

APTAMERY – FUNKCE, VZNIK, CHARAKTERIZACE

1. ÚVOD

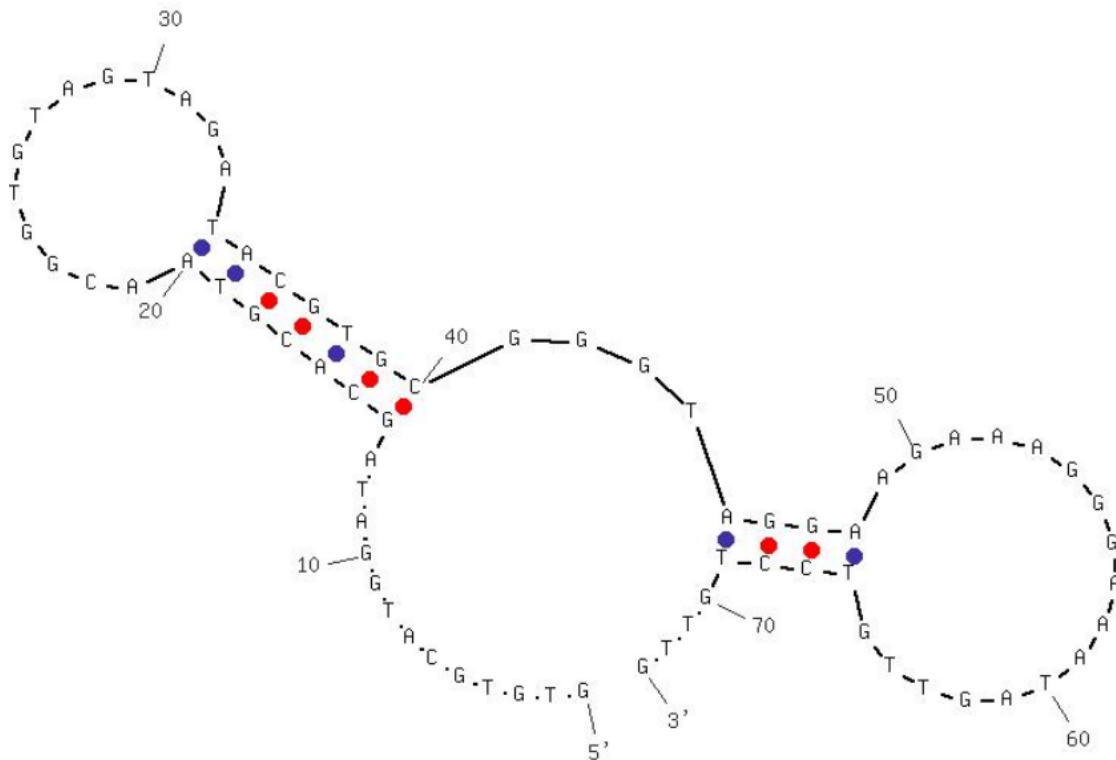
Aptamery jsou synteticky vytvořené oligonukleotidy kyseliny ribonukleové (RNA) a jednořetězcové deoxyribonukleové kyseliny (ssDNA), nebo peptidové molekuly, které se mohou vázat na cílové molekuly s vysokou afinitou a specificitou díky jejich specifické trojrozměrné struktuře. RNA a ssDNA aptamery se od sebe mohou lišit jak sekvencí nukleotidů, tak i strukturním uspořádáním, a to i když se vážou ke stejnému cíli. Koncepce spojení nukleových kyselin s proteiny se začaly objevovat v roce 1980 na základě výzkumu viru lidské imunodeficiency (HIV) a adenoviru. Je uvedeno, že tyto viry kódují množství malých strukturovaných RNA, které se váží k virovým nebo buněčným proteinům s vysokou afinitou a specificitou [1].

Od roku 1990, kdy byla poprvé popsána metoda syntetické výroby oligonukleotidů SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment), se studie na téma aptamerů staly velmi oblíbeným tématem pro publikace [2, 3]. Vzhledem k rozvoji SELEXu, který je nyní základní technikou pro izolaci aptamerů, mohou být různé aptamery vybrány in vitro přímo proti nejrůznějším cílům a to od malých biomolekul, přes proteiny až po celé buňky [4].

Aptamery byly studovány jako biomateriál pro diagnostické a terapeutické účely, biosenzorické sondy ve vývoji nových léků, systémů podávání léčiv apod. Cílem těchto studií bylo vyhledat takové aptamery, které jsou specifické pro cílové buňky či molekuly typické pro různá onemocnění, jako jsou onkologická onemocnění nebo virové infekce. V dnešní době má uplatnění aptamerů velký význam, jde o velmi široké pole působnosti, především v diagnostické sféře jako terapeutický nástroj [5].

2. CÍLOVÉ MOLEKULY APTAMERŮ

Synteticky vytvořené oligonukleotidy jsou navrženy tak, aby vynikaly velkou afinitou a naprostou specificitou k jednomu určenému cíli. Metodou zvanou SELEX je možné vytvořit aptamery pro neimunogenní a toxické cílové molekuly, což je velká výhoda ve srovnání s protilátkami imunitního systému, které na takové cílové molekuly nedokážou reagovat [6]. Do této chvíle byly aptamery vyrobeny k celé řadě cílů, včetně kovových iontů (např. K^+ , Hg^{2+} a Pb^{2+}), malých organických molekul (např. aminokyseliny, ATP, antibiotika, vitaminy a kokain) barviv, peptidů a proteinů (např. trombin, růstové faktory a peptidy spojené s HIV), a dokonce i k celým buňkám nebo mikroorganismům (např. bakterie) [7-10]. Dostupnost tak širokého spektra aptamerů je velmi důležitá a to zejména ve vývoji nových nástrojů v oblasti BioAssay, což zahrnuje životní prostředí, analýzu potravin a nástroje proti bioterorismu [11].



Obr. 1.: Struktura aptameru proti hemaglutininu viru chřipky typu H5N1

3. APTAMERY VERSUS PROTILÁTKY

Protilátky byly více než tři desítky let považovány za nejpůvodnější třídu molekul hojně využívanou v molekulární biologii pro identifikaci nejrůznějších látek. Nyní jejich místo začaly zaujímat synteticky vytvořené oligonukleotidy. Aptamery jsou všeobecně známé jako mnohem lepší obdoba protilátek, jelikož je dokážou nejen dokonale nahradit, ale také překonat jejich nedostatky[4]. V následujícím přehledu jsou uvedeny některé výhody aptamerů ve srovnání s protilátkami.

- a) **Vysoká stabilita aptamerů:** Proteiny snadno podléhají denaturaci a při vysokých teplotách ztrácí svoji terciární strukturu, naproti tomu oligonukleotidy jsou tepelně stabilní a disponují funkcí zachovat si svoji strukturu i po opakovaných cyklech denaturace/renaturace. První výhodou aptameru na bázi oligonukleotidu nad proteinovou protilátkou je tedy jeho stabilita při vyšších teplotách. Nativní konformace aptamerů může být obnovena, zatímco protilátky snadno podléhají nevratné denaturaci[12].
- b) **Výroba aptamerů:** Identifikace a výroba monoklonálních protilátek jsou pracné a velmi nákladné procesy zahrnující screening velkého počtu kolonií. Navíc klinické komerční úspěchy protilátek vedly k potřebě velkého rozsahu výroby kultury savčích buněk [13]. Naproti tomu aptamery, pokud jsou jednou vybrány a vytvořeny, mohou být syntetizovány ve velkém množství s velkou přesností a reprodukovatelností.

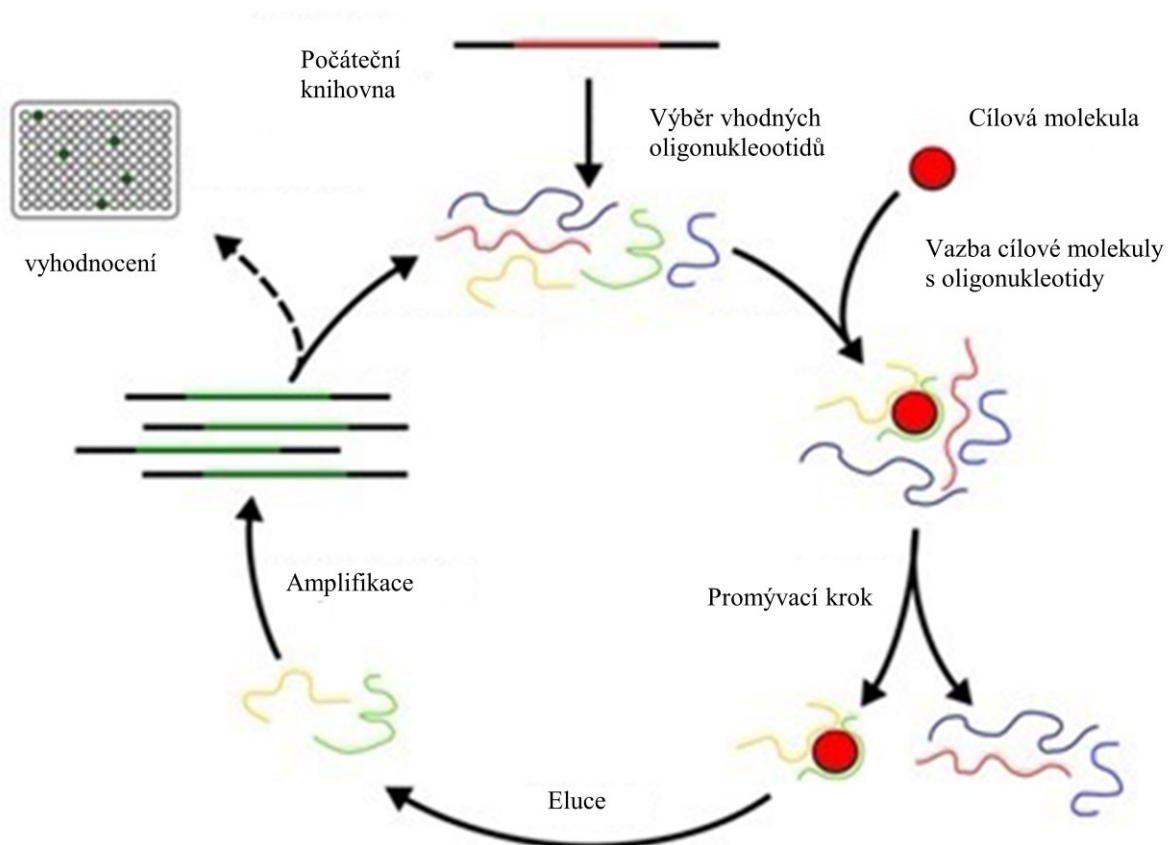
Aptamery mohou být snadno upravovány různými chemickými reakcemi sloužícími ke zvýšení jejich stability a odolnosti proti působení nukleáz. Do jejich struktury je také možné zavést různé fluorofory a zhasěče, které usnadňují následné zhotovení biosenzorů[6, 14].

- c) **Nízká imunogenicita aptamerů:** U aptamerů se předpokládá nízká imunogenicita a nízká toxicita, jelikož nukleové kyseliny nejsou typicky rozpoznávány lidským imunitním systémem jako cizorodé látky. Naproti tomu, protilátky jsou výrazně imunogenní, což vylučuje jejich opakované podání[15].
- d) **Různé cílové molekuly:** V případech, toxinů nebo molekul, které nevyvolávají silné imunitní reakce, je obtížné identifikovat a vyrobit protilátky, ale aptamery mohou být generovány v dostatečném množství. Kromě toho, aptamery vykazují vysokou afinitu a specifitu pro některé ligandy, které nelze rozpoznat pomocí protilátek, jako jsou ionty nebo malé molekuly[6].

4. VÝROBA APTAMERŮ – SELEX

Aptamery jsou chemicky syntetizovány a vybrány pro svou vysokou afinitou a specificitou pro určitý cíl prostřednictvím SELEX procesu. Tato metoda byla nezávisle objevena dvěma skupinami vědců Goldem a Tuerkem, a Ellingtonem a Szostakem v roce 1990.

Při zahájení SELEX postupu pro izolaci aptamerů je prvním krokem výběr knihovny DNA nebo RNA oligonukleotidů. Tady se nejprve náhodně generuje sekvence nukleotidů na středové oblasti. Tyto oligonukleotidy jsou pak vystaveny cílové molekule za požadovaných podmínek. Podmnožina oligonukleotidů je vázána k cílovému objektu a je tedy potenciálně vytvářen požadovaný aptamer. V dalším kroku jsou odseparovány oligonukleotidy, které nevykazují vazebné schopnosti k cílové molekule. Oligonukleotidy, které mají afinitu k cílové molekule, jsou zmnoženy pomocí polymerázové řetězové reakce a je vytvořena další specifitější a menší knihovna potencionálních aptamerů. Tyto aptamery jsou znovu vystaveny cílové molekule a ty, které vykazují afinitu a vážou se k cíli, jsou opět zmnoženy metodou PCR. Tento proces je opakován pětkrát až patnáctkrát, aby byly vyizolovány aptamery, které mají opravdu nejlepší vazebné vlastnosti. Aby byla zajištěna co nejvyšší specifita vazby aptameru na cílový objekt, je využito procesu negativní selekce, při kterém se používá cílů, které jsou strukturně podobné, ale ne identické. Aptamer, který se váže specificky a velmi citlivě na cílovou molekulu, se tímto způsobem může objevit a amplifikovat. Aptamery vybrané prostřednictvím SELEX procesu mají disociační konstanty v rozmezí od pico-molárních do nano-molárních hodnot. Pokud je SELEX prováděn ručně, může dokončení tohoto procesu trvat více než několik měsíců, s použitím robotického přístroje jsou v dnešní době vědci schopni dokončit experiment v horizontu několika dnů[2, 3].



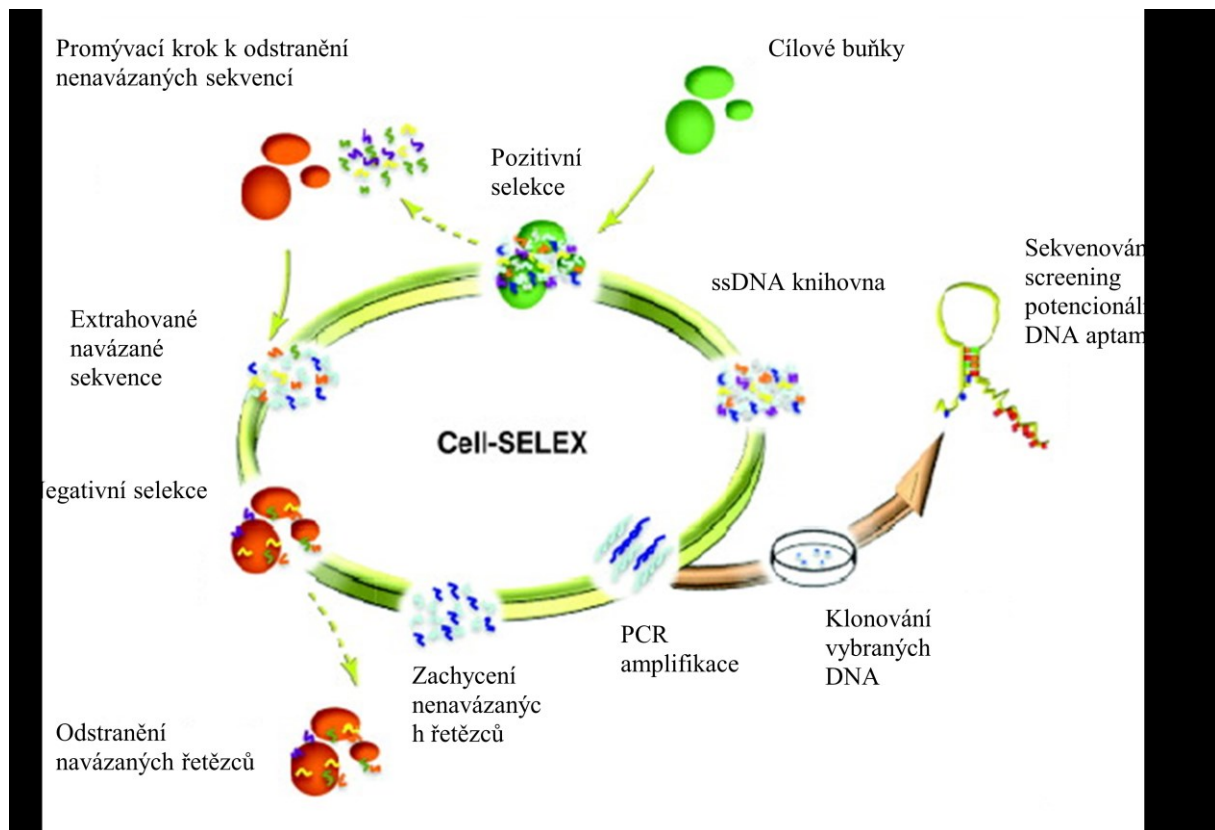
Obr. 2.: Obecné schéma metody in vitro selekce aptamerů SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment)

Cell-SELEX

K velmi zajímavému rozšíření klasické SELEX metody patří i Cell-SELEX. Největším rozdílem od tradičního typu SELEXU je použití celé živé buňky jako cílového objektu. Cell-SELEX se nejčastěji používá k nálezů a izolaci aptamerů, které jsou specifické ke známým nebo nově nalezeným povrchovým znakům buněk[16-18].

Cell-SELEX má tu výhodu, že pomocí této metody je možné vytvořit specifické aptamery proti požadovanému typu buněk i v případě, že cílem budou naprosto neznámé povrchové buněčné znaky. Jak je známo, každá buňka na svém povrchu exprimuje jisté buněčné markery bílkovinného původu. Při některých onemocněních, jako je například rakovina, mohou být hladiny některých povrchových markerů zvýšeny, popřípadě může nastat jejich modifikace a mohou se z nich vytvořit markery zcela jiné se zcela jinou funkcí. Tyto zmnožené či modifikované markery mohou být použity k rozlišení zdravých buněk a buněk poškozených či pozměněných danou nemocí. Díky tomuto faktu, mohou být a byly vytvářeny aptamery specifické k povrchovým buněčným markerům buněk postižených například T-buněčným lymfomem, glioblastomem, nebo malobuněčným plicním karcinomem.

Ani Cell-SELEX však není bez nedostatků. Během tohoto procesu mohou být buňky poškozeny, dokonce podlehnout buněčné smrti v průběhu oddělování navázaných aptamerů od nenavázaných. Tyto mrtvé buňky pak mohou nespecificky vázat aptamery a tím snižovat specifitu skupiny aptamerů pro požadovaný proteinový cíl. V současné době je výzkum zaměřen na oddělování zdravých buněk od těch, které podlehly buněčné smrti, nebo byly mechanicky poškozeny. Tyto dvě populace buněk je možné oddělit pomocí metody vysokorychlostního fluorescenčně aktivovaného třídění (FACS). Problém nespecifické vazby aptamerů má příčinu v existenci většího množství povrchových buněčných znaků u mobilních buněk. Z tohoto důvodu může být aptamer vázán na jiné proteiny buněčné membrány a díky tomu projít SELEXem jako specificky navázaný aptamer. Proto je výše zmíněná negativní selekce velmi důležitým krokem pro celou metodu, což však znamená zvýšení počtu kol SELEXu a tím snížení účinnosti procesu[16].



Obr. 3.: Schéma průběhu metody Cell-SELEX

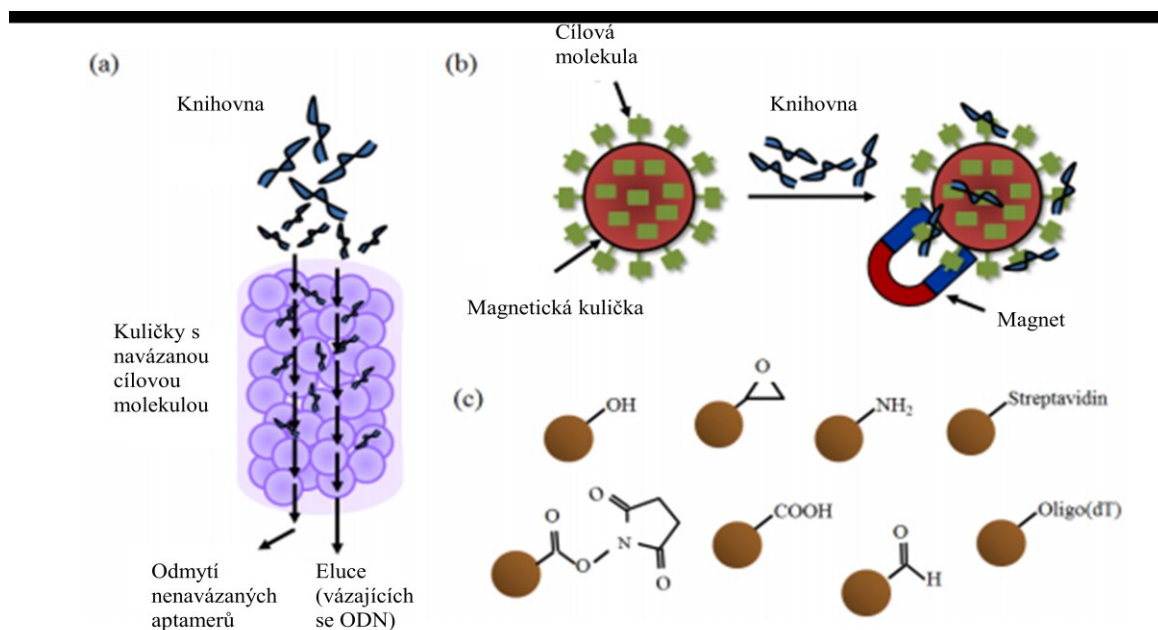
Tissue-SELEX

Další variace SELEXu se nazývá Tissue-SELEX. V tomto procesu dochází k izolaci aptamerů specifických k části nádorové tkáně. Tyto aptamery se mohou vázat na různé komponenty nádoru, včetně extracelulární matrix, buněčné membrány a intracelulární složky [16]. Tohoto procesu je dosaženo vystavením řezů tkáně pocházejícím z nemocí zasažené oblasti směsí

aptamerů. Zdravá tkáň je taktéž vystavena směsi aptamerů a slouží jako kontrolní vzorek. Poté je možné identifikovat aptamery vážící se pouze na poškozené tkáň. Tato metoda byla v nedávné době rozšířena o aplikaci in vivo do laboratorních myší trpících onkologickým onemocněním. Díky tomu je možné identifikovat RNA aptamery, které rozpoznávají buněčné markery různých nemocí, jako je rakovina tlustého střeva či metastázy při rakovině jater[19].

SELEX založený na afinitní chromatografii a magnetických částicích

Afinitní chromatografie je metoda sloužící pro oddělování složek z biochemické směsi. Používá se především pro čištění rekombinantních proteinů, na základě vysoce specifické biologické interakce mezi receptorem a ligandem nebo antigenem a protilátkou. Imobilní fáze se obecně skládá z kuliček na bázi agarózy, kuličky jsou umístěny v koloně kde plní funkci v promývacích a elučních procesech. Afinitní chromatografie je v metodě SELEX použita ve vazebných a separačních krocích při výběru knihoven oligonukleotidů s afinitou k cílové molekule a při imobilizaci cílových molekul k magnetickým kuličkám. Nevýhodou této metody je to, že nemůže být použita v případě, že cílová molekula postrádá afinitní tag nebo funkční skupiny potřebné pro spojení s magnetickými kuličkami. Magnetické kuličky jsou také používány pro imobilizaci cílové molekuly prostřednictvím interakce nebo chemické reakce mezi afinitní značkou a substrátem na kuličce. Použití magnetických kuliček je obzvláště účinný nástroj pro snadnou a rychlou separaci cílových objektů navázaných na kuličkách pomocí vnějšího magnetického pole[20-22].



Obr. 4.: (a) Schématické znázornění selektivního kroku s použitím afinitní kolony; (b) selektivní krok s použitím magnetických kuliček; (c) několik typů funkčních skupin, které jsou schopné aktivovat magnetické kuličky.

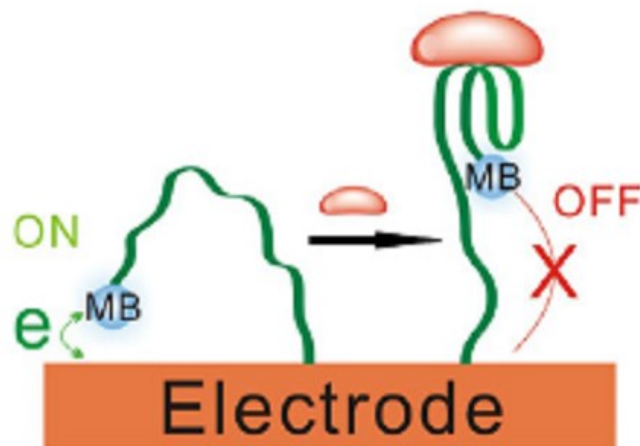
5. POUŽITÍ APTAMERŮ – APTAMEROVÉ BIOSENZORY

Biosenzor založený na aptameru jako rozpoznávacím prvku se nazývá APTASENZOR. Biosenzory na bázi aptamerů nabízí výhodu v možnosti znovu použití povrchu elektrody, na rozdíl od protilátek. Navíc, jejich malá velikost a univerzálnost umožňuje efektivní imobilizaci při vysoké hustotě, která má zásadní význam pro miniaturizované systémy (např. bioarrays nebo bio-čipy). Biosenzory na bázi aptamerů se dají rozdělit do několika skupin.

a) Elektrochemické aptasenzory

Aptamery jednořetězcových nukleových kyselin jsou flexibilní a disponují funkcí složení jejich řetězce do dobře definovaných 3D struktur. Tato 3D struktura je schopná se navázat na cílovou molekulu, takže pokud jsou aptamery imobilizovány na vodivém povrchu, je možné pomocí jejich redoxně aktivních zbytků sledovat formování komplexů aptamer – cílová látka.

Na základě této strategie bylo vyvinuto několik elektrochemických aptasenzorů. Například konformační přechod anti-trombinového aptameru při vazbě na molekulu trombinu. Elektrochemický trombinový aptasenzor byl sestaven imobilizací aptameru označeného redoxně-aktivní methylenovou modří (MB) na elektrodě. Flexibilní konformace aptameru umožnila elektrickou komunikaci MB s elektrodou. Po navázání trombinu na aptamer se struktura aptameru změní do tzv. G-quadruplexu a brání kontaktu MB s elektrodou a tím i elektrotransferu[23].



Obr. 5.: Schéma elektrochemického aptasenzoru. Po navázání trombinu proběhla změna struktury aptameru a tím také stínění MB, které zabránilo komunikaci s elektrodou, což vedlo k negativnímu signálu.

Z obecného hlediska jsou elektrochemické analýzy velice atraktivní díky jejich vysoké citlivosti, kompatibilitě s novými mikrotechnologiemi, vlastní miniaturizaci a nízkým nákladům. Proto byly některé elektrochemické aptasenzory vytvořeny pomocí několika technik, včetně EIS, potenciometrie s ISE, ECL, CV a DPV [24-27]. Pro zvýšení citlivosti mohou být použity AuNRs nebo AuNPs modifikované vodivé polymery, které se používají jako materiál pro imobilizaci na elektrodě [28]. Velmi důležitou součástí těchto metod jsou také elektroaktivní reportéry, jako jsou

methylenová modř (MB), ferrocen, komplexy železa a ruthenia, které se používají pro přenos signálu.

b) Optické aptasenzory

Aptamery mohou být použity jako sondy v bio-optických senzorech založených na začlenění fluoroforu nebo nanočástice. V případě fluorescenční detekce je nejjednodušší označit aptamery jak zhášečem, tak fluoroforem. Optické aptasenzory jsou tedy sondy, které mohou monitorovat přítomnost cílové molekuly v roztoku pomocí páru fluorofor – zhášeč. S navázáním cílové molekuly se může měnit struktura aptameru – např. konformace vlásenky, nebo hybridizační forma. Existují i složitější formy přestavby, které využívají změny v kvartérní struktuře způsobené otevíráním a zavíráním aptamerů, tyto přestavby taktéž souvisí s fluorescenční signalizací. V nedávné době byla zkoumána fluorescence a zhášecí efekt u mnoha nanomateriálů, např. kvantové tečky, zlaté nanočástice, uhlíkové nanotrubky, oxidy grafenu, různé koordinační polymery atd. Tyto nanomateriály by mohly být v budoucnosti používány namísto tradičního zhášeče [29].

c) Další aptasenzory

SPR – surface-plasma resonance - SPR senzory jsou zařízení schopné zaznamenávat hmotnostní změny způsobené změnou indexu lomu na jejich povrchu. Vzhledem k tomu, že SPR metoda může stanovit vazebné konstanty aptamerů s jejich cílovými molekulami, je tato technologie často používán v SELEX procesu, kde funguje přesně a rychle. Metoda SPR se také používá při snímacích aplikacích založených na aptamerech. V tomto případě je selektivní plocha tvořená imobilizací aptameru na povrchu. Cílová molekula je pak vsřikována při konstantním průtoku, zatímco přístroj měří změny rezonančního úhlu na povrchu zařízení. Jakmile se cílová molekula naváže na aptamer, povrchový úhel se změní. Bylo zjištěno, že získaný signál je úměrný počtu navázaných molekul, což umožňuje detekovat změnu signálu bez dalšího značení. V nedávné době byla metoda SPR využita k imobilizaci aptameru specifickému pro HIV-1 Tat protein pomocí avidin-biotinového můstku. Vysoká specifita testu byla potvrzena použitím kontrolního proteinu Rev, který je biologicky srovnatelný s proteinem Tat. Pomocí dvoustranně vazebného modelu mohou být vyvinuté vysoce citlivé a velmi specifické SPR biologické testy.

QCM – Quartz Crystal Microbalance - Mikrogravimetrické analýzy na QCM byly taktéž použity k detekci interakce mezi aptamery a jejich cílovými molekulami. Frekvence křemenného krystalu je řízena změnami v hmotnosti spojené s krystalem, tedy spojení cílové molekuly s krystalem modifikovaným aptamerem zvyšuje hmotnost na snímači, což má za následek snížení rezonanční frekvence krystalu. V poslední době byly publikovány dvě podobné metody, které používaly biotinylovaný aptamer imobilizovaný na Au / křemenný krystal pro mikrogravimetrické stanovení trombinu a HIV-1 Tat proteinu s LOD 1 nm a 0,25 ppm [30].

6. VYUŽITÍ APTAMERŮ PRO CÍLENÝ PŘENOS LÉČIV

Aptamery, které se specificky vážou na receptory na povrchu buněk, byly využity k cílenému přenosu léků a jiných látek do vnitřního prostoru buněk. Například, prostatický specifický membránový antigen (PSMA) je důležitý marker rakoviny prostaty. Byly vytvořeny dvojité aptamerové sondy - A10 aptamer pro PSMA (+) buněk karcinomu prostaty a DUP-1 aptamer pro PSMA (-) buněk karcinomu prostaty, do jejichž struktury byl uzavřen doxorubicin, který má cytostatické účinky na rakovinou napadené buňky. Díky tomuto objevu může být doxorubicin zaveden přímo do buněk karcinomu prostaty, aniž by přitom došlo k poškození buněk okolních zdravých tkání.

V poslední době je pozornost vědců věnována malým interferujícím molekulám RNA (siRNA), které mohou vytvářet novou třídu léčiv u různých onemocnění. Funkcí siRNA je navodit RNA interferenci dráhy, která reguluje expresi určitého genu. Velmi důležitým cílem je dosáhnout efektivního a bezpečného přenosu siRNA do specifické buňky tak, aby následný terapeutický vliv byl co nejvíce efektivní. V nedávné době byl představen konjugát siRNA s aptamerem spojeným prostřednictvím streptavidinového můstku, byl použit anti-PSMA aptamer pro buňky karcinomu prostaty. Tento konjugát byl zaveden do rakovinných prostatických buněk během 30 minut a účinkem siRNA byla genová exprese těchto buněk účinně inhibována[31-33].

7. ZÁVĚR

Synteticky vytvořené oligonukleotidy s názvem aptamery jsou velmi důležitým terapeutickým nástrojem přítomnosti a hlavně budoucnosti. Tyto krátké řetězce DNA nebo RNA mohou být vyrobeny pro velké množství cílových molekul od iontů až po celé buňky. V souboji s dodnes používanými proteinovými protilátkami mají navrch díky jejich tepelné stabilitě, ochotě podléhat opakované denaturaci a denaturaci a jednodušší, cenově výhodnější výrobě. Ve spojení s elektrochemickými či optickými metodami mohou vytvářet velmi citlivé aptasenzory s potencionálně velkým využitím v diagnostické a terapeutické oblasti. Mohou taktéž sloužit jako přenašeče při cíleném transportu léčiv a dalších látek, což nabízí nové možnosti při léčbě vážných, zatím ne zcela vyléčitelných onemocnění.

8. LITERATURA

1. Dollins, C.M., S. Nair, and B.A. Sullenger, *Aptamers in immunotherapy*. Human Gene Therapy, 2008. **19**(5): p. 443-450.
2. Ellington, A.D. and J.W. Szostak, *INVITRO SELECTION OF RNA MOLECULES THAT BIND SPECIFIC LIGANDS*. Nature, 1990. **346**(6287): p. 818-822.
3. Tuerk, C. and L. Gold, *SYSTEMATIC EVOLUTION OF LIGANDS BY EXPONENTIAL ENRICHMENT - RNA LIGANDS TO BACTERIOPHAGE-T4 DNA-POLYMERASE*. Science, 1990. **249**(4968): p. 505-510.

4. Han, K., Z.Q. Liang, and N.D. Zhou, *Design Strategies for Aptamer-Based Biosensors*. *Sensors*, 2010. **10**(5): p. 4541-4557.
5. Bunka, D.H.J. and P.G. Stockley, *Aptamers come of age - at last*. *Nature Reviews Microbiology*, 2006. **4**(8): p. 588-596.
6. Jayasena, S.D., *Aptamers: An emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics*. *Clinical Chemistry*, 1999. **45**(9): p. 1628-1650.
7. Minunni, M., et al., *Development of biosensors with aptamers as bio-recognition element: the case of HIV-1 Tat protein*. *Biosensors & Bioelectronics*, 2004. **20**(6): p. 1149-1156.
8. Niu, W.Z., N. Jiang, and Y.H. Hu, *Detection of proteins based on amino acid sequences by multiple aptamers against tripeptides*. *Analytical Biochemistry*, 2007. **362**(1): p. 126-135.
9. Senior, K., *Aptamers as potential probes for cancer*. *Lancet Oncology*, 2006. **7**(9): p. 712-712.
10. Stojanovic, M.N. and D.W. Landry, *Aptamer-based colorimetric probe for cocaine*. *Journal of the American Chemical Society*, 2002. **124**(33): p. 9678-9679.
11. Tombelli, S., M. Minunni, and M. Mascini, *Aptamers-based assays for diagnostics, environmental and food analysis*. *Biomolecular Engineering*, 2007. **24**(2): p. 191-200.
12. Mascini, M., *Aptamers and their applications*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008. **390**(4): p. 987-988.
13. Birch, J.R. and A.J. Racher, *Antibody production*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2006. **58**(5-6): p. 671-685.
14. Ferreira, C.S.M. and S. Missailidis, *Aptamer-based therapeutics and their potential in radiopharmaceutical design*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 2007. **50**: p. 63-76.
15. Ireson, C.R. and L.R. Kelland, *Discovery and development of anticancer aptamers*. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2006. **5**(12): p. 2957-2962.
16. Dua, P., S. Kim, and D.K. Lee, *Nucleic acid aptamers targeting cell-surface proteins*. *Methods*, 2011. **54**(2): p. 215-225.
17. Levy-Nissenbaum, E., et al., *Nanotechnology and aptamers: applications in drug delivery*. *Trends in Biotechnology*, 2008. **26**(8): p. 442-449.
18. Yan, A.C. and M. Levy, *Aptamers and aptamer targeted delivery*. *Rna Biology*, 2009. **6**(3): p. 316-320.
19. Mi, J., et al., *In vivo selection of tumor-targeting RNA motifs*. *Nature Chemical Biology*, 2010. **6**(1): p. 22-24.
20. Joeng, C.B., et al., *ssDNA aptamers that recognize diclofenac and 2-anilinophenylacetic acid*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2009. **17**(15): p. 5380-5387.
21. Niazi, J.H., S.J. Lee, and M.B. Gu, *Single-stranded DNA aptamers specific for antibiotics tetracyclines*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2008. **16**(15): p. 7245-7253.
22. Wang, C.L., et al., *In vitro selection of high-affinity DNA aptamers for streptavidin*. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*, 2009. **41**(4): p. 335-340.
23. Xiao, Y., et al., *Label-free electronic detection of thrombin in blood serum by using an aptamer-based sensor*. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2005. **44**(34): p. 5456-5459.
24. Cho, E.J., J.W. Lee, and A.D. Ellington, *Applications of Aptamers as Sensors*, in *Annual Review of Analytical Chemistry 2009*, Annual Reviews: Palo Alto. p. 241-264.
25. Numnuam, A., et al., *Aptamer-based potentiometric measurements of proteins using ion-selective microelectrodes*. *Analytical Chemistry*, 2008. **80**(3): p. 707-712.
26. Wang, X.Y., et al., *Detection of thrombin using electrogenerated chemiluminescence based on Ru(bpy)₃(2+)-doped silica nanoparticle aptasensor via target protein-induced strand displacement*. *Analytica Chimica Acta*, 2007. **598**(2): p. 242-248.
27. Xu, D.K., et al., *Label-free electrochemical detection for aptamer-based array electrodes*. *Analytical Chemistry*, 2005. **77**(16): p. 5107-5113.
28. Rahman, M.A., et al., *Gold Nanoparticles Doped Conducting Polymer Nanorod Electrodes: Ferrocene Catalyzed Aptamer-Based Thrombin Immunosensor*. *Analytical Chemistry*, 2009. **81**(16): p. 6604-6611.

29. Song, K.M., S. Lee, and C. Ban, *Aptamers and Their Biological Applications*. Sensors, 2012. **12**(1): p. 612-631.
30. Song, S.P., et al., *Aptamer-based biosensors*. Trac-Trends in Analytical Chemistry, 2008. **27**(2): p. 108-117.
31. Chu, T.C., et al., *Aptamer mediated siRNA delivery*. Nucleic Acids Research, 2006. **34**(10).
32. Lupold, S.E., et al., *Identification and characterization of nuclease-stabilized RNA molecules that bind human prostate cancer cells via the prostate-specific membrane antigen*. Cancer Research, 2002. **62**(14): p. 4029-4033.
33. Min, K., et al., *Dual-aptamer-based delivery vehicle of doxorubicin to both PSMA (+) and PSMA (-) prostate cancers*. Biomaterials, 2011. **32**(8): p. 2124-2132.