Pejouhesh dar Pezeshki *(i.e., Research in Medicine)* *Original Article*

The Quarterly Journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences 2024; Vol. 48; No. 3

Construction of a Chemically- Conjugated DNA Aptamer- Protein Hybrid Molecule to Develop the Enzyme- Linked Apta- Sorbent Assay

Mahshid Bahari[1], Ali Kargar Kheirabad[2*], Farshid Yeganeh[1*]

1. Department of Immunology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
2. Research Center for Clinical Virology, Tehran University of Medical Science, Tehran, Iran.

Received: June 18, 2024; Accepted: November 06, 2024

Abstract

Background and Aim: Aptamers are single-stranded nucleic acid molecules, either DNA or RNA, selected for their high affinity and specificity to target molecules and advantages over antibodies. The current study aimed to establish a robust protocol for the chemical conjugation of an aptamer to horseradish peroxidase (HRP) enzyme using the heterobifunctional crosslinker sulfo- succinimidyl 4-[N-maleimidomethyl] cyclohexane-1-carboxylate (sulfo- SMCC) to facilitate the development of aptamers in diagnostic methods. This method was used for aptamer conjugation for the first time.

Methods: The current study was performed in two steps: 1- Design and construction through an exploratory method and 2- Experimental investigation. This experimental study involved the activation of HRP with the sulfo- SMCC crosslinker. Post-activation, HRP was purified by size exclusion chromatography. The activated HRP was subsequently crosslinked with a thiolated aptamer via maleimide- thiol chemistry. The resulting HRP- aptamer conjugate was further purified using Amicon filters. A direct enzyme- linked aptasorbent assay (ELASA) was then performed to validate the conjugation efficiency and functionality of the aptamer- HRP complex. Statistical analyses were conducted using GraphPad Prism 10 software, applying ANOVA to assess significance.

Results: The research demonstrated that it is possible to make a protein- aptamer hybrid molecule using conjugation. During the conjugation process, the HRP enzyme was covalently linked to the NHS- ester end of the sulfo- SMCC linker through its amino group, resulting in stable amide bond formation. The thiolated aptamer was then conjugated to the linker via thioether linkage. To evaluate the efficacy of the conjugation, a direct ELASA assay was performed using varying concentrations of the HRP-aptamer conjugate (1, 2 and 5 µM) and each concentration was tested in duplicate. The data showed that different concentrations of the conjugated aptamer significantly affected the aptamer's performance. The average optical density (OD) for the positive control samples were 0.5, 1, 1.6, corresponding to increasing concentrations of the conjugate, while negative controls consistently showed an OD of 0.04. The statistical analysis confirmed that the differences in OD between positive and negative controls were significant ($P < 0.05$), demonstrating successful conjugation without losing aptamer functionality.

Conclusion: The findings of this investigation demonstrated that, initially, it is possible to generate a protein hybrid molecule, and that, secondly, its use is likely to be advantageous and it seems that conjugation of aptamer is possible without negatively affecting the performance of the aptamer.

Keywords: Aptamer; conjugation; crosslinkers; Enzyme- linked immunosorbent assay (ELISA); Enzyme- linked apta-sorbent assay (ELASA)

Please cite this article as: Bahari M, Kargar Kheirabad A, Yeganeh F. Construction of a Chemically- Conjugated DNA Aptamer- Protein Hybrid Molecule to Develop the Enzyme- Linked Apta- Sorbent Assay. Pejouhesh dar Pezeshki. 2024;48(3):9-20.

* **First Corresponding Author:** Farshid Yeganeh; **Email:** fyeganeh@sbmu.ac.ir
Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

* **Second Corresponding Author:** Ali Kargar Kheirabad; Email: kargarapgv@gmail.com
Research Center for Clinical Virology, Tehran University of Medical Science, Tehran, Iran.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-03-19]

پژوهش در پزشکی
مقاله پژوهشی
فصلنامه علمی-پژوهشی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی شهید بهشتی
دوره ۴۸، شماره ۳، سال ۱۴۰۳ شمسی، صفحات ۹ تا ۲۰

ساخت مولکول هیبریدی پروتئین- آپتامر با استفاده از کونژوگاسیون مستقیم برای استفاده در روش الازای مبتنی بر آپتامر

مهشید بهاری[۱]، علی کارگر خیرآباد[۲*]، فرشید یگانه[۱*]

۱- گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
۲- مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی بالینی دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۳/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۸/۱۶

چکیده

سابقه و هدف: آپتامرها مولکول‌های Deoxyribonucleic acid (DNA) یا Ribonucleic acid (RNA) تک‌رشته‌ای هستند که به دلیل دارا بودن میل پیوندی و اختصاصیت بالا برای مولکول‌های هدف و برتری‌هایی نسبت به آنتی‌بادی‌ها مورد توجه قرار گرفته‌اند و به‌عنوان جایگزین‌هایی برای آنتی‌بادی‌ها در روش‌های تشخیصی مختلف از جمله الازا مطرح شده‌اند. هدف از مطالعه حاضر، ارائه روشی برای کونژوگاسیون شیمیایی آپتامر به آنزیم horseradish peroxidase (HRP) با استفاده از لینکر succinimidyl 4-[N-maleimidomethyl] cyclohexane-1- carboxylate- sulfo (sulfo- SMCC) بود که توسعه آپتامرها در روش‌های تشخیصی را تسهیل کند. استفاده از این روش برای کونژوگاسیون آپتامر برای نخستین بار انجام شده است.

روش کار: مطالعه حاظر در دو قسمت انجام شده است: ۱- طراحی و ساخت به روش اکتشافی و ۲- بررسی تجربی آن. ابتدا، آنزیم HRP به لینکر sulfo- SMCC متصل و سپس با ستون کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون خالص‌سازی شد. در ادامه HRP فعال شده با آپتامر تیوله، مجاور و کونژوگاسیون از طریق واکنش شیمیایی مالئیمید- تیول انجام و کونژوگه آپتامر -HRP با استفاده از فیلتر آمیکون تخلیص شد. برای تأیید کونژوگاسیون آپتامر به HRP، عملکرد کونژوگه حاصل با استفاده از تست الازا مستقیم سنجیده شد و بررسی‌های آماری از طریق نرم‌افزار Graphpad prism ۱۰ و تست آماری ANOVA انجام شد.

یافته‌ها: این تحقیق نشان داد که ساخت مولکول هیبریدی پروتئین- آپتامر با استفاده از کونژوگاسیون مقدوراست. ساخت مولکول هیبریدی پروتئین در فرایند کونژوگاسیون، آنزیم HRP از طریق گروه آمینی خود به انتهای NHS- ester لینکر sulfo- SMCC متصل و پیوندهای آمیدی پایدار تشکیل شد. آپتامر تیوله با پیوند تیواتری به لینکر متصل شد. در فرآیند ارزیابی کونژوگاسیون از تست الازای مستقیم با غلظت‌های مختلف (۱، ۲ و ۵ میکرومولار) آپتامر کونژوگه استفاده شد و در هر غلظت، نمونه‌ها به صورت دوپلیکیت آزمایش شد. داده‌ها نشان دادند که غلظت‌های مختلف آپتامر کونژوگه تأثیر معناداری روی عملکرد آپتامر داشته‌اند. میانگین جذب نوری در غلظت‌های مختلف ۱، ۲ و ۵ میکرومولار در نمونه‌های مثبت به ترتیب ۰/۵، ۱ و ۱/۶ بود، در حالی که در نمونه‌های منفی میانگین جذب نوری ۰/۰۴ بود که نشان‌دهنده تفاوت معنادار آماری ($P < ۰/۰۵$) بین گروه‌ها و کونژوگاسیون موفق آپتامر بدون تأثیر بر عملکرد آن است.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که اولا ساخت مولکول هیبریدی پروتئین مقدور است، ثانیاً استفاده از آن احتمالاً مفید خواهد بود و به نظر می‌رسد که کونژوگاسیون آپتامر به HRP از طریق لینکر sulfo- SMCC بدون تأثیر منفی بر عملکرد آپتامر امکان‌پذیر است.

واژگان کلیدی: آپتامر؛ کونژوگاسیون؛ لینکر؛ سنجش ایمنی مرتبط با آنزیم (الایزا)؛ سنجش ایمنی مبتنی بر آپتامر مرتبط با آنزیم (الازا)

به این مقاله، به صورت زیر استناد کنید:

Bahari M, Kargar Kheirabad A, Yeganeh F. Construction of a Chemically- Conjugated DNA Aptamer- Protein Hybrid Molecule to Develop the Enzyme- Linked Apta- Sorbent Assay. Pejouhesh dar Pezeshki. 2024;48(3):9-20.

[*] **اولین نویسنده مسئول مکاتبات:** فرشید یگانه؛ **آدرس پست الکترونیکی:** fyeganeh@sbmu.ac.ir
گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

[*] **دومین نویسنده مسئول مکاتبات:** علی کارگرخیرآباد؛ **آدرس پست الکترونیکی:** kargarapgv@gmail.com
مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی بالینی دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-03-19]

CC BY NC

مقدمه

آپتامرها توالی‌های کوتاه و تک‌رشته‌ای DNA یا RNA هستند که به‌صورت سنتتیک تولید می‌شوند و میل پیوندی بالایی برای اتصال به مولکول‌های هدف دارند (۱، ۲). این ویژگی آپتامرها سبب استفاده گسترده آنها در اتصال بهتر داروها به مولکول‌های هدف و همچنین در سیستم‌های تشخیص آزمایشگاهی مانند ELISA شده است. با جایگزینی آپتامر به جای آنتی‌بادی در این روش، تکنیک ELASA (ELISA مبتنی بر آپتامر) توسعه یافته است که مشابه ELISA، به‌صورت ساندویچ، مستقیم یا غیرمستقیم قابل استفاده است (۳).

برای بهره‌گیری از ELASA ساندویچ، نیاز به یک جفت آپتامر است که باید با آنزیم کونژوگه شود (۴، ۵). فرآیند کونژوگاسیون شامل ایجاد گروه‌های فعال روی ماکرومولکول‌ها و اتصال این گروه‌ها به لینکرهای شیمیایی است (۶). لینکرها که حاوی دو یا چند گروه واکنش‌گر هستند، می‌توانند به گروه‌های فعال روی مولکول‌های هدف متصل شوند و به عنوان عوامل کلیدی در موفقیت فرآیند کونژوگاسیون عمل می‌کنند (۷، ۸). لینکرها بر اساس عملکرد گروه‌های واکنش‌گر در هر دو انتهای خود به لینکرهای hetero bifunctional و homo bifunctional دسته‌بندی می‌شوند (۷).

کونژوگاسیون اغلب به‌عنوان فرآیند اتصال بیومولکول‌ها به آنزیم‌ها، فلوروفورها یا سایر مولکول‌ها شناخته می‌شود (۹). این روش‌ها به دو دسته شیمیایی و فیزیکی تقسیم می‌شوند که در روش‌های شیمیایی، پیوندهای کووالانسی بین گروه‌های فعال مولکول‌ها و لینکرهای bifunctional مانند N-hydroxy succinimide (NHS) و sulfo- SMCC تشکیل می‌شود (۱۰). در مقابل، روش‌های فیزیکی از طریق تعاملات غیرکووالانسی نظیر تعاملات الکترواستاتیک یا آب‌گریز انجام می‌شوند (۱۱). کونژوگاسیون‌ها بر اساس اختصاصیت به دو دسته تصادفی و Site- specific تقسیم می‌شوند که در نوع تصادفی، اتصال لینکر به جایگاه‌های مختلف مولکول انجام می‌گیرد و در Site- specific، اتصال در جایگاه‌های خاصی انجام می‌شود (۱۲، ۱۳).

در فرآیند کونژوگاسیون آنزیم‌ها با ماکرومولکول‌ها، هدف ایجاد یک پیوند کووالانسی پایدار بین ماکرومولکول و آنزیم‌هایی مانند HRP، اوره‌آز یا آلکالین فسفاتاز است (۱۴). آنزیم‌ها رزیدوهایی با اسیدهای آمینه مختلف دارند که با گروه‌های فعال نظیر کربوکسیلات، تیواتر، ایمیدازول، سولفیدریل و آمین وارد واکنش می‌شوند (۱۵). لینکرهای hetero bifunctional با گروه‌های آمین و سولفیدریل، پرکاربردترین لینکرها برای کونژوگاسیون آنزیم و آپتامر هستند. Sulfo- SMCC از رایج‌ترین این لینکرهاست که در روش‌های کونژوگاسیون چند مرحله‌ای استفاده می‌شود، به‌طوری‌که ابتدا با گروه‌های آمینی واکنش داده و سپس با گروه سولفیدریل واکنش نهایی انجام می‌شود (۱۶-۱۸).

در اکثر مطالعه‌های پیشین ELASA، آپتامر بیوتینه و HRP استرپتاویدین‌دار به عنوان پروب تشخیصی استفاده شده است (۱۹). اما این مطالعه برای نخستین بار روش کونژوگاسیون مستقیم آپتامر تیوله با HRP با استفاده از sulfo- SMCC را معرفی کرده است. این روش می‌تواند زمان و مراحل تست را کاهش داده و توسعه آپتامرها در روش‌های تشخیصی را تسهیل کند. در این مطالعه آپتامر تک رشته‌ای اختصاصی cTnI (Tro6) از مطالعهٔ Changil Ban انتخاب شد (۲۰). نتایج نشان داد که آپتامر کونژوگه‌شده با این روش می‌تواند به‌عنوان پروب تشخیصی در ELASA استفاده شود.

روش کار

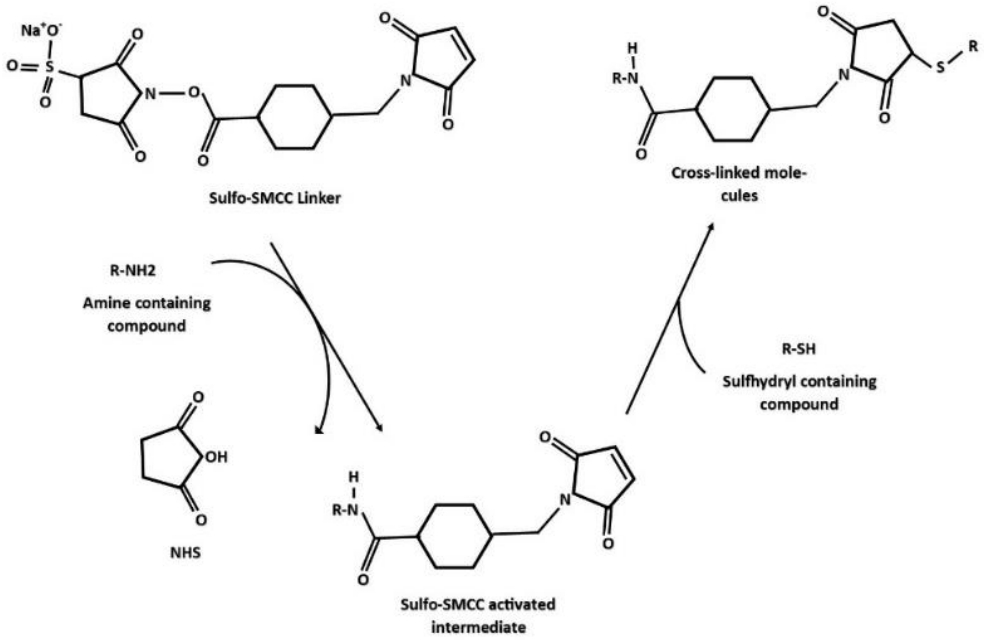
مطالعه حاظر در دو قسمت انجام شده است: ۱- طراحی و ساخت به روش اکتشافی و ۲- بررسی تجربی آن و براساس کد اخلاق IR.SBMU.MSP.REC.1401.483 دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام و در طی انجام تحقیق، اصول اخلاقی پژوهش رعایت شد.

I) فعال‌سازی آنزیم HRP با استفاده از لینکر sulfo- SMCC

اتصال لینکر به آنزیم تحت عنوان فعال‌سازی آنزیم شناخته می‌شود. به این منظور، ابتدا، ۱۰ میلی‌گرم آنزیم پراکسیداز ترب کوهی (HRP) (سیگما، آلمان)، در یک میلی‌لیتر بافر فسفات

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-03-19]

سدیم (Merk، آمریکا) M ۰/۱ و نمک سدیم کلرید (Merk، آمریکا) M ۰/۱۵ با pH ۷/۲ حل شد. این شرایط بافری برای حفظ فعالیت آنزیم ضروری است. سپس، دو میلی‌گرم از لینکر sulfo- SMCC ابتدا در ۲۰۰ میکرولیتر آب حل شده و به غلظت mg/ml ۱۰ رسید، سپس ۵۰ میکرولیتر از آن به محلول حاوی آنزیم اضافه شد و به مدت یک ساعت در دمای اتاق به آرامی مخلوط شد تا حل شود (شکل ۱).



شکل ۱- نمای کلی فرآیند کونژوگاسیون.

لینکر Sulfo- SMCC با مولکول‌های حاوی آمین واکنش می‌دهد (که در این مطالعه HRP است) و اتصالات آمیدی ایجاد می‌کند. سپس انتهای مالئیمید آن با یک ترکیب حاوی سولفیدریل (آپتامر تیوله) ادغام می‌شود و اتصال تیواتر ایجاد می‌شود.

لینکر sulfo- SMCC به رطوبت حساس است؛ بنابراین باید ویال معرف در ماده خشک کن نگه‌داری شود و قبل از استفاده باید به دمای محیط برسد تا از تراکم رطوبت در داخل ظرف جلوگیری شود. برای انحلال اولیه Sulfo- SMCC نباید از بافر فسفات (PBS) استفاده شود زیرا لینکر به خوبی در بافرهای با بیش از ۵۰ میلی مولار نمک حل نمی‌شود. با این حال، پس از حل شدن، محلول را می‌توان بیشتر در PBS یا محلول‌های دیگر رقیق کرد.

II) تخلیص آنزیم فعال شده با استفاده از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون

آنزیم HRP فعال‌شده با استفاده از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون خالص‌سازی شد. به این منظور، پودر Sephadex G-25 (سیگما، آلمان) بر اساس دستورالعمل شرکت به مدت ۲۴ ساعت در محلول PBS در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا متورم شود. سپس، ژل به دست آمده در یک ستون به طول ۴۰ سانتی‌متر و سطح مقطع ۵ سانتی‌متر فشرده شد. به طوری‌که ارتفاع بستر Sephadex ۷۰ درصد از کل حجم ستون را شامل می‌شد. یک میلی‌لیتر آنزیم HRP فعال‌شده با لینکر به ستون اضافه شد و فرآیند خالص‌سازی با استفاده از جریان بافر فسفات سدیم ۰/۱ مولار و NaCl (Merk، آمریکا) ۰/۱۵ مولار با pH= ۷/۲ انجام شد تا زمانی که فرکشن‌های حاوی آنزیم جمع‌آوری شود. فرکشن‌ها به حجم یک میلی‌لیتر جمع‌آوری شد (۲۱).

III) کونژوگاسیون آنزیم HRP با آپتامر

مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از HRP فعال شده با ۱۰۰ میکرولیتر

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-03-19]

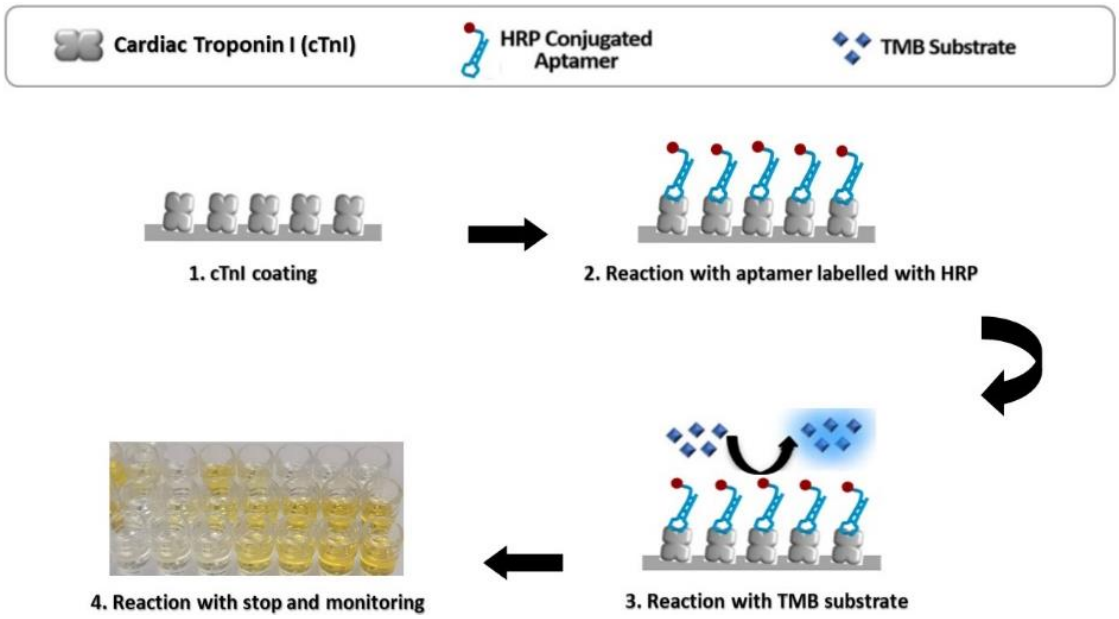
آپتامر Tro6 متصل به تیول (متابیون، آلمان) با طول ۴۰ نوکلئوتید با توالی 5'-thiol-C6-CGCATGCCAAACGTTGCCTCATAGTTCCCTCCCCGTGTCC (۱۰۰ میکرومولار) به صورت over night در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. به این ترتیب، گروه مالئیمید لینکر sulfo- SMCC به گروه تیول در انتهای '۵ آپتامر کراس‌لینک شد (شکل ۱).

IIII) تخلیص آپتامر کونژوگه

فرآیند تخلیص و تغلیظ آپتامر کونژوگه با استفاده از فیلتر آمیکون ۳۰ کیلودالتونی (Jet Biofil، چین) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور g × ۳۰۰۰ انجام شد. پس از سانتریفوژ، ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات برای مرحله شست‌وشو استفاده شد و سانتریفوژ تکرار شد. هنگامی که مرحله شست‌وشو کامل شد، آپتامر- HRP کونژوگه از فیلتر جمع‌آوری شد.

IV) ارزیابی کونژوگاسیون آپتامر با استفاده از روش ELASA مستقیم

برای تأیید کونژوگاسیون آپتامر با آنزیم، آزمون ELASA مستقیم برای تشخیص cTnI طراحی و از این آپتامر کونژوگه با HRP به عنوان پروب تشخیصی استفاده شد. فرآیند انجام تست به این صورت بود که ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر cTnI (وایداس، فرانسه) با غلظت ۳۸۰ نانوگرم بر لیتر در چاهک‌های میکروپلیت (ارغوان طب کاویان، ایران) کوت شد. چاهک‌های کوت شده پنج بار با PBS- Tween (Merk، آمریکا) ۰/۰۵ شست‌وشو داده شد و سپس به مدت یک ساعت در دمای اتاق با BSA (Merk، آمریکا) یک‌درصد مسدود شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر آپتامر کونژوگه با HRP با غلظت‌های مختلف (۱، ۲، ۵میکرومولار) به چاهک‌ها اضافه شد و به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه شد (در برخی از چاهک‌های کوت شده با cTnI، بافر بدون آپتامر به عنوان کنترل منفی همراه با نمونه سرم فاقدcTnI استفاده شد). سپس چاهک‌ها سه بار با PBS- Tween یک‌درصد شست‌وشو داده شد، ۱۰۰ میکرولیتر ماده رنگزا TMB (مونوبایند، آمریکا) اضافه شد و پس از ۲۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق و تاریکی، محلول توقف H2SO4 (مونوبایند، آمریکا) اضافه شد و میزان جذب نوری در ۴۵۰ و ۶۳۰ نانومتر خوانش شد (شکل ۲).



شکل ۲- نمای کلی روش ELASA مستقیم.

(۱) آنتی‌ژن cTnI در یک پلیت ELISA با محلول کربنات- بیکربنات کوت شد. (۲) آپتامر که با آنزیم HRP کونژوگه شده بود، به چاهک‌ها اضافه شد. (۳) پس از اضافه کردن TMB و انکوباسیون در تاریکی، (۴) محلول توقف اضافه شد و در ۴۵۰ و ۶۳۰ نانومتر میزان جذب نوری خوانش شد.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-03-19]

روش‌های آماری

در این مطالعه نمونه سرم‌های منفی (فاقد cTnI) و مثبت (دارای cTnI) برای هر غلظت آپتامر به صورت دوپلیکیت با روش الازا مستقیم ارزیابی شد. با استفاده از نرم‌افزار Graphpad prism ۱۰ (GraphPad Software, Inc) رسم نمودار انجام و با استفاده از تست آماری ANOVA آنالیز شد و P-value < ۰/۰۵ به عنوان تفاوت معنادار درنظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از روش ELASA مستقیم نشان داد که فرآیند کونژوگاسیون شیمیایی آپتامر با آنزیم HRP از طریق تشکیل پیوندهای پایدار بین آنزیم HRP، لینکر sulfo- SMCC و آپتامر تیوله انجام شده است و کونژوگه آپتامر- آنزیم عملکرد خود را حفظ کرده است. در ادامه، نتایج حاصل از مراحل مختلف این مطالعه به تفکیک آورده شده است:

I) فعال‌سازی با استفاده از لینکر Sulfo- SMCC و تخلیص آنزیم HRP

در فرآیند فعال‌سازی آنزیم HRP با استفاده از لینکر sulfo- SMCC، گروه آمینی آنزیم HRP به انتهای NHS- ester لینکر sulfo- SMCC متصل و پیوندهای آمیدی پایدار تشکیل شد. باتوجه به اینکه سرعت تجزیه NHS- ester در محلول‌های آبی با افزایش pH افزایش می‌یافت، کونژوگاسیون با لینکر sulfo- SMCC در pH ۷/۲-۷/۵ انجام شد. اگرچه گروه maleimide پایدارتر از گروه NHS- ester است، اما در مقادیر pH > ۷/۵ به آرامی هیدرولیز شده و ویژگی خود برای واکنش با گروه سولفیدریل را از دست می‌داد.

در فرآیند فعال‌سازی آنزیم با لینکر با توجه به غلظتی از آنزیم که استفاده می‌شود، لینکر با نسبت‌های مختلفی استفاده می‌شود و در این مطالعه با توجه به اینکه آنزیم با غلظت ۱۰ mg/ml استفاده شد، لینکر Sulfo- SMCC به میزان ۵ مولار بیشتر از آنزیم استفاده شد تا احتمال اتصال آن به آنزیم افزایش یابد (برای محاسبه مقدار لینکر اضافه، مقدار آنزیم مورد استفاده بر وزن مولکولی آن تقسیم شد تا مولاریته آنزیم به دست آید، همچنین مولاریته لینکر نیز با این روش محاسبه و مولاریته لینکر بر مولاریته آنزیم تقسیم شد و عدد حاصل برابر با ۵ بود).

در فرآیند تخلیص آنزیم فعال شده با لینکر، رنگ ذاتی آنزیم HRP یک مزیت بصری ایجاد می‌کند که امکان ردیابی آن را از طریق ستون کروماتوگرافی فراهم می‌کند. همان‌طور که آنزیم به سمت انتهای ستون پیش رفت، فرکشن‌ها با دقت جمع‌آوری شدند. در این مرحله هدف از فرآیند تخلیص، جداسازی آنزیم متصل به لینکر و حذف لینکرهای آزاد بود تا در ادامه فرآیند تداخلی ایجاد نکند. توجه به این نکته ضروری است که برای تخلیص آنزیم فعال شده نباید از روش دیالیز استفاده کرد که سبب از دست رفتن عملکرد مالئیمید و تداخل در ادامه فرآیند کونژوگاسیون می‌شود.

II) اتصال آنزیم فعال شده به توالی آپتامر تیوله

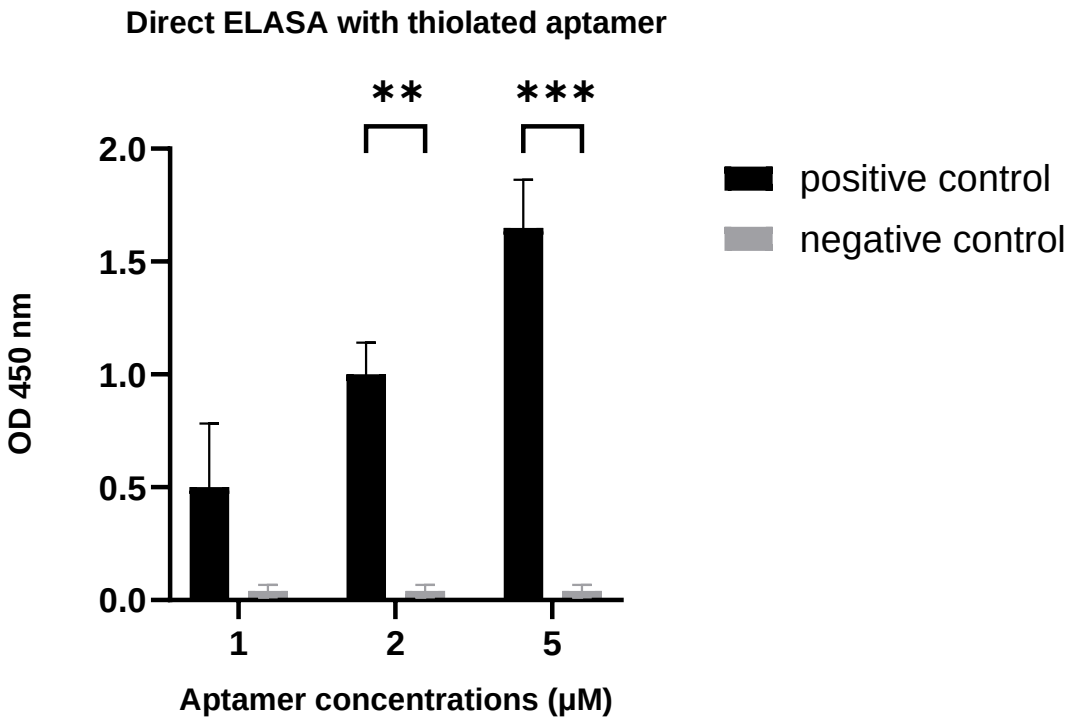
آنزیم فعال شده با لینکر با آپتامر مجاور شد و اتصال آپتامر به آنزیم با تشکیل پیوند تیواتری پایدار شد. سپس آپتامر کونژوگه تخلیص شد. در مرحله تخلیص آپتامر کونژوگه با آنزیم با استفاده از فیلتر آمیکون باتوجه به اینکه وزن مولکولی HRP و آپتامر به ترتیب ۵۵ و ۱۲/۵ کیلودالتون است، استفاده از فیلتر آمیکون ۳۰ کیلودالتونی سبب خروج آپتامر کونژوگه نشده از طریق منافذ غشاء شد و آپتامر کونژوگه و آنزیم کونژوگه نشده درون فیلتر باقی ماند. آنزیم کونژوگه نشده از طریق شست‌وشوها در فرآیند ELISA حذف شد و به این ترتیب تست الازا بدون ایجاد تداخل انجام شد.

در فرآیند کونژوگاسیون آنتی‌بادی و آنزیم HRP برای تخلیص آنتی بادی کونژوگه می‌توان از روش‌هایی مثل کروماتوگرافی میل پیوندی نیز استفاده کرد که آنتی‌بادی کونژوگه به پروتئین G موجود در ستون کروماتوگرافی متصل و جداسازی می‌شود و آنزیم اتصال نیافته حذف می‌شود اما در کونژوگاسیون آپتامر با آنزیم با توجه به ماهیت آپتامر امکان استفاده از این روش وجود ندارد و استفاده از فیلتر آمیکون برای تخلیص و تغلیظ آپتامر کونژوگه روش منطقی‌تری است.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-03-19]

III) تأیید فرآیند کونژوگاسیون

در این مطالعه، تأیید کونژوگاسیون از طریق ارزیابی عملکرد کونژوگه حاصل انجام شد؛ به‌طوری‌که برای تأیید کونژوگاسیون آپتامر با HRP و بررسی عملکرد آپتامر از روش ELASA مستقیم استفاده شد و در نهایت، نتایج تست ELASA (نمودار ۱) تاییدی بود بر اینکه کونژوگاسیون آپتامر با آنزیم HRP با موفقیت انجام شده و آپتامر توانایی اتصال به آنتی‌ژن cTnI و ایجاد سیگنال قابل تشخیص را دارد. در این تست از آپتامر کونژوگه با غلظت‌های مختلف ۲، ۱ و ۵ میکرومولار استفاده شد (این غلظت‌ها براساس مقاله‌هایی که در زمینه الازا مستقیم انجام شده بود، تنظیم شد) و مشاهده شد در هر سه غلظت، آپتامر کونژوگه با آنزیم HRP در نمونه سرم مثبت به آنتی‌ژن cTnI متصل شده و میزان جذب نوری آنها در مقایسه با نمونه سرم منفی بیشتر بود؛ به طوری‌که میانگین جذب نوری در سرم مثبت به ترتیب ۰/۵، ۱، ۱/۶ و در سرم منفی ۰/۰۴ بود. به این ترتیب در غلظت ۲ و ۵ میکرومولار، اختلاف در میزان جذب نوری نمونه سرم‌های مثبت و منفی معنادار بود (P-value < ۰/۰۵) و غلظت ۵ میکرومولار به عنوان غلظت اپتیمم آپتامر در تست الازای مستقیم درنظر گرفته شد. بنابراین نتایج آزمون الازا نشان داد که آپتامر توانایی خود در اتصال به آنتی ژن هدف را طی فرآیند کونژوگاسیون و تخلیص حفظ کرده است و این روش کونژوگاسیون می‌تواند برای ایجاد پروب‌های تشخیصی در روش ELASA بهینه شود.



نمودار ۱- آزمایش ELASA مستقیم مبتنی بر آپتامر.

برای تأیید کونژوگاسیون آپتامر با آنزیم، یک آزمون ELASA مستقیم برای تشخیص cTnI انجام شد و این آپتامر با اتصال به HRP به عنوان پروب تشخیصی استفاده شد و نتایج نشان داد که فرآیند کونژوگاسیون به درستی انجام شده و با عملکرد آپتامر در تشخیص آنتی‌ژن تداخلی ندارد (نمونه‌ها به صورت دوپلیکیت تکرار شد. سپس نمودار با استفاده از نرم‌افزار Graphpad prism ۱۰ رسم و با استفاده از تست آماری ANOVA آنالیز شد).

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-03-19]

جدول ۱- لینکرهای hetero bifunctional و homo bifunctional

گروه‌های واکنشگر	گروه‌های فعال هدف	لینکرهای Bifunctional	لینکرهای Bifunctional (اختصار)
لینکرهای Hetero bifunctional			
NHS- Maleimide	Amine-to-sulfhydryl	Succinimidyl 4-(N maleimidomethyl) cyclo hexane-1-carboxylate	SMCC
		Sulfo-succinimidyl 4-(N maleimidomethyl) cyclo hexane-1 carboxylate	Sulfo- SMCC
NHS- Pyridyl disulfide		N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionate	SPDP
		Succinimidyl 6-(3'-(2-pyridyldithio)-propionamido) hexanoate	LC- SPDP
Hydrazide- Maleimide	Carbonyl-to-Sulfhydryl	4-(4- N-maleimidophenyl) butyric acid hydrazide	MPBH
Hydrazide- Pyridyl disulfide		3-(2-pyridyldithio) propionyl hydrazide	PDPH
لینکرهای Homo bifunctional			
NHS ester	Amine-to-Amine	Bis (sulfosuccinimidyl) suberate	BS3
		Ethylene glycol bis (succinimidylsuccinat)	EGS
		Disuccinimidyl suberate	DSS
Maleimide	Sulfhydryl-to-Sulfhydryl	Bis-maleimidohexane	BMH
Pyridyl disulfide		1,4-di-[3'-(2'-pyridyldithio) propionamido] butane	DPDPB

معمولاً انواع مختلفی از لینکرهای bifunctional برای کونژوگاسیون مولکول‌های مختلف استفاده می‌شود و فقط برخی از لینکرهایbifunctional متداول در این جدول نشان داده شده است. توجه شود که یک تا چند نوع گروه‌های واکنش‌گر موجود هستند که به گروه‌های فعال هدف متصل می‌شوند و برای سنتز لینکرها استفاده شده‌اند.

استفاده از این روش کونژوگاسیون برای اتصال آپتامر به آنزیم HRP در مقایسه با اتصال آنتی‌بادی به آنزیم HRP در تعدادی از مراحل متفاوت است که به دلیل ماهیت متفاوت آپتامر و آنتی‌بادی است. ازجمله تفاوت‌هایی که در فرآیند کونژوگاسیون این دو ماکرومولکول وجود دارد می‌توان به تفاوت در روش تخلیص محصول نهایی کونژوگه و نسبت متفاوت آنزیم/ آپتامر یا آنزیم/ آنتی‌بادی برای کونژوگاسیون مؤثر آنها اشاره کرد.

بحث

این تحقیق نشان داد که اولاً طراحی و ساخت مولکول هیبریدی پروتئین مقدور است و ثانیاً استفاده از این مدل می‌تواند استفاده شود، در این مطالعه، با هدف توسعه یک روش ساده شیمیایی برای کونژوگاسیون آپتامر، ابتدا آنزیم HRP با استفاده از لینکر Sulfo- SMCC فعال‌سازی و پس از تخلیص، به توالی آپتامر تیوله متصل شد که سبب تشکیل پیوند تیواتری پایدار شد. سپس، آپتامر کونژوگه تخلیص و از آنزیم‌های کونژوگه نشده جدا شد. فرآیند کونژوگاسیون و عملکرد آپتامر کونژوگه با HRP از طریق روش ELASA مستقیم تأیید شد و نتایج نشان داد که آپتامر کونژوگه توانایی اتصال به آنتی‌ژن cTnI را حفظ کرده و می‌تواند به عنوان پروب تشخیصی در ELASA بهینه شود.

انواعی از روش‌های کونژوگاسیون وجود دارد که شامل روش‌های شیمیایی، فیزیکی، تصادفی و site specific است که بسته به هدف مورد نظر، روش مناسب و همچنین لینکرهای متنوع homo bifunctional یا hetero bifunctional انتخاب می‌شود (۱۰، ۱۲، ۱۳) (لیستی از انواع لینکرها در جدول ۱ نمایش داده شده است). در این مطالعه از روش کونژوگاسیون شیمیایی استفاده شد که بتواند اتصالات قوی و پایداری بین آنزیم و آپتامر

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-03-19]

ایجاد کند و منجر به کاهش تداخلات شود (۲۲). همچنین در این روش از لینکر Sulfo- SMCC برای کونژوگاسیون آپتامر و آنزیم استفاده شد که به دلیل پایداری بالای پیوند تیول- مالئمید، حفظ فعالیت بیولوژیکی آپتامر و آنزیم پس از کونژوگاسیون، سهولت در استفاده و انحلال‌پذیری در آب نسبت به سایر لینکرها (ازجمله SMCC) مزیت داشت و به‌طور گسترده‌ای در مطالعه‌های مختلف برای سایر مولکول‌ها به ویژه آنتی‌بادی‌ها استفاده شده بود که ازجمله این مطالعه‌ها می‌توان به کونژوگاسیون آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال و پروتئین R-Phycoerythrin برای استفاده در روش‌های فلوروسنت، کونژوگاسیون آنتی‌بادی و آنزیم β-Galactosidase به عنوان پروب تشخیصی در الایزا، کونژوگاسیون آنتی‌بادی درمانی anti- TNFα و پپتیدهای collagen- hybridizing برای حفظ سرکوب ایمنی موضعی در آرتریت روماتوئید با استفاده از لینکر Sulfo- SMCC اشاره کرد (۲۵-۲۳).

مطالعه‌های گذشته اغلب از آپتامرهای بیوتینه و HRP استرپتاویدین‌دار برای ایجاد پروب‌های تشخیصی استفاده کرده‌اند (۲۶). این روش، مرحله اضافی بیوتینه کردن آپتامر و اتصال استرپتاویدین- HRP را شامل می‌شود که ممکن است به زمان بیشتری نیاز داشته باشد و احتمال از دست رفتن فعالیت آپتامر نیز وجود دارد. بر خلاف این روش، پروتکل معرفی شده در مطالعه حاضر کونژوگاسیون مستقیم آپتامر به آنزیم را تسهیل می‌کند و می‌تواند مراحل و زمان انجام تست را کاهش دهد. همچنین، در برخی دیگر از مطالعه‌ها از لینکرهای NHS (N-hydroxysuccinimide) و DC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide) برای کونژوگاسیون آپتامرها استفاده شده است. این روش‌ها معمولاً با تشکیل پیوندهای کووالانسی بین گروه‌های کربوکسیل و آمین در آپتامر و آنزیم انجام می‌شود. اگرچه این روش‌ها نیز مؤثر هستند، اما اغلب منجر به کونژوگاسیون تصادفی می‌شوند، که می‌تواند بر میل اتصال آپتامر و فعالیت آنزیم تأثیر بگذارد (۲۷). همچنین، واکنش اولیه بسیار وابسته به pH است و ممکن است منجر به هیدرولیز استرهای میانی شود که بازده و پایداری را کاهش می‌دهد (۲۸). استفاده از sulfo- SMCC به دلیل داشتن دو گروه واکنش‌گر مختلف NHS ester و maleimide که به آمین و تیول متصل می‌شوند، اختصاصیت بالاتری را فراهم می‌کند و احتمال واکنش‌های ناخواسته را کاهش می‌دهد (۲۸). استفاده از لینکر گلوتارآلدئید نیز در پژوهش‌های پیشین گزارش شده است. این اتصال‌دهنده از طریق تشکیل باز شیف بین گروه‌های آلدهیدی گلوتارآلدئید و گروه‌های آمین روی پروتئین‌ها و آپتامرها کونژوگه‌هایی ایجاد می‌کند که اغلب سبب ایجاد اتصالات عرضی در چندین محل می‌شود که منجر به تجمع (aggregation) و از دست دادن فعالیت می‌شود (۲۹). علاوه براین، کونژوگه‌های تولید شده به این روش عموماً پایداری کمتری دارند و می‌توانند در شرایط اسیدی از هم جدا شوند (۲۹). نشان داده شده است که استفاده از گلوتارآلدئید یا بیس (سولفوسوکسینیمیدیل) سوبرات (BS3) اغلب منجر به اتصال چند نقطه‌ای می‌شود که می‌تواند مناطق اتصال آپتامر یا مکان‌های فعالیت آنزیم را بپوشاند و عملکرد کلی کونژوگه را کاهش دهد (۳۰). استفاده از آنزیم‌ای فعال شده با maleimide برای اتصال به آپتامرهای تیوله (به عنوان مثال، استفاده از معرف Traut برای تیولاسیون) ویژگی مشابهی با سولفو- SMCC نشان می‌دهد، اما مراحل کار طولانی‌تر است و فرآیند خالص‌سازی در این روش کمتر کارآمد است (۳۱). در مقابل روش‌های شیمیایی، روش‌های فیزیکی کونژوگاسیون (نظیر استفاده از تعاملات الکترواستاتیک یا آب‌گریز) نیز در برخی از مطالعه‌ها استفاده شده است که معمولاً به‌دلیل عدم تشکیل پیوند کووالانسی، از پایداری کمتری برخوردار هستند و احتمال جدایی آپتامر و آنزیم در شرایط مختلف وجود دارد. روش معرفی شده در مطالعه حاضر با ایجاد پیوندهای thioether کووالانسی، پایداری بالایی را فراهم می‌کند که در شرایط مختلف آزمایشگاهی و تشخیصی قابل اعتمادتر است.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-03-19]

نتیجه‌گیری و پیشنهادات

این مطالعه به توسعه یک روش شیمیایی برای کونژوگاسیون آپتامر به آنزیم HRP با استفاده از لینکر Sulfo- SMCC پرداخته است. نتایج نشان داد که آپتامر کونژوگه شده توانایی خود در اتصال به آنتی‌ژن cTnI را حفظ کرده و می‌تواند به عنوان پروب تشخیصی در آزمون ELASA به کار رود. این روش به دلیل پایداری بالای پیوند تیول- مالئیمید، حفظ فعالیت بیولوژیکی و سهولت در استفاده، نسبت به سایر لینکرها برتری دارد. برای بهینه‌سازی فرآیند و کاهش تداخلات، تنظیم دقیق غلظت‌ها، دما، زمان واکنش و pH پیشنهاد می‌شود. این روش می‌تواند در کونژوگاسیون سایر آپتامرها و توسعه پروب‌های جدید در آزمون‌های مختلف استفاده شود. همچنین، مقایسه این روش با دیگر روش‌های کونژوگاسیون برای تعیین بهترین گزینه توصیه می‌شود.

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه در دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی بررسی و با کد اخلاق IR.SBMU.MSP.REC.1401.483 ثبت شده است.

تأمین بودجه

بودجه این مطالعه با حمایت‌های مالی بخش تحقیق و توسعه شرکت دانش بنیان ارغوان طب کاویان تأمین شده است.

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل بخشی از پایان‌نامه خانم مهشید بهاری برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته ایمونولوژی از دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی بود.

تعارض منافع

نویسندگان، تعارض منافعی را گزارش نکرده‌اند.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-03-19]

References

1. Wang T, Chen C, Larcher LM, Barrero RA, Veedu RN. Three decades of nucleic acid aptamer technologies: Lessons learned, progress and opportunities on aptamer development. Biotechnology Advances. 2019;37(1):28-50.

2. Moreno M, García-Sacristán A, Martín ME, González VM. Enzyme-Linked Oligonucleotide Assay (ELONA). Methods Mol Biol. 2023;2570:235-42.

3. Bauer M, Strom M, Hammond DS, Shigdar S. Anything You Can Do, I Can Do Better: Can Aptamers Replace Antibodies in Clinical Diagnostic Applications? Molecules. 2019;24(23).

4. Zhang J, Liu B, Liu H, Zhang X, Tan W. Aptamer-conjugated gold nanoparticles for bioanalysis. Nanomedicine (Lond). 2013;8(6):983-93.

5. Cho EJ, Lee J-W, Ellington AD. Applications of Aptamers as Sensors. Annual Review of Analytical Chemistry. 2009;2(1):241-64.

6. Jayachandran B, Parvin TN, Alam MM, Chanda K, Mm B. Insights on Chemical Crosslinking Strategies for Proteins. Molecules. 2022;27(23).

7. Hermanson G. Chapter 5. Homobifunctional Crosslinkers. 2008. p. 234-75.

8. Belyadi H, Fathi E, Belyadi F. Chapter Eight - Hydraulic fracturing chemical selection and design. In: Belyadi H, Fathi E, Belyadi F, editors. Hydraulic Fracturing in Unconventional Reservoirs (Second Edition): Gulf Professional Publishing; 2019. p. 107-20.

9. Dutta U, Goswami MJ, Kakati D. Chapter Three - Environmentally benign synthesis of bioconjugated materials. In: Verma SK, Das AK, editors. Comprehensive Analytical Chemistry. 102: Elsevier; 2023. p. 93-121.

10. Yin XG, Gao XF, Du JJ, Zhang XK, Chen XZ, Wang J, et al. Preparation of Protein Conjugates via Homobifunctional Diselenoester Cross-Linker. Org Lett. 2016;18(22):5796-9.

11. Schreiber CL, Smith BD. Molecular conjugation using non-covalent click chemistry. Nat Rev Chem. 2019;3(6):393-400.

12. Kalia J, Raines RT. Advances in Bioconjugation. Curr Org Chem. 2010;14(2):138-47.

13. Sadiki A, Vaidya SR, Abdollahi M, Bhardwaj G, Dolan ME, Turna H, et al. Site-specific conjugation of native antibody. Antib Ther. 2020;3(4):271-84.

14. Winston SE, Fuller SA, Evelegh MJ, Hurrell JG. Conjugation of enzymes to antibodies. Curr Protoc Mol Biol. 2001;Chapter 11:Unit11.1.

15. Bartlett GJ, Porter CT, Borkakoti N, Thornton JM. Analysis of catalytic residues in enzyme active sites. J Mol Biol. 2002;324(1):105-21.

16. Dovgan I, Kolodych S, Koniev O, Wagner A. 2-(Maleimidomethyl)-1,3-Dioxanes (MD): a Serum-Stable Self-hydrolysable Hydrophilic Alternative to Classical Maleimide Conjugation. Sci Rep. 2016;6:30835.

17. Rana S, Shaw R, Kumar R, Chakraborty P, Bandyopadhyay S. Chapter Two - Bioconjugates: Preparation methods and therapeutic applications. In: Verma SK, Das AK, editors. Comprehensive Analytical Chemistry. 102: Elsevier; 2023. p. 43-91.

18. Alice Lee N, Kennedy IR. Chapter 5 - Immunoassays. In: Picó Y, editor. Food Toxicants Analysis. Amsterdam: Elsevier; 2007. p. 91-145.

19. Zhang X, Zhang Z, Li J, Huang X, Wei J, Yang J, et al. A Novel Sandwich ELASA Based on Aptamer for Detection of Largemouth Bass Virus (LMBV). Viruses. 2022;14(5).

20. Jo H, Gu H, Jeon W, Youn H, Her J, Kim SK, et al. Electrochemical aptasensor of cardiac troponin I for the early diagnosis of acute myocardial infarction. Anal Chem. 2015;87(19):9869-75.

21. Hermanson G. Bioconjugate Techniques: Third Edition. Bioconjugate Techniques: Third Edition. 2013:1-1146.

22. Lu L, Duong VT, Shalash AO, Skwarczynski M, Toth I. Chemical Conjugation Strategies for the Development of Protein-Based Subunit Nanovaccines. Vaccines (Basel). 2021;9(6).

23. Mahmoudian J, Jeddi-Tehrani M, Rabbani H, Mahmoudi AR, Akhondi MM, Zarnani AH, et al. Conjugation of R-Phycoerythrin to a Polyclonal Antibody and F (ab')2 Fragment of a Polyclonal

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-03-19]

Antibody by Two Different Methods. Avicenna J Med Biotechnol. 2010;2(2):87-91.

24. Liu Z, Gurlo T, von Grafenstein H. Cell-ELISA using β-galactosidase conjugated antibodies. Journal of Immunological Methods. 2000;234(1):P153-P67.

25. Arlotta KJ, San BH, Mu HH, Yu SM, Owen SC. Localization of Therapeutic Fab-CHP Conjugates to Sites of Denatured Collagen for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. Bioconjug Chem. 2020;31(8):1960-70.

26. Kim YJ, Choi JW. Enzyme-linked aptamer-based sandwich assay (ELASA) for detecting Plasmodium falciparum lactate dehydrogenase, a malarial biomarker. RSC Adv. 2022;12(45):29535-42.

27. Odeh F, Nsairat H, Alshaer W, Ismail MA, Esawi E, Qaqish B, et al. Aptamers Chemistry: Chemical Modifications and Conjugation Strategies. Molecules. 2019;25(1).

28. Vashist SK. Comparison of 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimide Based Strategies to Crosslink Antibodies on Amine-Functionalized Platforms for Immunodiagnostic Applications. Diagnostics (Basel). 2012;2(3):23-33.

29. Gubala V, Le Guevel X, Nooney R, Williams DE, MacCraith B. A comparison of mono and multivalent linkers and their effect on the colloidal stability of nanoparticle and immunoassays performance. Talanta. 2010;81(4-5):1833-9.

30. Mera K, Nagai M, Brock JW, Fujiwara Y, Murata T, Maruyama T, et al. Glutaraldehyde is an effective cross-linker for production of antibodies against advanced glycation end-products. J Immunol Methods. 2008;334(1-2):82-90.

31. Hnasko RM. Bioconjugation of Antibodies to Horseradish Peroxidase (HRP). Methods Mol Biol. 2015;1318:43-50.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-03-19]