

امکان شناسایی آنتی‌ژن سطحی ویروس هپاتیت B (HBsAg) به روش

Enzyme-Linked Aptamer Assay و مقایسه‌ی آن با روش Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

حمیدرضا میانه‌ساز^۱، حسین خان‌احمد^۲، مینا میریان^۳، مریم بشتام^۴، سید نظام‌الدین حسینی^۵

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: کیت‌های تشخیص بالینی ویروس هپاتیت B، بر اساس آنتی‌بادی می‌باشند و از نظر حساسیت، پایداری و هزینه دارای نواقصی هستند. از این رو، تحقیقات در جهت جایگزینی آبتامرها به جای آنتی‌بادی شاید این نواقص را جبران کند. در این مطالعه، از آبتامر بیوتینه در بررسی امکان شناسایی اختصاصی Hepatitis B surface antigen (HBsAg) با سیستم بیوتین- استرپتاویدین و روش Enzyme-linked aptamer assay (ELAA) استفاده شد.

روش‌ها: HBsAg به وسیله‌ی بافر کربنات- بی کربنات دارای pH معادل ۹/۴ با در نظرگیری متغیرهای مختلف در پلیت Maxibinding (SPL, Korea) تثبیت شد. تثبیت HBsAg با کیت ELISA تجاری بررسی شد. قطعه‌ی آبتامر کلون شد و از پلاسمید به عنوان الگو در Imbalance polymerase chain reaction (Imbalance PCR) جهت تولید DNA تک رشته‌ای استفاده و این روش بهینه شد. از آبتامر بیوتینه با استفاده از سیستم استرپتاویدین- بیوتین در روش ELAA استفاده شد.

یافته‌ها: تثبیت آنتی‌ژن با استفاده از کونزوگه‌ی ۱ و ۲ کیت تجاری اثبات شد. کلونینگ قطعه‌ی آبتامر در Escherichia coli Top10 (E. coli Top10) توسط Colony PCR تأیید شد. بهترین نتیجه‌ی PCR گرادیان دمای اتصال پرایمر در ۶۴ درجه‌ی سانتی‌گراد بود. گروه شاهد آزمایش‌ها، گویای تثبیت صحیح آنتی‌ژن بود، اما هر دو آبتامر سنتتیک و آبتامر Imbalance PCR، سیگنال‌های تکرارپذیر و اختصاصی مبین شناسایی و اتصال آبتامر به HBsAg را نشان ندادند.

نتیجه‌گیری: در هنگام تثبیت آنتی‌ژن، ساختار آن نسبت به آنتی‌ژن موجود در سطح ویروس یا سلول تغییر می‌کند. شاید علت نتایج منفی، توانایی آبتامر در شناسایی آنتی‌ژن با ساختار دست نخورده باشد. همچنین، احتمال می‌رود اتصال بیوتین به آبتامر، موجب تداخل در ساختار آن شود و استفاده از بازوی رابط بین افزونه و آبتامر نیاز به بررسی دارد.

واژگان کلیدی: آبتامرها، DNA، Enzyme-linked immunosorbent assay، هپاتیت B، آنتی‌ژن‌های سطحی ویروس هپاتیت B

ارجاع: میانه‌ساز حمیدرضا، خان‌احمد حسین، میریان مینا، بشتام مریم، حسینی سید نظام‌الدین. امکان شناسایی آنتی‌ژن سطحی ویروس هپاتیت B (HBsAg) به روش Enzyme-Linked Aptamer Assay و مقایسه‌ی آن با روش Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. مجله دانشکده پزشکی

اصفهان ۱۳۹۷؛ ۳۶ (۴۷۱): ۲۳۳-۲۴۰

بیماری دست و پنجه نرم می‌کنند (۲-۳). عامل مهم و ضروری در تشخیص و درمان این بیماری آنتی‌ژن سطحی ویروس هپاتیت B (Hepatitis B surface antigen یا HBsAg) می‌باشد. بیماران مبتلا به هپاتیت B مزمن، افرادی هستند که به مدت ۶ ماه از نظر HBsAg مثبت باشد (۴). پس از شناسایی آنتی‌بادی‌ها، روش Enzyme-

مقدمه

هپاتیت یا التهاب بافت کبد یک بیماری ویروسی خطرناک است که حدود ۸۸ درصد جمعیت جهان در مناطق با شیوع بالا و متوسط آن زندگی می‌کنند (۱). اگر چه بسیاری از افراد ناقل ویروس هپاتیت B فاقد علائم خاصی هستند، حدود ۲۵۷ میلیون نفر در جهان با این

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- دانشیار، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- دکتری تخصصی، گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۴- دانشجوی دکتری، مرکز تحقیقات قلب و عروق اصفهان، پژوهشکده‌ی قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۵- دانشیار، بخش تولید واکسن هپاتیت B، مجتمع تولیدی- تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

Email: hossein_khanahmad@yahoo.com

نویسنده‌ی مسؤؤل: حسین خان‌احمد

روش‌ها

در این مطالعه، ابتدا تثبیت آنتی‌ژن با در نظر گرفتن متغیرهای مختلف بهینه شد. بدین منظور، آنتی‌ژن‌های نوترکیب HBsAg از دو منبع مختلف واکسن هپاتیت B و آنتی‌ژن تخلیص شده توسط انستیتو پاستور تهران (ایران) تهیه شد. در هر دو مورد، ابتدا تشخیص کیفی با استفاده از کیت تجاری تشخیص HBsAg (پیشناز طب، ایران) انجام شد و سپس، با استفاده از بافر تثبیت کننده‌ی کربنات-بی‌کربنات ۰/۲ مولار، آنتی‌ژن مورد نظر در کف چاهک‌های پلیت ELISA تثبیت شد. روش مورد استفاده برای انجام ELISA دستی، روشی مشابه دستور کار کیت تشخیص HBsAg شرکت پیشناز طب بود که توسط راهنمای ELISA (Thermo scientific, USA) بهینه شد (۱۱). در این فرایند، سه غلظت ۰/۳، ۰/۹ و ۲/۵ نانوگرم/میلی‌لیتر از آنتی‌ژن در بافر کربنات/بی‌کربنات تهیه و ۲۰۰ میکرولیتر از هر غلظت در چاهک‌ها ریخته شد. لازم به ذکر است که برای تصدیق تکرارپذیری نتایج، برای هر غلظت سه تکرار در نظر گرفته شد. به یک چاهک نیز آنتی‌ژن افزوده نشد و به عنوان چاهک شاهد در نظر گرفته شد.

چاهک‌ها به مدت یک شب در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس، محتویات چاهک‌ها تخلیه شد و پس از ۲ مرتبه شستشو با بافر شستشوی ۱ x (سیتومتن ژن، ایران) (۱۰ میلی‌مولار بافر فسفات با pH معادل ۷/۴، ۱۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم و ۰/۰۵ درصد Tween 20) و خشک کردن چاهک‌ها روی دستمال جذب، مسدودسازی با استفاده از ۳۰۰ میکرولیتر Skimmed milk (۵ درصد در Phosphate buffered saline یا PBS) به ازای هر چاهک و انکوباسیون ۱ ساعته در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام گرفت. سپس، محتویات تخلیه شد و پس از ۲ مرتبه شستشو، ۲۵ میکرولیتر کونژوگه‌ی شماره‌ی ۱ کیت تجاری پیشناز طب که حاوی آنتی‌بادی بیوتینه‌ی ضد HBsAg می‌باشد، در چاهک‌ها به جز چاهک شاهد ریخته شد و پلیت به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردید. آن گاه، بدون شستشو ۲۵ میکرولیتر کونژوگه‌ی شماره‌ی ۲ کیت پیشناز طب که حاوی استرپتاویدین و آنزیم HRP متصل به بیوتین است، به هر چاهک به جز چاهک شاهد افزوده شد و بار دیگر، ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از آن، محتویات تخلیه شد و بعد از ۳ مرتبه شستشو و خشک کردن، ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترای آنزیم HRP (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) با TMB (Sigma Aldrich, USA) به هر چاهک افزوده و ۱۵ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق انکوبه شد. سپس، با افزودن ۵۰ میکرولیتر اسید سولفوریک ۱ نرمال، واکنش در چاهک‌ها متوقف شد و میزان

linked immunosorbent assay (ELISA) ابداع شد و شناسایی و تشخیص بسیاری بیماری‌ها بر مبنای آن امکان پذیر گردید. تا کنون برای تشخیص این بیماری، کیت‌های تشخیص آزمایشگاهی مارکر ویروسی HBsAg بر اساس ELISA ساندویچی تهیه شده است و آنتی‌بادی‌ها نیز به عنوان عامل تثبیت کننده‌ی آنتی‌ژن و هم به عنوان عامل تشخیصی در آن‌ها به کار رفته‌اند (۵).

آنتی‌بادی‌ها، مولکول‌های با اتصال اختصاصی و قوی به مولکول هدفشان هستند که طیف گسترده‌ای از کاربردها مانند خالص‌سازی، جداسازی و تشخیص اختصاصی یک ماده از میان انبوهی از مواد را امکان‌پذیر می‌سازند، اما با وجود مزایای این مولکول‌ها، محدودیت‌هایی نظیر ناپایداری حرارتی، تولید در شرایط زنده، هدف‌گیری اهداف محدود، تغییرات در سری‌های مختلف تولید و هزینه‌ی تمام شده‌ی بالا برای تولید، استفاده از آن‌ها را محدود کرده است (۶)، اما در سال‌های اخیر، مولکول‌های دیگری با خواص اتصال قوی و اختصاصی به مولکول هدف، تحت عنوان آپتامر معرفی شده‌اند (۷) که بسیاری از محدودیت‌های موجود در مورد آنتی‌بادی‌ها را ندارند. این در حالی است که ثابت تفکیک (Dissociation constant) آنتی‌بادی و آپتامر که نشان دهنده‌ی میل ترکیبی آن‌ها به مولکول هدف می‌باشد، به طور تقریبی یکسان است و حدود ۵۰-۰/۱ نانومولار می‌باشد (۸).

بنابراین، استفاده از آپتامرها در بسیاری موارد، مفیدتر از آنتی‌بادی‌ها به نظر می‌رسد (۶). از طرف دیگر، DNA آپتامرها در مقایسه با RNA آپتامرها دارای مزایایی همچون عدم حساسیت به RNase، عدم نیاز به سنتز cDNA و سنتز شیمیایی ارزان‌تر هستند (۹). بر این مبنای روش جدیدی با استفاده از آپتامرها مشابه ELISA به وجود آمد که ارزان‌تر و کارآمدتر است و تحت عنوان روش Enzyme-linked aptamer assay (ELAA) شناخته می‌شود.

حال با توجه به اهمیت بیماری هپاتیت و لزوم شناسایی سریع و درمان آن از یک سو و هزینه‌ی بالای تشخیص این بیماری از سوی دیگر و همچنین، با توجه به مزایای آپتامرها نسبت به آنتی‌بادی‌ها، به نظر می‌آید جایگزینی آپتامر ضد مارکر ویروسی HBsAg در کیت‌های تشخیصی موجب کارایی بهتر و هزینه‌ی کمتر کیت‌ها گردد. این در حالی است که در پژوهشی دیگر، DNA آپتامری ضد این آنتی‌ژن، با پایداری و ویژگی (Specificity) مناسب توسط خان‌احمد و همکاران تهیه و مورد ارزیابی قرار گرفته است (Unpublished). بنابراین، تصمیم گرفته شد در این مطالعه، از آپتامر ضد HBsAg جهت شناسایی آنتی‌ژن سطحی ویروس هپاتیت B به جای آنتی‌بادی با بهره‌گیری از سیستم تقویت سیگنال بیوتین-استرپتاویدین و آنزیم Horseradish peroxidase (HRP) استفاده شود (۱۰).

بار دیگر مقدار مشابهی آنزیم Taq DNA polymerase به هر واکنش اضافه شد و مراحل پیش‌گفته تا مجموع ۱۲۰ چرخه انجام گرفت. غلظت محصول حاصل از Imbalance PCR در نهایت با نانودراپ (Nanospec cube, Germany) اندازه‌گیری شد.

برای تهیه‌ی آپتامر سنتتیک، به شرکت ژن فن‌آوران، سفارش ساخت توالی آپتامر که در انتهای 5' آن بیوتین اضافه شده بود، داده شد. پس از تهیه‌ی آپتامرها مانند قبل، HBsAg در کف پلیت‌ها تثبیت شد. سپس، مطابق دستور کار استفاده شده برای اتصال آنتی‌بادی به آنتی‌ژن‌های تثبیت شده، این بار به چاهک‌های حاوی آنتی‌ژن، آپتامر اضافه شد. آپتامرهای متصل شده به آنتی‌ژن‌های تثبیت شده پس از شستشو در کف چاهک‌ها، متصل باقی می‌ماند و به واسطه‌ی بیوتین باعث تولید سیگنال می‌شوند. این کار، با روش تقویت سیگنال استرپتاویدین و آنزیم HRP متصل به دو مولکول بیوتین که در اصطلاح به آن Avidine biotin complex (ABC) گفته می‌شود، انجام شد. سیستم استرپتاویدین-بیوتین، در قالب کیت (Vector Lab, USA) با نام تجاری ABC Kit خریداری شد. در همه‌ی آزمایش‌ها، گروه شاهد (گروه‌های A₁ و A₂) برای اطمینان از صحت انجام ELAA تعریف شد. سپس، مراحل آزمایش به دو مرحله‌ی جداگانه تقسیم شد.

در مرحله‌ی اول پس از تثبیت آنتی‌ژن، آپتامر به آن اضافه شد. در این مرحله، به طور جداگانه آپتامر تهیه شده از هر دو منبع، مورد بررسی قرار گرفت. از این رو، غلظت ۲ میکرومولار از هر دو آپتامر تهیه شد. از طرف دیگر، سیستم تشخیص استرپتاویدین-بیوتین نیز از دو منبع متفاوت، از کیت ABC و کونزوگه‌ی شماره‌ی ۲ کیت پیشتاز طب (پیشتاز طب، ایران) تأمین شد. سپس، ۳ گروه برای انجام آزمایش‌ها طراحی شدند. در گروه A₁ کونزوگه‌ی شماره‌ی ۱ (آنتی‌بادی بیوتینه) و کونزوگه‌ی شماره‌ی ۲ کیت پیشتاز طب (استرپتاویدین - HRP)، در گروه B₁ آپتامر به جای آنتی‌بادی و کونزوگه‌ی شماره‌ی ۲ کیت پیشتاز طب و در گروه C₁ نیز از آپتامر و کیت ABC استفاده شد.

سپس، در مرحله‌ی دوم، تأثیر چند متغیر از جمله بافر اتصال آپتامر، مدت زمان مسدودسازی و حلال مورد استفاده برای ساخت محلول ۵ درصد (وزنی - حجمی) Skimmed milk روی اتصال آپتامر به آنتی‌ژن بررسی شد. از این رو، ۲ گروه شامل گروه A₂ با کونزوگه‌ی شماره‌ی ۱ و ۲ کیت پیشتاز طب و گروه B₂ با آپتامر محلول در Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) کیت ABC، برای انجام آزمایش‌های این مرحله در نظر گرفته شدند. سپس، از DPBS به جای آب مقطر به عنوان حلال آپتامر (بافر اتصال) استفاده شد و مرحله‌ی مسدودسازی به صورت شبانه صورت گرفت.

جذب رنگ زرد حاصل شده توسط فیلتر ۴۵۰ نانومتر دستگاه خوانشگر ELISA (BIORAD, USA) اندازه‌گیری شد.

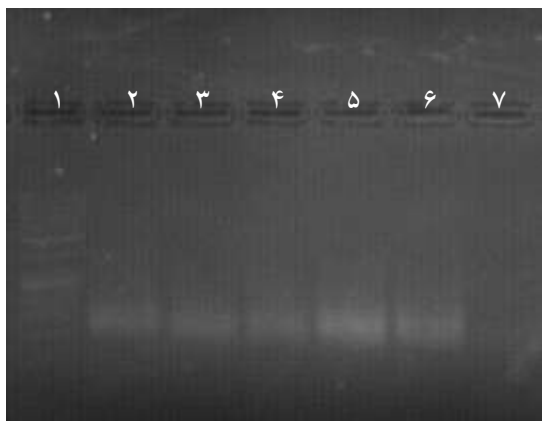
سپس، آپتامر ضد HBsAg به دو طریق شامل روش Imbalance polymerase chain reaction (Imbalance PCR) و روش سنتتیک تهیه گردید. برای تهیه‌ی آپتامر به روش Imbalance PCR، ابتدا قطعه‌ی آپتامر به کمک وکتور پلاسمیدی pUC57 در میزبان Escherichia coli Top10 (E. coli Top10) کلون شد. بدین منظور، قطعه‌ی آپتامر که دارای دو انتهای چسبنده‌ی 3' باز A بود، در وکتور پلاسمیدی خطی دارای انتهای چسبنده‌ی 3' باز T (Fermentas, USA) دارای ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کلون شد و پلاسمید حلقوی حاصل در باکتری E. coli Top10 به روش CaCl₂ سرد و شوک حرارتی ترانسفورم (Transform) گردید. سپس، تک کلون‌های ترانسفورم شده به وسیله‌ی کشت روی محیط Luria-Bertani agar (LB Agar) حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین انتخاب شد و جهت تأیید کلونی‌های حاوی قطعه، با کمک پرایمرهای عمومی فاز M13، Colony PCR انجام شد. سپس، از این کلونی‌ها به وسیله‌ی کیت Solg™ plasmid mini-prep kit (SolGent, Korea) پلاسمید استخراج و برای تأیید نهایی وجود قطعه‌ی مورد نظر در آن‌ها، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی قطعه (پرایمر پیشرو: 5'-biotin-ATCATCCAGCTTATTCAATT-3' و پرایمر معکوس 3'-CTTCTCCTGCACACTTACTAT-5') PCR انجام شد. لازم به ذکر است PCR با گرادیان دمایی انجام گردید تا دمای اتصال بهینه به دست آید.

سپس، با استفاده از هر دو پرایمر پیشرو و معکوس، ۱۵ چرخه‌ی واکنش PCR معمولی روی پلاسمید دارای قطعه به عنوان الگو انجام شد و محصول آن به عنوان الگو در واکنش Imbalance PCR مورد استفاده قرار گرفت؛ به طوری که برای یک واکنش ۲۵ میکرولیتری، ۱ میکرولیتر محصول PCR به عنوان الگو (۴۰۰ نانوگرم/میکرولیتر) به همراه ۲/۵ میکرولیتر بافر، ۱ میکرولیتر محلول MgCl₂ (۵۰ میلی‌مولار)، ۱ میکرولیتر از Deoxynucleotide triphosphate (dNTP) (۱۰ میلی‌مولار)، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase (۵ واحد بین‌الملل/میکرولیتر) و ۱/۵ میکرولیتر از پرایمر رقیق نشده‌ی پیشرو (۱۰۰ میکرومولار) و ۱۸/۲ میکرولیتر آب استریل در یک تیوب ریخته و PCR شد. برنامه‌ی PCR عبارت از ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد در ۵ دقیقه، سپس ۴۵ چرخه‌ی متوالی از مراحل شامل ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، ۶۴ درجه‌ی سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد ۱۵ ثانیه و سپس مرحله‌ی نهایی ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد ۵ دقیقه و ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد تا انتهای برنامه بود. سپس،



شکل ۲. نتایج الکتروفورز ژل آگارز محصول **Colony polymerase chain reaction (Colony PCR)** بر روی ۱۰ تک کلون به دست آمده از کلونینگ قطعه‌ی آپتامر در باکتری **Escherichia coli Top10 (E. coli Top10)**

ستون‌های ۳ و ۴: باند ۲۸۰ جفت بازی مربوط به کلون‌های ۳ و ۴ (کلون‌های مثبت حاوی توالی آپتامر) و ستون‌های ۱، ۲ و ۵-۱۰ باند ۱۹۰ جفت بازی مربوط به سایر کلون‌ها (کلون‌های منفی بدون قطعه مورد نظر). در این تصویر، از **Ladder ۱۰۰** جفت بازی (Fermentas, USA) استفاده شده است.



شکل ۳. نتایج الکتروفورز ژل آگارز محصول

Imbalance polymerase chain reaction

(Imbalance PCR) بر روی پلاسمید استخراج شده از کلونی ۴

(حاوی قطعه‌ی آپتامر)

ستون ۱ **Ladder ۱۰۰** جفت بازی (Fermentas, USA) بوده است، ستون‌های ۲-۶ محصول واکنش‌های به طور کامل مشابه **Imbalance PCR** و ستون ۷ نمونه‌ی شاهد منفی است.

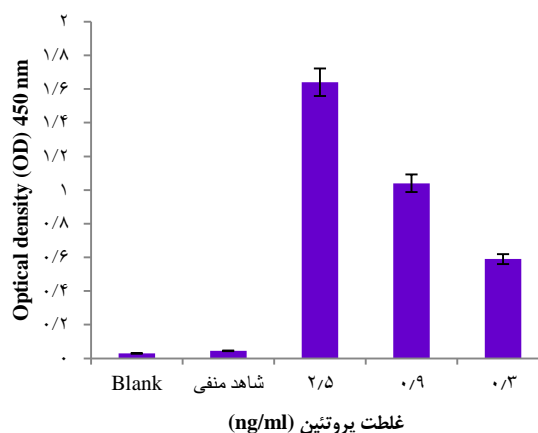
در نتایج مرحله‌ی اول در گروه **A₁**، با کاهش غلظت آنتی‌ژن تثبیت شده در چاهک‌ها، مقدار جذب نوری ۴۵۰ نانومتر نیز به طور معنی‌داری کاهش یافت.

همچنین، در گروه‌های **B₁** و **C₁**، هیچ سیگنال اختصاصی وابسته به غلظت آنتی‌ژن، از اتصال آپتامر (از هیچ یک از دو منبع) به آنتی‌ژن با استفاده از هر دو سیستم تشخیص به دست نیامد (شکل‌های ۴ و ۵).

همچنین، از آب‌مقطر برای تهیه‌ی **Skimmed milk ۵** درصد (به جای **PBS**) و سپس از این محلول برای ساخت معرف‌های کیت **ABC** استفاده شد. مقایسه‌ی آماری بین مقادیر جذب ۴۵۰ نانومتری غلظت‌های مختلف آنتی‌ژن در هر گروه از آزمایش‌ها به روش **Kruskal-Wallis** انجام شد.

یافته‌ها

بر اساس یافته‌های شکل ۱ که مربوط به روند تثبیت آنتی‌ژن در چاهک‌ها می‌باشد، میانگین جذب نوری ۴۵۰ نانومتر همراه با کاهش غلظت آنتی‌ژن تثبیت شده در چاهک‌ها به صورت معنی‌داری کاهش یافت.



شکل ۱. مقایسه‌ی میانگین جذب غلظت‌های مختلف **HBsAg**

(Hepatitis B surface antigen) (انستیتو پاستور تهران، ایران) تثبیت

شده در چاهک‌های پلیت **Enzyme-linked immunosorbent assay**

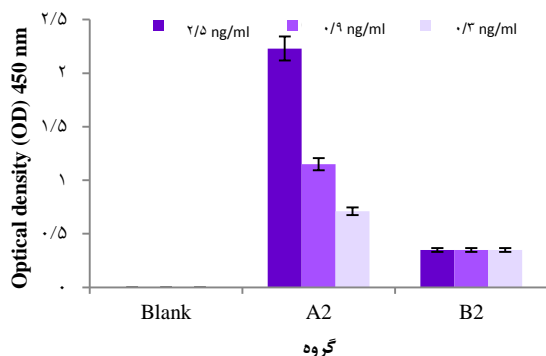
(ELISA) در طول موج ۴۵۰ نانومتر

Error barها نماینده‌ی **Standard deviation** می‌باشند. **NC**: شاهد منفی

(در آزمون **Kruskal-Wallis** $P = ۰/۰۲۵$)

نتایج ژل الکتروفورز **Colony PCR** روی تک کلون‌های حاصل از ترانسفورماسیون (**Transformation**) نشان داد که کلونی‌های ۳ و ۴ که باند حدود ۲۸۰ نوکلئوتیدی دادند، دارای قطعه‌ی آپتامر می‌باشند؛ در حالی که مابقی، باند حدود ۱۹۰ نوکلئوتیدی ایجاد نمودند و فاقد قطعه‌ی فوق می‌باشند (شکل ۲). وجود باندهای ضعیف در الکتروفورز ژل آگارز، ایجاد **DNA** تک رشته در **Imbalance PCR** را تأیید نمود (شکل ۳). غلظت نهایی **Single-stranded DNA (ssDNA)** حاصل از مخلوط کردن همه‌ی محصولات حاصل از **Imbalance PCR** ۹۰ نانوگرم/میکرولیتر توسط نانودراپ اندازه‌گیری شد.

نتایج مرحله‌ی دوم آزمایش‌ها روی آپتامر نشان داد که در گروه A₂ با کاهش غلظت آنتی‌ژن تثبیت شده، جذب نوری ۴۵۰ نانومتر نیز کاهش یافته است، اما مقادیر جذب نوری گروه B₂ هیچ گونه الگو و ویژگی را نشان نداد (شکل ۶).



شکل ۶. مقایسه‌ی میانگین جذب غلظت‌های مختلف

Hepatitis B surface antigen (HBsAg) تثبیت شده در چاهک‌های پلیت (ELISA) Enzyme-linked immunosorbent assay در

مرحله‌ی دوم آزمایش‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر

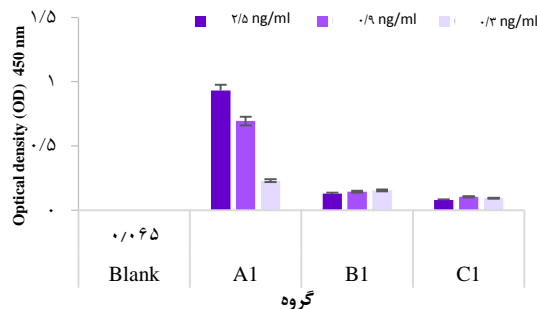
در گروه A₂ از کونژوگه‌ی شماره‌ی ۱ (آنتی‌بادی بیوتینه) و کونژوگه‌ی شماره‌ی ۲ کیت پستاناز طب (استرپتایویدین - HRP) استفاده شد. در گروه B₂ از آپتامر سنتتیک محلول در Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) به جای آنتی‌بادی و کیت ABC استفاده شد (Error bar نماینده‌ی Standard deviation هستند).

بر اساس آزمون Kruskal-Wallis در گروه A₂ $P = 0/027$ ، در گروه B₂ $P = 0/990$ به دست آمد.

بحث

اساس این مطالعه را ایجاد روندی استاندارد برای تثبیت آنتی‌ژن نوترکیب HBsAg در چاهک‌ها تشکیل می‌داد. در مطالعه‌ی این روند (شکل ۱)، میانگین مقادیر جذب نوری همراه با کاهش غلظت آنتی‌ژن تثبیت شده در چاهک‌ها، کاهش می‌یابد که این امر، نشان دهنده‌ی ویژگی نسبی و وابستگی مقادیر جذب نوری به دست آمده به میزان آنتی‌ژن تثبیت شده در چاهک‌ها می‌باشد. همچنین، تکرارپذیری بالای مقادیر جذب نوری به دست آمده در هر غلظت از آنتی‌ژن که به صورت خطوط خطا در هر ستون نمایان است (شکل ۱)، دقت این روند را نشان می‌دهد. این روند، در ادامه، اساس کار تمامی آزمایش‌ها قرار گرفت و به عنوان شاهده‌ی بر صحت انجام سایر آزمایش‌ها از آن استفاده شد.

در مطالعه‌ی حاضر، هیچ یک از آپتامرهای سنتتیک و تهیه شده به روش Imbalance PCR، سیگنال‌های تکرارپذیر و اختصاصی جهت تشخیص HBsAg نشان ندادند. اگر چه نتایج استفاده از آپتامر سنتتیک در مرحله‌ی اول آزمایش‌ها (شکل ۵) از نظر آماری معنی‌دار



شکل ۴. مقایسه‌ی میانگین جذب غلظت‌های مختلف

Hepatitis B surface antigen (HBsAg) تثبیت شده در چاهک‌های

پلیت (ELISA) Enzyme-linked immunosorbent assay در

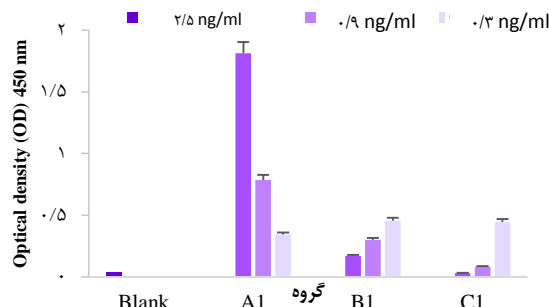
مرحله‌ی اول آزمایش‌ها بر روی آپتامر با استفاده از آپتامر محصول

Imbalance PCR در طول موج ۴۵۰ نانومتر

در گروه A₁ از کونژوگه‌ی شماره‌ی ۱ (آنتی‌بادی بیوتینه) و کونژوگه‌ی شماره‌ی ۲ کیت پستاناز طب (استرپتایویدین - HRP) استفاده شد. در گروه B₁ از آپتامر حاصل از Imbalance PCR به جای آنتی‌بادی و کونژوگه‌ی شماره‌ی ۲ کیت پستاناز طب و در گروه C₁ نیز از آپتامر به جای آنتی‌بادی و کیت ABC استفاده شد (Error bar نماینده‌ی Standard deviation هستند).

بر اساس آزمون Kruskal-Wallis، در گروه A₁ $P = 0/027$ ، در گروه B₁ $P = 0/072$ و در گروه C₁ $P = 0/120$ به دست آمد.

در مورد آپتامر سنتتیک، سیگنال‌ها علاوه بر ضعیف بودن، با کاهش غلظت آنتی‌ژن تثبیت شده در چاهک‌ها، افزایش یافت (شکل ۵).



شکل ۵. مقایسه‌ی میانگین جذب غلظت‌های مختلف

Hepatitis B surface antigen (HBsAg) تثبیت شده در

چاهک‌های پلیت (ELISA) Enzyme-linked immunosorbent assay در

مرحله‌ی اول آزمایش‌ها با استفاده از آپتامر سنتتیک در

طول موج ۴۵۰ نانومتر

در گروه A₁ از کونژوگه‌ی شماره‌ی ۱ (آنتی‌بادی بیوتینه) و کونژوگه‌ی شماره‌ی ۲ کیت پستاناز طب (استرپتایویدین - HRP) استفاده شد. در گروه B₁، از آپتامر سنتتیک به جای آنتی‌بادی و کونژوگه‌ی شماره‌ی ۲ کیت پستاناز طب و در گروه C₁ نیز از آپتامر سنتتیک به جای آنتی‌بادی و کیت ABC استفاده شد (Error bar نماینده‌ی Standard deviation هستند).

بر اساس آزمون Kruskal-Wallis در هر سه گروه A₁، B₁ و C₁ $P = 0/027$ به دست آمد.

مقایسه‌ای مشخص گردید که روش ELAA غیر مستقیم با استفاده از آپتامر WKB-14 تمایل و ویژگی بهتری برای تشخیص مایکوپلاسما بویوس (*Mycoplasma bovis*) از خود نشان می‌دهد (۱۶).

Chen و همکاران، در یک Patent، آپتامر بر علیه آلفا-متیل آسیل کوآ (α -methylacyl-CoA) معرفی کردند که از آن در طراحی کیت تشخیص این ماده بر اساس سیستم ELAA استفاده شد (۱۷). مثال دیگری از این دست، مانند اکراتوکسین A، تجاری‌سازی یک کیت تشخیص آفلاتوکسین بر مبنای آپتامر است (۱۸). اساس این مطالعه، مشابه تحقیق حاضر است؛ به طوری که یک آپتامر تهیه شده بر ضد آفلاتوکسین B1 که دارای افزونه‌ی بیوتین در انتهای 5' است، روی آگارز-استریتاومیدین تثبیت می‌شود و در یک ستون کروماتوگرافی تمایلی به عنوان بخش جامد به کار می‌رود. سپس، از این ستون برای خلص‌سازی و تعیین مقدار آنتی‌ژن مورد نظر استفاده می‌شود. تفاوت این مطالعه با مطالعه‌ی Barthelmebs و همکاران (۱۳) و همچنین، مطالعه‌ی حاضر، در استفاده از ستون کروماتوگرافی به جای تثبیت آنتی‌ژن روی سطح جامد است. در هر دو مطالعه‌ی پیش‌گفته، از روش فلورسنت جهت ایجاد سیگنال استفاده شده است که از این نظر با مطالعه‌ی حاضر متفاوت است.

از مقایسه‌ی مطالعه‌ی حاضر با سایر مطالعات انجام شده، چنین به نظر می‌رسد که لازم است مطالعه‌ی حاضر با یک سری تغییرات تکرار شود. اول این که از سایر آپتامرهای معرفی شده برای HBsAg استفاده شود. برای مثال، Xi و همکاران، به معرفی چند آپتامر با ویژگی و میل ترکیبی بالا برای HBsAg پرداخته‌اند. در این مطالعه، جداسازی آپتامرها با استفاده از Magnetic nano particles (MNPs) و با بهره‌گیری از روش SELEX انجام گرفته است و نتیجه‌ی آن DNA آپتامرهای ۴۰ بازی با نام‌های H01، H02 و H03 است (۱۹). دومین تغییر، این است که شاید بهتر باشد از سیستم‌های تشخیصی متفاوت دیگر همچون سیستم‌های فلورسنت و کمی لومینسانس در مطالعه بهره گرفت. همچنین، فاصله‌ی مناسب بین افزونه (Modification) و آپتامر به وسیله‌ی یک بازوی کربنی جهت جلوگیری از ایجاد تأثیرات منفی افزونه در ساختار سه بعدی آپتامر لحاظ شود. از دیگر نکاتی که باید در مطالعات آینده مد نظر قرار گیرد، تغییرات لازم در نوع بافر اتصال مناسب آپتامر به آنتی‌ژن و مدت زمان و درجه‌ی حرارت مناسب جهت انکوباسیون آن‌ها و نیز مسدودسازی بنیان‌های آزاد کف پلیت به گونه‌ای است که کمترین میزان از سیگنال‌های پس زمینه و ناخواسته ایجاد شود. نکته‌ی قابل توجه دیگر این است که شاید روش‌های پیچیده‌تری مانند Sandwich ELAA که در آن می‌بایست آپتامر به وسیله‌ی افزونه‌ای مناسب مانند بیوتین/نوترایدین در کف چاهک‌ها تثبیت شود و در

بود، اما از آن جایی که در گروه‌های B₁ و C₁ میزان سیگنال‌ها بسیار کم بود و مهم‌تر از آن با کاهش غلظت آنتی‌ژن تثبیت شده این سیگنال‌ها افزایش می‌یافت؛ به این نتایج نمی‌توان اتکا نمود. چنانچه در مطالعات مختلف، علاوه بر معنی دار بودن آماری داده‌ها کاربرد بالینی این داده‌ها نیز لازمه‌ی اثبات ادعای مطالعه می‌باشد.

یکی از دلایل احتمالی این نتیجه، می‌تواند استفاده از بافر تثبیت کننده باشد. همان‌طور که پیش از این ذکر شد، آپتامر بر خلاف آنتی‌بادی برای آن که به طور اختصاصی آنتی‌ژن را شناسایی کند، باید با آنتی‌ژنی دست نخورده و با ساختار فضایی مناسب روبه‌رو شود. در حالی که برای آنتی‌بادی در بیشتر موارد اپی‌توپ‌های خطی و پروتئین‌های به نسبت دناتوره شده نیز قابل شناسایی است (۱۲). از این رو، ممکن است شرایط بافری مانند pH بافر تثبیت کننده، ساختار آنتی‌ژن را به قدری تغییر دهد که دیگر برای آپتامر قابل شناسایی نباشد، اما کماکان برای آنتی‌بادی قابل شناسایی باشد. نتایج همه‌ی آزمایش‌های گروه‌های A که در بر گیرنده‌ی آنتی‌بادی هستند، گواهی بر این مدعا می‌باشد.

البته، این مسأله که یک آپتامر در فلوسایتومتري نتایج خوبی داشته، اما در روش ELAA کارایی نداشته باشد، در مورد آنتی‌بادی‌ها نیز صادق است و در موارد زیادی شرکت سازنده‌ی یک آنتی‌بادی، محصول خود را فقط برای یک نوع آزمایش مانند Western-blot ارائه می‌نماید، اما برای استفاده در فلوسایتومتري توصیه نمی‌نماید. همچنین، شاید آپتامر پیش‌گفته به Conformation خاصی از HBsAg متصل می‌شود که فقط در سطح سلول یا ویروس آن ساختار ایجاد می‌شود و آنتی‌ژن نو ترکیب چنین ساختاری را ایجاد نمی‌کند. یکی از دلایل احتمالی دیگر، آن است که وجود بیوتین در آپتامرهای ساخته شده، سبب کاهش ویژگی آپتامر می‌گردد و همچنین، بافر مورد استفاده نیز می‌تواند در اتصال اختصاصی بسیار مهم باشد.

تاکنون کیت‌هایی بر اساس آپتامر در زمینه‌های مختلف تهیه شده است. برای مثال، در زمینه‌ی سموم غذایی، چندین کیت با روش ELISA که مبنای آن آنتی‌بادی است، برای سم آکراتوکسین A تهیه شده است، اما پس از تهیه‌ی آپتامرهای H8 و H12، اولین کیت ELAA برای این سم ساخته شد (۱۳). همچنین، برای شناسایی دقیق آدیپونکتین، برای تشخیص زودرس دیابت نوع ۲، روشی که به طور هم‌زمان از آنتی‌بادی و آپتامر استفاده می‌کند، به نام Enzyme-linked aptamer assays (ELAAs) مورد استفاده قرار گرفته است (۱۴). در تحقیق دیگری، Gu و همکاران، DNA آپتامری که به طور اختصاصی با میل ترکیبی بالا به Okadic acid متصل می‌شود، به دست آوردند. سپس، آن را در شناسایی سم پیش‌گفته در روش ELAA به کار بردند (۱۵). همچنین، در یک مطالعه‌ی

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد به شماره‌ی طرح ۳۹۵۶۹۶ مصوب دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد. بدین وسیله، از این دانشگاه جهت تأمین هزینه‌های انجام طرح سپاسگزاری می‌گردد.

مرحله‌ی بعد، آنتی‌ژن به محیط اضافه شود، روش‌های کارآمدتری باشد. این روند، علاوه بر آن که مانع تغییرات احتمالی در ساختار آنتی‌ژن حین تثبیت شدن در چاهک‌ها می‌شود، با قابل اندازه‌گیری کردن آنتی‌ژن‌های تثبیت شده، به یکسان‌سازی و استانداردسازی همه‌ی آزمایش‌ها و همه‌ی چاهک‌ها کمک می‌نماید.

References

1. Poorolajal J, Majdzadeh R. Prevalence of chronic hepatitis B infection in Iran: A review article. *J Res Med Sci* 2009; 14(4): 249-58
2. World Health Organization. Global hepatitis report, 2017. Geneva, Switzerland: WHO; 2017.
3. Zidan A, Scheuerlein H, Schule S, Settmacher U, Rauchfuss F. Epidemiological pattern of hepatitis B and hepatitis C as etiological agents for hepatocellular carcinoma in Iran and worldwide. *Hepat Mon* 2012; 12(10 HCC): e6894.
4. Kidd-Ljunggren K, Myhre E, Blackberg J. Clinical and serological variation between patients infected with different Hepatitis B virus genotypes. *J Clin Microbiol* 2004; 42(12): 5837-41.
5. Pishtaz Teb. HBsAg ELISA kit [Online]. Available from: URL: <http://www.pishtazteb.com/product/p25-HBs-Ag>
6. Jayasena SD. Aptamers: An emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clin Chem* 1999; 45(9): 1628-50.
7. Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* 1990; 249(4968): 505-10.
8. Zhu Q, Liu G, Kai M. DNA aptamers in the diagnosis and treatment of human diseases. *Molecules* 2015; 20(12): 20979-97.
9. Bock LC, Griffin LC, Latham JA, Vermaas EH, Toole JJ. Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature* 1992; 355(6360): 564-6.
10. Nussbaum O. Nucleic acid aptamer-based diagnostic methods with novel techniques for signal enhancement [Patent: EP2591107A2]. 2013.
11. Thermo Scientific. ELISA technical guide and protocols (TECH TIP # 65) [Online]. [cited 2017]; Available from: URL: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/TR0065-ELISA-guide.pdf>
12. Mayer G. The chemical biology of aptamers. *Angew Chem Int Ed Engl* 2009; 48(15): 2672-89.
13. Barthelmebs L, Jonca J, Hayat A, Prieto-Simon B, Marty JL. Enzyme-Linked Aptamer Assays (ELAAs), based on a competition format for a rapid and sensitive detection of Ochratoxin A in wine. *Food Control* 2011; 22(5): 737-43.
14. Lee SJ, Park JW, Kim IA, Youn BS, Gu MB. Sensitive detection of adipokines for early diagnosis of type 2 diabetes using enzyme-linked antibody-aptamer sandwich (ELAAS) assays. *Sens Actuators B Chem* 2012; 168: 243-8.
15. Gu H, Duan N, Wu S, Hao L, Xia Y, Ma X, et al. Graphene oxide-assisted non-immobilized SELEX of okadaic acid aptamer and the analytical application of aptasensor. *Sci Rep* 2016; 6: 21665.
16. Fu P, Sun Z, Yu Z, Zhang Y, Shen J, Zhang H, et al. Enzyme-linked aptamer assay: based on a competition format for sensitive detection of antibodies to *Mycoplasma bovis* in serum. *Anal Chem* 2014; 86(3): 1701-9.
17. Chen LC, Yang DK, Hsu CH, Lee MY. Aptamer for detection of alpha-methylacyl-coa racemase and diagnostic kit thereof [Patent: US20160177397A1]. 2016.
18. Penner G. Commercialization of an Aptamer-Based Diagnostic Test [Online]. [cited 2012 5 Sep]; Available from: URL: <https://www.mddionline.com/commercialization-aptamer-based-diagnostic-test>
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.

Using Enzyme-Linked Aptamer Assay to Detect Hepatitis B Surface Antigen in Comparison to Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Hamidreza Mianesaz¹, Hossein Khanahmad², Mina Mirian³, Maryam Boshtam⁴, Seyed Nezamoddin Hoseini⁵

Original Article

Abstract

Background: Clinical diagnostic kits for detecting hepatitis B are based on antibodies, and have inefficient sensitivity, stability, and cost. Therefore, researches about aptamers and using them instead of antibodies may make these defects up. In this study, a biotinylated anti-hepatitis B virus surface antigen (anti-HBsAg) aptamer sequence was used to evaluate the possibility of specific detection of HBsAg via enzyme-linked aptamer assay (ELAA) method using biotin-streptavidin system.

Methods: HBsAg was immobilized in Maxibinding plate (SPL, Korea) by using carbonate-bicarbonate buffer (pH: 9.4), and by considering different variables. Immobilization of HBsAg was evaluated by commercial kit. Aptamer sequence was cloned and imbalance polymerase chain reaction (PCR) was improved and performed using plasmid as DNA template. Then, biotinylated aptamer was utilized in enzyme-linked aptamer assay method via taking advantage of streptavidin-biotin signal amplification system.

Findings: Antigen immobilization was set up using conjugates number 1 and 2 of commercial kit. Colony polymerase chain reaction confirmed aptamer cloning in Escherichia coli (E. coli) Top10 host. The best gradient polymerase chain reaction result was achieved at 64 °C annealing temperature. Control group in assays showed accuracy of immobilization; but no repetitive specific signal was obtained that could prove joining of aptamer to HBsAg, and detection of that.

Conclusion: Three-dimensional structure of an immobilized antigen on a solid surface may vary from that which exists on the surface of viruses or cells. Negative results might be due to the ability of aptamers to attach into antigens with totally intact shape. Conjugation of aptamer with biotin may interfere in aptamer conformation; so, a connective arm between aptamer and biotin could be a suggestion, which needs more assessments.

Keywords: DNA aptamers, Enzyme-linked immunosorbent assay, Hepatitis B, Hepatitis B surface antigens

Citation: Mianesaz H, Khanahmad H, Mirian M, Boshtam M, Hoseini SN. Using Enzyme-Linked Aptamer Assay to Detect Hepatitis B Surface Antigen in Comparison to Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. J Isfahan Med Sch 2018; 36(471): 233-40.

1- MSc Student, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Associate Professor, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- PhD, Department of Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy, Isfahan University of Medical Science, Isfahan, Iran

4- PhD Candidate, Isfahan Cardiovascular Research Center, Cardiovascular Research Institute, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

5- Associate Professor, Hepatitis B Vaccine Production Section, The Production and Research Complex, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Corresponding Author: Hossein Khanahmad, Email: hossein_khanahmad@yahoo.com