جدا سازی و استفاده از DNA آپتامرها در تشخیص و شناسائی مورفین

سعید حیدری کشل[1]، غلام رضا بهروزی*[1]، میراطیف موسوی[1]، محمدجواد رسائی[1]، جعفر سلیمیان[2]، اکبر اکبری[3]

1) کمیته تحقیقات دانشجویی، مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
2) مرکز تحقیقات میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)
3) گروه ایمونولوژی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

تاریخ دریافت: 91/8/17 **تاریخ پذیرش: 91/11/21**

چکیده

مقدمه: با توجه به ویژگی های قطعات کوچک نوکلئوتید(الیگونوکلئوتیدهای تک زنجیره ای) از جمله توانائی آن ها در استفاده ابزاری برای تشخیص بعضی از مولکول های کلیدی تصمیم گرفته شد تا تجربیاتی در رابطه با به دست آوردن یک قطعه DNA که تمایل زیادی در اتصال به مولکول مورفین دارد، حاصل گردد.

مواد، روش ها و یافته های پژوهش: برای این منظور ابتدا یک کتابخانه الیگونوکلئوتیدی که شامل دو توالی مشخص 21 و 19 نوکلئوتیدی در دو سر '5 و '3 یک توالی40 نوکلئوتیدی در وسط که از نظر ترتیب اسیدنوکلئیک تصادفی بوده تهیه گردید، با توجه به این که چهار نوع اسیدنوکلئیک وجود دارد و توالی 40 اسید نوکلئیک دارد حدود 10^{15} زنجیره DNA حاصل گردید که استخر الیگونوکلئوتیدی نام برده شد. پس از تکثیر توسط PCR در معرض مولکول هدف که مورفین بود و به یک بستر ثابت شده بود قرار گرفت و پس از شستشو با یک بافر و خروج زنجیره هائی که به مولکول هدف متصل نشده بودند توسط یک بافر دیگر که توانائی جدا کردن زنجیره های DNA را از مولکول هدف داشتند جدا گردید و این عمل تا 15 مرتبه تکرار گردید. سپس در بار آخر از پرایمر هائی استفاده گردید که در انتهای 5 آن یک مولکول فلورسین قرار گرفت و به وسیله تکنیک فلوسایتومتری کارائی زنجیره برای تشخیص مولکول هدف(مورفین) اثبات کنیم.

بحث و نتیجه گیری: مولکول مورفین به واسطه اهمیت آن از نظر اجتماعی، اقتصادی برای دولتمندان کشور، هدفمند انتخاب گردید. در این راستا با استفاده از تجارب دیگر محققین سیستم جداسازی این قطعه نوکلئوتید(الیگونوکلئوتید) طراحی گردید و در نهایت به قطعاتی دست یافتیم که پس از تعیین توالی می توانیم به جای آنتی بادی های مونوکلونال که هم اکنون برای تشخیص مورفین در کیت های سریع به کار می روند استفاده گردد با این تجربه پا به عرصه علوم نانوبیوتکنولوژی می گذاریم که در امتداد آن به استفاده از الیگونوکلئوتیدها در درمان و هم چنین انتقال دارو به سلول های هدف و پیگیری تاثیر دارو بر سلول ها و در نهایت کمک به تصویر برداری خواهیم رسید.

واژه های کلیدی: آپتامر، مورفین، سلکس

* **نویسنده مسئول:** کمیته تحقیقات دانشجویی، مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

Email:

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-20]

مقدمه

آپتامرها اولیگونوکلئوتیدهائی تک زنجیره ای DNA یا RNA با تمایل بسیار بالا برای اتصال به مولکول هدف خود می باشند. آن ها با اختصاصیت و بهگزینی بسیار بالا به واسطه ویژگی شکل ساختمان سوم خود به مولکول هدف متصل می شوند،(۱،۲). لغت آپتامر از کلمه لاتین آپتوس به معنی مناسب گرفته شده است که رفتار قفل و کلید را با مولکول هدف خود دارد،(3)، و از این جهت شباهت بسیاری به آنتی بادی ها دارند. از طرف دیگر این مولکول می تواند مزایائی نیز نسبت به آنتی بادی ها داشته باشد.(جدول شماره 1)

این مزایا به طور خلاصه عبارتند از:

1-سنتز و تولید آپتامر ساده تر از تولید آنتی بادی می باشد.

2-زمان تولید آپتامر بسیار کمتر از زمان تولید آنتی بادی است.

3-توانائی ممانعت از فعالیت هدف بیشتری نسبت به آنتی بادی دارد.

4-به علت کوچک بودن مولکول آپتامر(الیگونوکلئوتید) قابلیت اتصال به جایگاه های فعال هدف را دارا می باشد که حتی به صورت حفره های اپی توپ هستند در صورتی که آنتی بادی چون یک پروتئین بزرگ تر است از این قابلیت برخوردار نیست و اپی توپ های خطی را شناسائی می کند.

5-خاصیت ایمونولوژیکی و سمّیت از آپتامرها دیده نشده است در صورتی که آنتی بادی ها خطر ایمونولوژیکی دارند.

جدول شماره 1. خواص آپتامرها و مقایسه آن ها با آنتی بادی ها

	آپتامر	با آنتی بادی
مدت زمان تولید	8 هفته	تا 6 ماه
سنتز	شیمیائی	بیولوژیکی
ویژگی و میل ترکیبی	بالا، Ks در حد نانومولار	بالا، Ks در حد نانومولار
قدرت مهاری	بالا، 50 درصد موارد مهار کننده هستند	پائین، تنها 1 از 200 مورد
نحوه اتصال به پروتئین	حفره ها و شیارها، اپیتوپ های سه بعدی	قسمتهای بیرونی، اپیتوپ های خطی
ایمونوژنیسیتی و توکسیسیتی	مشاهده نشده است	خطر واکنش های ایمنی
کاربرد	ناک داون پروتئین و کشف دارو	تشخیص و درمان

مرحله تولید آپتامر، سلکس نام دارد که بر اساس سیستم اتصال تدریجی بنا نهاده شده است. سلکس (سیستم اتصال تدریجی بوسیله غنی سازی) به وسیله لاری گلد و گرایج ترک اختراع شده بود و بعد از آن پروفسور تد کواچ روش فتوسلکس را توسعه داد. در سال 1989 وقتی که اتصال یک آنزیم ویروسی به یک توالی ویژه RNA شرح داده شد، آقایان گلد و ترک فهمیدند که می توانند از رابطه بین پروتئین و نوکلئوتید یک کاربرد بسیار وسیع و مفیدی تعریف نمایند،(۵،۶).

آن ها روشی را بنا نهادند که در آن بعضی اولیگونوکلئوتیدها که دارای طول 30 تا 40 باز بودند قابلیت اتصال اختصاصی را به بعضی پروتئین ها دار می باشند این روش گاهی In vitro evolution نام دارد،(2). ایده استفاده از الیگونوکلئوتیدها در تشخیص بعضی مولکول ها اولین بار در سال 1990 به وسیله آقایان الینگتون و سزوستاک مطرح شد و با پیشرفت علوم مولکولی و پایه گذاری تکنیک سلکس آپتامرهای اختصاصی برای بسیاری از مولکول ها جداسازی شد،(۷،۸). این مولکول ها شامل اسیدهای نوکلئیک، اسیدهای آمینه، قندها و پلیمرهای آن ها و هم چنین ترکیبات معدنی و مولکول های سطح سلولی می باشند.(۱۰،۱۹)

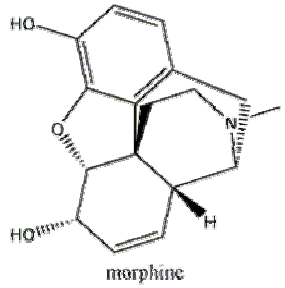
تاکنون مولکول های زیاد دیگری شامل آنزیم ها، فاکتورهای رشد، آنتی بادی ها، فاکتورهای مربوط به تنظیم ژن، مولکول های چسبیده به سلول و کیتین ها و حتی اجزاء ویروسی به

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-20]

عنوان هدف برای جداسازی آپتامرهای آن ها مورد آزمایش قرار گرفته اند. آپتامرها امروزه به عنوان یک ابزار قوی جهت شناسائی، درمان و تصویربرداری مورد توجه محققان علوم بیولوژی قرار گرفته است.

از آن جا که مولکول مورفین از نظر ویژگی های ذاتی از نظر اقتصادی و اجتماعی بسیار حائز اهمیت است، تصمیم گرفته شد که به عنوان مولکول هدف جهت جداسازی یک یا چند دسته از قطعات DNA آپتامر مورد استفاده قرار گیرد تا در صورت موفقیت در مراحل بعدی از این قطعات جهت طراحی یک کیت سریع تشخیص گام برداشته شود.

مولکول مورفین با فرمولC17H19NO3، دارای ساختمان پنج حلقه ای است که یک حلقه آن عمود بر دیگر حلقه ها می باشد،(4).(شکل شماره 1)



شکل شماره 1. فرمول ساختمانی مولکول مورفین

مواد و روش ها

مواد مورد نیاز شامل استخر الیگونوکلئوتیدی تهیه شده از شرکت(کیاژن)، ژل سفاروز 4B که به وسیله بروموسیانید فعال شده بود، تهیه شده از شرکت(سیگما)، مورفین متصل به آلبومین سرم گاوی تهیه شده توسط شرکت(گیبکو)، محلول فسفات سالین 17 میلی مولار(کلرید سدیم 9 گرم در لیتر، فسفات هیدروژن دی سدیم 0/9 گرم در لیتر، فسفات دی هیدروژن سدیم 0/4 گرم در لیتر) که جهت شستشو به کار می رود، محلول اوره(اوره 7 مولار، EDTA 5 میلی مولار، PH=8) جهت شستشوی نهائی قطعات DNA، هم چنین ابزار مورد نیاز شامل دستگاه ترموسایکلر(Eppendrof)، سانتریفیوژ یخچال دار، الکتروفورز و ترانس لومینیتور می باشد.

ابتدا ستون کروماتوگرافی تمایلی باید آماده گردد. برای این منظور ژل سفاروز را به وسیله پنج برابر حجم آن آب مقطر آماده ساخته و پس از یک ساعت انکوبه کردن در دمای 4 درجه به وسیله اسیدکلریدریک 1 میلی مولار جهت فعال کردن گروه های متصل شستشو نمودیم. سپس مخلوط حاصل را با بافر اتصال آن قدر شستشو دادیم تا PH آن به 8 رسید. به موازات این عمل پروتئین آلبومین گاوی که مولکول مورفین به عنوان مولکلول هدف به آن متصل بود، را در کیسه دیالیز ریخته و کیسه را در بافر اتصال(کربنات سدیم 100 میلی مولار، کلریدسدیم 500 میلی مولار) سه بار به تعادل رساندیم. بعد از این عمل، پروتئین را به ژل، در بافر اتصال افزوده و به مدت 16 ساعت در حال هم خوردن در دمای 4 درجه سانتی گراد به هم متصل کردیم. در آخر نیز به وسیله افزودن 5 برابر حجم ژل متصل به پروتئین از اتانل آمین 1 مولار به مدت 8 ساعت عوامل فعال متصل نشده ژل را غیرفعال نمودیم. شستشو ژل به وسیله بافر سالین فسفات با PH 4 به طوری که PH محلول خروجی از شستشو به 8/4 برسد آخرین مرحله برای آماده سازی ستون کروماتوگرافی تمایلی بود.

در کنار این عمل یک ستون دیگر به شرح بالا را آماده سازی نمودیم با این تفاوت که پروتئین آلبومین گاوی فاقد مولکول مورفین بود. این ستون را برای آن

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-20]

آماده گردید که در هر بار عمل اتصال قطعات آپتامر به ستون اصلی، آن ها را ابتدا با این ستون مجاور ساخته تا قطعاتی که تمایل به اتصال به اجزاء ستون را دارند از کل قطعات کم گردد. بدین ترتیب ما قطعاتی را خواهیم داشت که اگر به مولکول هدف تمایل داشته باشند به آن متصل شده و در غیر این صورت از ستون اصل خارج خواهند شد.

کتابخانه اولیگونوکلئوتیدی

این کتابخانه شامل یک توالی 80 توکلئوتیدی است که ترکیبی از 21 نوکلئوتید با توالی مشخص در سر '5 و 19 نوکلئوتید با توالی مشخص در سر '3 آن جهت جایگاه اتصال پرایمر و یک قطعه 40 نوکلئوتیدی با توالی نامشخص در وسط می باشد(-'5 CAT CCA TGG GAA TTC GTC GAC (NNN)13N CT GCC TAG GCT CGA GCT CG-3'). این کتابخانه به طور عملی و تجربی تقریباً شامل 10^{15} نوع مختلف نوکلئوتید می باشد. آغازگر(پرایمر) برای توالی های مشخص شامل: F(5'-CAT CCA TGG GAA TTC GTC GAC-3') و R(5'-CTG CCT AGG CTC GAG CTC G-3') می باشد که البته از آغازگر فوروارد دو نوع ساخته شد یکی ساده و یکی توسط مولکول فلورسئین از طرف '5 نشان دار شده بود. لازم به توضیح است که آغازگر اخیر(نشان دار) جهت انجام تکنیک فلوسایتومتری در مرحله آخر مورد استفاده قرار گرفت. برنامه واکنش زنجیره ای پلیمراز برای قطعات کتابخانه اولیگونوکلئوتیدی شامل :1- 95 سانتی گراد 5 دقیقه. 2- 94 درجه سانتی گراد 30 ثانیه. 3- 62 درجه سانتی گراد 30 ثانیه. 4- 72 درجه سانتی گراد 30 ثانیه. 5- 72 درجه سانتی گراد 5 دقیقه(مرحله 2 الی 4، 30 بار تکرار می گردد).

پنینگ

عملیات پنینگ شامل یک چرخه می باشد که در آن، ابتدا قطعات کتابخانه اولیگونوکلئوتیدی در مجاورت ستون کروماتوگرافی تمایلی بدون ملکول هدف قرار گرفته تا قطعات زائد از کل قطعات جداسازی شده و در مرحله بعد در مجاورت ستون کروماتوگرافی تمایلی دارای مولکول هدف(مورفین) قرار می گیرد و پس از شستشوی قطعات متصل نشده به وسیله بافر شستشو، با تغییر PH محیط به وسیله محلول 7 مولار اوره قطعات موردنظر را از ستون جداسازی می گردد. به این مراحل سیستم اتصال تدریجی به وسیله غنی سازی(سلکس) می گویند.

برای انجام پنینگ ابتدا کتابخانه اولیگونوکلئوتیدی را به مدت 5 دقیقه در دمای 90 درجه سانتی گراد قرار دادیم تا قطعات دو زنجیره ای را به تک زنجیره تبدیل شوند و بلافاصله آن را به مدت 2 دقیقه در حمام یخ قرار می دهیم تا قطعات تک زنجیره ای یک دو زنجیره را با توالی خود برقرار نمایند(ساختمان دوم و سوم فضائی به وسیله توالی خود تشکیل دهند). سپس این مخلوط را در دمای اتاق قرار دادیم. حالا کل قطعات را در ستون اول که فاقد مولکول هدف بود به مدت 30 دقیقه تیمار داده و محلول عبور کرده از ستون را در مجاورت ستون دوم که حاوی مولکول هدف(مورفین) بود به مدت 30 دقیقه تیمار دادیم و پس از این زمان محلول عبوری را درو ریز نموده و ستون را با فسفات بافر سالین 17 میلی مولار با PH 7/2 شش تا ده بار شستشو داده و در آخر ستون را با محلول اوره 7 مولار شستشو نمودیم. لازم به ذکر است که اجازه می دهیم تا اوره به مدت 15 دقیقه در مجاورت ستون قرار گیرد. و هم چنین برای شستشوی در چرخه های بعدی به تربیت به بافر شستشو مقادیر 0/1 درصد الی 0/5درصد می افزائیم تا قدرت جداکنندگی قطعاتی که اتصال ضعیف برقرار نموده اند را افزایش دهد.

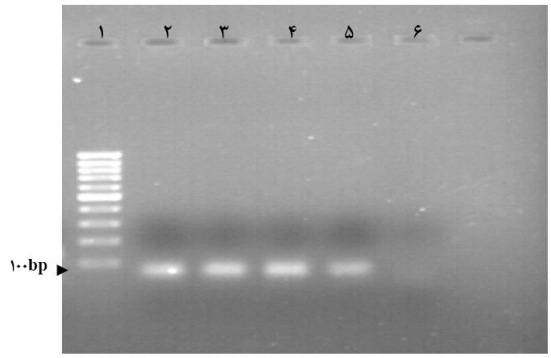
در آخر هر چرخه ستون ها را به وسیله فسفات بافر سالین ده بار شستشو دادیم تا برای چرخه بعد آماده شوند. قطعات آپتامر که در محلول اوره می باشند را به روش رسوب به وسیله اتانل از آن جداسازی نمودیم و قطعات به دست آمده را به وسیله واکنش زنجیره پلی مراز تکثیر کرده و وارد چرخه بعدی شدیم و این عمل را تا چرخه 15 تکرار نمودیم. در چرخه آخر به جای استفاده از آغازگر فوروارد معمولی از آغازگر نشان دار شده استفاده نمودیم. زنجیره های حاصل دارای یک سر '5 نشان دار شده بود. قطعات به دست آمده از این مرحله را به دو قسمت مساوی تقسیم نموده و در دو ستون یکی حاوی مولکلول مورفین و دیگری فاقد آن به مدت 30 دقیقه مجاور ساختیم و محلول عبوری از ستون را در لوله های جداگانه ذخیره نمودیم

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-20]

و پس از 6 بار شستشوی ستون ها به وسیله بافر سالین فسفات آن را نیز به لوله های قبلی افزودیم. پس از شستشوی ستون به آن محلول اوره 7 مولار افزوده و پس از 15 دقیقه آن را نیز از ستون جدا نموده و ستون را به وسیله بافر شستشو 6 بار شستشو داده و در لوله های جداگانه نگهداری نمودیم. بدین ترتیب چهار لوله به شرح ذیل خواهیم داشت. لوله شماره 1 حاوی قطعاتی که به ستون حاوی مولکول مورفین متصل نشده اند. لوله شماره 2 حاوی قطعاتی که به ستون فاقد مولکول مورفین متصل نشده اند، لوله شماره 3 حاوی قطعاتی که به ستون حاوی مولکول مورفین متصل شده اند، لوله شماره 4 حاوی قطعاتی که به ستون فاقد مولکول مورفین متصل شده اند. با اندازه گیری تعداد قطعات لوله شماره 3 و 4 به وسیله دستگاه فلوسایتومتر می توان اختلاف معنی دار میزان اتصال قطعات به مولکول مورفین را بررسی نمود. هم چنین با اندازه گیری تعداد قطعات لوله شماره 1 و 2 نیز می توان این اختلاف را تأیید نمود.

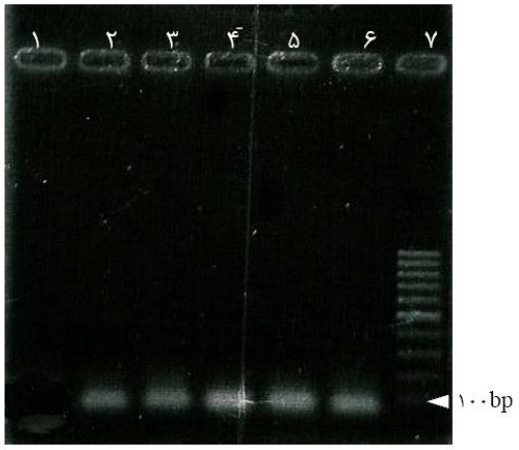
یافته های پژوهش

تکثیر قطعات حاصل از کتابخانه اولیگونوکلئوتیدی به شرح ذیل است(شکل شماره 2) :



شکل شماره 2. قطعات تکثیر شده حاصل از کتابخانه اولیگونوکلئوتیدی
چاهک شماره 1 مارکر 100-1000، چاهک شماره 2-5 محصول تکثیری، چاهک شماره 6 کنترل منفی

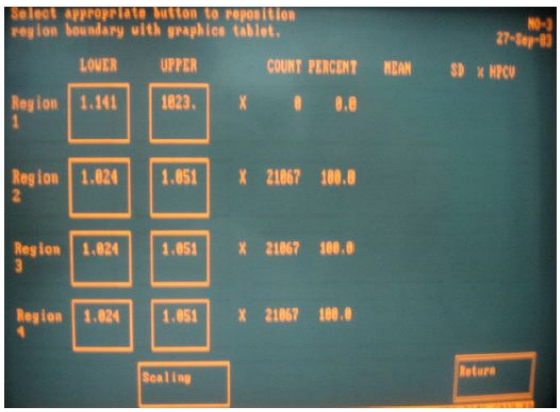
نتیجه تکثیر واکنش زنجیره ای پلی مراز با آغازگر نشان دار در شکل شماره 3 نشان داده شده است.



شکل شماره 3 . ژل الکتروفورز حاصل از PCR با پرایمر فوروارد فلورسئین
چاهک شماره 1 کنترل منفی، چاهک شماره 2-6 محصول تکثیری، چاهک شماره 7 مارکر

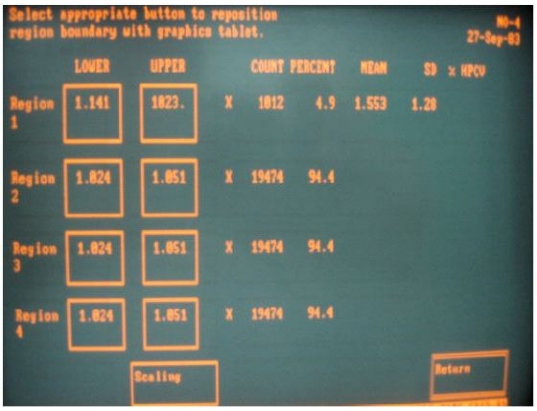
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-20]

نتیجه حاصل از فلوسایتومتری لوله شماره 4 (قطعات متصل به ستون بدون مورفین) که فاقد هرگونه فلورسئین می باشد. (شکل شماره 4)



شکل شماره 4 . اعداد حاصل از فلوسایتومتری لوله شماره 4 (قطعات متصل به ستون بدون مورفین) چرخه سیزدهم که فاقد هر گونه فلورسئین می باشند، صفر درج گردیده است

نتیجه حاصل از فلوسایتومتری لوله شماره 3 (قطعات متصل به مورفین)در شکل شماره 5 نشان داده شده است.



شکل شماره 5 . عدد حاصل از فلوسایتومتری لوله شماره 3 (قطعات متصل به مورفین) چرخه سیزدهم 4/9 درصد درج گردیده است.

همان گونه که در نتایج مشخص است در لوله شماره 3 که حاوی مورفین بود تعدادی قطعات آپتامر به مورفین موجود متصل گردید. اما در لوله شماره 4 که فاقد مورفین بود هیچ قطعه ای متصل نگردیده است. می توان نتیجه گیری نمود که قطعات فقط به مولکول موفین متصل شده اند.

در چرخه آخر هیچ یک از قطعات به ستون بدون مورفین متصل نشده اند این در حالی است که تقریباً 25 درصد از قطعات به مولکول مورفین متصل شده اند و از طرفی هم در انجام PCR آخر از آغازگر فوروارد نشان دار استفاده نمودیم و در حقیقت نیمی از محصول نشان دار بودند بنا بر این می توان این گونه محاسبه نمود که تقریباً 50 درصد از کل قطعات به مولکول مورفین متصل شده اند. از آن جا که در هر ستون تقریباً 460 میکروگرم DNA به کار رفته بود بنا بر این به ازاء 1/4 میلی گرم مورفین تقریباً 230 میکروگرم به مورفین متصل شده اند.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-20]

بحث و نتیجه گیری

باید به این نکته توجه داشت که حاصل سلکس به دست آوردن یک زنجیره DNA آپتامر واحد با یک توالی خاص نیست بلکه محصول سلکس یک یا چند خانواده از قطعات آپتامر است.(۱۱،۱۲)

در بین خانواده های مختلف آپتامر قطعاتی وجود دارند که تمایل بیشتر نسبت به بقیه خواهند داشت. این مطلب را می توان این گونه تفسیر نمود که در یک توالی نوکلئوتیدی ما دو دسته باز پورین و پیریمیدین خواهیم داشت که اگر بازهای پورینی به جای یکدیگر یا بازهای پیریمیدینی به حای یکدیگر قرار گیرند شاید در تشکیل ساختمان سوم(فضائی) تغییری حاصل نشود. به عبارت دیگر با تغییر بعضی از بازها که در جایگاه فعال قطعات آپتامر قرار ندارند هیچ تغییری در عملکرد این قطعات به وجود نیاید.

این قطعات می توانند در طراحی کیت های سریع بر مبنای ایمونواسی بسیار مناسب باشند و به جای مونوکلونال آنتی بادی که تهیه آن به شرایط زیستی بستگی دارد به عنوان یک مولکول اختصاصی برای اتصال به مولکول هدف بکارگیری شوند. حتی می توان برای جداسازی مولکول های هدف در حد نانوگرم از این مولکول ها در ستون های کروماتوگرافی تمایلی استفاده نمود.

References

1-Goodman AL,Theodore WR, Ferid M. The pharmacological Basis of Therapeutics. Seventh Edition. New York Macmillan Publishing company ;PP.491-581,1985.

2-Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligand by exponential enrichment: RNA Ligand to bacteriophage T4 DNA Polymerase. Sience 1990;10:249-550.

3-Elington AD, Szustak JW. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligand. Nature 1990;346:818-22.

4-Laurie D, Manson AJ, Rowell FJ, Seviour J. A rapid, qualitative ELISA test for the specific detection of morphine in serum or urine. Clin Chim Acta 1989;183:183-95.

5-William DG, Hatch DJ, Howard RF. Codeine phosphate in paediatric medicine. Br J Anaesth 2001;86:413-21.

6-Kim I, Barnes AJ, Oyler JM, Schepers R, Joseph RE Jr, Cone EJ, et al. Plasma and oral fluid pharmacokinetics and pharmacyodynamics after oral codeine administeration. Clin Chem 2002;48:1486-96.

7-Jayasena SD. Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. Clin Chem 1999;45:1628-50.

8-Silverman SK. Rube Goldberg goes (ribo)nuclear? Molecular switches and sensors made from RNA RNA 2003;9:377-83.

9-O'Sullivan CK. Aptasensors--the future of biosensing? Anal Bioanal Chem 2002; 372:44-8.

10-Hesselberth JR, Robertson MP, Knudsen SM, Ellington AD. Simultaneous detection of diverse analytes with an aptazyme ligase array. Anal Biochem 2003;312: 106-12.

11-Seetharaman S, Zivarts M, Sudarsan N, Breaker RR. Immobilized RNA switches for the analysis of complex chemical and biological mixtures. Nat Biotechnol 2001; 19:336-41.

12-Allen RS, Millgate AG, Chitty JA, Thisleton J, Miller JA, Fist AJ, et al. RNAi-mediated replacement of morphine with the nonnarcotic alkaloid reticuline in opium poppy. Nat Biotechnol 2004;22:1559-66.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-20]

Separation and Application of DNA Aptamer for Detection of Morphine

Heidari Keshel S[1], behrozi G.R[1] , Mosavi M[1], rasaee M.J[1], Salimian J[2], Akbari A[3]

(Received: 7 Nov. 2012 Accepted: 9 Feb. 2013)

Abstract

Introduction: With regard to the characteristics of single-stranded oligonucleotides, including their potential for implemental use in order to detect some key molecules, it was determined to gain experience in obtaining single-stranded DNA (ssDNA) having affinity for binding to morphine molecules.

Materials, methods & Findings: An oligonucleotide library was prepared, consisting of an 80-nucleotide sequence with fixed length flanked by constant 5′ and 3′ ends, a 19-nucleotide sequence from 3′-end, a 21-nucleotide sequence from 5′-end that serve as primer, and a 40-nucleotide random sequence in the middle. Four types of nucleic acid and the 40-nucleotide sequence are mathematically equaled with 1015 DNA chains known as oligonucleotide pool. After amplification by PCR, the aptamers were exposed to the matrix-bound morphine molecules. After rinsing with a buffer and eliminating the chains, not bound to morphine molecule, they were separated using washing buffer, having potential to separate DNA chains from the target molecule. This act was repeated 15 times. Lastly, those primers were used in which one fluorescein molecule was placed at its 5′-end and flow cytometry results proved the efficiency of the chain in detection of target molecule (morphine).

Discussion & Conclusion: Morphine molecule was chosen due to its social and commercial importance for governments. For this reason, the separation of this nucleotide segment (oligonucleotide) was designed by applying the experience of other researchers and some segments were eventually obtained, which can be utilized instead of monoclonal antibodies in detecting morphine in rapid kits after detection of sequences. Therefore, we enter to nanobiology and we will achieve applying oligonucleotides in treatment, drug delivery into the target molecule, follow up the effect of the drug on cells, and finally help imaging.

Keywords: aptamer, morphine, SELEX

1. Student Research committee, Proteomics Research Center, Faculty of paramedical sciences, Shahid Beheshti University of medical sciences, Tehran Iran
2. Microbiology Research Center, Baghyatollah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Dept of Immunology, Faculty of Medicine, Ilam, Iran
**(correspondence author)*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-20]