



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.

¹Biotechnology Department, Chemical Engineering Faculty, University of Tehran, Tehran, Iran

²Protein Research Center, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

³Biotechnology Department, Energy & New Technologies Faculty, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

⁴Nanobiotechnology 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

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 72 nucleotides, 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 T_m 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

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

شناسایی آپتامر DNA با تمایل بالا علیه آنتی ژن 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 رعنائی‌سیادت 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 آنتی ژن سطحی ویروس هپاتیت B (HBsAg) که به صورت نوترکیب تولید می‌شود، استفاده می‌شود. هدف پژوهش حاضر شناسایی آپتامر DNA با تمایل بالا علیه آنتی ژن 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 DNA 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 به عنوان 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 روبه SELEX و ارزیابی توالی تکثیر یافته با ژل آگارز، نمونه کنترل مثبت دارای باندی در محدوده ۷۲ نوکلئوتید بود که نشان‌دهنده تکثیر موفق توالی گزینش‌شده با استفاده از آغازگرهای انتخابی بود. میل ترکیبی محاسبه‌شده ۸۱/۵۳ نانومولار بود. طی مراحل همسانه‌سازی از روی کلنی‌های موجود واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی آپتامر، حضور قطعه آپتامر در باکتری *شریشیا کلی* تایید شد. آپتامر گزارش‌شده دارای ساختار ثانویه پایدار با داشتن انرژی آزاد ΔG کمتر از $-۶/۹$ کیلوژول و T_m بالاتر از ۴۵°C بود. **نتیجه‌گیری:** آپتامر DNA گزینش‌شده دارای قدرت اتصال بالا به پروتئین هدف (HBsAg) است و می‌تواند به عنوان جایگزینی برای پادتن‌ها، در ستون‌های کروماتوگرافی تمایلی تخلیص HBsAg مورد توجه قرار بگیرد.

کلیدواژه‌ها: آنتی ژن سطحی هپاتیت B، غنی‌سازی نمایی، آپتامر DNA، 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 ۲۴۰ میلیون نفر در سراسر جهان از این بیماری رنج می‌برند و سالانه بیش از یک میلیون مورد مرگ در اثر این بیماری اتفاق می‌افتد^[۱]. واکسیناسیون در سطح همگانی سبب کاهش چشمگیری در میزان حاملان بیماری شده است. در حال حاضر آنتی ژن سطحی هپاتیت (HBsAg) که به صورت نوترکیب و با فرایندهای زیست‌فناوری تهیه و تولید می‌شود، به عنوان واکسن در پیشگیری از ابتلا به هپاتیت B مورد استفاده قرار می‌گیرد.

زیست‌فناوری دانشگاه تربیت مدرس

HBsAg به شکل مونومر دارای وزن مولکولی متوسط ۲۴ کیلودالتون و طول ۴۰۰-۳۲۰ آمینواسید (بسته به زیرگونه ویروسی) است. همچنین این پروتئین دارای توانایی خودتجمعی با برقراری پیوند دی‌سولفیدی و تشکیل ذرات تا اندازه ۲۰ نانومتر است^[۲].

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^[۳]. روش کروماتوگرافی تمایلی یکی از مهم‌ترین روش‌ها است. این تکنیک در حال حاضر، به دلیل انتخاب‌پذیری بالا و توانایی بازیابی، قوی‌ترین روش موجود در فرایندهای پایین‌دستی به منظور خالص‌سازی نهایی پروتئین مورد نظر است^[۴]. در ستون‌های کروماتوگرافی به صورت رایج از پادتن‌های مونوکلونال به عنوان 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^[۵]. 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^[۶].

یکی از روش‌های شیمی ترکیبی، روش فرایند 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^[۷]. این روش برای اولین بار در سال ۱۹۹۰ میلادی استفاده شده و روش مرسوم SELEX شامل چندین چرخه به منظور گزینش و تکثیر آپتامر با قدرت اتصال بالاست، اما این روش از زمان اولین کاربرد SELEX تاکنون تغییرات و بهبودهای زیادی پیدا کرده است، به گونه‌ای که امروزه گزینش آپتامر جدید تنها چند ساعت به جای چندین هفته که در روش مرسوم SELEX رایج است، طول می‌کشد^[۸].

در مقایسه با پادتن‌های مورد استفاده در کروماتوگرافی تمایلی، آپتامرهای DNA، پایداری و ماندگاری بیشتری دارند که هنگام استفاده از بافرهای شست‌وشوی دارای ترکیبات دنا توره‌کننده اهمیت پیدا می‌کند. همچنین دنا توره‌اسیون آپتامرها در دمای بالا قابل برگشت است، ولی در مورد پادتن‌ها غیرقابل برگشت است^[۵]. ایجاد تغییرات روی آپتامرها برای تثبیت روی بستر جامد نسبت به پادتن‌ها ساده‌تر است و به دلیل اندازه کوچک‌تر آپتامرها تراکم آپتامرهای تثبیت‌شده روی بستر جامد بیشتر است و باعث افزایش ظرفیت ستون می‌شود^[۹]. اختصاصی بودن، 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^[۱۰]. برخلاف پادتن‌های مونوکلونال، آپتامرهای DNA پاسخ ایمنی بدن را تحریک نمی‌کنند. این ویژگی باعث کارایی بیشتر در درمان بیماری‌ها و کاربردهای پزشکی طولانی‌مدت توسط آنها می‌شود^[۱۱]. به دلیل اهمیت بالای کارایی و هزینه‌های مربوط به خالص‌سازی HBsAg در مراحل تولید واکسن، در این

رویه گزینش آپتامر

ایجاد ساختار سه بُعدی در توالی‌های الیگونوکلوئوتیدی: ایجاد ساختمان‌های ثانویه در مخزن تصادفی الیگونوکلوئوتیدی یکی از مراحل اصلی در فرآیند انتخاب آپتامرهای اسیدنوکلیئیکی محسوب می‌شود. برای ایجاد ساختار سه بُعدی به صورت قابل تکرار از اعمال روند دمایی مشخص استفاده می‌شود^[13]. برای این منظور، مقدار ۳/۱۰ نانومول از DNA درون یک میلی‌لیتر از بافر اتصال (۲۰/۰٪) توئین ۲۰، یک میلی‌مولار کلرید کلسیم (CaCl₂)، ۵ میلی‌مولار کلرید منیزیم (MgCl₂)، ۱۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم، ۵ میلی‌مولار کلرید پتاسیم و ۲۰ میلی‌مولار تریس هیدروکلراید با pH برابر با ۷/۶ ریخته شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵°C قرار داده شد. سپس بلافاصله به مدت ۱۰ دقیقه روی یخ انکوبه و متعاقب آن به دمای محیط منتقل و قبل از انکوباسیون به مدت ۸ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد.

انکوباسیون کتابخانه تک رشته‌ای با پروتئین هدف: به منظور بررسی تثبیت پروتئین روی غشای PVDF، دو قطعه غشا یکی در محلول پروتئین HBSAg و دیگری درون بافر اتصال به مدت یک شبانه‌روز قرار گرفتند. سپس مراحل رنگ آمیزی با کوماسی بلوی 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 به مدت یک شبانه‌روز قرار گرفتند. بعد از مرحله تثبیت پروتئین، غشاها درون بافر مسدودکننده (محلول توئین ۱٪ رقیق شده در بافر اتصال) به مدت یک ساعت در دمای ۲۵°C قرار داده شدند تا سطحی از غشاها که پروتئین‌ها روی آن تثبیت نشده بود، پوشانده شود.

به منظور حذف توئین ۲۰ اضافی، غشاها سه مرتبه 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 به مدت 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 الیگونوکلوئوتیدی و پروتئین هدف، غشای حاوی پروتئین درون ویال مربوطه قرار داده شد و مجدداً فرآیند انکوباسیون به مدت 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 ۵۰ میکرولیتر آنزیم DNase I منتقل شد تا توالی‌هایی با اتصال ضعیف حذف شوند. بعد از یک ساعت، واکنش آنزیمی با افزودن ۵ میکرولیتر از ۲۵ میلی‌مولار اتیلن‌دی‌آمین‌تترااستیک اسید (EDTA) متوقف شود. به منظور حذف بیشتر توالی‌هایی که اتصال ضعیف به پروتئین هدف دارند، غشای حاوی پروتئین هدف، سه مرحله با بافرهای اوره (pH برابر با ۸) شامل ۴۰ میلی‌مولار تریس هیدروکلراید، ۱۰ میلی‌مولار EDTA و ۲۰٪ توئین ۲۰ هر کدام دارای ۷، ۸ و ۹ مولار اوره شست‌وشو داده شد. سپس یک مرحله شست‌وشو با آب مقطر انجام شد تا اوره حذف شود^[14].

تکثیر توالی‌های الیگونوکلوئوتیدی توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR): غشای حاوی پروتئین هدف به همراه آپتامرهای متصل شده به آن به طور مستقیم به ویال PCR منتقل شد. ابتدا اجزای واکنش به تعداد ویال‌های مورد نیاز برای تکثیر به علاوه یک

تحقیق گزینش یک آپتامر DNA ای مناسب با تمایل بالا نسبت به این آنتی ژن بررسی شد. آپتامر جدا شده می‌تواند در ادامه مراحل تحقیقات به عنوان یک روش مکمل یا جایگزین برای پادتن‌های مونوکلونال استفاده شود. بنابراین هدف پژوهش حاضر شناسایی آپتامر DNA ای با تمایل بالا علیه آنتی ژن 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 تولید شده به صورت نوترکیب (پروتئین نوترکیب سبحان؛ ایران) تهیه شد و از محلول رویی تخریب سلولی میزبان تولیدی فاقد ژن خارجی به منظور کنترل منفی استفاده شد. پروتئین HBSAg و محلول رویی تخریب سلولی فاقد ژن خارجی با استفاده از آزمایش الکتروفورز روی ژل پلی‌آکریل‌آمید-سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE) مطابق روش /سمیت^[12] مورد بررسی قرار گرفتند. دو قطعه کوچک از غشای پلی‌وینیلیدین-فلوئورید (PVDF) به منظور تثبیت پروتئین روی غشا، یکی درون محلول حاوی پروتئین هدف و دیگری درون محلول کنترل منفی قرار گرفت.

کتابخانه DNA تک رشته اولیه: کتابخانه DNA تک رشته با طول ۷۲ نوکلئوتید شامل ۳۰ نوکلئوتید تصادفی احاطه شده با دو ناحیه ثابت ۲۱ نوکلئوتیدی با توالی 5'-TACCAAGAGAACTACATATCC(N30)GGACTACTAGA-3 CACTGTATGA (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 نرم افزار Oligo 7 طراحی شدند. همچنین آغازگر رفت دارای رنگدانه فلورسنتی فلورسین آمیدیت (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 ۷۲ نوکلئوتیدی و نواحی پُررنگ، آغازگرهای رفت و برگشت عمومی هستند:

pTG19-apt S1_M13F-pUC:
AGCAGGCGTGATTTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCA
AGATT[TACCAAGAGAACTACATATCCGGCACGCTCCC
CCTACGTGGGCGCAGGAGAGGACTACTAGACACTG
TATGA]AATCTTGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCA
GGCATGCAAGCTTTCCTATAGTGAGTCGTATTAGA
GCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGT
GAAATTGTTATCCGCTCACAAATTCACACAACATA

توالی‌یابی با استفاده از هر دو آغازگر T7promoter و M13R یکسان و به صورت مکمل معکوس توالی گزارش شده با استفاده از آغازگر M13F-pUC بود که قسمتی از آنالیز توالی‌یابی بعد از مکمل معکوس شدن برای آغازگر T7promoter در زیر آمده است:

pTG19-apt S1_T7promoter:
CGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTCCAGT
CACGACGTTGTAAAACGACGCCAGTGAATTCGA
GCTCGGTACCCGGGGATCCAAGATT[TACCAAGAGA
ACTACATATCCGGCACGTCCTTACGTTGGGCGCA
GGAGAGGACTACTAGACACTGTATGA]AATCTTGGGG
ATCCTCTAGAGTCGACTGCAGTTGACGG

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

نام ماده	مقدار (میکرولیتر)
آب دیونیزه فاقد نوکلئاز	۱۳/۹
بافر PCR (۱۰X)	۲
منیزیم کلرید (۱۰ میلی‌مولار)	۲ (غلظت نهایی یک میلی‌مولار)
داکسی‌نوکلئوتیدتری فسفات (۱۰ میلی‌مولار)	۰/۵ (غلظت نهایی ۰/۲۵ میلی‌مولار)
آغازگر (۱۰ اپیکومول بر میکرولیتر)	۰/۲
DNA پلیمرز Taq (۵ واحد در میکرولیتر)	۰/۲
حجم نهایی	۲۰

جدول ۲) روند دمایی واکنش PCR

کارکرد	مدت	دما (°C)
واشرشته‌سازی اولیه DNA دورشته‌ای الگو	۵ دقیقه	۹۵
واشرشته‌سازی DNA دورشته‌ای	۳۰ ثانیه	۹۵
اتصال آغازگر	۳۰ ثانیه	۵۶
طول‌سازی DNA	۳۰ ثانیه	۷۲
طول‌سازی تکمیلی DNA	۵ دقیقه	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 ۱۰ برابر نسبت به آغازگر برگشت در محلول واکنش اضافه شد.

محصولات PCR (۱۰ میکرولیتر) روی ژل ۲٪ آگارز و بافر تریس-بورات-EDTA (۰/۵X) با ولتاژ ۹۰ ولت 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 ۵۰ میکرولیتر بافر اتصال، حل و غلظت محلول به کمک اسپکتروفتومتر و با توجه به جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر تعیین شد.

تعیین میل ترکیبی توالی‌های انتخاب‌شده به روش فلورسنت: غلظت‌های کاهش‌یافته از این توالی در محدوده ۰/۱-۰ میکرومولار تا ۲ میکرومولار تهیه شد و پس از ایجاد ساختارهای ثانویه به کمک تیمار حرارتی، جذب فلورسنت آنها در طول موج تحریکی با اسپکترومتر لومینسانس LS50B (پرکین‌امر؛ ایالات متحده) ۴۹۴ نانومتر و طول موج نشری ۵۱۸ نانومتر تعیین شد. سپس در حضور محلول یک‌نانومولار پروتئین HBSAg به مدت ۹۰ دقیقه 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 (Kd) تعیین شد.

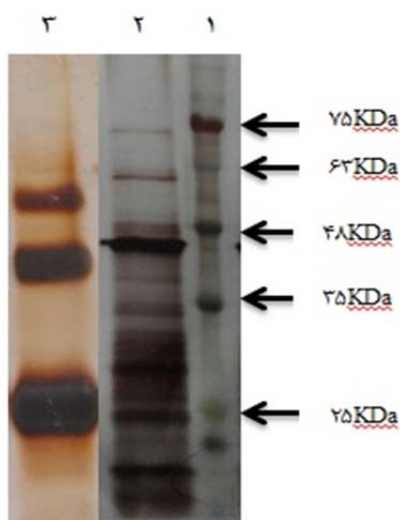
همسانه‌سازی، توالی‌یابی و آنالیز ساختار ثانویه توالی: بعد از تکثیر توالی‌های گزینش‌شده، از سلول /شیرشیا کلی سوبه DH5α برای

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 (Tm) با استفاده از Oligoanalyzer 3.0 تحت شرایط دمای ۲۵°C، سدیم‌کلرید ۱۰۰ میلی‌مولار و منیزیم‌کلرید ۵ میلی‌مولار مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها

تثبیت پروتئین‌ها 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 تراپمرهای 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 ۷۲ نوکلئوتید 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 ۷۲ نوکلئوتیدی است.

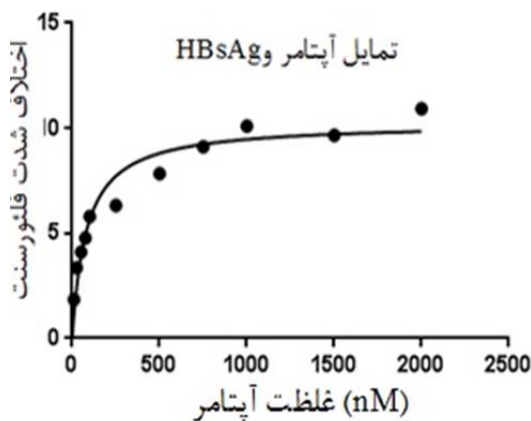


شکل ۱) نتایج تست الکتروفورز؛ ۱- نشانگر پروتئینی ۲- محلول روماند تخریب سلولی فاقد ژن خارجی ۳- HBSAg خالص

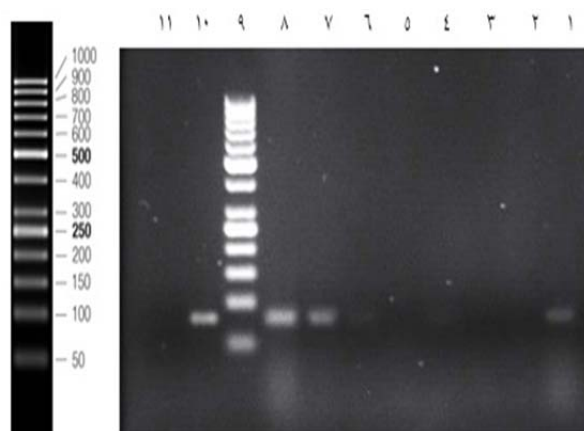
شناسایی آبتامر DNA ای با تمایل بالا علیه آنتی ژن سطحی هیپاتیت B با روش تکامل... ۳۲۱
گزینش شده: طی مراحل همسانه سازی از روی کلنی های موجود واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی آبتامر، حضور قطعه آبتامر در باکتری تایید شد (شکل ۶). پلاسمید شماره ۱ حاوی قطعه کامل آبتامری ۷۲ نوکلئوتیدی بود. آبتامر گزارش شده دارای 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 آبتامر نیز تعیین شد (شکل ۷).

جدول ۳) میزان توالی متصل شده به پروتئین HBsAg در غلظت های مختلف توالی آبتامری

غلظت توالی آبتامری (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



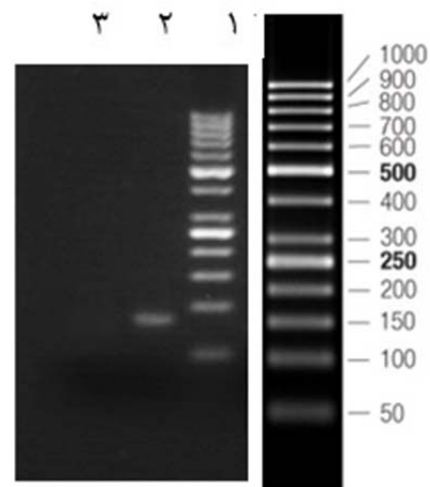
شکل ۵) نمودار میزان اتصال توالی آبتامری نهایی به HBsAg



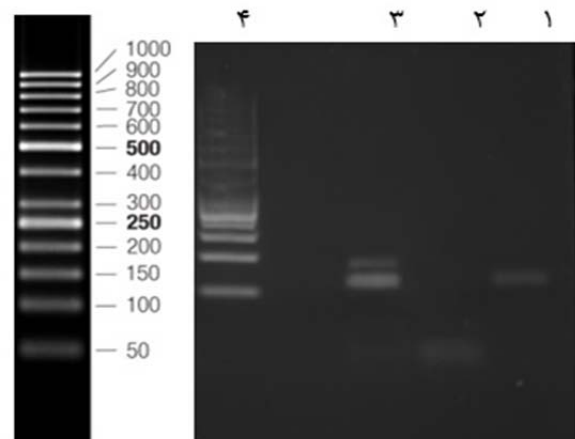
شکل ۶) نتایج PCR کلنی های رشد کرده روی محیط انتخابی؛ چاهک ۱ تا ۸ مربوط به کلنی های ۱ تا ۸ به ترتیب، چاهک ۹: DNA Ladder، چاهک ۱۰: کنترل مثبت، چاهک ۱۱: کنترل منفی



شکل ۷) تایید تثبیت پروتئین HBsAg روی غشای PVDF: ۱- غشای غوطه ور در بافر بعد از رنگبری ۲- غشای غوطه ور در پروتئین بعد از رنگبری



شکل ۸) تکثیر توالی گزینش شده با استفاده از PCR: ۱- نشانگر DNA ۲- آبتامر گزینش شده با طول ۷۲ نوکلئوتید ۳- کنترل منفی



شکل ۹) محصولات PCR نامتقارن روی ژل آگارز ۲٪: ۱- کتابخانه الیگونوکلئوتیدی تک رشته ای با طول ۷۲ نوکلئوتید ۲- نمونه منفی ۳- محصول PCR نامتقارن ۴- نشانگر DNA

تعیین میل ترکیبی آبتامر DNA تک رشته ای نسبت به HBsAg:
اطلاعات مربوط به اختلاف جذب فلورسنت قبل و بعد از انکوباسیون آبتامر با HBsAg تعیین شد (جدول ۳) و میل ترکیبی محاسبه شده ۸۱/۵۳ نانومولار بود (شکل ۵).
همسانه سازی و توالی یابی و تعیین ساختار ثانویه آبتامر

همچنین در این مطالعه میزان تمایل آپتامر گزینش‌شده علیه HBsAg به صورت کمی محاسبه شد، در حالی که در دو مطالعه ذکرشده در بالا محاسبات کمی برای قدرت اتصال آپتامر گزینش‌شده علیه HBsAg انجام نشده است. در مطالعه‌ای که توسط لیو و همکاران به منظور 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 ۸۰ باز انتخاب شد و در نهایت K_d محاسبه‌شده در این روش برابر با ۱۴/۰ نانومولار بود^[14]. در این تحقیق نیز با استفاده از روش تک‌مرحله‌ای وابسته به DNase I توالی با میل ترکیبی بالا از کتابخانه با طول ۷۲ باز گزینش شد. در این روش میل ترکیبی با استفاده از فلوریمتری اندازه‌گیری و مقدار ۸۱/۵۳ نانومولار 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 DNAی 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 به صورت ۱۸۰ نانومولار گزارش شده است^[20] که نشان‌دهنده قدرت اتصال نسبتاً بالای آپتامر گزارش‌شده در این مطالعه (۸۱/۵۳ نانومولار) در مقایسه با مطالعات دیگر انجام‌شده در این زمینه است.

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

نتیجه‌گیری

آپتامر DNAی 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.

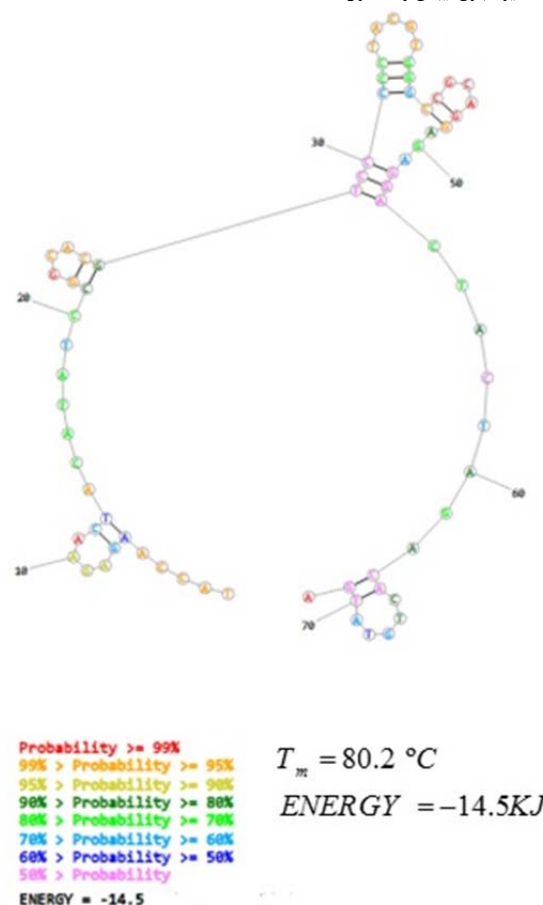
تاییدیه اخلاقی: این پژوهش نیاز به تاییدیه اخلاقی ندارد.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ تعارض منافی 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 رعنائی‌سیادت (نویسنده چهارم)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی (۲۰٪)؛ محمد پوری‌عقوبی (نویسنده پنجم)، پژوهشگر کمکی (۱۰٪) **منابع مالی:** مودی 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.



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

بحث

پژوهش حاضر با هدف شناسایی آپتامر DNAی 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 الیگونوکلوئیدی 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 DNAی 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.

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