



شناسایی آپتامرهای تک رشته از جنس DNA که به طور اختصاصی به پلاکت ها متصل میشوند با استفاده از تکنیک Cell-SELEX

فاطمه عالمی^۱، مجتبی سنکیان^۲، علیرضا حق پرست^۱، محمدرضا باسامی^{۱،۳}، غلامرضا هاشمی تبار^{۱،۳*}

۱ گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۲ مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
۳ گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

چکیده

آپتامرها اولیگونوکلئوتیدهایی هستند که به آسانی تولید میشوند و با گرایش و اختصاصیت فوق العاده به اهداف خود متصل میشوند. چندین آپتامر ویژه عوامل محلول آبشار انعقادی تولید شده اند اما آپتامرهای ویژه مولکول های سطحی پلاکت، تا به حال تولید نشده اند. هدف ما کشف آپتامرهایی از جنس DNA می باشد که می توانند به طور اختصاصی به پلاکت های انسانی متصل شوند. از روش cell-SELEX برای کشف آپتامرها استفاده گردید. اولیگونوکلئوتیدهای تک رشته سنتز شده با طول ۷۹ نوکلئوتید به عنوان مخزن اولیه آپتامر استفاده گردید. پلاکت های خالص از طریق حذف ناخالصی ها با استفاده از سانتریفیوژ افتراقی و دانه های مغناطیسی تهیه گردید. پرایمر فوروارد نشاندار شده با FITC برای تکثیر اولیگونوکلئوتیدهای انتخاب شده به روش PCR استفاده گردید و از آنزیم اگزونوکلئاز برای حذف رشته پیرو استفاده شد. پس از انجام ۱۲ مرحله cell-SELEX اولیگونوکلئوتیدهای انتخاب شده تکثیر شده و به وکتور مناسب کلون گردید و پس از تکثیر در باکتری مناسب توالی آنها تعیین گردید. توالی آپتامرهای حاصل از ۲۰۰ کلنی مثبت، هم تراز شده و وجود هفت گروه آپتامری شناسایی گردید. آپتامرهای خالص انتخاب شده از هر گروه، تکثیر شده و شدت و ویژگی گرایش آنها به هدف و نیز هضم پذیری مولکول های هدف آنها ارزیابی شد. تداخل این آپتامرها با دو تست عملکردی پلاکت ها نیز تحقیق شد. میل ترکیبی آپتامرهای شناسایی شده از ۱۰۹ تا ۳۴۰ نانومولار بود. قرار گرفتن پلاکت ها در معرض تریپسین اتصال بعدی همه هفت آپتامر شاخص را به مولکول های هدف خود ملغا نمود. چهار تا از آپتامرها پس از اتصال به هدف، از مولکول هدف خود در مقابل آنزیم تریپسین محافظت نمودند. هیچ یک از هفت آپتامر تاثیر معنی داری بر نتایج تست های عملکردی پلاکت نداشتند. در این تحقیق هفت آپتامر ویژه پلاکت ها شناسایی و خصوصیات آنها تعیین شد. این آپتامرها ممکن است کاربردهای متنوعی در تشخیص و یا درمان اختلالات پلاکتی داشته باشند.

واژگان کلیدی

آپتامردی ان ای؛ آپتامر ویژه پلاکت؛ پلاکت؛ cell-SELEX

* نویسنده مسئول: غلامرضا هاشمی تبار

Hashemit@um.ac.ir