

نانوسیم‌های اپتامر و کاربردهای بیولوژیکی آنها

الله اسماعیلی، متین محمودی فرد

دانشگاه صنعتی شریف، پژوهشکده علوم و فناوری نانو

چکیده

اپتامرها الیگونوکلوئوتیدهایی مثل ریبونوکلیک‌اسید (RNA) و تک‌شاخه‌ی دئوکسی‌ریبونوکلیک‌اسید (ssDNA) هستند که به دلیل ساختار سه‌بعدی خاص‌شان با میل ترکیبی زیاد و اختصاصیت بالا به هدف موردنظر وصل می‌شوند. اپتامرها در زمینه‌های مختلفی مثل ابزارهای تشخیص و درمانی، پروب بیوسنسور و توسعه‌ی داروهای جدید و سیستم‌های حمل دارو قابل کاربرد است. آنتی‌بادی‌ها معروفترین مواد برای تشخیص مولکولی می‌باشند، اپتامرها علاوه بر مزایای آنتی‌بادی‌ها دارای خصوصیتی چون پایداری گرمایی بالا و تحریک پاسخ‌ایمنی کم می‌باشند، بنابراین توجه بسیاری از دانشمندان را به خود جلب کرده‌اند. در این پژوهش دلایل جایگزینی اپتامرها به جای آنتی‌بادی‌ها مورد بررسی قرار گرفته است. به علاوه تعدادی از فرآیندهای انتخاب در محیط مصنوعی شامل کروماتوگرافی میل ترکیبی، بیدهای مغناطیسی و الکتروفورز موینیکی توضیح داده می‌شود. همچنین کاربردهای مختلف اپتامرها برای تشخیص مولکول‌های کوچک و پروتئین‌ها، تصویربرداری رزونانس مغناطیسی و انتقال دارو مورد بررسی قرار می‌گیرد. تکنیک‌های آنالیزوری مختلف مثل الکتروشیمیایی، اپتیکی و روش‌های حساس به جرم به دلیل اصلاحات متداول و پایداری اپتامرها می‌توانند برای شناسایی هدف به کار برده شوند و در نهایت برخی کاربردهای آنالیزوری و پزشکی اپتامرها ارائه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: اپتامر، تکامل ستماتیک لیگاند با غنی‌سازی‌نمایی، اپتاسنسور

e_esmaeili@mehr.sharif.ir

۱- مقدمه

برای درمان AMD است، توسط سازمان غذا و دارو (FDA) تصویب شد که نقطه‌تحوالی در کاربرد اپتامرها محسوب می‌شود [۷]. از آن پس تکنولوژی اپتامر توجه زیادی را به خود جلب کرد و مطالعات روی کاربرد اپتامرها افزایش یافت.

بیش از سه دهه است که آنتی‌بادی‌ها معروف‌ترین دسته برای شناسایی مولکولی می‌باشند. اپتامرها به دلیل عدم وجود برخی از مشکلات آنتی‌بادی‌ها به عنوان جایگزینی برای آنها به کار رفته‌اند. مزایای اپتامرها نسبت به آنتی‌بادی‌ها در ذیل آمده است: اپتامرها نه تنها به مولکول‌های بزرگی مثل پروتئین‌ها و سلول‌ها متصل می‌شوند بلکه به مولکول‌های کوچکی مثل نوکلئوتیدها، رنگینه‌های آلی، آمینواسیدها و یون‌های فلزی نیز متصل می‌شوند، درحالی‌که آنتی‌بادی‌ها عموماً برای اتصال به مولکول‌های بزرگتر مناسب هستند. بنابراین وقتی که مولکول‌های کوچک در تشخیص و رهایش دارو به عنوان هدف باشند اپتامرها کارآمدتر هستند.

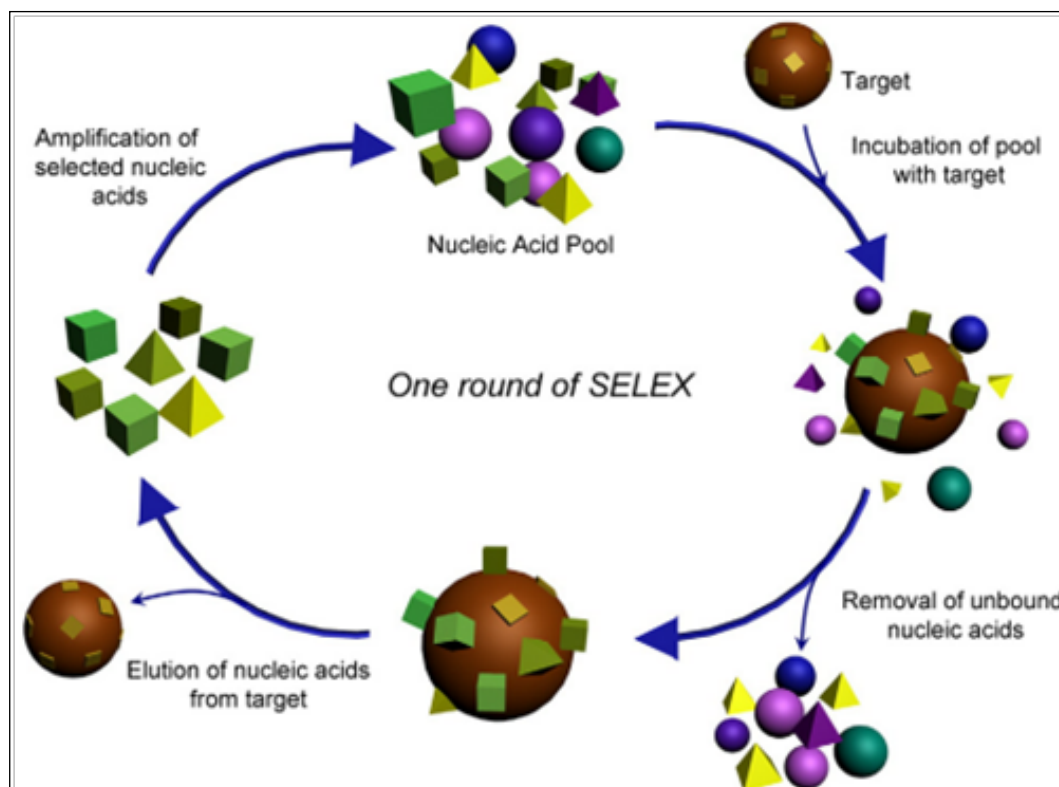
اپتامرها به صورت *in vitro* انتخاب می‌شوند بنابراین می‌توانند برای گستره‌ی وسیعی از هدف‌ها مثل مولکول‌های سمی یا غیرایمونوژنیک به کار روند. به علاوه شرایط انتخاب می‌تواند تحت شرایط غیرفیزیولوژیکی مثل دما یا pH کم یا زیاد انجام شود، ولی آنتی‌بادی‌ها به دلیل شرایط تولید *in vivo* دارای چنین مزایایی نیستند. وقتی که یک نوع اپتامر انتخاب می‌شود، می‌توانند در مقادیر زیاد به طریق سنتز شیمیایی که مقرون به صرفه است، حاصل شود.

عامل دارکردن شیمیایی اپتامرها با انواع فلوروفورها، نشانگرهای الکتروشیمیایی یا رمان، گروه‌های عاملی مثل آمین نوع اول، تیول در انتهای ۵ یا ۳، روی بازها یا روی رشته بلند DNA آسان است. به علاوه اپتامرها می‌توانند به صورت نانو ساختارهای براساس DNA یک، دو یا سه بعدی شکل بگیرند که در کاربردهای بالینی یا تشخیصی مفید است. در طراحی میکروآرایه‌ها، اپتامرها مزایایی دارند. برای مثال از آنجاییکه سایز اپتامرها ($10\text{kDa} < 1-2\text{nm}$) از آنتی‌بادی‌ها ($155\text{kDa} \sim 10\text{nm}$) کمتر است، اپتامرها دانسیته سطحی بیشتر و ممانعت فضایی کمتری دارند که بازدهی اتصال را افزایش می‌دهد. به علاوه جذب سطحی غیراختصاصی برای نوکلئیک‌اسید ثابت شده روی سطح نسبت به پروتئین ثابت شده روی سطح

اپتامرها الیگونوکلوئوتیدهایی مثل ریبونوکلیک‌اسید (RNA) و تک‌شاخه‌ی دئوکسی‌ریبونوکلیک‌اسید (ssDNA) هستند که به دلیل ساختار سه‌بعدی خاص‌شان با میل ترکیبی زیاد و اختصاصیت بالا به هدف موردنظر وصل می‌شوند [۱]. میل ترکیبی برای اتصال اپتامرها بسیار وابسته به هدف است و برای هدف‌های پروتئینی مختلف در دامنه‌ی پیکومولار ($10^{-12}\text{M} \times 1$) تا 10^{-7}M (high-nanomolar) می‌باشد. وقتی ترکیبات آلی کوچک به عنوان هدف قرار گیرند، ثابت تفکیک در حدود میکرومولار است؛ زیرا مولکول‌های کوچک سایت‌های برهمکنش کمتری دارند [۲].

انتخاب طبیعی یکی از مکانیسم‌هایی اساسی تکامل است که در حدود ۱۵۰ سال پیش توسط داروین کشف شد. ولی انتخاب *in vitro* مصنوعی اخیراً مورد اهمیت قرار گرفته است [۳]. مفهوم اتصال نوکلئیک‌اسیدها به پروتئین‌ها از سال ۱۹۸۰ با تحقیقات روی HIV و آدنوویروس آغاز شد [۴]. الیگونوکلوئوتید RNA کارکردی، اپتامر نام گرفت که از واژه لاتین aptus به معنی to fit گرفته شده است [۳]. از زمان فرآیند انتخاب *in vitro* به نام تکامل ستماتیک لیگاند با غنی‌سازی‌نمایی (SELEX) که برای اولین بار توسط گروه‌های Gold و Szostak در ۱۹۹۰ گزارش شد؛ مطالعات روی اپتامرها پیشرفت قابل توجهی کرد [۵، ۶]. با توسعه SELEX که هم‌اکنون تکنیک پایه برای جداسازی اپتامرهاست، اپتامرهای زیادی به صورت *in vitro* در برابر هدف‌های مختلف مثل پروتئین، پپتید، آمینواسید، داروها، یون‌های فلزی و حتی برای کل سلول انتخاب شده‌اند. اپتامر به دلیل امکان اتصال و پیچش میل ترکیبی زیادی نسبت به هدف دارد. به عبارت دیگر آنها می‌توانند مولکول‌های کوچک را درون ساختار نوکلئیک‌اسیدی خود جا دهند و یا درون ساختار ماکرومولکولی پروتئین‌ها گنجانده شوند [۳].

اپتامرها در زمینه‌های مختلفی مثل ابزارهای تشخیص و درمانی، پروب بیوسنسور و توسعه‌ی داروهای جدید و سیستم‌های حمل دارو قابل کاربرد است [۴]. تلاش‌های بسیاری برای حصول اپتامرهایی که خاص بیماری‌های مختلفی مثل سرطان یا عفونت‌های ویروسی است، انجام شده است. در سال ۲۰۰۴ ماوکژن که اپتامر مخصوص فاکتور رشد درون‌پوشگر (VEGF)



شکل ۱- تصویر شماتیک فرآیند [۸] SELEX.

کمتر است. در نهایت، اپتامرها در برابر گرما، pH و حلال‌های آلی بسیار پایدارتر از آنتی‌بادی‌ها هستند و برخلاف آنتی‌بادی‌ها می‌توانند بدون فقدان قابل‌توجه فعالیت دنا توره و رنا توره شوند. اپتامرها معمولاً مولکول‌هایی با سمیت و ایمونوژنیک کم هستند. زیرا معمولاً نوکلئیک اسیدها به وسیله سیستم ایمنی بدن به عنوان عوامل خارجی شناخته نمی‌شوند، ولی آنتی‌بادی‌ها به طور قابل توجهی ایمونوژنیک هستند که مانع استفاده از دوز بالایی از آنها می‌شود. اپتامرها با اتصال به هدف اغلب دستخوش تغییرات کنفورماسیونی قابل توجهی می‌شوند که این موضوع انعطاف پذیری اپتامرها در طراحی بیوسنسورهای جدید با حساسیت و گزینش پذیری بالا را نشان می‌دهد. به دلیل مزایای ذکر شده در بالا، اپتامرها به عنوان جایگزینی برای آنتی‌بادی‌ها در بسیاری از کاربردهای بیولوژیکی در نظر گرفته می‌شوند.

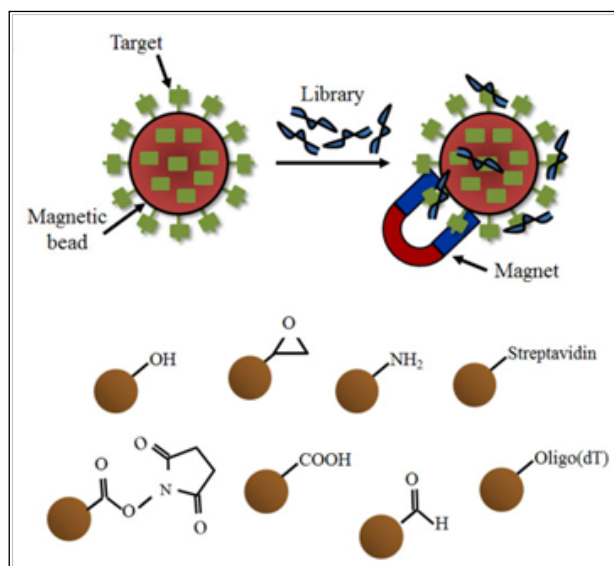
۲- گزینش In vitro

SELEX یا گزینش in vitro تکنیکی است که برای جداسازی اپتامرهای با میل ترکیبی زیاد برای هدفی خاص از میان ۱۰۱۲-۱۰۱۵ کتابخانه الیگونوکلوئیدی ترکیبی استفاده می‌شود. به طور کلی فرآیند SELEX شامل سه مرحله است که به منظور یافتن نوکلئوتیدی با توانایی اتصال بهتر به هدف تکرار می‌شود (شکل ۱). در مرحله اول (تولید کتابخانه)، ۱۰۱۴-۱۰۱۵ شاخه الیگونوکلوئیدی با توالی‌های تصادفی به صورت شیمیایی سنتز می‌شود و با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) تقویت می‌شود. در مرحله دوم (اتصال و جداسازی) کتابخانه نوکلئیک اسیدی در معرض مولکول هدف قرار می‌گیرد که اغلب روی ماتریس حالت جامدی مثل ژل یا ستون ثابت شده است، به طوریکه

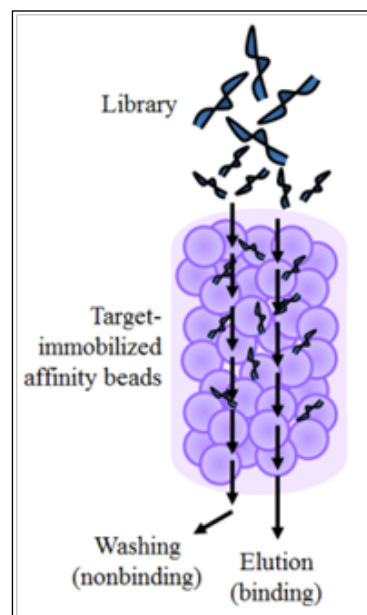
DNA یا RNA ای که دارای میل ترکیبی با مولکول هدف باشد به آن متصل می‌شود. سپس مولکول‌های نوکلئیک اسید متصل به هدف از انواع متصل نیافته جدا می‌شود. در نهایت در مرحله سوم (تقویت سازی) شاخه DNA یا RNA متصل به هدف از هدف جدا می‌شود و تقویت سازی با استفاده از PCR انجام می‌شود و مجموعه جدیدی از نوکلئیک اسیدها حاصل می‌شود که از توالی‌هایی با میل ترکیبی بیشتر با هدف، غنی است. چرخه بعدی فرآیند گزینش تحت شرایط سخت تری مثل غلظت هدف کمتر و زمان کمتر برای اتصال انجام می‌شود. بعد از ۱۰-۲۰ چرخه از فرآیند گزینش، الیگونوکلوئیدی با بیشترین میل ترکیبی به مولکول هدف حاصل می‌شود [۴].

کروماتوگرافی میل ترکیبی روشی برای جداسازی اجزای سازنده مخلوط بیوشیمیایی است. این روش بر اساس برهمکنش بیولوژیکی بسیار اختصاصی بین موادی مثل گیرنده و لیگاند یا آنتی ژن و آنتی بادی برای تخلیص پروتئین‌های نو ترکیب به کار می‌رود. فاز ثابت عموماً دانه‌های آگارس است و دانه‌ها در ستونی برای شستشو و استخراج متراکم شده‌اند. مولکول‌های هدف روی دانه‌ها تثبیت می‌شود و اجزایی که دارای میل ترکیبی با هدف باشند انتخاب می‌شوند (شکل ۲). در مورد تثبیت پروتئین‌ها، برچسب‌های مختلف و در مورد مولکول‌های آلی کوچک، هدف با واکنش شیمیایی به صورت کووالانسی (مثل اتصال با EDC) روی دانه‌ها ثابت می‌شود. عیب این روش آن است که اگر هدف، برچسب یا گروه عاملی لازم برای اتصال به دانه‌ها را نداشته باشد، این روش کارآمد نخواهد بود.

دانه‌های مغناطیسی نیز برای تثبیت هدف با واکنش شیمیایی بین برچسب و بیدها استفاده می‌شود. استفاده از بیدهای مغناطیسی برای جداسازی سریع و آسان هدف تثبیت شده روی بید با مگنت مفید است (شکل ۳).



شکل ۳- فرآیند SELEX به روش دانه‌های مغناطیسی و روش‌های مختلف عامل‌دار کردن بیدها.



شکل ۲- فرآیند SELEX به روش کروماتوگرافی میل‌ترکیبی.

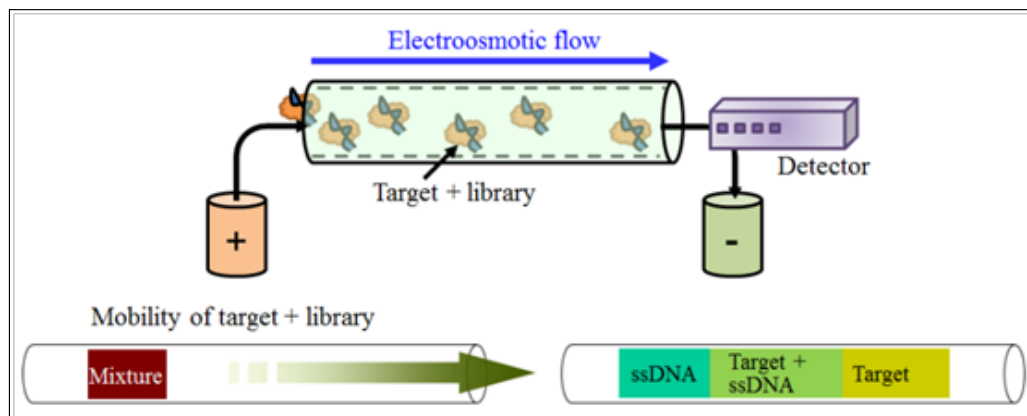
به‌علاوه از آنجاییکه اپی‌توپ‌های مختلفی روی هدف‌ها وجود دارد، تولید اپتایمر برای ناحیه خاصی از هدف وجود دارد که این فرآیند سختی برای آنتی‌بادی‌هاست. تا هم-اکنون، اپتایمرها در برابر گستره‌ی وسیعی از اهداف شامل یون‌های فلزی (مثل Hg^{2+} و Pb^{2+}), مولکول‌های آلی کوچک (مثل آمینو اسیدها، ATP، آنتی‌بیوتیک، ویتامین و کوکائین)، رنگینه‌های آلی، پپتیدها و پروتئین‌ها (مثل ترومبین، فاکتورهای رشد و پپتیدهای مربوط به HIV) و یا حتی کل سلول یا میکروارگانیسم‌ها (مثل باکتری) انتخاب شده‌اند [۳].

۴- اپتاسنسور

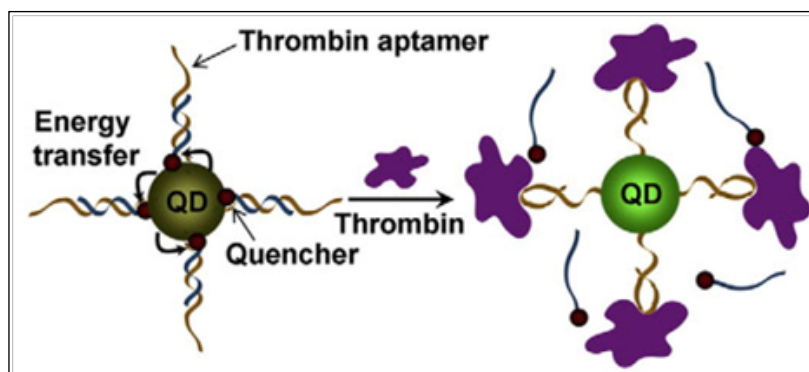
بیوسنسوری که براساس اپتایمر به‌عنوان عنصر شناسایی ساخته شود اپتاسنسور نامیده می‌شود. بیوسنسورهای براساس اپتایمر نسبت به آنتی‌بادی‌ها قابلیت استفاده مجدد را دارند. به‌علاوه، سایز کوچک و تنوع آنها امکان تثبیت در دانسیته بالا را می‌دهد که اهمیت زیادی در سیستم‌های مینیاتوری multiplex مثل بیوآرایه‌ها و بیوتراشه‌ها دارد. اپتاسنسورها براساس روش‌های مختلفی مثل بیوسنسورهای الکتروشیمیایی، بیوسنسورهای اپتیکی و بیوسنسورهای حساس به جرم ساخته می‌شوند.

۳- هدف‌ها

اپتایمرها همچنین به‌دلیل فرآیند مصنوعی تولید شدن براساس SELEX، آنتی‌بادی‌های شیمیایی نام گرفته‌اند. برخلاف آنتی‌بادی‌ها که بر تحریک سیستم ایمنی حیوان استوار است، فرآیند SELEX، تولید اپتایمر برای اهداف سمی و غیرایمونوژنیک که به‌دست آوردن آن توسط سیستم ایمنی بدن غیرممکن است را امکان‌پذیر می‌سازد.

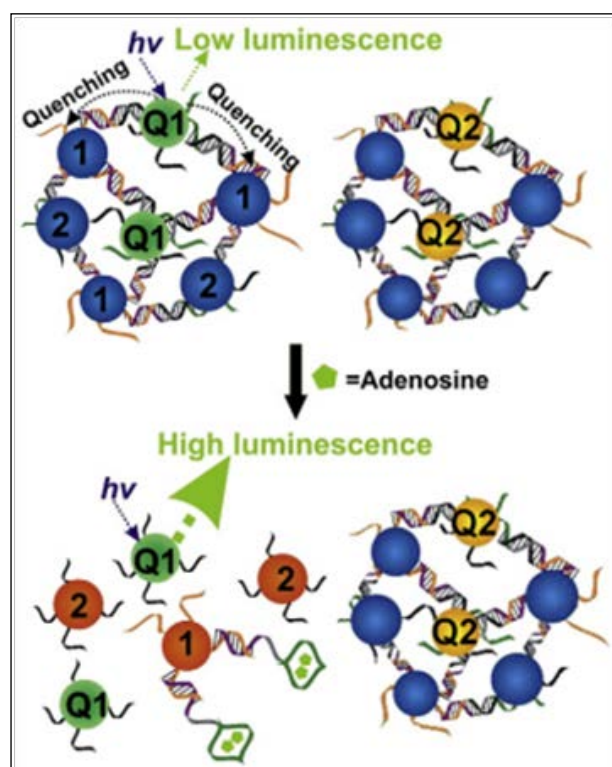


شکل ۴- فرآیند SELEX به روش الکتروفورز موینیکی.



شکل ۵- سنسور فلورسانس براساس ایتامر-QDs [۸].

شود که از این نظر دارای مزیت می‌باشد. نانوذرات فلزی مثل طلا یا نقره، موادی ایده‌آل برای شناسایی کالریمتریک هستند. نانوذرات طلا دارای ضریب خاموشی بالا هستند، بنابراین رنگ آنها بدون هیچ ابزاری حتی در غلظت نانومولار قابل تمیز است. AuNPs پخش شده با سایز کمتر از ۱۰۰ nm در محلول مایل به قرمز است. وقتی نانوذرات طلا تجمع می‌کنند به دلیل شیفت رزونانس پلاسمون سطحی آنها به طول موج‌های بالاتر، رنگ آنها از قرمز به آبی تغییر می‌کند.



شکل ۶- شناسایی چندین آنالیت با استفاده از QDs به روش فلورسانس. [۹]

دو روش برای طراحی سنسورهای براساس AuNP-DNA وجود دارد. روش نشاندار شده براساس مونتاژ (یا جداسازی) AuNPs به دلیل تغییر کنفورماسیون، شکافتگی یا اتصال مولکول‌های DNA خاص آنالیت است. دو

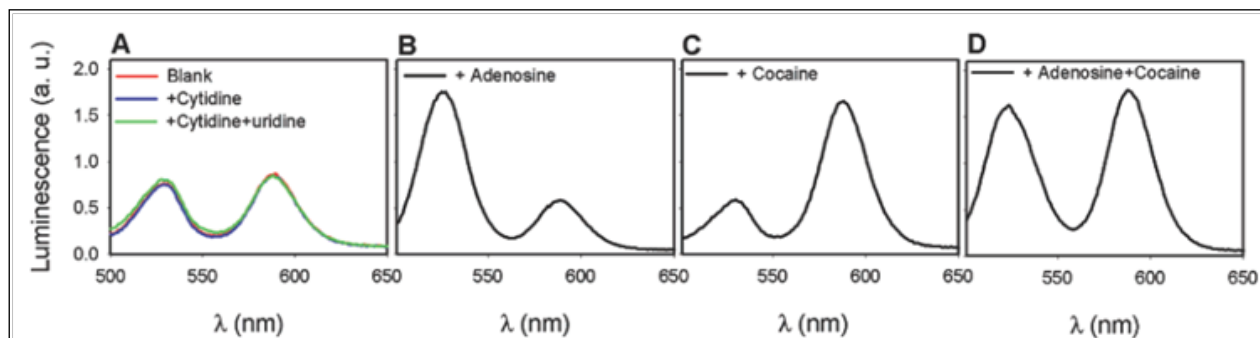
۵-۱- سنسور براساس فلورسانس:

ایتامرها می‌توانند به آسانی با انواع مختلف رنگینه‌های آلی عامل‌دار شوند. ساده‌ترین حالت این نوع سنسورهای ایتیکی، نشاندار کردن ایتامر با فلوروفور و خاموشگر است. نقاط کوانتومی (QDs) یا نانوذرات نیمه‌رسانا یکی از مواد فلورسان با خواص ایتیکی منحصربه‌فرد هستند. درمقایسه با رنگینه‌های فلورسان آلی، نقاط کوانتومی در برابر نور پایداری دارند و طول موج نور نشر شده با تغییر سایز و ترکیب مواد قابل کنترل است. به علاوه نقاط کوانتومی دامنه‌ی تهییج وسیع و نشر تیزی دارند. بنابراین می‌توان نقاط کوانتومی مختلف را با یک طول موج تحریک کرد ولی نشر در طول موج‌های مختلف رخ دهد. براساس این خصوصیات، نقاط کوانتومی در بیوتصویربرداری و تشخیص قابل کاربرد هستند. اولین QD متصل با ایتامر توسط Ellington و همکارانش براساس انتقال انرژی برای شناسایی ترومبین گزارش شد. در این کار، QD عامل‌دار شده با ایتامر ترومبین با شاخه مکمل DNA نشاندار شده با خاموشگر در انتهای آن هیبرید می‌شود. در غیاب ترومبین، به دلیل اینکه QD در مجاورت خاموش ساز قرار گرفته است، باعث انتقال انرژی از QD به خاموش ساز و در نتیجه خاموش سازی سیگنال فلورسانس QD می‌شود. در حضور ترومبین، برهمکنش ایتامر-ترومبین باعث رها شدن شاخه مکمل حاوی خاموش ساز شده، بنابراین سیگنال فلورسانس بازیابی می‌شود (شکل ۵) [۸].

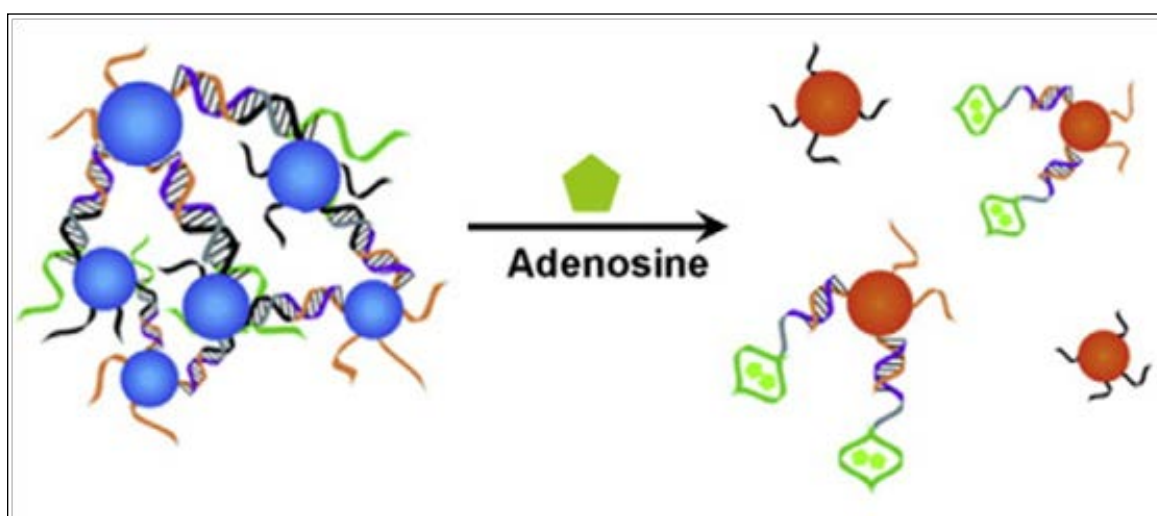
برای کاربردهای پزشکی مورد توجه است که با استفاده از یک سنسور در یک مرحله، شناسایی بیش از یک آنالیت انجام شود. Liu و همکارانش شناسایی multiplex مربوط به آدنوزین و کوکائین با استفاده از QDs و نانوذرات طلای متصل به ایتامر را گزارش کردند (شکل ۶). در این کار، تجمعات QDs با طول موج نشر ۵۲۵ nm، نانوذرات طلا و ایتامر خاص آدنوزین و همچنین تجمعات QDs با پیک نشر در ۵۸۵ nm، نانوذرات طلا و ایتامر خاص کوکائین ساخته شد. در این سنسور به دلیل انتقال انرژی از هر QD به AuNPs فلورسانس خاموش می‌شود. با افزودن آدنوزین، سیگنال فلورسانس در ۵۲۵ nm و با افزودن کوکائین سیگنال فلورسانس در ۵۸۵ nm مشاهده می‌شود. زیرا در حضور آنالیت، برهمکنش ایتامر به آنالیت باعث جداسازی تجمعات QD-AuNPs می‌شود [۹].

۵-۲- سنسور کالریمتریک:

از آنجایی که سنسورهای براساس فلورسانس براساس نشر فلوروفورها یا نقاط کوانتومی پس از تهییج در طول موج خاص استوار است، لازم است که تجهیزات آنالیزوری مثل فلوریتر یا میکروسکوپ فلورسانس برای شناسایی داشته باشیم. شناسایی کالریمتریک می‌تواند به وسیله چشم غیرمسلح انجام



شکل ۷- سنسور کالریمتیک نشاندار براساس ایتامر- [Au NP۱۰].



شکل ۸- سنسور کالریمتیک بی‌نشان براساس Au NP- ایتامر [۱۱].

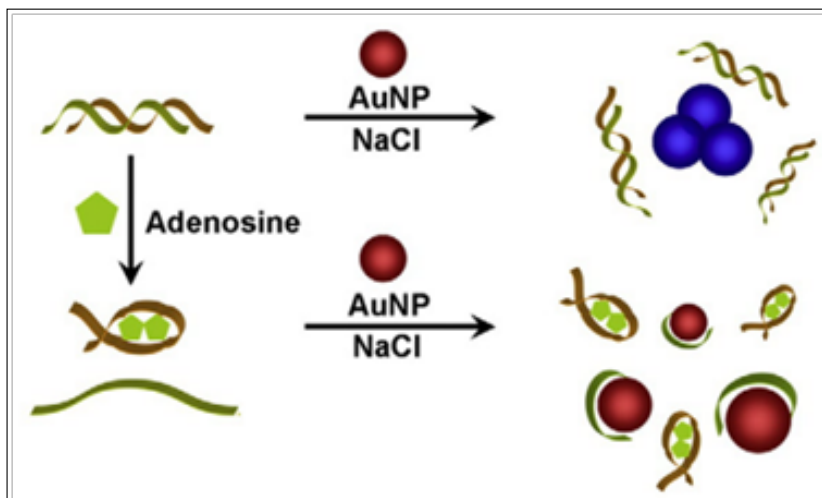
در حضور هدف، AuNPs جدا شده و منجر به رنگ قرمز می‌شود (شکل ۷). تغییر رنگ در کمتر از یک دقیقه اتفاق می‌افتد [۱۰]. روش نشاندار برای دیگر مولکول‌های کوچک و پروتئین‌ها به کار برده شده است. Fan و همکارانش، شناسایی کالریمتیک ATP را با استفاده از AuNPs اصلاح‌شده و ایتامرهای ATP با روش بدون نشان گزارش کردند (شکل ۸). AuNPs در غیاب ATP، به صورت تجمعی بوده و رنگ آبی را نشان می‌دهند. ولی در حضور ATP به صورت پخش بوده و رنگ قرمز را نشان می‌دهند. سنسور حساسیت بالا و حد تشخیص $0.6 \mu\text{M}$ دارد. این روش شناسایی کالریمتیک براساس ایتامر بدون نشان برای دیگر آنالیت‌ها مثل پتاسیم، کوکائین و ترومبین به کار برده شده است [۱۱].

Li و همکارانش، روشی را براساس ترکیب روش‌های نشاندار و بدون نشان گزارش کردند. آنها در ابتدا شاخه‌های DNA کوتاه را روی AuNPs به صورت شیمیایی قرار دادند و سپس این شاخه‌ها را با شاخه‌های ایتامر مکمل بلند هیبرید کردند (شکل ۹). DNA ایتامر بلند، بار منفی اضافی برای AuNPs ایجاد می‌کند که پایداری آنها را در حضور مقدار خاصی از NaCl افزایش می‌دهد. وارد کردن مولکول هدف باعث برهمکنش بین مولکول هدف و شاخه ایتامر می‌شود. بنابراین شاخه ایتامر از AuNPs جدا می‌شود. جدا شدن ایتامر باعث کاهش تعداد بارهای منفی روی AuNPs شده و بنابراین باعث کاهش پایداری AuNPs می‌شود و رنگ از قرمز به آبی تغییر می‌کند [۱۲].

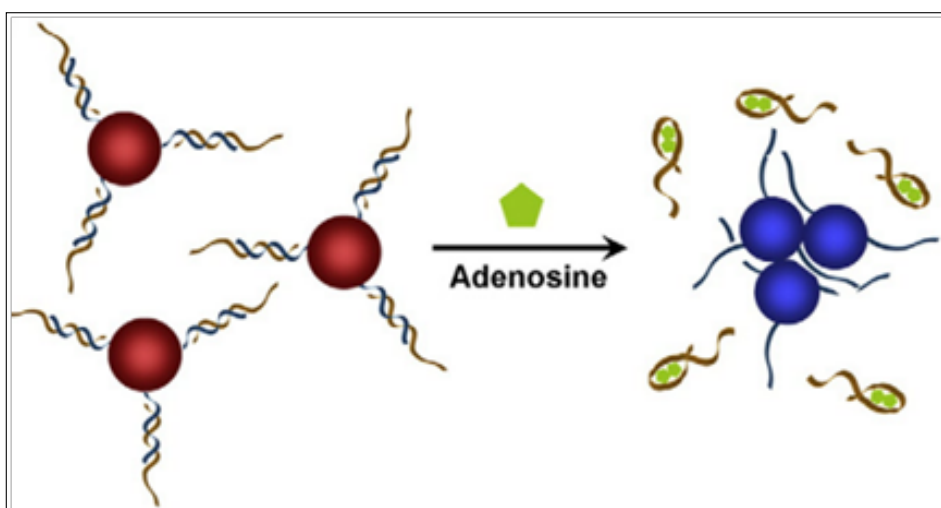
دسته از نانوذرات طلا که هر دسته براساس شیمی Au به تیول با شاخه‌های DNA مختلف عامل‌دار شده‌اند باهم مخلوط می‌شوند، بنابراین به دلیل بار منفی DNA، نانوذرات طلای پخش شده حاصل می‌شود. در حضور شاخه DNA پل که با دو شاخه DNA مختلف روی سطح AuNP مکمل است، AuNPs تجمع می‌یابند و رنگشان از قرمز به آبی تغییر می‌کند. روش بدون نشان براساس خواص جذب-سطحی متفاوت DNA تک‌شاخه، ss(DNA) و ds(DNA) روی نانوذرات طلای اصلاح‌شده با سیترات استوار است. AuNPs اصلاح‌شده با سیترات در حضور NaCl ناپایدار بوده و به آسانی تجمع می‌یابند.

از آنجایی که ssDNA انعطاف‌پذیر است و می‌تواند به‌طور جزئی واپیچیده شود، می‌تواند به آسانی روی سطح AuNPs جذب سطحی شده که باعث افزایش دافعه الکتروستاتیک بین AuNPs می‌شود که حتی در حضور NaCl، نانوذرات طلا را پایدار می‌کند. از سوی دیگر، از آنجایی که dsDNA سخت است و دارای بدنه‌ی فوسفاتی با بار منفی است، بنابراین نانوذرات طلای اصلاح‌شده با سیترات با بار منفی را دفع کرده که منجر به تجمع AuNPs می‌شود. ایتامرهای می‌توانند در هر دو سیستم برای شناسایی کالریمتیک به کار روند [۱].

در سال ۲۰۰۶، سنسور کالریمتیک به روش نشاندار برای شناسایی آدنوزین و کوکائین به کار برده شد. در غیاب مولکول هدف، AuNPs اصلاح‌شده با ایتامر به صورت تجمعی باقی می‌مانند و رنگ آبی قابل مشاهده است، ولی



شکل ۹- سنسور کالریمتریک براساس ترکیب روش‌های نشاندار و بدون نشان [۱۲].



شکل ۱۰- اپتاسنسور SERS برای شناسایی پروتئین [۱۳].

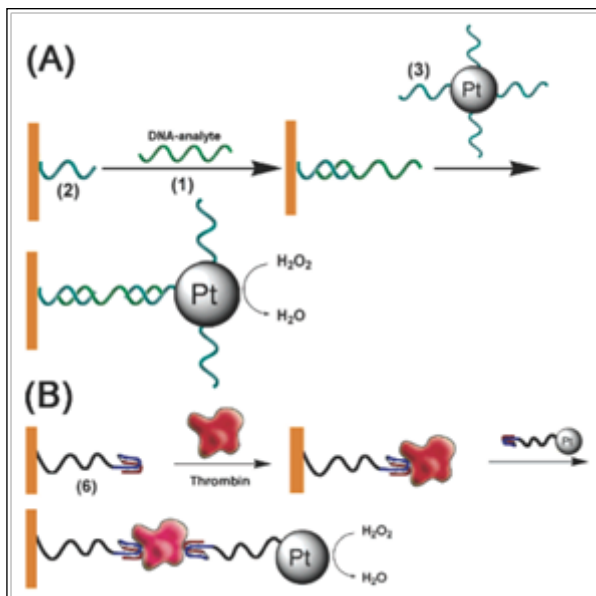
شناسایی α -ترومبین با SERS استفاده کردند (شکل ۱۰). ترومبین دارای دو سایت پیوندی با میل ترکیبی زیاد با اپتامرهای DNA مختلف است. ابتدا سببیت عامل‌دار شده با اپتامر ۱ با ترومبین وارد واکنش می‌شود و سپس در معرض AuNPs عامل‌دار شده با اپتامر ۲ و نشانگر SERS قرار می‌گیرد. در نتیجه، AuNPs از طریق برهمکنش اپتامر-ترومبین به سطح وصل می‌شود. بعد از نشست AgNPs، ذرات بزرگتر می‌شوند، در نتیجه پراکندگی رامان، تقویت شده و سیگنال بسیار حساسی حاصل می‌شود. حد تشخیص این سیستم 0.5 nM گزارش شده است [۱۳].

Yu و همکارانش روشی متفاوت را برای شناسایی آدنوزین با استفاده از اپتامرها ارائه کردند. آنها از dsDNA شامل شاخه اپتامر آدنوزین و شاخه DNA کوتاه مکمل پاره‌ای با نشانگر رامان استفاده کردند (شکل ۱۱). در حضور آدنوزین، اپتامر دستخوش تعویض ساختار می‌شود که منجر به دناتوره شدن dsDNA می‌شود. بنابراین الیگونوکلوئید نشاندار شده با پروپ رامان در محلول رها می‌شود. شاخه رها شده با DNA مکمل که قبلاً روی سطح طلای زبر ثابت شده بود، هیبرید می‌شود. این مجموعه فرآیندها منجر به افزایش سیگنال رامان می‌شود [۱۴].

۵-۳- پراکندگی رامان افزایش یافته سطحی (SERS):

پراکندگی رامان یک روش اپتیکی است که از پراکندگی غیرکشسان فوتون استفاده می‌کند. این روش نسبت به فلورسانس دارای مزایایی مانند حصول اطلاعات ساختاری مولکول، پایداری در برابر photobleaching و پهنای طیفی باریکتری ($> 1 \text{ nm}$ پهنای در نصف ارتفاع) می‌باشد که در شناسایی multiplex اهمیت دارد. از آنجایی که سطح مقطع رامان، ضعیف و ناکارآمد است ($10^{-3} \text{ cm}^2/\text{molecules}$ در برابر $10^{-16} \text{ cm}^2/\text{molecules}$ برای فلورسانس) محدودیتی در استفاده از پراکندگی رامان به عنوان ابزاری برای شناسایی‌های بسیار حساس وجود دارد. در سال ۱۹۷۴ گزارش شد که وقتی که مولکول‌ها روی سطح فلزی جذب می‌شوند، به دلیل میدان الکترومغناطیسی بسیار زیاد تشکیل شده روی نقاط داغ تولید شده روی سطح فلزات، پراکندگی رامان به مقدار قابل توجهی تقویت می‌شود. این پدیده پراکندگی رامان افزایش یافته سطحی (SERS) نامیده می‌شود. SERS روی سطوح فلزی زبر یا روی تجمعات نانو ذره فلزی به دلیل تهییج پلاسمون سطحی مستقر، بسیار کارآمد است [۱]. شناسایی پروتئین‌ها یا مولکول‌های کوچک با استفاده از SERS و اپتامرهای DNA گزارش شده است. Wang, Dong و همکارانش از اپتامرها برای

الکتروشیمیایی، تعیین مقدار پروتئین موجود در محلول نمونه امکان پذیر است. با استفاده از این روش حد تشخیص زیر pM با گزینش پذیری بالا حاصل شد [۱۶].



شکل ۱۳- شناسایی multiplex ترومبین و لیزوزیم با اپتاسنسور الکتروشیمیایی [۱۶].

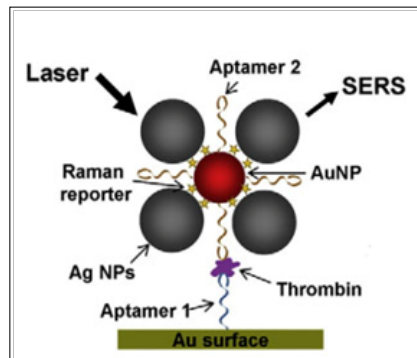
۵-۵- سنجش براساس حساسیت جرمی :

بیوسنسور حساس به جرم به عنوان ابزاری تعریف می شود که خاصیتی را اندازه گیری می کند که متناسب با جرم متصل به سطح حساس شده با پروب گیرنده است. بیوسنسورهای حساس به جرم اپتامری دسته ای از بیوسنسورهای بدون نشان هستند که شامل سنسورهای براساس موج ناپایدار (مثل رزونانس پلاسمون سطحی (SPR)، سنسورهای براساس موج صوتی (مثل میکروبالانس کریستال کوآرتز (QCM)) و سنسورهای براساس کانلیور میکرومکانیکی می باشند. این سنسورها به دلیل اندازه گیری سنگینی یا ضخامت برای لایه نازک ها به عنوان تکنیک های حساس به جرم منسوب شده اند.

سنسورهای SPR ابزارهایی هستند که می توانند تغییرات جرمی را با تغییر ضریب شکست در سطح نشان دهند. در عملکرد سنسوری، سطح گزینش پذیری با تثبیت اپتامر روی سطح تشکیل می شود. هدف با سرعت جریان ثابتی تزریق می شود و دستگاه تغییرات در زاویه رزونانسی سطح را اندازه گیری می کند. زاویه رزونانسی با اتصال هدف به اپتامر تغییر می کند. یافت شده است که سیگنال متناسب با مقدار مولکول های متصل است و شناسایی بدون نشان در کنفورماسیون تک سایتی را امکان پذیر می سازد [۳].

آنالیز میکروگروایمتری روی QCM برای شناسایی برهمکنش اپتامرها و هدفشان استفاده شده است. کوآرتز بین دو الکترود قرار می گیرد و اپتامرها روی آن تثبیت می شوند و فرکانس سیستم به صورت درجا اندازه گیری می شود. افزایش جرم در نتیجه اتصال باعث کاهش فرکانس رزونانس می شود.

بیوسنسورهای میکرومکانیکی، نویز کم و مقیاس پذیری بالایی دارند. نویز کم باعث قدرت تفکیک بالا و مقیاس پذیری باعث می شود که سنسورهای

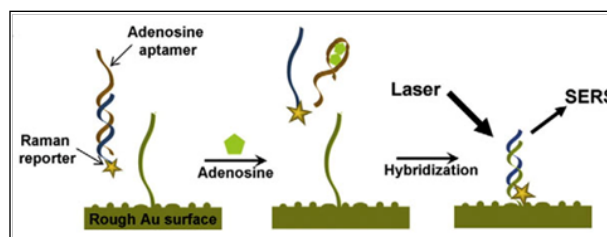


شکل ۱۱- سنسور براساس SERS برای شناسایی آدنوزین [۱۴].

۵-۴- شناسایی الکتروشیمیایی:

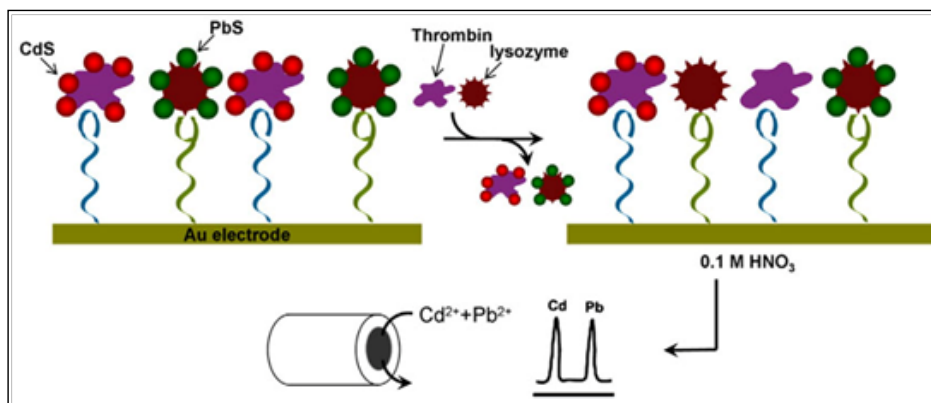
اغلب روش های شناسایی اپتیکی نیازمند محلول نمونه بسیار شفاف هستند، زیرا ممکن است رنگ محلول با سیگنال اپتیکی تولید شده از سنسور تداخل ایجاد کند. برای شناسایی نمونه های بیولوژیکی مثل خون، لازم است که روش جایگزینی را پیدا کرد. روش شناسایی الکتروشیمیایی روش ارزشمندی برای محلول های غیر شفاف است، زیرا ویرسانی سیگنال با روش های غیر اپتیکی انجام می شود.

شناسایی الکتروشیمیایی با اندازه گیری تغییر حالات ردوکس پروب ردوکس فعال انجام می شود. روش های مختلفی برای شناسایی الکتروشیمیایی آنالیت با استفاده از اپتامرها وجود دارد. در یک روش می توان از تغییر حالت ردوکس القاشده به وسیله کاتالیزورهای تثبیت شده روی اپتامر DNA استفاده کرد. مثالی از استفاده از نانوذرات پلاتین به عنوان نشانگر کاتالیزوری در شکل ۱۲ نشان داده شده است. ابتدا اپتامر ۱ ترومبین روی الکترود Au تثبیت شده و در معرض ترومبین قرار می گیرد تا به آن متصل شود. سپس اپتامر ۲ ترومبین که به Pt NP متصل است وارد محیط واکنش می شود تا کمپلکس ساندویچی ترومبین-اپتامر Pt NP- تشکیل شود. Pt NP فرآیند کاهش H_2O_2 به H_2O را کاتالیز می کند که منجر به جریان کاتدی می شود که در نتیجه شناسایی ترومبین تا حد تشخیص ۱ nM را امکان پذیر می سازد [۱۵].

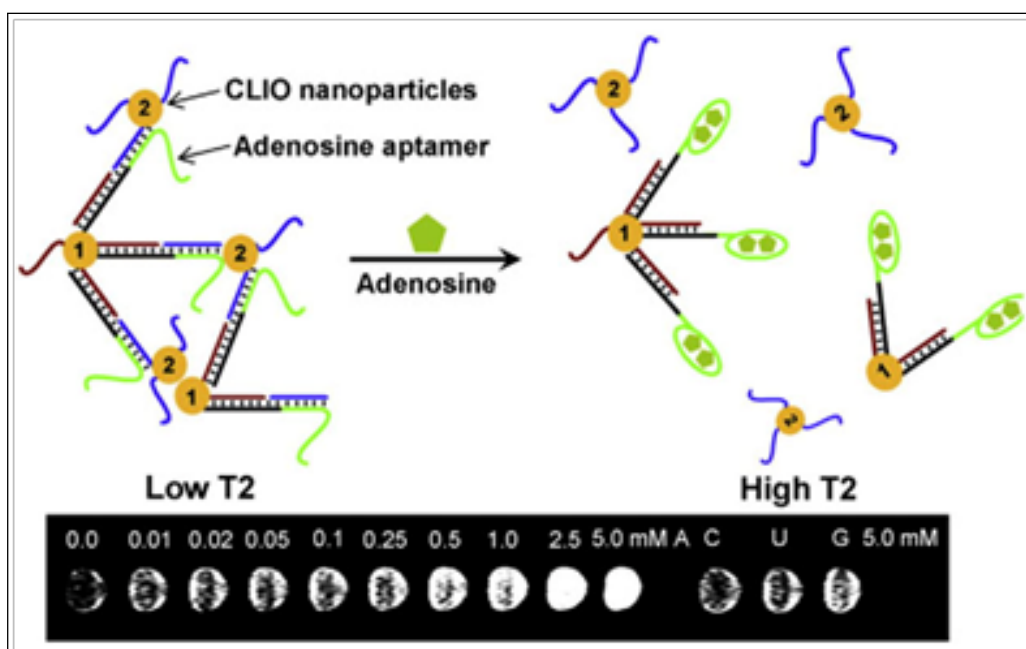


شکل ۱۲- استفاده از Pt NP در اپتاسنسور الکتروشیمیایی برای آنالیز DNA و پروتئین [۱۵].

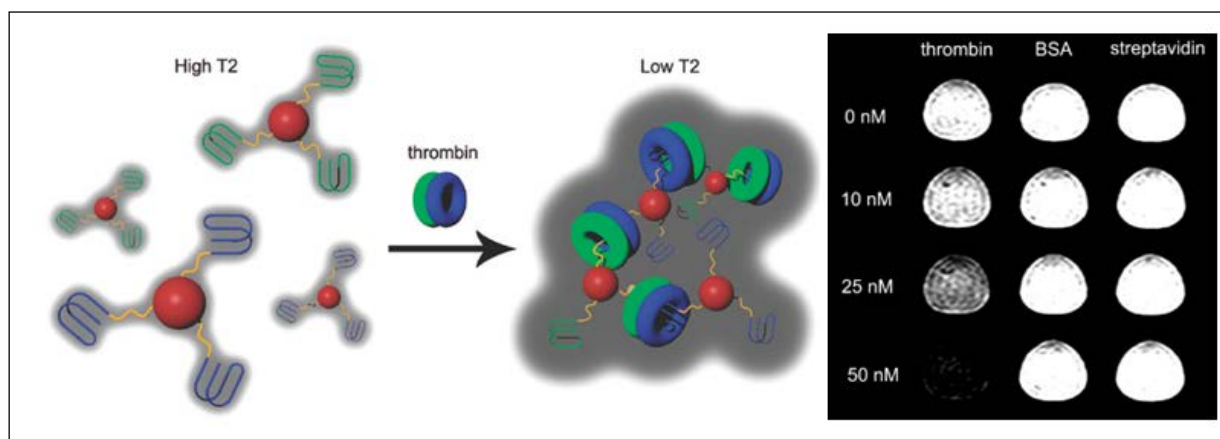
به منظور توسعه این رویکرد به شناسایی multiplex، wang همکارانش از پروتئین های نشاندار شده با QDs با ترکیبات شیمیایی مختلف استفاده کردند. در این کار، آنها دو اپتامر مختلف خاص ترومبین و لیزوزیم را روی سطح طلا تثبیت کردند و سپس ترومبین و لیزوزیم نشاندار شده با CdS و PbS را وارد محیط واکنش کردند (شکل ۱۳). سپس آنالیت های ترومبین و لیزوزیم اضافه می شود که در نتیجه پروتئین نشاندار شده با QD روی سطح با آنالیت موجود در نمونه جایگزین می شود. با اندازه گیری QDs باقیمانده به روش



شکل ۱۴- تصویربرداری رزونانس مغناطیسی براساس اپتامر-CLIO برای حسگری مولکول کوچک آدنوزین[۱۷].



شکل ۱۵- تصویربرداری رزونانس مغناطیسی براساس اپتامر-CLIO برای حسگری پروتئین ترومبین[۱۸].



شکل ۱۶- استفاده از کمپلکس اپتامر-QD برای تصویربرداری فلورسانس و انتقال دارو[۱۹].

(شکل ۱۴). آنالیت کنترل بدون هیچ فعالیتی روی اپتامر آدنوزین، تغییری در تصاویر MR نشان نداد. همچنین نانوذرات CLIO عامل دار شده با اپتامر جهش دار که با آدنوزین برهمکنش می دهد نیز تغییری در تصویر MR نشان نداد [۱۷].

به منظور نشان دادن پاسخ روی پروتئین ها به جای مولکول های کوچک و مشاهده تغییر در کنتراست، سیستم با آنالیت ترومبین مورد آزمایش قرار گرفت. نانوذرات CLIO عامل دار شده با اپتامر ترومبین در حضور ترومبین، تجمع یافتند که با کاهش روشنایی تصاویر MR-T₂ weighted مشاهده شد (شکل ۱۵). بنابراین نانوذرات اکسید آهن سوپراپارامغناطیس عامل دار شده با اپتامر برای تصویربرداری غیرهجومی in vivo نشانگرهای مولکولی کوچک مناسب است که تشخیص و درمان بیماری را قبل از پیشرفت آن تا مراحل زیاد امکان پذیر می سازد [۱۸].

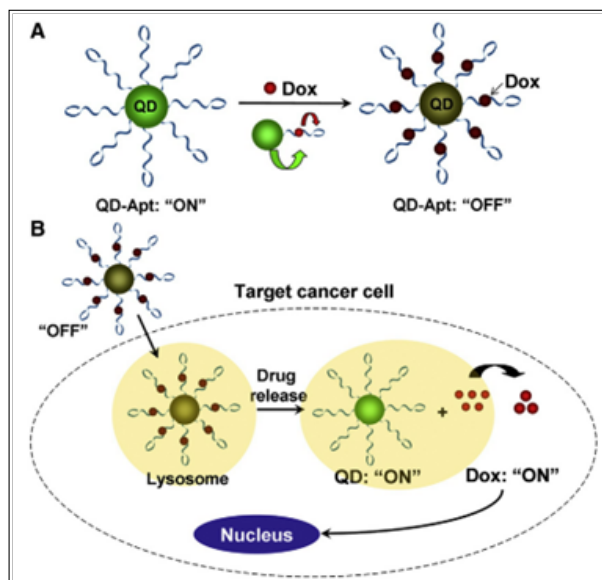
۵- رهایش دارو

علاوه بر کاربردهای تشخیصی و تصویربرداری، اپتامرها در رهایش دارو نیز به کار رفته اند. Langer و همکارانش اتصال از QD-اپتامر را معرفی کردند که هم به عنوان تصویربرداری فلورسانس و هم در رهایش دارو به کار می رفت (شکل ۱۶). سیستم QD-اپتامر شامل ۳ جزء می باشد: QD، اپتامر RNA خاص سلول سرطانی پروستات (Pca) و داکسوروبیسین (Dox) که معمولاً از داروی آنتراسیکلین استفاده می شود که وقتی که بین جفت بازهای الیگونوکلوئید دوشاخه قرار می گیرد فلورسانس دارد. اپتامرها به QDs وصل شده و Dox در شاخه اپتامر جاداده می شود و سیستم QD-اپتامر-Dox تشکیل می شود. از آنجاییکه فلئوئورسانس QD به Dox انتقال یافته و فلئوئورسانس Dox توسط اپتامر dsDNA خاموش می شود (از طریق انتقال انرژی بین دو جزء)، سیستم در ابتدا خاموش است. وقتی این سیستم به درون سلول سرطانی تزریق می شود، با اتصال مولکول هدف به اپتامر dsDNA، سیستم QD-اپتامر-Dox به تدریج آزاد می کند. رهایش Dox باعث بازایی فلورسانس QD می شود. بنابراین این سیستم نه تنها رهایش داروی هدفمند بلکه مشاهده رهایش دارو و تصویربرداری سلول های هدف را امکان پذیر می سازد [۱۹].

۶- نتیجه گیری

اپتامرها مولکول های نوکلئیک اسیدی هستند که می توانند با میل پیوندی و اختصاصیت بالا به بسیاری از هدف ها متصل شوند. اپتامرها به دلیل مزایایی نسبت به آنتی بادی ها از جمله پایداری تحت شرایط مضر یا گرما، به عنوان جایگزین مناسبی برای آنتی بادی ها در نظر گرفته می شوند. اپتامرها می توانند در مقادیر زیاد با خلوص بالا سنتز شوند و واکنش های شیمیایی ساده عامل دار شوند، موادی غیرایمونوژنیک و غیرسمی هستند، بنابراین می توانند در زمینه های وسیعی مثل تشخیص و درمان بیماری به کار روند. روش های SELEX مختلفی برای انتخاب سریع و مناسب اپتامرها طراحی شده است. SELEX براساس کروماتوگرافی میل ترکیبی و بید مغناطیسی، به دلیل میل پیوندی زیاد به هدف و جداسازی آسان از مولکول های غیرضروری، روش های مناسبی برای مولکول های بزرگ مثل پروتئین ها می باشند. به علاوه SELEX براساس الکتروفورز موینیکی، روش سریعی است که برای مولکول های کوچک مناسب است.

زیادی به صورت موازی استفاده شوند. در این نوع سنجش، اپتامرها به سطح فوقانی میکروکانیلور وصل می شوند. اتصال اپتامر به هدف منجر به ازدحام فضایی و در نتیجه خمش کانیلور می شود، سپس اتصال به صورت الکتریکی یا اپتیکی آشکارسازی می شود



۵-۶- تصویربرداری رزونانس مغناطیسی (MRI):

درحالیکه فلورسانس و SERS در تصویربرداری in vivo به کار رفته اند، ولی طول نفوذ آنها محدودکننده می باشد. از سوی دیگر، MRI چنین محدودیتی ندارد و تصویربرداری ۳D بدن با دستگاه های قابل دسترس کلینیکی در کل دنیا امکان پذیر است. هم اکنون، هنگامیکه اختلاف در بافت ها مثل بافت توموری جامد و بافت سالم، زیاد است، با اطلاعات توموری کم، MRI کارآمدترین روش است. برای تصویربرداری MRI در آینده، مدنظر است که MRI نشانگرهای مولکولی تومور را قبل از گسترش تومور شناسایی کند. برای نیل به این هدف، به عوامل کنتراست MRI جدید که به نشانگرهای مولکولی کوچک پاسخ دهند، نیاز می شود. نانوذرات اکسید آهن سوپراپارامغناطیس، دسته ی جدیدی از عوامل کنتراست MRI هستند که توجه بسیاری از دانشمندان را به خود جلب کرده است. نشان داده شده است که نانوذرات اکسید آهن سوپراپارامغناطیس می توانند به مولکول های بیولوژیکی مثل الیگونوکلوئیدهای عامل دار شده با تیول برای هدف گیری فعال متصل شوند. نانوذرات اکسید آهن-دکستران اتصال عرضی شده (CLIO) می توانند با DNA عامل دار شوند و این ماده می تواند برای شناسایی توالی الیگونوکلوئیدی خاص با MRI استفاده شود. نانوذرات CLIO می توانند زمان آسایش اسپین-اسپین (T₂) پروتون های آب مجاور را تغییر دهند. به علاوه محققان مشاهده کردند که با بزرگ شدن سایز کلاسترها، کاهش T₂ مؤثرتر خواهد بود. براساس این اصول، تمیز دادن حالت مونتاژ شده و متفرق نانوذرات و بنابراین شناسایی آنالیتی که باعث چنین تغییری می شود امکان پذیر است. برای اساس، روشی برای شناسایی شیمیایی و بیولوژیکی مولکول ها با استفاده از نانوذرات CLIO عامل دار شده با اپتامر پیشنهاد شد. اپتامر آدنوزین می تواند متفرق شدن تجمعات نانوذره ای CLIO را در حضور آدنوزین القا کند که در MRI به صورت افزایش روشنایی تصاویر MR-T₂ weighted مشاهده شد

11. J. Wang, L. Wang, X. Liu, Z. Liang, S. Song, W. Li, G. Li, C. Fan, "A Gold Nanoparticle-Based Aptamer Target Binding Readout for ATP Assay", *Adv. Mater. Des.*, 19, 2007, 3943-3496.
12. W. Zhao, W. Chiuman, J.C.F. Lam, S.A. McManus, W. Chen, Y. Cui, R. Pelton, M.A. Brook, Y. Li, "DNA Aptamer Folding on Gold Nanoparticles: From Colloid Chemistry to Biosensors", *J. Am. Chem. Soc.*, 130, 2008, 3610-3618.
13. Y. Wang, H. Wei, B. Li, W. Ren, S. Guo, S. Dong, E. Wang, "SERS Opens a New Way in Aptasensor for Protein Recognition with High Sensitivity and Selectivity", *Chem. Commun.*, 48, 2007, 5220-5222.
14. J.W. Chen, X.P. Liu, K.J. Feng, Y. Liang, J.H. Jiang, G.L. Shen, R.Q. Yu, "Detection of Adenosine Using Surface-Enhanced Raman Scattering Based on Structure-Switching Signaling Aptamer", *Biosens. Bioelectron.*, 24, 2008, 66-71.
15. R. Polsky, R. Gill, L. Kaganovsky, I. Willner, "Nucleic Acid-Functionalized Pt Nanoparticles: Catalytic Labels for the Amplified Electrochemical Detection of Biomolecules", *Anal. Chem.*, 78, 2006, 2268-2271.
16. J.A. Hansen, J. Wang, A.-N. Kawde, Y. Xiang, K.V. Gothelf, G. Collins, "Quantum-Dot/Aptamer-Based Ultrasensitive Multi-Analyte Electrochemical Biosensor", *J. Am. Chem. Soc.*, 128, 2006, 2228-2229.
17. M.V. Yigit, D. Mazumdar, H.K. Kim, J.H. Lee, B. Odintsov, Y. Lu, "Smart "Turn-On" Magnetic Resonance Contrast Agents Based on Aptamer-Functionalized Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles", *ChemBioChem*, 8, 2007, 1675-1678.
18. M.V. Yigit, D. Mazumdar, Y. Lu, "MRI Detection of Thrombin with Aptamer Functionalized Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles", *Bioconjug. Chem.*, 19, 2008, 412-417.
19. V. Bagalkot, L. Zhang, E. Levy-Nissenbaum, S. Jon, P.W. Kantoff, R. Langer, O.C. Farokhzad, "Quantum Dot-Aptamer Conjugates for Synchronous Cancer Imaging, Therapy, and Sensing of Drug Delivery Based on Bi-Fluorescence Resonance Energy Transfer", *Nano Lett.*, 7, 2007, 3065-3070.

اپتامرها براساس میل پیوندی و گزینش پذیری نسبت به هدف، به عنوان پروب گیرنده استفاده می شوند. بنابراین سنسورهای برپایه ای اپتامرها کارایی خوبی در تشخیص بیماری دارند. همچنین از آنجایی که آنتی بادی ها در تشخیص مولکول های کوچک دارای محدودیت هایی می باشند، اپتامرها در این زمینه به طور مؤثری قابل کاربرد می باشند. اپتامرها در زمینه های مختلفی مثل سنسورهای اپتیکی، کالری متریک، الکتروشیمیایی و حساس به جرم، در درمان و انتقال دارو و در بیوتصویربرداری کاربرد دارند.

منابع:

1. J.H. Lee, M.V. Yigit, D. Mazumdar, Y. Lu, "Molecular diagnostic and drug delivery agents based on aptamer-nanomaterial conjugates", *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 62, 2010, 592-605.
2. E.J. Cho, J.W. Lee, A.D. Ellington, "Applications of Aptamers as Sensors", *Annu. Rev. Anal. Chem.*, 2, 2009, 241-264.
3. S. Song, L. Wang, J. Li, J. Zhao, C. Fan, "Aptamer-based biosensors", *Trends Anal. Chem.*, 27, 2008, 108-117.
4. K.M. Song, S. Lee, C. Ban, "Aptamers and Their Biological Applications", *sensors*, 12, 2012, 612-631.
5. A.D. Ellington, J.W. Szostak, "In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands" *Nature*, 346 1990, 818-822.
6. C. Tuerk, L. Gold, "Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase" *Science*, 249, 1990, 505-510.
7. D.H. Bunka, P.G. Stockley, "Aptamers come of age—At last" *Nat. Rev. Microbiol.*, 4, 2006, 588-596.
8. M. Levy, S.F. Cater, A.D. "Ellington, Quantum-Dot Aptamer Beacons for the Detection of Proteins", *ChemBioChem.*, 6, 2005, 2163-2166.
9. J. Liu, J.H. Lee, Y. Lu, "Quantum Dot Encoding of Aptamer-Linked Nanostructures for One Pot Simultaneous Detection of Multiple Analytes", *Anal. Chem.*, 79, 2007, 4120-4125.
10. J. Liu, Y. Lu, "Fast Colorimetric Sensing of Adenosine and Cocaine Based on a General Sensor Design Involving Aptamers and Nanoparticles", *Angew. Chem. Int. Ed.*, 45, 2006, 90-94.