



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Selección de aptámeros de ADN para la detección de blancos
virales provenientes de enfermedades emergentes”**

TESIS

Que presenta

M. en C. Pablo Alberto Franco Urquijo

Para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

en la especialidad de

Genética y Biología Molecular

Director de Tesis

Dr. Luis Marat Alvarez Salas

Ciudad de México noviembre de 2022

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	5
RESUMEN	7
ABSTRACT	9
1.INTRODUCCIÓN	10
1.1 Enfermedades virales emergentes	10
1.2 Genoma viral de Zika	10
1.3 Estructura de la cápside de ZIKV.....	12
1.4 Síntomas de la infección ZIKV	13
1.5 Métodos de detección para ZIKV	14
1.6 Genoma viral de SARS-CoV-2	16
1.7 Estructura de la cápside de SARS-CoV-2.....	17
1.8 Síntomas de la infección SARS-CoV-2.....	18
1.9 Métodos de detección para SARS-CoV-2	18
1.10 Aptámeros	20
1.11 Aislamiento de aptámeros.....	21
1.12 Ventajas de los aptámeros	23
1.13 Aplicaciones de los aptámeros.....	24
1.14 Aptasensores	24
3. JUSTIFICACIÓN.....	29
4. HIPÓTESIS.....	30
5. OBJETIVOS	31
5.1 Objetivo General.....	31
5.2 Objetivos Específicos.....	31
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
6.1 Oligonucleótidos y proteínas	32
6.2 Selección de secuencias afines al dominio DIII con CE-SELEX	32
6.3 Ensayos de unión	33
6.4 Secuenciación de próxima generación (NGS) y análisis bioinformático	35
6.6 PCR en solución, generación de ADNcs, PCR emulsión y PCR en emulsión asimétrica.	36
6.7 Cultivo celular y producción de virus.....	37

6.8 Inmunotransferencia.....	37
6.9 Ensayo de aptámero ligado a fluoróforo (FLAA)	38
7. RESULTADOS.....	40
7.1 Selección de secuencias afines al dominio DIII de la proteína E de Zika	40
7.1.1 <i>Determinación de enriquecimiento de las rondas de selección</i>	43
7.2 Secuenciación de próxima generación	44
7.3 Validación de los aptámeros mediante ensayos de unión.....	50
7.4 Producción de virus de Zika y evaluación de la interacción con los aptámeros	53
7.5 Elaboración de un ensayo tipo FLAA con aptámeros de ADNcs seleccionados contra la proteína S de SARS-CoV-2.....	55
7.6 Evaluación de la especificidad del FLAA.....	57
7.7 Determinación de la capacidad de detección del FLAA en fluidos biológicos.....	59
7.8 Evaluación del FLAA con muestras clínicas	60
8. DISCUSIÓN.....	62
9. CONCLUSIONES.....	68
10. PERSPECTIVAS	69
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Luis Marat Alvarez Salas en el Laboratorio de Terapia Génica del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

Durante su realización, el autor con CVU 777606 contó con una beca personal otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) un apoyo adicional para realizar una estancia en el extranjero.

ÍNDICE DE FIGURAS

<u>Figura 1. Organización genómica del virus de Zika</u>	10
<u>Figura 2. Estructura del virus de Zika</u>	11
<u>Figura 3. Organización genómica de SARS-CoV2</u>	15
<u>Figura 4. Estructura del virus de SARS-CoV2</u>	16
<u>Figura 5. Representación de la interacción aptámero-blanco</u>	19
<u>Figura 6. Representación esquemática del método SELEX</u>	21
<u>Figura 7. Electroferograma del dominio DIII y biblioteca aleatorizada</u>	38
<u>Figura 8. Resultados del CE-SELEX</u>	39
<u>Figura 9. Determinación de enriquecimiento de CE-SELEX</u>	40
<u>Figura 10. Rondas de selección de CE-SELEX amplificadas por emPCR</u>	42
<u>Figura 11. Ligación de las rondas de selección</u>	42
<u>Figura 12. Verificación de la ligación</u>	43
<u>Figura 13. Análisis de la variabilidad de la NGS</u>	45
<u>Figura 14. Análisis del enriquecimiento de NGS de R2/R3 Y R4/5</u>	45
<u>Figura 15. Predicción de motivos del top 500 de secuencias más enriquecidas del análisis de NGS realizado con MEME para R3 y 5R</u>	46
<u>Figura 16. Purificación de la síntesis de las candidatas seleccionadas</u>	47
<u>Figura 17. Unión de las candidatas al dominio DIII</u>	48
<u>Figura 18. Purificación de la PCR en emulsión asimétrica para los ensayos de unión</u>	49
<u>Figura 19. Afinidad y especificidad de los aptámeros</u>	50
<u>Figura 20. Infección de células c6/36 con ZIKV</u>	51
<u>Figura 21. Detección de la proteína E en ZIKV</u>	51
<u>Figura 22. Unión de los aptámeros al ZIKV</u>	52
<u>Figura 23. Representación gráfica del FLAA</u>	54
<u>Figura 24. Regresión lineal simple del FLAA</u>	55
<u>Figura 25. Intensidad de fluorescencia del FLAA</u>	56
<u>Figura 26. Especificidad del FLAA con proteínas virales</u>	57
<u>Figura 27. Detección de la proteína S en muestras clínicas con el FLAA</u>	59

ÍNDICE DE CUADROS

<u>Cuadro 1. Condiciones de CE-SELEX</u>	39
<u>Cuadro 2. Adaptadores y concentración de cada biblioteca secuenciada</u>	43
<u>Cuadro 3. Secuencias procesadas utilizando Galaxy Project platform y FASTaptamer</u>	44
<u>Cuadro 4. Secuencias de aptámeros resultantes del análisis bioinformático</u>	47
<u>Cuadro 5. Determinación de la concentración de proteína S con el FLAA</u>	

RESUMEN

Las enfermedades producidas por virus juegan un papel importante en aproximadamente dos tercios de los patógenos que infectan a los humanos. La aparición de diversos brotes de enfermedades por virus emergentes o re-emergentes tales como el virus de Zika (ZIKV) en 2017 y la actual pandemia de COVID-19 provocada por el virus de SARS-CoV-2 han renovado el interés en el desarrollo de estrategias que permitan su prevención, tratamiento y control. Dentro del diagnóstico molecular, los aptámeros de ácidos nucleicos y sus características como la producción por síntesis química, poca variación entre lotes de producción, estabilidad y reversibilidad térmica los convierten en potenciales candidatos en su uso como elementos de reconocimiento molecular.

El método por el cual se seleccionan los aptámeros se denomina evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (SELEX por sus siglas en inglés) y consta de varias rondas de selección y una infinidad de variantes de partición que permiten la separación de las secuencias afines por nuestro blanco. En el presente trabajo se utilizó SELEX con electroforesis capilar (CE-SELEX), secuenciación de próxima generación (NGS) y ensayos de unión para la selección y validación de dos aptámeros que reconocen al dominio recombinante DIII de la proteína del ZIKV. Éstos, Z10 y Z11 con constantes de disociación (K_{Ds}) de 246.7nM y 358 nM, fueron posteriormente evaluados contra los viriones ZIKA.

Además, como una parte de nuestra contribución a la batalla contra la pandemia de COVID-19, se probaron dos aptámeros previamente seleccionados por nuestro grupo de trabajo (C7 y C9), que reconocen con alta afinidad y especificidad a la proteína recombinante S del virus de SARS-CoV-2 para la elaboración de un aptasensor fluorescente también llamado ensayo de aptámero ligado a fluoróforo (FLAA). Estos aptámeros demostraron no competir por el mismo sitio de unión y poseer tener una alta sensibilidad y especificidad para la detección de la proteína S en el FLAA con un límite

de detección de 41.87 nM, además de funcionar en biofluidos como saliva y muestras clínicas de raspados nasofaríngeos.

En conclusión, los aptámeros C7 y C9 pueden ser utilizados como elementos de reconocimiento molecular en un ensayo FLAA para la detección de la proteína S de SARS-Cov-2 en biofluidos o muestras clínicas, mientras Z10 y Z11 se unen al dominio DIII recombinante de ZIKV pero no a los viriones infectivos.

ABSTRACT

Virus-induced diseases have an important role in approximately two-thirds of the pathogens that infect humans. The outbreak occurrence of emerging and re-emerging viral diseases such as the Zika virus (ZIKV) in 2017 and the current COVID-19 pandemic caused by the SARS-CoV-2 virus have renewed the interest in prevention, treatment, and control strategies. Regarding molecular diagnosis, nucleic acid aptamers advantages such as chemical synthesis, high quality control, thermal stability and reversibility makes them potential candidates as molecular recognition elements.

Aptamers are selected by a method called *Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment* (SELEX) consisting in several rounds of selection and a variety of partitions steps that allows the separation of binding sequences specific for the target of interest. In this work, we used capillary electrophoresis SELEX (CE-SELEX), next generation sequencing (NGS) and binding assays to select and validate two aptamer sequences (Z10 and Z11) for the recombinant DIII domain of ZIKV protein with dissociation constants of (K_{DS}) 246.7nM and 358nM, respectively, were also tested with ZIKA virions.

In addition, two previously selected aptamers in our laboratory, C7 and C9, which recognize with high affinity and specificity the recombinant S protein of the SARS-CoV-2 virus were used for the development of a fluorescent aptasensor called *Fluorophore-Linked Aptamer Assay* (FLAA). These highly sensitive and specific non-competing aptamers were able to detect the S protein in the FLAA system with a detection limit of 41.87 nM and under different conditions in biofluids such as saliva and clinical nasopharyngeal samples.

In conclusion, C7 and C9 aptamers can be used as molecular recognition elements in a FLAA assay for SARS-Cov-2 S protein detection in biofluids or clinical samples, while Z10 and Z11 bind to the ZIKV recombinant DIII domain but not the infective virions.

1.INTRODUCCIÓN

1.1 Enfermedades virales emergentes

El termino de enfermedad emergente se utiliza para describir la aparición de una infección no reconocida o bien una infección previamente reconocida que se ha expandido hacia un nuevo nicho ecológico o zona geográfica que usualmente es acompañada de un cambio significativo en su patogenicidad (Choi, 2021). Los patógenos emergentes o reemergentes causantes de estas infecciones son en su mayoría de origen zoonótico representando cerca del 60% (Trovato et al, 2020). Dentro de este grupo, los virus se encuentran sobre representados y más aún, los virus con genomas de ARN representan un tercio de todas las infecciones emergentes y reemergentes (Howard et al, 2012). En las últimas décadas, un alto número de virus apareció por primera vez o reapareció, dando como resultado un incremento significativo de epidemias y pandemias. Dentro de estos, algunos brotes epidémicos han sido causados por flavivirus generalmente transmitidos por mosquitos, tales como el virus del Nilo occidental (WNV), el virus de Zika (ZIKV), el virus de la fiebre amarilla (YFV) y el virus del dengue (DENV). Otros han causado pandemias como los virus de influenza (IAV) en 1918 y 2009, y más recientemente el virus del SARS-CoV-2 agente causal del COVID-19 que en marzo de 2020 la organización mundial de la salud declaro como una pandemia global que hasta el momento continua (Trovato et al, 2020).

1.2 Genoma viral de Zika (ZIKV)

Los Arbovirus o virus transmitidos por artrópodos son considerados patógenos emergentes o re-emergentes debido a su distribución geográfica y el creciente impacto en poblaciones susceptibles (Fritzell, et al 2018; Weaver, et al 2018; Gould et al, 2017).

Dentro de este grupo de virus, se encuentra el ZIKV que es transmitido por el vector mosquito *Aedes aegypti* (Liu, et al 2017).

ZIKV pertenece a la familia *Flaviviridae*, género *Flavivirus* (Carrillo-Hernández et al, 2018). Los Flavivirus son pequeños virus envueltos de aproximadamente 50 nm que contienen un genoma de ARN de cadena sencilla (ARNcs) de polaridad positiva (ARN+) de 10-11 kb de longitud (Fig. 1). Este ARN codifica para una región no traducida (UTR, por sus siglas en inglés: *Untranslated Region*) en el extremo 5', un marco de lectura abierto (ORF, por sus siglas en inglés: *Open Reading Frame*) y una UTR en el extremo 3'. El ORF codifica para una larga poliproteína que posteriormente es procesada por proteasas virales y del hospedero para generar tres proteínas estructurales: la proteína de cápside (C), la proteína pre-membrana/membrana (prM/M) y la proteína de envoltura (E). Además, codifica para siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) implicadas en la replicación viral, ensamblaje del virus y la modulación de las respuestas celulares del hospedero (Barrows et al, 2018; Blitvich y Firth, 2017; Rastogi et al, 2016; García et al, 2017; Medigeshi, 2011).



Figura 1. Organización genómica del virus de ZIKV. Los Flavivirus comprenden un solo ORF con genes que codifican para las proteínas estructurales seguidos de genes que codifican para proteínas no estructurales. Estos se transcriben y traducen resultando en una poliproteína que sufre un procesamiento proteolítico (Zanotto et al, 2018).

1.3 Estructura de la cápside de ZIKV

Los ZIKV exhiben una cápside rodeada de una membrana lipídica con dos proteínas integradas (E y M). Estos virus poseen una cubierta icosaédrica que consta de 180 copias de la glicoproteína E y la proteína de membrana M que se encuentran ancladas a la membrana lipídica por sus regiones transmembranales (Fig. 2). La proteína E es el principal componente proteico involucrado en la fusión y la unión del receptor. Se encuentra en forma dimérica con sus extremos opuestos en la superficie de las partículas virales, mientras que la proteína M se encuentra oculta debajo de la proteína E. Este heterodímero de proteínas E-M presenta una simetría icosaédrica, que contiene 60 unidades de repetidos. Cada unidad asimétrica contiene al menos la mitad de 3 dímeros E-M acomodados de manera paralela uno con otro para formar un grupo o "raft" que puede ser dividido en dos mitades simétricas. La proteína E se compone de cuatro dominios, el dominio de tallo trans-membranal (*stem-transmembrane domain*); y los dominios I, II y III. El dominio I (DI) sirve como puente entre el dominio II (DII) y el dominio III (DIII). El DI de ZIKV contiene un solo sitio de glicosilación en N154 que sobresale de la superficie, mientras que DENV contiene dos sitios de glicosilación en el sitio N67 y N153. La punta del DII contiene el dominio de fusión (FL) que interactúa con la membrana del hospedero durante la fusión y está disponible cuando se acidifica el pH. El DIII contiene un sitio de unión al receptor putativo y juega un papel importante durante la fusión (Heinz et al, 2017; Shi et al, 2017; Yap et al, 2017; Wen et al, 2018; Sevvana et al, 2018; Zhang et al, 2013).

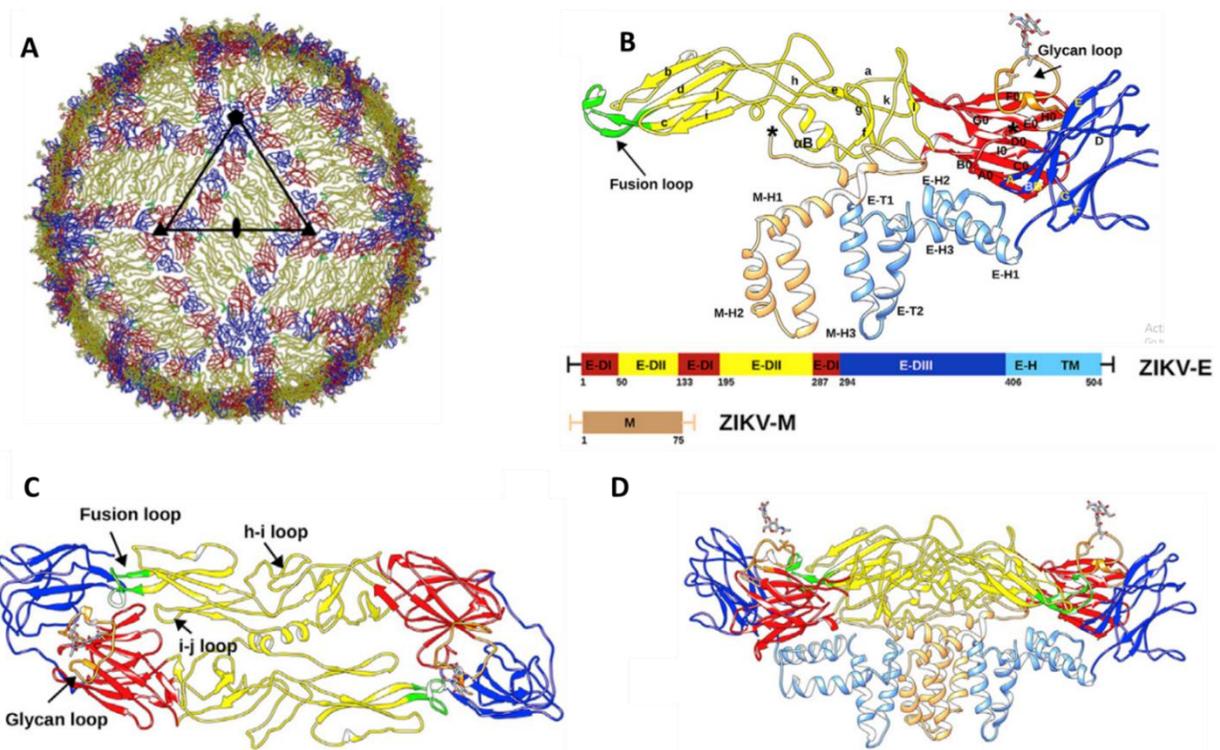


Figura 2. Estructura del ZIKV. A) Se puede apreciar la unidad asimétrica icosaédrica resaltada por un triángulo negro. Los Dominios E-DI, E-DII y E-DIII de cada proteína E se encuentran de color rojo, amarillo y azul respectivamente. El bucle (*loop*) de fusión de cada proteína E se encuentra mostrado de color verde. B) Elementos estructurales secundarios de un heterodímero E-M se encuentran numerados de A0-lo, y A-G respectivamente. El tallo (*stem*) y las hélices transmembranales (E-H1, E-H2, E-H3, E-T1, E-T2) y de la proteína M (M-H1, M-H2, M-H3) se encuentran coloreadas en azul claro y café claro respectivamente. El N terminal de las proteínas M y E se encuentran marcados con un asterisco. C) Vista superior y D) Vista lateral del heterodímero E-M (Shi, y Gao, 2017).

1.4 Síntomas de la infección ZIKV

Los síntomas de la infección por ZIKV son incluyen salpullido, fiebre, artralgia, mialgia, fatiga, dolor de cabeza y conjuntivitis (Plourde y Bloch, 2016; Shragai et al, 2017) que usualmente aparecen después de un periodo de incubación que va de 3 a 12 días

(Agumadu y Ramphul, 2018). A pesar de los síntomas relativamente moderados, el Zika ha sido declarado una emergencia mundial de salud pública debido al incremento atípico (de 20 veces) de microcefalia en recién nacidos, un incremento en la probabilidad de pérdida de embarazo y anormalidades en el cerebro y ojos en infantes de madres infectadas (Shragai et al, 2017). Además, se ha asociado con el síndrome de Guillain-Barre síndrome en adultos, que se trata de una rara enfermedad autoinmune potencialmente mortal que ataca a los nervios y usualmente es desencadenada por infecciones (Agumadu y Ramphul, 2018, Leonhard et al, 2019).

1.5 Métodos de detección para ZIKV

En la actualidad el ZIKV, DENV y el virus chikungunya (CHIKV) circulan en las mismas regiones geográficas de México, por lo que varios problemas surgen con la presencia del 3 virus distintos que presentan similitud en los síntomas y posibles co-infecciones (Okuneye et al, 2017; Beltrán-Silva, et al 2016).

El diagnóstico de laboratorio para la detección de ZIKV incluye la detección del ARN viral genómico, productos virales (detección de la proteína NS1), o la respuesta inmune del hospedero a la infección del virus a través de la medición de inmunoglobulinas específicas del virus, como IgM y IgG (Muller et al, 2017; Landry y St George, 2017; Johnson et al, 2017; PAHO, 2017; Beltrán-Silva, et al 2016; CDC, 2014;).

La detección de ARN viral puede ser en el suero de pacientes por medio de una reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-qPCR). Esta técnica se ve limitada por la corta duración de la viremia (alrededor de 5 días desde el inicio de los síntomas. A pesar de que ZIKV disminuye en el suero, el virus se elimina en la orina usualmente presentando títulos virales más altos que en el suero y permaneciendo alrededor de 7 a 14 días después del inicio de la enfermedad. De esta manera las pruebas moleculares en orina, además del suero son muy recomendables para ZIKV (Landry y St George, 2017).

El diagnóstico serológico de la infección es llevado a cabo por la detección de anticuerpos específicos (IgM e IgG). Los anticuerpos específicos IgM pueden ser detectables generalmente 5 días después del inicio de la enfermedad alcanzando su punto máximo durante varias semanas después de la recuperación y se mantiene detectable durante varios meses. Por otra parte, los anticuerpos específicos IgG son detectables poco después y se asume que persisten durante varios años (Muller et al, 2017; Landry y St George, 2017; CDC, 2014). La detección de la infección de DENV o ZIKV por serología es complicada debido a que comparten epítomos de reactividad cruzada en la glicoproteína E y por tanto los anticuerpos exhiben una respuesta cruzada. Por esta razón, se recomienda un ensayo de reducción de neutralización de placa (PRNT, por sus siglas en inglés: *plate reduction neutralization test*) (Beltrán-Silva, et al 2016) o bien comparar los resultados con la detección la proteína NS1 (Muller et al, 2017; Azeredo et al, 2018). La proteína viral NS1 se usa para el diagnóstico como antígeno de captura por que es secretada por las células infectadas, se encuentra en altos niveles circulando en la sangre de individuos infectados y puede ser detectada desde el inicio de los síntomas hasta nueve días después. Por esta razón se encuentran disponibles algunas pruebas ELISA que emplean a NS1 como antígenos de captura, y que han demostrado no tener reactividad cruzada con otros Flavivirus (Muller et al, 2017). Sin embargo, la detección de NS1 tiene sus limitaciones para pacientes que experimentan una infección secundaria. En éstos, ocurre un rápido incremento en los anticuerpos contra NS1. Los anticuerpos secuestran a NS1 en complejos inmunes que no pueden ser detectados en ensayos de captura provocando una cinética de detección mucho más corta que infecciones primarias (Muller et al, 2017).

De igual manera cuando ocurre una infección secundaria por un flavivirus, los anticuerpos específicos de IgM usualmente se encuentran con títulos bajos o no detectables, mientras que ocurre una rápida respuesta de IgG, apareciendo cerca de los 3 días después del inicio de la enfermedad, por lo que cuando se lleva a cabo la detección de IgM e IgG en paralelo pueden contribuir en el diagnóstico de una infección

primaria o secundaria basado en la relación IgM e IgG durante la fase aguda (primeros 5 días) de la enfermedad (Lam Sk et al, 2000; Schwartz E et al, 2000).

1.6 Genoma viral de SARS-CoV-2

El agente etiológico del COVID-19 es el nuevo coronavirus SARS-CoV-2. Se trata de un virus envuelto de aproximadamente 108 ± 8 nm de diámetro (Hardenbrook y Zhang, 2022), posee un genoma de ARNcs+ que pertenece a la familia *Coronaviridae* del género beta-coronavirus (Cao et al, 2021; Chen et al, 2020). Su genoma es de alrededor de 29.9kb y se compone de 13-15 ORFs (12 funcionales) que contienen aproximadamente 30,000 nucleótidos (Naqvi et al, 2020). Su genoma contiene un *cap* en el extremo 5' y una cola de poli-A en el extremo 3'. Este codifica para 16 proteínas putativas no estructurales (NSP), 6 de accesorio además de 4 proteínas estructurales (Brant et al, 2021). Las NSP participan en la replicación del ARN viral y la evasión del sistema inmune, las proteínas accesorio (3a, 6, 7a, 7b, 8 y 9b) se encuentran relacionadas con la sobrevivencia, la infección viral y la transmisión hacia las células del hospedero. Por último, las proteínas estructurales S (*Spike*), E (envoltura), M (membrana) y N (nucleocápside) participan en el ensamblaje y maduración de las partículas virales (Wu et al, 2022).

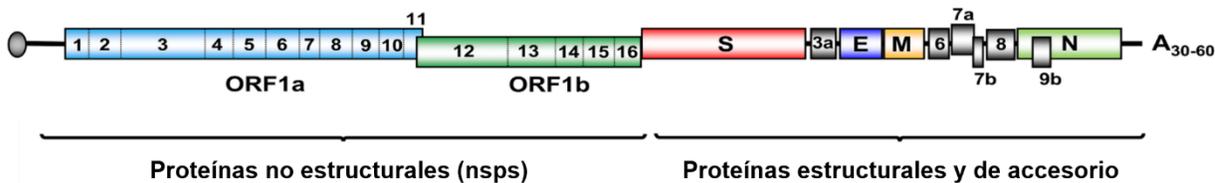


Figura 3. Organización genómica de SARS-CoV-2. El genoma viral codifica para 16 proteínas no estructurales (ORF1a → nsp1-11 and ORF1b → nsp12-16), 4 proteínas estructurales (S, *Spike*; E, envoltura; M membrana; N, Nucleocápside) y varias proteínas de accesorio (3a, 6, 7a, 7b, 8 y 9b) (Brant et al, 2021).

1.7 Estructura de la cápside de SARS-CoV-2

La envoltura viral se encuentra constituida de la proteína S, M y E. La glicoproteína trans-membranal S forma homotrímeros de aproximadamente 600 kDa que sobresalen de la superficie viral. Se compone de las subunidades S1 y S2. La subunidad S1 contiene el dominio de unión a receptor (RBD) que se encarga de la unión con la enzima convertidora de angiotensina-2 (ACE2) que es el receptor del hospedero. Por otra parte, la subunidad S2 es responsable de la fusión de la membrana viral con la del hospedero y entrada del virus. La proteína E es una proteína de 8.5 kDa que presenta un dominio transmembranal y presenta propiedades de oligomerización y permite iniciación de la gemación viral y la liberación de los virus. La proteína M que se encuentra incrustada en la membrana viral a través de 3 hélices transmembranales se encarga del ensamblaje de nuevos viriones en las células hospederas. En otros coronavirus se ha demostrado oligomerización en el compartimento intermedio del retículo endoplásmico con Golgi e inducir apoptosis (Hardenbrook y Zhang, 2022; Mariano et al, 2020; Wang et al, 2020).

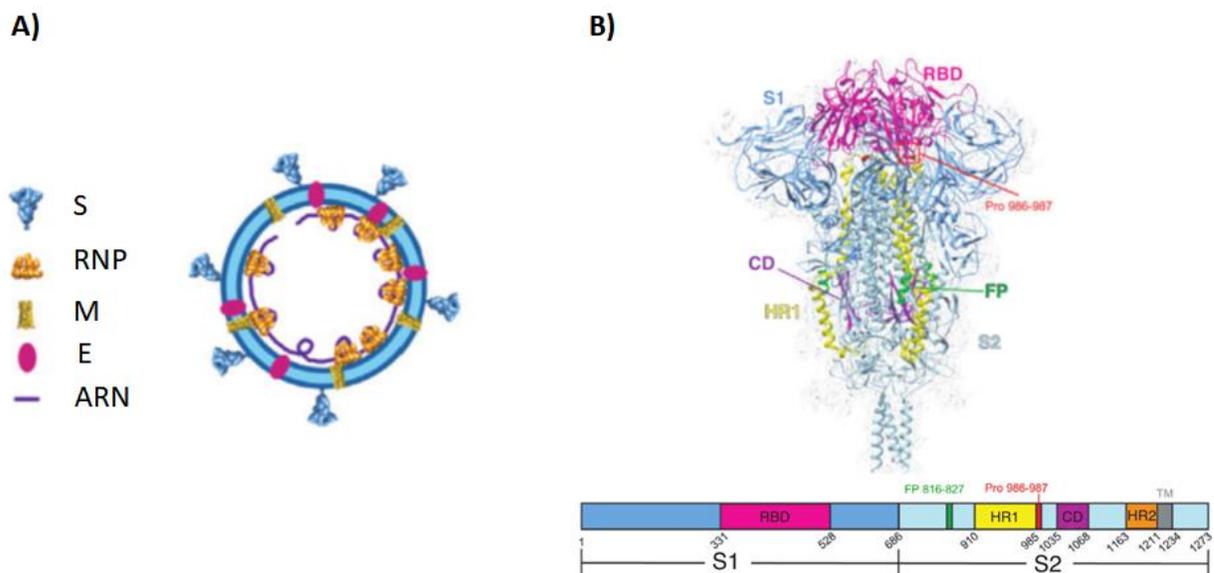


Figura 4. Estructura del virus SARS-CoV2. A) Modelo esquemático del virión de SARS-CoV-2 con las proteínas estructurales indicadas. B) Estructura determinada por cryoEM del trímero de la proteína S en un estado de prefusión. La subunidad S1 se muestra de color azul, la

subunidad S2 de azul claro, el receptor de unión a receptor (RBD) magenta, el péptido de fusión verde (FP), la región transmembranal de gris y los dominios HR1, CD, HR2 de color amarillo, morado y naranja respectivamente (Hardenbrook y Zhang, 2022).

1.8 Síntomas de la infección SARS-CoV-2

El virus de SARS-CoV2 se transmite a través de microgotas respiratorias y aerosoles y cuenta con un promedio de incubación de alrededor de 5 días (Mollarasouli et al, 2022). Los síntomas más comunes de la infección incluyen fiebre, tos y fatiga; sin embargo, se han descrito una gran variedad de síntomas tales como mialgia, vómito, dolor de cabeza, dolor de pecho, dolor de garganta, diarrea, entre otros (Lamers y Haagmans, 2022; Mollarasouli et al, 2022; Hu et al, 2021; Wang et al, 2021). Las manifestaciones clínicas difieren con la edad. En general, adultos mayores a 60 años con comorbilidades (enfermedad pulmonaria, diabetes, hipertensión, y enfermedad de corazón) son más propensos a desarrollar una enfermedad respiratoria aguda que requiera hospitalización o incluso produce la muerte mientras que las personas más jóvenes o niños tienden a desarrollar una enfermedad más leve (Hu et al, 2021). Aquellos pacientes que desarrollan síntomas severos usualmente experimentan opresión en el pecho y disnea entre los 7 a 10 días después del inicio de los síntomas. De estos, una proporción desarrollara el síndrome de estrés respiratorio, choque séptico, acidosis metabólica y coagulopatías (Wang et al, 2021). Esto se debe a que el virus daña otros tejidos aparte de los pulmones como el corazón, riñones, hígado, ojos, sistema nervioso y el sistema cardiovascular (Mollarasouli et al, 2022).

1.9 Métodos de detección para SARS-CoV-2

Para llevar a cabo la detección molecular del virus es necesario la apropiada colección de la muestra. La toma de muestra debe realizarse después de 5 a 6 días posteriores del inicio de la enfermedad siendo apropiadas las muestras nasofaríngeas y

orofaríngeas (Mollarasouli et al, 2022). Las muestras nasofaríngeas son las que generalmente han reportado mayor abundancia de ARN viral; sin embargo, también se han utilizado otras opciones menos invasivas como hisopados orales, nasales o de saliva (Mercer y Salit, 2021).

La detección de los ácidos nucleicos del virus por RT-PCR es el método estándar para la determinación de la infección por coronavirus (Mollarasouli et al, 2022) siendo este recomendando por la OMS y por el centro de control y prevención de enfermedades (CDC). Distintos sets de cebadores fueron diseñados para la detección de SARS-CoV-2 que incluye la secuencia del gen N y el ORF1-nsp10 (China CDC), N1, N2 y N3 (Estados Unidos CDC), N y ORF1-nsp14 (Universidad de Hong Kong) y E, N y RdRp (Instituto de Virología, Universidad de Medicina de Berlín, Alemania) (Meng et al, 2021).

La detección molecular también puede llevarse a cabo detectando la presencia de proteínas virales con antígenos. Se han elaborado test de diagnósticos rápidos (RDT) que buscan la detección de la presencia de antígenos utilizando muestras del tracto respiratorio de pacientes. No obstante, presentan algunas desventajas como la detección de antígenos en fases agudas de infección y su eficacia depende de factores como la calidad de la muestra, el protocolo de recolección y la formulación de los reactivos por lo que la sensibilidad puede variar del 34 al 80%. (Mollarasouli et al, 2022).

Por último, se pueden emplear ensayos serológicos para detectar la presencia de los anticuerpos IgG o IgM tipo ELISA. En estos, se determina la respuesta inmune contra la proteína S (Kevadiya et al, 2021) y se utilizan para la identificación específica de perfiles de anticuerpos que ayudan a predecir la severidad de la infección. Diversos estudios demuestran que el promedio de la seroconversión para IgM se da cerca de los 10 a 12 días iniciados los síntomas, mientras que IgG aproximadamente de los 12 a 14 días (Meng et al, 2021). A pesar de esto, se ha observado que la mayoría de los pacientes puede producir anticuerpos neutralizantes dentro de los primeros 4 días, pero

con un nivel bajo. Recientemente se ha observado que estos niveles dinámicos de anticuerpos se relacionan con la severidad y la presencia de los síntomas, por lo que sigue siendo controversial (Choe et al, 2021; Kwon et al 2020; Marklund et al, 2020; Chen et al 2020).

Diversas variantes interés de SARS-CoV-2 han surgido en distintos países. La identificación de una variante requiere la secuenciación del genoma completo o al menos de manera parcial el gen S. La detección clínica de variantes ya conocidas utiliza métodos basados en la PCR como ensayos multiplex de RT-PCR que incluyen los genes E, N, ORF1 y S que en combinación permiten su detección o incluyen regiones específicas de la secuencia que sirven de marcadores para su identificación (European Centre for Disease Prevention and Control & World Health Organization, 2021) .

1.10 Aptámeros

Los aptámeros de ácidos nucleicos son moléculas de cadena sencilla de ADN (ADNcs) o de ARN que son seleccionados para la unión a un blanco específico (Zhou y Rossi, 2017). Debido a que los ácidos nucleicos poseen una flexibilidad inherente son capaces de adoptar una amplia variedad de motivos estructurales y de unirse a sus blancos con alta especificidad a través de interacciones de Van der Waals, electrostáticas, puentes de hidrógeno y complementariedad estructural (**Fig. 5**). A la fecha se han aislado aptámeros para virtualmente cualquier tipo de blanco que van desde iones metálicos hasta células completas (Dembowski y Bowser, 2018; Sun y Zu, 2015).

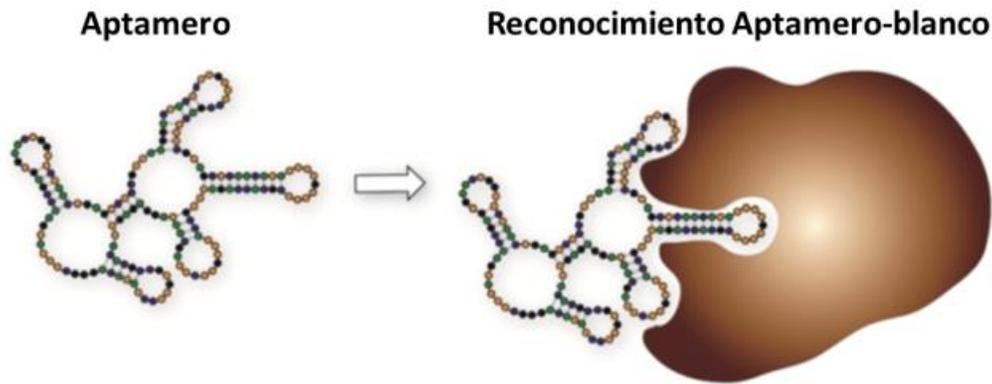


Figura 5. Representación de la interacción aptámero-blanco (Darmostuk et al, 2015).

1.11 Aislamiento de aptámeros

Los aptámeros son seleccionados *in vitro* a partir de bibliotecas de oligonucleótidos sintéticos con secuencias aleatorizadas mediante un proceso denominado SELEX (por sus siglas en inglés, *Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*) (Muslum y Nilsen-hamilton, 2016). El método SELEX es un método iterativo de selección y amplificación en el cual grandes poblaciones aleatorizadas de oligonucleótidos (aproximadamente 10^{15} secuencias distintas) son retadas a la unión con el blanco deseado bajo una serie de condiciones definidas (Stoltenburg et al, 2005; Dunn et al, 2017). En este método, las bibliotecas contienen una región aleatoria central de 20-80 nucleótidos flanqueadas por secuencias específicas de 18-21 nucleótidos que sirven como sitios de unión a cebadores (Stoltenburg et al, 2007).

Una vez que la biblioteca inicial de ácidos nucleicos es diseñada y sintetizada, se incuba con la molécula blanco. Este es el primer paso del ciclo de SELEX en el que las secuencias más afines y específicas se unirán al blanco (Yüce et al, 2018; Wandtke et al, 2015; **(Fig. 6)**). El segundo paso es la separación de los oligonucleótidos no unidos al blanco y la elución de los oligonucleótidos unidos al blanco (partición) (Yüce et al, 2018; Dembowski y Bowser, 2018). La partición se puede realizar por una gran variedad de técnicas tales como: cromatografía de afinidad, separación magnética, filtrado con

nitrocelulosa, citometría de flujo (FC) resonancia de plasmon superficial (SPR), electroforesis capilar (CE) y separaciones microfluídicas, entre otras (Muslum y Nilsen, 2016). Una vez realizada la partición, los oligonucleótidos eluidos son amplificados y convertidos en ADNcs (aptámeros de ADN), o bien convertidos a ADN complementario (ADNc) seguido de una amplificación por PCR y transcripción (aptámeros de ARN). Los oligonucleótidos de cadena sencilla recuperados son empleados para la siguiente ronda de partición. Eventualmente, esto resulta en una población de cadena sencilla que ha sido enriquecida con secuencias afines por el blanco. Al final de cada ciclo selectivo, la afinidad de cada población es medida (Tolle y Mayer, 2013) y el proceso se repite hasta que se alcanza una unión óptima con el blanco. Varias rondas de selección pueden ser necesarias para obtener aptámeros de alta afinidad, dependiendo de las condiciones de selección como: pH, temperatura, fuerza iónica, número de lavados y concentración del blanco (Zhou y Rossi, 2017; McKeague et al, 2015). Una vez alcanzado el nivel de afinidad deseado, la población enriquecida es clonada y secuenciada por secuenciación de Sanger o secuenciación de próxima generación (NGS, por sus siglas en inglés: *Next-Generation Sequencing*). Posteriormente, herramientas bioinformáticas, secuencias consenso o motivos conservados permiten la selección de secuencias candidatas. Se realiza la síntesis química y se confirma la afinidad y especificidad (Yüce et al, 2018; Dembowski y Bowser, 2018) por medio de ensayos de unión como ensayo de unión con filtro, SPR, calorimetría de titulación isotérmica, termoforesis, citometría de flujo, interferometría de retro dispersión, polarización de la fluorescencia, entre otros (Hafner, et al 2008; Zhuo et al, 2017). Sin embargo, la inmensidad de las bibliotecas y la imposibilidad práctica de contar con grandes cantidades de oligonucleótidos sintéticos (>100 gr), el limitado número de estructuras posibles dentro de una biblioteca y la naturaleza de los blancos, son factores que influyen para que el proceso SELEX sea un método esencialmente probabilístico.



Figura 6. Representación esquemática del método SELEX. La biblioteca de ácidos nucleicos se incuba con el blanco de interés, las secuencias no unidas son removidas, posteriormente se amplifican las secuencias unidas y se purifican para remover las hebras complementarias. (Dembowski y Bowser, 2018).

1.12 Ventajas de los aptámeros

El uso de anticuerpos como agentes de reconocimiento molecular en un gran número de aplicaciones ha sido empleado por más de tres décadas (Song et al, 2012). Sin embargo, los aptámeros son excelentes alternativas a los anticuerpos, ya que ofrecen distintas ventajas debido a las características de los ácidos nucleicos (Zhou y Rossi, 2017). Algunas de estas ventajas son (Zhou y Rossi, 2017; Sun y Zu, 2015; Song et al, 2012):

1) Alta estabilidad: Los oligonucleótidos son más estables térmicamente que las proteínas y son capaces de mantener sus estructuras tras repetidos ciclos de desnaturalización/renaturalización. Esto permite que los aptámeros puedan ser utilizados en una amplia variedad de condiciones en distintos ensayos, además facilita su almacenamiento y transporte.

2) Producción de aptámeros (síntesis/modificaciones): Una vez que los aptámeros son aislados, pueden ser sintetizados con gran exactitud y reproducibilidad por medio de síntesis química. Pueden producirse a gran escala con mínimas variaciones entre cada lote en un periodo corto de tiempo. Además, pueden ser modificados químicamente para incrementar la estabilidad y la resistencia a nucleasas.

3) Baja inmunogenicidad: Los aptámeros usualmente parecen tener baja inmunogenicidad y toxicidad.

4) Variedad de blancos: Los aptámeros pueden ser aislados contra una gran variedad de blancos, incluyendo ligandos que no pueden ser reconocidos por anticuerpos, como iones o moléculas pequeñas.

1.13 Aplicaciones de los aptámeros

Los aptámeros han tenido un efecto notable en el desarrollo de nuevas herramientas químicas con aplicaciones prácticas (Dunn et al, 2017; Famulok y Mayer, 2014). La versatilidad del protocolo SELEX y la gran afinidad por sus blancos los han llevado a numerosas aplicaciones como herramientas científicas (proteómica, nanotecnología, biotecnología), terapéuticas y diagnósticas (sondas, biosensores, imagenología molecular, descubrimiento de biomarcadores, sistemas de liberación de fármacos), sensores ambientales y descubrimientos biofísicos (Wang and Farokhzad, 2014; Song et al, 2012; Röthlisberger et al, 2017; Dunn et al, 2017).

1.14 Aptasensores

Los biosensores son dispositivos analíticos que contienen dos componentes funcionales importantes: un elemento de reconocimiento biológico que detecta a la molécula blanco (enzimas, proteínas, ácidos nucleicos) y un elemento de transducción de señal (Mehlhorn et al, 2018; Zhou et al, 2014). Un biosensor cuyo elemento de reconocimiento molecular se encuentra basado en aptámeros, es llamado aptasensor (Zhang et al, 2018; Song et al, 2012). La adaptabilidad de los aptámeros a distintos métodos

analíticos ha resultado en una gran variedad tecnológica de aptasensores que han permitido la identificación y determinación de concentración diversas de proteínas, moléculas pequeñas, metabolitos y iones (Muslum y Nilsen, 2016).

Los aptasensores pueden ser contruidos con distintos transductores, que son sensibles a cambios de masa, ópticos o electroquímicos (Mehlhorn et al, 2018). Sin embargo, las estrategias de diseño de la mayoría de los biosensores poseen algunos elementos analógicos versátiles. Dichas estrategias se pueden dividir en:

a) Cambio de estructura inducido por el blanco: En este, la unión del blanco causa que el aptámero altere su conformación a patrones específicos que conllevan un cambio de características detectables como, por ejemplo: la posición relativa o cantidad de moléculas señal añadidas en los extremos, el tamaño o peso de los aptámeros u otras propiedades como la habilidad de estabilizar nanopartículas de oro.

b) Sándwich o tipo sándwich: El ensayo de unión de sitios duales o ensayo sándwich requiere la disponibilidad de un par de aptámeros que se unen a diferentes regiones de la proteína. Sin embargo, en casos donde el analito posee dos sitios de unión idénticos es posible el uso de un solo aptámero. En este ensayo el analito se encuentra en medio del par de aptámeros, uno empleado como sonda de captura y otro como sonda reportera. Las sondas de captura usualmente son inmovilizadas en soportes solidos (electrodos, chips de vidrio, nanopartículas), mientras que las sondas reporteras a menudo son conjugadas con moléculas señalizadoras (fluoróforos, enzimas o nanopartículas (Song et al, 2008). Además, es posible diferentes versiones del ensayo que incluyan anticuerpos como segundo elemento de reconocimiento molecular (Toh et al, 2014).

c) Disociación o desplazamiento inducido por el blanco: En éste, secuencias complementarias de aptámeros son empleadas para el anclaje. Después de la incubación con el blanco, los complejos aptámero-blanco son liberados en la solución provocando cambios en señales detectables, (electroquímicas o colorimétricas, por ejemplo) (Zhao et al, 2007).

d) Reemplazo competitivo: Estos ensayos se basan en el reemplazo de moléculas señal unidas al aptámero por el analito en solución. Funcionan de manera muy parecida a los inmunoensayos para moléculas pequeñas en los que ocurre el desplazamiento de anticuerpos unidos a la superficie por el analito en solución (Lee and Walt, 2000).

2. ANTECEDENTES

A la fecha, se han aislado aptámeros contra proteínas virales para detectar o inhibir la infección. Virus como el virus de papiloma humano (VPH), el virus de la inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1), el virus de la hepatitis C (HCV), el virus de la hepatitis B (HBV), el coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo (Sars-CoV), el virus del herpes simple (HSV), el virus Ébola, el virus de la fiebre del Valle del Rift, el DENGVI, el virus de la leucemia de células T humanas tipo 1 (HTLV-1), el virus de Epstein-Barr y el Citomegalovirus humano han sido blancos de aptámeros (González et al, 2016; Wandtke et al, 2015; Leija-Montoya et al, 2014). Esto ha producido un rápido avance en la aplicación de estos aptámeros en el diagnóstico de enfermedades y descubrimiento de nuevos biomarcadores (Wandtke et al, 2015).

Shiratori y colaboradores aislaron aptámeros de ADN contra hemaglutinina (H) recombinante de varios subtipos del IFV-A (H5N1, H1N1 y H3N2) y desarrollaron un ensayo por apta-absorción ligado a enzimas tipo sándwich (ELAA, por sus siglas en inglés; *Enzyme Linked Aptamer Assay*) capaz de detectar varios subtipos de partículas virales de influenza A (Shiratori et al, 2014). Por otra parte, también se han desarrollado ensayos más sensibles basados en sistemas duales de aptámeros. Nguyen y colaboradores desarrollaron un biosensor tipo sándwich basado en plasmón superficial (SPR, por sus siglas en inglés; *Surface Plasmon Resonance*) para la detección de distintos subtipos H5 del virus de influenza aviar provenientes muestras de heces infectadas con una concentración mínima detectable de 200 EID₅₀/ml (50% Egg infected dose) (Nguyen et al, 2016).

Por su parte, Park y colaboradores obtuvieron aptámeros de ADN contra la glicoproteína E2 del HCV e implementaron un ensayo de ELASA que no solo les permitió un análisis cualitativo sino la cuantificación de particular virales en muestras infectadas por el virus. Con esto demostraron que un ELASA es un sistema rápido y fácil para medir el título de viral en un cultivo de HCV en un rango que va de 3.91×10^2 FFU/mL (Forming Units per Milliliter) a 1.00×10^5 FFU/mL (Park et al, 2013).

Ahn y colaboradores llevaron a cabo el aislamiento de un aptámero de ARN contra la región C-terminal de la proteína de nucleocápside (N) del coronavirus SARS e implementaron un inmunoensayo híbrido aptámero-anticuerpo quimioluminiscente empleando al aptámero como agente de captura al antígeno. En placas recubiertas con estreptavidina conjugaron oligonucleótidos biotinilados (dT)₁₆ para hibridar una región añadida al aptámero (A)₁₆. Empleando este ensayo pudieron detectar una concentración de 20 pg/mL (420 fM) de la proteína N que es comparable a los límites de detección obtenidos con ELISA (Ahn et al, 2009). Lee y Zeng aislaron aptámeros de ADN contra diferentes epítomos de la proteína NS1 e implementaron su aplicación en un ensayo tipo ELISA. Emplearon el aptámero 2 como agente de captura y al aptámero 10 como agente de detección. De esta manera lograron un límite de detección de 100 ng/mL (en buffer). Por otra parte, cuando emplearon el aptámero 2 junto con un anticuerpo anti-NS1 lograron disminuir la sensibilidad a 0.1 ng/mL. Además, lograron detectar 1 y 10 ng/mL de NS1 en 10% y 100% de suero humano, respectivamente (Lee y Zeng, 2017).

Por último, nuevos biosensores se han reportado para la detección de COVID-19 que tienen como blanco la detección del ARN de SARS-CoV-2 así como las proteínas S y N utilizando anticuerpos (Zhao et al, 2021; Ali et al, 2021; Elledge et al, 2021; Yakob et al, 2021; Eissa et al, 2021; Cerutti et al, 2020; Schoeman et al, 2020). A pesar de esto, las ventajas del uso de anticuerpos como bajos costos de manufactura, poca variabilidad en lotes de producción, mejor estabilidad química, larga vida útil y la posibilidad de ser modificados químicamente (Zhou y Rossi, 2017; Sun y Zu, 2015; Song et al, 2012) ofrecen ventajas sobre los sensores basados en anticuerpos.

Con estos reportes y otras publicaciones se sugiere que la selección de aptámeros puede ser empleada en el diagnóstico de distintos tipos de infecciones mediante varios aptasensores que incluyen entre ellos, modificaciones al ensayo de ELISA con aptámeros.

3. JUSTIFICACIÓN

Dentro de los patógenos que causan las enfermedades infecciosas emergentes, los virus juegan un papel importante en aproximadamente dos tercios de los patógenos que infectan a los humanos provocando un tremendo impacto en la salud global y la economía (Sánchez-Báscones et al, 2021).

La aparición de diversos brotes de enfermedades por virus emergentes o reemergentes como el síndrome agudo respiratorio severo (SARS) en 2002, la influenza porcina H1N1 en 2009, el síndrome respiratorio del medio oriente (MERS) en 2012, virus de Ébola en 2013, el virus de Zika en 2015, Virus de Lassa en 2018 y la pandemia actual de COVID-19 provocada por el virus de SARS-COV-2 han renovado el interés en el desarrollo de estrategias que permitan su prevención, tratamiento y control (Trovato et al, 2020). Estas enfermedades virales, que usualmente presentan síntomas comunes entre si (Kim y Lee, 2021) y con otras enfermedades requieren un diagnóstico apropiado, por lo que el diagnóstico molecular debe ser utilizado. Dentro de los métodos más comunes, se encuentran los basados la reacción en cadena de polimerasa (PCR), o ensayos inmunológicos tipo ELISA que emplean el uso de anticuerpos como agentes de captura y detección. Sin embargo, la aplicación de elementos de reconocimiento molecular alternativos que reemplacen o complementen a los anticuerpos pueden resultar en variantes que mejoren sus características (Kulabhusan et al, 2020). En este sentido, el uso de aptámeros con sus características de producción, ventajas sobre anticuerpos y su capacidad para reconocer a sus blancos con alta afinidad y especificidad los hacen candidatos perfectos como herramientas de reconocimiento molecular (Kim y Lee, 2021).

4. HIPÓTESIS

-El uso del método SELEX con electroforesis capilar (CE-SELEX) y secuenciación de próxima generación (NGS) permiten la selección de aptámeros de ADN con alta afinidad y especificidad contra dianas proteicas. Entonces, la incubación de un péptido conteniendo el dominio DIII de la proteína E de ZIKV con una poza aleatoria de oligodesoxinucleótidos en un protocolo CE-SELEX y el análisis de sus secuencias resultará en aptámeros específicos que podrán ser usados como agentes de reconocimiento molecular en dispositivos de diagnóstico para ZIKV.

-La modificación 5'-Amino en aptámeros de ADNcs permite su inmovilización en superficies recubiertas con anhídrido maléico y su marcaje con fluoróforos permite su uso como agentes de detección. Entonces, la afinidad y especificidad de los aptámeros C7 y C9 dirigidos contra la proteína S de SARS-CoV-2 y su modificación combinada (5'-Amino y 5'-FAM) permitirá su uso como agentes de reconocimiento molecular en un aptasensor tipo sándwich (FLAA) que podrá ser usado para la detección de SARS-CoV-2.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Elaborar un aptasensor tipo sándwich empleando aptámeros de ADNcs que interactúen con las proteínas virales de Zika y/o SARS-CoV-2

5.2 Objetivos Específicos

- Selección de pozas de ADNcs afines al dominio DIII de la proteína E de Zika
- Secuenciación de próxima generación, análisis bioinformático e identificación de secuencias aptaméricas del proceso de selección
- Validación de los aptámeros mediante ensayos de unión
- Producción de virus de Zika y evaluación de la interacción con los aptámeros
- Elaboración de un ensayo tipo FLAA con aptámeros de ADNcs seleccionados contra la proteína S de SARS-CoV-2
- Evaluación de la especificidad del ensayo FLAA para la detección de la proteína S
- Determinación de la capacidad de detección del ensayo FLAA en biofluidos
- Evaluación del ensayo FLAA con muestras clínicas

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Oligonucleótidos y proteínas

La biblioteca de 42 bases aleatorizada (M2) (Martínez-Roque et al, 2020), los cebadores FWD (5'-CACGACGACAGAGACCACAG-3') y REV (5'-TGTTTCGTCTCTGGCTGCTGG-3') para el CE-SELEX se adquirieron de Ella Biotech GmbH, (Martinsried, Alemania). Los oligonucleótidos modificados C7 (5'-amino-C6-modificado) y C9 (5'-FAM) se compraron de ADN Technologies Inc. (San Diego, CA). Los oligonucleótidos restantes fueron adquiridos de T4 oligo® (ADN Artificial S. de R.L. de C.V., Irapuato, México). La albumina sérica bovina (BSA), lisozima y caseína se compraron de Merck (Merck KGaA, Alemania). La proteína recombinante del dominio DIII de Zika (40543-V08B1), la proteína S de SARS-CoV-2 (40589-V08B1), la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) (10108-H08B), la proteína del Virus respiratorio sincitial (VSR) (11070-V08H), la proteína S del coronavirus NL63 (HCoV-NL63) (HCoV-NL63) fueron comprados de Sino Biological (Sino Biological Inc., Beijing, China).

6.2 Selección de secuencias afines al dominio DIII con CE-SELEX

La selección de las secuencias afines y la determinación del enriquecimiento de las rondas de selección se llevó a cabo durante una estancia de investigación en el instituto Life and Medical Sciences Institute (LIMES) y en el instituto Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin (IHT) de la universidad de Bonn en el laboratorio del Dr. Günter Mayer y sus colaboradores Dr. Jens Müller y Dra. Nasim Shahidi Hamedani en Alemania.

La partición de las secuencias afines se llevó a cabo utilizando una variante de CE-SELEX denominada “Non-equilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures” (NECEEM, por sus siglas en inglés). En esta técnica, las pozas de ADNcs se mezclan con el blanco y son incubadas para formar una mezcla en equilibrio (EM) que consiste

en ADNcs libre, complejos ADNcs-blanco y blanco libre. La EM se introduce en el capilar y se aplica un alto voltaje para separar la fracción en equilibrio ADNcs-blanco de la fracción de ADNcs libre bajo condiciones de no equilibrio. Las condiciones de no equilibrio implican que el buffer de separación no contiene las pozas de ADNcs o el blanco. Posteriormente, con las condiciones de separación se busca que la movilidad del blanco sea mayor que la del ADNcs y con esto que la movilidad de los complejos ADNcs-blanco migre de manera intermedia entre el ADNcs y el blanco. Con la aplicación de un campo eléctrico cada zona se separa (ADNcs, ADNcs-blanco y blanco) y cada uno de los componentes llega al final del capilar de manera distinta permitiendo la generación de una ventana de colección.

La partición de las secuencias afines al dominio DIII se llevó a cabo con un equipo de electroforesis capilar ProteomeLab PA 800 (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA) utilizando un capilar de sílice de 50 cm de largo efectivo, 50 μm de diámetro interno y 375 μm de diámetro externo (Beckman Coulter, Inc. Brea, CA, USA). Previo a cada ciclo de selección se acondicionó el capilar con 0.1 M NaOH, agua desionizada y buffer de SELEX (HEPES 20mM pH 7.3, NaCl 10mM, MgCl_2 1mM) durante 5 min. Para llevar a cabo la primera partición, la mezcla de interacción que contenía 1 μM de proteína DIII y 25 μM de biblioteca fue incubada durante 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se inyectó al capilar durante 5 segundos con 5 psi para posteriormente aplicar un voltaje de separación de 25KV que permitió obtener una ventana de colección de 20 minutos. En los ciclos de selección posteriores se disminuyó la cantidad de ADNcs y proteína a concentraciones menores con el fin de incrementar la astringencia del SELEX.

6.3 Ensayos de unión

Para la determinación del enriquecimiento se calcularon las constantes de disociación (K_D) por interferometría en biocapa. Esta, es una técnica óptica que monitorea el patrón de interferencia de luz blanca reflejada de una capa interna de referencia y una capa biomolecular. Para llevarla a cabo se inmoviliza en la punta de un biosensor la muestra

que posteriormente se hace interaccionar con su analito en solución. Después de la unión entre ambas moléculas, el patrón de interferencia de la luz reflejada cambia debido al incremento del grosor en la punta del sensor (Sultana y Lee, 2015).

Se utilizó un sistema BLItz (Pall Life Sciences, Dreieich, Alemania) y el software BLItz 1.2. En este, se cargó un biosensor de alta precisión de estreptavidina (SAX) con cada una de las pozas biotiniladas durante 120 a 200 segundos utilizando una concentración de 1000nM. Después se equilibró el sensor durante 30 segundos con el buffer de selección y se añadieron diferentes concentraciones de proteína en constante agitación (2200 rpm).

Para llevar a cabo los ensayos de *Slot blot*, se marcaron las secuencias candidatas utilizando la polinucleótido cinasa T4 (PNK) (Thermo Fisher Scientific) y γ -[32P]-ATP (PerkinElmer, Inc., Waltham, MA). Los ensayos de unión se llevaron a cabo utilizando 15pM de las candidatas marcadas y 300nM de proteína DIII o BSA incubándolos durante 1 hora a temperatura ambiente en el buffer de SELEX. Las mezclas se hicieron fluir a través de un aparato de *Slot blot* (Invitrogen) que contiene una membrana de nitrocelulosa (NC) y una membrana de nylon (NY). Se cuantificó la radioactividad de las membranas utilizando un Typhoon IB Biomolecular Imager (Cytiva) y se determinó el porcentaje de unión a proteína (%Unión) de la siguiente manera: % Unión= (radioactividad en NC / radioactividad en NC y NY) * 100.

Los ensayos de polarización de la fluorescencia se llevaron a cabo utilizando las secuencias de ADNcs con una modificación en el extremo 5' añadida por PCR en emulsión asimétrica. Las mezclas de interacción se llevaron a cabo en 30 μ L utilizando 1.25 nM de aptámero modificado y diferentes concentraciones de proteína DIII o proteínas control en buffer SELEX y se incubaron 1 hora a temperatura ambiente en placas de 384 pozos de fondo oscuro (Corning Inc., Corning NY). La polaridad de la fluorescencia se midió en un lector de placas BioTek® Synergy™ H4 (Thermo Fisher Scientific). La diferencia de polarización de fluorescencia (Δ FP) se calculó sustrayendo los valores de la mezcla de interacción con proteína y la mezcla de interacción sin proteína. Las K_D s se calcularon utilizando el software GraphPad Prism 8.4, utilizando un modelo de regresión no lineal mediante la siguiente ecuación:

$$Y = B_{\max} * X / (K_D + X)$$

6.4 Secuenciación de próxima generación (NGS) y análisis bioinformático

Para llevar a cabo la secuenciación de próxima generación se produjeron 2 µg de ADNdc de cada ciclo de selección por PCR en emulsión (emPCR) y se añadieron adaptadores distintos con el kit TruSeq ADN PCR-Free LT siguiendo las especificaciones del proveedor. Después de la ligación, las rondas fueron purificadas en un gel de agarosa al 3%, verificadas por PCR y cuantificadas utilizando el kit NEBNext® Library Quant Kit for Illumina® (New England Biolabs Inc. Ipswich, MA) para posteriormente ser secuenciadas por extremos emparejados (paired end) en una plataforma de secuenciación NGS MiSeq (Illumina) utilizando el kit MiSeq Reagent Kit V3 (Illumina) flow cell. Los datos obtenidos fueron analizados con Galaxy project platform, FASTaptamer, APTAsuite y MEME.

6.5 Purificación de oligonucleótidos

La purificación de oligonucleótidos se llevó a cabo utilizando un gel de poliacrilamida desnaturante (19:1 acrilamida-bisacrilamida) al 8% con urea 7M. Se visualizó el tamaño de los productos de acuerdo con el corrimiento electroforético de los colorantes xilencianol y azul de bromofenol para posteriormente ser cortados y eluidos con buffer de elución (acetato de amonio 0.5 M, EDTA 1 mM y SDS 0.1%) durante toda la noche a 4°C y purificados con el kit *Oligo clean and concentrator* (Zymo Research®) siguiendo las indicaciones del proveedor. Posteriormente fueron cuantificados en el espectrofotómetro NanoDrop2000 y se verificaron en un gel de poliacrilamida nativo (19:1 acrilamida-bisacrilamida) al 8%.

6.6 PCR en solución, generación de ADNcs, PCR emulsión y PCR en emulsión asimétrica.

Para la generación de ADNdc después de cada ronda de selección se llevó a cabo una PCR con la siguiente mezcla de reacción de reacción: dNTPs 0.2 mM, Buffer 1X, cebador forward 0.5 μ M, cebador reverse fosforilado 0.5 μ M, 2.5 U/ μ L de Taq polimerasa (Invitrogen), MgCl₂ 3mM más 2 μ L de la partición recuperada en un volumen de 20 μ L. Se emplearon las siguientes condiciones de ciclaje: desnaturalización inicial de 95 °C durante 2 min. 19-25 ciclos de desnaturalización de 95 °C durante 30 segundos, alineamiento de 56 °C durante 30 segundos y extensión de 72 °C durante 30 segundos.

Para la generación de ADNcs los productos de PCR se digirieron utilizando 20 U de exonucleasa lambda incubando las muestras durante 1 h a 37 °C para posteriormente ser purificados por columna y visualizados en un gel de agarosa al 3%.

La producción de ADNdc para la NGS se realizó por emPCR asimétrica compuesta por una fase oleica que contiene Span 80 al 4.5%, Tween 80 al 0.4%, Triton X-100 al 0.05% y aceite mineral. La fase acuosa contiene dNTPs 0.2nM, Buffer 1X, cebador forward 0.4 μ M, cebador reverse 0.4 μ M, 0.125 U/ μ L de Taq polimerasa, MgCl₂ 3mM y 5pM de molde. La reacción de 200uL de PCR se combinó con 500uL de la fase oleosa, fue agitada por 20 min y termociclada durante 20 ciclos. La emulsión fue purificada utilizando diclorometano saturado con agua y centrifugada a 17,200 \times g durante 5 min para recuperar la fase acuosa y ser purificada con el *Oligo clean and concentrator* (Zymo Research®)

La emPCR asimétrica se llevó a cabo utilizando la misma emulsión descrita anteriormente con la excepción que la mezcla reacción PCR contiene: cebador forward 5-FAM 0.4 μ M, cebador reverse 0.03 μ M y fue termociclada durante 55 ciclos. La emulsión resultante fue purificada como se describió anteriormente y la ADNcs fue separada de la dsADN utilizando un gel nativo de poliacrilamida al 10%, eluida y

cuantificada. Cada uno de los productos de PCR descritos anteriormente y se verificaron por gel de poliacrilamida nativo 19:1 al 8%.

6.7 Cultivo celular y producción de ZIKV

Las células C6/36 (ATCC® CCL-1660™) se cultivaron en cajas Petri P50 a 28°C utilizando medio L-15 (Leibovitz) suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB) (Thermo Fisher Scientific), 0.025 % de NaHCO₃, 100 IU/mL de ampicilina (GE Healthcare, Piscataway NJ), 100 µg/mL de estreptomina (Thermo Fisher Scientific) y 1X de aminoácidos no esenciales. Para la producción de los virus se cultivaron 2 cajas de Petri p150 a una confluencia del 90% y se llevó a cabo la infección y purificación siguiendo el método previamente reportado (Jensen et al, 2016). La infección se llevó a cabo utilizando una dilución 1:10 proveniente de un clarificado de ZIKV obtenido por el mismo método (Jensen et al, 2016) durante una hora utilizando el mismo medio únicamente disminuyendo a 2.5% la cantidad de SFB. La infección se llevó a cabo durante 1 hora utilizando 8mL de medio suplementado más 100 µL de la dilución del clarificado. Posteriormente se añadieron 17 mL de medio suplementado y se monitoreo el efecto citopático durante los siguientes 5 días. Una vez terminados los días, se retiró el medio y se centrifugo a 3200xg para obtener un clarificado. El sobrenadante se recuperó y se colocaron 8mL por cada 3 mL de una solución de sacarosa al 20% para someterse a una ultracentrifugación de 113,602xg a 4°C. Se desechó el sobrenadante resultante y el pellet obtenido fue resuspendido en buffer HEPES pH 7.9 NaCl 50nM. Por último, se centrifugo a 16,000xg, se resuspendió en 250 µL de buffer de SELEX y se almacenaron a 4°C hasta su uso.

6.8 Inmunotransferencia

La inmunotransferencia se llevó a cabo añadiendo Laemmli 2X (Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, glicerol 25%, SDS 2%, β-mercaptoetanol 2% (v/v), azul de bromofenol 0.01% (p/v)) a las muestras de virus purificado y llevando a ebullición durante 10 min. Los virus desnaturalizados se cargaron en geles de poliacrilamida-bisacrilamida 29:1 y la

electroforesis se llevó a cabo utilizando un gel concentrador al 4% (Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, SDS 0.1% (p/v)) y un gel separador al 8% (Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, SDS 0.1% (p/v)) en buffer TGS (Tris 25mM pH 8.3, glicina 192mM, SDS 0.1% (p/v)) durante 1:30 horas a 125 volts. Posteriormente se transfirió el gel a una membrana de PVDF (Millipore Corporation, Bedford MA) empleando buffer Towbin (Tris-base 25mM pH 8.3, glicina 192mM, Metanol 20% (v/v)) y 1 ciclo de turbo blot para mini geles en un Transblot® (Trans-Blot®Turbo™ Transfer System Bio-Rad). Se bloqueó la membrana con leche en polvo descremada al 10% en PBS-Tween (PBS con Tween 0.1% v/v) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se incubó con el anticuerpo anti *ZIKV Envelope Protein (40543-V08H*, SinoBiological) 1:2000 en PBS-Tween, durante toda la noche. Se lavó la membrana tres veces con 30 mL de PBS-Tween 0.1% (v/v) y se incubó el anticuerpo secundario anti-mouse (1:2000 en PBS-Tween 0.1% (v/v)) durante 1 hora. Finalmente, las membranas se lavaron 3 veces con 30 mL de PBS-Tween 0.1% (v/v) y se revelaron con el kit Luminata Crescendo (Millipore) en un C-DiGit® Blot Scanner (LI-COR Biosciences Inc., Lincoln NE) usando el protocolo estándar

6.9 Ensayo de aptámero ligado a fluoróforo (FLAA)

El ensayo de aptámero ligado a fluoróforo o (FLAA por sus siglas en inglés), se llevó a cabo utilizando placas de 96 pozos. Primero, se lavaron los pozos 3 veces con 200 µL buffer de lavado (Fosfato de sodio 100mM pH 7.2, NaCl 150mM, Tween-20 0.05%,) y se añadieron 100 pmoles del aptámero C7 5'-amino-modificado en 100µL de buffer de inmovilización (Fosfato de sodio 100mM pH 7.2, Cloruro de sodio 150mM,). Se incubó la placa 2 horas a 37°C y 175 rpm. Se retiró la solución anterior, se añadió 200 µL del Buffer de bloqueo (Thermo Scientific SuperBlockBlocking Buffer™) e incubó 1 hora a temperatura ambiente. Terminado el bloqueo, se lavó 3 veces con 200 µL buffer de lavado y buffer TNa (Tris-HCl 50 mM pH 7.0, NaCl 110 mM). Se añadieron 200 µL de buffer TNa o TNa con 10% de saliva, con proteína S, controles o muestras clínicas e incubaron a 175 rpm una hora a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó la placa 3 veces con 200 µL buffer TNa y se añadieron 50 pmoles del aptameros C9 5'-FAM-modificado en 100 µL de buffer TNa a cada pozo e incubó a 175 rpm una hora a

temperatura ambiente. Se lavó 3 5 veces con 200 μ L buffer TNa, se añadieron 150 μ L de urea 7M a cada pozo e incubaron 30 min a 175 rpm a temperatura ambiente. Por último, se tomó 25 μ L de cada pozo y añadió a una placa negra (Corning Inc., Corning NY) con 75 μ L de TNa y se leyó la fluorescencia (491ex/516em nm) en un lector de placas BioTek® Synergy™ H4 Hybrid Multi-mode microplate reader (Thermo Fisher Scientific). Para cuantificar la proteína S y los ensayos de *spike-and-recovery*, la señal de fluorescencia de fondo se sustrajo de la señal de fluorescencia de la muestra. Para calcular la cantidad proteína S se utilizó la ecuación $y = mx+b$. La cantidad máxima teórica de la intensidad de fluorescencia posible se estimó utilizando los datos de la calibración a un análisis de regresión lineal que utilizo la siguiente formula:

$$FI = F_{\text{max}} * x / (K_D + x)$$

donde FI es igual al valor obtenido de las unidades de intensidad de fluorescencia. F_{max} es la señal máxima posible obtenida, x es la pendiente y K_D la constante de disociación. El límite de detección se calculó utilizando la ecuación:

$$\text{LOD} = ks/m$$

donde k es la constante del error aleatorio (donde típicamente se utiliza 3), s es la desviación estándar del blanco y m es la pendiente de la curva de calibración.

7. RESULTADOS

7.1 Selección de secuencias afines al dominio DIII de la proteína E de Zika

La selección de las secuencias afines por nuestro blanco seleccionado se llevó a cabo utilizando una de las variantes de electroforesis capilar como método de partición. En esta variante NECEEM se estableció una serie de condiciones de corrida que permitieron una migración distinta de cada uno de los componentes de la mezcla de interacción. Para establecer la ventaja de colección, se utilizaron 18.5 μM de proteína DIII y 10 μM de biblioteca aleatorizada. De esta manera, tal como se observa en la **Fig. 7**, la migración del dominio DIII se da alrededor de los 11.5 minutos, mientras que la biblioteca aleatorizada comienza su migración a los 22 minutos. Con esto, se logró establecer el tiempo de colección que terminó antes de los 22 minutos y permitió la obtención de los complejos DIII-ADNcs a causa de los cambios en masa y carga resultantes de la interacción ADN-Proteína. Debido a la baja concentración de proteína utilizada en el SELEX, no fue posible observar directamente el complejo DIII-ADNcs entre el pico de proteína y biblioteca inicial; sin embargo, durante cada ciclo de selección se verificó la recuperación de las secuencias afines por visualización directa en gel.

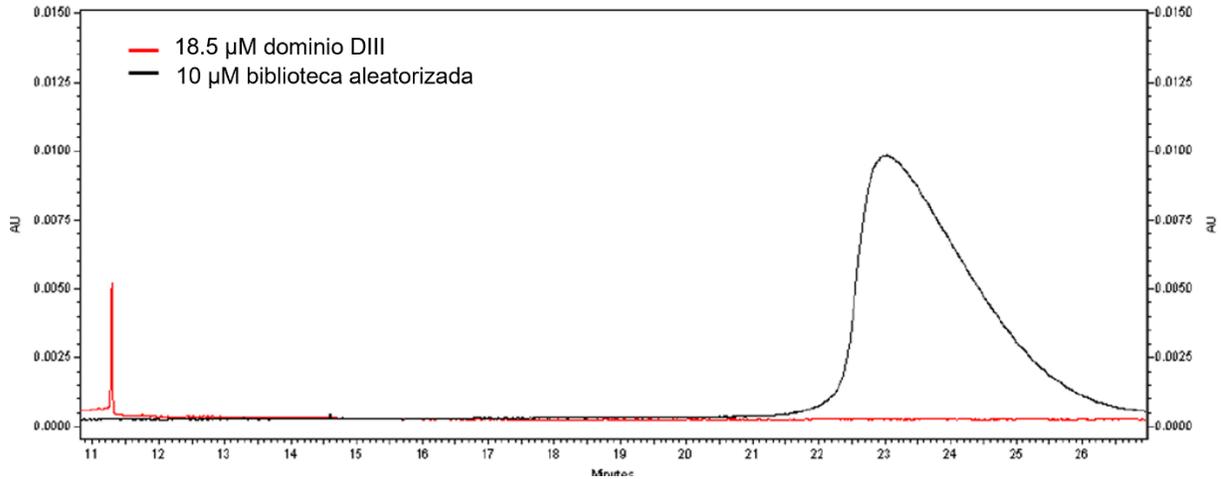


Figura 7. Electroferograma de dominio DIII y biblioteca aleatorizada. Condiciones de CE: 18.5 μM , 10 μM de biblioteca aleatorizada. Buffer de corrida Hepes 20 mM pH 7.3, inyección 5psi 5 segundos, 25 C, Voltaje 25 k, detección UV a 260 nM.

El primer ciclo de selección se llevó a cabo utilizando 25 μM de biblioteca inicial (M2) y 1 μM de proteína. Posteriormente se disminuyó la cantidad de biblioteca inicial y la cantidad de proteína con el fin de incrementar la astringencia del SELEX tal y como se muestra en el **cuadro 1**. Las secuencias recuperadas en cada ciclo de selección fueron amplificadas mediante PCR y verificadas en gel (**Fig. 8, panel A**). Cada ronda de selección generó el amplicón del tamaño esperado (82 pb) sin la formación de ningún subproducto indicando la correcta amplificación de cada una de las rondas. Posterior a cada amplificación, se llevó cabo la digestión con exonucleasa lambda que nos permitió tener ADNcs para cada una de las siguientes rondas. La digestión con exonucleasa lambda fue confirmada por gel y tal como se muestra en el **panel B (Fig. 8)** donde se puede apreciar la diferencia en la migración electroforética correspondiente entre ADNdc y ADNcs.

Cuadro 1. Condiciones de CE-SELEX.

Ronda	Dominio DIII	ssADN	Ciclos de PCR
1	1 μ M	25 μ M	27
2	0.5 μ M	0.5 μ M	29
3	0.25 μ M	0.5 μ M	28
4	0.25 μ M	0.5 μ M	28
5	0.125 μ M	0.5 μ M	26

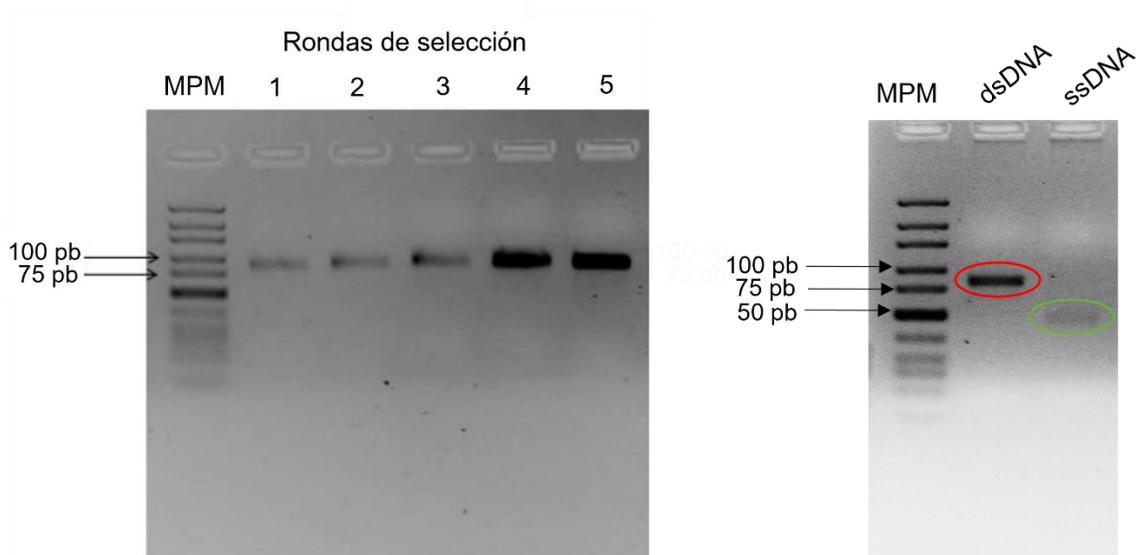


Figura 8. Resultados del CE-SELEX. A) En este gel de agarosa al 4% se puede observar el resumen de los resultados obtenidos de cada ronda de selección. Se puede apreciar un amplicón de 82 pb por cada ciclo sin la formación de ningún subproducto. B) En este gel de agarosa al 4% se presenta la digestión de la ADNdc (rojo) para la generación de ADNcs (verde) comprobada por la diferencia en la migración electroforética.

7.1.1 Determinación de enriquecimiento de las rondas de selección

Una vez terminadas las rondas del SELEX se procedió a evaluar la afinidad de la biblioteca inicial, la ronda 3 (R3) y 5 (R5) con el fin determinar el enriquecimiento durante el proceso de selección. Utilizando interferometría en biocapa se calcularon las constantes de disociación para cada una de las rondas (**Fig.9**). Como se puede observar, cada una de las rondas de selección tiene una constante de disociación más pequeña que la biblioteca inicial que se traduce en una mayor afinidad por nuestro blanco. De manera interesante, la R3 tuvo una afinidad mayor por el dominio DIII, presentando una K_D más baja que la R5. A pesar de esto, la diferencia de afinidad entre las rondas 3 y 5 con respecto a la biblioteca inicial nos indica que el proceso SELEX empleado nos permitió la obtención de secuencias afines que fueron evolucionando a lo largo de los ciclos de selección.

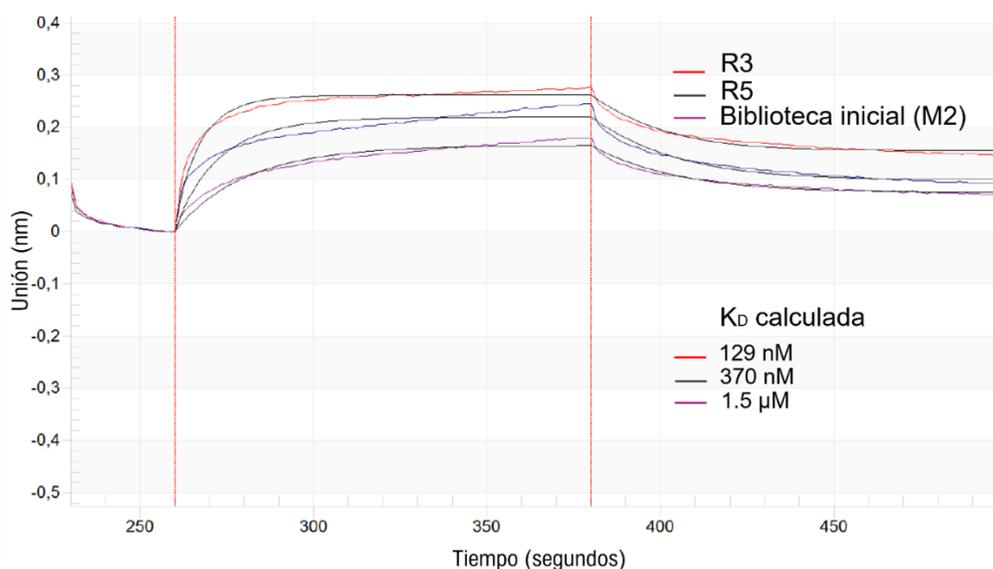


Figura 9. Determinación de enriquecimiento de CE-SELEX. Se calcularon las K_D de la biblioteca inicial (M2), 3R y 5R con interferometría en biocapa. Se cargaron en un biosensor de alta precisión de estreptavidina (SAX) cada una de las pozas biotiniladas durante 120 a 200 segundos utilizando una concentración de 1000nM. Después se equilibró el sensor durante 30 segundos con el buffer de selección y se añadieron diferentes concentraciones de proteína en

constante agitación (2200 rpm) y se utilizó el software BLItz 1.2. La KDs calculadas para la R3, 5R y biblioteca aleatorizada son 129 nM, 370nM y 1.5 μ M respectivamente.

7.2 Secuenciación de próxima generación

En la **Fig. 10** se presenta cada una de las rondas amplificadas en un gel de acrilamida-bisacrilamida 19:1 al 10%. Cada ronda amplificada posee el tamaño esperado (82 pb) y no presenta la presencia de ningún subproducto. En la **Fig.11**, se puede observar cada una de las rondas de selección ligadas con los adaptadores en un gel de agarosa al 3% con la presencia de una banda que migra entre las 200 y 300 pb tal como Tolle y Mayer reportaron previamente. Posteriormente se presenta (**Fig. 12**) la verificación de la ligación con los productos esperados del inserto (82 pb) y la longitud completa del fragmento (inserto + 125 pb del adaptador) (**Fig. 12**) en cada una de las ligaciones purificadas por gel. Por último, se llevó a cabo la validación de las bibliotecas con el kit NEBNext® Library Quant Kit for Illumina®. En el **cuadro 2** se puede observar la concentración y numero de adaptador de cada una de las bibliotecas que posteriormente fueron ocupadas para la NGS.

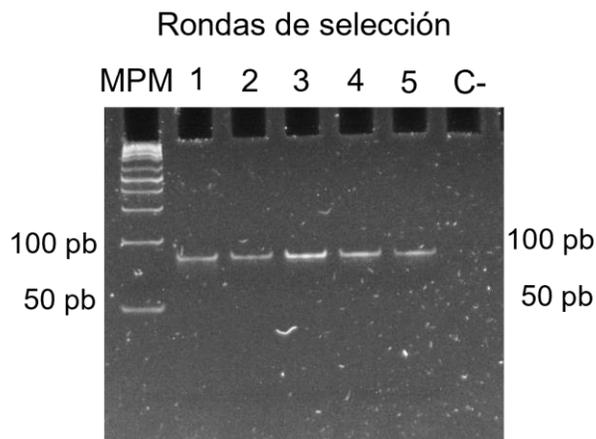


Figura 10. Rondas de selección de CE-SELEX amplificadas por emPCR. A) En este gel de acrilamida-bisacrilamida 19:1 al 10% se observar la migración esperada (82pb) para cada una de las rondas amplificadas por PCR en emulsión sin la formación de ningún subproducto.

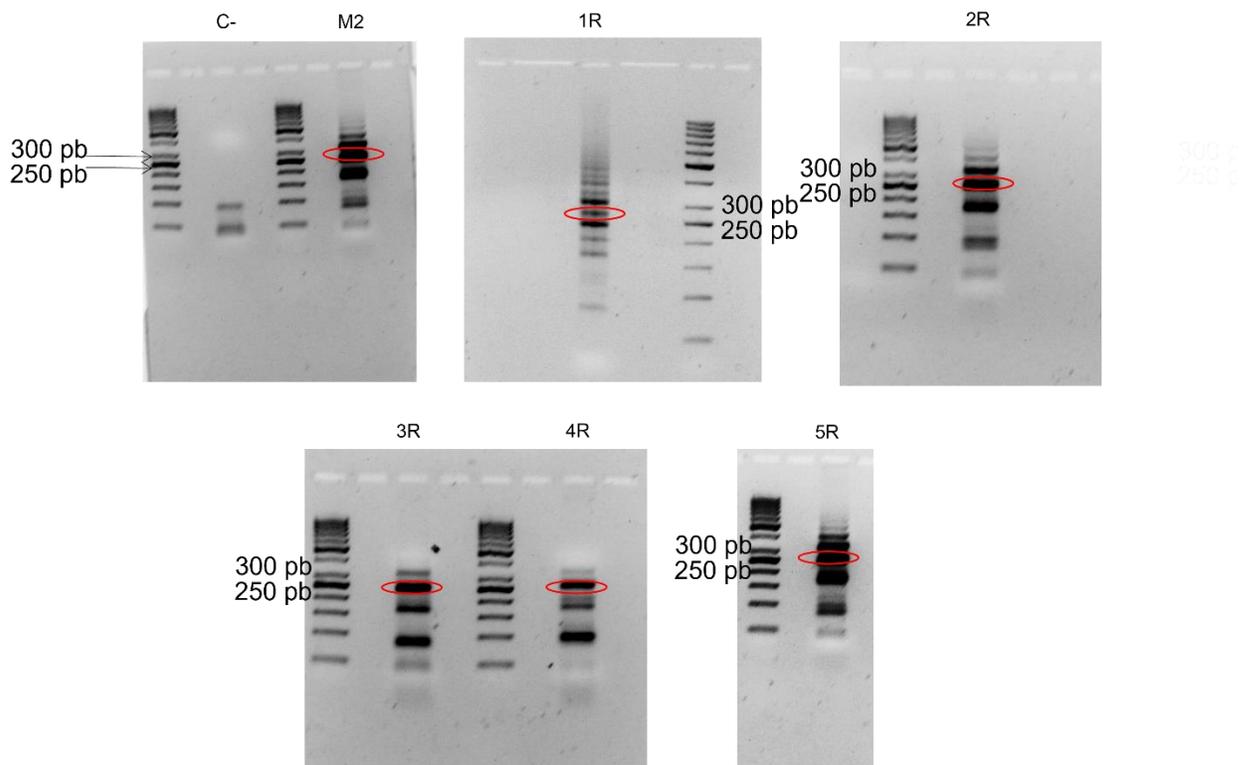


Figura 11. Ligación de las rondas de selección. En estos geles de agarosa al 3% se observan los productos resultantes de la ligación de cada una de las bibliotecas con una migración electroforética entre los 300 y 250 pb.

Cuadro 2. Adaptadores y concentración de cada biblioteca secuenciada

Biblioteca	Adaptador	Concentración (nM)
M2	AD002	28.54
1R	AD0016	83.44
2R	AD0014	42.48
3R	AD007	18.62
4R	AD0014	7
5R	AD0013	14.32

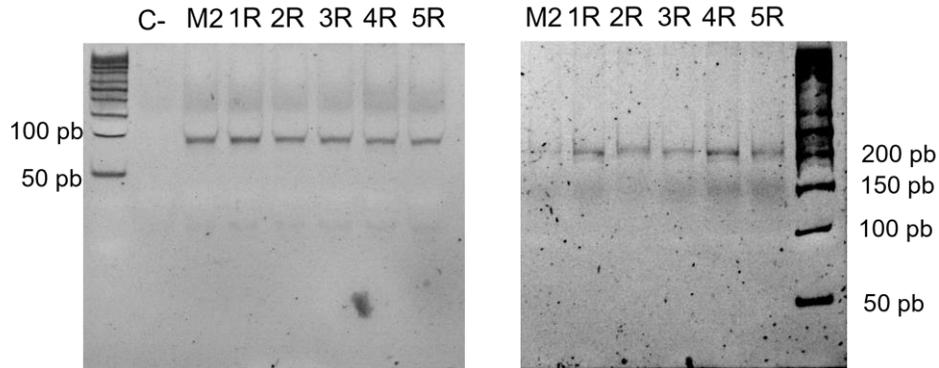


Figura 12. Verificación de la ligación. A) En este gel de poliacrilamida 19:1 al 10% nativo se verificó la presencia un amplicón de 82pb correspondiente al inserto en nuestras bibliotecas. B) En este gel de poliacrilamida nativo 19:1 al 10% nativo se verificó la presencia de un amplicon de aproximadamente de 207 pb que corresponde al inserto y los adaptadores en nuestras bibliotecas.

Con todo lo anterior se procedió a llevar a cabo la NGS. Siguiendo las especificaciones del proveedor se llevó a cabo un *pooling* de cada una de las bibliotecas a una concentración final de 12.5pM y se procedió a secuenciar en un equipo MiSeq de NGS utilizando la MiSeq Reagent Kit V3 (Illumina) flow cell.

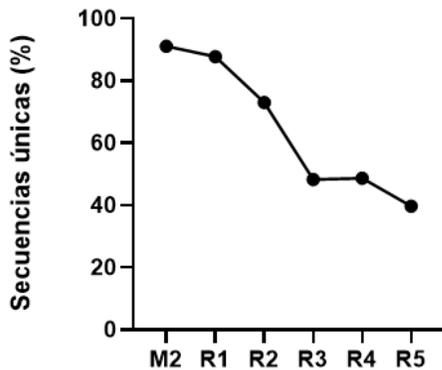
Los resultados de la secuenciación fueron procesados con Galaxy Project Platform y arrojaron más de 1.3 millones de secuencias por biblioteca. En **cuadro 3** se puede observar el número de secuencias exactas por cada ronda secuenciada. Además, se calculó el porcentaje de secuencias únicas (**Fig.13, panel A**) utilizando el software FASTaptamer observándose una reducción de secuencias únicas a medida que se incrementan las rondas de selección. Adicionalmente se calculó la disminución y el porcentaje de enriquecimiento de secuencias únicas (**Fig.13, panel B**) utilizando el software Aptasuite. De esta manera se observa que mientras disminuye la cantidad de secuencias únicas, incrementa el enriquecimiento de otras hasta llegar a un punto donde el número de rondas de selección parece no favorecer su enriquecimiento. Por otra parte, se analizó el *fold change* en el enriquecimiento (lecturas por millón,) entre las rondas de selección 2R/3R y 4R/5R utilizando la rutina *Script Enrich* de FASTaptamer con el objetivo de obtener las secuencias que más se enriquecieron en la ronda 3 y 5. En la **Fig.14** podemos observar el análisis de los datos obtenidos cuando

se comparan las lecturas por millón de la 2R con la 3R y la 4R con 5R, siendo notable que la R3 posee algunas secuencias con mucho mas enriquecimiento que la 5R.

Cuadro 3. Secuencias procesadas utilizando Galaxy Project platform y FASTaptamer

Biblioteca	Secuencias
M2	1,711,283
1R	1,676,394
2R	1,629,641
3R	1,574,022
4R	1,344,662
5R	2,11,638

A)



B)

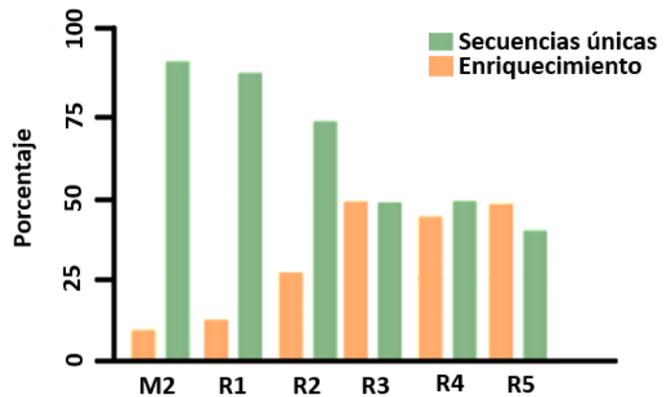


Figura 13. Análisis de la variabilidad de la NGS. A) Análisis con FASTaptamer donde se observa la disminución del porcentaje de secuencias únicas conforme incrementan los ciclos de selección. B) Análisis con APTAsuite. Este, además de incluir el porcentaje de secuencias únicas también se observa como incrementa el porcentaje de enriquecimiento hasta llegar al punto donde el número de rondas de selección parece no favorecer su enriquecimiento.

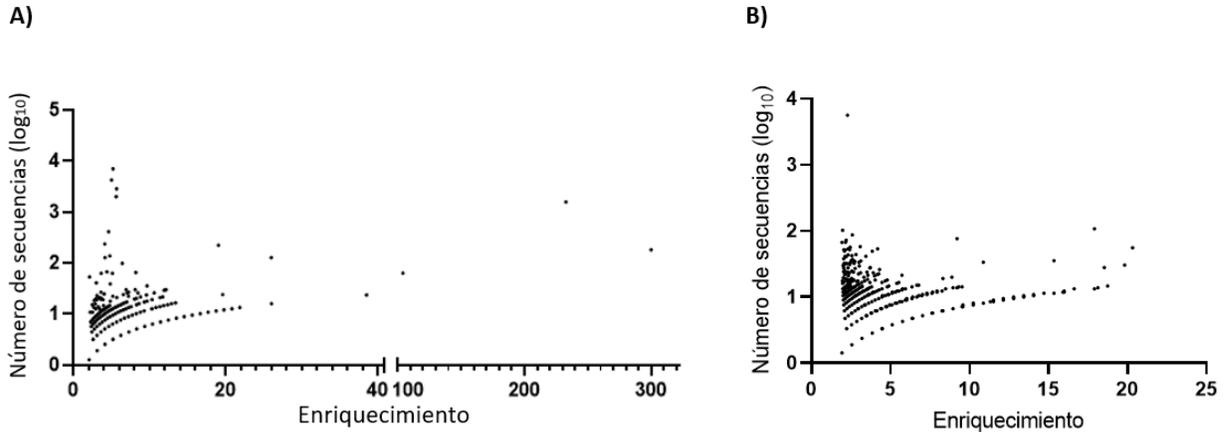


Figura 14. Análisis del enriquecimiento de NGS de R2/R3 Y R4/5. En este análisis se graficó la frecuencia de cada una de las secuencias como función del múltiplo de enriquecimiento (*enrichment fold*) que cada una de las secuencias presento durante las rondas seleccionadas. A) En este grafico se observa el enriquecimiento que ocurrió a partir de la (lecturas por millón) 2R a la 3R B) En este grafico se observa el enriquecimiento que ocurrió a partir de (lecturas por millón) de la 4R a la 5R.

En adición a los análisis previos, se utilizó la plataforma MEME suite con el fin de identificar los motivos más representados en la R3 y aquellos que permanecieron hasta la R5 del SELEX. En la **Fig.15**, se pueden apreciar los principales motivos que poseen un valor E significativo (>0.05) del top 500 de las secuencias más frecuentes.

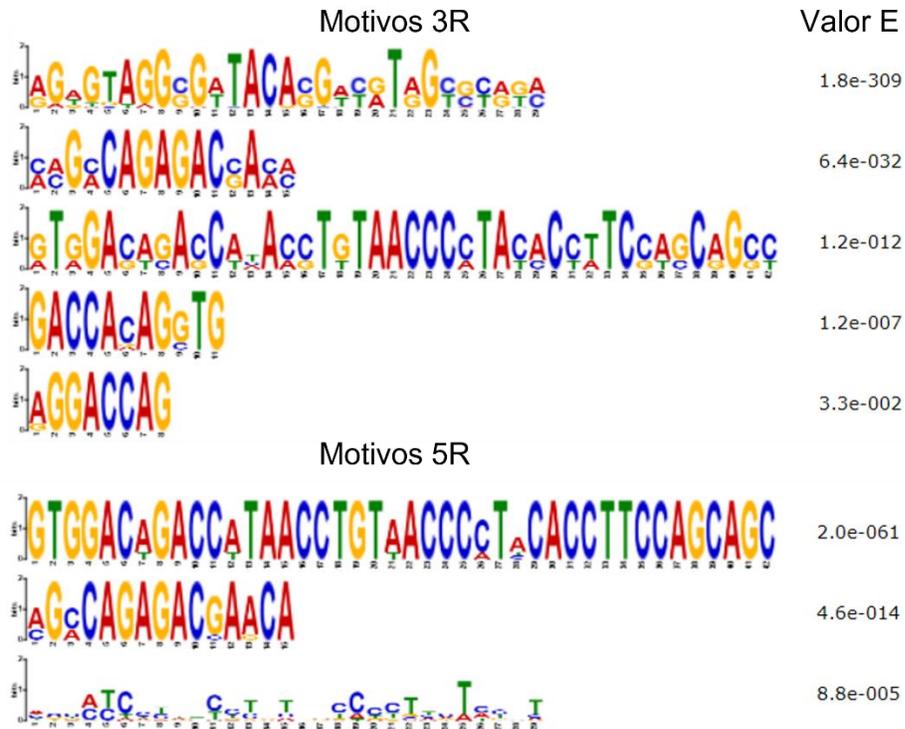


Figura 15. Predicción de motivos del top 500 de secuencias más enriquecidas del análisis de NGS realizado con MEME para 3R y 5R.

Con todos estos datos obtenidos, se seleccionaron 11 candidatas (**cuadro 4**) que pertenecen a las secuencias más enriquecidas en la 3R y 5R, y presentan alguno de los motivos previamente analizados.

Cuadro 4. Secuencias de aptámeros resultantes del análisis bioinformático

Nombre	Secuencia de los aptámeros seleccionados (5'→3')
Z1	CCACAGCAGCCAGAGACGAACACCAGCAGCCAGAGACGAACA
Z2	CAGCCAGAGACGAACACACGACGACAGAGACCACAGCAGCCA
Z3	CAGCCAGAGACGAACACCAGCAGCCAGAGACGAACACCAGCA
Z4	CCAGCAGCCAGAGACGAACACACGACGACAGAGACGAACATG
Z5	CCAGAGACGAACACCAGCAGCCAGAGACGAACATGTTTCGTCT
Z6	GACCACAGGTGGACAGACCATAACCTGTAACCCCTACATCTT
Z7	GTGGACAGACCATAACCTGTAACCCCTACACCTTCCAGCAGCC
Z8	CACAGGAGAGAGTAGGCGATACACGACGTAGCGCAGATAGGA
Z9	GTGGACAGACCATAACCTGTAACCCCTACACTTCCAGCAGCC
Z10	GAGGAGAGAGGCGATACACGACGTAGCGCAGATAGGACCAGC
Z11	TATGTGCCCGTCAGCGCAAACGTTTACGATGATTCCTTACTT

7.3 Validación de los aptámeros mediante ensayos de unión

Los oligonucleótidos sintetizados para los ensayos de unión fueron purificados (Figura X) por gel PAGE desnaturalizante (**Fig. 16, panel A**) con el fin de eliminar los subproductos provenientes de la síntesis. Se determinó su migración electroforética de acuerdo con la migración de los colorantes xilencianol y bromofenol, así como un oligonucleótido de referencia (80pb) para su posterior uso en marcaje radioactivo o para la incorporación de 5-FAM. Posteriormente las candidatas purificadas fueron verificadas en un gel de acrilamida 19:1 al 10% confirmando su tamaño con la migración electroforética esperada (**Fig. 16 panel B**).

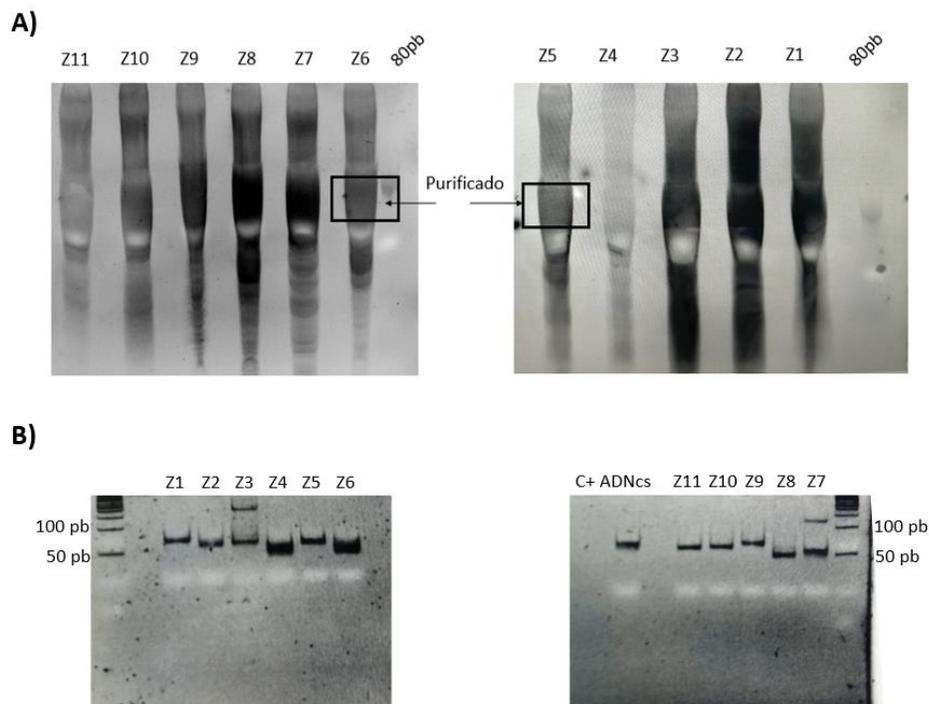


Figura 16. Purificación de la síntesis de las candidatas seleccionadas. **A)** Geles de poliacrilamida desnaturalizante 19:1 al 8% donde se observa la purificación del fragmento correspondiente al tamaño de los aptámeros que se llevó a cabo para eliminar los productos no deseados provenientes de la síntesis. **B)** Geles de poliacrilamida 19:1 al 10% usado para verificar la purificación de los aptámeros sintetizados. Cada producto corresponde al tamaño esperado de cada una de las candidatas. Como control positivo de ADNcs se utilizó la R3 purificada proveniente del CE-SELEX.

Para determinar la afinidad y especificidad de las secuencias previamente seleccionadas se llevaron a cabo ensayos de unión por *slot-blot* y polarización de la fluorescencia con el dominio DIII. Primero se llevó a cabo un *screening* de las 11 candidatas (**Fig.17**). En esta figura, podemos observar que en los ensayos de *slot-blot* se presenta un incremento en el porcentaje de unión cuando se añade el dominio DIII para la mayoría de las candidatas. Además, se observa una diferencia significativa de las mismas con respecto a la biblioteca cuando se añade el dominio DIII (**Fig.17, panel B**). Se seleccionaron dos candidatas (Z10 y Z11) para ensayos posteriores que demostraron afinidad y especificidad.

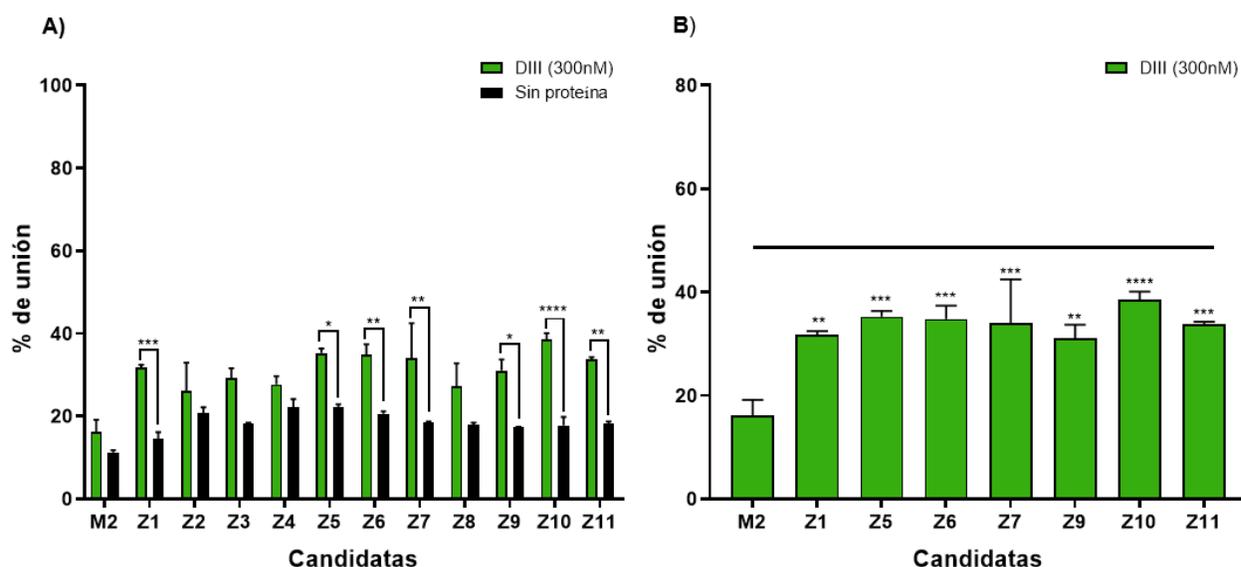


Figura 17. Unión de las candidatas al dominio DIII. A) Cuantificación del porcentaje de unión en los ensayos de *slot blot* de cada una de las candidatas seleccionadas del análisis bioinformático al añadir dominio DIII en los ensayos de unión. B) Cuantificación del porcentaje de unión y su diferencia con respecto la biblioteca M2. Análisis de varianza de un factor, comparación múltiple de Tukey's (95% CI). n=2. (****= p<0.0001, ***= p 0.0007, **= p 0.002, *= p 0.01).

Para llevar a cabo los siguientes ensayos de unión, se llevó a cabo la incorporación de 5'-FAM utilizando una emulsión asimétrica. En la **Fig. 18**, se puede observar un gel de poliacrilamida 19:1 nativo al 10% con dos bandas distintas para cada una de las muestras. El ADNdc que tiene una migración electroforética de aproximadamente 82 pb y el ADNcs que posee una migración menor fueron purificados para los ensayos de polarización de la fluorescencia.

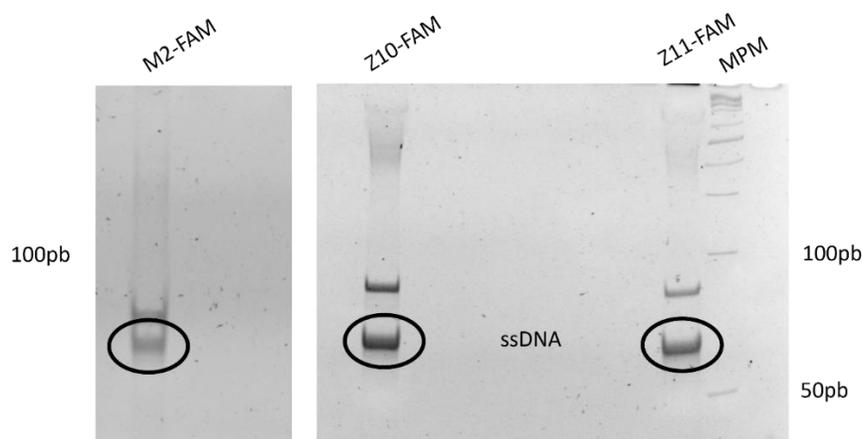


Figura 18. Purificación de la PCR en emulsión asimétrica para los ensayos de unión. En este gel de poliacrilamida nativo 19:1 al 10% podemos observar la purificación que se llevó a cabo para obtener la ADNcs con FAM en el extremo 5'.

Se determinó las constantes de disociación (K_{DS}) de Z10 y Z11 ($K_D = 246.7 \pm 14$ nM y $K_D = 358 \pm 14$ nM respectivamente). Se calcularon añadiendo concentraciones crecientes de dominio DIII o BSA como proteína control. La grafica construida con la diferencia de polarización (ΔFP) obtenida del incremento de las concentraciones se presenta en la **Fig.19**. Como se puede observar, únicamente se presenta un ΔFP significativo para nuestras candidatas en presencia de proteína DIII indicando que nuestras secuencias son afines y específicas contra nuestro blanco.

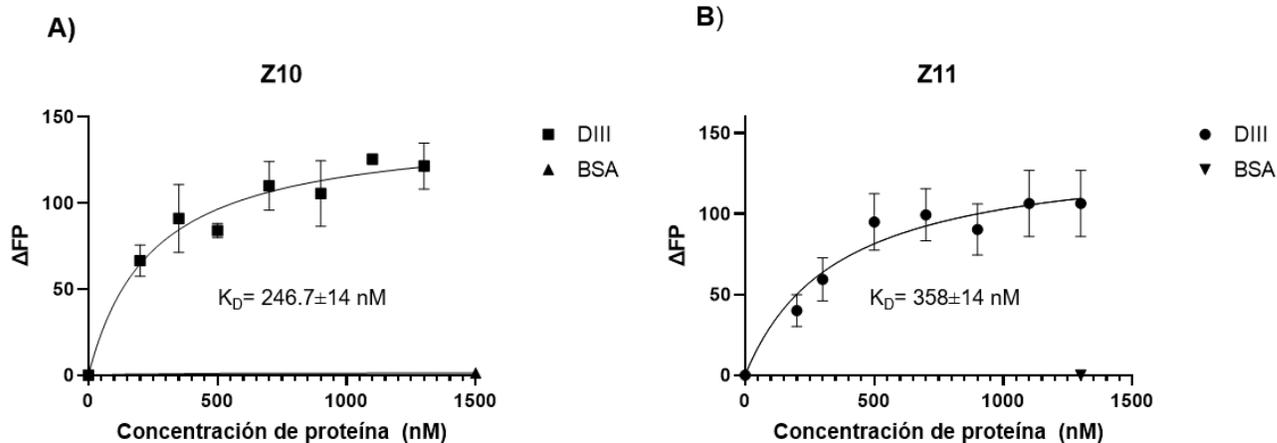


Figura 19. Afinidad y especificidad de los aptámeros. Las K_D s se calcularon utilizando los valores de ΔFP ajustándolos a un modelo de regresión no lineal de un solo sitio de unión. A) Determinación de la K_D de Z10 ($K_D = 246.7 \pm 14 \text{ nM}$, $R^2 = 0.92$). B) Determinación de la K_D de Z11 ($K_D = 358 \pm 14 \text{ nM}$, $R^2 = 0.86$). $n = 3$.

7.4 Producción de ZIKV y evaluación de la interacción con los aptámeros

Con el fin de evaluar la interacción de los aptámeros Z10 y Z11 con las proteínas nativas, se produjeron viriones ZIKV infectando células C6/36. La expresión de los virus se verificó por la presencia del efecto citopático (**Fig.20**) y la presencia de la proteína E. En la **Fig. 21** se puede apreciar una banda que corresponde a la proteína E con un tamaño aproximado de 48 KDa en un SDS-PAGE al 10% y en una inmunotransferencia.

Con estos resultados se evaluó la interacción de Z10 y Z11 con la proteína E de ZIKV. Primero se cuantificó por densitometría ($y = 307.88x + 11664y$, $R^2 = 0.95$) la concentración de proteína E resultante de la producción de los virus utilizando una curva patrón de BSA. Con esto, se estableció una concentración de virus que equivale a 800 nM de proteína E para los ensayos de unión que se llevaron a cabo en las mismas condiciones descritas que con el dominio DIII. En la **Fig.22** se presenta el ensayo de unión utilizando una concentración fija virus de ZIKV equivalente a 800 nM de proteína E. Se determinó la ΔFP para la biblioteca M2(control), Z10 y Z11. A pesar de la alta

concentración de proteína, no se observaron diferencias significativas, demostrando la falta de afinidad de nuestras candidatas su blanco cuando se presenta en condiciones nativas. Algunos elementos de reconocimiento molecular de origen biológico como anticuerpos y aptámeros pueden presentar una falta de unión cuando sus blancos sufren modificaciones en su estructura o presentan diferencias de cuando fueron aislados. Debido a los resultados anteriores Z10 y Z11 no se consideraron lo suficientemente sensibles para la elaboración de un biosensor para la detección de ZIKV.

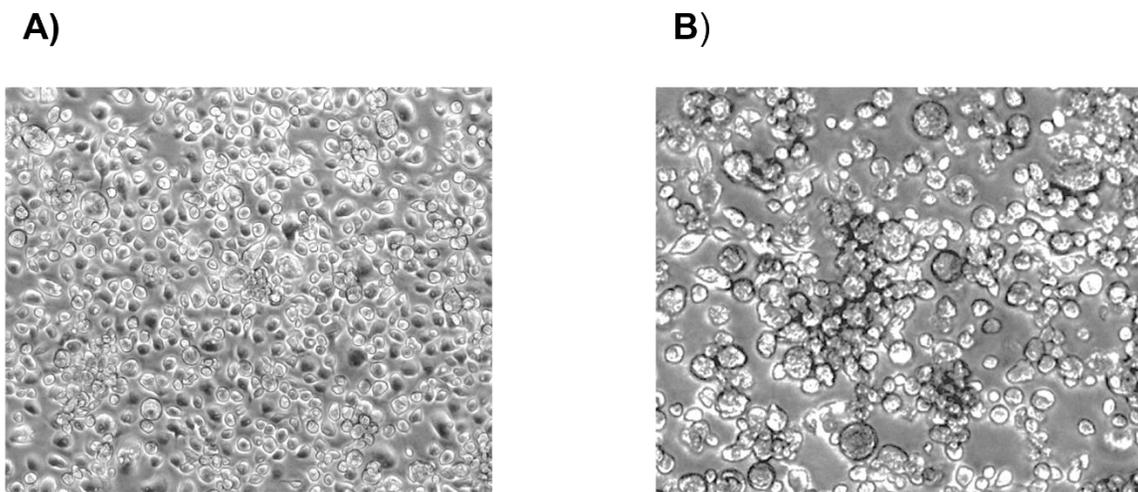


Figura 20. Infección de células c6/36 con ZIKV. A) Microscopia de campo claro de células c6/36 al día 1 de infección. B) Microscopia de campo claro de células c3/36 después de 5 días de infección.

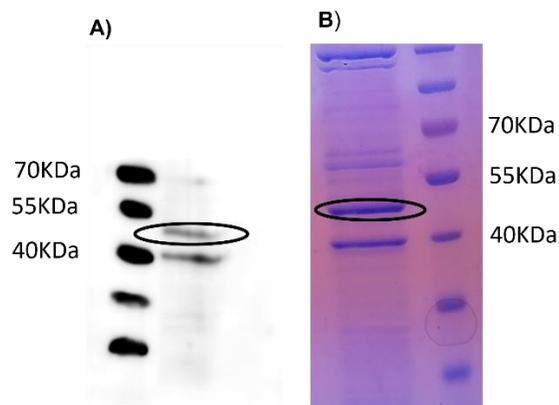


Figura 21. Detección de la proteína E en ZIKV. A) Inmunotransferencia de los virus producidos. La banda señalada corresponde a la migración electroforética esperada para la proteína E presente en los virus. B) SDS-PAGE al 10% poliacrilamida-bisacrilamida 29:1 teñido con Azul de Coomassie. La banda señalada corresponde a la migración electroforética esperada para la proteína E presente en los virus.

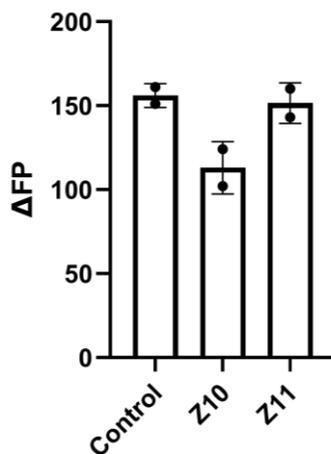


Figura 22. Unión de los aptámeros al ZIKV. Ensayos de unión con polarización de la fluorescencia para Z10 y Z11. Análisis de varianza de un factor, comparación múltiple de Tukey. N=2.

7.5 Elaboración de un ensayo tipo FLAA con aptámeros de ADNcs seleccionados contra la proteína S de SARS-COV-2

Para colaborar en la lucha contra la pandemia de COVID-19, nuestro grupo de trabajo realizó la selección de aptámeros contra otro tipo de blancos virales como la proteína S recombinante de SARS-CoV-2 como una respuesta a la pandemia de COVID-19 y se aislaron dos aptámeros de ADN (C7 y C9) que probaron ser afines y específicos (Martínez-Roque et al, 2022). Estos aptámeros fueron puestos a prueba para la elaboración de un aptasensor FLAA en el que C7 se utilizó como agente de captura y C9 como agente de detección. Brevemente, C7 con la modificación 5'-amino-C6 fue inmovilizado en placas de 96 pozos, bloqueado e incubado con la proteína recombinante S de SARS-COV-2 en buffer TNa para posteriormente añadir a C9

modificado con FAM y transferir el contenido a unas placas negras después de un tratamiento con urea para detectar la fluorescencia (**Fig.23**). En la **Fig.24** se presentan los primeros resultados del ensayo FLAA. En éste se puede observar como la intensidad de la fluorescencia es dependiente de la concentración de la proteína S, mientras que la presencia de BSA no genera ningún tipo de señal. Con estos datos, se caracterizaron los parámetros de detección del FLAA y se generó una curva de calibración que se elaboró sustrayendo la fluorescencia basal de todos los puntos y graficando el incremento la intensidad de la fluorescencia contra las concentraciones crecientes de la proteína con el fin de establecer el rango dinámico de detección. La curva resultante se ajustó a un modelo de regresión no lineal y el límite de detección (LOD) que se calculó a 41.87 nM y una sensibilidad (S) de 51 nM. Además, se calculó la intensidad de la fluorescencia máxima (FI max) con un valor de 70585 que corresponde a una cantidad de proteína mayor a la concentración máxima usada en el ensayo (600nM), sugiriendo que el rango dinámico de detección puede ser mayor y abarcar una concentración de proteína más alta.

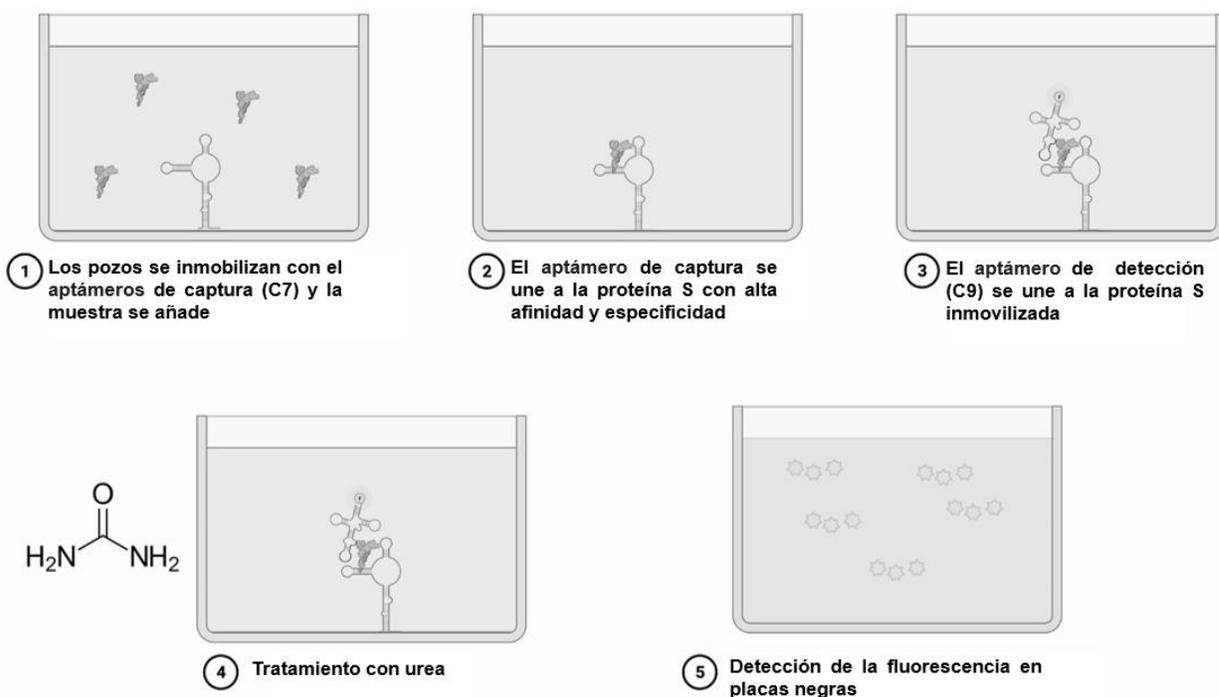


Figura 23. Representación gráfica del FLAA. Paso 1. El aptámero C7 amino modificado se inmoviliza como agente de captura en la superficie de placas pre-tratadas con anhídrido

maléico. Paso 2. La proteína recombinante S de SARS-CoV-2, control negativo o muestra es añadida al pozo con C7. Paso 3. Se añade el aptámero C9 modificado con FAM como agente de detección. Paso 4. Después de lavar la placa, se incuban las placas con urea 7M. Paso 5. el volumen se transfiere a placas de fondo negro y se detecta la fluorescencia.

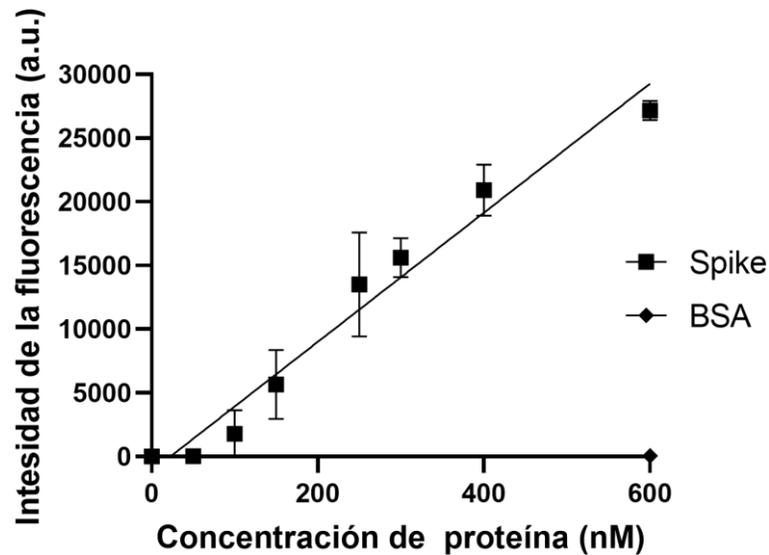


Figura 24. Regresión lineal simple del FLAA. La señal del FLAA es dependiente de la concentración de la proteína S. La concentración de la curva (0-600 nM) se representa con cuadros negros ($y = 50.67x - 1130$, $R^2 = 0.94$) y BSA usado como control negativo con rombos negros. Cada punto representa el promedio con la desviación estándar de 3 experimentos independientes ($n=3$).

7.6 Evaluación de la especificidad del FLAA

Como parte de la caracterización del ensayo FLAA, se determinó la capacidad de C9 aminado como agente de captura y C7-FAM como agente de detección. Así mismo, se incluyó una mayor cantidad de proteínas irrelevantes utilizando buffer TNA con 10% de saliva para comprobar la especificidad del ensayo para futuras aplicaciones. En la **Fig.25** se presenta el ensayo FLAA con las dos configuraciones de aptámeros como agente de captura y detección. En este, se muestra una diferencia significativa cuando

se usa la primera configuración del ensayo FLAA. Por otra parte, no se detectó ninguna señal cuando se utilizó C9 como agente de captura y C7 como agente de detección. Además, se puede observar que las proteínas irrelevantes incluidas no exhibieron ningún incremento en la intensidad de la fluorescencia. Por último, se decidió evaluar bajo las mismas condiciones, la especificidad del FLAA con otras proteínas virales, incluyendo la proteína S de otro coronavirus (HCoV-NL63) y la glicoproteína G del virus respiratorio sincitial, incluyendo caseína y lisozima como controles negativos (**Fig. 26**). Al igual que en el ensayo anterior, no se observó un incremento en la fluorescencia con ninguna proteína. Con estos resultados se demostró la capacidad de detección de la proteína S del ensayo FLAA utilizando a C7 como agente de captura y C9 como agente de detección, además de su alta especificidad por la proteína S.

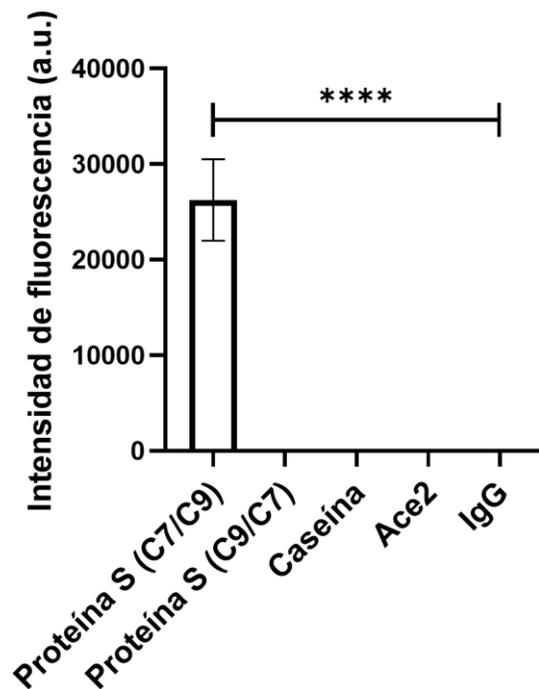


Figura 25. Intensidad de fluorescencia del FLAA. En esta grafica se presenta la intensidad de fluorescencia cuando se añaden 250 nM de proteína S utilizando la configuración C7/C9 y C9/C7 (agente de captura/agente de detección) así como otras proteínas irrelevantes (Caseína, ACE2 e IgG de ratón) incubadas en TNa con 10% de saliva. Análisis de varianza de un factor, comparación múltiple de Tukey (95% CI). n=3. (****= $p < 0.0001$).

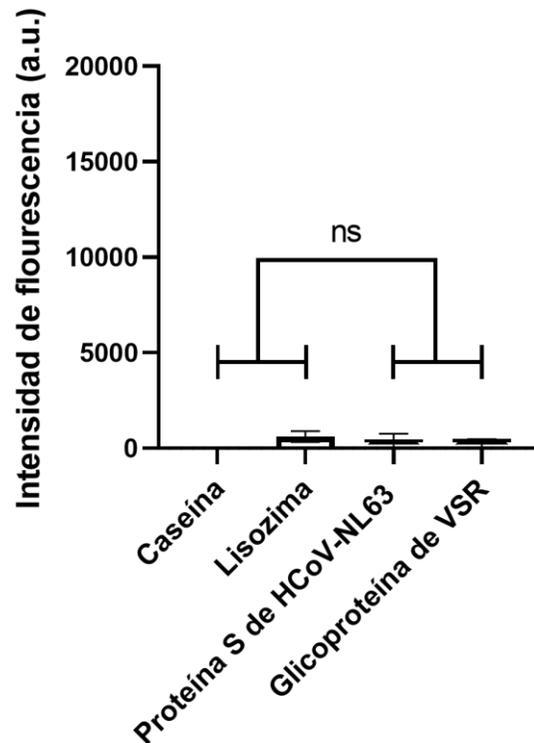


Figura 26. Especificidad del FLAA con proteínas virales. En esta grafica se presenta la intensidad de fluorescencia cuando se añaden 250 nM de la proteína S de coronavirus HCoV-NL63, glicoproteína de virus sincitial respiratorio (VSR) y controles negativos (Caseína, Lisozima) incubadas en TNa con 10% de saliva. Análisis de varianza de un factor, comparación múltiple de Tukey (95% CI). n=3.

7.7 Determinación de la capacidad de detección del FLAA en fluidos biológicos

Para determinar el desempeño del FLAA cuando la proteína S se encuentra diluida en fluidos biológicos, se utilizó el ensayo de “*spike and recovery*” utilizando buffer TNa con

10% de saliva. El objetivo de este ensayo es establecer si existe una diferencia en la respuesta del FLAA con el diluyente estándar (TNa) y una matriz biológica. Este se llevó a cabo añadiendo una cantidad definida de proteína S en buffer TNa con 10% de saliva obtenida de diferentes donadores. La intensidad de la fluorescencia se obtuvo de sustraer el fondo (intensidad de la fluorescencia del buffer TNa con 10% de saliva) y la señal obtenida de la muestra. Para cuantificar la concentración de proteína de nuestras muestras, se utilizó una curva estándar (**Fig.24**) y la ecuación generada a partir de la regresión lineal. Con esto, se estableció que el FLAA es capaz de determinar la concentración de proteína en un rango aceptable que va del 80-110% (**Cuadro 5**) demostrando que los componentes de la saliva no interfieren significativamente con la capacidad de C7 y C9 para detectar y cuantificar la proteína S.

Cuadro 5. Determinación de la concentración de proteína S con el FLAA. DUS: donante único de saliva al 10%, DMS: donante múltiple de saliva al 10%.

Muestra	Cantidad añadida (nM)	Cantidad esperada (nM)	Cantidad calculada	Recuperación promedio (%)
DUS+ Proteína S	500	500	516 ± 24.2	103.27
DMS+ Proteína S	250	250	235 ± 27.9	94.3
DMS+ Proteína S	500	500	439 ± 13	87.8
DUS+ BSA	500	0	-7 ± 70	-

7.8 Evaluación del FLAA con muestras clínicas

Se evaluó el desempeño del FLAA con muestras clínicas. En colaboración con la Dra. Julia Toscano (Hospital Regional de Alta Especialidad de Ixtapaluca) se colectaron hisopados provenientes de pacientes con COVID-19 y se analizaron un total de 12 muestras negativas y 42 muestras positivas confirmadas por RT-qPCR. En la **Fig.27** (panel A) se presentan las muestras recolectadas y la intensidad de la fluorescencia que presentaron con el FLAA. Con estos datos se construyó una curva ROC con el fin

de determinar la capacidad discriminativa del aptasensor. La **Fig. 27** (panel B) muestra la curva ROC, la cual tiene valor de área bajo la curva de 0.79. Así mismo, se determinó la especificidad y sensibilidad con las siguientes formulas: sensibilidad = positivos verdaderos / (positivos verdaderos + falsos negativos) y especificidad = negativos verdaderos / (negativos verdaderos + falsos positivos) obteniendo un valor de 83% para la especificidad y 81% de sensibilidad respectivamente. Con estos resultados, nuestro sistema demostró ser capaz de reconocer las proteínas blanco se presentan en el virus en un ambiente complejo como las muestras clínicas.

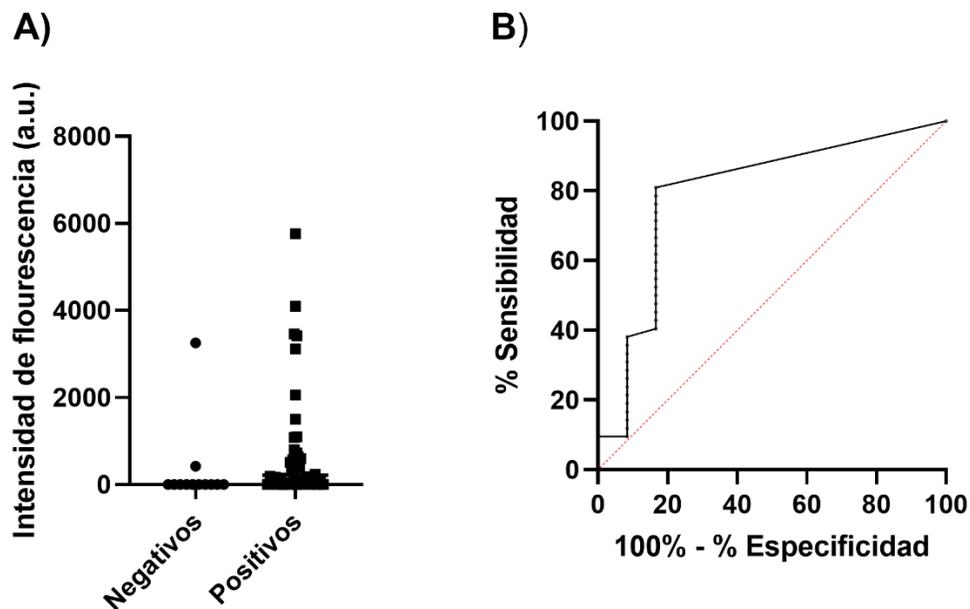


Figura 27. Detección de la proteína S en muestras clínicas con el FLAA. A) Intensidad de fluorescencia de las muestras evaluadas con FLAA y comparadas con RT-qPCR. B) Curva ROC determinada con las muestras anteriores.

8. DISCUSIÓN

Para la detección oportuna de una enfermedad es necesario detectar mínimas cantidades de moléculas o proteínas relacionadas con la infección (Lee, et al 2008). Por esto los sistemas de diagnóstico molecular con alto grado de especificidad y sensibilidad son esenciales (Charrel, et al 2017). De acuerdo con esto, la detección del analito blanco requiere un elemento de reconocimiento molecular selectivo. Debido a que los aptámeros de ácidos nucleicos tienen características únicas que les permiten adoptar diferentes estructuras y poseen ventajas prometedoras con respecto al uso de anticuerpos, se propuso la selección de aptámeros de ácidos nucleicos como elementos de reconocimiento molecular. En este sentido, se estableció la selección de aptámeros contra el dominio DIII de ZIKV y se logró establecer un FLAA para la detección de SARS-CoV-2 con aptámeros afines a la proteína S del virus.

La selección de aptámeros contra el dominio DIII de ZIKV se realizó mediante CE-SELEX, por la gran eficiencia de partición que posee (Uemachi et al, 2021). Dentro de los distintos tipos de SELEX o variantes que utilizan electroforesis capilar, el tamaño del blanco juega un papel importante para la elección de la variante a utilizar. NECEEM permite la generación de una ventana de colección adecuada conservando una eficiencia de partición mucho mayor que los métodos tradicionales debido a su alta eficacia y baja unión de fondo (Yu y Yu, 2014; Berezovski et al, 2006; Berezovski et al, 2005). El uso de esta variante de CE-SELEX asegura una ventana de colección suficiente cuando se busca recolectar complejos ADN-proteína de bajo peso molecular. Esto determina la preferencia de uso con respecto a otro tipo de métodos de electroforesis capilar en los que se emplea menores rondas de partición como por ejemplo *Ideal Filter Capillary Electrophoresis* (IFCE). Siendo las características de corrimiento de los complejos y la relación entre las moléculas afines y no afines que cada método es capaz de coleccionar la principal determinante de la elección del método (Le et al, 2022).

El número de ciclos empleados durante el SELEX contra DIII coincide con diversos reportes de algunos aptámeros que va de 3 a 5 rondas de selección (Xiao et al, 2021; Bowser y Yang, 2013; Krylova et al, 2011). Esto, sumado al incremento en la astringencia durante las rondas de selección causado por la disminución de la concentración de ADNcs y/o proteína permitió el enriquecimiento de secuencias afines. Posteriormente la determinación de las K_D s por interferometría en biocapa permitió confirmar el enriquecimiento de las secuencias afines. De manera interesante, la ronda 3 tuvo una afinidad mayor por el dominio DIII, presentando una K_D más baja que la ronda 5. Este fenómeno, donde el incremento del número de ciclos de selección no produce un incremento o se produce una disminución en la afinidad con su blanco también ha sido descrito previamente por distintos autores (Bowser y Jang, 2013; Jing y Bowser, 2013; Mendonsa y Bowser, 2004). Se han propuesto distintas explicaciones tales como la presencia de fondo de ADNcs del método empleado, el sesgo de la ADN polimerasa en su amplificación, mutaciones en las secuencias de los aptámeros recuperados, contaminación durante el proceso de selección o la disminución de cantidad de proteína hasta llegar a un límite donde concentraciones más bajas pueden ser perjudiciales (Zhu et al, 2019; Wang et al, 2012). A pesar de esto, la diferencia de afinidad entre las rondas 3 y 5 con respecto a la biblioteca inicial nos indica que el proceso SELEX empleado nos permitió la obtención de secuencias afines y las poblaciones obtenidas fueron evolucionando a lo largo de los ciclos de selección.

El enriquecimiento y la evaluación de las secuencias afines durante el SELEX se puede apreciar de una forma más detallada con el análisis de la secuenciación de las distintas rondas de selección. Estas fueron preparadas con distintos adaptadores que permitieron la identificación y análisis de secuencias únicas por cada ciclo. Como es de esperarse, conforme incrementan los ciclos de selección la cantidad de secuencias únicas disminuye. Esta disminución de la variabilidad se relaciona de manera inversa con el enriquecimiento. Tal y como se puede observar (**Fig. 13**) conforme los ciclos de selección incrementan la variabilidad disminuye mientras que el enriquecimiento incrementa hasta el ciclo 3. Esto demuestra que después de la ronda 3 no incremento la cantidad de secuencias enriquecidas y con ello tampoco la afinidad de la ronda 5.

La diferencia de afinidad entre la ronda 3 y 5 pudiera explicarse con la ligera disminución de secuencias únicas que ocurre mientras no incrementa la cantidad de secuencias enriquecidas (**Fig.13 panel B**). Esto, se podría traducirse como un incremento de secuencias no afines, quizá por el sesgo de la polimerasa, secuencias menos estructuradas o contaminación que ocurre al incrementar el número de ciclos hasta un punto donde ya no resulta mas beneficioso. Esto también se puede observar en la **figura 14**, donde observamos un mayor enriquecimiento de la R3 presentando un mayor número de secuencias enriquecidas en comparación a la R5. Por último, el análisis de motivos (**Fig. 15**) también soporta estos resultados, ya que la R3 tiene una mayor cantidad de motivos representados.

Después de seleccionar 11 candidatas pertenecientes a las secuencias más enriquecidas de la 3R y 5R y llevar a cabo los ensayos de unión, se caracterizó la interacción de Z10 y Z11 con el dominio DIII. Como se puede observar en la figura (x) se obtuvo una $K_D = 246.7 \pm 14$ nM y $K_D = 358 \pm 14$ nM para Z10 siendo esta última bastante similar a la afinidad determinada por la ronda 5. Estas K_D s calculadas y su diferencia con la afinidad de la 3R del SELEX nos da un indicio que quizá, sea necesario incluir otros parámetros durante los análisis bioinformáticos como estructura secundaria, estabilidad o algún otro criterio que nos permita seguir más de cerca la evolución de las poblaciones, secuencias y motivos con el fin de identificar a los aptámeros más afines. A pesar de esto, la selección de las secuencias candidatas fue exitosa contra el blanco propuesto.

La selección de los aptámeros utilizando SELEX dirigido a proteínas se ha empleado como estrategia para la selección de secuencias específicas contra diversos epítomos de una proteína en específico. Además, permite la utilización de una infinidad de métodos de partición que el SELEX convencional ofrece. Sin embargo, cuando la proteína blanco se encuentra en un estado modificado o el dominio de unión se encuentra enmascarado puede no llevarse a cabo su correcto reconocimiento (Tabaradz y Jafari, 2016). Esto se ha observado en algunos aptámeros seleccionados han fallado en reconocer a su blanco cuando este se encuentra embebido de células completas (Lui et al 2009; Chauveau et al, 2007). En otros casos las modificaciones postraduccionales

también juegan un papel importante. Se han descrito modificaciones postraduccionales distintas entre los sistemas de producción de la proteína blanco y las proteínas de superficie de las células ocasionaron que los epítomos fueran inaccesibles (Lakhin et al, 2013; Grabovenko et al, 2022). En este sentido, la falta de reconocimiento de Z10 y Z11 de unión contra la proteína de ZIKV que se demostró en los ensayos de unión indican que estas secuencias no son capaces de reconocer a la proteína nativa presente en el virus. A pesar de esto, todavía quedan secuencias restantes obtenidas del análisis bioinformático cuya interacción podrá ser evaluada.

La falta de reconocimiento de algunos aptámeros generados por el SELEX convencional hacia las proteínas blanco en condiciones nativas ha propiciado que se utilice una variante de SELEX denominada cell-SELEX que usa células completas como blanco para la selección de aptámeros (Ye et al, 2012). A pesar de esto, este tipo de SELEX presenta desventajas como la interferencia de componentes durante la selección, una larga duración de los ciclos de selección y el uso de contra selecciones poco eficientes (Bakhtiari et al, 2021). En este sentido, el uso de una variante de cell-SELEX que en nuestro caso usara los viriones completos para la selección de nuestros aptámeros no podría garantizarnos el éxito tomando en cuenta la duración, el número de ciclos y la baja eficiencia de partición inherente a este método.

Como perspectiva, se pueden evaluar las secuencias restantes obtenidas del análisis bioinformático o bien llevar a cabo un SELEX que utilice las primeras rondas de selección obtenidas por CE y se añadan unos subsecuentes ciclos de selección utilizando al virus. De esta manera aprovechamos la alta eficiencia de partición obtenida del CE-SELEX con las secuencias que se unen a DIII a su vez que se seleccionan aquellas que se encuentran de manera nativa en el virus. Esta combinación entre el SELEX dirigido a proteínas y cell-SELEX ya ha sido utilizada (Uemachi et al, 2021; Bakhtiari et al, 2021) por lo que su utilización podría incrementar la probabilidad de obtener aptámeros capaces de reconocer a los virus.

Las características unión de Z11 y Z10 por su blanco no permitieron continuar con la elaboración de un sensor basado en aptámeros, sin embargo, la selección de aptámeros de contra la proteína S del virus del SARS-COV-2 en nuestro grupo de trabajo cuyas

K_D s se encuentran dentro del rango nanomolar fueron puestas a prueba en un sistema de detección FLAA.

Los biosensores se pueden clasificar en ensayos competitivos y tipo sándwich dependiendo del número de elementos de reconocimiento molecular que usen (Chen et al, 2016). Para el presente trabajo se decidió poner a prueba un ensayo tipo sándwich debido a que se caracterizan por tener una alta especificidad y selectividad por el uso de un ERM como agente de captura y otro como agente de detección. Debido a que dos regiones distantes son necesarias para el mecanismo de reconocimiento dual, la generación de una señal fluorescente por la combinación de C7 como agente de captura y C9 como agente de detección nos indica que ambos poseen sitios de reconocimiento distinto.

En la **figura 25** se presenta un incremento en la intensidad de la fluorescencia únicamente cuando se utiliza la configuración de C7/C9 como agente de captura y detección. Este fenómeno podría deberse a la diferencia de afinidad que existe entre ellas, ya que C7 posee una K_D (89 nM) más pequeña que C9 (230 nM). Esto sugiere que en este sistema el agente de captura debe tener una mayor afinidad si se busca un límite de detección bajo. Esta falta en la intensidad de fluorescencia utilizando C9/C7 pudiera corroborarse añadiendo concentraciones mayores de C9; sin embargo, para fines prácticos se buscó que el sistema tuviera bajos límites de detección. Otra posible causa podría ser que la modificación química de C9 afecte su estructura y con ello la capacidad de unión, siendo C9 ($\Delta G = -7.4$ kcal/mol) más susceptible que C7 ($\Delta G = -8.9$ kcal/mol) al tener una estructura menos estable. Por otra parte, la falta de señal en los ensayos de especificidad indicó que el FLAA es altamente específico y selectivo incluso cuando se añaden proteínas virales como la proteína S de otro coronavirus. Dentro de la caracterización del FLAA también se evaluó la capacidad de detección de la proteína S por ensayos de *spike-and-recovery* con el objetivo de determinar si existe una diferencia en la respuesta del FLAA con el diluyente estándar y una matriz biológica. En este ensayo, el FLAA fue capaz de determinar la concentración de proteína en un rango aceptable (80-110%) (Walter et al, 2008) demostrando que los componentes de la saliva no interfieren con la capacidad de detección de C7 y C9. Con todo lo anterior,

se demostró que los aptámeros C7 y C9 poseen las características necesarias de ERM ya que se unen a la proteína S en diferentes epítomos con gran afinidad y especificidad bajo distintas condiciones. Así mismo el LOD determinado es comparable con otros aptasensores que se han descrito a la fecha y que utilizan a la proteína S, N o partículas virales e incluyen un rango bastante amplio de concentración que va de fM a nM (Huang et al, 2021; Li et al, 2021; Lewis et al, 2021; Tian et al, 2021; Tabrizi et al, 2021; Yang et al, 2021; Kacherovsky et al, 2021; Zakashansky et al, 2021; Liu et al, 2020).

Por lo anterior, se decidió evaluar el FLAA con muestras clínicas provenientes de pacientes con COVID-19. De manera convencional, un enfoque para la evaluación de ensayos diagnósticos usa la especificidad y sensibilidad en comparación con el estándar de oro como medida de precisión. En este sentido el uso de la curva ROC que se genera graficando la sensibilidad contra 1-especificidad nos ayuda a determinar qué tan bueno es el ensayo distinguiendo entre pacientes enfermos y pacientes sanos (Akobeng, 2007). El área bajo la curva nos resume que tan buena es la precisión de nuestro ensayo. En general un AUC de 0.5 sugiere que no existe discriminación entre estos grupos, de 0.7 a 0.8 se considera aceptable, de 0.8 a 0.9 se considera excelente y más de 0.9 se considera sobresaliente (Mandrekar, 2010). De acuerdo con esto, el AUC de 0.79 obtenido del análisis de las muestras clínicas nos permite concluir que el FLAA es un aptasensor aceptable para emplearse con muestras clínicas. Por último, se han realizado algunos análisis de las variantes presentes en las muestras clínicas utilizadas como ómicron y nuestro aptasensor ha sido capaz de la detección de estas. Estos resultados se encuentran en vías de publicación.

9. CONCLUSIONES

-Se logró la selección de los aptámeros Z10 y Z11 mediante CE-SELEX y NGS contra el dominio DIII, sin embargo, no pueden ser utilizados como elementos de reconocimiento molecular.

-Z11 y Z10 no son capaces de unirse a viriones infectivos de ZIKV.

-Los aptámeros C7 y C9 demostraron ser adecuados para la elaboración de un aptasensor tipo sándwich que permitió la detección de la proteína S.

-C7 y C9 presentan diferentes sitios de unión y una alta afinidad y especificidad hacia la proteína S en el FLAA.

-El aptasensor FLAA permite la detección de la proteína S en matrices biológicas y muestras clínicas.

10. PERSPECTIVAS

- Evaluar la unión de las 5 secuencias restantes obtenidas del análisis bioinformático en ensayos de unión con DIII y ZIKV.
- Evaluar la unión de Z10 y Z11 con proteínas recombinantes de otros flavivirus para determinar su afinidad y especificidad.
- Realizar un SELEX que utilice las primeras rondas de selección obtenidas por CE y se añadan ciclos subsecuentes utilizando al virus purificado.
- Incrementar la cantidad de muestras clínicas utilizadas en el FLAA y llevar a cabo un análisis donde se determinen las variantes de SARS-CoV-2 presentes en estas.
- Probar el aptasensor FLAA con nuevas variantes de SARS-CoV-2
- Incorporar a C7 y C9 en otros sistemas de detección.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agumadu, V. C., & Ramphul, K. (2018). Zika Virus: A Review of Literature. *Cureus*, 10(7), 1–5. <https://doi.org/10.7759/cureus.3025>.

Ahn, D. G., Jeon, I. J., Kim, J. D., Song, M. S., Han, S. R., Lee, S. W., Oh, J. W. (2009). RNA aptamer-based sensitive detection of SARS coronavirus nucleocapsid protein. *Analyst*, 134(9), 1896–1901. <https://doi.org/10.1039/b906788d>

Akobeng, A. K. (2007). Understanding diagnostic tests 3: Receiver operating characteristic curves. *Acta Paediatrica, Inte Journal of Paediatrics*, 96(5), 644–647. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2006.00178.x>

Ali, M. A., Hu, C., Jahan, S., Yuan, B., Saleh, M. S., Ju, E., Gao, S. J., & Panat, R. (2021). Sensing of COVID-19 Antibodies in Seconds via Aerosol Jet Nanoprinted Reduced-Graphene-Oxide-Coated 3D Electrodes. *Advanced Materials*, 33(7), 1–15. <https://doi.org/10.1002/adma.202006647>

Amouzadeh Tabrizi, M., Nazari, L., & Acedo, P. (2021). A photo-electrochemical aptasensor for the determination of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 receptor-binding domain by using graphitic carbon nitride-cadmium sulfide quantum dots nanocomposite. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 345(April), 130377. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.130377>

Azeredo EL, dos Santos FB, Barbosa LS, Souza TMA, Badolato-Corrêa J, Sánchez-Arcila JC, Nunes PCG, de-Oliveira-Pinto LM, de Filippis AM, Dal Fabbro M, Hoscher Romanholi I, Venancio da Cunha R (2018). Clinical and Laboratory Profile of Zika and Dengue Infected Patients: Lessons Learned From the Cocirculation of Dengue, Zika and Chikungunya in Brazil. *PLOS Currents Outbreaks*. Doi:10.1371/currents.outbreaks.0bf6aeb4d30824de63c4d5d745b217f5.

Bakhtiari, H., Palizban, A. A., Khanahmad, H., & Mofid, M. R. (2021). Novel Approach to Overcome Defects of Cell-SELEX in Developing Aptamers against Aspartate β -

Hydroxylase. ACS Omega, 6(16), 11005–11014.
<https://doi.org/10.1021/acsomega.1c00876>

Barrows, N. J., Campos, R. K., Liao, K. C., Prasanth, K. R., Soto-Acosta, R., Yeh, S. C., Garcia-Blanco, M. A. (2018). Biochemistry and Molecular Biology of Flaviviruses. *Chemical Reviews*, 118(8), 4448–4482. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00719>.

Beltrán-Silva, S. L., Chacón-Hernández, S. S., Moreno-Palacios, E., & Pereyra-Molina, J. Á. (2016). Clinical and differential diagnosis: Dengue, chikungunya and Zika. *Revista Médica Del Hospital General de México*, 81(3), 146–153. <https://doi.org/10.1016/j.hgmx.2016.09.011>.

Berezovski, M. V., Musheev, M. U., Drabovich, A. P., Jitkova, J. V., & Krylov, S. N. (2006). Non-SELEX: Selection of aptamers without intermediate amplification of candidate oligonucleotides. *Nature Protocols*, 1(3), 1359–1369. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.200>

Berezovski, M., Drabovich, A., Krylova, S. M., Musheev, M., Okhonin, V., Petrov, A., & Krylov, S. N. (2005). Nonequilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures: A universal tool for development of aptamers. *Journal of the American Chemical Society*, 127(9), 3165–3171. <https://doi.org/10.1021/ja042394q>

Blitvich, B. J., y Firth, A. E. (2017). A review of flaviviruses that have no known arthropod vector. *Viruses*, 9(6), 1–25. <https://doi.org/10.3390/v9060154>.

Bowser, M., & Yang, J. (2013). Capillary Electrophoresis-SELEX Selection of Catalytic DNA Aptamers for a Small-Molecule Porphyrin Target. *Analytical Chemistry*, 85, 1525–1530.

Brant, A. C., Tian, W., Majerciak, V., Yang, W., & Zheng, Z. M. (2021). SARS-CoV-2: from its discovery to genome structure, transcription, and replication. *Cell and Bioscience*, 11(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13578-021-00643-z>

Cao, C., Cai, Z., Xiao, X., Rao, J., Chen, J., Hu, N., Yang, M., Xing, X., Wang, Y., Li, M., Zhou, B., Wang, X., Wang, J., & Xue, Y. (2021). The architecture of the SARS-CoV-2

RNA genome inside virion. *Nature Communications*, 12(1), 1–14.
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-22785-x>

Carrillo-Hernández, M. Y., Ruiz-Saenz, J., Villamizar, L. J., Gómez-Rangel, S. Y., & Martínez-Gutierrez, M. (2018). Co-circulation and simultaneous co-infection of dengue, chikungunya, and zika viruses in patients with febrile syndrome at the Colombian-Venezuelan border. *BMC Infectious Diseases*, 18(1), 1–12.
<https://doi.org/10.1186/s12879-018-2976-1>.

Cerutti, F., Burdino, E., Milia, M. G., Alice, T., Gregori, G., Bruzzone, B., & Ghisetti, V. (2020). Urgent need of rapid tests for SARS CoV-2 antigen detection: Evaluation of the SD-Biosensor antigen test for SARS-CoV-2. *Journal of Clinical Virology*, 132(September), 104654. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104654>

Chauveau, F., Aissouni, Y., Hamm, J., Boutin, H., Libri, D., Ducongé, F., & Tavitian, B. (2007). Binding of an aptamer to the N-terminal fragment of VCAM-1. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 17(22), 6119–6122.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.09.046>

Chen, A., Yan, M., & Yang, S. (2016). Split aptamers and their applications in sandwich aptasensors. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 80, 581–593.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.04.006>

Chen, X., Pan, Z., Yue, S., Yu, F., Zhang, J., Yang, Y., Li, R., Liu, B., Yang, X., Gao, L., Li, Z., Lin, Y., Huang, Q., Xu, L., Tang, J., Hu, L., Zhao, J., Liu, P., Zhang, G., ... Ye, L. (2020). Disease severity dictates SARS-CoV-2-specific neutralizing antibody responses in COVID-19. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1).
<https://doi.org/10.1038/s41392-020-00301-9>

Chen, Y., Liu, Q., & Guo, D. (2020). Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *Journal of Medical Virology*, 92(4), 418–423.
<https://doi.org/10.1002/jmv.25681>

Choe, P. G., Kang, C. K., Suh, H. J., Jung, J., Song, K.-H., Bang, J. H., Kim, E. S., Kim, H. Bin, Park, S. W., Kim, N. J., Park, W. B., & Oh, M. (2021). Waning Antibody Responses

in Asymptomatic and Symptomatic SARS-CoV-2 Infection - Volume 27, Number 1—
January 2021 - Emerging Infectious Diseases Journal - CDC. Emerging Infectious
Diseases, 27(1), 327–329. https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/27/1/20-3515_article%0Ahttps://wwwnc.cdc.gov/eid/article/27/1/20-3515_article.htm

Choi, Y. K. (2021). Emerging and re-emerging fatal viral diseases. *Experimental and Molecular Medicine*, 53(5), 711–712. <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00608-9>.

Darmostuk, M., Rimpelova, S., Gbelcova, H., & Ruml, T. (2014). Current approaches in SELEX: An update to aptamer selection technology. *Biotechnology Advances*, 33(6), 1141–1161. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.008>

Dembowski, S. K., & Bowser, M. T. (2018). Microfluidic methods for aptamer selection and characterization. *Analyst*, 143(1), 21–32. <https://doi.org/10.1039/c7an01046j>.

Division of Vector-Borne Diseases. (2014). Revised diagnostic testing for Zika, chikungunya, and dengue viruses in US Public Health Laboratories. *CDC*, (1), 1–5.

Dunn, M. R., Jimenez, R. M., & Chaput, J. C. (2017) - Analysis of aptamer discovery and technology (1) *Nature Reviews Chemistry*. <https://doi.org/10.1038/s41570017-0076>

Eissa, S., & Zourob, M. (2021). Development of a low-cost cotton-tipped electrochemical immunosensor for the detection of SARS-CoV-2. *Analytical Chemistry*, 93(3), 1826–1833. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c04719>

Elledge, S. K., Zhou, X. X., Byrnes, J. R., Martinko, A. J., Lui, I., Pance, K., Lim, S. A., Glasgow, J. E., Glasgow, A. A., Turcios, K., Iyer, N. S., Torres, L., Peluso, M. J., Henrich, T. J., Wang, T. T., Tato, C. M., Leung, K. K., Greenhouse, B., & Wells, J. A. (2021). Engineering luminescent biosensors for point-of-care SARS-CoV-2 antibody detection. *Nature Biotechnology*, 39(8), 928–935. <https://doi.org/10.1038/s41587-021-00878-8>

European Centre for Disease Prevention and Control & World Health Organization. Regional Office for Europe. (2021). Methods for the detection and identification of SARS-CoV-2 variants, March 2021. World Health Organization. Regional Office for Europe. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/340067>.

Famulok, M., y Mayer, G. (2014). Aptamers and SELEX in chemistry & biology. *Chemistry and Biology*, 21(9), 1055–1058. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2014.08.003>

Fritzell, C., Rousset, D., Adde, A., Kazanji, M., Van Kerkhove, M. D., & Flamand, C. (2018). Current challenges and implications for dengue, chikungunya and Zika seroprevalence studies worldwide: A scoping review. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(7), 1–29. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006533>.

García, L. L., Padilla, L., Castaño, J. C. (2017). Inhibitors compounds of the flavivirus replication process. *Virology Journal*, 14(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0761-1>.

González, V. M., Elena Martín, M., Fernández, G., & García-Sacristán, A. (2016). Use of aptamers as diagnostics tools and antiviral agents for human viruses. *Pharmaceuticals*, 9(4), 1–34. <https://doi.org/10.3390/ph9040078>

Gould, E., Pettersson, J., Higgs, S., Charrel, R., & de Lamballerie, X. (2017). Emerging arboviruses: Why today? *One Health*, 4(June), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2017.06.001>.

Grabovenko, F., Nikiforova, L., Yanenko, B., Ulitin, A., Loktyushov, E., Zatsepin, T., Zavyalova, E., & Zvereva, M. (2022). Glycosylation of Receptor Binding Domain of SARS-CoV-2 S-Protein Influences on Binding to Immobilized DNA Aptamers. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1). <https://doi.org/10.3390/ijms23010557>

Hafner, M., Vianini, E., Albertoni, B., Marchetti, L., Grüne, I., Gloeckner, C., & Famulok, M. (2008). Displacement of protein-bound aptamers with small molecules screened by fluorescence polarization. *Nature Protocols*, 3(4), 579–587. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.15>.

Hardenbrook, N. J., & Zhang, P. (2022). A structural view of the SARS-CoV-2 virus and its assembly. *Current Opinion in Virology*, 52, 123–134. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.11.011>

Heinz, F. X., & Stiasny, K. (2017). The Antigenic Structure of Zika Virus and Its Relation to Other Flaviviruses: Implications for Infection and Immunoprophylaxis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 81(1), e00055-16. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00055-16>.

Howard, C. R., & Fletcher, N. F. (2012). Emerging virus diseases: Can we ever expect the unexpected? *Emerging Microbes and Infections*, 1(November), 1–11. <https://doi.org/10.1038/emi.2012.47>.

Hu, B., Guo, H., Zhou, P., & Shi, Z. L. (2021). Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology*, 19(3), 141–154. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>

Huang, G., Zhao, H., Li, P., Liu, J., Chen, S., Ge, M., Qin, M., Zhou, G., Wang, Y., Li, S., Cheng, Y., Huang, Q., Wang, J., Wang, H., & Yang, L. (2021). Construction of Optimal SERS Hotspots Based on Capturing the Spike Receptor-Binding Domain (RBD) of SARS-CoV-2 for Highly Sensitive and Specific Detection by a Fish Model. *Analytical Chemistry*, 93(48), 16086–16095. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c03807>

Jensen, S. M., Nguyen, C. T., & Jewett, J. C. (2016). A gradient-free method for the purification of infective dengue virus for protein-level investigations. *Journal of Virological Methods*, 235, 125–130. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.05.017>

Jing, M., & Bowser, M. T. (2013). Tracking the emergence of high affinity aptamers for rhVEGF165 during capillary electrophoresis-systematic evolution of ligands by exponential enrichment using high throughput sequencing. *Analytical Chemistry*, 85(22), 10761–10770. <https://doi.org/10.1021/ac401875h>

Johnson, B. W., Russell, B. J., & Goodman, C. H. (2017). Laboratory Diagnosis of Chikungunya Virus Infections and Commercial Sources for Diagnostic Assays, *J Infect Dis*. 2016 December 15; 214: doi:10.1093/infdis/jiw274.

Kacherovsky, N., Yang, L. F., Dang, H. V., Cheng, E. L., Cardle, I. I., Walls, A. C., McCallum, M., Sellers, D. L., DiMaio, F., Salipante, S. J., Corti, D., Veessler, D., & Pun, S. H. (2021). Discovery and Characterization of Spike N-Terminal Domain-Binding

Aptamers for Rapid SARS-CoV-2 Detection. *Angewandte Chemie – International Edition*, 60(39), 21211–21215. <https://doi.org/10.1002/anie.202107730>

Kevadiya, B. D., Machhi, J., Herskovitz, J., Oleynikov, M. D., Blomberg, W. R., Bajwa, N., Soni, D., Das, S., Hasan, M., Patel, M., Senan, A. M., Gorantla, S., McMillan, J. E., Edagwa, B., Eisenberg, R., Gurusurthy, C. B., Reid, S. P. M., Punyadeera, C., Chang, L., & Gendelman, H. E. (2021). Diagnostics for SARS-CoV-2 infections. *Nature Materials*, 20(5), 593–605. <https://doi.org/10.1038/s41563-020-00906-z>

Kim, T. H., & Lee, S. W. (2021). Aptamers for anti-viral therapeutics and diagnostics. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8), 1–41. <https://doi.org/10.3390/ijms22084168>

Krylova, S. M., Karkhanina, A. A., Musheev, M. U., Bagg, E. A. L., Schofield, C. J., & Krylov, S. N. (2011). DNA aptamers for as analytical tools for the quantitative analysis of DNA-dealkylating enzymes. *Analytical Biochemistry*, 414(2), 261–265. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.03.010>

Kulabhusan, P. K., Hussain, B., & Yüce, M. (2020). Current perspectives on aptamers as diagnostic tools and therapeutic agents. *Pharmaceutics*, 12(7), 1–23. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12070646>

Kwon, J. S., Kim, J. Y., Kim, M. C., Park, S. Y., Kim, B. N., Bae, S., Cha, H. H., Jung, J., Kim, M. J., Jin, M. L., Choi, S. H., Chung, J. W., Shin, E. C., & Kim, S. H. (2020). Factors of severity in patients with COVID-19: Cytokine/Chemokine concentrations, viral load, and antibody responses. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 103(6), 2412–2418. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.20-1110>

Lakhin, A. V., Tarantul, V. Z., & Gening, L. V. (2013). Aptamers: Problems, solutions and prospects. *Acta Naturae*, 5(19), 34–43. <https://doi.org/10.32607/20758251-2013-5-4-34-43>

Lam SK, Lan Ew C, Mitchell JL, Cuzzubbo AJ, Devine PL. Evaluation of a capture screening enzyme-linked immunosorbent assay for combined determination of

immunoglobulin M and G antibodies produced during dengue infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000; 7:850–2.

Lamers, M. M., & Haagmans, B. L. (2022). SARS-CoV-2 pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 20(5), 270–284. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00713-0>

Landry, M. L., y St George, K. (2017). Laboratory diagnosis of zika virus infection. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 141(1), 60–67. <https://doi.org/10.5858/arpa.2016-0406-SA>.

Le, A. T. H., Wang, T. Y., Krylova, S. M., Beloborodov, S. S., & Krylov, S. N. (2022). Quantitative Characterization of Partitioning in Selection of DNA Aptamers for Protein Targets by Capillary Electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 94(5), 2578–2588. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c04560>

Lee M., Walt D.R (2000). A fiber-optic microarray biosensor using aptamers as receptors. *Anal. Biochem*, 282,142–146.

Lee, K. H., y Zeng, H. (2017). Aptamer-Based ELISA Assay for Highly Specific and Sensitive Detection of Zika NS1 Protein. *Analytical Chemistry*, 89(23), 12743–12748. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b02862>

Leija-montoya, A. G., Benitez-Hess, L., Toscano-Garibay JD., Alvarez-Salas LM. (2014). Characterization of an RNA Aptamer Against HPV-16 L1 Virus-Like Particles, 24(5), 344–355. <https://doi.org/10.1089/nat.2013.0469>

Leonhard, S. E., Mandarakas, M. R., Gondim, F. A. A., Bateman, K., Ferreira, M. L. B., Cornblath, D. R., van Doorn, P. A., Dourado, M. E., Hughes, R. A. C., Islam, B., Kusunoki, S., Pardo, C. A., Reisin, R., Sejvar, J. J., Shahrizaila, N., Soares, C., Umapathi, T., Wang, Y., Yiu, E. M., ... Jacobs, B. C. (2019). Diagnosis and management of Guillain–Barré syndrome in ten steps. *Nature Reviews Neurology*, 15(11), 671–683. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0250-9>

Lewis, Tyra & Giroux, Erin & Jovic, Marko & Martić, Sanela. (2021). Localized Surface Plasmon Resonance Aptasensor for Selective Detection of SARS-CoV-2 S1 Protein. *The Analyst*. 146. 10.1039/D1AN01458G.

Li, J., Zhang, Z., Gu, J., Stacey, H. D., Ang, J. C., Capretta, A., Filipe, C. D. M., Mossman, K. L., Balion, C., Salena, B. J., Yamamura, D., Soleymani, L., Miller, M. S., Brennan, J. D., & Li, Y. (2021). Diverse high-affinity DNA aptamers for wild-type and B.1.1.7 SARS-CoV-2 spike proteins from a pre-structured DNA library. *Nucleic Acids Research*, 49(13), 7267–7279. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab574>

Liu, L. E., Dehning, M., Phipps, A., Swinton, R. E., Harris, C. A., & Klein, K. R. (2017). Clinical Update on Dengue, Chikungunya, and Zika: What We Know at the Time of Article Submission. *Disaster Medicine and Public Health Preparedness*, 11(3), 290–299. <https://doi.org/10.1017/dmp.2016.144>.

Liu, R., He, L., Hu, Y., Luo, Z., & Zhang, J. (2020). A serological aptamer-assisted proximity ligation assay for COVID-19 diagnosis and seeking neutralizing aptamers. *Chemical Science*, 11(44), 12157–12164. <https://doi.org/10.1039/d0sc03920a>

Liu, Y., Kuan, C. T., Mi, J., Zhang, X., Clary, B. M., Bigner, D. D., & Sullenger, B. A. (2009). Aptamers selected against the unglycosylated EGFRvIII ectodomain and delivered intracellularly reduce membrane-bound EGFRvIII and induce apoptosis. *Biological Chemistry*, 390(2), 137–144. <https://doi.org/10.1515/BC.2009.022>

Mandrekar, J. N. (2010). Receiver operating characteristic curve in diagnostic test assessment. *Journal of Thoracic Oncology*, 5(9), 1315–1316. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e3181ec173d>

Mariano, G., Farthing, R. J., Lale-Farjat, S. L. M., & Bergeron, J. R. C. (2020). Structural Characterization of SARS-CoV-2: Where We Are, and Where We Need to Be. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7(December). <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.605236>

Marklund, E., Leach, S., Axelsson, H., Nystrom, K., Norder, H., Bemark, M., Angeletti, D., Lundgren, A., Nilsson, S., Andersson, L. M., Yilmaz, A., Lindh, M., Liljeqvist, J., & Gisslen, M. (2020). Serum-IgG responses to SARS-CoV-2 after mild and severe COVID-

19 infection and analysis of IgG non-responders. *PLoS ONE*, 15(10 October), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241104>

Martínez-Roque, M. A., Franco-Urquijo, P. A., García-Velásquez, V. M., Choukeife, M., Mayer, G., Molina-Ramírez, S. R., Figueroa-Miranda, G., Mayer, D., & Alvarez-Salas, L. M. (2022). DNA aptamer selection for SARS-CoV-2 spike glycoprotein detection. *Analytical Biochemistry*, 645. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2022.114633>

McKeague, M., McConnell, E. M., Cruz-Toledo, J., Bernard, E. D., Pach, A., Mastronardi, E. DeRosa, M. C. (2015). Analysis of In Vitro Aptamer Selection Parameters. *Journal of Molecular Evolution*, 81(5–6), 150–161.

Medigeshi, G. R. (2011). Mosquito-borne flaviviruses: Overview of viral life-cycle and host-virus interactions. *Future Virology*, 6(9), 1075–1089. <https://doi.org/10.2217/fvl.11.85>.

Mehlhorn, A., Rahimi, P., y Joseph, Y. (2018). Aptamer-Based Biosensors for Antibiotic Detection: A Review. *Biosensors*, 8(2), 54. <https://doi.org/10.3390/bios8020054>

Mendonsa, S. D., & Bowser, M. T. (2004). In vitro selection of high-affinity DNA ligands for human IgE using capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 76(18), 5387–5392. <https://doi.org/10.1021/ac049857v>

Meng, Z., Guo, S., Zhou, Y., Li, M., Wang, M., & Ying, B. (2021). Applications of laboratory findings in the prevention, diagnosis, treatment, and monitoring of COVID-19. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 1–26. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00731-z>

Mercer, T. R., & Salit, M. (2021). Testing at scale during the COVID-19 pandemic. *Nature Reviews Genetics*, 22(7), 415–426. <https://doi.org/10.1038/s41576-021-00360-w>

Mollarasouli, F., Zare-Shehneh, N., & Ghaedi, M. (2022). A review on corona virus disease 2019 (COVID-19): current progress, clinical features and bioanalytical diagnostic methods. *Microchimica Acta*, 189(3). <https://doi.org/10.1007/s00604-022-05167-y>

Muller, D. A., Depelsenair, A. C. I., Young, P. R. (2017). Clinical and laboratory diagnosis of dengue virus infection. *Journal of Infectious Diseases*, 215(Suppl 2), S89–S95. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw649>.

Muller, D. A., Depelsenair, A. C. I., Young, P. R. (2017). Clinical and laboratory diagnosis of dengue virus infection. *Journal of Infectious Diseases*, 215(Suppl 2), S89–S95. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw649>.

Muslum I, and Nilsen-Hamilton M (2016) Aptamers in analytics. *Analyst* 141 (5), 1551-1568. <https://doi.org/10.1039/c5an01824b>.

Naqvi, A. A. T., Fatima, K., Mohammad, T., Fatima, U., Singh, I. K., Singh, A., Atif, S. M., Hariprasad, G., Hasan, G. M., & Hassan, M. I. (2020). Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1866(10), 165878. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165878>

Nguyen, V. T., Seo, H. Bin, Kim, B. C., Kim, S. K., Song, C. S., & Gu, M. B. (2016). Highly sensitive sandwich-type SPR based detection of whole H5Nx viruses using a pair of aptamers. *Biosensors and Bioelectronics*, 86, 293–300. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.06.064>

Okuneye, K. O., Velazco-Hernandez, J. X., & Gumel, A. B. (2017). the “Unholy” Chikungunya–Dengue–Zika Trinity: a Theoretical Analysis. *Journal of Biological Systems*, 25(04), 545–585.

Pan American Health Organization (PAHO). (2017). Tool for the diagnosis and care of patients with suspected arboviral diseases. Pan American Health Organization.

Park, J. H., Jee, M. H., Kwon, O. S., Keum, S. J., Jang, S. K. (2013). Infectivity of hepatitis C virus correlates with the amount of envelope protein E2: Development of a new aptamer-based assay system suitable for measuring the infectious titer of HCV. *Virology*, 439(1), 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.01.014>

Plourde, A. R., & Bloch, E. M. (2016). A Literature Review of Zika Virus, 22(7), 1185–1192. <https://doi.org/10.3201/eid2207.151990>.

Rastogi, M., Sharma, N., Singh, S. K. (2016). Flavivirus NS1: A multifaceted enigmatic viral protein. *Virology Journal*, 13(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0590-7>.

Röthlisberger, P., Gasse, C., Hollenstein, M. (2017). Nucleic acid aptamers: Emerging applications in medical imaging, nanotechnology, neurosciences, and drug delivery. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(11).

Sánchez-Báscones, E., Parra, F., & Lobo-Castañón, M. J. (2021). Aptamers against viruses: Selection strategies and bioanalytical applications. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 143. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116349>

Schoeman, D., Fielding, B. C., Arias-Reyes, C., Zubieta-DeUrioste, N., Poma-Machicao, L., Aliaga-Raudan, F., Carvajal-Rodriguez, F., Dutschmann, M., Schneider-Gasser, E. M., Zubieta-Calleja, G., Soliz, J., Schneider-Gasser, E. M., Zubieta-Calleja Director High, G., Loeffelholz, M. J., Tang, Y. W., Velavan, T. P., Meyer, C. G., Taylor, D., Lindsay, A.

Schoeman, D., Fielding, B. C., Arias-Reyes, C., Zubieta-DeUrioste, N., Poma-Machicao, L., Aliaga-Raudan, F., Carvajal-Rodriguez, F., Dutschmann, M., Schneider-Gasser, E. M., Zubieta-Calleja, G., Soliz, J., Schneider-Gasser, E. M., Zubieta-Calleja Director High, G., Loeffelholz, M. J., Tang, Y. W., Velavan, T. P., Meyer, C. G., Taylor, D., Lindsay, A. C., ... Sankar, G. (2020). Protein Antigen. *Journal of Visualized Experiments*, 8(4), 1–6. <http://dx.doi.org/10.1088/2043>.

Schwartz E, Mileguir F, Grossman Z, Mendelson E. Evaluation of ELISA-based sero-diagnosis of dengue fever in travelers. *J Clin Virol* 2000; 19:169–73.

Sevvana, M., Long, F., Miller, A. S., Klose, T., Buda, G., Sun, L., Rossmann, M. G. (2018). Refinement and Analysis of the Mature Zika Virus Cryo-EM Structure at 3.1 Å Resolution. *Structure*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.str.2018.05.006>.

Shi, Y., y Gao, G. F. (2017). Structural Biology of the Zika Virus. *Trends in Biochemical Sciences*, 42(6), 443–456. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.02.009>.

Shiratori, I., Akitomi, J., Boltz, D. A., Horii, K., Furuichi, M., & Waga, I. (2014). Selection of DNA aptamers that bind to influenza A viruses with high affinity and broad subtype specificity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 443(1), 37–41. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.11.041>

Song, K. M., Lee, S., & Ban, C. (2012). Aptamers and their biological applications. *Sensors*, 12(1), 612–631.

Song, S., Wang, L., Li, J., Fan, C., Zhao, J. (2008). Aptamer-based biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 27, 108-117. <https://doi:10.1016/j.trac.2007.12.004>

Stoltenburg, R., Reinemann, C., & Strehlitz, B. (2005). FluMag-SELEX as an advantageous method for DNA aptamer selection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 383(1), 83–91. <https://doi.org/10.1007/s00216-005-3388-9>.

Stoltenburg, R., Reinemann, C., & Strehlitz, B. (2007). SELEX-A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomolecular Engineering*, 24(4), 381–403. <https://doi.org/10.1016/j.bioeng.2007.06.001>.

Stoltenburg, R., y Strehlitz, B. (2018). Refining the results of a classical SELEX experiment by expanding the sequence data set of an aptamer pool selected for protein A. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2). <https://doi.org/10.3390/ijms19020642>

Sultana, A., & Lee, J. E. (2015). Measuring protein-protein and protein-nucleic acid interactions by biolayer interferometry. *Current Protocols in Protein Science*, 2015, 19.25.1-19.25.26. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps1925s79>

Sun, H., & Zu, Y. (2015). A Highlight of recent advances in aptamer technology and its application. *Molecules*, 20(7), 11959–11980. <https://doi.org/10.3390/molecules200711959>

Tabarzad, M., & Jafari, M. (2016). Trends in the Design and Development of Specific Aptamers Against Peptides and Proteins. *Protein Journal*, 35(2), 81–99. <https://doi.org/10.1007/s10930-016-9653-2>

Tian, J., Liang, Z., Hu, O., He, Q., Sun, D., & Chen, Z. (2021). An electrochemical dual-aptamer biosensor based on metal-organic frameworks MIL-53 decorated with Au@Pt nanoparticles and enzymes for detection of COVID-19 nucleocapsid protein. *Electrochimica Acta*, 387. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2021.138553>

Toh, S. Y., Citartan, M., Gopinath, S. C. B., Tang, T. H. (2014). Aptamers as a replacement for antibodies in enzyme-linked immunosorbent assay. *Biosensors and Bioelectronics*, 64, 392–403. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.09.026>

Tolle, F., y Mayer, G. (2013). Dressed for success-applying chemistry to modulate aptamer functionality. *Chemical Science*, 4(1), 60–67. <https://doi.org/10.1039/c2sc21510a>

Trovato, M., Sartorius, R., D'Apice, L., Manco, R., & De Berardinis, P. (2020). Viral Emerging Diseases: Challenges in Developing Vaccination Strategies. *Frontiers in Immunology*, 11(September), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02130>.

Uemachi, H., Kasahara, Y., Tanaka, K., Okuda, T., Yoneda, Y., & Obika, S. (2021). Hybrid-type selex for the selection of artificial nucleic acid aptamers exhibiting cell internalization activity. *Pharmaceutics*, 13(6), 1–16. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13060888>

Walter, J. G., Kökpinar, Ö., Friehs, K., Stahl, F., & Scheper, T. (2008). Systematic investigation of optimal aptamer immobilization for protein-microarray applications. *Analytical Chemistry*, 80(19), 7372–7378. <https://doi.org/10.1021/ac801081v>

Wandtke, T., Woźniak, J., Kopiński, P. (2015). Aptamers in diagnostics and treatment of viral infections. *Viruses*, 7(2), 751–780. <https://doi.org/10.3390/v7020751>.

Wang, A. Z., t Farokhzad, O. C. (2014). Current Progress of Aptamer-Based Molecular Imaging. *Journal of Nuclear Medicine*, 55(3), 353–356.

Wang, C., Wang, Z., Wang, G., Lau, J. Y. N., Zhang, K., & Li, W. (2021). COVID-19 in early 2021: current status and looking forward. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00527-1>

Wang, J., Rudzinski, J. F., Gong, Q., Soh, H. T., & Atzberger, P. J. (2012). Influence of Target Concentration and Background Binding on In Vitro Selection of Affinity Reagents. *PLoS ONE*, 7(8), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043940>

Wang, M. Y., Zhao, R., Gao, L. J., Gao, X. F., Wang, D. P., & Cao, J. M. (2020). SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10(November), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.587269>

Weaver, S. C., Charlier, C., Nikos, V., & Lecuit, M. (2018). Viral, Other Emerging Vector-borne. *Annu Rev Med.*, 69, 395–408. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-050715-105122.Zika>.

Wen, D., Li, S., Dong, F., Zhang, Y., Lin, Y., Wang, J., Zheng, A. (2018). N-glycosylation of viral e protein is the determinant for vector midgut invasion by flaviviruses. *MBio*, 9(1), 1–14. <https://doi.org/10.1128/mBio.00046-18>.

Wu, C. rong, Yin, W. chao, Jiang, Y., & Xu, H. E. (2022). Structure genomics of SARS-CoV-2 and its Omicron variant: drug design templates for COVID-19. *Acta Pharmacologica Sinica*, December 2021, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41401-021-00851-w>

Xiao, X., Li, H., Zhao, L., Zhang, Y., & Liu, Z. (2021). Oligonucleotide aptamers: Recent advances in their screening, molecular conformation and therapeutic applications. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 143(September), 112232. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112232>

Yakoh, A., Pimpitak, U., Rengpipat, S., Hirankarn, N., Chailapakul, O., & Chaiyo, S. (2021). Paper-based electrochemical biosensor for diagnosing COVID-19: Detection of SARS-CoV-2 antibodies and antigen. *Biosensors and Bioelectronics*, 176(December 2020), 112912. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112912>

Yang, G., Li, Z., Mohammed, I., Zhao, L., Wei, W., Xiao, H., Guo, W., Zhao, Y., Qu, F., & Huang, Y. (2021). Identification of SARS-CoV-2-against aptamer with high

neutralization activity by blocking the RBD domain of spike protein 1. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00649-6>

Yap, S. S. L., Nguyen-Khuong, T., Rudd, P. M., Alonso, S. (2017). Dengue virus glycosylation: What do we know? *Frontiers in Microbiology*, 8(JUL), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01415>.

Ye, M., Hu, J., Peng, M., Liu, J., Liu, J., Liu, H., Zhao, X., & Tan, W. (2012). Generating aptamers by cell-SELEX for applications in molecular medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(3), 3341–3353. <https://doi.org/10.3390/ijms13033341>

Yu, X., & Yu, Y. (2014). A mathematical analysis of the selective enrichment of NECEEM-based non-SELEX. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 173(8), 2019–2027. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0989-9>

Yüce, M., Kurt, H., Hussain, B., & Budak, H. (2018). Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment for Aptamer Selection. *Biomedical Applications of Functionalized Nanomaterials*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-50878>.

Zakashansky, J. A., Imamura, A. H., Salgado, D. F., Romero Mercieca, H. C., Aguas, R. F. L., Lao, A. M., Pariser, J., Arroyo-Currás, N., & Khine, M. (2021). Detection of the SARS-CoV-2 spike protein in saliva with Shrinky-Dink© electrodes. *Analytical Methods*, 13(7), 874–883. <https://doi.org/10.1039/d1ay00041a>

Zanotto, P. M. de A., Leite, L. C. de C. (2018). The Challenges Imposed by Dengue, Zika, and Chikungunya to Brazil. *Frontiers in Immunology*, 9(August), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01964>.

Zhang, W., Liu, Q. X., Guo, Z. H., Lin, J. S. (2018). Practical application of aptamer-based biosensors in detection of low molecular weight pollutants in water sources. *Molecules*, 23(2), 12–16. <https://doi.org/10.3390/molecules23020344>

Zhang, X., Ge, P., Yu, X., Brannan, J. M., Bi, G., Zhang, Q., Hong Zhou, Z. (2013). Cryo-EM structure of the mature dengue virus at 3.5-Å resolution. *Nature Structural and Molecular Biology*, 20(1), 105–110. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2463>.

Zhao W., Chiuman W., Brook M.A., Li Y. (2007). Simple and rapid colorimetric biosensors based on DNA aptamer and non-crosslinking gold nanoparticle aggregation. *ChemBioChem*, 8, 727–731

Zhao, H., Liu, F., Xie, W., Zhou, T. C., OuYang, J., Jin, L., Li, H., Zhao, C. Y., Zhang, L., Wei, J., Zhang, Y. P., & Li, C. P. (2021). Ultrasensitive supersandwich-type electrochemical sensor for SARS-CoV-2 from the infected COVID-19 patients using a smartphone. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 327(July 2020), 128899. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128899>

Zhou, J., & Rossi, J. (2017). Aptamers as targeted therapeutics: Current potential and challenges. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(3), 181–202. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.199>

Zhou, W., Jimmy Huang, P. J., Ding, J., Liu, J. (2014). Aptamer-based biosensors for biomedical diagnostics. *Analyst*, 139(11), 2627–2640. <https://doi.org/10.1039/c4an00132j>

Zhu, C., Yang, G., Ghulam, M., Li, L., & Qu, F. (2019). Evolution of multi-functional capillary electrophoresis for high-efficiency selection of aptamers. *Biotechnology Advances*, 37(8), 107432. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107432>

Zhuo, Z., Yu, Y., Wang, M., Li, J., Zhang, Z., Liu, J., Zhang, B. (2017). Recent advances in SELEX technology and aptamer applications in biomedicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(10), 1–19.

11. ANEXOS



DNA aptamer selection for SARS-CoV-2 spike glycoprotein detection

Mateo Alejandro Martínez-Roque^{a,1}, Pablo Alberto Franco-Urquijo^{a,1},
 Víctor Miguel García-Velásquez^{a,1}, Moujab Choukeife^b, Günther Mayer^b,
 Sergio Roberto Molina-Ramírez^c, Gabriela Figueroa-Miranda^c, Dirk Mayer^c,
 Luis M. Alvarez-Salas^{a,*}

^a Laboratorio de Terapia Génica, Departamento de Genética y Biología Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N., CDMX, 07360, Mexico

^b Life and Medical Sciences (LIMES) Institute, University of Bonn, 53121, Bonn, Germany

^c Institute of Biological Information Processing, Bioelectronics (IBI-3), Forschungszentrum Jülich GmbH, 52428, Jülich, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:

Aptamers
 SELEX
 SARS-CoV-2
 COVID-19
 Aptasensor
 Capillary electrophoresis

ABSTRACT

The rapid spread of SARS-CoV-2 infection throughout the world led to a global public health and economic crisis triggering an urgent need for the development of low-cost vaccines, therapies and high-throughput detection assays. In this work, we used a combination of Ideal-Filter Capillary Electrophoresis SELEX (IFCE-SELEX), Next Generation Sequencing (NGS) and binding assays to isolate and validate single-stranded DNA aptamers that can specifically recognize the SARS-CoV-2 Spike glycoprotein. Two selected non-competing DNA aptamers, C7 and C9 were successfully used as sensitive and specific biological recognition elements for the development of electrochemical and fluorescent aptasensors for the SARS-CoV-2 Spike glycoprotein with detection limits of 0.07 fM and 41.87 nM, respectively.

1. Introduction

Over two years have passed since the initial outbreak of a new Coronavirus disease (COVID-19). The original report to the World Health Organization (WHO), anticipated that COVID-19 would present a challenge for the public health systems across the world due to the rapid spread of the disease [1]. To date, over 323 million confirmed COVID-19 cases have been reported worldwide leading to the death of more than 5.5 million people by the severe acute respiratory syndrome associated with COVID-19 [2,3]. Although vaccines are already available in several countries, COVID-19 remains a major public health concern due to the uprising of SARS-CoV-2 variants and the lack of epidemiological surveillance and vaccination programs in impoverished countries [4].

The etiological agent for COVID-19 is the new coronavirus SARS-CoV-2, a single-stranded positive sense RNA (+ssRNA) enveloped virus with a genome of approximately 30 Kb encoding four structural proteins: Spike (S), membrane (M), envelope (E) and nucleocapsid (N) [5]. The trimeric S protein is recognized as the main virulence factor [6,7]. This is a type I transmembrane protein consisting of a large ecto-domain, a single-pass transmembrane anchor and a short C-terminal

intracellular tail [8]. The role of the S protein is crucial for viral adherence and entry to the host cell, where the receptor binding domain (RBD) within S protein mediates the interaction with the angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) attached to the cell membrane [9]. In addition, the S protein appears highly immunogenic, making it a suitable candidate for vaccine development and theranostic applications [10–13].

Quantitative RT-PCR (RT-qPCR) or serological SARS-CoV-2 tests have become the standard COVID-19 diagnostic methods, however, they are costly, time-consuming and require specialized equipment and trained personnel [14]. In addition, serology and antigen tests require the production of purified proteins and specific antibodies, a long and expensive process that often leads to batch-to-batch variations [15]. Such problems related to antibodies may be one of the reasons why there is a difference in the detection performance (specificity and sensitivity) observed on rapid antigen tests when these parameters are determined in clinical conditions [16,17].

There are some new detection methods for SARS-CoV-2 infection based on technologies such as Field Effect Transistor, CRISPR-Cas12, Fluorine Doped Tin Oxide electrodes and functionalized gold

* Corresponding author.

E-mail address: lavarez@cinvestav.mx (L.M. Alvarez-Salas).

¹ These authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.ab.2022.114633>

Received 3 November 2021; Received in revised form 24 February 2022; Accepted 27 February 2022

Available online 2 March 2022

0003-2697/© 2022 Elsevier Inc. All rights reserved.

nanoparticles or magnetic beads; however the equipment and the process to generate the materials needed for their implementation are difficult to obtain in most laboratories [18–21]. As practical COVID-19 detection becomes necessary to save lives and return to a relative normality, there is a pressing need for efficient and affordable diagnosis tools.

Biosensors have been developed for the rapid, sensitive, and stable diagnostic methods that can use novel recognition elements such as nucleic acids aptamers [22,23]. Nucleic acid aptamers are short, single-stranded DNA (ssDNA) or RNA molecules that are selected for binding to a specific target [24]. The high affinity and specificity of aptamers are comparable to those of antibodies, with the advantage of rapid and massive high-quality production by automated synthesizers [25]. Aptamers are obtained through a highly probabilistic process called Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX) [26]. In SELEX, large single-stranded oligonucleotide combinatorial pools are challenged for binding to a desired target under a defined set of conditions [24,25]. Aptamer selection is attained through iterative steps of target incubation with combinatorial pools, followed by the separation of unbound sequences (partitioning), and the PCR-mediated amplification and purification of the target-bound oligonucleotide species [27,28]. Aptamers with high affinity can be recovered through several partitioning methods although efficiency is often affected by the nonspecific background binding that each SELEX variant may have [29]. SELEX based on capillary electrophoresis (CE-SELEX), where target-bound aptamers are separated in solution, eliminate the possible background against components of the partitioning method resulting in the fast selection of aptamers due to its higher partition efficiency [30].

Aptamers are used in biosensors as biological recognition elements (BRE) for accurate and rapid detection of pathogens through fluorescence, chemiluminescence, electrochemistry and immunoluminescence techniques. These methods often require the chemical modification of the aptamer to produce visual or measurable signals upon interaction with the target molecule. Such modifications include labeling with fluorogenic, electrochemical or chromogenic moieties, addition of catalytic nucleic acids (aptasensors) or even allosteric aptamers (aptazymes) responsive to the target. Recently, new biosensors for COVID-19, including devices targeting the RNA of SARS-CoV-2, and COVID-19 antibodies, as well as immunosensors targeting the S and N proteins have been reported [31–37]. Nonetheless, aptamer-based biosensors offer advantages compared to antibodies such as shorter generation time, lower manufacturing costs, negligible batch-to-batch variability, simple chemical modification, better thermal stability, long shelf-life and higher target selection potential [38–40].

Aptamers against SARS-CoV-2 proteins have been previously isolated, some of them are able to block the interaction of S protein/RBD with ACE2 receptors and capable of inhibiting infection in pseudovirus models demonstrating therapeutic potential [41–44]. Aptamer selection for the same virus using different viral targets and SELEX conditions is a common practice due to the rise of aptamer with different affinity, sequence, structure and binding capabilities [15]. In this regard, a variety of SELEX protocols have been used extensively, such as immobilization-free methods that expose the whole protein surface to the oligonucleotide pool thus making it more accessible to a variety of different aptatopes [45]. This is important when paired (non-competing for the same target site) aptamer screening is sought as different combinations of aptamers can generate a response to a wider range of the analyte concentration [46].

Thus, newly selected aptamers may be necessary for a more versatile response range in novel biosensors. As different BRE are required for biosensor development, aptamers with different interaction properties could be useful, alone or in combination with previously published aptamers. In addition, different aptamers capable of interacting with various epitopes of the S protein may exhibit synergistic effects in the inhibition of the viral entry or the detection of target sequence or

structural variants. Therefore, selection and characterization of novel SARS-CoV-2 S protein aptamers are necessary for the development of new theranostic and biotechnology applications.

In the present work, IFCE-SELEX (Ideal Filter Capillary Electrophoresis-SELEX) was used in combination with Next Generation Sequencing (NGS) for the selection and identification of single-stranded DNA (ssDNA) aptamers that specifically bind with high affinity to the SARS-CoV-2 S protein. Furthermore, as proof-of-concept applications, selected paired aptamers were implemented in an electrochemical aptasensor and a simple sandwich-type fluorescent aptasensor capable of detecting and quantifying S protein in diluted human saliva of multiple donors suggesting a novel tool for the rapid and opportune diagnosis of COVID-19.

2. Materials and methods

2.1. Oligonucleotides and proteins

The FWD (5'-CACGACGACAGACCACAG-3') and REV (5'-TGTTCTCTCTGGCTGG-3') primers, the 40-nucleotide randomized DNA pool (M2 pool) and the 5'-FAM-C9 aptamer were purchased from T4 oligo® (ADN Artificial S. de R.L. de C.V., Irapuato, México). The 5'-amino-C6-modified C7 and C9 aptamers was purchased from Integrated DNA Technologies Inc. (San Diego, CA). 5'-DTPA2-modified C7 aptamer was purchased from Friz Biochem GmbH (Neuried, Germany). Mono-functional methoxy-polyethylene glycol thiol (PEG, 2 kDa), Bovine serum albumin (BSA), Lysozyme, and Casein were purchased from Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). The recombinant baculovirus-produced SARS-CoV-2 S protein (40589-V08B1), the human Angiotensin-Converting Enzyme 2 Protein (ACE2) (10108-H08B), the human Respiratory Syncytial Virus (RSV) glycoprotein G (11070-V08H), the human Coronavirus NL63 (HCoV-NL63) S Protein (40604-V08B), the influenza virus (H1N1) Hemagglutinin protein (40510-V08H), the MERS-CoV virus S protein (40069-V08B), and the SARS-CoV-2 (2019-nCoV) Spike Neutralizing Antibody, Mouse Mab (IgG) were all purchased from Sino Biological (Sino Biological Inc., Beijing, China).

2.2. Ideal-Filter Capillary Electrophoresis SELEX (IFCE-SELEX)

The M2 pool was purified through HPLC and preparative 8% polyacrylamide/7 M Urea gels. Partition by IFCE [30] was achieved using a G7100a Capillary Electrophoresis system (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara CA) with standard uncoated fused-silica capillaries (Agilent G1600-60311). Prior to each partition cycle the capillary was pre-conditioned by flushing 0.1 M NaOH, deionized water and SELEX buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.0, 110 mM NaCl, 1 mM MgCl₂) for 5 min.

For the initial partition, an interaction mixture containing 100 nM purified S protein and 10 μM M2 ssDNA was prepared in SELEX buffer and incubated for 30 min at room temperature (RT). In all partition cycles the interaction mixture was injected at 34 mbar 10 s pressure pulse and propagated through the non-cooled part of the capillary with a 270 s 20 mbar pressure pulse. The aptamer-S protein complexes were separated applying 10 kV across the capillary for 45 min and collected in SELEX buffer. To increase selection stringency, protein concentration was decreased to 50 nM and 25 nM for the 2nd and 3rd partition cycles, respectively.

2.3. Generation of dsDNA and ssDNA production

Recovered aliquots (8 μL) from each partition were amplified by qPCR using the 0.3 μM primers and the Thermo Scientific™ 1X Maxima SYBR Green master mix (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham MA), and an initial 95 °C for 7 min incubation followed by the cycling sequence 95 °C for 30s, 58 °C for 30s, 72 °C for 30s until a relatively high level of fluorescence was recorded. Purified amplicons were used as

templates for asymmetric emulsion PCR (emPCR) to avoid by-product formation [47]. The oil phase was composed of 4.5% Span 80, 0.4% Tween 80 and 0.05% Triton X-100 in mineral oil. The aqueous phase contained 0.2 mM dNTPs, 0.4 μM FWD primer, 0.03 μM REV primer, 3 mM MgCl₂, 1X Taq Buffer (BioTecMol S.A. de C.V., Mexico City, Mexico), 5 pM template and 0.125 U/μL Amplificasa® Taq DNA polymerase (BioTecMol). The 200 μL PCR reaction was combined with 500 μL of oil phase, vortexed for 20 min and cycled 50 times. The PCR water-in-oil emulsion was extracted with water-saturated dichloromethane and centrifuged at 17,200×g for 5 min for aqueous phase recovery. The ssDNA was separated from dsDNA through 10% native polyacrylamide gels followed by crush and soak elution. The ssDNA was quantified using a NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher) and visualized in denaturing 8% polyacrylamide/7 M Urea gels after every purification.

2.4. Next-generation sequencing (NGS)

NSG was performed essentially as previously described [48]. A minimum of 500 ng dsDNA from each cycle was used with the TruSeq DNA PCR-Free LT kit (Illumina Inc., San Diego, CA). The different adapters were added to each partition round following the manufacturer instructions. The partitioned pools with ligated adapters were quantified using the NEBNext® Library Quant Kit for Illumina® and paired-end sequenced in a MiSeq System using a MiSeq Reagent Kit V2 (Illumina) flow cell. NGS data was analyzed with the Galaxy project platform and FASTaptamer software [49].

To further increase the probability of selecting high affinity and specific aptamers, three additional oligodeoxynucleotide pools were included in the sequencing analysis. These pools were obtained from nitrocellulose-bound sequences recovered from three interaction mixtures flowed through a Slot blot apparatus. The first mixture contained only 2R ssDNA (NC), the second (NC-100) and third (NC-25) contained 2R ssDNA and S protein at S protein concentrations of 100 nM and 25 nM, respectively. The ssDNA bound to the nitrocellulose membrane was eluted by incubating at 95 °C in nuclease-free water for 10 min and then amplified by emPCR.

2.5. Binding assays

For Slot blot binding assays, the ssDNA pools and aptamers were radiolabeled using Thermo Scientific™ T4 polynucleotide kinase (PNK) (Thermo Fisher Scientific) and γ-[³²P]-ATP (PerkinElmer, Inc., Waltham, MA). For enrichment and dissociation constant (K_D) determination, interaction mixtures containing 15 pM of radiolabeled M2 pool, ssDNA pools or aptamers and different S protein concentrations, control proteins or diluted human saliva were incubated for 1 h at RT in either complete SELEX buffer, SELEX buffer without magnesium (TNa7) or with increasing concentrations of EDTA. The interaction mixture was placed in a Slot Blot apparatus (Invitrogen) with a nitrocellulose (NC) membrane (aptamer-S complexes retainer) (Cytiva, Marlborough, MA) layered on a nylon (NY) membrane (unbound aptamer retainer) (Cytiva). Residual radioactivity on the membranes was quantified using an Amersham Typhoon IP Biomolecular Imager (Cytiva). The percentage of bound fraction (%BF) was calculated using the following formula: %BF=Residual radioactivity on NC/total radioactivity on NC and NY)*100

The K_D were calculated using the GraphPad Prism 8.4 software, curve-fitting to one site non-linear regression model:

$$B = B_{max} * [M] / (K_D + [M])$$

Where B is the bound fraction, B_{max} is the maximum binding, $[M]$ is the protein concentration, and K_D is the dissociation constant [50].

The K_D were also determined by single-cycle kinetic analysis using surface plasmon resonance BIAcore T200 instrument (SPR) (GE Healthcare Europe). His-tag Spike protein with a concentration of 148.8

nM (20 ng/μL) was immobilized (lane 2) on a surface sensor (Series S Sensor Chip NTA) (GE Healthcare Europe) with a flow rate of 10 μL/min at 25 °C in TNa7 buffer until values of ~600 response units were reached. The reference flow cell (lane 1) was left blank. A concentration series of C7, C9 and a randomized 80 nt pool as non-binder control were assessed for binding with S protein at 25 °C. The C7 aptamer was injected at concentrations of 1230, 410, 13, 45, and 15 nM. For C9 aptamer, concentrations were 1523, 507, 169, 56, and 18 nM. The concentrations for the randomized pool were 1335, 445, 148, 49 and 16 nM. The association and dissociation time was 180 s and 600 s, respectively. Data was fitted to a 1:1 binding stoichiometry model using the BIAcore T200 evaluation software 3.2 (Biacore) for K_D determination.

2.6. Saliva collection and pretreatment

Whole saliva was collected from consenting healthy volunteer subjects, three male and two female donors, between 08:00 a.m. and 14:00 p.m. to account for the influence of circadian rhythms and food debris. Subjects were asked to rinse their mouths with water and discard this before sample collection. Saliva was allowed to accumulate on the mouth floor. The accumulated saliva was then spit into a polypropylene test tube and this was repeated until enough saliva was collected. During the collection process the sample tubes were kept on ice. Samples were cleared for 30 s in a microfuge. The pellet was discarded, and the supernatant diluted 10-fold in TNa7 buffer. Samples were kept on ice and used immediately.

2.7. Fluorophore-linked aptamer assay (FLAA)

The proof-of-principle FLAA test for SARS-CoV-2 S protein detection was set in 96-well microplates as described with some modifications [51]. Briefly, 100 pmole of 5'-amino-C6-modified C7 aptamer was immobilized on Pierce™ maleic anhydride activated plates (Thermo Fisher Scientific) as capture agent. Plates were blocked using Super-Block™ reagent (Thermo Fisher Scientific) following the manufacturer's protocol. Different concentrations of S or control proteins were incubated in either TNa7 buffer or TNa7 supplemented with 10% single-donor or multi-donor saliva mix (SDS: 10% Single-donor Saliva; FDS: 10% multi-donor Saliva mix) and washed five times with TNa7 buffer. After washing, 50 pmole of the 5'-FAM-C9 aptamer were added as detection agent and incubated for 1 h at RT and washed five times with TNa7 buffer. To denature and retrieve the detection aptamer, 150 μL of 7 M urea were added and incubated 30 min in agitation at RT. Finally, 25 μL of the urea solution was mixed with 75 μL of TNa7 in 96-well black opaque plates (Corning Inc., Corning NY) and fluorescence measured at 491_{ex}/516_{em} nm using a BioTek® Synergy™ H4 Hybrid Multi-mode microplate reader (Thermo Fisher Scientific). For S protein quantification and spike-and-recovery assays, the background fluorescence signal (SDS or MDS without protein) was subtracted from the sample fluorescence signal (SDS or MDS with added S protein) and then used to determine the S protein concentration with the linear equation $y = mx + b$.

The maximum theoretical fluorescence intensity was estimated by fitting the calibration data to a nonlinear regression analysis using the formula:

$$FI = FI_{max} * x / (K_D + x)$$

where FI equals the obtained fluorescence intensity units, FI_{max} is the maximum possible signal obtained and x is the dissociation constant. The limit of detection (LOD) was calculated according to the equation:

$$LOD = ks/m$$

where k is the constant of random error (which 3 is typically used), s is the standard deviation of the blank, and m is the slope of the calibration

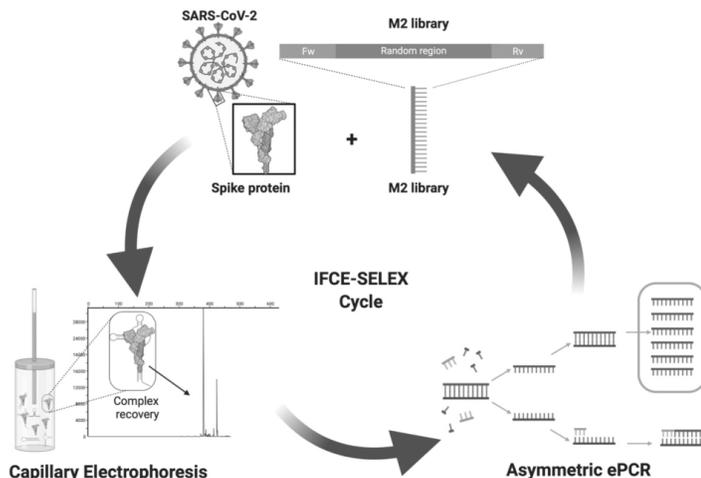


Fig. 1. Schematics representation of DNA aptamers selection against SARS-CoV-2 Spike (S) protein through IFCE-SELEX. Purified recombinant SARS-CoV-2 S protein was incubated with the M2 ssDNA combinatorial pool containing 40 randomized positions (M2 library). The ssDNA-S protein complexes were partitioned using Ideal-Filter Capillary Electrophoresis (IFCE). The dsDNA generated from the recovered aptamer pools was used as template for asymmetric ePCR in ssDNA production. Each partitioned aptamer pool was allowed to enter in increasingly stringent selection cycles by decreasing the protein concentration by half until 25 nM. Figure created with [BioRender.com](https://www.biorender.com).

curve [19,27,76].

2.8. Electrochemical assay

The electrochemical detection of the S protein was made utilizing well-established flexible multi-electrode arrays (flex-MEAs) [52]. Briefly, the flex-MEA chip was incubated for 2 h in a 0.5 μM C7 aptamer solution. Afterwards, the chip was rinsed with Tris-HCl 25 mM pH 7.4 and incubated in for 1 h in 5 mg/mL PEG solution, used as a blocking agent, and finally rinse with Tris buffer to remove non-bound molecules. Differential pulse voltammetry (DPV) was used for the characterization of the S protein detection. The protein was spiked in the buffer medium in a concentration range of 1 fg/mL to 100 ng/mL. DPV measurements were conducted in 5 mM ferri-ferrocyanide solution with a potential scan going from 0.0 V to 0.7 V (Ag/AgCl) with increments of 5 mV, an amplitude of 25 mV, a pulse width of 50 ms, a sampling width of 25 ms and a pulse period of 100 ms. In the same way, the control tests with the proteins from the RSV, Influenza and MERS-CoV virus were performed. The ratio between the current signal peak before and after protein addition ($|\Delta I/I_0|$ (%)) was calculated for each tested concentration (c) to produce a calibration curve. The linear part of the obtained calibration curve was fitted by the half-log equation:

$$|\Delta I/I_0| (\%) = 6.29 \cdot \log(c) + 144.72$$

3. Results and discussion

3.1. Binding analysis of IFCE-partitioned pools

SARS-CoV-2 S protein-specific aptamers were selected using IFCE-SELEX to integrate a simple and rapid biosensor for COVID-19. IFCE partitioning was used to obtain high-affinity affinity aptamers with 2 selection cycles using purified recombinant S protein and the randomized oligonucleotide M2 pool (Fig. 1). IFCE conditions allowed opposite migration direction of aptamer-target complex and non-binders by decreasing the electroosmotic flow (EOF) in the running buffer. This was confirmed by performing capillary electrophoresis of the M2 pool with low ionic strength (50 mM Tris HCl) and high ionic strength conditions (TNa7) Fig. Multimedia component 5(Supplementary Fig. S1A), as described in the original work [30]. This resulted in suppression of pool

migration with TNa7 condition (Fig. Multimedia component 6Supplementary Fig. S1B). In addition, S protein migration in TNa7 was confirmed using the same conditions resulting in a peak at minute 10 (Fig. Multimedia component 7Supplementary Fig. S1C). Protein interaction with aptamers changes drastically the mass-to-charge ratio of aptamers resulting in a less negative aptamer-S protein complex whose mobility is more affected by EOF rather than by its electrophoretic mobility. Therefore, a 45-min collection window was established for the partition step [53]. Because the low S protein concentration, the aptamer-complex peak was not detected; however, each electrophoresis condition was amplified by qPCR and aptamer recovery complex was confirmed by direct visualization on polyacrylamide gels (Supplementary Fig. Multimedia component 8Fig. S2A and Fig. Multimedia component 9S2B).

To increase SELEX stringency, the resulting partitioned pool (1R) was used for two subsequent IFCE partition rounds (2R and 3R) with decreasing S protein concentrations (50 and 25 nM, respectively). This method was modified by performing extra selection rounds to increase strong binders, reduce the amount of non-binders and facilitate NGS enrichment analysis [54]. Binding assays showed that the M2 and 2R pools had differential binding affinities for the S protein. The M2 pool showed low binding affinity for S protein at 200 nM concentration, while 2R showed a significantly increased binding affinity (Fig. 2A). These results suggest that the second IFCE partition round significantly increased the number of high affinity aptamers (HAA) decreasing the amount of protein required for binding. Also, this higher binding affinity appeared specific for S protein as the BSA negative control showed no DNA retention (Fig. 2A). Interestingly, a further selection cycle with decreased S protein concentration produced loss of binding affinity in the third IFCE partition (Fig. Multimedia component 10Supplementary Fig. S3). This approach is useful, however, as seen in some mathematical models, there is a limit in the protein concentration that can be used to improve SELEX. This can be explained because mostly all methods exhibit background binding that can compromise SELEX efficiency because represents a competitive presence [55]. In addition, this is consistent with previous CE-SELEX reports where binding enrichment occurred in early selection rounds and further partition rounds showed no improvement [56] or even the loss of affinity [57,58]. It is unclear why the pool affinity decreases through several partition rounds but other plausible explanations include mutations in aptamer sequences, DNA contamination and even over-amplification of non-aptamer

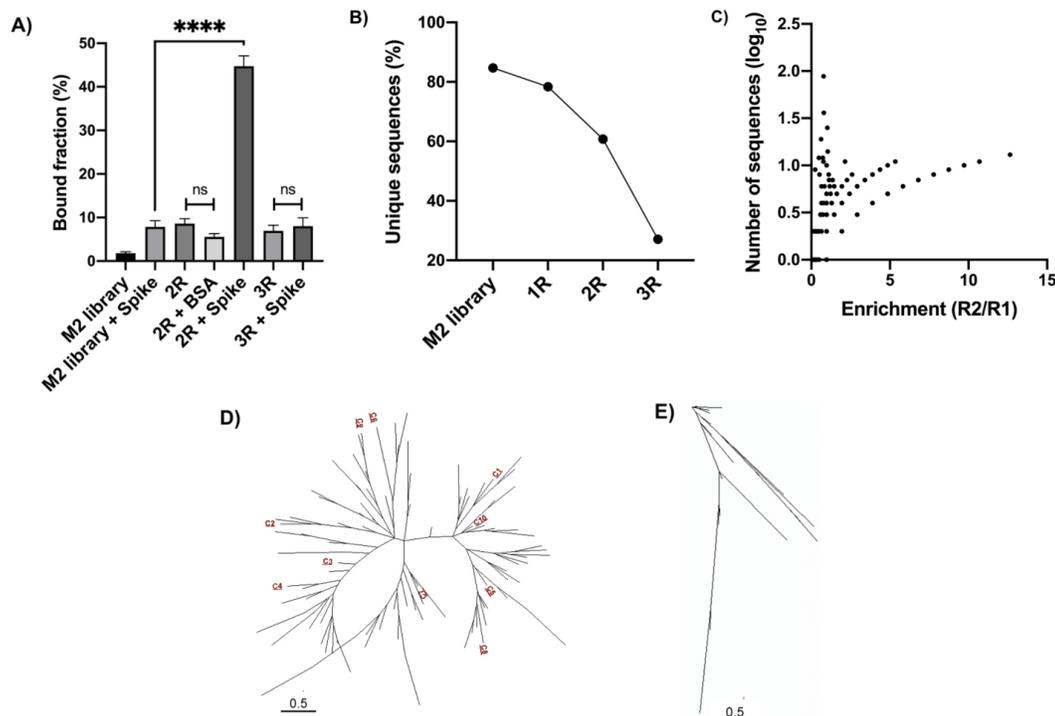


Fig. 2. IFCE SELEX analysis. A) Binding affinity and specificity of the different aptamer pools partitioned by IFCE-SELEX. Slot blot binding assays were made by incubating purified recombinant SARS-CoV-2 S protein (200 nM) with 10 pM of either the radiolabeled M2 randomized pool or the partitioned pools 2R and 3R. Bovine serum albumin (BSA) (200 nM) was used as negative binding control. The residual radioactivity on the nitrocellulose (NC) and nylon (NY) membranes was used to determine the aptamer fraction bound to the proteins. Error bars represent one standard deviation from triplicate analyses. The results were analyzed using one-way ANOVA with post hoc Tukey's multiple comparisons test (99.9% CI). Asterisks indicate statistical significance ($n = 3$, $p < 0.0001$). B) NGS variability analysis. The percentage of unique sequences in each dataset was calculated after sequencing each IFCE-SELEX cycle. The number of unique sequences decreased through the IFCE partition. C) NGS enrichment analysis. R1 data set was matched against 2R. Each black dot represents one sequence obtained from the NGS data. Sequence frequency was plotted as a function of its enrichment-fold from R1 to R2. It was observed that some of the most enriched sequences were also frequent. FASTAptamer toolkit was used for the variability and enrichment analysis. D) Unrooted radial phylogenetic tree of the most enriched sequences in R2 containing the ten selected aptamer sequences. E) Unrooted radial phylogenetic tree of the most enriched sequences against NC membrane. The trees were constructed using the 100 most enriched sequences and analyzed by Molecular Phylogenetic Analysis by Maximum Likelihood method based on the Kimura 2-parameter model conducted in MEGA7. Scale bar indicates 0.5 substitution per site.

sequences due to Taq DNA polymerase bias, suggesting that decreasing concentrations to a lower limit could be detrimental for the SELEX process [55,59].

3.2. NGS aptamer identification and validation

NGS was used for the identification of individual aptamer sequences from the pools with high affinity and specificity for the S protein. The raw NGS data from unselected M2 pool, all the partitioned pools (1R, 2R and 3R) and the NC, NC-25 and NC-100 nitrocellulose bound pools were pre-processed through the Galaxy project platform before FASTAptamer analysis (Supplementary Table 1).

A reduction in unique sequences was observed as the selection cycles progressed, confirming that the IFCE-SELEX process effectively decreased variability through the partition rounds with the lowest variability in the 3R pool despite the low binding affinity (Fig. 2B). This drop-in variability is also a common event in SELEX processes. Aptamer selection against ibuprofen performed a negative selection step (no target) reducing the number of sequences by 56% [60]. Also, in a SELEX

against streptavidin variability decreased through ten selection rounds whereas affinity did not increase after round six [61]. Although the apparent low number of aptamers in 3R, this data was used to discriminate aptamer sequences that are present in both 2R and 3R pools. In addition, bioinformatics motif analysis using Multiple Expectation maximizations for Motif Elicitation Suite (MEME Suite) showed that top enriched sequences motifs are different in 2R and 3R. However, they were not considered for HAA selection due to a high E value (< 0.05) in MEME motif analysis (Fig. Multimedia component 11Supplementary Fig. S4) [62].

To identify HAA, the enrichment-folds (reads per million between selection rounds) were calculated and ranked for every sequence through the partition rounds using the FASTAptamer-Enrich script to observe the most enriched sequences from 2R/1R (Fig. 2C). In addition to this enrichment data, the NC, NC-100 and NC-25 NGS data sets were used to compare NC-100/NC-25 enrichment and identify which aptamer sequences were enriched with the decrement of S protein concentration thus facilitating the HAA discovery.

The arrangement in phylogenetic trees implies the acquisition of new

Table 1
Sequences of the ten aptamer candidates with higher enrichment/frequency.

Name	Sequence of selected aptamers (5'→3')
C1	TCGTAGAGTAGGTGCGGGCTTAAOGCTCCAATCCGCTGAC
C2	ATGTAACGTAACATCGTGGATTGACAGATATCCCTCAGG
C3	GCTGAACATGCTTGGAAATCATGTGTCTGCCAGAGACA
C4	GGGCGGGGGGACACGAGATGGGCTTAATGGATAGCAGA
C5	CTCATTAGGCCATCAAAGTGCCTTAGCTGAATGACCTCA
C6	TGATACGTGACATGGTGTGATGAATAGGAATCGTTGT
C7	CACGTGGCCACGTTAATCCGTTATAAGTCAAGCTCGAT
C8	CTCCATCGGGATCTTATATCACGAATCGACAACGGTTGA
C9	GGGGCGTCAAGCGGGTCCACATCGGAGTAGGGAATCTTG
C10	ATCTGAGAGTCCAAGAGTGCACCTGAAGCATGCCTCTAT

characteristics with respect to their ancestors along the branches. Using Molecular Phylogenetic analysis by Maximum Likelihood method ten candidates were selected from different families in the selection cycle 2 (Table 1) and analyzed by binding analysis to find the best HAA (Fig. 2D) [63,64]. All sequences showing high enrichment or frequency in the NC data set were discarded. All ten candidate sequences exhibited no enrichment in the NC data set (Fig. 2E), but some were present in the NC-100 and NC-25 data set.

NGS analysis revealed that the initial pool variability decreased through the SELEX procedure although there were not highly over-represented or predominant sequence motifs as previously described for other CE-SELEX experiments [56,65–69]. Nevertheless, the bioinformatic analysis allowed identification of enriched oligonucleotide sequences. It is also possible that data may be improved if the NGS output is increased by using higher capacity flow cells since other NGS aptamer analyses used a higher number of reads per cycle (>1 million reads) [50].

Slot blot binding assays showed candidates C7 and C9 best binding affinities similar to that presented by the whole 2R pool. No significant differences were observed with the BSA negative binding control or without protein, suggesting specific interactions (Fig. 3B and 3C), as confirmed later by FLAA assay. Candidates C7 and C9 were further analyzed for binding affinity because they showed the lowest dissociation constant $K_D = 89.41 \pm 18$ nM and 231.9 ± 15 nM in a linear model, respectively (Fig. 3A and Supplementary Fig. Multimedia component 12 Fig. S5A and Fig. Multimedia component 13 S5B). In addition, all the K_D were also determined by SPR showing nanomolar binding affinities similar to the Slot blot results (Fig. Multimedia component 14 Supplementary Fig. S6).

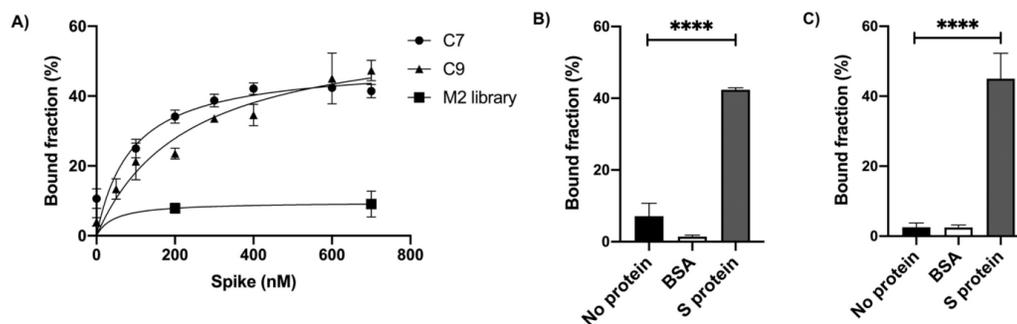


Fig. 3. Binding Affinity and Specificity of aptamer sequences. A) K_D determination. The dissociation constants for aptamers C7 ($K_D = 89.41 \pm 18$ nM) (black dots) and C9 ($K_D = 231.9 \pm 15$ nM) (black triangles) were calculated fitting the bound fraction curves from slot blot assays to a one binding site non-linear regression model (C7 $R^2 = 0.83$; C9 $R^2 = 0.92$). B) Binding specificity of C7 (left panel) and C9 (right panel) aptamers. Radiolabeled aptamer DNA (15 pM) was incubated with 600 nM of purified S protein. BSA (600 nM) and no protein negative controls were included. The data was analyzed using one-way ANOVA with post hoc Tukey's multiple comparisons test (99% CI). Asterisks indicate statistical significance ($n = 3$, $p < 0.0001$). For both aptamers no statistically significant differences were found between BSA and without protein (C7: $p > 0.039$; C9: $p > 0.99$).

3.3. FLAA can be used to quantify SARS-CoV-2 S protein

Biosensors can be classified as competitive and sandwich assays depending on the number of BRE that are used. Sandwich-type biosensors are preferred because of its dual recognition mechanism; in this type of biosensors, two different BRE are needed as two spatially distant regions are recognized within the target. This results in higher specificity and selectivity as one BRE is used for capture and the other for signal generation [70].

For a FLAA setting, C7 was immobilized on the surface of treated multiwell plates as capture agent and fluorescein-labeled C9 was added as detection agent. Purified recombinant SARS-CoV-2 S protein was added to the C7-containing plates, blocked and incubated in the presence of 10% saliva prior to addition of FAM-labeled C9 (Fig. 4A). Other non-related proteins (mouse IgG, ACE2 and milk casein) were used as specificity controls (Fig. 4B).

SARS-CoV-2 S protein exhibited the highest fluorescence intensity suggesting a positive recognition and that C7 and C9 bind to different sites within S protein as no signal will be recorded otherwise. Interestingly, when 5'-amino-C6-modified C9 aptamer was used as capture agent and FAM-labeled C7 aptamer as detection agent, no signal was detected when 250 nM of S protein was added in TNa7 buffer. This may be due to the higher K_D of C9 (230 nM) compared to C7 (89 nM) suggesting that the capture agent must be the aptamer with the highest affinity for the target if a low limit of detection (LOD) is desired, although the K_D may vary depending of the determination method as we observed by SPR analysis (Supplementary Fig. S6). Another explanation may be that the chemical modification itself impaired C9 binding, since such an effect has been observed with other chemical modifications causing the partial or total loss of aptamer binding [71,72]. Also, it has been reported that the negative phosphate backbone of an aptamer can interact with the immobilization surface electrostatically, resulting in denaturation of the aptamer structure. This last may impact more C9 structure ($\Delta G = -7.4$ kcal/mol) since it is less stable than C7 structure ($\Delta G = -8.9$ kcal/mol) [73].

In addition, FLAA was tested against other surface virus proteins, such as human RSV glycoprotein G and HCoV-NL63 S protein, using milk casein and egg lysozyme as negative controls (Fig. 4C). No fluorescence was observed despite other S protein from a human coronavirus was used, thus indicating aptamer specificity for SARS-CoV-2 S glycoprotein. These results showed the suitability of FLAA as a detection test for S protein [45,74,75], using C7 and C9 aptamers as capture and detection agents, respectively.

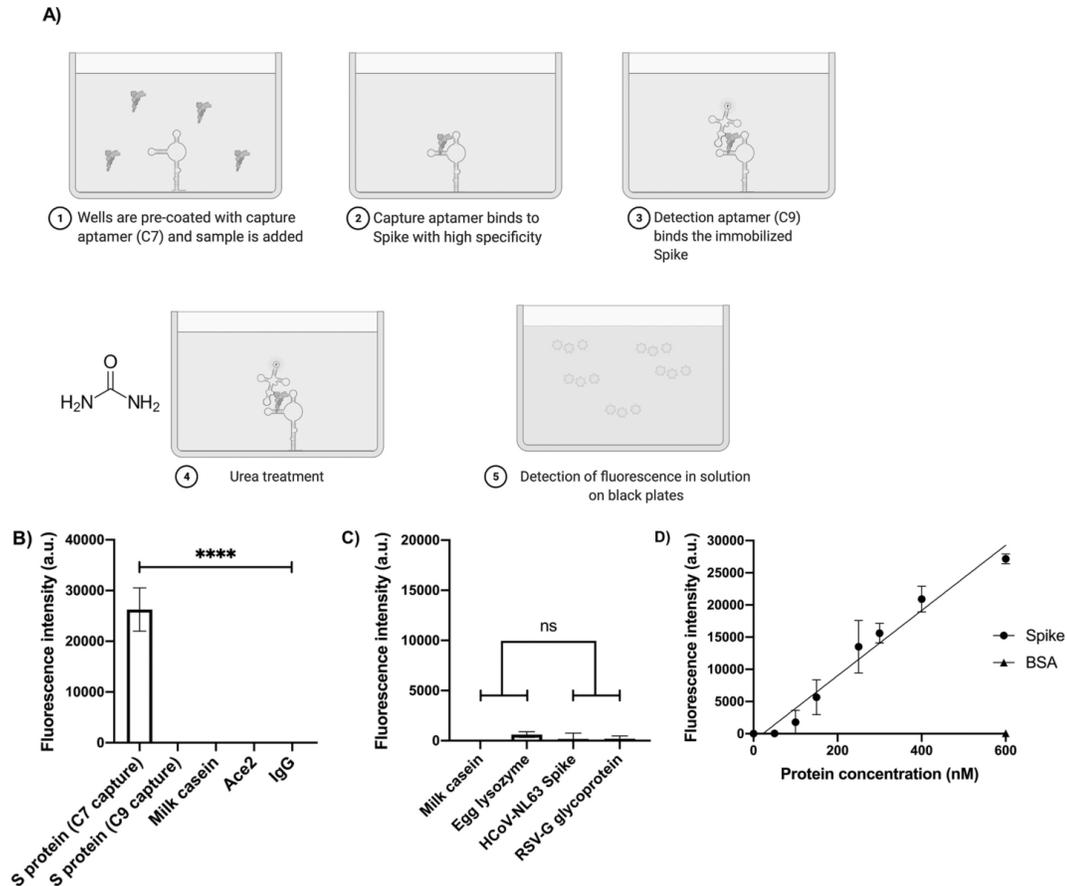


Fig. 4. FLAA specificity and detection parameters. A) Schematics of the FLAA procedure. Step 1: 5'-amino-C6-modified C7 aptamer was immobilized on the surface of maleic anhydride-activated multiwell plates as capture agent. Step 2: The purified recombinant SARS-CoV-2 S or negative binding control protein were added to the C7-containing plates. Step 3: Fluorescein-labeled C9 was added as detection agent. Step 4: After step 3 the multiwells are washed with TNa buffer. The multiwell plates are incubated with 7 M urea and volume is transferred to black plates. B) FLAA test based on the C7 and C9 aptamers. Purified recombinant S protein (250 nM) was added and incubated before addition of FAM-C9. Milk casein, human ACE2 and mouse IgG, were used as non-related controls to evaluate the FLAA specificity in 10-fold diluted human saliva. The graphs represent the mean and standard deviation from three independent experiments analyzed by one-way ANOVA with post hoc Tukey's multiple comparisons test (95% CI). Asterisks indicate statistical significance ($n = 3$, $p < 0.0001$). C) The FLAA test does not detect unrelated proteins and other common cold recombinant surface virus proteins. Milk casein, egg lysozyme, Human Respiratory Syncytial virus (RSV) glycoprotein G and Human Coronavirus (HCoV-NL63) S protein (250 nM) were added and incubated before addition of FAM-C9. The graphs represent the mean and standard deviation from three independent experiments analyzed by one-way ANOVA with post hoc Tukey's multiple comparisons test (95% CI). Asterisks indicate statistical significance ($n = 3$, $p < 0.0001$). D) FLAA signal is concentration-dependent of S protein. A FLAA test based on 96-microwell plate format using aptamer C7 as capturing agent and FAM-labeled C9 as detection agent. The FLAA concentration curve (0 nM–600 nM) of S protein (Black circles) showed a simple linear regression ($R^2 = 0.94$). Background fluorescence from the well without S protein was subtracted from the measurements. BSA (600 nM) was used as negative control (Black triangle). Plotted data represents the mean and standard deviation of three independent experiments ($n = 3$).

To further characterize FLAA detection parameters, a calibration curve was generated using TNa buffer. The increase in fluorescence intensity (FI) signal caused by the formation of a tertiary complex (C7–S protein–C9) was determined by fluorometry. Background fluorescence was subtracted from all data points and plotted against increasing S protein concentrations to establish the dynamic detection range. The resulting standard curve was fitted to a simple linear regression analysis where the following equation was obtained:

$$FI = 51.04[nM] + 5940, (R^2 = 0.947)$$

The calculated LOD of the FLAA assay was 41.87 nM with a sensitivity (S) extracted from the slope of the obtained equation of 51 nM. The calculated F_{max} was 70585 FI which corresponds to a protein concentration greater than the tested in this assay (600 nM); this result implies that the dynamic detection range of this assay using these BRES is wider and may be used with higher protein concentrations.

To determine FLAA detection performance in biofluids, spike-and-recovery assays were performed using diluted human saliva as matrix. As biological matrices may contain components that affect the response to the analyte more than the standard diluent (TNa), a spike-and-

Table 2
Spike-and-recovery assessment for FLAA in diluted human saliva.

Sample	Spike added (nM)	Expected (nM)	Observed (nM)	Average recovery (%)
SDS + Spike	500	500	516 ± 24.2	103.27
MDS + Spike	250	250	235 ± 27.9	94.30
MDS + Spike	500	500	439 ± 13	87.80
SDS + BSA	500	0	-7 ± 70	-

SDS: 10% Single Donor Saliva; MDS: 10% Multiple Donor Saliva.

recovery assay is appropriate to assess the difference response between the standard diluent and the biological matrix [77]. A specific amount of purified S protein (spike) in 10-fold diluted human saliva (from multiple or single donors) was added to the microplate wells in TNa buffer and the fluorescence response (recovery) read after incubation in comparison with the response without saliva. BSA was used as negative control (Fig. 4D). It was established that the FLAA assay determines S protein concentration with an average recovery well within the 80–110% acceptable range (Table 2) [73]. These results also showed that other components found in saliva had low detrimental effect in the capacity of C7 and C9 aptamers to detect and quantify S protein, indicating that the FLAA may be suitable for COVID-19 detection in diluted saliva samples (Supplementary Fig. Multimedia component 15 Fig. S7A and Fig. Multimedia component 16 S7B).

As a second proof-of-principle test, the C7 aptamer was implanted in an electrochemical aptasensor configuration. A 5'-end thiol-terminal group was added to the C7 aptamer for its immobilization on a gold electrode through a sulfur-gold bond (Fig. 5A). Furthermore, thiol terminated PEG molecules were used as anti-fouling backfill to suppress unspecific binding [78]. The binding of the target to the receptor layer induced conformational changes within the aptamer film. These modulations of the receptor layer caused alterations of the ferri/ferrocyanide charge transfer characteristics which were registered by differential pulse voltammetry (DPV). Firstly, the starting DPV current signal of the sensor electrodes was measured without analyte exposure. Subsequently, the sensor responses were recorded after 30-min incubation for different S protein concentrations covering a range from 1 fg/mL to 100 ng/mL. An increase of the peak current signal was observed as the concentration of the protein rose. The current increase can be understood as a result of a reduced charge transfer resistance due to

conformational rearrangements within the receptor layer (Fig. 5A). The sensitivity of the sensor was calculated to $6.29 \pm 0.98/\text{decade}$ while the LOD was calculated to 8.85 fg/mL (0.07 fM). Correspondingly, a dynamic detection was feasible in the range from 8.85 fg/mL to 100 pg/mL. Hereby, the calculated K_D for 5'-thio-C7 was 141 fg/mL (1.04 fM) (Fig. 5B).

A high selectivity of the C7 aptamer was obtained for S protein of the SARS-CoV-2 virus over proteins from other viruses such as the Glycoprotein G of the RSV, the Hemagglutinin protein of the influenza (H1N1) virus, or the S protein of the MERS-CoV virus even at high concentrations (Fig. 5B).

4. Conclusion

In the present work, C7 and C9 aptamers specific for the SARS-CoV-2 S protein were selected by combining IFCE partition with an optimized SELEX protocol. The high partition efficiency coupled with the use of ePCR for efficient aptamer amplification allowed the enrichment of HHA in only two selection cycles. Aptamer sequence identification was facilitated by using Slot-blot assays with the generated pools and the use of NGS data combined with phylogenetic analysis. This combination of methods can be easily applied to different targets for rapid HAA discovery.

The newly developed FLAA test for SARS-CoV-2 S protein detection is presented as a proof-of-concept to validate the potential of DNA aptamer applications in the fight against COVID-19. The C7 and C9 aptamers were deemed suitable for the design of FLAA detection methods as both bind S in a variety of conditions and appear to have different binding sites within the protein as the observed K_D for each aptamer suggests that no signal would be retained in case of intramolecular competition. This indicated a potential application in clinical samples, which was further validated by spike-and-recovery assays. Furthermore, a second validation approach was demonstrated for the implementation of the C7 aptamer in an aptasensor system. A flexMEA chip was utilized to electrochemically determine the aptamer-S protein complex formation with high sensitivity and selectivity. In addition, C7 and C9 binding capacities and biofluid resilience are useful for application in places where minimal clinical facilities are difficult to meet as is the case for developing countries. As a next stage, we are currently evaluating the FLAA test with clinical samples to establish clinical applicability and final costs.

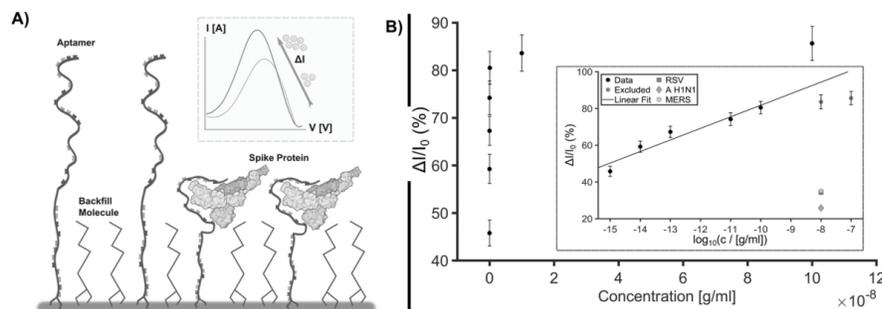


Fig. 5. Electrochemical detection. A) Schematic representation of the surface of a gold electrode functionalized with C7 aptamer by a sulfur-gold binding through thiol groups at the 5'-end (5'-thio-C7). The formation of the aptamer-S protein complex changes the aptamer conformation resulting in modification of the electrochemical signal, shortening the charge transfer distance of the redox molecules and thereby increasing the current as the concentration of the protein increases (inlet). B) Current signal $I(\text{peak}-I_0)/I_0I$ (%) of the differential potential voltammetry response versus increasing analyte concentration (1 fg/mL - 100 ng/mL). Inlet: same relation but in a semi-log representation. A linear fit was calculated over the linear dynamic detection range (Data points) by excluding the data points in saturation region (Excluded). The selectivity is demonstrated by the sensor signals obtained for Glycoprotein G of the RSV, the Hemagglutinin protein of the influenza (H1N1) virus, and the S protein of the MERS-CoV virus.

Author contributions

MAMR, PAFU and VMGV contributed equally to this work by performing experiments, bioinformatics analysis, manuscript writing and data interpretation.

MC and GM provided the design of the M2 pool.

SRMR, GFM and DM performed the electrochemical experiments and results.

LMAS was the project coordinator providing funding, data analysis, manuscript writing and revision.

Acknowledgements

This project was funded by CONACyT grants 311385 and 300073 and SRE-AMEXCID grant 2020-6. We thank to Ian Gering and María Fernanda Pérez y Pérez for excellent technical assistance during SPR and binding experiments, respectively.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ab.2022.114633>.

References

- D.S. Hui, E. I. Azhar, T.A. Madani, F. Ntoumi, R. Kock, O. Dar, G. Ippolito, T. D. McHugh, Z.A. Memish, C. Drosten, A. Zumla, E. Petersen, The continuing 2019-nCoV epidemic threat of novel coronaviruses to global health - the latest 2019 novel coronavirus outbreak in Wuhan, China, *Int. J. Infect. Dis.* 91 (2020) 264–266, <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.01.009>.
- E. Dong, H. Du, L. Gardner, An interactive web-based dashboard to track COVID-19 in real time, *Lancet Infect. Dis.* 20 (2020) 533–534, [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30120-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30120-1).
- WHO, COVID-19 Weekly Epidemiological Update, 1–23, World Heal. Organ, 2021. <https://www.who.int/publications/m/item/covid-19-weekly-epidemiological-update>.
- J.M. Abduljalil, B.M. Abduljalil, Epidemiology, genome, and clinical features of the pandemic SARS-CoV-2: a recent view, *New Microbes New Infect* 35 (2020) 100672, <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2020.100672>.
- Y. Chen, Q. Liu, D. Guo, Emerging coronaviruses: genome structure, replication, and pathogenesis, *J. Med. Virol.* 92 (2020) 418–423, <https://doi.org/10.1002/jmv.25681>.
- T.M. Gallagher, M.J. Buchmeier, Coronavirus spike proteins in viral entry and pathogenesis, *Virology* 279 (2001) 371–374, <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0757>.
- A. Kumar, P. Prasoon, C. Kumari, V. Pareek, M.A. Faiq, R.K. Narayan, M. Kulanthasamy, K. Kant, SARS-CoV-2-specific virulence factors in COVID-19, *J. Med. Virol.* (2020), <https://doi.org/10.1002/jmv.26615>.
- B. Coutard, C. Valle, X. De Lamballerie, B. Canard, N.G. Seidah, E. Decroly, The Spike Glycoprotein of the New Coronavirus 2019-nCoV Contains a Furin-like Cleavage Site Absent in CoV of the Same Clade, 2020.
- P. Zhou, X. Lou Yang, X.G. Wang, B. Hu, L. Zhang, W. Zhang, H.R. Si, Y. Zhu, B. Li, C.L. Huang, H.D. Chen, J. Chen, Y. Luo, H. Guo, R. Di Jiang, M.Q. Liu, Y. Chen, X. R. Shen, X.X. Wang, X.S. Zheng, K. Zhao, Q.J. Chen, F. Deng, L.L. Liu, B. Yan, F. X. Zhan, Y.Y. Wang, G.F. Xiao, Z.L. Shi, A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin, *Nature* 579 (2020) 270–273, <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>.
- P.R. Hsueh, L.M. Huang, P.J. Chen, C.L. Kao, P.C. Yang, Chronological evolution of IgM, IgA, IgG and neutralisation antibodies after infection with SARS-associated coronavirus, *Clin. Microbiol. Infect.* 10 (2004) 1062–1066, <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.01009.x>.
- P.C.Y. Woo, S.K.P. Lau, C. Chu, K. Chan, H. Tsoi, Y. Huang, B.H.L. Wong, R.W. S. Poon, J.J. Cai, W. Luk, L.L.M. Poon, S.S.Y. Wong, Y. Guan, J.S.M. Peiris, K. Yuen, Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia, *J. Virol.* 79 (2005) 884–895, <https://doi.org/10.1128/jvi.79.2.884-895.2005>.
- T. Zhang, Q. Wu, Z. Zhang, Probable Pangolin origin of SARS-CoV-2 associated with the COVID-19 outbreak, *Curr. Biol.* 30 (2020) 1578, <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.03.063>.
- Y. Cai, J. Zhang, T. Xiao, H. Peng, S.M. Sterling, R.M. Walsh, S. Rawson, S. Rits-Volloch, B. Chen, Distinct conformational states of SARS-CoV-2 spike protein, *Science* 369 (2020) 1586–1592, <https://doi.org/10.1126/science.abd4251>, 80.
- J. Pang, M.X. Wang, I.Y.H. Ang, S.H.X. Tan, R.F. Lewis, J.I.-P. Chen, R.A. Gutierrez, S.X.W. Gwee, P.E.Y. Chua, Q. Yang, X.Y. Ng, R.K. Yap, H.Y. Tan, Y.Y. Teo, C.C. Tan, A.R. Cook, J.C.-H. Yap, L.Y. Hsu, Potential rapid diagnostics, vaccine and therapeutics for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV): a systematic review, *J. Clin. Med.* 9 (2020), <https://doi.org/10.3390/jcm9030623>.
- E. Sánchez-Báscones, F. Parra, M.J. Lobo-Castañón, Aptamers against viruses: selection strategies and bioanalytical applications, *TRAC Trends Anal. Chem.* (Reference Ed.) 143 (2021), <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116349>.
- J. Hayer, D. Kasapic, C. Zemmrich, Real-world clinical performance of commercial SARS-CoV-2 rapid antigen tests in suspected COVID-19: a systematic meta-analysis of available data as of November 20, 2020, *Int. J. Infect. Dis.* 108 (2021) 592–602, <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.05.029>.
- M. Alghounaim, H. Bastaki, F. Bin Essa, H. Motlagh, S. Al-Sabah, The performance of two rapid antigen tests during population-level screening for SARS-CoV-2 infection, *Front. Med.* 8 (2021) 1–5, <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.797109>.
- J.P. Broughton, X. Deng, G. Yu, C.L. Fasching, V. Servellita, J. Singh, X. Miao, J. A. Streithorst, A. Granados, A. Sotomayor-Gonzalez, K. Zorn, A. Gopez, E. Hsu, W. Gu, S. Miller, C.Y. Pan, H. Guevara, D.A. Wadford, J.S. Chen, C.Y. Chiu, CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2, *Nat. Biotechnol.* 38 (2020) 870–874, <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0513-4>.
- S. Mahari, A. Roberts, D. Shahdeo, S. Gandhi, eCovSens-ultrasensitive novel in-house built printed circuit board based electrochemical device for rapid detection of nCoV-19 antigen, a spike protein domain 1 of SARS-CoV-2, *bioRxiv* (2020), <https://doi.org/10.1101/2020.04.24.059204>.
- G. Seo, G. Lee, M.J. Kim, S.H. Baek, M. Choi, K.B. Ku, C.S. Lee, S. Jun, D. Park, H. G. Kim, S.J. Kim, J.O. Lee, B.T. Kim, E.C. Park, S. Il Kim, Rapid detection of COVID-19 causative virus (SARS-CoV-2) in human nasopharyngeal Swab Specimens using field-effect transistor-based biosensor, *ACS Nano* 14 (2020) 5135–5142, <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c02823>.
- N.K. Singh, P. Ray, A.F. Carlin, C. Magallanes, S.C. Morgan, L.C. Laurent, E. S. Aronoff-Spencer, D.A. Hall, Hitting the diagnostic sweet spot: point-of-care SARS-CoV-2 salivary antigen testing with an off-the-shelf glucometer, *Biosens. Bioelectron.* 180 (2021) 113111, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113111>.
- K.M. Song, S. Lee, C. Ban, Aptamers and their biological applications, *Sensors* 12 (2012) 612–631, <https://doi.org/10.3390/s120100612>.
- Z. Chen, Q. Wu, J. Chen, Xiaohua Ni, J. Dai, A DNA aptamer based method for detection of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein, (n.d.), <https://doi.org/10.1007/s12250-020-00236-z>.
- J. Zhou, J. Rossi, Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges, *Nat. Rev. Drug Discov.* 16 (2016) 181–202, <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.199>.
- H. Sun, Y. Zu, A Highlight of recent advances in aptamer technology and its application, *Molecules* 20 (2015) 11959–11980, <https://doi.org/10.3390/molecules200711959>.
- A.D. Ellington, J.W. Szostak, In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands, *Nature* 346 (1990) 818–822, <https://doi.org/10.1038/346818a0>.
- S.K. Dembowski, M.T. Bowser, Microfluidic methods for aptamer selection and characterization, *Analyst* 143 (2018) 21–32, <https://doi.org/10.1039/c7an01046j>.
- R. Stoltenburg, C. Reinemann, B. Strehlitz, FluMag-SELEX as an advantageous method for DNA aptamer selection, *Anal. Bioanal. Chem.* 383 (2005) 83–91, <https://doi.org/10.1007/s00216-005-3388-9>.
- A. Ruscito, M.C. DeRosa, Small-molecule binding aptamers: selection strategies, characterization, and applications, *Front. Chem.* 4 (2016) 14, <https://doi.org/10.3389/fchem.2016.00014>.
- A.T.H. Le, S.M. Krylova, M. Kanoatov, S. Desai, S.N. Krylov, Ideal-filter capillary electrophoresis (IFCE) facilitates the one-step selection of aptamers, *Angew. Chem. Int. Ed.* 58 (2019) 2739–2743, <https://doi.org/10.1002/anie.201812974>.
- H. Zhao, F. Liu, W. Xie, T.-C. Zhou, J. OuYang, L. Jin, H. Li, C.-Y. Zhao, L. Zhang, J. Wei, Y.-P. Zhang, C.-P. Li, Ultrasensitive supersandwich-type electrochemical sensor for SARS-CoV-2 from the infected COVID-19 patients using a smartphone, *Sens. Actuators B Chem.* 327 (2021) 128899, <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128899>.
- M.A. Ali, C. Hu, S. Jahan, B. Yuan, M.S. Saleh, E. Ju, S.J. Gao, R. Panat, Sensing of COVID-19 antibodies in seconds via aerosol jet nanoprinted reduced-graphene-oxide-coated 3D electrodes, *Adv. Mater.* 33 (2021) 1–15, <https://doi.org/10.1002/adma.202006647>.
- S.K. Elledge, X.X. Zhou, J.R. Byrnes, A.J. Martinko, I. Lui, K. Pance, S.A. Lim, J. E. Glasgow, A.A. Glasgow, K. Turcios, N.S. Iyer, L. Torres, M.J. Peluso, T. J. Henrich, T.T. Wang, C.M. Tato, K.K. Leung, B. Greenhouse, J.A. Wells, Engineering luminescent biosensors for point-of-care SARS-CoV-2 antibody detection, *Nat. Biotechnol.* 39 (2021) 928–935, <https://doi.org/10.1038/s41587-021-00878-8>.
- A. Yakoh, U. Pimpitak, S. Rengpipat, N. Hirankarn, O. Chailapakul, S. Chaiyo, Paper-based electrochemical biosensor for diagnosing COVID-19: detection of SARS-CoV-2 antibodies and antigen, *Biosens. Bioelectron.* 176 (2021) 112912, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112912>.
- F. Cerutti, E. Burdino, M.G. Milia, T. Allice, G. Gregori, B. Bruzzone, V. Ghisetti, Urgent need of rapid tests for SARS CoV-2 antigen detection: evaluation of the SD-Biosensor antigen test for SARS-CoV-2, *J. Clin. Virol.* 132 (2020) 104654, <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104654>.
- S. Eissa, M. Zourab, Development of a low-cost cotton-tipped electrochemical immunosensor for the detection of SARS-CoV-2, *Anal. Chem.* 93 (2021) 1826–1833, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c04719>.
- S. Mavrikou, G. Moschopoulou, V. Tsekouras, S. Kintzios, Development of a portable, ultra-rapid and ultra-sensitive cell-based biosensor for the direct detection of the SARS-CoV-2 S1 spike protein antigen, *Sensors* 20 (2020) 3121, <https://doi.org/10.3390/s20113121>.
- N.K. Singh, P. Jain, S. Das, P. Goswami, Dye coupled aptamer-captured enzyme catalyzed reaction for detection of pan malaria and p. Falciparum species in laboratory settings and instrument-free paper-based platform, *Anal. Chem.* 91 (2019) 4213–4221, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b00670>.

- [39] M. Vargas-Montes, N. Cardona, D.M. Moncada, D.A. Molina, Y. Zhang, J.E. Gómez-Marín, Enzyme-linked aptamer assay (ELAA) for detection of toxoplasma ROP18 protein in human serum, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9 (2019) 1–13, <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00386>.
- [40] E. Wędrowska, T. Wandtke, E. Piskorska, P. Kopyński, The latest achievements in the construction of influenza virus detection aptasensors, *Viruses* 12 (2020) 1–14, <https://doi.org/10.3390/v12121365>.
- [41] M. Sun, S. Liu, X. Wei, S. Wan, M. Huang, T. Song, Y. Lu, X. Weng, Z. Lin, H. Chen, Y. Song, C. Yang, Aptamer blocking strategy inhibits SARS-CoV-2 virus infection, *Angew. Chem. Int. Ed.* 60 (2021) 10266–10272, <https://doi.org/10.1002/anie.202100225>.
- [42] X. Liu, Y. Ling Wang, J. Wu, J. Qi, Z. Zeng, Q. Wan, Z. Chen, P. Manandhar, V. S. Cavener, N.R. Boyle, X. Fu, E. Salazar, S.V. Kuchipudi, V. Kapur, X. Zhang, M. Umetani, M. Sen, R.C. Willson, S. Hsia Chen, Y. Zu, Neutralizing aptamers block S/RBD-ACE2 interactions and prevent host cell infection, *Angew. Chem. Int. Ed.* 60 (2021) 10273–10278, <https://doi.org/10.1002/anie.202100345>.
- [43] Y. Song, J. Song, X. Wei, M. Huang, M. Sun, L. Zhu, B. Lin, H. Shen, Z. Zhu, C. Yang, Discovery of aptamers targeting the receptor-binding domain of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein, *Anal. Chem.* 92 (2020) 9895–9900, <https://doi.org/10.1021/acxanchem.0c01394>.
- [44] A. Schmitz, A. Weber, M. Bayin, S. Breuers, V. Fieberg, M. Famulok, G. Mayer, A SARS-CoV-2 spike binding DNA aptamer that inhibits pseudovirus infection by an RBD-independent mechanism, *Angew. Chem. Int. Ed.* 60 (2021) 10279–10285, <https://doi.org/10.1002/anie.202100316>.
- [45] H. Bin Seo, M.B. Gu, Aptamer-based sandwich-type biosensors, *J. Biol. Eng.* 11 (2017) 1–7, <https://doi.org/10.1186/s13036-017-0054-7>.
- [46] M.A. Morales, J.M. Halpern, Guide to selecting a biorecognition element for biosensors, *Bioconjugate Chem.* 29 (2018) 3231–3239, <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00592>.
- [47] K. Shao, W. Ding, F. Wang, H. Li, D. Ma, H. Wang, Emulsion PCR: a high efficient way of PCR amplification of random DNA libraries in aptamer selection, *PLoS One* 6 (2011), e24910, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024910>.
- [48] M. Vogel, B. Sues, Nucleic acid aptamers: selection, characterization, and application, *Methods Mol. Biol.* 1380 (2016) 113–125, <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3197-2>.
- [49] K.K. Alam, J.L. Chang, D.H. Burke, FASTAptamer: a bioinformatic toolkit for high-throughput sequence analysis of combinatorial selections, *Mol. Ther. Nucleic Acids* 4 (2015) e230, <https://doi.org/10.1038/mtna.2015.4>.
- [50] M. Cho, Y. Xiao, J. Nie, R. Stewart, A.T. Scordas, S.S. Oh, J.A. Thomson, H.T. Soh, Quantitative selection of DNA aptamers through microfluidic selection and high-throughput sequencing, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107 (2010) 15373–15378, <https://doi.org/10.1073/pnas.1009331107>.
- [51] K.H. Lee, H. Zeng, Aptamer-based ELISA assay for highly specific and sensitive detection of Zika NS1 protein, *Anal. Chem.* 89 (2017) 12743–12748, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b02862>.
- [52] G. Figueroa-Miranda, S. Chen, M. Neis, L. Zhou, Y. Zhang, Y. Lo, J.A. Tanner, A. Kreidenweiss, A. Offenhäusser, D. Mayer, Multi-target electrochemical malaria aptasensor on flexible multielectrode arrays for detection in malaria parasite blood samples, *Sensor. Actuator. B Chem.* 349 (2021), <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.130812>.
- [53] H. Zhang, X.-F. Li, X.C. Le, Tunable aptamer capillary electrophoresis and its application to protein analysis, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 34–35, <https://doi.org/10.1021/ja0778747>.
- [54] A.T.H. Le, S.M. Krylova, S.S. Beloborodov, T.Y. Wang, R. Hili, P.E. Johnson, F. Li, R.N. Veedu, S. Belyanskaya, S.N. Krylov, How to Develop and prove high-efficiency selection of ligands from oligonucleotide libraries: a universal framework for aptamers and DNA-encoded small-molecule ligands, *Anal. Chem.* 93 (2021) 5343–5354, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c00601>.
- [55] J. Wang, J.F. Rudzinski, Q. Gong, H.T. Soh, P.J. Atzberger, Influence of target concentration and background binding on in vitro selection of affinity reagents, *PLoS One* 7 (2012), e43940, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043940>.
- [56] S.D. Mendonsa, M.T. Bowser, In vitro selection of high-affinity DNA ligands for human IgE using capillary electrophoresis, *Anal. Chem.* 76 (2004) 5387–5392, <https://doi.org/10.1021/ac049857v>.
- [57] M. Jing, M.T. Bowser, Tracking the emergence of high affinity aptamers for rhVEGF165 during capillary electrophoresis-systematic evolution of ligands by exponential enrichment using high throughput sequencing, *Anal. Chem.* 85 (2013) 10761–10770, <https://doi.org/10.1021/ac401875h>.
- [58] J. Yang, M.T. Bowser, Capillary electrophoresis-SELEX selection of catalytic DNA aptamers for a small-molecule porphyrin target, *Anal. Chem.* 85 (2013) 1525–1530, <https://doi.org/10.1021/ac302721j>.
- [59] C. Zhu, G. Yang, M. Ghulam, L. Li, F. Qu, Evolution of multi-functional capillary electrophoresis for high-efficiency selection of aptamers, *Biotechnol. Adv.* 37 (2019) 107432, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107432>.
- [60] Y.S. Kim, C.J. Hyun, I.A. Kim, M.B. Gu, Isolation and characterization of enantioselective DNA aptamers for ibuprofen, *Bioorg. Med. Chem.* 18 (2010) 3467–3473, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.03.074>.
- [61] T. Schütze, B. Wilhelm, N. Greiner, H. Braun, F. Peter, M. Mörl, V.A. Erdmann, H. Lehrach, Z. Konthur, M. Menger, P.F. Arndt, J. Glöckler, Probing the SELEX process with next-generation sequencing, *PLoS One* 6 (2011), e29604, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029604>.
- [62] T.L. Bailey, M. Boden, F.A. Buske, M. Frith, C.E. Grant, L. Clementi, J. Ren, W. W. Li, W.S. Noble, MEME Suite: tools for motif discovery and searching, *Nucleic Acids Res.* 37 (2009) 202–208, <https://doi.org/10.1093/nar/gkp335>.
- [63] P. Ajawatanawong, Molecular phylogenetics: concepts for a newcomer, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 160 (2017) 185–196, https://doi.org/10.1007/10_2016_49.
- [64] K. Setlem, B. Mondal, S. Ramlal, J. Kingston, Immuno affinity SELEX for simple, rapid, and cost-effective aptamer enrichment and identification against aflatoxin B1, *Front. Microbiol.* 7 (2016) 1–14, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01909>.
- [65] C. Zhu, G. Yang, M. Ghulam, L. Li, F. Qu, Evolution of multi-functional capillary electrophoresis for high-efficiency selection of aptamers, *Biotechnol. Adv.* 37 (2019) 107432, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107432>.
- [66] S.D. Mendonsa, M.T. Bowser, In vitro selection of aptamers with affinity for neuropeptide Y using capillary electrophoresis, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 9382–9383, <https://doi.org/10.1021/ja052406n>.
- [67] R.K. Mosing, S.D. Mendonsa, M.T. Bowser, Capillary electrophoresis-SELEX selection of aptamers with affinity for HIV-1 reverse transcriptase, *Anal. Chem.* 77 (2005) 6107–6112, <https://doi.org/10.1021/ac050836q>.
- [68] J. Tok, J. Lai, T. Leung, S.F.Y. Li, Selection of aptamers for signal transduction proteins by capillary electrophoresis, *Electrophoresis* 31 (2010) 2055–2062, <https://doi.org/10.1002/elps.200900543>.
- [69] B.A.R. Williams, L. Lin, S.M. Lindsay, J.C. Chaput, Evolution of a histone H4-K16 acetyl-specific DNA aptamer, *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2009) 6330–6331, <https://doi.org/10.1021/ja900916p>.
- [70] A. Chen, M. Yan, S. Yang, Split aptamers and their applications in sandwich aptasensors, *TrAC Trends Anal. Chem. (Reference Ed.)* 80 (2016) 581–593, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.04.006>.
- [71] J.P. Elskens, J.M. Elskens, A. Madder, Chemical modification of aptamers for increased binding affinity in diagnostic applications: current status and future prospects, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 1–31, <https://doi.org/10.3390/ijms21124522>.
- [72] F. Odeh, H. Nsaïrat, W. Alshaer, M.A. Ismail, E. Esawi, B. Qaish, A. Al Bawab, S. I. Ismail, Aptamers chemistry: chemical modifications and conjugation strategies, *Molecules* 25 (2020), <https://doi.org/10.3390/molecules25010003>.
- [73] J.G. Walter, Ö. Kökpınar, K. Friehs, F. Stahl, T. Scheper, Systematic investigation of optimal aptamer immobilization for protein-microarray applications, *Anal. Chem.* 80 (2008) 7372–7378, <https://doi.org/10.1021/ac801081v>.
- [74] A. Higuchi, Y.-D. Siao, S.-T. Yang, P.-V. Hsieh, H. Fukushima, Y. Chang, R.-C. Ruan, W.-Y. Chen, Preparation of a DNA Aptamer–Pt complex and its use in the colorimetric sensing of thrombin and anti-thrombin antibodies, *Anal. Chem.* 80 (2008) 6580–6586, <https://doi.org/10.1021/ac8006957>.
- [75] U. Schlecht, A. Malavé, T. Gronewold, M. Tewes, M. Löhndorf, Comparison of antibody and aptamer receptors for the specific detection of thrombin with a nanometer gap-sized impedance biosensor, *Anal. Chem. Acta* (2006) 65–68, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.01.016>, 573–574.
- [76] D. Macdougall, W.B. Crummett, Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry, *Anal. Chem.* 52 (1980) 2242–2249.
- [77] U. Andresson, A. Perret-Liaudet, L.J.C. van Waalwijk van Doorn, K. Blennow, D. Chiasserini, S. Engelborghs, T. Fladby, S. Genc, N. Kruse, H.B. Kuiperij, L. Kulic, P. Lewczuk, B. Mollenhauer, B. Mroczko, L. Parnetti, E. Vanmechelen, M. M. Verbeek, B. Winblad, H. Zetterberg, M. Koel-Simmelink, C.E. Teunissen, A practical guide to immunoassay method validation, *Front. Neurol.* 6 (2015) 1–8, <https://doi.org/10.3389/fneur.2015.00179>.
- [78] G. Figueroa-Miranda, C. Wu, Y. Zhang, L. Nöbel, Y. Lo, J.A. Tanner, L. Elling, A. Offenhäusser, D. Mayer, Polyethylene glycol-mediated blocking and monolayer morphology of an electrochemical aptasensor for malaria biomarker detection in human serum, *Bioelectrochemistry* 136 (2020) 107589, <https://doi.org/10.1016/j.bioelect.2020.107589>.