌مولار اتیلن‌دی‌آمین‌تتراستیک‌اسید (EDTA) متوقف شود. به‌منظور حذف بیشتر توالی‌هایی که اتصال ضعیف به پروتئین هدف دارند، غشای حاوی پروتئین هدف، سه مرحله با بافرهای اوره (pH برابر با ۸) شامل ۴۰میلی‌مولار تریس هیدروکلراید، ۱۰میلی‌مولار EDTA و ۰/۰۲% توئین ۲۰ هر کدام دارای ۷، ۸ و ۹مولار اوره شست‌وشو داده شد. سپس یک مرحله شست‌وشو با آب مقطر انجام شد تا اوره حذف شود[14].

تکثیر توالی‌های الیگونوکلئوتیدی توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR): غشای حاوی پروتئین هدف به‌همراه آپتامرهای متصل‌شده به آن به‌طور مستقیم به ویال PCR منتقل شد. ابتدا اجزای واکنش به تعداد ویال‌های مورد نیاز برای تکثیر به‌علاوه یک

Archive of SID
www.SID.ir

ویال کنترل منفی تهیه شدند (جدول ۱). ویال کنترل منفی فاقد توالی الگو تهیه و به آن مقدار یک‌میکرولیتر آب دیونیزه افزوده شد. در انتها به تمام ویال‌ها ۰/۲۵میکرولیتر آنزیم DNA تگ‌پلیمراز افزوده شد. تکثیر به کمک دستگاه ترمال سایکلر tp600 (تاکارا؛ ژاپن) و طی روند دمایی تعیین‌شده انجام شد (جدول ۲).

جدول ۱) محتوای واکنش PCR در هر ویال برای تکثیر توالی‌های DNA

نام ماده	مقدار (میکرولیتر)
آب دیونیزه فاقد نوکلئاز	۱۳/۹
بافر PCR (۱۰X)	۲
منیزیم‌کلرید (۱۰میلی‌مولار)	۲ (غلظت نهایی یک‌میلی‌مولار)
داکسی‌نوکلئوتیدتری‌فسفات (۱۰میلی‌مولار)	۰/۵ (غلظت نهایی ۰/۲۵میلی‌مولار)
آغازگر (۱۰پیکومول بر میکرولیتر)	۰/۲
DNA پلیمراز Taq (۵واحد در میکرولیتر)	۰/۲
حجم نهایی	۲۰

جدول ۲) روند دمایی واکنش PCR

کارکرد	مدت	دما (°C)
واسرشته‌سازی اولیه DNA دورشته‌ای الگو	۵دقیقه	۹۵
واسرشته‌سازی DNA دورشته‌ای	۳۰ثانیه	۹۵
اتصال آغازگر	۳۰ثانیه	۵۶
طویل‌سازی DNA	۳۰ثانیه	۷۲
طویل‌سازی تکمیلی DNA	۵دقیقه	۷۲

به‌منظور تهیه توالی‌های تک‌رشته‌ای برای اندازه‌گیری تمایل آپتامر گزینش‌شده و پروتئین هدف از PCR نامتقارن استفاده شد. PCR نامتقارن از لحاظ شرایط واکنش، مشابه PCR معمولی است، جز این که به‌منظور تکثیر یکی از دو رشته، مقدار یکی از آغازگرها نسبت به آغازگر دیگر بیشتر است[15, 16]. در این پژوهش نیز برای تکثیر رشته هدف، آغازگر رفت با غلظت ۱۰برابر نسبت به آغازگر برگشت در محلول واکنش اضافه شد.

محصولات PCR (۱۰میکرولیتر) روی ژل ۲% آگارز و بافر تریس-بورات- EDTA (۰/۵X) با ولتاژ ۹۰ولت جداسازی شدند. محصولات PCR نامتقارن بعد از جداسازی از باند مربوط به DNA تک‌رشته با استفاده از روش ترسیب با اتانول[17] از روی ژل خالص‌سازی شدند. پلت الیگونوکلئوتیدی در ۵۰میکرولیتر بافر اتصال، حل و غلظت محلول به کمک اسپکتروفتومتر و با توجه به جذب در طول موج ۲۶۰نانومتر تعیین شد.

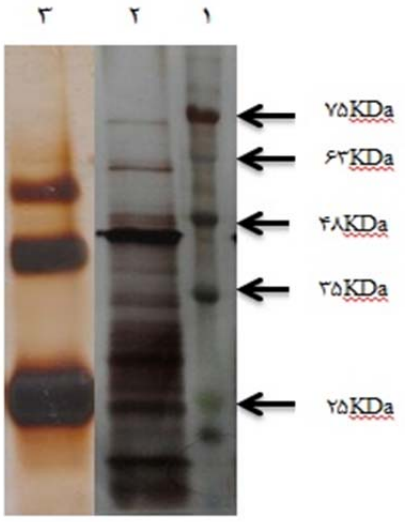
تعیین میل ترکیبی توالی‌های انتخاب‌شده به روش فلورسنت: غلظت‌های کاهش‌یابنده از این توالی در محدوده ۰/۰۱میکرومولار تا ۲میکرومولار تهیه شد و پس از ایجاد ساختارهای ثانویه به کمک تیمار حرارتی، جذب فلورسنت آنها در طول موج تحریکی با اسپکترومتر لومینسانس LS50B (پرکین‌المر؛ ایالات متحده) ۴۹۴نانومتر و طول موج نشری ۵۱۸نانومتر تعیین شد. سپس در حضور محلول یک‌نانومولار پروتئین HBsAg به‌مدت ۹۰دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. توالی‌های متصل‌شده به روش فیلتراسیون نیتروسلولزی از توالی‌های آزاد تفکیک و جذب فلورسنت توالی‌های آزاد اندازه‌گیری شد. اختلاف جذب اولیه و مقدار باقیمانده به‌عنوان معیاری از میزان توالی‌های متصل‌شده با کمک نرم‌افزار Prism 5 به روش رگرسیون غیرخطی، محاسبه اشباع اتصال (Binding-saturation) و مدل one site-total انجام و میزان میل ترکیبی (K_d) تعیین شد.

همسانه‌سازی، توالی‌یابی و آنالیز ساختار ثانویه توالی: بعد از تکثیر توالی‌های گزینش‌شده، از سلول *اشریشیا کلی* سویه DH5α برای همسانه‌سازی توالی گزینش‌شده استفاده شد. بعد از انجام مراحل کلونینگ توالی‌های الیگونوکلئوتیدی انتخاب‌شده درون ناقل pTG19-T و انتقال محصول اتصال در سلول مستعد باکتری DH5α به روش شوک حرارتی با کمک غربالگری سفید- آبی ۸ عدد کلنی‌های حاوی ناقل انتخاب شدند و با استفاده از روش کلنی PCR حضور توالی در ۵ کلنی تایید شد که دو کلنی برای تعیین توالی آپتامر برای توالی‌یابی به شرکت ژن‌فناوران ارسال شد. لازم به ذکر است که توالی‌یابی با استفاده از آغازگر عمومی M13F-pUC- 40 و M13R انجام شد. سپس ساختار ثانویه و انرژی آزاد آپتامر با استفاده از سرور اینترنتی RNAstructure و دمای ذوب (T_m) با استفاده از Oligoanalyzer 3.0 تحت شرایط دمای ۲۵°C، سدیم‌کلرید ۱۰۰میلی‌مولار و منیزیم‌کلرید ۵میلی‌مولار مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها

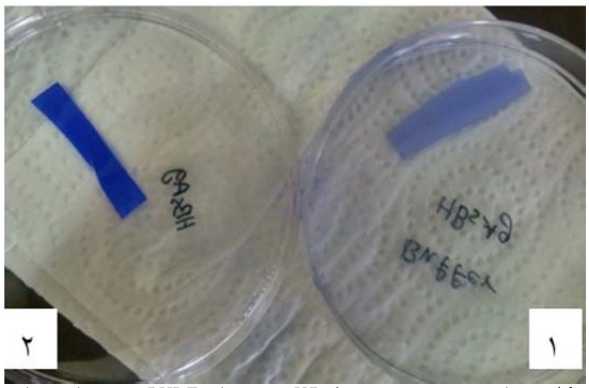
تثبیت پروئین‌ها روی غشای PVDF: نتایج تست الکتروفورز پروتئین HBsAg و محلول روماند تخریب سلولی به دست آمد (شکل ۱). باندهای موجود در تست الکتروفورز مربوط به HBsAg خالص مربوط به مونومر، دایمر و ترایمرهای این پروتئین بود که در اثر تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی بین مونومرهای این پروتئین به وجود آمدند. در مرحله تایید تثبیت پروتئین‌های روی غشا بعد از رنگ‌آمیزی با کوماسی‌بلو، غشاهای دارای پروتئین تثبیت‌شده در مقایسه با نمونه شاهد که فقط در محلول بافر قرار گرفته بود، رنگ خود را حفظ کردند (شکل ۲).

گزینش آپتامر و تهیه آپتامر تک‌رشته‌ای: بعد از انجام رویه SELEX و ارزیابی توالی تکثیریافته با ژل آگارز، نمونه کنترل مثبت دارای باندی در محدوده ۷۲نوکلئوتید بود که نشان‌دهنده تکثیر موفق توالی گزینش‌شده با استفاده از آغازگرهای انتخابی بود (شکل ۳). به‌منظور تایید تکثیر تک رشته‌ای توالی الیگونوکلئوتیدی محصولات PCR نامتقارن روی ژل آگارز برده شد (شکل ۴). محصول PCR دارای دو باند بود که باند بالاتر مربوط به DNA دورشته‌ای و باند پایین‌تر مربوط به DNA تک‌رشته‌ای ۷۲نوکلئوتیدی است.

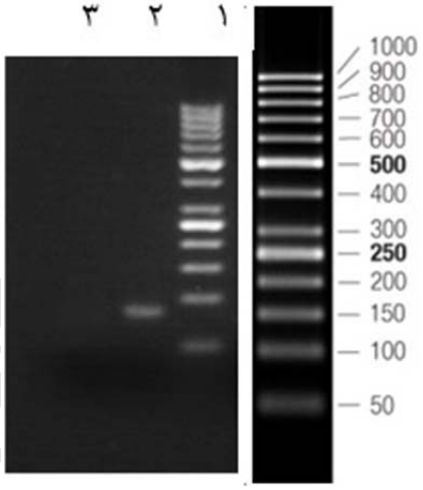


شکل ۱) نتایج تست الکتروفورز؛ ۱- نشانگر پروتئینی ۲- محلول روماند تخریب سلولی فاقد ژن خارجی ۳- HBsAg خالص

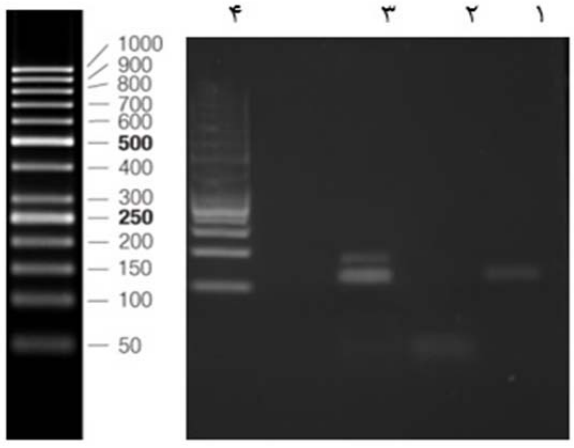
www.SID.ir



شکل ۲) تایید تثبیت پروتئین HBsAg روی غشای PVDF؛ ۱- غشای غوطه‌ور در بافر بعد از رنگ‌بری ۲- غشای غوطه‌ور در پروتئین بعد از رنگ‌بری



شکل ۳) تکثیر توالی گزینش‌شده با استفاده از PCR؛ ۱- نشانگر DNA ۲- آپتامر گزینش‌شده با طول ۷۲ نوکلئوتید ۳- کنترل منفی



شکل ۴) محصولات PCR نامتقارن روی ژل آگارز ۲%؛ ۱- کتابخانه الیگونوکلئوتیدی تک رشته‌ای با طول ۷۲ نوکلتوتید ۲- نمونه منفی ۳- محصول PCR نامتقارن ۴- نشانگر DNA

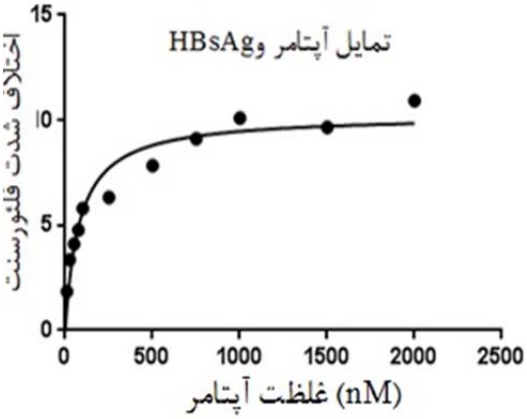
تعیین میل ترکیبی آپتامر DNA تک‌رشته‌ای نسبت به HBsAg:
اطلاعات مربوط به اختلاف جذب فلورسنت قبل و بعد از انکوباسیون آپتامر با HBsAg تعیین شد (جدول ۳) و میل ترکیبی محاسبه‌شده ۸۱/۵۳نانومولار بود (شکل ۵).

همسانه‌سازی و توالی‌یابی و تعیین ساختار ثانویه آپتامر

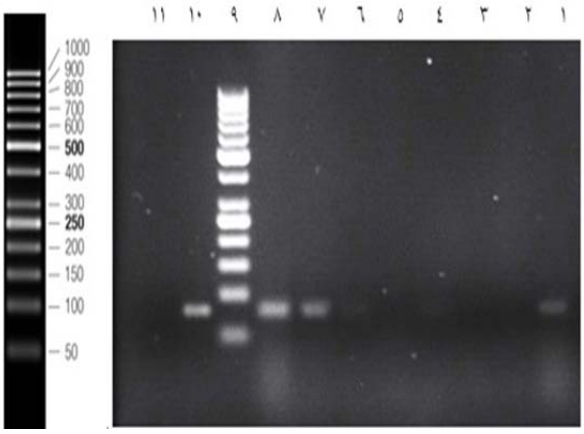
گزینش‌شده: طی مراحل همسانه‌سازی از روی کلنی‌های موجود واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی آپتامر، حضور قطعه آپتامر در باکتری تایید شد (شکل ۶). پلاسمید شماره ۱ حاوی قطعه کامل آپتامری ۷۲نوکلئوتیدی بود. آپتامر گزارش‌شده دارای ساختار ثانویه پایدار با داشتن انرژی آزاد گیبس (ΔG) کمتر از ۶/۹-کیلوژول و T_m بالاتر از ۴۵°C بود. شکل ساختار سوم توالی آپتامر نیز تعیین شد (شکل ۷).

جدول ۳) میزان توالی متصل‌شده به پروتئین HBsAg در غلظت‌های مختلف توالی آپتامری

غلظت توالی آپتامری (نانومولار)	اختلاف جذب فلورسنت اولیه و باقیمانده بعد از انکوباسیون
۱۰	۱/۸۶
۲۵	۳/۳۷
۵۰	۴/۱۲
۷۵	۴/۷۸
۱۰۰	۵/۸
۲۵۰	۶/۳۳
۵۰۰	۷/۸۵
۷۵۰	۹/۱۱۸
۱۰۰۰	۱۰/۱۱
۱۵۰۰	۹/۶۷
۲۰۰۰	۱۰/۹۳

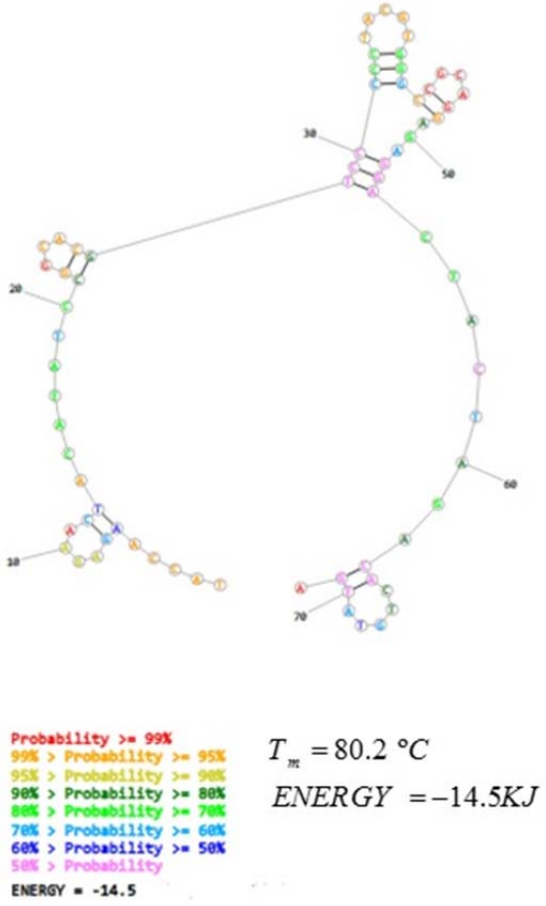


شکل ۵) نمودار میزان اتصال توالی آپتامری نهایی به HBsAg



شکل ۶) نتایج PCR کلنی‌های رشدکرده روی محیط انتخابی؛ چاهک ۱تا ۸ مربوط به کلنی‌های ۱تا۸ به ترتیب، چاهک ۹: DNA Ladder، چاهک ۱۰: کنترل مثبت، چاهک ۱۱: کنترل منفی

www.SID.ir



شکل ۷) پیش‌بینی ساختار ثانویه توالی آپتامری به همراه انرژی آزاد و T_m

بحث

پژوهش حاضر با هدف شناسایی آپتامر DNAای با تمایل بالا علیه آنتی‌ژن سطحی هپاتیت B با روش تکامل سیستماتیک لیگاند از طریق غنی‌سازی نمایی انجام شد. خالص‌سازی HBsAg به‌علت کاربرد این آنتی‌ژن در تهیه واکسن هپاتیت B بسیار مورد توجه است. فرآیند خالص‌سازی این پروتئین متحمل هزینه‌های بسیار در مراحل پایین‌دستی به‌ویژه مراحل مربوط به استفاده از ستون‌های کروماتوگرافی است[3]. عموم لیگاندهای تمایلی مورد استفاده برای خالص‌سازی، پادتن‌ها هستند، ولی هم‌اکنون محققان به‌دلیل هزینه‌های بسیار بالای استفاده از پادتن‌ها و سختی تهیه آنها تمایل به استفاده از توالی‌های الیگونوکلئوتیدی از جنس RNA یا DNA تک‌رشته‌ای به نام آپتامر پیدا کرده‌اند. مزیت استفاده از آپتامرها قدرت اتصال بالا، سرعت تفکیک پایین، هزینه کم و سهولت تهیه آنها است[6].

در سال ۲۰۱۰ میلادی دو توالی آپتامری از جنس RNA علیه HBsAg توسط *لیو* و همکاران با استفاده از روش مرسوم SELEX شامل ۱۵ چرخه تکاملی گزارش شده است[18]. همچنین در سال ۲۰۱۵ میلادی *زای* و همکاران با استفاده از نانوذرات مغناطیسی پوشش‌دارشده با گروه کربوکسیل، سه آپتامر DNAای علیه HBsAg گزارش کرده‌اند[19]. به‌علت این که کار با RNA در هر دو مقیاس صنعتی و آزمایشگاهی دشوار است و آپتامرهای RNA نسبت به DNA پایداری کمتری دارند، در این مطالعه نیز سعی شد تا آپتامرهایی از جنس DNA به‌منظور فراهم‌آوردن شرایط مناسب برای استفاده در ستون‌های کروماتوگرافی تمایلی گزینش شوند.

همچنین در این مطالعه میزان تمایل آپتامر گزینش‌شده علیه HBsAg به‌صورت کمّی محاسبه شد، در حالی که در دو مطالعه ذکرشده در بالا محاسبات کمّی برای قدرت اتصال آپتامر گزینش‌شده علیه HBsAg انجام نشده است. در مطالعه‌ای که توسط *لیو* و همکاران به‌منظور جداسازی آپتامر مناسب برای آنتی‌ژن مرکزی هپاتیت B (HBcAg) انجام شده است، آپتامر مناسب به روش تک‌مرحله‌ای وابسته به DNase I از میان کتابخانه با طول ۸۰باز انتخاب شد و در نهایت K_d محاسبه‌شده در این روش برابر با ۰/۱۴نانومولار بود[14]. در این تحقیق نیز با استفاده از روش تک‌مرحله‌ای وابسته به DNase I توالی با میل ترکیبی بالا از کتابخانه با طول ۷۲باز گزینش شد. در این روش میل ترکیبی با استفاده از فلوریمتری اندازه‌گیری و مقدار ۸۱/۵۳نانومولار گزارش شد که این میزان هر چند نسبت به K_d گزارش‌شده برای آپتامر گزینش‌شده برای آنتی‌ژن مرکزی هپاتیت B (HBcAg) بیشتر بود، ولی این عدد نشان‌دهنده اتصال آپتامر گزینش‌شده با قدرت بالا به HBsAg است. در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۱۵ میلادی توسط *اورابی* و همکاران انجام شد، یک آپتامر DNAای علیه کپسید ویروس هپاتیت B، با استفاده از روش مرسوم SELEX، دارای ۱۳ چرخه تکاملی گزارش شده و قدرت اتصال این آپتامر به کپسید ویروس هپاتیت B به‌صورت ۱۸۰نانومولار گزارش شده است[20] که نشان‌دهنده قدرت اتصال نسبتاً بالای آپتامر گزارش‌شده در این مطالعه (۸۱/۵۳نانومولار) در مقایسه با مطالعات دیگر انجام‌شده در این زمینه است.

پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده کارآیی آپتامر به‌دست‌آمده در اتصال با نانوذرات مغناطیسی یا رزین‌های مناسب کروماتوگرافی به‌منظور تخلیص HBsAg مورد ارزیابی قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

آپتامر DNAای گزینش‌شده دارای قدرت اتصال بالا به پروتئین هدف (HbsAg) است و می‌تواند به‌عنوان جایگزینی برای پادتن‌ها، در ستون‌های کروماتوگرافی تمایلی تخلیص HBsAg مورد توجه قرار بگیرد.

تشکر و قدردانی: بدین وسیله از دانشگاه شهید بهشتی به‌دلیل فراهم‌آوردن امکانات این تحقیق قدردانی می‌شود.

تاییدیه اخلاقی: این پژوهش نیاز به تاییدیه اخلاقی ندارد.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ تعارض منافعی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: سمیرا انباری‌میبدی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۳۰%)؛ ساره ارجمند (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/نگارنده بحث (۲۰%)؛ حمید راشدی (نویسنده سوم)، روش‌شناس (۲۰%)؛ سیدامید رعنایی‌سیادت (نویسنده چهارم)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی (۲۰%)؛ محمد پوریعقوبی (نویسنده پنجم)، پژوهشگر کمکی (۱۰%)

منابع مالی: موردی گزارش نشده است.

منابع

1- Huang Y, Bi J, Zhang Y, Zhou W, Li Y, Zhao L, Su Z. A highly efficient integrated chromatographic procedure for the purification of recombinant hepatitis B surface antigen from Hansenula polymorpha. Protein Expr Purif. 2007;56(2):301-10.

Archive of SID

www.SID.ir

applications. Appl Microbiol Biotechnol. 2005;69(4):367-74.
12- Smith BJ. SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. Methods Mol Biol. 1984;1:41-55.
13- Stoltenburg R, Reinemann C, Strehlitz B. SELEX--a (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. Biomol Eng. 2007;24(4):381-403.
14- Liu Y, Wang C, Li F, Shen S, Tyrrell DL, Le XC, Li XF. DNase-mediated single-cycle selection of aptamers for proteins blotted on a membrane. Anal Chem. 2012;84(18):7603-6.
15- Svobodova, M, Pinto A, Nadal P, O'Sullivan CK. Comparison of different methods for generation of single-stranded DNA for SELEX processes. Anal Bioanal Chem. 2012;404(3), 835-842.
16- Marimuthu C, Tang TH, Tominaga J, Tan SC, Gopinath SC. Single-stranded DNA (ssDNA) production in DNA aptamer generation. Analyst. 2012;137(6):1307-15.
17- Tautz D, Renz M. An optimized freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gels. Anal Biochem. 1983;132(1):14-9.
18- Liu J, Yang Y, Hu B, Ma ZY, Huang HP, Yu Y, et al. Development of HBsAg-binding aptamers that bind HepG2. 2.15 cells via HBV surface antigen. Virol Sin. 2010;25(1):27-35.
19- Xi Z, Huang R, Li Z, He N, Wang T, Su E, et al. Selection of HBsAg-specific DNA aptamers based on carboxylated magnetic nanoparticles and their application in the rapid and simple detection of hepatitis B virus infection. ACS appl mater interfaces. 2015;7(21):11215-23.
20- Orabi A, Bieringer M, Geerlof A, Bruss V. An aptamer against the matrix binding domain on the hepatitis B virus capsid impairs virion formation. J virol. 2015;89(18):9281-7.
2- Tleugabulova D, Falcón V, Sewer M, Pentón E. Aggregation of recombinant hepatitis B surface antigen in Pichia pastoris. J chromatogr B Biome Sci Appl. 1998;716(1-2):209-19.
3- Safarik I, Safarikova M. Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides. Biomagn Res Technol. 2004;2:7.
4- Janson JC, editor. Protein purification: Principles, high resolution methods, and applications. 54th .Volume. 3th Edition. Hoboken: Wiley-VCH; 2012.
5- Zhao Q, Wu M, Chris Le X, Li XF. Applications of aptamer affinity chromatography. TrAC Trends Anal Chem. 2012;41:46-57.
6- Tombelli S, Mascini M. Aptamers as molecular tools for bioanalytical methods. Curr Opin Mol Ther. 2009;11(2):179-88.
7- Deng Q, Watson CJ, Kennedy RT. Aptamer affinity chromatography for rapid assay of adenosine in microdialysis samples collected in vivo. J Chromatogr A. 2003;1005(1-2):123-30.
8- Darmostuk M, Rimpelova S, Gbelcova H, Ruml T. Current approaches in SELEX: An update to aptamer selection technology. Biotechnol Adv. 2015;33(6 pt2):1141-61.
9- Connor AC, McGown LB. Aptamer stationary phase for protein capture in affinity capillary chromatography. J Chromatogr A. 2006;1111(2):115-9.
10- Ravelet C, Peyrin E. Aptamers in affinity separations: Stationary separation. In: Li Y, Lu Y, editors. Functional nucleic acids for analytical applications, integrated analytical systems. New York: Springer; 2009. pp. 271-86.
11- Proske D, Blank M, Buhmann R, Resch A. Aptamers--basic research, drug development, and clinical

Archive of SID

www.SID.ir