نقش آپتامرها در تشخیص ویروس‌های کرونای انسانی

آزاده حکمت[۱،*]

چکیده

شیوع کروناویروس جدید، کووید-۱۹ یا SARS-CoV-2، به مشکلی بزرگ و فراگیر در سلامت انسان‌ها بدل گشته است و بسیاری از جوامع را تحت تأثیر خود قرار داده است. عدم وجود یک روش درمانی مؤثر و استاندارد این وضعیت را بیش‌از پیش پیچیده‌تر نموده است. تاکنون تلاش‌های بسیاری در جهت تولید کیت‌های تشخیصی برای خانواده ویروس کرونا انسانی انجام شده است اما اغلب دقت و حساسیت مناسبی ندارند. آپتامرها توالی‌های تک‌رشته‌ای سنتزی از جنس RNA، DNA یا پپتید هستند و به‌صورت کاملاً اختصاصی به اهداف معینی متصل می‌گردند. ویژگی‌های خاص آپتامرها موجب شده است که مؤثرتر از آنتی‌بادی‌ها عمل نمایند. آپتامرها عموماً از طریق فرآیند آزمایشگاه Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment (SELEX) از یک کتابخانه، غربال و انتخاب می‌شوند و می‌توانند به مولکول‌های هدف متصل شوند. اگرچه مطالعات اندکی در معرفی آپتامرهای ویژه برای کروناویروس‌ها انجام پذیرفته است اما همین مطالعات اندک نیز می‌تواند راه را برای تشخیص و کشف آپتامرهای ویژه برای این ویروس هموار سازد. در مطالعه حاضر به بررسی کاربرد بالقوه داروها و حسگرهای مبتنی بر آپتامرها در شناسایی و درمان کروناویروس انسانی پرداخته شده است.

واژگان کلیدی: آپتامر، ویروس، مرس، سارس، کووید-۱۹

* عهده‌دار مکاتبات، استادیار، آدرس الکترونیکی hekmat@ut.ac.ir

۱ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران

DOR: 20.1001.1.2008935.1399.11.1.6.5

مقدمه

انسان سال‌ها است در حال مقابله با اثرات منفی ویروس‌ها می‌باشد. در برخی از بیماری‌های ویروسی، واکسن‌ها و داروهای ضدویروس امکان جلوگیری از شیوع گسترده عفونت و بهبودی بیماران را فراهم نموده است. در حال حاضر شماری از ویروس‌ها، از جمله کرونا ویروس جدید، در سراسر جهان شیوع یافته‌اند و تهدید جدی برای بهداشت عمومی به حساب می‌آیند، زیرا هنوز ابزاری دقیق برای شناسایی و درمان آنها وجود ندارد. در این مقاله در ابتدا به معرفی اجمالی آپتامرها پرداخته می‌شود و سپس به کاربرد بالقوه آپتامرها در شناسایی و درمان سه ویروس کشنده خانواده ویروس کرونای انسانی (مرس، سارس و کووید-۱۹) پرداخته می‌شود.

آپتامرها و فناوری SELEX، فرآیند انتخاب آپتامر

آپتامر از کلمه لاتین Aptus به معنی مناسب[1] و کلمه یونانی Meros به معنای ذرّه گرفته شده است و معنای دقیق آن، ذره قابل تطبیق است. آپتامرها، لیگاندهای تک‌رشته‌ای الیگونوکلئوتیدی از جنس DNA، RNA و یا پپتید هستند که طولی بین ۳۰ تا ۷۰ نوکلئوتید دارند و اولین بار در سال ۱۹۹۰ میلادی معرفی شدند [۱, ۲]. آپتامرها با تشکیل ساختارهای سه بعدی، مانند آنتی‌بادی‌های بلند زنجیر، توانایی اتصال اختصاصی به مولکول هدف را دارند. در بیشتر مواقع، اصطلاح آپتامر به آپتامرهای اسیدنوکلئیکی اطلاق می‌گردد. اتصال آپتامرها با مولکول هدف از طریق نیروهای ضعیف واندروالسی، برهم کنش‌های الکترواستاتیک، پیوندهای هیدروژنی یا مجموعه‌ای از این نیروها صورت می‌گیرد. آپتامرها می‌توانند به صورت ساختارهای سه بعدی خاصی نظیر ریشه حلقه[2]، سنجاق سری[3]، شبه گره[4] و ساختار چهارتایی پیچیده[5] تا بخورند. گزارش شده است که وجود بازهای گوانین با توالی خاص (Gn-Xm-Gn-Xm-Gn، G=گوانین، X=هرنوع بازی، n =اغلب ۳ و m = بیش از ۱) در الیگونوکلئوتیدها موجب ایجاد پیوند هیدروژنی بین صفحات ایجاد می‌گردد [۳]. آپتامرها همانند آنتی‌بادی‌ها به صورت کاملاً اختصاصی مولکول هدف خود را شناسایی می‌کنند. اما آپتامرها نسبت به آنتی‌بادی‌ها مزیت‌هایی ویژه‌ای دارند که موجب جلب توجه پژوهشگران شده است [۴]. فرآیند تولید آپتامرها درون تنی[6] نمی‌باشد بنابراین این ترکیبات می‌توانند برای طیف وسیعی از مولکول‌های هدف، از مولکول‌های کوچکی مثل یک یون تا یک سلول، ساخته شوند. در حالی‌که آنتی‌بادی‌ها تنها قابلیت اتصال به ترکیبات ایمونولوژیک را دارند. آپتامرها با روش‌های شیمیایی قابل دستکاری هستند و تغییرات ساختاری ناشی از حرارت در آنها برگشت‌پذیر می‌باشد. آپتامرها همچنین برای نگهداری نیاز به دماهای پائین ندارند. قابلیت‌های آپتامرها باعث شده است که این ترکیبات در زمینه‌های مختلفی مانند ساختن زیست‌حسگرها، جداسازی مواد، علوم تشخیصی پزشکی و داروسازی مورد توجه باشند.

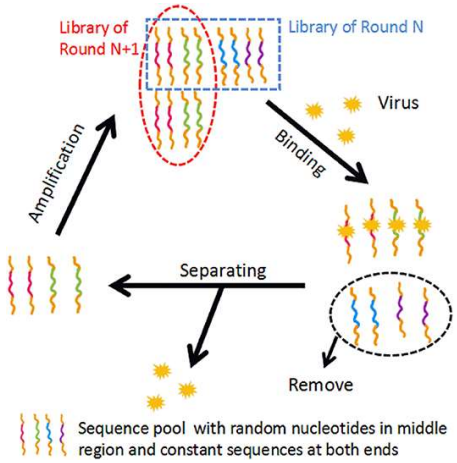
آپتامرها از یک کتابخانه تصادفی الیگونوکلئوتیدی در یک فرآیند سنجش برون تنی[7] به نام انتخاب هدفمند لیگاند به روش غنی‌سازی نمایی[8] یا SELEX انتخاب می‌شوند [۵]. خصوصیات آپتامرها نظیر میل ترکیبی و اختصاصی بودن آنها، به مراحل انتخاب آنها یعنی SELEX وابسته است. چرخه‌های تکرارشونده در شرایط کنترل شده آزمایشگاهی و انتخاب مولکول‌هایی با میل ترکیبی بالاتر به مولکول هدف در هر چرخه، یک پروسه دارویی را یادآور می‌شود که به سمت انتخاب توالی‌هایی با میل ترکیبی بیشتر به مولکول هدف، پیش می‌رود. فرآیند SELEX متشکل از سه مرحله است که تکرار می‌شود تا نوکلئوتیدهای که بهتر به هدف متصل می‌شوند جستجو و یافت شوند. مرحله اول ایجاد کتابخانه است. یک کتابخانه حاوی الیگونوکلئوتیدهای تک‌رشته‌ایی متشکل از مناطق توالی رندم معمولا ۴۰ – ۳۰ نوکلئوتیدی و ختم شده به جایگاه اتصال پرایمر می‌باشد. اگر هدف، تولید آپتامر DNA باشد، می‌توان از همین کتابخانه‌ی تولید شده استفاده کرد؛ اما در صورتی‌که هدف تولید

[1] Fit
[2] Stem –loop
[3] Hairpin
[4] Pseudoknot
[5] Quadruplex
[6] *in vivo*
[7] *in vitro*
[8] Systematics Evolution of Ligands by Exponential enrichment

آپتامر RNA باشد، باید پیش از آغاز فرآیند SELEX کتابخانه DNAبه RNA از طریق فرآیند نسخه‌برداری برون تنی[1] تبدیل شود.

مرحله دوم اتصال و جداسازی است. در این مرحله مولکول‌های هدف تثبیت شده برسطح، در معرض کتابخانه قرار داده می‌شوند و در شرایط دمایی و بافری خاص طی فرآیند شستشو و غربالگری و جداسازی الیگونوکلئوتیدهای اتصال نیافته حذف می‌شوند. این مرحله یکی از سخت‌ترین مراحل SELEXاست و به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای بر خصوصیات اتصالی آپتامر به هدف، اثر می‌گذارد.

مرحله سوم، مرحله تکثیر است. در این مرحله الیگونوکلئوتیدهای اتصال یافته به صورت اختصاصی بدست می‌آیند. این مولکول‌ها توسط PCR برای DNA SELEX و RT-PCR برای RNA SELEX تکثیر می‌یابند و مورد توالی‌یابی قرار می‌گیرند تا یک کتابخانه جدید برای استفاده در دور بعد ایجاد شود (شکل ۱). تعداد دفعات چرخه (راند) مورد نیاز در SELEX، به پارامترهای مختلفی از جمله خصوصیات هدف و غلظت آن، طراحی کتابخانه اولیگونوکلئوتیدی آغازگر، شرایط محیطی انتخاب، نسبت مولی هدف به اولیگونوکلئوتیدها و کارآیی روش جداسازی وابسته است [۶].



شکل ۱: مراحل SELEX برای سنتز آپتامرها [۷]

کرونا ویروس‌ها[2]

کروناویروس‌ها جزء ویروس‌های پاکت‌دار، Positive-sense، دارای RNA تک‌رشته‌ای با منشأ جانوری و متعلق به خانواده Coronaviridae و دسته Nidovirales می‌باشند. ویروس‌های کرونا در دهه ۱۹۶۰ میلادی کشف شدند. برجسته‌ترین ویژگی ویروس‌های کرونا، زوائد اسپایک[3] گرز مانند یا گلبرگی شکل با طول ۲۱ نانومتر آنها است که از سطح ویروس بیرون زده‌اند. نام ویروس کرونا برگرفته از ظاهر تاج خورشیدی ناشی از این زوائد است. کروناویروس‌ها دارای بزرگترین اندازه ژنوم در بین تمامی ویروس‌های RNA دار هستند. ویروس‌های کرونا از نظر سرولوژی و ژنوتیپی شامل چهار سرده (آلفاکروناویروس، بتاکروناویروس، دلتاکروناویروس و گاماکروناویروس)، ۲۲ زیرسرده و ۴۰ گونه هستند. کروناویروس‌های انسانی توسط جنس آلفا و بتا ایجاد می‌شوند. تاکنون ۷ گونه از ویروس کرونا انسانی شناخته شده‌اند و اغلب منجر به ایجاد عفونت بافت تنفسی می‌شود که معمولاً مانند سرماخوردگی خفیف هستند، اما برخی از اعضای این خانواده مانند سارس، مرس و کووید-۱۹ کشنده هستند. ژنوم این ویروس‌ها حاوی یک ساختار کلاهک در سر ′۵ و یک دم پلی A در سر ′۳ است که به آن اجازه می‌دهد تا به عنوان mRNA برای ترجمه پلی پروتئین‌های همانندسازی عمل کند. ژن‌های رپلیکاز[4] که پروتئین‌های غیرساختاری (Nsps) را رمزگذاری می‌کنند، دو سوم ژنوم ویروس، یعنی در حدود kb ۲۰، طول دارند [۸]. یک سوم باقی مانده یعنی حدود ۱۰kb را، ژن‌های مرتبط با پروتئین‌های ساختاری[5] و یا جانبی[6] تشکیل می‌دهند. ژنوم ویروسی در انتهای′۵ حاوی توالی leaderو ناحیه‌ای غیرکدکننده (UTR) است که شامل چندین ساختار ساقه حلقه مورد نیاز برای تکثیر و رونویسی RNA است. علاوه براین، در ابتدای هر ژن ساختاری یا جانبی، توالی‌های تنظیم کننده رونویسی (TRSs) قرار دارند که برای بیان و نیز تنظیم بیان هر یک از این ژن‌ها ضروری هستند. UTR ′۳ دارای ساختارهایRNA مورد نیاز برای تکثیر و سنتز RNA

[1] *in vitro* transcription
[2] Coronaviruses
[3] Spike
[4] Replicase
[5] Structural
[6] Accessory

ویروسی است. به‌طور کلی سازمان‌بندی ژنوم کروناویروس‌ها به صورت زیر است [۹]:

5′-leader-UTR-replicase-S (Spike)–E (Envelope)-M (Membrane)-N (Nucleocapsid)-3′UTR-poly (A)

در ادامه به مطالعات انجام شده در زمینه کاربرد آپتامرها جهت درمان و تشخیص سه ویروس عفونی از خانواده کرونا ویروس انسانی پرداخته می‌شود.

ویروس سندرم تنفسی حاد یا سارس[1]

براساس آمار سازمان بهداشت جهانی[2] (WHO)، از اواخر سال ۲۰۰۲ تا جولای ۲۰۰۳ میلادی، بیماری کشنده‌ای به نام سارس یا سندرم تنفسی حاد (SARS-CoV-1 یا SARS-CoV)، از یکی از ایالات جنوبی چین (استان گوانگدونگ) به ۳۰ کشور جهان مانند سوئیس، سنگاپور، تایلند، آمریکا، کانادا، عربستان، برزیل، ویتنام و کویت گسترش یافت و در مدت کوتاهی، بیش از هشت هزار انسان به این ویروس مبتلا شدند و ۷۷۴ نفر جان خود را از دست دادند [۱۰]. ویروس سارس متعلق به دسته بتاکروناویروس است و احتمالاً در ابتدا ابتلا به این ویروس از خفاش‌ها شروع شده است و پیش از آلوده کردن انسان‌ها، به پستانداران شبانه‌ای به نام گربه زباد (civet) انتقال یافته است. تب بالای ۳۸ درجه سانتی‌گراد، سرفه و تنگی نفس در افراد آلوده به این ویروس شناسایی شده است. در سال ۲۰۰۳ دانشمندان دریافتند نوکلئوکپسید[3] (N) SARS-CoV بیومارکر مناسبی برای تشخیص و شناسایی این ویروس است [۱۱]. جدول ۱ برخی آپتامرهای ساخته شده برای ویروس سارس را نشان می‌دهد. همانگونه که مشاهده می‌گردد مولکول هدف آپتامرها در این ویروس می‌تواند هلیکاز، نوکلئوکپسید یا دمین انتهایی باشد.

جدول۱: برخی آپتامرهای ساخته شده برای ویروس سارس

منبع	عملکرد	هدف	توالی	نوع	نام آپتامر
[۱۲]	مهار هلیکاز	NTPase/Helicase	GATAATACGACTCACTATAGGGTTCACTGCAGACTTGACGAA	RNA	nsP10
[۱۳]	شناسایی و تشخیص ویروس	N protein	GGGAGAGCGGAAGCGUGCUGGGCCUGUCGGUUCGCUGUCUUGCUACGUUACGUUACACGGUUGGCAUAACCCAGAGGUCGAUGGAUCCCCCC	RNA	QDs-conjugated RNA
[۱۳]	شناسایی و کاهش عفونت‌زایی ویروس	دمین اتصال گیرنده	CAGCACCGACCTTGTGCTTTGGGAGTGCTGGTCCAAGGGCGTTAATGGAC	DNA	-
[۱۰]	شناسایی و کاهش عفونت‌زایی ویروس	پروتئین نوکلئوکپسید	GCAATGGTACGGTACTTCCGGATGCGGAAACTGGCTAATTGGTGAGGCTGGGGCGGTCGTGCAGCAAAAGTGCACGCTACTTTGCTAA	DNA	-

ویروس سندروم تنفسی خاورمیانه یا مرس[4]

از زمان کشف ویروس مرس (MERS-CoV) در عربستان سعودی در سال ۲۰۱۲ میلادی و شیوع دوباره آن در سال ۲۰۱۵ میلادی در کره جنوبی، بیش از ۱۸۰۰ نفر در ۲۷ کشور جهان تحت تاثیر عفونت ناشی از این ویروس قرارگرفته‌اند که از این تعداد، بیش از ۶۰۰ مورد مرگ گزارش شده است. نرخ مرگ‌ومیر

[1] Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 1
[2] World Health Organization
[3] Nucleocapsid
[4] Middle East Respiratory Syndrome–related coronavirus

ویروس مرس در مقایسه با ویروس سارس، بالاتر است (۴۰ درصد در مقابل ۱۰ درصد) و این نرخ به‌خصوص در افراد مبتلا به بیماری‌های زمینه‌ای بسیار بیشتر گزارش شده است [۱۴]. این ویروس متعلق به دسته بتاکروناویروس‌ها است. ویروس مرس نیز احتمالاً از خفاش‌ها منشأ گرفته شده است. این بیماری قبل از انتقال به انسان، شترها را آلوده کرده و موجب تب، سرفه و تنگی نفس در انسان‌های آلوده می‌شود. مرس اغلب تا ذات‌الریه شدید پیشروی می‌کند و با داشتن نرخ مرگ‌ومیر ۳۰ تا ۴۰ درصدی، جزو کشنده‌ترین ویروس‌های شناخته شده است که از حیوانات به انسان انتقال می‌یابد. ویروس مرس دارای ژنوم بزرگ از جنس ریبونوکلئوتید با طول حدود ۶۱ کیلو باز و متشکل از ۱۱ قالب خواندن (ORF) است. در انتهای '۵ این ژنوم، دو قالب خواندن همپوشان به نام‌های ORF1a و ORF1b، دو پلی‌پروتئین را کد می‌کنند که حاصل برش این پلی پروتئین‌ها، ۱۶ پروتئین غیرساختمانی عملکردی است [۱۵]. مطالعات چندانی در زمینه طراحی آپتامر تشخیصی و درمانی برای این ویروس انجام نشده است. از مهم‌ترین آپتامر طراحی شده برای این ویروس، می‌توان hot start RT را نام برد که با توالی CUUACCACGCGCUCUUAACUGCUAGCGCC AUGGCCAAAACU به آنزیم نسخه‌بردار معکوس متصل شده و جهت شناسایی و تشخیص این ویروس به کار می‌رود [۱۵].

ویروس کووید-۲۰۱۹[1]

در اواخر دسامبر سال ۲۰۱۹، مواردی از شیوع بیماری ویروسی در ووهان چین گزارش شد. دولت و محققان حوزه بهداشت در چین اقدامات سریع را برای کنترل همه‌گیری آن انجام دادند و تحقیقات اتیولوژیک را آغاز کردند. سازمان بهداشت جهانی (WHO) در ژانویه سال ۲۰۲۰ به‌طور موقت این ویروس جدید را کروناویروس نوین- ۲۰۱۹[2] نامگذاری کرد. در ۱۱ فوریه سال ۲۰۲۰ میلادی، سازمان بهداشت جهانی به صورت رسمی این بیماری را کووید-۱۹ نامگذاری نمود و کمیته بین‌المللی طبقه‌بندی ویروس‌ها[3] (ICTV) این ویروس را سندرم تنفسی حاد شدید-۲[4] یا SARS-CoV-2 نامگذاری کرد. منشأ این ویروس مانند SARS-CoV احتمالاً خفاش است و پیش از آلوده کردن انسان‌ها، از حیوان واسط عبور می‌کند. ویروس نوظهور SARS-CoV-2 گونه جدید از بتاکرونا ویروس‌ها است که ساختار ژنومی معمول کرونا ویروس‌ها شامل پروتئین ساختاری اسپایک، پروتئین پوششی، پروتئین غشایی و پروتئین نوکلئوکپسید را دارا است و همچنین چندین پروتئین جانبی منحصر به فرد نیز دارد. orf1ab بزرگترین ژن SARS-CoV-2 است که پلی‌پروتئین pp1ab و ۱۵ nsp را رمزگذاری می‌کند [۸، ۱۱]. با وجود گزارشات مبنی بر مؤثر بودن برخی روش‌های درمانی، در حال حاضر هیچ درمان ضدویروسی یا واکسنی برای عفونت کووید-۱۹ وجود ندارد. تولید واکسن‌های ایمن و پایدار یک چالش بزرگ است و تولید داروهای جدید و مؤثر یک فرایند بسیار طولانی است. تاکنون مقالات اندکی در زمینه کاربرد بالقوه آپتامرها در درمان کووید-۱۹ منتشر شده است. جدول ۲ برخی آپتامرهای ساخته شده برای ویروس کووید-۱۹ را نشان می‌دهد که مولکول هدف در همه آنها پروتئین‌های نوکلئوکپسید است. اخیرا پائولا بیتس[5] در دانشگاه لوئیزویل[6] به همراه گروه تحقیقاتی خود پژوهشی را در زمینه کاربرد آپتامرها در درمان ویروس کووید-۱۹ انجام داده است و یک آپتامر را به عنوان یک داروی بسیار عالی بدون اثرات جانبی برای درمان کروناویروس‌ها به ویژه کووید-۱۹ به سازمان غذا و دارو[7] (FDA) جهت دریافت مجوزهای لازم معرفی نموده است. اما حتی این آپتامر نیز برای تولید مجوز راه طولانی در پیش دارد.

[1] COVID-19
[2] Coronavirus disease 2019
[3] International Committee on Taxonomy of Viruses
[4] Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2
[5] Paula J. Bates
[6] Louisville
[7] Food and Drug Administration

جدول ۲: برخی آپتامرهای ساخته شده برای ویروس کووید-۱۹

آپتامر	نوع	توالی	هدف	عملکرد	منبع
N Aptamer 1	DNA	GCAATGGTACGGTACTTCCGGATGCGGA AACTGGCTAATTGGTGAGGCTGGGGCGG TCGTGCAGCAAAAGTGCACGCTACTTTGC TAA	پروتئین نوکلئوکپسید	شناسایی و تشخیص ویروس	[۱۱]
N Aptamer 2	DNA	GCAATGGTACGGTACTTCCGGATGCGGA AACTGGCTAATTGGTGAGGCTGGGGCGG TCGTGCAGCAAAAGTGCACGCT	پروتئین نوکلئوکپسید	شناسایی و تشخیص ویروس	[۱۱]
N Aptamer 3	DNA	GCAATGGTACGGTACTTCCGGATGCGGA AACTGGCTAATTGGT GAGGCTGGGGCGGT	پروتئین نوکلئوکپسید	شناسایی و تشخیص ویروس	[۱۱]

نتیجه‌گیری

شیوع ویروس کووید-۱۹ در اوایل سال ۲۰۲۰ میلادی، بار دیگر اهمیت تشخیص و درمان سریع ویروس‌ها را نمایان ساخت. به کارگیری آپتامرها در تشخیص و درمان بیماری‌ها به‌علت ویژگی‌های خاص آنها مانند اختصاصی بودن و تمایل بالا به اتصال به مولکول‌های هدف، بسیار مورد توجه است. مقالات متعددی برای شناسایی و درمان ویروس‌ها با استفاده از آپتامرها به چاپ رسیده است. با این‌حال کاربرد این آپتامرها به‌صورت وسیع هنوز با مشکلاتی پیش‌رو است. اگرچه اصول SELEX در تمام هدف‌ها یکسان است اما جزئیات آزمایش‌ها با یکدیگر متفاوت و زمانبر است. همچنین دشواری در روش PCR خود کاربرد گسترده آپتامرها را با اشکالاتی روبرو کرده است. افزون بر آن آپتامرها در شرایط آزمایشگاهی تهیه می‌شود و ممکن است ویژگی‌های آنها در شرایط تغییر نماید و به عبارتی ساختار، عملکرد، تمایل آنها به اتصال و اختصاصی بودن آپتامرها در شرایط بالینی تغییر می‌کند. همچنین تولید نوکلئوتیدها جهت طراحی آپتامرها هزینه‌بر می‌باشد. با این‌حال تقویت طراحی آپتامرها، شناخت دقیق ساختار سه‌بعدی آپتامرها و همچنین آزمایش آپتامرها در شرایط برون‌تنی و درون‌تنی کاربرد آپتامرها را در شناسایی و درمان ویروس‌ها تقویت خواهد نمود و با پیشرفت فناوری، استفاده از آنها برای شناسایی و درمان ویروس‌ها به سرعت افزایش خواهد یافت. در خاتمه باید گفت اگرچه مطالعات در زمینه یافتن روش درمانی مناسب برای درمان ویروس‌های خانواده کرونا در حال انجام است. اما پتانسیل بالقوه آپتامرها جهت شناسایی و درمان ویروس‌ها را نباید از نظر دور داشت چه بسا این ترکیبات بتوانند در آینده‌ای بسیار نزدیک به عنوان کاندیدای بسیار مناسبی جهت درمان ویروس‌های عفونی به‌ویژه کروناویروس‌ها به‌کار روند.

منابع و مؤاخذ

[1]. Rye, P. D., and Nustad, K. (2001) Immunomagnetic DNA aptamer assay, BioTechniques, Vol. 30, No. 2, PP. 290-295.

[2]. Stoltenburg, R., Reinemann, C., and Strehlitz, B. (2007) SELEX—a (r) evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands, Biomolecular Engineering, Vol. 24, No. 4, PP. 381-403.

[3]. Strehlitz, B., Nikolaus, N., and Stoltenburg, R. (2008) Protein detection with aptamer biosensors, Sensors, Vol. 8, No. 7, PP. 4296-4307.

[4]. Proske, D., Blank, M., Buhmann, R., and Resch, A. (2005) Aptamers—basic research, drug development, and clinical applications, Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 69, No. 4, PP. 367-374.

[5]. Çalık, P., Balcı, O., and Özdamar, T. H. (2010) Human growth hormone-specific aptamer identification using improved oligonucleotide ligand evolution method, Protein Expression and Purification, Vol. 69, No. 1, PP. 21-28.

[6]. Gopinath, S. C. B. (2007) Methods developed for SELEX, Analytical and Bioanalytical Chemistry, Vol. 387, No. 1, PP. 171-182.

[7]. Zou, X ,.Wu, J., Gu, J., Shen, L., and Mao, L. (2019) Application of aptamers in virus detection and antiviral therapy, Frontiers in Microbiology, Vol. 10, PP. 1462.

[8]. Ren, L.-L., Wang, Y.-M., Wu, Z.-Q. et al. (2020) Identification of a novel coronavirus causing severe pneumonia in human: a descriptive study,

Chinese Medical Journal. Vol. 133, No. 9, PP. 1015-1024.
[9]. Chellapandi, P., and Saranya, S. (2020) Genomics insights of SARS-CoV-2 (COVID-19) into target-based drug discovery, Medicinal Chemistry Research, Vol. 29, PP. 1777–1791.
[10]. Cho, S.-J., Woo, H.-M., Kim, K.-S., Oh, J.-W., and Jeong, Y.-J. (2011) Novel system for detecting SARS coronavirus nucleocapsid protein using an ssDNA aptamer, Journal of bioscience and bioengineering, Vol. 112, No. 6, PP. 535-540.
[11]. Chen, Z., Wu, Q., Chen, J., Ni, X., and Dai, J. (2020) A DNA Aptamer Based Method for Detection of SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein, Virologica Sinica, Vol. 35, PP. 351–354.
[12]. Jang ,K. J., Lee, N.-R., Yeo, W.-S., Jeong, Y.-J., and Kim, D.-E. (2008) Isolation of inhibitory RNA aptamers against severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus NTPase/Helicase, Biochemical and biophysical research communications, Vol. 366, No. 3, PP. 738–744.
[13]. Roh, C., and Jo, S. K. (2011) Quantitative and sensitive detection of SARS coronavirus nucleocapsid protein using quantum dots-conjugated RNA aptamer on chip, Journal of Chemical Technology & Biotechnology, Vol. 86, No. 12, PP. 1475-1479.
[14]. Zaki, A. M., Van Boheemen, S., Bestebroer, T. M., Osterhaus, A. D., and Fouchier, R. A. (2012) Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia, New England Journal of Medicine, Vol. 367, No. 19, PP. 1814-1820.
[15]. Rutschke ,N., Zimmermann, J., Möller, R., Klöck, G., Winterhalter, M., and Leune, A. (2015) Hot start reverse transcriptase: an approach for improved real-time RT-PCR performance, Journal of Analytical Science and Technology, Vol. 6, No. 1, PP. 1-5