

مروری بر کاربرد آپتامرهای تشخیصی در کیت‌های نواری

فاطمه بزرگمهر، مهدی زین‌الدینی^{۲*}، عباس عظیمی‌فرد^۳، نورمحمد دانش^۴

۱- دانش آموخته، مجتمع پدافند عامل، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، گروه علوم زیستی، تهران، ایران

۲- دانشیار، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، گروه علوم زیستی، تهران، ایران

۳- دانش آموخته، مجتمع پدافند عامل، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، گروه علوم زیستی، تهران، ایران

۴- استادیار، مجتمع پدافند عامل، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، گروه علوم زیستی، تهران، ایران

* صندوق پستی ۱۵۸۷۵۱۷۷۴، تهران، ایران

zeinoddini52@mut.ac.ir

پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۲۰

دریافت: ۱۴۰۱/۰۵/۳۰

چکیده

آپتامرها یا پادتن‌های شیمیایی اغلب توالی‌های اسیدنوکلئیکی هستند که قادر به اتصال به طیف وسیعی از اهداف متنوع شامل مولکول‌های کوچک، مولکول‌های بزرگ و سلول‌ها هستند. از جمله مزایای آپتامرها نسبت به پادتن‌ها می‌توان به فرایند تولید برون‌تنی، امکان انتخاب آپتامرها در برابر مولکول‌های سمی و غیرایمونوژن، ذخیره در بازه‌های زمانی طولانی و هزینه تولید به‌مراتب کمتر نام برد. همچنین، آپتامرها می‌توانند به راحتی اصلاح و یا تثبیت شوند و سنتز آنها با خلوص و تکرارپذیری بالا همراه است، به‌طور شیمیایی پایدار بوده و به دلیل ماهیت نوکلئیک‌اسیدی خود بسیار انعطاف‌پذیرتر از پادتن‌ها بوده و می‌توانند در قالب پروب فائوس مولکولی، ترکیبی از برهم‌کنش هدف-آپتامر و تکثیر اسیدنوکلئیک را برای دستیابی به محدوده‌های تشخیصی خیلی حساس بکار گیرند. این ویژگی‌های جالب توجه، آپتامرها را به‌عنوان عناصر تشخیصی منحصربه‌فرد برای ابزارهای تحلیلی همچون حسگرهای زیستی، روش‌های رنگ‌سنجی، تشدید پلاسمون سطحی و آزمایشگاه روی تراشه تبدیل کرده است. با این حال، تمام این روش‌ها به کارکنان ماهر و ابزار دقیق مستقر در آزمایشگاه نیاز دارند در نتیجه کاربرد آنها را محدود می‌کند. در این خصوص سنسجش‌های جریان جانبی یا کیت‌های نواری و کاغذی نتایج سریع و قابل اطمینان را ارائه می‌دهند و تنها نیازمند مداخله کاربر در مرحله افزودن نمونه است. به دلیل سادگی آنها، به‌طور گسترده در زمینه‌های مختلف از جمله پزشکی، رصد و پایش کیفیت محصولات غذایی و ایمنی محیطی استفاده می‌شود. در این پژوهش ضمن معرفی آپتامرها، مروری بر کاربرد منحصربه‌فرد آن در سنسجش جریان جانبی و آینده این فناوری انجام می‌شود.

کلید واژگان: آپتامر، پادتن، تشخیص، سنسجش، حسگری زیستی.

۱- مقدمه

در دهه ۱۹۹۰، یک روش جدید برای تکامل سامانمند لیگاندهای بر پایه غنی سازی نمایی توسعه یافته است که به طور معمول به عنوان فناوری SELEX^۱ (تکامل سامانمند لیگاندها با استفاده از غنی سازی نمایی) شناخته می شود [۱]. آپتامر توالی ویژه‌ی اولیگونوکلوئوتیدی است که طی چندین چرخه تصادفی، از کتابخانه DNA یا RNA با استفاده از فناوری SELEX به دست می آید [۲]. آپتامری که توسط SELEX انتخاب شده است دارای اختصاصیت و تمایل اتصال بالایی برای مولکول هدف می باشد [۳]. این خواص ذاتی، آپتامرها را به خط مقدم کاربردهای متعدد سوق داده است که در نهایت، در توسعه اولین داروی مورد تایید FDA مبتنی بر اولیگونوکلوئوتید به اوج خود رسید [۴]. روش های غربالگری آپتامر [۵] از طریق روش های SELEX شامل غربالگری بر پایه محیط ثابت متفاوت، بیدهای مغناطیسی فلورسانس [۶]، SELEX با الکتروفورز موینگی [۷] و SELEX سلول [۸] هستند. پس از غربالگری و غنی سازی SELEX، قطعات آپتامر جداسازی می شوند که تعداد جفت بازهای آپتامر در حدود ۴۰bp - ۲۵ است. رایج ترین ساختارهای آپتامر مارپیچی، سنجاق سر، حلقه ساقه، حلقه محذب، شبدر و شبه گره هستند [۹]. آپتامرها مزایای متعددی از جمله سنتز آسان، پایداری بالا، تکرارپذیری خوب و قیمت پایین دارند. علاوه بر این، آپتامر به طور انحصاری به بسیاری از اهداف [۱۰]، از قبیل سلولها، ویروسها، سموم [۱۱]، پروتئینها [۱۲] و ویتامینها [۱۱] متصل می شود.

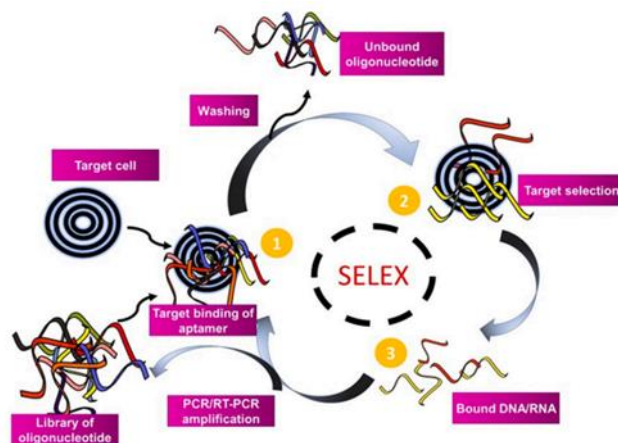
در سالهای اخیر کاربرد آپتامرها بیش از پیش مورد استفاده قرار گرفته است. در زمینه پزشکی بالینی، آپتامر متصل شده به دارو به ارگان هدف تحویل داده می شود [۱۳]. آپتامر می تواند بر مضرات احتمالی از بین برنده اندامهای هدف اغلب داروها در طول درمان غلبه کند. در

زمینه زیست شناسی پزشکی، آپتامر به عنوان ابزار تشخیصی در درمان نقش ایفا می کند [۱۴]. از آنجا که برخی علائم بالینی مشخص نیستند و یا بیماری در معرض تشخیص نادرست قرار دارد، شناسایی پاتوزنهای بیماریزا در بدن انسان می تواند احتمال سوء مصرف دارو را کاهش دهد [۱۵]. یک روش بسیار مهم و موثر برای غربالگری آپتامر از طریق SELEX، تشخیص مستقیم بیماری ناشی از باکتری بیماریزا است. در حفاظت محیط زیست، آپتامر را می توان با بسیاری از یونهای فلزی سنگین، فلوروئومتری، رنگ سنجی [۱۶]، الکتروشیمی و فن آوری های دیگر برای انجام تشخیص کمی یونهای فلزی سنگین ترکیب کرد. در جنبه تشخیص میکروبی، آپتامر می تواند با انواعی از باکتریها و سموم ترکیب شود که هدف از تشکیل این ترکیب، اندازه گیری سیگنالهای تولید شده است [۱۷]. می توان برای به دام اندازی هدف توسط آپتامر، انواع هدف را با آپتامر به طور خاص یا غیراختصاصی ترکیب کرد. این اهداف می توانند باکتری، ویروس یا سموم باشند.

با توجه به اهداف مختلف، روش های پیش آماده سازی متفاوتی برای استخراج توالی هدف انتخاب می شوند تا آپتامر به طور خاص با توالی هدف ترکیب شود. در خصوص روش رشد باکتری، حداقل ۴-۷ روز از گرمخانه گذاری باکتری هدف تا حصول نتیجه گیری نهایی طول می کشد. در صورت از پیش آماده بودن ماده آپتامر، حسگر زیستی مبتنی بر آپتامر^۲ می تواند نتایج را در مدت زمان بسیار کوتاهی (۳۰ دقیقه) به دست آورد. بنابراین، در مقایسه با روش رشد باکتریها، زیست حسگر مبتنی بر آپتامر قابلیت هایی از جمله چرخه تشخیص کوتاه، سادگی فرایند، سیگنال خروجی پایدار، گستره ی وسیع تشخیص و حساسیت و گزینش پذیری مناسب را دارا می باشد.

۲- مروری بر آپتامرها.

^۲ aptasensor^۱ Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment



شکل ۱ تصویری از in-vitro SELEX

مرحله شست‌وشو شناخته می‌شود. مولکول‌های DNA/RNA انتخاب شده در مرحله پس از طریق روش PCR رونویسی معکوس و تکثیر می‌شوند. سپس اولیگونوکلوئوتیدهای انتخابی در دور بعدی جهت کلون، تعیین توالی و تعیین ویژگی مورد استفاده قرار می‌گیرند [۲۰].

طراحی و کیفیت کتابخانه‌های اولیه، مؤلفه‌های کلیدی برای آزمایش‌های موفق SELEX هستند؛ زیرا تنها مخزن با موتیف‌های توزیع برابر هر چهار نوکلئوتید، فضای دنباله را به حداکثر می‌رساند [۲۱]. کتابخانه‌های تصادفی یا با هدف تثبیت در یک تکیه‌گاه محکم انکوبه می‌شوند تا جداسازی فیزیکی مولکول‌ها از مولکول‌های متصل نشده فراهم شود و یا به‌طور مستقیم با سلول‌ها در روش cell SELEX حاصل می‌شوند [۲۲]. توالی‌های متصل شده به هدف، پس از غربالگری، PCR شده و جمعیت‌های غنی از آن انتخاب و به مراحل بعدی تزریق می‌شوند. دقت در انتخاب را می‌توان از طریق چرخه‌های تکراری با تغییر تدریجی پارامترهای فیزیکوشیمیایی مثل دما، قدرت یونی، غلظت هدف، زمان انکوباسیون یا با اضافه کردن یک گام انتخاب منفی افزایش داد [۲۳].

آپتامرها توالی‌های اسیدنوکلئیک هستند که با به‌کارگیری روش SELEX و روش‌های ترکیبی دیگر مربوط به انتخاب برون‌تنی به دست می‌آیند [۱۸]. SELEX روش اصلی پیدایش آپتامرها است که به لحاظ بهینه‌سازی هزینه، کارایی و زمان مورد نیاز برای تولید آپتامرهای بالقوه، تکامل و بهبود یافته است. به‌طور خلاصه کتابخانه‌های بزرگ اولیگونوکلوئوتیدها (معمولاً در حدود 10^{14} مولکول) با واکنش‌های بسط پرایمر^۱ (PEX) یا PCR ایجاد می‌شوند (شکل ۱). الیگونوکلوئوتیدهای شسته شده توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) (در مورد توالی‌های DNA) یا RT-PCR (در مورد توالی‌های RNA) برای تکثیر کتابخانه استفاده می‌شوند [۱۹].

مرحله اول فرایند SELEX شامل انکوباسیون هدف با مخزن DNA یا RNA به منظور انجام فرایند اتصال است. در مرحله دوم اولیگونوکلوئوتیدهای دارای تمایل اتصال بالا به هدف سلولی متصل می‌شوند، درحالی‌که اولیگونوکلوئوتیدهایی که اتصال نیافته‌اند؛ حذف می‌شوند. حذف چنین اولیگونوکلوئوتیدهای اتصال نیافته به‌عنوان

^۱ Primer extension reactions

هنگامی که یک توالی تکثیر نمایی پیدا می‌کند (به‌طور معمول پس از ۵ تا ۱۵ سیکل رخ می‌دهد)، قطعات متصل شده‌ی باقی مانده محصول نهایی SELEX به دست می‌آید و این قطعات الیگونوکلئوتیدی تعیین توالی شده و ترادف های اختصاصی، مشخص می‌شود. ظرفیت اتصال آپتامرها به طور معمول با ثابت تفکیک تعادل خود (K_d) توصیف می‌شود که اغلب در محدوده پایین‌تر از نانومولار قرار می‌گیرد [۱۱]. مقادیر K_d توسط روش‌های بیوفیزیکی مانند تشدید پلاسمون سطحی (SPR) یا MST^1 (یک روش قدرتمند برای تعیین کمیت تعاملات بین مولکولی) اندازه‌گیری می‌شوند. با توجه به تمایل اتصال و حساسیت بالا، آپتامرها در کاربردهای عملی متعدد از جمله کاربردهای تشخیصی، درمان، سیستم‌های تحویل دارو و حتی شروع به نفوذ در زمینه‌های تصویربرداری پزشکی و نانو تکنولوژی استفاده شده‌اند [۲۴]. از جمله کاربردهای تشخیصی آپتامرها می‌توان به قابلیت آنها در شناسایی تری نیتروتولوئن (TNT) اشاره کرد. در این بررسی‌ها و مطالعات از زیست حسگرهای مبتنی بر آپتامر جهت شناسایی ماده منفجره و کوچک TNT استفاده شده است [۲۵-۲۸].

آپتامرها نسبت به همتایان پروتئینی خود مزایایی از جمله تمایل اتصال و حساسیت، سرعت نفوذ در بافت‌های هدف، راحتی نسبی سنتز در مقیاس بزرگ، اندازه کوچک (کمتر از ۳۰ کیلو دالتون) و ایمونوژنیستی پایین را نشان می‌دهند [۴]. مقادیر پایین K_d و اختصاصیت بالا، به‌ویژه با توجه به کاربردهای درمانی و برای ساخت سیستم‌های تحویل دارو، پارامترهای ضروری هستند. استراتژی‌های مرسوم SELEX پس از چندین دور انتخاب در شرایط آزمایشگاهی برای ایجاد آپتامرها همیشه موفق نیستند. مدل‌های کتابخانه‌های الیگونوکلئوتیدی تکرار شده‌ی تصادفی از طریق شبیه‌سازی مولکولی و تنظیم

پیچیدگی‌های ساختاری با فیلتر کردن الگوریتم، طرح‌های انتخاب آپتامر محاسباتی غالب هستند که می‌توان آنها را *in silico*-SELEX نامید. به‌طور خلاصه، *in silico*-SELEX در دو مرحله‌ی غربالگری توالی‌ها بر اساس ساختار ثانویه آنها و غربالگری کتابخانه آغازگر با استفاده از ابزارهای اتصال محاسباتی انجام می‌شود.

مرحله اول، غربالگری توالی‌ها بر اساس ساختار ثانویه آنها. تجزیه و تحلیل کتابخانه آپتامر نشان داد که آپتامرهای با میل ترکیبی بالا از نظر ترمودینامیکی با توالی‌های تصادفی متفاوت هستند. به‌عنوان مثال، انرژی‌های آزاد تشکیل ساختار ثانویه آپتامرهای اتصال *GTP* به‌طور قابل توجهی کمتر از توالی‌های تصادفی با طول یکسان است. بنابراین، به‌حداقل رساندن حضور توالی‌ها با ساختارهای ساده ساقه-حلقه یا ساختارهای کمی منشعب و به حداکثر رساندن حضور آپتامرها با ساختارهای کم‌انرژی پایدار در همان زمان، مفید به نظر می‌رسد. این نوع توالی‌ها را می‌توان برای تشکیل یک کتابخانه آغازگر پیشرفته برای مرحله بعدی انتخاب کرد.

مرحله دوم، غربالگری کتابخانه آغازگر با استفاده از ابزارهای اتصال محاسباتی. برای شناسایی توالی‌های متصل کننده مولکول هدف به یکدیگر، ابزارهای اتصال مختلفی وجود دارد. بر اساس داده‌های حاصل از تجزیه و تحلیل اتصال (به‌عنوان مثال انرژی آزاد اتصال و ثابت تفکیک آپتامرها)، همه کاره‌ترین آپتامر انتخاب شده و برای مطالعات بیشتر استفاده می‌شود. در شکل ۲، تصویر کلی از انتخاب تا رسیدن به توالی نهایی به‌نمایش درآمده است.

بی شک غربالگری‌ها و سنجش‌های تشخیصی آزمایشگاهی به واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) یا پادتن‌ها متکی هستند [۳۰]. فرایند PCR به یک ماشین پیچیده، پروب‌ها و پرایمرهای گران قیمت و نیروی انسانی بسیار آموزش دیده نیاز دارد. از سویی آنتی‌بادی‌ها

¹ Microscale thermophoresis

بودن فرایند تولید آنتی‌بادی نیز عامل محدود کننده می‌باشد [۳۱]. محدودیت دیگر این است که تشخیص ایمنوگلوبولین IgM و IgG در سرم بیماران با استفاده از آنتی‌ژن‌های نو ترکیب می‌تواند یک رویکرد منطقی و عملی باشد، اما حساسیت ضعیفی دارد.

باید در حیوانات تولید شوند و به چندین دوز تقویت کننده نیاز دارند. به‌طور کلی، تولید آنتی‌بادی یک فرایند زمان‌بر چند ماهه است. همچنین، آنتی‌بادی‌ها مستعد تغییرات ناحیه‌ای هستند و بنابراین محققان از بحران تکرارپذیری رنج می‌برند. علاوه بر این مشکل، طولانی



شکل ۲ تصویری کلی از مراحل *in silico* SELEX

اصلاح نشده به‌طور کلی حدود ۵ دقیقه در سرم [۱۷] و کم‌تر از یک ساعت در سلول‌های زنده باقی می‌مانند [۳۳]. همچنین، آپتامرهای اصلاح نشده نیز هیچ برتری ندارند و به سرعت توسط آندو و آگزونوکلئازها در شرایط درون‌تنی^۱ تجزیه می‌شوند. به‌عنوان مثال، مشخص شده است که یک آپتامر DNA شناخته شده در برابر ترومبین، در شرایط آزمایشگاهی نیمه عمری به اندازه ۱۰۸ ثانیه دارد [۳۴]، در حالی که، یک آپتامر RNA برای تشخیص عامل رشد کراتینوسیت، در عرض چند ثانیه در ۹۰ درصد سرم انسان تخریب می‌شود [۳۵]. در نهایت، دما پارامتر دیگری است که می‌تواند تاثیر منفی بر بازده اتصال آپتامرها داشته باشد و می‌تواند تخریب آنها را با نوکلئازها تسریع کند [۳۶]. در حقیقت، آپتامرها ساختارهای دوم و سوم پیچیده‌ای را شکل می‌دهند که اتصال به هدف خود را ممکن می‌سازند. افزایش دما (برای مثال در ۳۷ درجه

شکل ۲ تصویری کلی از مراحل *in silico* SELEX در مراحل ابتدایی لازم است، اطلاعات اولیه مشخص شود و با توجه به هدف طراحی منطقی انجام شود. در تحقیقات Ahiwar از آنجاکه استروژن می‌تواند به هدف‌های اولیگونوکلئوتیدی مشخص متصل شود، بنابراین این توالی‌ها برای انتخاب آپتامر نامزد می‌شوند [۲۹]. در ادامه با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی، مدل‌سازی سه بعدی آپتامر و آنالیت انجام می‌شود. برای بررسی تعامل آپتامر با آنالیت از نرم‌افزارهای Docking استفاده خواهد شد. مراحل تایید نهایی به‌صورت *in vitro* خواهد بود که اختصاصیت و حساسیت آپتامر در این مرحله تایید می‌شود.

آپتامرها، مانند هر اولیگونوکلئوتید طبیعی، در معرض تجزیه و تحلیل سریع به‌وسیله نوکلئازها قرار دارند [۳۲]. دست‌ورزی اولیه در توسعه اولیگونوکلئوتیدهای آنتی‌سنس درمانی نشان داده است که اسیدهای نوکلئیک

^۱ *in vivo*

سانتی‌گراد) ممکن است این ساختارهای دوم و سوم را مختل کرده و مانع از اتصال شود [۳۷]. علاوه بر پاکسازی سریع وابسته به متابولیک، آپتامرها در معرض پاکسازی موثر کلیه قرار دارند. در حقیقت، به دلیل اندازه کوچک آنها، آپتامرها به سرعت توسط کلیه‌ها دفع می‌شوند که قادر به از بین بردن مواد با وزن مولکولی کوچکتر از ۵۰ کیلو دالتون است [۳۸]. در مجموع، پاکسازی کلی پلاسما (یعنی مجموع پاکسازی متابولیک، تصفیه کلیه و جذب بافت برگشت‌ناپذیر [۳۹]) از آپتامرهای اصلاح نشده، نسبتاً بالا است و بنابراین بیانگر نگرانی جدی برای درمان در کاربردهای درون‌تنی است.

۲-۱ بسته‌های نواری

سنجش جریان جانبی (LFA^۱) یک زیست حسگر مبتنی بر کاغذ است که می‌تواند در یک نمونه معین مواد زیستی را شناسایی کرده و نتایج آزمایش را در عرض چند دقیقه بدون نیاز به کارکنان آموزش‌دیده جهت به کار انداختن تجهیزات گران‌قیمت و پیچیده ارائه کند [۴۰]. بنابراین، این فناوری به دلیل مزایای خود شامل عملیات آسان، کم هزینه و تشخیص سریع، نظر محققان به نحو قابل توجهی به خود جلب کرده است [۴۱]. از آنجایی که راه‌اندازی موفقیت‌آمیز اولین محصول تجاری برای تشخیص بارداری بر پایه ادرار اعمال شده است، LFA به‌طور گسترده در زمینه‌های مختلف از جمله امنیت غذایی، آنالیز بالینی و نظارت بر محیط زیست به کار گرفته شده است [۴۲]. به‌طور قراردادی LFA شامل لایه نمونه، لایه مزدوج، غشای نیتروسولوزی، لایه جاذب و کارت پشتیبانی می‌باشد که در آن چهار قسمت اول بر روی کارت پشتیبانی با همپوشانی مناسب مونتاژ می‌شوند. لایه نمونه برای بارگذاری نمونه مورد نظر به کار گرفته می‌شود که سپس از طریق نیروی موئینگی به بخش‌های دیگر LFA

منتقل می‌شود. لایه مزدوج، مولکول تشخیص دهنده زیستی^۳ نشان‌دار متصل شونده به آنالیت هدف را ذخیره می‌کند. غشای نیتروسولوز جهت تثبیت مولکول به دام اندازنده به ترتیب در خط تست^۴ (TL) و خط کنترل^۵ (CL) به کار گرفته می‌شود. لایه جاذب، نیروی موئینگی را تامین می‌کند و از برگشت نمونه بارگذاری شده جلوگیری می‌کند [۴۴]. معمولاً آنتی‌بادی به‌عنوان مولکول‌های تشخیص دهنده زیستی در LFAهای استفاده می‌شود [۴۵]. اگرچه کاربرد آنتی‌بادی‌ها با حساسیت و اختصاصیت بالا در این کیت‌های نواری، اثبات شده است، اما این ترکیبات پروتئینی همچنان در معرض دناتوراسیون^۶ ساده و ناتوانی در تغییر ماهیت هستند که آنها را ناپایدار کرده و کاربردهای آنها را محدود می‌کنند. علاوه بر این، آنتی‌بادی‌های انتخاب شده با استفاده از یک فرایند درون‌تنی نه تنها منجر به کشتن میزبان‌های حیوان و ایجاد اشتباه در دسته‌های مختلف می‌شود، بلکه دامنه آنها محدود به شرایط یخچال برای نگهداری آنها است [۴۶]. امروزه آپتامرها برای غلبه بر این محدودیت‌ها به کار گرفته شده‌اند [۴۷]. آپتامرها به‌عنوان اسیدهای نوکلئیک، به دلیل ماهیت ذاتی، پایدار هستند و قادر به یافتن ترکیب طبیعی پس از دناتوراسیون می‌باشند که آنها را برای انطباق با قالب‌های سنجش به میزان کافی انعطاف‌پذیر می‌کنند [۴۸]. در حالی که، فرایند انتخاب آپتامرها ممکن است پرهزینه باشد. زمانی که، آپتامرها غربال شوند، می‌توان آنها را با تکرارپذیری بالا و خلوص سنتز کرد و منجر به هزینه تولید بسیار کم‌تر نسبت به آنتی‌بادی‌ها می‌شود [۴۹]. به تازگی، آپتامرها به‌طور کامل به‌عنوان مولکول تشخیص دهنده زیستی برای LFAهای مختلف مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. مقایسه LFAهای مبتنی بر آنتی‌بادی و LFAهای مبتنی بر آپتامر در جدول ۱ گنجانده شده است.

³ Biorecognition

⁴ Test line

⁵ Control line

⁶ Denaturation

¹ Kit

² lateral flow assays

جدول ۱ مقایسه LFAهای مبتنی بر پادتن و LFAهای مبتنی بر آپتامر

تجاری سازی	قابلیت تکثیر	تنظیم پذیری	حساسیت	اختصاصیت	نوع سنجش
در سطح پایین	بالا	انعطاف پذیر	بالا	بالا	LFAس مبتنی بر آپتامر
در سطح گسترده	ضعیف	ضعیف	بالا	بالا	LFAس مبتنی بر آنتی بادی

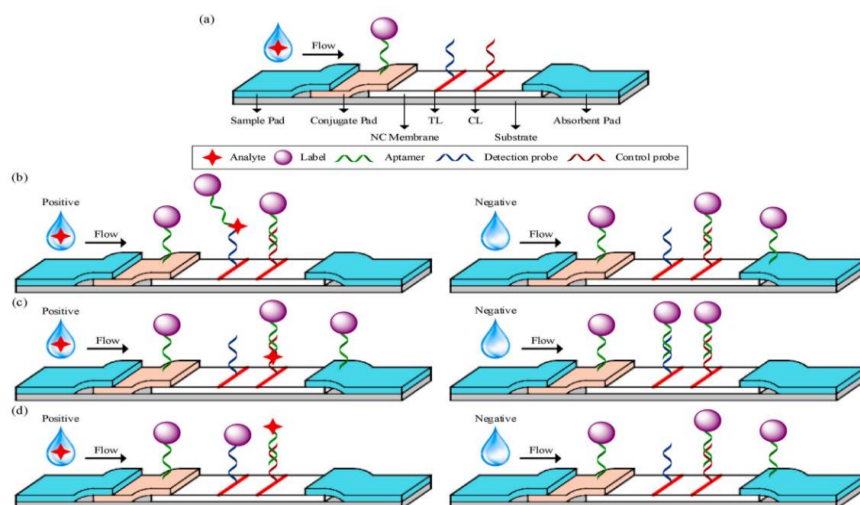
شده است. این قالب به جذب آپتامر در سطح برچسب و واجدبی بعدی آپتامر، از آپتامر نشان‌دار وابسته است [۵۰]. نمای شماتیک قالب‌های ساندویچ، رقابتی و جذب- واجذب در شکل ۳ نشان داده شده است.

بر اساس این قالب‌ها راهبردهای تکثیر سیگنال، تشخیص مولتی‌پلکس^۱ و چشم‌انداز آینده برای ارائه خلاصه‌ای از LFA های مبتنی بر آپتامر برای تشخیص آنالیت هدف مورد بحث قرار می‌گیرند. قالب ساندویچ برای LFA های مبتنی بر آپتامر، رایج‌ترین قالب مورد استفاده برای تشخیص آنالیت با اپی‌توپ‌های چندگانه است که می‌توانند به یک جفت آپتامر یا به ترکیبی از آپتامر و پادتن متصل شوند. برای افزایش حساسیت، راهبردهای تقویت سیگنال مختلفی مورد بهره‌برداری قرار گرفته‌اند. علاوه بر این، محققان تلاش‌های قابل‌توجهی جهت دستیابی به تشخیص مولتی‌پلکس با استفاده از قالب ساندویچی LFA مبتنی بر آپتامر انجام داده‌اند. بررسی‌ها در خصوص قالب ساندویچ به شکل‌های مختلف از جمله استفاده از دو آپتامر، استفاده از آپتامر-پادتن، استفاده از راهبردهای تکثیر سیگنال و تشخیص مولتی‌پلکس انجام شده است. در یک LFA ساندویچ معمولی یک جفت آپتامر به کار گرفته می‌شود. آپتامر اولیه بر روی خط آزمون (TL) به‌عنوان پروب پذیرنده استفاده می‌شود و آپتامر ثانویه نشان‌دار با بیوتین بر روی لایه کانژوگه در ناحیه ثانویه به‌عنوان پروب شناساگر پخش می‌شود.

بر اساس تحقیقات اخیر، بازار آپتامر جهانی نزدیک به ۹۱۶ میلیون دلار در سال ۲۰۲۰ بوده و پیش‌بینی می‌شود تا سال ۲۰۲۵ به حدود ۱۸۲۷ میلیون دلار برسد که نرخ رشد آن برابر با ۱۴٫۸ درصد است. این رشد به پیشرفت‌های سریع در فناوری برای غربالگری آپتامرها و افزایش توجه محققان متعدد نسبت داده می‌شود. گرچه عمده بازار آپتامر بر پایه سنتز آپتامر ساخته شده است، بدون هیچ شکلی LFA های مبتنی بر آپتامر شایستگی‌های خود را اثبات کرده و پتانسیل آنها برای تشخیص در محل نشان داده شده است. بر اساس ساختار رقابتی و ساندویچی، روش LFA مبتنی بر آپتامر می‌تواند شناسایی در محل آنالیت هدف را انجام دهد. قالب ساندویچ برای آنالیت‌های با اپی‌توپ‌های چندگانه مناسب‌تر است. درحالی‌که قالب رقابتی برای آنالیت‌های با تنها یک اپی‌توپ ترجیح داده می‌شود. در قالب ساندویچ، آنالیت در نمونه ابتدا با آپتامر نشان‌دار واکنش می‌دهد و سپس توسط مولکول به دام می‌افتد تا یک قالب ساندویچ شکل بگیرد. در قالب رقابتی، آنالیت و مولکول پذیرنده با یکدیگر رقابت می‌کنند تا با آپتامر نشان‌دار واکنش نشان دهند. صرف‌نظر از این که آیا نمونه حاوی آنالیت است، مولکول آپتامر نشان‌دار شده، می‌تواند در نهایت توسط مولکول گزارشگر بر روی خط نشانگر ثبت شود که عملکرد درست LFA مبتنی بر آپتامر را نشان می‌دهد. از آنجا که آپتامرها توانایی متمایزی را برای تغییرات ساختاری دارند، قالب جذب-واجذب نیز برای شناسایی آنالیت‌های هدف در LFA های مبتنی بر آپتامر استفاده

¹ Multiplexed

² Test line



شکل ۳ تصویری از LFA مبتنی بر آبتامر (a)؛ قالب ساندویچ (b)، قالب رقابتی (c)، قالب جذب و واجذب (d) [۵۱].

لایه مزدوج قرار گرفتند، بکارگیری شد. در همان زمان، آبتامرهای VFCA-03 و استرپتوآویدین به ترتیب روی TL و CL به عنوان پروب‌های ضبط و کنترل تثبیت شدند. هنگامی که یک نمونه مثبت روی پد نمونه اعمال شد، ویبریو فیشری در ابتدا به پروب‌های تشخیصی AuNP-VFCA-02 متصل شد تا AuNP-VFCA-02/V. fischeri را تشکیل دهد. اجتماع باکتری‌ها که بیشتر توسط آبتامرهای VFCA-03 در TL دستگیر شدند، مجتمع‌های ساندویچی VFCA-03 (AuNP-VFCA-02/V. fischeri/VFCA-03) را با یک نوار قرمز مشخص تشکیل دادند. هنگامی که یک نمونه منفی اعمال شد، هیچ کمپلکس ساندویچی روی TL تشکیل نشد. صرف نظر وجود یا عدم وجود ویبریو فیشری در نمونه، پروب‌های تشخیصی AuNP-VFCA-02 بیوتینیل‌اضافی توسط استرپتوآویدین روی CL از طریق واکنش میل ترکیبی استرپتوآویدین-بیوتین به دام افتادند که نشان‌دهنده صحت عملکرد LFA است. در نهایت، یک دستگاه خوانش برای تشخیص ویبریو فیشری با محدوده خطی $10^1 \times 4$ تا $10^5 \times 4$ واحد تشکیل کلنی/میلی‌لیتر استفاده شد. Li و همکاران با استفاده از همان اصل

استرپتوآویدین به عنوان یک پروب کنترل بر روی خط کنترل (CL^۱) تثبیت شده است. زمانی که آنالیت بر روی لایه نمونه به کار گرفته می‌شود، ابتدا به آبتامر ثانویه نشان‌گذاری شده متصل می‌شود و سپس توسط آبتامر اولیه به دام می‌افتد و یک ساندویچ بر روی خط آزمون ایجاد می‌کند. مازاد آبتامر ثانویه نشان‌دار با بیوتین می‌تواند توسط استرپتوآویدین تثبیت شده بر روی خط کنترل از طریق واکنش اتصال بین استرپتوآویدین و بیوتین بر روی خط کنترل (CL) ثبت شود. بنابراین، ظهور دو باند در TL و CL یک نتیجه مثبت را نشان می‌دهد. درحالی‌که، یک باند منفرد در خط کنترل نتیجه منفی را نشان می‌دهد. در مطالعات Shin (۲۰۱۸) سامانه نواری تشخیص ویبریو فیشری^۲ ارائه شد [۵۲]. در این روش، جفت آبتامر سلولی VFCA-02 و VFCA-03، با موفقیت توسط Cell-SELEX غربالگری شدند. در این پژوهش، نانوذرات طلا (AuNPs) اصلاح شده با کربوکسیل برای کانژوگه شدن با آبتامرهای بیوتینیل‌شده VFCA-02 و با هدف تشکیل پروب‌های شناساگر AuNP-VFCA-02، که روی

¹ Control line

² *V. fischeri*

شناساگر AuNP-PRA70A را به دام انداخت که منجر به ایجاد یک باند قرمز دوم شد. برای افزایش حساسیت، استراتژی‌های تقویت سیگنال مختلف در قالب ساندویچ LFA های مبتنی بر آپتامر مورد بهره‌برداری قرار گرفته‌اند. Wu و همکارانش یک LFA ساندویچ مرتبط با تکثیر آنزیمی و غنی‌سازی مغناطیسی را برای تشخیص کانگلو تین^۲ در ۲۰ دقیقه آماده کردند [۵۵]. تشخیص مولتی‌پلکس، به‌عنوان مثال، تشخیص همزمان آنالیت‌های هدف چندگانه در یک سنجش واحد، در قالب ساندویچ LFA های مبتنی بر آپتامر پدیدار شده است. Zheng و همکاران یک LFA ساندویچ را برای شناسایی مولتی‌پلکس 210، -155، -21 microRNA(miRNA) توصیف کردند. خلاصه‌ای از نمونه‌های کاربردی قالب ساندویچ برای LFA های مبتنی بر آپتامر در جدول ۲ آورده شده است.

قالب رقابتی LFA مبتنی بر آپتامر به‌طور کلی برای شناسایی آنالیت‌های با یک اپی‌توپ استفاده می‌شود. رویکرد شهودی رقابت از این حقیقت استفاده می‌کند که هدف در نمونه با DNA مکمل آن بر روی خط آزمون برای ترکیب با آپتامر نشان‌دار شده رقابت می‌کند. یک روش جایگزین از این حقیقت استفاده می‌کند که هدف در نمونه با هاپتن روی خط آزمون برای ترکیب با آپتامر نشان‌دار رقابت می‌کند. جهت بهبود حساسیت، راهبردهای تقویت سیگنال مختلف در قالب رقابتی LFA های مبتنی بر آپتامر مورد استفاده قرار گرفته‌اند. امروزه، تشخیص مولتی‌پلکس در قالب رقابتی LFA های مبتنی بر آپتامر بسیار مورد توجه محققین قرار گرفته است. قالب رقابتی برای LFA های مبتنی بر آپتامر شامل رقابت بین هدف و DNA مکمل آن، رقابت بین هدف و هاپتن، LFA رقابتی با راهبردهای تکثیر سیگنال و LFA رقابتی برای تشخیص مولتی‌پلکس است.

توضیح داده شده در بالا یک ساندویچ LFA برای تشخیص رونگالیت^۱ در ۱۵ دقیقه ایجاد کردند [۵۳]. به‌طور خاص، یک آپتامر اولیه A09 بیوتینیل‌شده با استرپتوآویدین و یک آپتامر ثانویه بیوتینیل‌شده B09 کائزوگه بانانوذرات طلا (AuNP-B09) به‌ترتیب به‌عنوان پروب‌های ضبط و تشخیص طراحی شدند. استرپتوآویدین همچنین، روی CL به‌عنوان کاوشگر کنترل برای گرفتن پروب‌های تشخیص AuNP-B09 بیوتینیل‌شده اضافی تثبیت شد. حد تشخیص به‌دست آمده با چشم غیرمسلح برای رونگالیت در نمونه‌های غذایی ۱ میکروگرم در یک میلی‌لیتر بود.

علاوه بر کاربرد جفت آپتامرها، ترکیب آپتامر و پادتن در قالب ساندویچی LFA های مبتنی بر آپتامر استفاده می‌شود. Kang و همکاران یک قالب ساندویچ LFA را با استفاده از آپتامر و پادتن (Ab) برای تشخیص نوکلئوپروتئین (NPR) و تروپونین ۱ قلبی (cTnI) در ۱۰ دقیقه گزارش کردند [۵۴]. در این روش، یک پروتئین متصل شونده به ssDNA (PRA70A) با AuNP برای تشکیل پروب‌های شناساگر (AuNP-PRA70A) مزدوج شد. Anti-NPR یا Ab anti-cTnI پروب، به‌عنوان پروب به دام اندازنده بر روی خط تست تثبیت شدند و streptavidin - biotinylated cDNA در برابر NPR یا cTnI آپتامر اختصاصی به‌عنوان پروب کنترل بر روی خط کنترل (CL) تثبیت شد. پس از افزودن مخلوط آنالیت هدف و آپتامر مربوطه بر روی لایه نمونه، آنتی‌بادی تثبیت شده بر روی خط تست آنالیت هدف را به دام انداخت. پس از آن، پروب‌های شناساگر AuNP-PRA70A بر روی لایه نمونه جهت ترکیب با کمپلکس ساندویچ (AuNP-PRA70A-aptamer/target/Ab) به کار گرفته شدند و ایجاد رنگ قابل‌شناسایی AuNPs بر روی خط تست را نشان دادند. پروب کنترل در خط کنترل مازاد پروب

² β - conglutin

¹ Rongalite

جدول ۲ خلاصه‌ای از قالب ساندویچ برای LFA های مبتنی بر آپتامر

منبع	خط کنترل	خط تست	پروب شناساگر	آنالیت هدف
۵۶	ssDNA	OD64	AuNP-OD35	ODAM
۵۷	Streptavidin-biotin-poly A	Streptavidin-biotin- J3APT	AuNP-JH4APT-poly T	H5N5
۵۸	Streptavidin- biotin-cDNA	Streptavidin- biotin-tDNA	AuNP-DNA	کورتیزول
۵۹	Streptavidin- biotin-cDNA	Streptavidin- biotin-tDNA	Cuo-DNA	HPV16-DNA
۶۰	Streptavidin- biotin-aptamer	Streptavidin- biotin-aptamer1	UCNP-aptamer2	Vaspin
۶۱	Streptavidin-cDNA	streptavidin	AuNP-Apt	ترومبین
۶۲	ssDNA	Ab	AuNP-streptavidin	OPN
۶۳	Ab2	streptavidin	AuNP _B -Ab ₃ /Cy3- AuNP _A -Ab1	PDGF-BB
۶۴	Streptavidin- biotin-cDNA	Streptavidin- biotin-aptamers of PDGF-BB and thrombin	AuNP-aptamers of PDGF-BB and thrombin	PDGF-BB and thrombin
۶۵	بیوتین	Ab	AuNP- streptavidin	اریترومایسین
۶۶	cDNA	tDNA	AuNP-DNA	RGNNV-CP

کار گرفته شده‌اند. لیو^۲ و همکاران LFA رقابتی را با استفاده از نانوذرات نقره (AgNPs) به‌عنوان استراتژی تقویت سیگنال برای تشخیص کانامایسین^۳ در مدت ۱۰ دقیقه پایه گذاری نمودند [۶۹]. تشخیص مولتی پلکس برای قالب رقابتی LFA های مبتنی بر آپتامر، در حال حاضر تولید شده‌است. Jin و همکاران نیز یک LFA رقابتی برای تشخیص مولتی پلکس Hg^{2+} ، OTA^۴ و سالمونلا (SE) در ۳۰ دقیقه ساختند [۷۰]. خلاصه‌ای از نمونه‌های کاربردی قالب رقابتی برای LFA های مبتنی بر آپتامر در جدول ۳ آورده شده‌است.

بر اساس رقابت بین هدف در یک نمونه و DNA مکمل آن بر روی خط آزمون برای اتصال به آپتامر نشان‌دار، Wu و همکاران یک LFA های رقابتی را برای تشخیص زارالنون^۱ (ZEN) در نمونه‌های ذرت در ۵ دقیقه طراحی کردند [۶۷]. رقابت بین هدف در نمونه و هدف-هاپتن بر روی خط تست برای اتصال به آپتامر نشان‌دار روش دیگری است که در قالب رقابتی LFA های مبتنی بر آپتامر اعمال می‌شود. Zhu و همکاران LF های رقابتی دوگانه را با استفاده از Cy5 فلورسانس برای تشخیص آفلاتوکسین B1 (AFB1) در نمونه‌های غذایی در مدت ۲۰ دقیقه ایجاد کردند [۶۸]. برای بهبود حساسیت، راهبردهای تقویت سیگنال نیز در مورد LFA های مبتنی بر آپتامر به

² Liu³ Kanamycin⁴ Ochratoxin A¹ Zearalenone

جدول ۳ خلاصه‌ای از قالب رقابتی برای LFA های مبتنی بر آپتامر.

منبع	خط کنترل	خط تست	پروب شناساگر	آنالیت هدف
۷۰	Streptavidin- biotin-cDNA	Streptavidin- biotin-tDNA	AuNP-Apt	Neu5GC
۷۱	مشاهده نشد	Streptavidin- biotin-tDNA	AuNP-CD63	A549 exosomes
۷۲	Digoxin Ab	Streptavidin- biotin-DNA2	AuNP-DNA1-digoxin	Hg ²⁺
۷۳	Streptavidin- biotin-probe 2	Streptavidin- biotin-cDNA	Cy5-Apt	OTA
۷۴	Streptavidin-cDNA2	Streptavidin-cDNA1	UCNP-Apt	OTA
۶۸	Streptavidin- biotin- probe	AFB1-hapten	Cy5-Apt	AFB1
۷۵	مشاهده نشد	aptamer	AuNP-CA125	CA125

جدول ۴ خلاصه‌ای از قالب جذب-واجذب برای LFA های مبتنی بر آپتامر

منبع	خط کنترل	خط تست	پروب شناساگر	آنالیت هدف
۷۹	پلیمر PDDA	Streptavidin	AuNP-Apt-biotin	OTA
۸۰	مشاهده نشد	سیستامین	AuNP-Apt	کورتیزول
۸۱	Streptavidin- biotin- cDNA _۱	Streptavidin- biotin- cDNA _۳	AuNP-Apt duplex	دوپامین
۸۲	مشاهده نشد	HRP	AuNP-gated mSiO ₂ with TMB	<i>L.monocytogenes</i>

جدول ۵ مواردی از به کار گیری آپتامرها در حوزه‌های تشخیص آنالیت‌های میکروبی و بیومارکرها

منبع	خط کنترل	خط تست	پروب شناساگر	آنالیت هدف
۸۴	SA- biotin-DNA probe	SA- biotin-DNA probe	آزمایش تکثیر جایجایی رشته	<i>E.coli</i> O157:H7
۸۵	Anti-digoxigenin antibody	Amino- aptamer2	قالب ساندویچ	<i>E.coli</i> O157:H7
۸۶	SA- biotin-DNA probe	SA- biotin-DNA probe	آزمایش تکثیر جایجایی رشته	سالمونلا انتریدیس
۸۷	Streptavidin-biotinylated control DNA	Streptavidin-biotinylated capture DNA	قالب رقابتی	PCA3 در سرطان پروستات
۸۸	Rabbit anti-mouse antibody	anti-STn monoclonal antibody	قالب ساندویچ	CA125 در سرطان تخمدان

زیستی هستند. نشان داده شده است که بسیاری از آپتامرها به سرعت در چند دقیقه در خون تجزیه می‌شوند. این زمان برای بیشتر کاربردهای پزشکی بسیار کوتاه بوده و بر این اساس، اصلاحات شیمیایی آپتامرها برای بهبود نیمه عمر آنها در گردش درون بدن انجام شده است. ادغام لیگاندهای پلی اتیلن گلیکول (PEG) یا اصلاح انتهای ۳' و ۵' آن، مقاومت در برابر آگزونوکلازها ایجاد می‌کند. از آنجایی که بیشتر آپتامرها مولکول‌های نسبتاً کوچکی با وزن ۵ تا ۱۵ کیلو دالتون (kDa) هستند، به راحتی توسط کلیه‌ها حذف شده و از بدن دفع می‌شوند. کونژوگ شدن با لیگاندهای PEG بزرگ که منجر به افزایش وزن مولکولی به بالاتر از حدود ۴۰ کیلو دالتون افزایش می‌شوند، دفع از طریق کلیه‌ها را کاهش می‌دهد. کنترل خواص فارماکوکینتیک^۱ آپتامرها نیز نسبتاً دشوار است، زیرا ممکن است تخریب، دفع یا در فرایندهای متابولیک با سرعت‌های مختلفی در سراسر بدن دخیل شوند. این عوامل به شدت بر مدت زمان اثر دارو، حسگر زیستی یا پروب آپتامر تأثیر می‌گذارند که در یک محیط بالینی از اهمیت حیاتی برخوردار است. وجود توالی آنتی‌سنس بر علیه آپتامر در واکنش، توانایی آپتامر را کاهش داده و حتی سبب غیر فعال‌سازی آن می‌شود. آپتامرها معمولاً بر اثر واکنش با مولکول‌های هدف طراحی و ایجاد می‌شوند که باید بسیار دقیق و خالص باشند. این یک فرایند کاری بسیار فشرده و پرهزینه را ایجاد می‌کند، که دارای مشکلات اضافی ناشی از ساختار طبیعی پروتئین‌های مختلف در محیط طبیعی سلول به دلیل تغییرات پس از ترجمه است [۸۹، ۹۰].

۳- نتیجه‌گیری

امروزه استفاده از کیت‌های نواری در عرصه‌های مختلف مانند تشخیص باکتری‌ها، عوامل شیمیایی، توکسین‌ها و بیومارکرها به‌عنوان یک روش کاربردی ساده، سریع،

باتوجه به توانایی متمایز آپتامرها برای تغییرات ساختاری، قالب جذب-واجذب در LFA های مبتنی بر آپتامر مورد بهره‌برداری قرار گرفته است. این قالب به جذب آپتامر در سطح برجسب‌ها و واجذبی بعدی از آپتامر نشان‌دار شده؛ از آنجایی که آپتامر وابسته است. برای تحقق بخشیدن قالب جذب-واجذب، آپتامر نشان‌دار یا آپتامرهای دوپلکس در LFA های مبتنی بر آپتامر مورد بررسی قرار گرفت. برای افزایش حساسیت، راهبردهای تقویت سیگنال نیز به کار گرفته شده است. روش‌های جذب-واجذب را در شکل های مختلف LFA جذب-واجذب با آپتامر نشان‌دار، LFA جذب-واجذب با آپتامرهای دوگانه نشان‌دار و LFA جذب-واجذب با راهبردهای تکثیر سیگنال می‌توان طبقه‌بندی کرد. قالب جذب-واجذب با آپتامر نشان‌دار در LFA های مبتنی بر آپتامر، اخیراً تولید شده است. Ranganathan و همکاران یک LFA جذب-واجذب برای تشخیص گیرنده ۲ فاکتور رشد اپیدرمی انسان (HER2) ایجاد کردند [۷۷]. در سال‌های اخیر، فرمت جذب-واجذب با آپتامرهای دوگانه نشان‌دار در LFA های مبتنی بر آپتامر بررسی شده است. Alnajrani و همکاران یک LFA جذب-واجذب برای تشخیص پروژسترون (P4) گزارش کردند [۷۸]. اخیراً، Deng و همکاران یک LFA فلورسانس جذب-واجذب پیشنهاد کردند که با استفاده از نقاط کوانتومی CdTe (QDs) برای تشخیص HIV-DNA در عرض ۱۵ دقیقه استفاده شود [۷۹]. خلاصه‌ای از نمونه‌های کاربردی قالب جذب-واجذب برای LFA های مبتنی بر آپتامر در جدول ۴ آورده شده است. همچنین، مواردی از به‌کارگیری آپتامرها در حوزه‌های تشخیص آنالیت‌های میکروبی و بیومارکرها در جدول ۵ ارائه شده است.

۲-۲ محدودیت‌های اصلی آپتامرها

آپتامرها، به‌ویژه رشته‌های RNA، به‌دلیل برهمکنش با مولکول‌های زیستی، مستعد تخریب سریع در محیط‌های

^۱ pharmacokinetic

aureus-specific DNA aptamers. *Sensors*. 15, 8884-8897

[2] Mondal, B., Ramlal, S., Lavu, P. S. R., Murali, H. S., and Batra, H. V. (2015) A combinatorial systematic evolution of ligands by exponential enrichment method for selection of aptamer against protein targets. *Appl Microbiol Biotechnol*. 99, 9791-9803

[3] Xiao, P., Lv, X., and Deng, Y. (2012) Immobilization of chymotrypsin on silica beads based on high affinity and specificity aptamer and its applications. *Anal Lett*. 45, 1264-1273

[4] Zhou, J., and Rossi, J. (2017) Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges. *Nat Rev Drug Discov*. 16, 181-202

[5] Teng, J., Yuan, F., Ye, Y., Zheng, L., Yao, L., Xue, F., Chen, W., and Li, B. (2016) Aptamer-based technologies in foodborne pathogen detection. *Front Microbiol*. 7, 1426

[6] Lin, C., Liu, Z.-S., Wang, D.-X., Li, L., Hu, P., Gong, S., Li, Y.-S., Cui, C., Wu, Z.-C., and Gao, Y. (2015) Generation of internal-image functional aptamers of okadaic acid via magnetic-bead SELEX. *Mar Drugs*. 13, 7433-7445

[7] Mosing, R. K., Mendonsa, S. D., and Bowser, M. T. (2005) Capillary electrophoresis-SELEX selection of aptamers with affinity for HIV-1 reverse transcriptase. *Anal Chem*. 77, 6107-6112

[8] Ara, M. N., Hyodo, M., Ohga, N., Hida, K., and Harashima, H. (2012) Development of a novel DNA aptamer ligand targeting to primary cultured tumor endothelial cells by a cell-based SELEX method. *PLoS One*. 7, e50174

[9] Lin, C. H., and Patei, D. J. (1997) Structural basis of DNA folding and recognition in an AMP-DNA aptamer complex: distinct architectures but common recognition motifs for DNA and RNA aptamers complexed to AMP. *Chem Biol*. 4, 817-832

[10] Templier, V., Roux, A., Roupioz, Y., and Livache, T. (2016) Ligands for label-free detection of whole bacteria on biosensors: A review. *Trends Analyt Chem*. 79, 71-79

[11] Ruscito, A., and DeRosa, M. C. (2016) Small-molecule binding aptamers: Selection strategies, characterization, and applications. *Front Chem*. 4, 14

[12] Tabarзад, M., and Jafari, M. (2016) Trends in the design and development of specific aptamers against peptides and proteins. *Protein J*. 35, 81-99

[13] Chen, C., Zhao, P., Ni, M., Li, C., Xie, Y., and Fei, J. (2019) Temperature-induced amperometric glucose biosensor based on a poly (N-vinylcaprolactam)/graphene oxide composite film. *Analyst*. 144, 1960-1967

[14] Mercier, M.-C., Dontenwill, M., and Choulier, L. (2017) Selection of nucleic acid aptamers

کارآمد، با قابلیت دست‌ورزی و بهینه‌سازی، مورد توجه قرار گرفته است. در این میان باتوجه به مزایای آپتامرها نسبت به پادتن‌ها، استفاده از روش‌های LFA مبتنی بر آپتامر مورد توجه بیشتری قرار گرفته است. ویژگی‌های منحصر به فرد و قابل توجه LFA ها به شناسایی بیماری‌ها و عوامل عفونی در پزشکی، کشاورزی، امنیت غذا و محیط‌زیست کمک کرده است. اگرچه اصل این روش برای دهه‌ها بدون تغییر باقی مانده است، پیشرفت‌های پیوسته روش‌های LFA منجر به افزایش حساسیت، تکرارپذیری و تشخیص هم‌زمان چند آنالیت شده است. آپتامرها طیف وسیعی از کاربردها را نسبت به پادتن یا روش‌های تشخیص سنتی دارند، زیرا می‌توانند با انواع مختلف فن‌ها ترکیب شوند. مسئله‌ای که در خصوص آپتامرها وجود دارد این است که علی‌رغم کسب نتایج مطلوب از آنها در بافر، نمی‌توان آنها را در نمونه‌های واقعی به خوبی اعمال کرد. دلیل عملکرد موفق آپتامر در بافر نیز ممکن است به بهینه‌سازی بودن بیشتر عوامل در طول آزمایش و ساده بودن ترکیب بافر مرتبط باشد. در حالی که به دلیل ترکیب پیچیده نمونه‌های واقعی نتایج تشخیص اغلب به اندازه نتایج تجربی خوب نیستند. همواره چگونگی استفاده بهینه و مطلوب‌تر از روش‌های آزمایشگاهی برای عملکردی بودن مشکلی بوده است که باید از آن عبور کرد. امروزه این سنسورها می‌توانند به طور مؤثر خارج از آزمایشگاه انجام شوند و مزایای زیادی برای استفاده چه در زمینه تشخیص و چه در تنظیمات بالینی دارند. لازم به توضیح است LFA مبتنی بر آپتامر، فناوری‌های نوینی است که در حال تجاری سازی است و به نظر می‌رسد در آینده بتواند جایگزین پادتن‌ها شود.

۴- منابع

[1] Moon, J., Kim, G., Park, S. B., Lim, J., and Mo, C. (2015) Comparison of whole-cell SELEX methods for the identification of *Staphylococcus*

- functional assessment and optimization. *Appl Biochem Microbiol.* 54, 677-681
- [28] Barkheh, H., Zeinoddini, M., Ranjbar, B., and Xodadadi, N. (2021) A Novel Strategy for Trinitrotoluene Detection Using Functionalized Gold Nanoparticles. *J Anal Chem.* 76, 459-465
- [29] Ahirwar, R., Nahar, S., Aggarwal, S., Ramachandran, S., Maiti, S., and Nahar, P. (2016) In silico selection of an aptamer to estrogen receptor alpha using computational docking employing estrogen response elements as aptamer-like molecules. *Sci Rep.* 6, 21285.
- [30] Carter, L. J., Garner, L. V., Smoot, J. W., Li, Y., Zhou, Q., Saveson, C. J., Sasso, J. M., Gregg, A. C., Soares, D. J., and Beskid, T. R. (2020) Assay techniques and test development for COVID-19 diagnosis, ed: ACS Publications. 6,591-605
- [31] Baker, M. (2015) Blame it on the antibodies. *Nature.* 521, 274
- [32] E Wang, R., Wu, H., Niu, Y., and Cai, J. (2011) Improving the stability of aptamers by chemical modification. *Curr Med Chem.* 18, 4126-4138
- [33] Monia, B. P., Johnston, J. F., Sasmor, H., and Cummins, L. L. (1996) Nuclease resistance and antisense activity of modified oligonucleotides targeted to Ha-ras. *J Biol Chem.* 271, 14533-14540
- [34] Griffin, L. C., Tidmarsh, G. F., Bock, L. C., Toole, J. J., and Leung, L. (1993) In vivo anticoagulant properties of a novel nucleotide-based thrombin inhibitor and demonstration of regional anticoagulation in extracorporeal circuits. *Blood.* 18, 3271-3276
- [35] Pagratis, N. C., Bell, C., Chang, Y., Jennings, S., Fitzwater, T., Jellinek, D., and Dang, C. (1997) Potent 2'-amino-, and 2'-fluoro-2'-deoxyribonucleotide RNA inhibitors of keratinocyte growth factor. *Nat Biotechnol.* 15, 68-73
- [36] Matsunaga, K.-i., Kimoto, M., Hanson, C., Sanford, M., Young, H. A., and Hirao, I. (2015) Architecture of high-affinity unnatural-base DNA aptamers toward pharmaceutical applications. *Sci Rep.* 5, 1-7
- [37] Shoara, A. A., Reinstein, O., Borhani, O. A., Martin, T. R., Slavkovic, S., Churcher, Z. R., and Johnson, P. E. (2018) Development of a thermal-stable structure-switching cocaine-binding aptamer. *Biochimie.* 145, 137-144
- [38] Rusconi, C. P., Roberts, J. D., Pitoc, G. A., Nimjee, S. M., White, R. R., Quick, G., Scardino, E., Fay, W. P., and Sullenger, B. A. (2004) Antidote-mediated control of an anticoagulant aptamer in vivo. *Nat Biotechnol.* 22, 1423-1428
- [39] Gupta, S., Drolet, D. W., Wolk, S. K., Waugh, S. M., Rohloff, J. C., Carter, J. D., Mayfield, W. S., targeting tumor cell-surface protein biomarkers. *Cancers.* 9, 69
- [15] Chu, T. C., Marks, J. W., Lavery, L. A., Faulkner, S., Rosenblum, M. G., Ellington, A. D., and Levy, M. (2006) Aptamer: toxin conjugates that specifically target prostate tumor cells. *Cancer Res.* 66, 5989-5992
- [16] Wu, P., Li, S., Ye, X., Ning, B., Bai, J., Peng, Y., Li, L., Han, T., Zhou, H., and Gao, Z. (2020) Cu/Au/Pt trimetallic nanoparticles coated with DNA hydrogel as target-responsive and signal-amplification material for sensitive detection of microcystin-LR. *Anal Chim Acta.* 1134, 96-105
- [17] Sharma, T. K., Bruno, J. G., and Dhiman, A. (2017) ABCs of DNA aptamer and related assay development. *Biotechnol Adv.* 35, 275-301
- [18] Tuerk, C., and Gold, L. (1990) Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science.* 249, 505-510
- [19] Qu, J., Yu, S., Zheng, Y., Zheng, Y., Yang, H., and Zhang, J. (2017) Aptamer and its applications in neurodegenerative diseases. *Cell Mol Life Sci.* 74, 683-695
- [20] Sheikh, A., Md, S., and Kesharwani, P. (2022) Aptamer grafted nanoparticle as targeted therapeutic tool for the treatment of breast cancer. *Biomed Pharmacother.* 146, 112530
- [21] Blind, M., and Blank, M. (2015) Aptamer selection technology and recent advances. *Mol Ther Nucleic Acids.* 4, e223
- [22] Sefah, K., Shanguan, D., Xiong, X., O'donoghue, M. B., and Tan, W. (2010) Development of DNA aptamers using Cell-SELEX. *Nat Protoc.* 5, 1169-1185
- [23] Silverman, S. K. (2008) Catalytic DNA (deoxyribozymes) for synthetic applications—current abilities and future prospects. *Chem comm,* 3467-3485
- [24] Röthlisberger, P., Gasse, C., and Hollenstein, M. (2017) Nucleic acid aptamers: Emerging applications in medical imaging, nanotechnology, neurosciences, and drug delivery. *Int J Mol Sci.* 18, 2430
- [25] Barkheh, H., Zeinoddini, M., and Ranjbar, B. (2016) Colorimetric Detection of TNT Using Aptasensor based on Gold-nanoparticle. *Journal of Police Medicine.* 5, 177-186
- [26] Torshizi, R., Zeinoddini, M., Deldar, A.-A., and Robatjazi, S.-M. (2013) Design of aptamer-based detector for trinitrotoluene (TNT) and review of its performance. *Journal of Police Medicine.* 2, 39-45
- [27] Alipour, M., Zeinoddini, M., and Saeedinia, A. (2018) Anti-trinitrotoluene aptamers: design,

- [53] Li, J., Jing, L., Song, Y., Zhang, J., Chen, Q., Wang, B., Xia, X., and Han, Q. (2018) Rapid detection of ronalite via a sandwich lateral flow strip assay using a pair of aptamers. *Nanoscale Res Lett.* 13, 1-7
- [54] Kang, J., Yeom, G., Jang, H., Oh, J., Park, C.-J., and Kim, M.-G. (2019) Development of replication protein A-conjugated gold nanoparticles for highly sensitive detection of disease biomarkers. *Anal Chem.* 91, 10001-10007
- [55] Wu, Z., He, D., Xu, E., Jiao, A., Chughtai, M. F. J., and Jin, Z. (2018) Rapid detection of β -conglutin with a novel lateral flow aptasensor assisted by immunomagnetic enrichment and enzyme signal amplification. *Food Chem.* 269, 375-379
- [56] Lee, B. H., Kim, S. H., Ko, Y., Park, J. C., Ji, S., and Gu, M. B. (2019) The sensitive detection of ODAM by using sandwich-type biosensors with a cognate pair of aptamers for the early diagnosis of periodontal disease. *Biosense Bioelectron.* 126, 122-128
- [57] Kim, S.-H., and Min, C.-S. (2019) Fouling reduction using the resonance vibration in membrane separation of whole milk. *J Ind Eng Chem.* 75, 123-129
- [58] Dalirirad, S., Han, D., and Steckl, A. J. (2020) Aptamer-based lateral flow biosensor for rapid detection of salivary cortisol. *ACS Omega.* 5, 32890-32898
- [59] Yang, Z., Yi, C., Lv, S., Sheng, Y., Wen, W., Zhang, X., and Wang, S. (2019) Development of a lateral flow strip biosensor based on copper oxide nanoparticles for rapid and sensitive detection of HPV16 DNA. *Sens Actuators B Chem.* 285, 326-332
- [60] Ali, M., Sajid, M., Khalid, M. A. U., Kim, S. W., Lim, J. H., Huh, D., and Choi, K. H. (2020) A fluorescent lateral flow biosensor for the quantitative detection of Vaspin using upconverting nanoparticles. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 226, 117610
- [61] Gao, Y., Zhu, Z., Xi, X., Cao, T., Wen, W., Zhang, X., and Wang, S. (2019) An aptamer-based hook-effect-recognizable three-line lateral flow biosensor for rapid detection of thrombin. *Biosense Bioelectron.* 133, 177-182
- [62] Mukama, O., Wu, W., Wu, J., Lu, X., Liu, Y., Liu, Y., Liu, J., and Zeng, L. (2020) A highly sensitive and specific lateral flow aptasensor for the detection of human osteopontin. *Talanta.* 210, 120624
- [63] Cheng, N., Liu, Y., Mukama, O., Han, X., Huang, H., Li, S., Zhou, P., Lu, X., and Li, Z. (2020) A signal-enhanced and sensitive lateral flow aptasensor for the rapid detection of PDGF-BB. *RSC Adv.* 10, 18601-18607
- Otis, M. R., Fowler, C. R., and Suzuki, T. (2017) Pharmacokinetic properties of DNA aptamers with base modifications. *Nucleic Acid Ther.* 27, 345-353
- [40] Bahadır, E. B., and Sezgintürk, M. K. (2016) Lateral flow assays: Principles, designs and labels. *Trends Analyt Chem.* 82, 286-306
- [41] Kim, H., Chung, D.-R., and Kang, M. (2019) A new point-of-care test for the diagnosis of infectious diseases based on multiplex lateral flow immunoassays. *Analyst.* 144, 2460-2466
- [42] Huang, X., Aguilar, Z. P., Xu, H., Lai, W., and Xiong, Y. (2016) Membrane-based lateral flow immunochromatographic strip with nanoparticles as reporters for detection: A review. *Biosense Bioelectron.* 75, 166-180
- [43] Soh, J. H., Chan, H.-M., and Ying, J. Y. (2020) Strategies for developing sensitive and specific nanoparticle-based lateral flow assays as point-of-care diagnostic device. *Nano Today.* 30, 100831
- [44] Huang, L., Tian, S., Zhao, W., Liu, K., Ma, X., and Guo, J. (2020) Multiplexed detection of biomarkers in lateral-flow immunoassays. *Analyst.* 145, 2828-2840
- [45] Yan, W., Wang, K., Xu, H., Huo, X., Jin, Q., and Cui, D. (2019) Machine learning approach to enhance the performance of MNP-labeled lateral flow immunoassay. *Nanomicro Lett.* 11, 1-15
- [46] Reid, R., Chatterjee, B., Das, S. J., Ghosh, S., and Sharma, T. K. (2020) Application of aptamers as molecular recognition elements in lateral flow assays. *Anal Biochem.* 593, 113574
- [47] Schüling, T., Eilers, A., Scheper, T., and Walter, J. (2018) Aptamer-based lateral flow assays. *AIMS Bioeng.* 5, 78-102
- [48] Amraee, M., Oloomi, M., Yavari, A., and Bouzari, S. (2017) DNA aptamer identification and characterization for E. coli O157 detection using cell based SELEX method. *Anal Biochem.* 536, 36-44
- [49] Wang, L., Ma, W., Chen, W., Liu, L., Ma, W., Zhu, Y., Xu, L., Kuang, H., and Xu, C. (2011) An aptamer-based chromatographic strip assay for sensitive toxin semi-quantitative detection. *Biosense Bioelectron.* 26, 3059-3062
- [50] Jauset-Rubio, M., El-Shahawi, M. S., Bashammakh, A. S., Alyoubi, A. O., and Ciara, K. (2017) Advances in aptamers-based lateral flow assays. *Trends Analyt Chem.* 97, 385-398
- [51] Huang, L., Tian, S., Zhao, W., Liu, K., Ma, X., and Guo, J. (2021) Aptamer-based lateral flow assay on-site biosensors. *Biosense Bioelectron.* 186, 113279
- [52] Shin, W.-R., Sekhon, S. S., Rhee, S.-K., Ko, J. H., Ahn, J.-Y., Min, J., and Kim, Y.-H. (2018) Aptamer-based paper strip sensor for detecting *Vibrio fischeri*. *ACS Comb Sci.* 20, 261-268

- [75] Wu, S., Liu, L., Duan, N., Wang, W., Yu, Q., and Wang, Z. (2018) A test strip for ochratoxin A based on the use of aptamer-modified fluorescence upconversion nanoparticles. *Mikrochim Acta*. 185, 1-8
- [76] Tripathi, P., Kumar, A., Sachan, M., Gupta, S., and Nara, S. (2020) Aptamer-gold nanozyme based competitive lateral flow assay for rapid detection of CA125 in human serum. *Biosense Bioelectron*. 165, 112368
- [77] Ranganathan, V., Srinivasan, S., Singh, A., and DeRosa, M. C. (2020) An aptamer-based colorimetric lateral flow assay for the detection of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2). *Anal Biochem*. 588, 113471
- [78] Alnajrani, M. N., and Alsager, O. A. (2019) Lateral flow aptasensor for progesterone: Competitive target recognition and displacement of short complementary sequences. *Anal Biochem*. 587, 113461
- [79] Deng, X., Wang, C., Gao, Y., Li, J., Wen, W., Zhang, X., and Wang, S. (2018) Applying strand displacement amplification to quantum dots-based fluorescent lateral flow assay strips for HIV-DNA detection. *Biosense Bioelectron*. 105, 211-217
- [80] Velu, R., and DeRosa, M. C. (2018) Lateral flow assays for Ochratoxin A using metal nanoparticles: comparison of “adsorption-desorption” approach to linkage inversion assembled nano-aptasensors (LIANA). *Analyst*. 143, 4566-4574
- [81] Dalirirad, S., and Steckl, A. J. (2019) Aptamer-based lateral flow assay for point of care cortisol detection in sweat. *Sens Actuators B Chem*. 283, 79-86
- [82] Dalirirad, S., and Steckl, A. J. (2020) Lateral flow assay using aptamer-based sensing for on-site detection of dopamine in urine. *Anal Biochem*. 596, 113637
- [83] Tasbasi, B. B., Guner, B. C., Sudagidan, M., Ucak, S., Kavruk, M., and Ozalp, V. C. (2019) Label-free lateral flow assay for *Listeria monocytogenes* by aptamer-gated release of signal molecules. *Anal Biochem*. 587, 113449
- [84] Wu, W., Zhao, S., Mao, Y., Fang, Z., Lu, X., and Zeng, L. (2015) A sensitive lateral flow biosensor for *Escherichia coli* O157: H7 detection based on aptamer mediated strand displacement amplification. *Anal Chim Acta*. 861, 62-68
- [85] Bruno, J. G. (2014) Application of DNA aptamers and quantum dots to lateral flow test strips for detection of foodborne pathogens with improved sensitivity versus colloidal gold. *Pathogens*. 3, 341-355
- [86] Fang, Z., Wu, W., Lu, X., and Zeng, L. (2014) Lateral flow biosensor for DNA extraction-free
- [64] Liu, G., Gurung, A. S., and Qiu, W. (2019) Lateral flow aptasensor for simultaneous detection of platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) and thrombin. *Molecules*. 24, 756
- [65] Du, Y., Liu, D., Wang, M., Guo, F., and Lin, J. S. (2021) Preparation of DNA aptamer and development of lateral flow aptasensor combining recombinase polymerase amplification for detection of erythromycin. *Biosense Bioelectron*. 181, 113157
- [66] Liu, J., Qin, Q., Zhang, X., Li, C., Yu, Y., Huang, X., Mukama, O., Zeng, L., and Wang, S. (2020) Development of a novel lateral flow biosensor combined with aptamer-based Isolation: application for rapid detection of grouper nervous necrosis virus. *Front Microbiol*. 11, 886
- [67] Wu, S., Liu, L., Duan, N., Li, Q., Zhou, Y., and Wang, Z. (2018) Aptamer-based lateral flow test strip for rapid detection of zearalenone in corn samples. *J Agric Food Chem*. 66, 1949-1954
- [68] Zhu, C., Zhang, G., Huang, Y., Yang, S., Ren, S., Gao, Z., and Chen, A. (2018) Dual-competitive lateral flow aptasensor for detection of aflatoxin B1 in food and feedstuffs. *J Hazard Mater*. 344, 249-257
- [69] Liu, J., Zeng, J., Tian, Y., and Zhou, N. (2018) An aptamer and functionalized nanoparticle-based strip biosensor for on-site detection of kanamycin in food samples. *Analyst*. 143, 182-189
- [70] Jin, B., Yang, Y., He, R., Park, Y. I., Lee, A., Bai, D., Li, F., Lu, T. J., Xu, F., and Lin, M. (2018) Lateral flow aptamer assay integrated smartphone-based portable device for simultaneous detection of multiple targets using upconversion nanoparticles. *Sens Actuators B Chem*. 276, 48-56
- [71] Gong, S., Ren, H., Lin, C., Hu, P., Tian, R., Liu, Z., Li, Y., Zhou, Y., Yang, Y., and Lu, S. (2018) Immunochromatographic strip biosensor for the rapid detection of N-glycolylneuraminic acid based on aptamer-conjugated nanoparticle. *Anal Biochem*. 561, 52-58
- [72] Yu, Q., Zhao, Q., Wang, S., Zhao, S., Zhang, S., Yin, Y., and Dong, Y. (2020) Development of a lateral flow aptamer assay strip for facile identification of theranostic exosomes isolated from human lung carcinoma cells. *Anal Biochem*. 594, 113591
- [73] Sun, J., Gan, Y., Kong, L., Zhou, S., Liang, T., Wang, X., Wan, H., and Wang, P. (2019) A Novel Lateral Flow Strip Based on DNA-Functionalized Gold Nanoparticles for On-site Detection of Mercury (II) Ions. *ISOEN* 2019. 1-3
- [74] Zhang, G., Zhu, C., Huang, Y., Yan, J., and Chen, A. (2018) A lateral flow strip based aptasensor for detection of ochratoxin A in corn samples. *Molecules*. 23, 291

- (2020) Glycovariant-based lateral flow immunoassay to detect ovarian cancer-associated serum CA125. *Communications Biology*. 3, 1-7
- [89] Lakhin, A. V., Tarantul, V. Z., Gening, L. V. (2013) Aptamers: problems, solutions and prospects. *Acta Naturae*, 5(4) , 34-43,
- [90] Rozenblum, G. T., Lopez, V. G., Vitullo, A. D., Radrizzani, M. (2016) Aptamers: current challenges and future prospects. *Expert Opin Drug Discov*, 11(2), 127-35.
- detection of salmonella based on aptamer mediated strand displacement amplification. *Biosense Bioelectron*. 56, 192-197
- [87] Fu, X., Wen, J., Li, J., Lin, H., Liu, Y., Zhuang, X., Tian, C., and Chen, L. (2019) Highly sensitive detection of prostate cancer specific PCA3 mimic DNA using SERS-based competitive lateral flow assay. *Nanoscale*. 11, 15530-15536
- [88] Bayoumy, S., Hyytiä, H., Leivo, J., Talha, S. M., Huhtinen, K., Poutanen, M., Hynninen, J., Perheentupa, A., Lamminmäki, U., and Gidwani, K.

A review of the diagnostic aptamers application in strip kits

Fatemeh Bozorgmehr¹, Mehdi Zeinoddini², Abbas Azimifard³, Noor Mohammad Danesh⁴

1.MSc, Faculty of Pasive Defense, Malek-Ashtar University of Technology, Tehran, Iran.

2 PhD, Faculty of Pasive Defense, Malek-Ashtar University of Technology, Tehran, Iran.

3 MSc, Faculty of Pasive Defense, Malek-Ashtar University of Technology, Tehran, Iran.

4 PhD, Faculty of Pasive Defense, Malek-Ashtar University of Technology, Tehran, Iran.

zeinoddini52@mut.ac.ir

Receipt: 2022/08/21

Accepted: 2022/10/09

Abstract

Aptamers or chemical antibodies are mostly nucleic acid sequences that can bind to various diverse targets including small molecules, large molecules, and cells. Among the advantages of aptamers compared to antibodies, we can mention the in vitro production process, the possibility of choosing aptamers against toxic and non-immunogenic molecules, long-term storage, and much lower production costs. Aptamers can also be easily modified or stabilized, and their synthesis is associated with high purity and reproducibility, they are chemically stable, and due to their nucleic acid structure, they are much more flexible than antibodies, and they can be used in the form of molecular beacons probes, a combination of use aptamer-target interaction and nucleic acid amplification to achieve highly sensitive detection ranges. These interesting features have made aptamers ideal diagnostic elements for analytical tools such as biosensors, colorimetric methods, surface plasmon resonance, and lab-on-a-chip. However, all these methods require skilled workers and laboratory-based instruments, thus limiting their application. In this regard, lateral flow assay or paper strip kits provide fast and reliable results and only require user intervention in the sample addition phase. Due to their simplicity is widely used in various fields including medicine, food product quality inspection, and environmental safety. In this work, while introducing aptamers, , an overview of its unique application in lateral flow assay and the future of this technology should be studies.

Keywords: Aptamer, Antibody, Detection, Assay, Biosensing.