

## طراحی و تولید کاوشگر بیولومینسانسی جدید برای تشخیص مولکولی استافیلوکوکوس اورئوس

یاسمن مزیدی<sup>۱</sup>، رحمان امام زاده<sup>۱\*</sup>، محبوبه نظری<sup>۲،۳</sup> و سیده شهربانو جعفری<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup> ایران، اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم و فناوریهای زیستی، گروه زیست‌شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی

<sup>۲</sup> ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی ایران، مرکز تحقیقات غدد، انیستیتو غدد درون ریز و متابولیسم

<sup>۳</sup> ایران، تهران، ACECR، پژوهشکده ابن سینا، مرکز تحقیقات ریز فناوری زیستی،

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۰۷

### چکیده

باکتری استافیلوکوکوس اورئوس از عوامل بیماری‌زای مهم در انسان و حیوان محسوب می‌شود. این باکتری به دلیل توانایی بسیار زیادش در کسب مقاومت نسبت به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها و در نهایت ایجاد بیماری‌های شدید حائز اهمیت می‌باشد. شناسایی عفونت‌های حاد ناشی از این باکتری با استفاده از روش‌های متداولی مانند کشت، کاری هزینه‌بر و زمان‌بر می‌باشد. آفی‌بادی‌ها پلی‌پپتیدهای تک قلمرویی با وزن مولکولی حدود ۶/۵ کیلو دالتون هستند که در اتصال به طیف وسیعی از مولکول‌ها اختصاصی هستند. در مطالعه حاضر کاوشگر نو ترکیب جدید با نام Rluc-(ZpA963)2 با دو توالی ژنی کدکننده آفی‌بادی 2 (ZpA963) متصل به توالی ژنی کدکننده رنیلا لوسیفراز (Rluc) طراحی و سنتز شد. برای بیان پروتئین نو ترکیب نیز از باکتری اشریشیاکلی استفاده شد و خالص‌سازی پروتئین نو ترکیب نیز به روش کروماتوگرافی تمایلی انجام شد. مطالعات سینتیک آنزیمی نشان داد که Km آنزیم Rluc در ساختار کاوشگر جدید مشابه با آنزیم Rluc نو ترکیب و به ترتیب ۱/۰۷ و ۱/۲۲ میکرومولار می‌باشد و بیانگر این است که الحاق 2 (ZpA963) به آنزیم Rluc، در تمایل اتصال به سوسترای آن تداخلی ایجاد نکرده است. همچنین بررسی اتصال Rluc-2 (ZpA963) به باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نشان داد که کاوشگر جدید قابلیت اتصال به باکتری را در دماهای ۴ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد به طور اختصاصی دارد. علاوه بر این بررسی‌ها نشان داد بیشترین سیگنال لومینسانس مربوط به باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس کشت شده در محیط برین هارت برات می‌باشد. مطالعه حاضر ممکن است برای توسعه کیت‌های تجاری جهت تشخیص و جداسازی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: آفی‌بادی ZpA963، استافیلوکوکوس اورئوس، رنیلا لوسیفراز (Rluc)، لومینسانس

\* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: [sci\\_rahman@yahoo.com](mailto:sci_rahman@yahoo.com)

### مقدمه

حیواناتی چون سگ، گربه و اسب می‌توانند نقش مهمی در انتقال استافیلوکوکوس اورئوس به انسان داشته باشند [۱۹، ۳۳].

فاکتورهای بیماری‌زایی استافیلوکوکوس اورئوس از عوامل ترشحی یا اتصالی به غشاء تشکیل شده است که باعث فرار از سیستم ایمنی، چسبندگی بافتی و لیز سلولی می‌شود [۱۵].

استافیلوکوکوس اورئوس از عوامل بیماری‌زای مهم در انسان و حیوان محسوب می‌شود [۲۷، ۲۸]. این سویه از علل شایع عفونت‌های پوستی و بیماری‌های ناشی از مواد غذایی (FBD) در انسان، سپسیس در بیمارستان‌ها و شیرخوارگاه‌ها، ورم پستان در حیوانات شیرده و علاوه بر این دلیل عفونت‌های پوستی در احشام محسوب می‌شود [۱۶، ۳۵].

روی سطح سلول استافیلوکوکوس اورئوس مطالعه نشده است.

لوسیفرازها پروتئین‌های گزارشگر هستند که به طور موفقیت‌آمیزی برای توسعه انواع مختلف کاوشگرهای مولکولی استفاده شده‌اند [۲، ۸، ۳۰، ۳۴]. در سال‌های اخیر نیز استفاده از این کاوشگرهای مبتنی بر لوسیفراز برای کاربردهای بالینی مورد توجه قرار گرفته است [۱۰، ۱۲]. بنابراین در این مطالعه از ویژگی‌های جالب افی بادی ZpA963 در اتصال اختصاصی به SpA و همین‌طور ویژگی‌های قابل توجه پروتئین گزارشگر رنیل لوسیفراز، برای طراحی و ساخت یک کاوشگر جدید استفاده شده است. این کاوشگر مولکولی جدید به نام Rluc-(ZpA963) توسط اتصال قطعه کد کننده توالی Rluc به دو تکرار از توالی کد کننده افی بادی ZpA963، طراحی و ساخته شد و کاوشگر حاصل نیز برای تشخیص باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، توسط دستگاه لومینومتر استفاده شد.

## مواد و روشها

### همسانه سازی ناقل pCold I حاوی قطعه ژنی Rluc-(ZpA963)<sub>2</sub>

برای ساخت کاوشگر متصل شونده به پروتئین A باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به همراه پروتئین گزارشگر رنیل لوسیفراز، از دو ناقل شامل ناقل اول، pCold I دارای قطعه ژنی Rluc-(ZpA963)<sub>2</sub> در کنار ژن EGFP که قبلاً توسط شاکران و همکاران سنتز شده بود [۹] و ناقل دوم، pCold I دارای قطعه ژنی کد کننده Rluc، استفاده شد. برای این منظور ابتدا باکتریهای دارای ناقل اول و دوم بطور جداگانه در محیط کشت مایع LB دارای آنتی‌بیوتیک در دمای ۳۷ °C برای ۱۶ ساعت کشت داده شدند. در ادامه پس از استخراج ناقل از این باکتری‌ها جهت ویرایش و هضم آنزیمی انجام شد

پس از تایید صحت استخراج‌ها، جهت خارج کردن ژن EGFP از ناقل pCold I حاوی ژن Rluc-(ZpA963)<sub>2</sub>، از آنزیم‌های محدودکننده *XhoI* و *NdeI* استفاده شد. این دو آنزیم در

عوامل دخیل در فرار از سیستم ایمنی شامل بتا-لاکتاماز و پروتئین A استافیلوکوکوس اورئوس (SpA) می‌باشد. پروتئین A، پروتئین حفاظت شده‌ی است که نقش بسیار مهمی در پاتوژنز این باکتریها دارد [۱۴، ۱۹، ۲۰]، بنابراین، این پروتئین می‌تواند به عنوان یک نشانگر تشخیصی برای این باکتری‌های بیماری‌زا باشد [۲۴]. SpA با وزن مولکولی حدود ۴۲ کیلو دالتون، دارای پنج قلمرو همولوگ شامل قلمروهای A، B، C، D، E می‌باشد [۲۵] و توسط انواعی از پروتئین‌ها از جمله آنتی‌بادی‌های ضد پروتئین A نشاندار شده [۱۷]، آنتی‌بادی‌های تک قلمرویی و افی بادی‌ها مورد هدف قرار می‌گیرد [۳۰، ۳۱].

افی بادی‌ها پلی‌پپتیدهای تک قلمرویی با وزن مولکولی حدود ۶،۵ کیلو دالتون هستند که برای اتصال به طیف وسیعی از مولکول‌ها مانند گیرنده فاکتور رشد اپیدرم انسانی [۱۸]، انسولین [۲۳]، گیرنده فاکتور نکروز تومور [۳۴] و آلبومین سرم انسانی [۲۶] اختصاصی هستند [۳۲، ۳۹، ۴۰]. در مقایسه با آنتی‌بادی‌ها و آنتی‌بادی‌های تک قلمرویی، که به‌طور گسترده در فلوسیتومتری و روش‌های ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) استفاده می‌شوند، مولکول‌های افی بادی این مزیت را دارند که در شکل محلول در سلول‌های میزبان مختلف بیان می‌شوند. اختصاصیت و میل ترکیبی زیاد، همراه با ثابت‌های تفکیک پایین، افی بادی‌ها را به ابزارهای مفیدی برای توسعه کاوشگرهای جدید تبدیل کرده است [۳۸، ۴۰]. اخیراً چندین افی بادی از جمله SpA-1، ZpA670، ZpA963 و ZpA964 برای اتصال به SpA گزارش شده است [۱۵، ۳۶]. در میان آنها، ZpA963 به دلیل اختصاصیت زیاد برای اتصال به SpA بسیار مورد توجه قرار گرفته است. مطالعات نشان داده است که این مولکول قادر به اتصال به هر پنج قلمروی ساختاری SpA با میل ترکیبی مشابه می‌باشد [۱۵]. اگرچه اتصال اختصاصی ZpA963 به SpA جذاب می‌باشد، ولی تاکنون این افی بادی به همراه پروتئین گزارشگر لوسیفراز برای تشخیص مستقیم SpA بر

مخلوط شد. واکنش با افزودن آنزیم Rluc یا Rluc-ZpA963 در غلظت نهایی ۳ نانومولار آغاز شد و نشر نور طی ۵ ثانیه توسط لومینومتر (لومینومتر برتولد سیروس) ثبت شد و اطلاعات حاصل با استفاده از نرم افزار گرافد پیرامیز ۶ تحلیل شد.

### سنجش اتصال افی بادی

سنجش‌های اتصال کاوشگر با تیمار کاوشگر لومینسانس Rluc- (ZpA963)2 در حضور استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 6538) انجام شد. باکتری‌های کشت شده در فاز رشد لگاریتمی در محیط کشت LB، در دمای ۳۷°C، به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ g سانتریفیوژ شدند. رسوب حاصل با بافر فسفات سالین (PBS، pH 7.4) شسته شد و سپس در PBS دارای عوامل بلاک کننده (۲،۵٪ آلبومین سرم گاوی (BSA) و ۰،۵٪ tween 20) مجدداً معلق شد. سپس سلول‌های استافیلوکوکوس اورئوس با کاوشگر و آنزیم رنیللا لوسیفراز بطور جداگانه (در غلظت نهایی ۲۰ نانومول در لیتر) برای مدت زمان ۵ و ۱۵ دقیقه برچسب گذاری شدند. برای از بین بردن اتصالات غیراختصاصی، نمونه‌ها متعاقباً با PBS شسته شدند و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ g سانتریفیوژ شدند. سلول‌های استافیلوکوکوس اورئوس نشاندار شده با استفاده از لومینومتر مورد مطالعه قرار گرفتند. به منظور بررسی اختصاصیت اتصال کاوشگر، سنجش اتصال کاوشگر به سلول‌های اشریشیا کلی با دستور عمل مشابه با سلول‌های استافیلوکوکوس اورئوس انجام شد. همچنین به منظور بررسی اثر تعداد سلول بر سیگنال کاوشگر، ابتدا دامنه ای از باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ( $10^8 \times 0.8$  cell/ml) تا  $10^8 \times 2$  آماده شد و در PBS تحت تاثیر عوامل بلاک کننده (۲،۵٪ آلبومین سرم گاوی (BSA) و ۰،۵٪ tween 20) تیمار شد. پس از شستشوی سلولها با PBS، هر یک از نمونه‌ها با غلظت ثابت از کاوشگر Rluc- (ZpA963)2 (۲۰ نانومولار) به مدت ۵ دقیقه تیمار شد. کاوشگرهای متصل نشده با اضافه کردن بافر PBS و انجام سانتریفیوژ به مدت

جایگاه چندگانه همسانه سازی (Multiple Cloning Site) در ناقل pCold I وجود دارند و در ابتدا و انتهای ژن EGFP قرار دارند [۹]. ناقل دوم که pCold I دارای ژن Rluc واقع شده در بین دو جایگاه برشی مشابه می‌باشد، نیز توسط آنزیم‌های محدودکننده *XhoI* و *NdeI* تیمار شد تا امکان خروج قطعه‌ی ژنی Rluc فراهم شد. الحاق قطعه ژنی Rluc به ناقل pCold I حاوی ژن 2 (ZpA963)، پس از واکنش هضم، توسط آنزیم T4 لیگاز صورت گرفت. ناقل نو ترکیب با استفاده از انتقال شیمیایی به *E. coli* DH5a منتقل شد و مدت یک شب در محیط LB در دمای ۳۷°C کشت شد [۴]. سپس تایید همسانه سازی با انجام واکنش تعیین توالی تایید شدند.

### بیان و خالص سازی Rluc-(ZpA963)2

به منظور بیان پروتئین نو ترکیب، ناقل نو ترکیب حاوی توایکی کد کننده Rluc-(ZpA963)2 به سلول‌های بیانی *E. coli* BL21 منتقل شد و سپس این سلول‌ها در ۲۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB تلقیح شدند و در دمای ۳۷°C انکوبه شد تا در طول موج ۶۰۰ نانومتر به دانسیته نوری ۰،۸-۰،۹ برسند. سپس، سلول‌ها با افزودن IPTG (*Isopropyl β-D-thiogalactoside*)، در غلظت نهایی ۰،۳ میلی‌مولار و در دمای ۱۵°C و ۱۵۰ دور در دقیقه برای یک شب تیمار شد. سلول‌ها در نهایت توسط سونیکاسیون لیز شد. پروتئین نو ترکیب Rluc-(ZpA963)2 با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی نیکل سفاروز خالص شدند. پس از خالص سازی پروتئین، آنالیز SDS-PAGE برای تایید کیفیت خالص سازی انجام شد. همچنین، سنجش برادفورد برای تخمین غلظت پروتئین خالص شده انجام شد. همزمان بیان و خالص سازی Rluc مشابه با مطالعات قبلی انجام شد [۹].

### سنجش فعالیت رنیللا لوسیفراز

برای سنجش فعالیت آنزیم، ۱۰۰ میکرولیتر از معرف سنجش حاوی ۱۰۰ میلی‌مولار NaCl در بافر Tris-HCl ۵۰ میلی‌مولار (pH 7.8 و ۲۵ درجه سانتی‌گراد) با غلظت‌های مختلفی از کولترازین (۰/۲۳ تا ۳۰ میکرومولار) در یک لوله

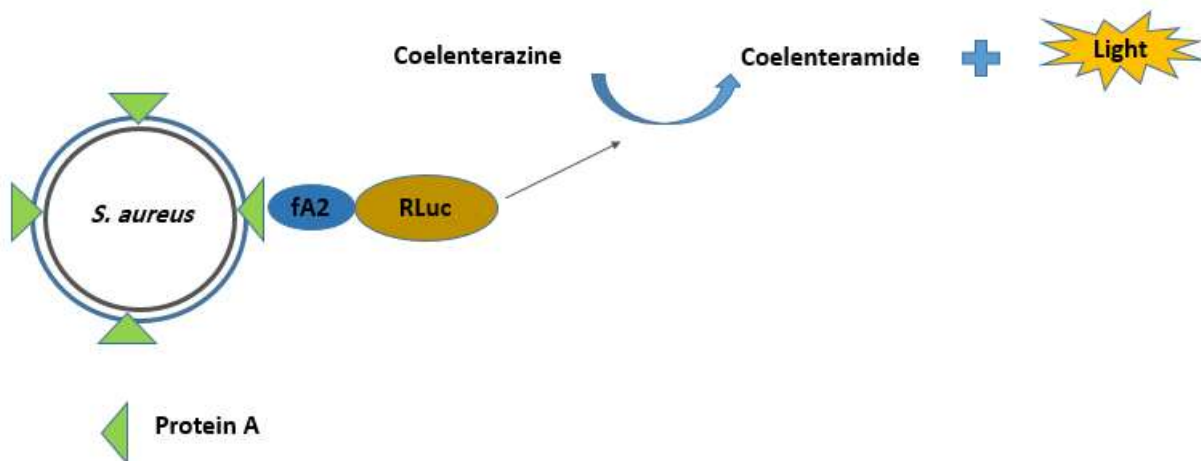
۰,۰۵٪ tween 20) و کاوشگر Rluc- (ZpA963)<sub>2</sub> (۲۰ نانومولار) و حذف کاوشگرهای متصل نشده با انجام سانتیفریوژ (۵۰۰۰ g) به مدت ۱۰ دقیقه) سنجش اتصال با اضافه کردن محلول کولتترازین (غلظت نهایی ۱۰ میکرومولار) در دستگاه لومینومتر انجام شد.

### نتایج

در مطالعه حاضر یک کاوشگر نوترکیب دارای توالی ژنی کد کننده افی بادی (ZpA963)<sub>2</sub> در الحاق با توالی ژنی کد کننده Rluc طراحی و ساخته شد و سیستم آنزیمی و کارایی اتصال آن نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که کاوشگر نوترکیب با نام EGFP- (ZpA963)<sub>2</sub> توانایی اتصال اختصاصی به باکتری استافیلوکوکوس اورئوس دارد.

۱۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ g حذف و در نهایت با اضافه کردن محلول کولتترازین (غلظت نهایی ۱۰ میکرومولار) به نمونه های سیگنال هر یک از نمونه ها در دستگاه لومینومتر سنجیده شد. نتایج با استفاده از نرم افزار اکسل ۲۰۲۰ تحلیل شد.

کارایی اتصال کاوشگر به سلول های استافیلوکوکوس اورئوس رشد کرده در سه محیط کشت لوریا-برتانی نوتریانت و برین هارت برات نیز مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور پس از کشت شبانه در هریک از محیط های کشت به صورت جداگانه، تعداد  $10^8 \times 1/6$  cell / ml از باکتری استافیلوکوکوس اورئوس آماده و پس از انجام تیمار با عوامل بلاک کننده (۲,۵٪ آلبومین سرم گاوی (BSA) و



شکل ۱: شماتیکی از کاوشگر نوترکیب Rluc- (ZpA963)<sub>2</sub> دارای توالی ژنی کد کننده افی بادی (fA2) (ZpA963)<sub>2</sub> در الحاق با توالی ژنی کد کننده Rluc طراحی و ساخته شده برای شناسایی سلول استافیلوکوکوس اورئوس

با هدف غربالگری اولیه تعدادی از کلنی‌های رشد یافته انتخاب و فعالیت آنزیم رنیلا لوسیفراز در آنها با اضافه کردن محلول سوبسترای کولتترازین توسط دستگاه لومینومتر بررسی شد. سپس با استخراج پلاسمید از دو کلنی، مرحله همسانه سازی با انجام واکنش تعیین توالی تایید شد. توالی کامل کاوشگر در پایگاه داده NCBI تحت شماره دسترسی GenBank MH2572398 ثبت شد.

### طراحی، بیان و تخلیص کاوشگر نوترکیب Rluc- (ZpA963)<sub>2</sub>

واکنش الحاق ناقل pCold I حاوی توالی کد کننده افی بادی (ZpA963)<sub>2</sub> و قطعه‌ی ژنی Rluc در جایگاه های محدود اثر *NdeI* و *XhoI* در حضور آنزیم T4 DNA Ligase و در دمای ۲۲°C انجام شد و ناقل نوترکیب با نام (ZpA963)<sub>2</sub> pCold I RLuc ایجاد شد (شکل ۲، الف). ناقل نوترکیب به باکتری های اشریشیا کلی مستعد به روش شیمیایی ترنسفورم شد.

کروماتوگرافی تمایلی Ni-NTA انجام شد. کیفیت RLuc-(ZpA963)<sub>2</sub> توسط SDS-PAGE بررسی شد. مطالعه SDS-PAGE نشان دهند یک نوار پروتئینی در محدوده ۴۵ تا ۶۶/۲ کیلودالتون می‌باشد که می‌تواند با وزن محاسبه شده برای پروتئین نوترکیب (۵۳/۸۴ کیلودالتون) تطابق داشته باشد (شکل ۲، ب).

به منظور بیان پروتئین، پس از تهیه کشت تازه با دانسته نوری برابر با ۰٫۸ از تعدادی از کلنی‌های حاوی (ZpA963)<sub>2</sub> pCold JRLuc، فرایند القای بیان توسط IPTG انجام شد. سلول‌های باکتریایی حاصل توسط سانتریفیوژ جمع‌آوری و توسط فرآیند سونیکاسیون لیز شد. پس از انجام سانتریفیوژ خالص-سازی پروتئین نوترکیب از محلول رویی، توسط



شکل ۲: الف) کاوشگر نوترکیب RLuc-(ZpA963)<sub>2</sub> دارای توالی ژنی کد کننده افی بادی (ZpA963)<sub>2</sub> در الحاق با توالی ژنی کد کننده RLuc طراحی و ساخته شده، ب) نتایج الکتروفورز کاوشگر نوترکیب RLuc-(ZpA963)<sub>2</sub> که به ترتیب در چاهک شماره ۱، ۵ میکرو لیتر اندازه نمای پروتئین، شماره ۲ دو پروتئین نوترکیب به میزان ۱ میکرو لیتر و در چاهک سوم به میزان ۳ میکرو لیتر بارگذاری شده‌اند.

لومینومتر سنجیده شد. با استفاده از نرم‌افزار گرفید پیرامیز ۶ نیز نمودار مکائیلیس-متن برای هر دو نمونه رسم شد (شکل ۳).

مقدار Km برای آنزیم RLuc ۱/۲۲ میکرومولار و برای کاوشگر آنزیمی (ZpA963)<sub>2</sub> RLuc- در حدود ۱/۰۷ میکرومولار می‌باشد. مقایسه‌ی Km ها نشان می‌دهد الحاق توالی (ZpA963)<sub>2</sub> با لوسیفراز در تمایل اتصال آنزیم به سوبسترا تاثیر قابل توجهی ندارد.

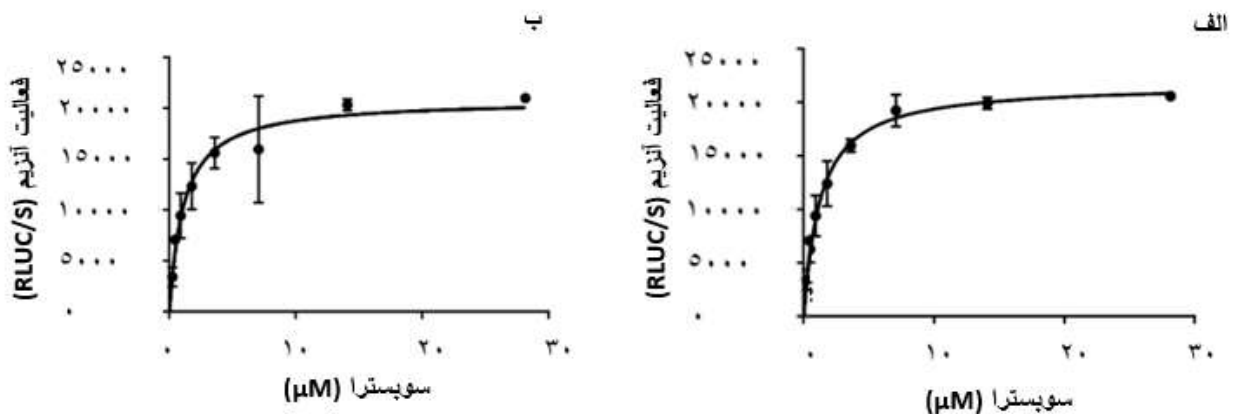
#### نتایج سنجش اتصال کاوشگر RLuc-(ZpA963)<sub>2</sub>

به منظور ارزیابی کارایی پروتئین نوترکیب حاصل، عملکرد RLuc-(ZpA963)<sub>2</sub> در شناسایی و اتصال به باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، تحت تاثیر فاکتورهای مختلفی مانند مدت زمان تیمار، تعداد سلولهای باکتریایی، دما و محیط کشت باکتری، بررسی شد.

تعیین غلظت پروتئین با استفاده از روش برادفورد نشان داد که غلظت پروتئین خالص شده ۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر است. پروتئین‌های نوترکیب خالص شده برای مطالعات بعدی مورد استفاده قرار گرفت. با توجه به این که کاوشگر RLuc-(ZpA963)<sub>2</sub> دارای یک قلمرو متصل شونده به پروتئین A و یک قلمرو گزارشگر لوسیفرازی می‌باشد، ارزیابی کارایی هر یک از قلمروها به‌طور جداگانه انجام شد.

#### مطالعات سینتیکی RLuc-(ZpA963)<sub>2</sub>

به منظور بررسی خصوصیت‌های سینتیکی آنزیم RLuc متصل به کاوشگر، Km RLuc-(ZpA963)<sub>2</sub> محاسبه و با Km آنزیم RLuc مقایسه شد. به این منظور غلظت‌های مختلفی از سوبسترای کولترازین در دامنه‌ی از چند غلظت کمتر و بیشتر از Km آنزیم در بافر Tris-NaCl تهیه شد و فعالیت آنزیم‌ها در غلظت‌های مختلف سوبسترا و در دستگاه

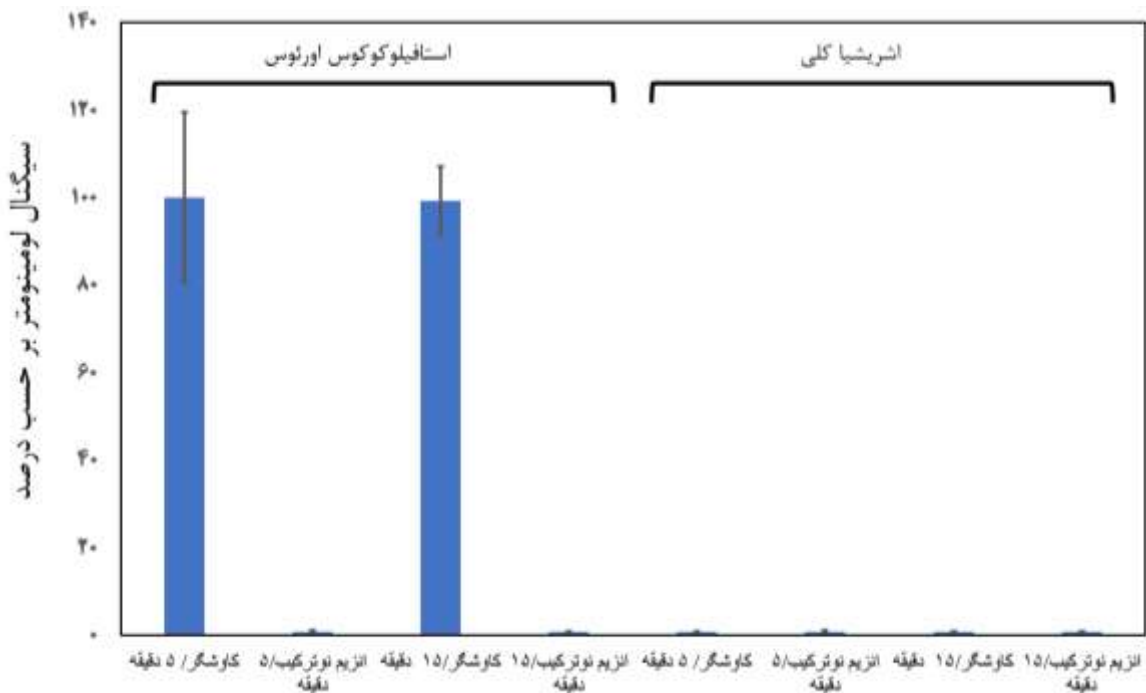


شکل ۳: الف) نمودار میکائیلیس-منتن آنزیم Rluc و ب) کاوشگر 2 (ZpA963)-Rluc، محور افقی غلظت کولترازین ( $\mu\text{M}$ ) و محور عمودی فعالیت آنزیم (RLUC/S) را نشان می‌دهد.

هریک از سلول‌ها تیمار شده با بافر PBS شستشوی شد و سیگنال حاصل از آنزیم رنیللا لوسیفرز با اضافه کردن محلول کولترازین (۱۰ میکرومولار) در دستگاه لومینومتر ثبت شد. همچنین به منظور بررسی اختصاصیت اتصال کاوشگر به سلول‌های استافیلوکوکوس اورئوس، مطالعه اتصال Rluc- (ZpA963)2 و Rluc به سلول‌های اشیریشیا کلی، تحت شرایط مشابه انجام شد (شکل ۴).

سنجش اتصال کاوشگر با تیمار 2 (ZpA963)-Rluc با سلول‌های استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 6538) در دو زمان ۵ و ۱۵ دقیقه انجام شد.

به طور مشابه به منظور بررسی هرگونه میانکنش غیر اختصاصی بین آنزیم لوسیفرز و سلول‌های استافیلوکوکوس اورئوس، میانکنش Rluc نوترکیب با سلول‌های انجام شد.



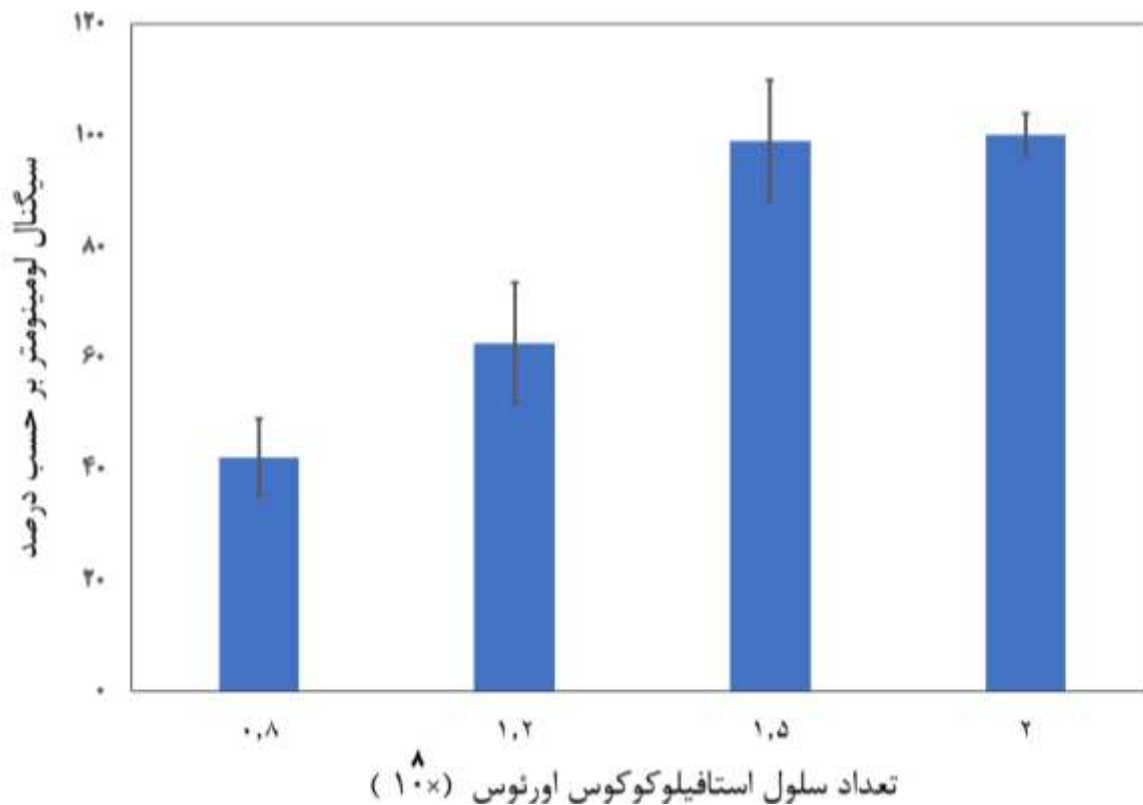
شکل ۴: نمودار سنجش اتصال کاوشگر 2 (ZpA963)-Rluc و آنزیم Rluc در مدت زمان ۵ و ۱۵ دقیقه بعد از انکوباسیون با سلول‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشیریشیا کلی

ZpA963)2، تعداد مختلف‌باز باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ( $10^8 \text{ cell/ml}$  تا  $2 \times 10^8 \text{ cell/ml}$ ) با غلظت ثابت از کاوشگر ZpA963)2 Rluc- (۲۰ نانومولار) تیمار و سیگنال اتصال در حضور کولت‌تراین (۱۰ میکرومولار) در دستگاه لومینومتر ثبت شد (شکل ۵). نتایج نشان می‌دهد همزمان با افزایش تعداد سلول‌ها میزان نشر نور لومینسانس ناشی از اتصال کاوشگر افزایش می‌یابد که بیانگر افزایش تعداد کاوشگرهای متصل به سلول می‌باشد. همچنین نتایج نشان می‌دهد با افزایش تعداد سلول از  $10^6 \text{ cell/ml}$  تا  $2 \times 10^8 \text{ cell/ml}$  افزایش قابل ملاحظه‌ای در نشر نور ناشی از اتصال کاوشگر به سلول ایجاد نمی‌شود و به نظر می‌رسد در این حالت اتصالات کاوشگر به سلول به حالت اشباع پس از آن نشان می‌دهد اتصال استافیلوکوکوس اورئوس و ZpA963)2 Rluc- اختصاصی است.

نتایج مقایسه‌سنجش اتصال کاوشگر ZpA963)2 Rluc- و آنزیم Rluc در مدت زمان ۵ و ۱۵ دقیقه بعد از انکوباسیون با سلول‌ها نشان می‌دهد که کاوشگر ZpA963)2 Rluc- بطور اختصاصی به سلول‌های استافیلوکوکوس اورئوس متصل می‌شود و علاوه بر این مقایسه مدت زمان انکوباسیون کاوشگر نشان می‌دهد که مدت زمان تیمار ۵ و ۱۵ دقیقه اثر مشابهی در سنجش اتصال کاوشگر به سلول‌های استافیلوکوکوس اورئوس دارند. همچنین تیمار اش‌ریشیا کلی در زمان‌های ۵ و ۱۵ دقیقه با کاوشگر نوترکیب یا آنزیم نوترکیب سیگنال قابل ملاحظه‌ای ایجاد نمی‌کند در نتیجه اتصال Rluc- ZpA963)2 به طور اختصاصی به سلول‌های استافیلوکوکوس اورئوس و از طریق قلمروی ZpA963)2 انجام می‌شود.

### تحلیل اتصال کاوشگر نوترکیب به تعداد متفاوت از استافیلوکوکوس اورئوس

برای بررسی اثر تعداد سلول در اتصال به کاوشگر Rluc-

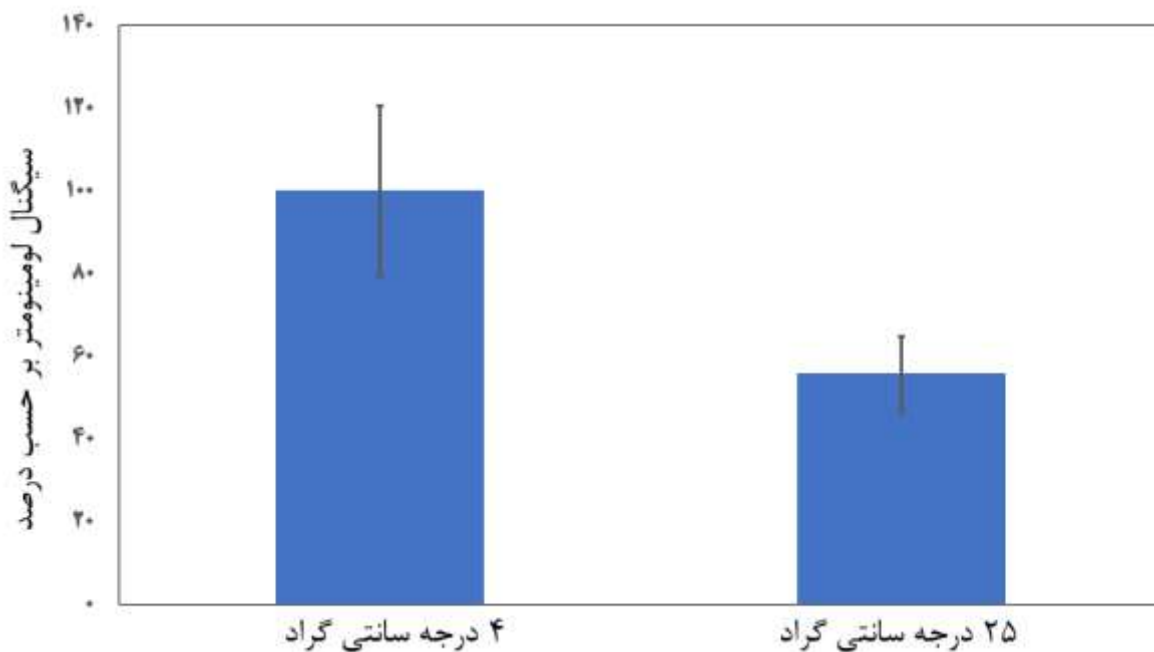


شکل ۵: نمودار مربوط به اثر تعداد سلول‌های باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بر اتصال کاوشگر

### اثر دما در سنجش اتصال کاوشگر

و ۲۵ سانتی‌گراد تیمار و سنجش فعالیت لوسیفراز با افزودن کولتزازین در دستگاه لومینومتر انجام شد (شکل ۶). نتایج نشان می‌دهد تیمار در هر دو دمای ۴ سانتی‌گراد و ۲۵ سانتی‌گراد سیگنال قابل اندازه‌گیری ایجاد می‌کند. با این حال، فعالیت کاوشگر متأثر از دما باشد و دمای ۴ سانتی‌گراد در مقایسه با ۲۵ سانتی‌گراد، میزان سیگنال سنجش شده تا حدود ۲ بیشتر برابر می‌باشد.

بررسی اثر دو دمای ۴ سانتی‌گراد و ۲۵ سانتی‌گراد در کارایی اتصال کاوشگر  $Rluc-(ZpA963)2$  به باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مطالعه شد. به این منظور باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ( $1/6 \times 10^8 \text{ cell/ml}$ ) و کاوشگر (۲۰ نانومولار) به مدت ۱۵ دقیقه در دماهای ۴ سانتی‌گراد

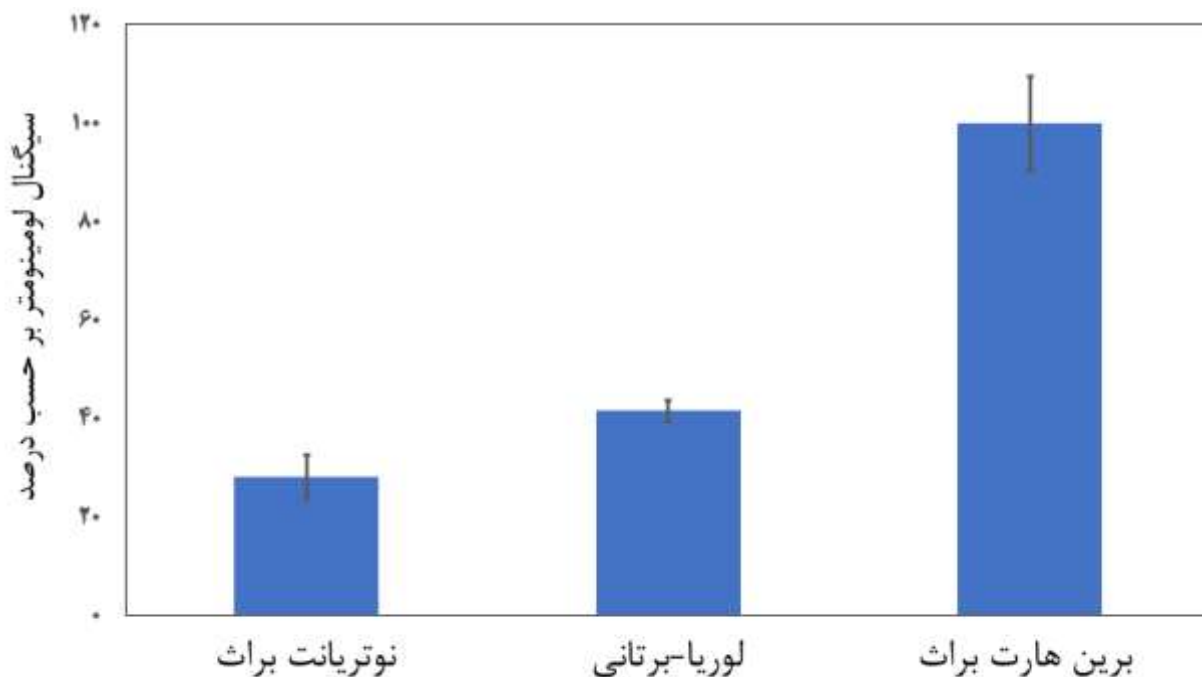


شکل ۶: نمودار مربوط به اثر دما بر روی میزان اتصال کاوشگر

مدت ۱۵ دقیقه تیمار و سنجش فعالیت لوسیفراز با افزودن کولتزازین در دستگاه لومینومتر انجام شد (شکل ۷). نتایج بیان می‌کند سیگنال قابل اندازه‌گیری در باکتری رشد کرده در سه محیط کشت لوریا-برتانی، نوتریانت و برین هارت برات ایجاد می‌شود با این حال، سیگنال کاوشگر به طور معنی‌داری در باکتری رشد کرده در محیط کشت برین هارت در مقایسه با دو محیط کشت دیگر بیشتر است.

### اثر محیط کشت در سنجش اتصال کاوشگر

بررسی اثر رشد باکتری در محیط‌های مختلف اثر سه محیط کشت لوریا-برتانی، نوتریانت و برین هارت بر کارایی اتصال کاوشگر  $Rluc-(ZpA963)2$  به باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مطالعه شد. به این منظور باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ( $1/6 \times 10^8 \text{ cell/ml}$ ) رشد یافته در سه محیط کشت مختلف لوریا-برتانی، نوتریانت و برین هارت برات با غلظت ثابت از کاوشگر (۲۰ نانومولار) به



شکل ۷: نمودار مربوط به اثر سه محیط کشت مختلف بر میزان اتصال کاوشگر

## بحث

است [۲۱]. اخیراً شاکران و همکاران از ZpA963 در الحاق با EGFP کاوشگر لومینسانسی برای شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس توسعه دادند. با وجود کارآمدی کاوشگر EGFP-ZpA963 در شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس، سنجش مبتنی بر EGFP نیازمند دستگاه‌های به نسبت گران قیمت فلوسایتومتری می‌باشد. همچنین EGFP برای برانگیختگی نیاز به منبع نور خارجی دارد که ایجاد سیگنال پس‌زمینه و کاهش نسبت سیگنال به تداخل در کاوشگر می‌شود.

لوسیفرآزها آنزیم‌های هستند که نشر نور سریع، تشخیص آسان، حساسیت زیاد دارند [۷، ۳۷]. بعلاوه بعلت عدم وجود سیگنال پس‌زمینه در سنجش‌ها و استفاده از دستگاه‌های به نسبت ارزانه‌تر لومینومتری حین درسنجش مورد توجه قرار گرفته‌اند [۱۳، ۲۲، ۲۹]. تاکنون کاوشگرهای مولکولی موفق بر اساس رنیلا لوسیفرآز برای شناسایی مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، تشخیص سلول‌های سرطانی و شناسایی گیرنده‌های فاکتور رشد اپیدرمی توسعه یافته است [۶]. در این مطالعه یک کاوشگر مولکولی جدید به نام  $Rluc\text{-}(ZpA963)_2$  با الحاق Rluc با دو تکرار از افی‌بادی متصل

باکتری استافیلوکوکوس اورئوس یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زایی است که باعث مسمومیت غذایی و تأثیرات بالینی حاد و مزمن می‌شود و هر ساله گزارش‌های متعددی از ابتلا به این بیماری‌ها منتشر می‌شود [۱۹، ۳۳]. پروتئین A استافیلوکوکوس اورئوس (SpA) پروتئین حفاظت شده‌ای است که نقش مهمی در پاتوژنز این باکتری دارد [۱۹، ۲۰]، بنابراین، این پروتئین می‌تواند به عنوان یک شاخص تشخیصی برای این باکتری بیماری‌زا باشد. SpA با وزن مولکولی حدود ۴۲ کیلو دالتون، دارای پنج دمین همولوگ شامل دمین‌های E، D، A، B و C می‌باشد و توسط انواعی از پروتئین‌ها از جمله آنتی‌بادی‌های ضد پروتئین A [۱۷]، آنتی‌بادی‌های تک‌دمینی و افی‌بادی‌ها مورد هدف قرار گرفته است [۲۱، ۳۱].

ZpA963 یک افی‌بادی ضد پروتئین A است و به دلیل اختصاصیت بالای برای اتصال به SpA مورد توجه بوده است. مطالعات نشان داده است که این مولکول قادر به اتصال به هر پنج قلمروی ساختاری SpA با میل ترکیبی مشابه

لومینومتر ایجاد می‌کند. این اتصال به طور اختصاصی از طریق قلمروی 2(ZpA963) انجام می‌شود و آنزیم Rluc نوترکیب فاقد افی بادی سیگنال موثر ایجاد نمی‌کند. بعلاوه مطالعات نشان می‌دهد که اتصال کاوشگر 2(ZpA963)-Rluc به استافیلوکوکوس اورئوس در دامنه  $10^8 \text{ cell/ml} \times 1/6$  تا  $10^8 \text{ cell/ml} \times 2$  سلول با الگوی هایپربولیک انجام می‌شود و با افزایش تعداد سلول به اشباع می‌رسد. همچنین کاوشگر یا آنزیم رنیلای لوسیفراز نوترکیب قابلیت اتصال به سطح سلول‌های اشیشیاکلی را ندارند. در نتیجه اتصال Rluc-2(ZpA963) به سلول‌های استافیلوکوکوس اورئوس به طور اختصاصی انجام شده است.

بررسی تأثیر تغییر شرایط محیطی بر اتصال کاوشگر به سلول استافیلوکوکوس اورئوس مطالعه شد. با وجود اینکه مدت زمان تیمار سلول‌ها با کاوشگر در دو زمان ۵ و ۱۵ دقیقه تأثیری روی افزایش سیگنال کاوشگر نداشت، دما و محیط کشت می‌تواند باعث اتصال مطلوب کاوشگر به باکتری شود. در مقایسه با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، انکوبه کردن کاوشگر در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد مناسب‌تری در زمان ۵ دقیقه ایجاد می‌کند. گزارش شده است که آنزیم رنیلای لوسیفراز یک آنزیم ناپایدار به لحاظ سینتیکی است و فعالیت آن در درجه حرارت‌های بالا به سرعت کاهش می‌یابد [۵]. در نتیجه کاهش سیگنال کاوشگر در درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد ممکن است به علت اثرات نامطلوب دما بر قلمروی Rluc باشد. با اینحال صرف‌نظر از سیگنال مناسب‌تر در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، کاوشگر جدید توانایی ایجاد سیگنال در هر دو دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و درجه سانتی‌گراد ۲۵ را دارد و می‌تواند برای سنجش‌های معمول در دمای اتاق نیز انجام شود.

تأثیر محیط کشت بر روی سیگنال حاصل از کاوشگر قابل ملاحظه است و استافیلوکوکوس اورئوس رشد کرده در محیط برین هارت برات با پس از تیمار با کاوشگر، سیگنال بیشتری در مقایسه با سلول‌های رشد کرده در محیط‌های

شونده به پروتئین A با نام ZpA963، ساخته شد و کارایی کاوشگر حاصل برای تشخیص استافیلوکوکوس اورئوس به روش لومینومتری نشان داده شده است.

الحاق پروتئین‌های نوترکیب ممکن است در عملکرد هر قلمرو تداخل ایجاد کند. گزارش شده است که جایگاه فعال آنزیم رنیلای لوسیفراز شامل اسیدها آمینه آسپارتیک اسید ۱۲۰، گلوتامیک اسید ۱۴۴ و هیستیدین ۲۸۵ در زیر واحد بزرگ پروتئین قرار دارند و نسبت به تغییرات کانفورماسیونی حساس هستند [۳]. به منظور بررسی اثر قلمروی افی بادی بر روی فعالیت قلمروی رنیلای لوسیفراز در کاوشگر Rluc-2(ZpA963)، Km آنزیم Rluc در ساختار کاوشگر و Km آنزیم Rluc نوترکیب محاسبه شد. در نتیجه مطالعه نشان داد که مقادیر Km تقریباً مشابه با هم دیگر هستند و الحاق 2(ZpA963) به Rluc تغییرات کانفورماسیونی معنی‌داری که منجر به تغییر در تمایل آنزیم به سوبسترای شده است ایجاد نکرده است. در مطالعه حاضر الحاق دو پروتئین Rluc و 2(ZpA963) در ساختار کاوشگر به واسطه لوپ انعطاف‌پذیر G4S انجام شده است. در نتیجه نتایج نشان می‌دهد که این لوپ فاصله کافی برای جلوگیری از ممانعت فضایی زیر واحد 2(ZpA963) بر روی Rluc در ساختار کاوشگر ایجاد می‌کند. مطالعات حاصل همچنین با نتایج غفوری و همکاران مطابقت دارد [۳۴] و تایید می‌کند که فعالیت آنزیم رنیلای لوسیفراز در الحاق با سایر پروتئین‌های کوچک احتمالاً در حضور لینکر انعطاف‌پذیر G4S تا حدود زیادی حفظ می‌شود.

گزارش شده است که 2(ZpA963) و نیز EGFP-(ZpA963) تمایل قابل ملاحظه‌ای به پروتئین A سطح استافیلوکوکوس اورئوس دارند [۹، ۳۸، ۳۹]. مقایسه نتایج سنجش اتصال کاوشگر 2(ZpA963)-Rluc و آنزیم Rluc با سلول‌های استافیلوکوکوس اورئوس نشان داد که قلمرو 2(ZpA963) در الحاق با Rluc قابلیت اتصال به سطح استافیلوکوکوس اورئوس را دارد و سیگنال قابل اندازه‌گیری در دستگاه

زمان بر و گرانتیمنت وابسته به دستگاه فلوسایتومتری است، سنجش سیگنال Rluc سریع و با روش های دستگاهی ارزانیقیمت تر انجام می شود. همچنین برای انجام آن نیاز به تکنسین های آزمایشگاهی دوره دیده که یک عامل محدود کننده در استفاده از روش های فلوسایتومتری است، نمی باشد. گزارشگر فعلی در کنار سایر روش ها موجود می تواند سنجش استافیلوکوکوس اورئوس را امکانپذیر نماید و ممکن است در آینده در توسعه کیت های تشخیصی برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مورد استفاده قرار بگیرد.

### تضاد منافع:

نویسندگان اعلام می کنند که هیچ تضاد منافی ندارند.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان از حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوریان کشور (Iran National Science Foundation (INSF)) و از این رساله قدردانی می نمایند. نویسندگان از حمایت دانشگاه اصفهان برای اجرای پژوهش حاصل در قالب پایان نامه کارشناسی ارشد در آزمایشگاه مهندسی پروتئین دانشگاه اصفهان قدردانی می نمایند.

کشت لوریا-برتانی و نوتریانت ایجاد می کنند. این موضوع با مطالعات پیشین مطابقت دارد. گزارش شده است که محیط های همانند لوریا برات، نوترینت برات و برین-هارت برات تأثیر معنی داری در میزان بیان پروتئین A توسط باکتری دارند. با این حال گزارش شده است که [۱۱] میزان قابل توجهی از پروتئین A توسط ۹۹٪ از سویه ها در زمانی که در محیط برین-هارت کشت داده می شوند تولید می شود؛ در نتیجه افزایش سیگنال در باکتری های رشد کرده در محیط برین-هارت برات ممکن است بعلت افزایش بیان پروتئین A در این سلول ها در مقایسه با سلول های رشد کرده در محیط های لوریا برات و نوترینت برات باشد.

### نتیجه گیری

بطور کلی نتایج نشان داد که کاوشگر جدید Rluc-(ZpA963)<sub>2</sub> دارای دو قلمروی (ZpA963)<sub>2</sub> و Rluc می باشد. در حالی که به واسطه قلمروی افی بادی (ZpA963)<sub>2</sub> به سلول های استافیلوکوکوس اورئوس متصل می شود، به واسطه قلمروی Rluc سیگنال قابل اندازه گیری ایجاد می کند. سنجش این سیگنال توسط روش های به نسبت ارزانیقیمت لومینومتری انجام می شود و در مقایسه با کاوشگرهای پیشین مبتنی بر EGFP که سنجش آنها توسط فرایند به نسبت

### منابع

- [1] Azizi Z, Deljo A, (2022). Identification of the transcription factor affecting the carotenoid/apocarotenoid biosynthetic pathway promoter in *Crocus sativus* L. *Journal of Plant Research (Scientific)*, 35(3): 541-555, 20.1001.1.23832592.1401.35.3.7.5.
- [2] Farzannia A, Roghanian R, Zarkesh-Esfahani SH, Nazari M, Emamzadeh R (2015). FcUni-RLuc: an engineered Renilla luciferase with Fc binding ability and light emission activity. *Analyst*, 140(5): 1438-1441, doi: 10.1039/c4an01946f.
- [3] Ghaedizadeh S, Emamzadeh R, Nazari M, Rasa SMM, Zarkesh-Esfahani SH, Yousefi M (2016). Understanding the molecular behaviour of Renilla luciferase in imidazolium-based ionic liquids, a new model for the  $\alpha/\beta$  fold collapse. *Biochemical engineering journal*, 105: 505-513, doi: 10.1016/j.bej.2015.10.024.
- [4] Jafari SS, Jafarian V, Khalifeh K, Ghanavatian P, Shirdel SA (2016). The effect of charge alteration and flexibility on the function and structural stability of sweet-tasting brazzein. *RSC advances*, 6(64): 59834-59841, doi: 10.1039/c6ra12626j.
- [5] Kahrani ZF, Emamzadeh R, Nazari M, Rasa SMM (2017). Molecular basis of thermostability enhancement of Renilla luciferase at higher temperatures by insertion of a disulfide bridge into the structure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1865(2): 252-259, doi: 10.1016/j.bbapap.2016.11.004.
- [6] Nazari M, Zamani Koukhaloo S, Mousavi S, Minai-Tehrani A, Emamzadeh R, Cheraghi R (2019). Development of a ZHER3-Affibody-Targeted Nano-Vector for Gene Delivery to HER3-Overexpressed Breast Cancer Cells. *Macromolecular Bioscience*, 19(11): 1900159, doi: 10.1002/mabi.201900159.
- [7] Rahmati, Tashkar, Amin, Hosseinkhani, Saman, & Heydari. (2017). Investigating the effect of choline-based solvent on the bioluminescence reaction of wild

- and mutant luciferase enzyme rich in arginine. *Cell and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*, 30(3), 242-251.
- [8] Safavi A, Emamzadeh R, Nazari M, Ehsani M, Zarkesh-Esfahani SH, Rahgozar S (2017). Super RLuc8-sFv; a new luciferase-labeled probe for detection of human CD4+ cells. *Molecular BioSystems*, 13(3): 470-475, doi: 10.1039/C6MB00652C.
- [9] Shakeran Z, Javadi-Zarnaghi F, Emamzadeh R (2021). Novel luminescent affiprobes for molecular detection of *Staphylococcus aureus* using flow cytometry. *Journal of Applied Microbiology*, 130(2): 493-503, doi: 10.1111/jam.14799.
- [10] Shamsi M, Shirdel SA., Jafarian V, Jafari SS, Khalifeh K, Golestani A (2016). Optimization of conformational stability and catalytic efficiency in chondroitinase ABC I by protein engineering methods. *Engineering in Life Sciences*, 16(8): 690-696, doi: 10.1002/elsc.201600034.
- [11] Carret G, Flandrois JP, Fougerat J (1981). Detection of *Staphylococcus aureus* protein A by passive hemagglutination test using microtiter plates. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. I. Abt. Originale. A, Medizinische Mikrobiologie, Infektionskrankheiten und Parasitologie*, 249(1): 32-38, doi: 10.1016/s0174-3031(81)80039-x.
- [12] Chen W, Zhang J, Huang L, Chen L, Zhou Y, Tang D, Huang C (2019). Detection of HER2-positive circulating tumor cells using the LiquidBiopsy system in breast cancer. *Clinical Breast Cancer*, 19(1): e239-e246, doi: 10.1016/j.clbc.2018.10.009.
- [13] Close DM, Xu T, Sayler GS, Ripp S (2010). In vivo bioluminescent imaging (BLI): noninvasive visualization and interrogation of biological processes in living animals. *Sensors*, 11(1): 180-206, doi: 10.3390/s110100180.
- [14] Crespo-Piazuelo D, Lawlor PG (2021). Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (LA-MRSA) prevalence in humans in close contact with animals and measures to reduce on-farm colonisation. *Irish veterinary journal*, 74(1): 1-12, doi: 10.1039/c8bm01569d.
- [15] Frejd F Y, Kim KT (2017). Affibody molecules as engineered protein drugs. *Experimental & molecular medicine*, 49(3): e306-e306, doi: 10.1038/emm.2017.35.
- [16] Freilich R, Arhar T, Abrams JL, Gestwicki JE (2018). Protein-protein interactions in the molecular chaperone network. *Accounts of chemical research*, 51(4): 940-949, doi:10.1021/acs.accounts.8b00036.
- [17] Furukawa M, Yoneyama H, Hata E, Iwano H, Higuchi H, Ando T, Aso H (2018). Identification of a novel mechanism of action of bovine IgG antibodies specific for *Staphylococcus aureus*. *Veterinary research*, 49(1): 1-12, doi: 10.1186/s13567-018-0517-y.
- [18] Göstring L, Lindegren S, Gedda L (2016). 17AAG-induced internalisation of HER2-specific Affibody molecules. *Oncology letters*, 12(4): 2574-2580, doi: 10.3892/ol.2016.4990.
- [19] Kadariya J, Smith TC, Thapaliya D (2014). *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health. *BioMed research international*, 32: 654, doi: 10.1155/2014/827965.
- [20] Lacey KA, Geoghegan JA McLoughlin, R. M. (2016). The role of *Staphylococcus aureus* virulence factors in skin infection and their potential as vaccine antigens. *Pathogens*, 5(1): 22, doi: 10.3390/pathogens5010022.
- [21] Lindborg M, Dubnovitsky A, Olesen K, Björkman T, Abrahmsén L, Feldwisch J, Härd T (2013). High-affinity binding to staphylococcal protein A by an engineered dimeric Affibody molecule. *Protein Engineering, Design & Selection*, 26(10): 635-644, doi: 10.1093/protein/gzt038.
- [22] Liu S, Su Y, Lin MZ, Ronald JA. (2021). Brightening up Biology: Advances in Luciferase Systems for in Vivo Imaging. *ACS Chemical Biology*, 16(12): 2707-2718, doi: 10.1021/acscchembio.1c00549.
- [23] Luckett BS, Frielle JL, Wolfgang L, Stocker SD (2013). Arcuate nucleus injection of an anti-insulin affibody prevents the sympathetic response to insulin. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 304(11): H1538-H1546, doi: 10.1152/ajpheart.00081.2013.
- [24] Merino N, Toledo-Arana A, Vergara-Irigaray M, Valle J, Solano C, Calvo E, Lasa I (2009). Protein A-mediated multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*, 191(3): 832-843, doi: 10.1128/JB.01222-08.
- [25] O'Halloran DP, Wynne K, Geoghegan JA (2015). Protein A is released into the *Staphylococcus aureus* culture supernatant with an unprocessed sorting signal. *Infection and immunity*, 83(4): 1598-1609, doi: 10.1128/IAI.03122-14.
- [26] Orelma H, Morales LO, Johansson LS, Hoeger IC, Filpponen I, Castro C, Laine J (2014). Affibody conjugation onto bacterial cellulose tubes and bioseparation of human serum albumin. *RSC Advances*, 4(93): 51440-51450, doi: 10.1039/c4ra08882d.
- [27] Pantosti A (2012). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with animals and its relevance to human health. *Frontiers in microbiology*, 3: 127, doi: 10.3389/fmicb.2012.00127.
- [28] Perez-Jorge EV, Burdette SD, Markert R, Beam WB (2010). *Staphylococcus aureus* bacteremia (SAB) with associated *S. aureus* bacteriuria (SABU) as a predictor of complications and mortality. *Journal of hospital medicine*, 5(4): 208-211, doi: 10.1002/jhm.623.
- [29] Prinz A, Reither G, Diskar M, Schultz C (2008). Fluorescence and bioluminescence procedures for functional proteomics. *Proteomics*, 8(6): 1179-1196, doi: 10.1002/pmic.200700802.
- [30] Radke EE, Li Z, Hernandez DN, El Bannoudi H, Kosakovsky Pond SL, Shopsis B, Silverman GJ (2021).

- Diversity of Functionally Distinct Clonal Sets of Human Conventional Memory B Cells That Bind Staphylococcal Protein A. *Frontiers in Immunology*, 12: 1400, doi: 10.3389/fimmu.2021.662782.
- [31] Ryan S, Kell AJ, van Faassen H, Tay LL, Simard B, MacKenzie R, Tanha J (2009). Single-domain antibody-nanoparticles: promising architectures for increased *Staphylococcus aureus* detection specificity and sensitivity. *Bioconjugate chemistry*, 20(10): 1966-1974, doi: 10.1021/bc900332r.
- [32] Tolmachev V, Orlova A (2020). Affibody molecules as targeting vectors for PET imaging. *Cancers*, 12(3): 651, doi: 10.3390/cancers12030651.
- [33] Umeda K, Nakamura H, Yamamoto K, Nishina N, Yasufuku K, Hirai Y, Ogasawara J (2017). Molecular and epidemiological characterization of staphylococcal foodborne outbreak of *Staphylococcus aureus* harboring seg, sei, sem, sen, seo, and selu genes without production of classical enterotoxins. *International journal of food microbiology*, 256: 30-35, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.05.023.
- [34] Varnosfaderani ZG, Emamzadeh R, Nazari M, Zarean M (2019). Detection of a prostate cancer cell line using a bioluminescent affiprobe: An attempt to develop a new molecular probe for ex vivo studies. *International journal of biological macromolecules*, 138: 755-763, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.07.085.
- [35] Velin L, Umutesi G, Riviello R, Muwanguzi M, Bebell LM, Yankurije M, Kateera F (2021). Surgical Site Infections and Antimicrobial Resistance After Cesarean Section Delivery in Rural Rwanda. *Annals of Global Health*, 87(1): doi: 10.5334/aogh.3413.
- [36] Wahlberg E, Lendel C, Helgstrand M, Allard P, Dincbas-Renqvist V, Hedqvist A, Härd T (2003). An affibody in complex with a target protein: structure and coupled folding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(6): 3185-3190, doi: 10.1073/pnas.0436086100.
- [37] Xu T, Close D, Ha ndagama, W., Marr, E., Sayler, G., & Ripp, S. (2016). The expanding toolbox of in vivo bioluminescent imaging. *Frontiers in oncology*, 6: 150, doi: 10.3389/fonc.2016.00150.
- [38] Xue X, Wang B, Du W, Zhang C, Song Y, Cai Y, Zhang L (2016). Generation of affibody molecules specific for HPV16 E7 recognition. *Oncotarget*, 7(45): 73995, doi: 10.18632/oncotarget.12174.
- [39] Zhu S, Chen J, Xiong Y, Kamara S, Gu M, Tang W, Zhang L (2020). Novel EBV LMP-2-affibody and affitoxin in molecular imaging and targeted therapy of nasopharyngeal carcinoma. *PLoS pathogens*, 16(1): e1008223, doi: 10.1371/journal.ppat.1008223.
- [40] Zhu J, Kamara S, Wang Q, Guo Y, Li Q, Wang L, Zhang L (2021). Novel affibody molecules targeting the HPV16 E6 oncoprotein inhibited the proliferation of cervical cancer cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9: 1150, doi: 10.3389/fcell.2021.677867.

## Design and production of a new bioluminescent probe for molecular detection of *Staphylococcus aureus*

Mazidi Y.<sup>1</sup>, Emamzadeh R.<sup>1</sup>, Nazari M.<sup>2,3</sup> and Jafari S.S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Cell and Molecular Biology & Microbiology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, I.R. of Iran

<sup>2</sup>Endocrine Research Center, Institute of Endocrinology and Metabolism, Iran University of Medical Sciences, Tehran, I.R. of Iran

<sup>3</sup>Nanobiotechnology Research Center, Avicenna Research Institute, ACECR, Tehran, I.R. of Iran

### Abstract

*Staphylococcus aureus* is an important pathogen in humans and animals. This bacterium is important due to its great ability to gain resistance to a variety of antibiotics and cause severe diseases. Identifying acute infections caused by this bacterium using conventional methods such as culture is costly and time-consuming. In this study, the design and development of a new probe that specifically detects *S. aureus* by emitting a luminescence signal is carried out. The new recombinant probe, named Rluc-(ZpA963) 2, has the gene sequence encoding Renilla luciferase (Rluc) in fusion with the gene sequence encoding affibody (ZpA963)2. Protein expression was performed in *Escherichia coli* BL21 and protein purification was carried out by affinity chromatography. Kinetics studies show that  $K_m$  of Rluc in the new probe is similar to recombinant Rluc; and are 1.07  $\mu\text{M}$  and 1.22  $\mu\text{M}$ , respectively. Therefore, the affinity for binding to *cholentrazine* does not change in Rluc-(ZpA963) 2. The binding of Rluc-(ZpA963)2 to *S. aureus* also show that the new probe is specifically capable of binding to bacteria at 4° C and 25 ° C. Moreover, the strongest signal is recorded in *S. aureus* growing in the Brain Heart broth. The present study may be used to develop commercial kits in the future.

**Keywords:** Affibody, Luminescence, *Renilla* luciferase, *Staphylococcus aureus*