

DERLEME / REVIEW

doi: 10.17986/blm.2018136899

Adli Bilimlerde Aptamer Uygulamaları: Kokain Algılama ve Parmak İzi Belirleme Örneği

Aptamer Applications in Forensic Science: Cocaine Detection and Latent Fingerprint Visualization Cases

Mustafa Oğuzhan Çağlayan

Cumhuriyet Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Nanoteknoloji Mühendisliği Bölümü, Sivas

Özet

Yapay antikorlar olarak da bilinen aptamerler, farklı boyutlardaki hedef moleküllere, yüksek ilgi ve seçicilik ile bağlanan ve geçtiğimiz 30 yıl içerisinde çok farklı sensör uygulamalarında başarıyla kullanılan yakalama elemanlarıdır. Aptamerlerin bir organizmada üretilen antikorlar yerine laboratuvar ortamında üretilebilmesi, çoğaltılma ve saflaştırma aşamasının kolay olması ve sonsuz konfigürasyonda üretilebiliyor olması gibi eşsiz avantajları vardır. Askeri, çevresel, gıda güvenliği ve tıbbi uygulamalarının yanı sıra, adli bilimlerde de aptamerlerin kullanılması kaçınılmazdır. Bu makalede, aptamerlerin adli bilimlerde uygulamalarına yönelik örnekler verilmiştir. Literatürde, çok sayıda uygulama olması nedeniyle bu makalede, adli bilim ve adli tıpta sensörler için kokain ve adli bilim için parmak izi belirlemesi uygulamaları örnek olarak verilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Aptamerler; Adli Bilim Uygulamaları; Biyosensörler; Kokain Tayini; Gizli Parmak İzi.

Abstract

Aptamers, also known as artificial antibodies, are capture elements that are attached to target molecules of different sizes with high affinity, and selectivity. They are successfully used in many different sensor applications over the last 30 years. Aptamers have unique advantages such as being able to be produced in a laboratory environment in contrast to antibodies produced via immunoactivity, easy to amplify and purify and to be produced in an infinite configuration. In addition to the military, environmental, food safety and medical applications, the use of aptamers in forensic sciences is inevitable. In this article, examples of aptamers and their applications in forensic sciences are given. Due to a large number of applications in the literature, latent fingerprint visualization and cocaine detection cases are given as examples of aptamer applications in forensic science.

Keywords: Aptamers; Forensic Science Applications; Biosensors; Cocaine Detection; Latent Fingerprint.

1. Giriş

Aptamerler, ilaçlar, proteinler veya diğer inorganik moleküller gibi geniş bir aralıktaki hedef moleküllerine yüksek afinite ve spesiflik göstererek bağlanabilen oligonükleotidlerdir (RNA veya DNA) (Luzi ve diğ., 2003; You ve diğ., 2003). Bu moleküller ilk kez 1990 yılında rapor edilmiş olan SELEX (üssel zenginleştirme ile ligandların sistematik evrimi- Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) adlı bir in vitro eleme/seçim yöntemi ile elde edilirler (Tuerk ve Gold, 1990; Ellington ve Stzostak, 1990). Bu proses, rastgele dağılımlı sekansa sahip olan geniş bir oligomer kütüphanesinden (RNA veya DNA) hedef moleküle yüksek afinite ve spesiflik

ile bağlanabilen eşsiz RNA/DNA moleküllerinin belirlenmesini sağlar (Şekil 1). RNA'nın RNA fonksiyonu çeşitliliğine neden olacak şekilde farklı yapılar halinde bükülebilmesi nedeniyle aptamerler genellikle RNA'lar arasından seçilmektedir (Marshall ve Ellington, 2000).

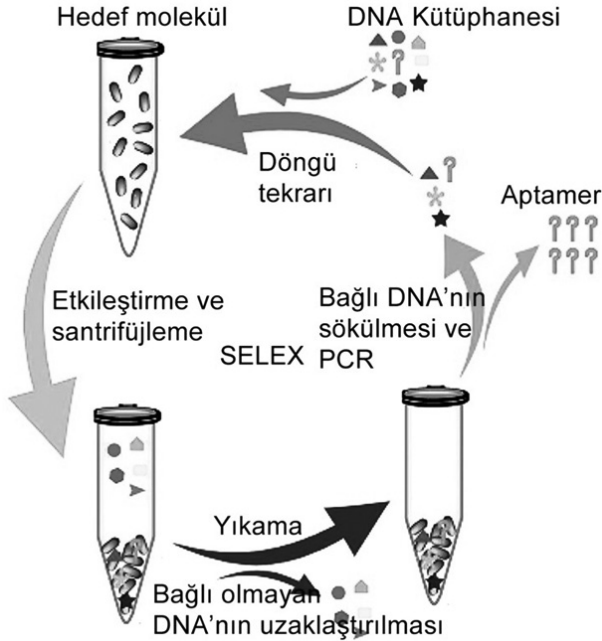
Aptamerler, afinite konusunda bazı monoklonal antikorlarla kıyaslanabilir hatta bazı durumlarda onlardan daha iyi bir afiniteye sahiptir. Aptamerlerin hedeflerine karşı afinitesinde sıklıkla katlanabilirlik tipik olarak mikromolar ile pikomolar seviyesi arasında değişmektedir (Jenison ve diğ., 1994). Aptamerler, örneğin yalnızca bir metil grubu farklı olan teofillin ile kafein arasında 10 bin kat yüksek ayırma kapasitesi gösterebilmektedir (anti-teofillin aptameri, Jenison ve diğ., 1994). Oligonükleotid sekanslarının dizilimindeki yüksek olasılık ve farklılıklar nedeniyle gerçekleşen moleküler farklılık, çok geniş sayıda moleküle afinitesi olan aptamerlerin üretilmesini mümkün kılmaktadır. Organik boyalar, aminoasitler, antibiyotikler, peptitler, proteinler ve vitaminler gibi çok sa-

Sorumlu Yazar: Doç. Dr. Mustafa Oğuzhan Çağlayan

Cumhuriyet Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Nanoteknoloji Mühendisliği Bölümü, Sivas

E-mail: caglayanmoguzhan@gmail.com

Geliş: 12.06.2017 Düzeltme: 21.12.2017 Kabul: 22.01.2018



Şekil 1. Aptamerlerin elde edilmesinde kullanılan SELEX yöntemi

yıda farklı molekül için yüksek afiniteye sahip aptamerler seçilmiş ve literatürde rapor edilmiştir (Tombelli ve diğ., 2005).

Aptamerlerin hedeflerine karşı yüksek afinite göstermesinin sebebi hedef molekülün çevresine sarılmasıdır. Böylece küçük moleküllerde kendi nükleik asit yapısı içerisine sıkıştırırken, büyük moleküllerde (örneğin proteinler) kendisi yapıya entegre olur (Herman ve Patel., 2000). Antikorlar ile kıyaslandığında aptamer reseptörler analitik ve tanı uygulamalarında çok sayıda avantaja sahiptir. Örneğin aptamerler, antikorlar gibi, üretim için hayvanların kullanılması zorunluluğunu ortadan kaldırır. Bu durumun bir diğer avantajı, bazı durumlarda immün cevabın doğru çalışmaması nedeniyle antikorların üretilmemesi durumunda uygun antikorun elde edilmesi mümkün olmayabilir. Bu durumun aksine aptamerler in vitro olarak üretilirler. Seçim işleminin ardından aptamerler, kimyasal sentez yolu ile çoğaltılıp saflaştırılırlar. Bu esnada antikorlar ise her bir partide varyasyon gösterebilir ve saflaştırma basamakları da oldukça uzun ve zahmetlidir. Buna ek olarak yapılarından dolayı, aptamer esaslı sensörler, protein esaslı sensörlere oranla daha dayanıklı olur, denatürasyon dayanımı ve raf ömrü daha yüksek olur (Tombelli ve diğ., 2005).

2. Aptasensörler

Aptamerler, immünoanaliz yöntemlerinde olduğu gibi, farklı hedef moleküllerin tayininde biyosensör olarak kullanılabilirler. Literatürde aptamerlerin farklı mole-

küllerin tayininde kullanılması ile ilgili çok sayıda yayına ulaşılabilir (örneğin, Çağlayan, 2017; Wang ve diğ., 2010 gibi). Aptasensörler, hedefi yakalayan bir antihedef aptamerinin immobilize edildiği dönüştürücü eleman yüzeyi ve bağlanma sonucunda oluşan değişimi algılayan bir dönüştürücüdür. Dönüştürücüler optik, elektrokimyasal, kütle değişim, elektriksel ve ısı tabanlı olabilirler. Her bir dönüştürücü türünün kendine özgü avantaj ve dezavantajları vardır. Bazı dönüştürücüler mikro-işlenebilir yapıdadır ve el tipi taşınabilir cihaz olarak uyarlanabilirler.

Adli bilim uygulamalarında toksinler ve ilaç etken maddeleri (örneğin Mckeague ve DeRosa, 2012, inceleme makalesi) gibi uygulamalar mevcuttur. Belirli bir molekül üzerine farklı aptamerler ve farklı algılama teknikleri ile çok sayıda çalışma yapıldığı görülebilir. Bu makalede, kokain için geliştirilen aptasensörler incelenmiştir.

3. Kokain Tayininde Aptamerler

Küçük moleküllerin, bu moleküllere özgü seçilmiş aptamerler ile yakalanması verimli olduğundan, özellikle uyuşturucu maddelerin kontrolü aşamasında aptasensörler ilgi çekmektedir. Bilimsel literatürün yanı sıra, uygulamaya yönelik ve patent literatüründe mevcut çalışmalar da bulunmaktadır. Örneğin, amfetamin, metamfetamin, ketamin, kokain ve flunitrazepam için floresan etiketli kaset formatında analiz için aptasensör esaslı bir yerinde analiz cihazı için Holmes (2010) tarafından US2010/01997516 numaralı patent bulunmaktadır. Membran kullanarak aptamer esaslı illegal ilaç tayininde kullanılmak üzere tasarlanan bir sistem için de patent bulunmaktadır (Heemstra, 2014).

İmmünosensör ile belirlenebilen tüm narkotik ilaçların aptamerler ile de tayini mümkündür. Narkotik ilaçların tayininde immünosensörler ve nanoparçacık uygulamaları hakkında bir inceleme makalesi mevcuttur (Gandhi, 2015). Belirtilen yöntemler, aptamerlere uyarlanabilir.

Tablo 1'de kokain tayini için kullanılan aptamerler ile ilgili ayrıntılı bir liste verilmiştir. Rapor edilmiş aptamerler ile farklı analiz konfigürasyonlarında yapılan çalışmalar, serum ve doğrudan insan kanından da dâhil olmak üzere, oldukça düşük algılama sınırı ve bazı durumlarda oldukça geniş algılama aralığı sunmaktadır. Kokain tayininde kullanılan yöntemle ait örnek bir diyagram Şekil 2'de verilmiştir.

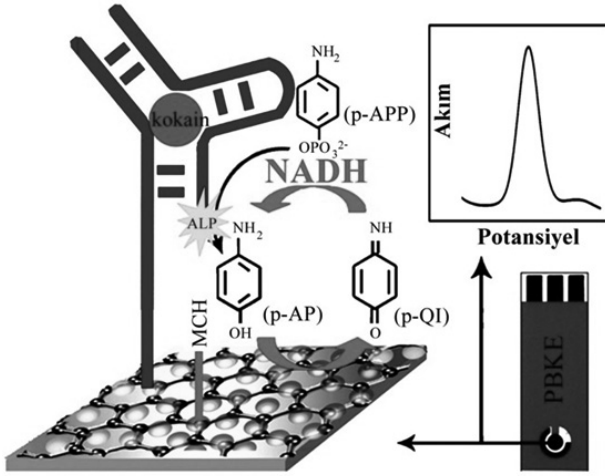
Ancak, aptamerler ile kokain tayininde en çok ilgi çeken konu, doğrudan kolorimetrik ölçüm ile tayin gerçekleştirebilen analiz yöntemlerini geliştirmektir. Herhangi bir ilave cihaza gerek kalmaksızın, eşik değerinde kokain varlığını gösteren kolorimetrik bir yöntemin sahada kullanılması daha kolay olacaktır. Stojanovic ve Landry

Tablo 1. Kokain tayininde kullanılan aptasensörler ve özellikleri

Yöntem	Çalışma Prensipleri	Aptamer	Performans	Referans
DNA aptamer ile kombine edilmiş membran protein kanalı - Floresans	Lipid tabaka üzerinde α -hemolisin membrandan, kokain bağlı iken geçiş sınırlaması ve floresans sinyali alınımı	Stojanovic ve diğ., 2001 KD=0.4 μ M	300 ng/mL (60 s) 3 μ g/mL (25 s)	Kawano ve diğ., 2011
DNA aptamer ile sarmalanmış tek duvarlı karbon nanotüp - Spektrofotometrik	Tek duvarlı CNT ile 807 nm'de gerçekleşen soğurumun spektrofotometrik ölçümü	Cekan ve diğ., 2009 KD= 100 μ M	49.5 nM LOD 0-200 nM doğrusal ölçüm aralığı	Taghavi ve diğ., 2014
Rutenyum kompleks ile fonksiyonlaştırılmış DNA aptamer, Elektrokimyasal	Rutenyum ile elektrokemilüminesans sinyali elde edilmesi	Stojanovic ve diğ., 2001 KD=0.4 μ M	1 nM LOD 5 nM- 300 nM	Li ve diğ., 2007
Au nanoparçacık ile kaplanmış elektrot yüzeyine immobilize DNA aptamer, Elektrokimyasal	Elektrokimyasal empedans spektroskopisi ile bağlanma sonucu azalan sinyal ölçümü	Liu ve diğ., 2006 KD=10 μ M	0.3 μ M LOD 1 μ M-150 μ M	Hua ve diğ., 2010
Aptamer immobilize elektrot, Elektrokimyasal	Dairesel DNA'nın kokain yakalayan aptamere bağlanması ve izotermal DNA amplifikasyonu ile sinyal yükseltilmesi	Neves ve diğ., 2010 KD=9 μ M	1.3 nM LOD 2-500 nM	Shen ve diğ., 2015
Grafen/Altın nanoparçacık üzerine immobilize DNA aptamer, Elektrokimyasal	Elektrokimyasal olarak redoks döngüsü ile amplifikasyon	KD belirtilmemiş	1 nM LOD 1-500 nM dinamik aralık	Jiang ve diğ., 2012
Altın elektrot üzerinde, elektrokimyasal empedans ölçümü, Elektrokimyasal	Ara yüz elektron transferi direnci değişimi ölçümü ile doğrudan etiketsiz analiz	3 farklı aptamer yapı KD belirtilmemiş	100 nM 0.1-20 μ M dinamik aralık	Zhang ve diğ., 2012
İki parçalı kokain aptameri ve floresan etiket, Floresans	Grafen oksit üzerinde, kokaine bağlanmayan floresan etiketli aptamer parçasının sönmülmesi ile floresan sinyalinin azalması	2 aptamer fragmanı KD belirtilmemiş	0.1 nM LOD 1-500 nM doğrusal aralık	Zhang ve diğ., 2016
Floresans ve konçlayıcı molekül ile modifiye edilmiş DNA aptamer, Floresans	Kokain ile bağlanma sonucu etkileşen floresans ve konçlayıcı nedeniyle floresan sinyalde azalma	KD= 0.4 μ M	10 μ M LOD 12.5-1500 μ M ölçüm aralığı	Stojanovic ve diğ., 2001
Kokain aptamerinin eşleniğine bağlı altın nanopartikül ve floresans etiketlenmiş aptamer DNA, Floresans	Kokain olmadığı durumda Au nanoparçacık ile sönmülendi floresans sinyali	Stojanovic ve diğ., 2001 KD 0.4 μ M	1 nM LOD Sınırsız ölçüm aralığı	Ge ve diğ., 2012
Au nanoparçacık üzerine immobilize anti-kokain aptamer ile iyon duyarlı alan etkili transistör (ISFET)	Au elektrot üzerinde kokain ile birlikte bağlanan Au nanoparçacığına bağlı ikinci anti-kokain aptameri fragmanı ile sinyal alınımı	Stojanovic ve diğ., 2001 KD 0.4 μ M	1 μ M LOD 0-1 mM ölçüm aralığı	Sharon ve diğ., 2009

(2002), kokain bağlandığında aptamer içerisine hapsedilmiş monomerik boyanın yapıdan ayrılarak çökmesi sonucu renk değiştiren bir kolorimetrik kokain sensörü geliştirmiştir (LOD belirtilmemiştir). Nanoparçacık agregatlarının kokain ve kokain aptameri ile birlikte yapıda bulunduğu durumda çözülerek, nanoparçacığına özgü rengi verdiği bir diğer kolorimetrik çalışmada 50 ila 500 μ M

aralığında kokain tespiti mümkün olmuştur (Liu ve Lu, 2006). Bir diğer kolorimetrik çalışmada kokain için 10 μ M'lık algılama sınırı elde edilmiştir (Xia ve diğ., 2010). Altın nanoparçacık kullanılarak gerçekleştirilen bir diğer çalışmada (Şekil 3), kokain derişimine bağlı olarak renk değişimi gözle bile takip edilebilmektedir (Zhang ve diğ., 2008).

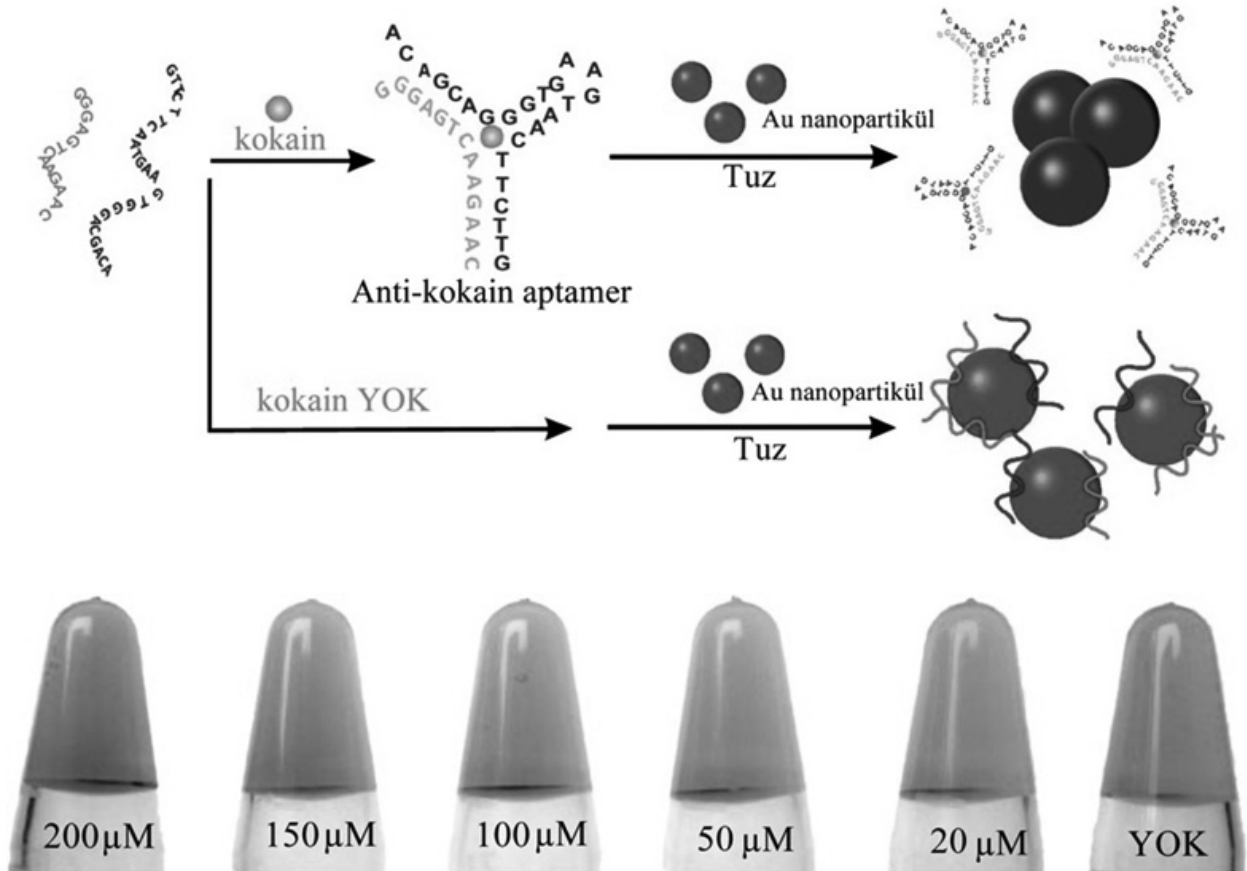


Şekil 2. Kokain aptameri ile grafen üzerine Au nanoparçacık dekore edilmiş yüzeyde elektrokimyasal kokain tayinine örnek (Jiang ve diğ., 2012)

4. Parmak İzi Belirlemede Aptamerler

Mevcut tekniklerin hassasiyet ve seçiciliklerinin yeterli seviyede olmaması nedeniyle, vakanın çözümünü sağlaması muhtemel, olay yerinde kayda değer miktarda gizli kalmış parmak izlerinin bulunduğu belirtilmiştir (Almog ve diğ., 2004). Aptamerlerin oldukça farklı hedeflere spesifik ve üç boyutlu kompleks yapılar oluşturarak başarılı bir şekilde bağlanmaları nedeniyle (Stoltenburg ve diğ., 2007; Yang ve diğ., 2007), lizozime özgü modifiye aptamerler kullanılarak, görünmeyen parmak izleri başarı ile belirlenmiş ve kaydedilmiştir.

Parmak bir yüzeye temas ettiğinde, derideki çizgiler boyunca var olan gözeneklerden çıkan doğal salgılar ile yabancı cisme dokunulduğunda harici kirleticilerin bir kompleks karışımı, temas edilen yüzeyde birikir. Bu tür parmak izleri gizli parmak izleri olarak adlandırılır. Bu tür parmak izleri adli tıp incelemelerinde en sık karşılaşılan kanıt türlerinden birisidir (Champad ve diğ., 2004). Bu izler genellikle göz ile görülmediğinden, bu izlerin belirlenmesi ve görünür hale getirilebilmesi için çeşitli optik, fiziksel veya kimyasal tekniklerin uygulanması gerekir (Lennard, 2007). İzlerin görünür hale getirilmesi,



Şekil 3. Kolorimetrik kokain aptasensörün çalışma prensibi ve kokain derişimine bağlı olarak renk değişimi (Zhang ve diğ., 2008).

gizli parmak izinin içerisinde bulunan kalıntıların bileşim ve doğası nedeniyle gerçekleşir. Yüzeyle parmak izinin arasında bir kontrast oluşturmak için developer kullanılır.

Lizozim, insan teri içerisinde bulunan 400'ü aşkın polipeptit bileşiğinden birisidir (Wilson, 2005). Bakteri hücre duvarı peptidoglikonların bağlarını hidrolize ederek cildin koruma sisteminde önemli bir rol oynar. Ciltteki lizozim derişimi bilinmesine rağmen, gizli parmak izlerindeki miktarı, bu birikimlerin kendine has ve karmaşık doğası nedeniyle bilinmemektedir (Wolstenholme, 2009).

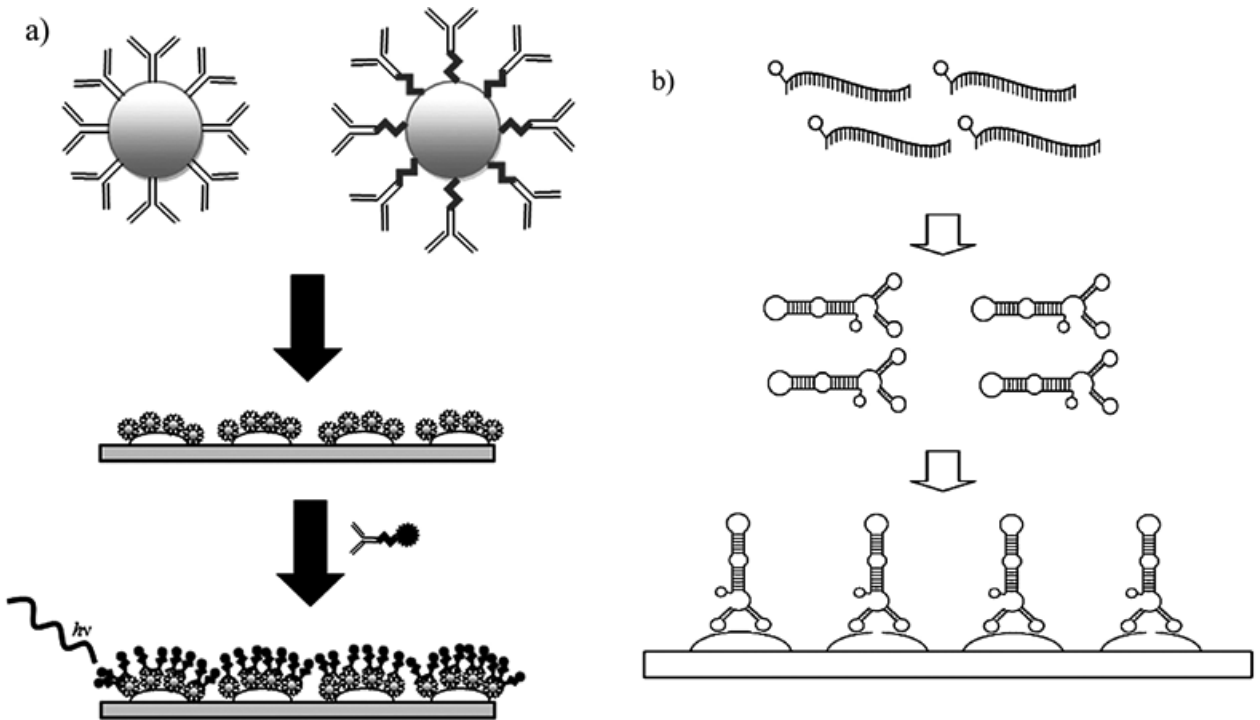
Rapor edilen 30mer'lik anti-lizozim aptameri için sölümme sabiti (K) 30 nM (Cox ve diğ., 2001) ve 80 mer'lik aptamer için K 2.8 nM olarak (Tran ve diğ., 2010) belirtilmiştir. Bu anti-lizozim aptamerlerin kullanılması ile parmak izlerinin başarılı bir şekilde belirlendiği çalışmada (Wood ve diğ., 2012) skualen, oleik asit, palmitik asit ve glikoz gibi diğere parmak izi bileşikleriyle jelatin ve sığır serum albümini (BSA) kullanılarak antilizozim aptamerinin seçicilik performansı da değerlendirilmiştir. Aptamerler, yüksek seçicilik ile lizozime bağlanarak parmak izinin belirlenmesini sağlamıştır (Şekil 4b ve Şekil 5).

Antikorların (anti-L-aminoasit antikor), sandviç analiz yöntemi ile (floresan molekölle etiketlenmiş ikin-

ci antikorun yüzeyle uygulanması) parmak izi belirlemede kullanılması da mevcuttur (Şekil 4a, Spindler ve diğ., 2011). Ancak, antikorların saklama koşulları ile uygulama koşullarının sonucunda protein yapısındaki muhtemel denatürasyon bağlanma tepkimesine etki edebilir. Antikaterin, antikatepsin-D ve antidermisidin gibi antikorların kullanıldığı farklı parmak izi uygulamalarına Drapel ve diğ. (2009) çalışmalarından ve antikotininin kullanıldığı çalışmadan (Legget ve diğ., 2007) ulaşılabilir.

5. Aptamerlerin Adli Bilimlerdeki Geleceği

Bu makalede, aptamerlerin Adli Bilimlerde kullanımı hakkında örnekler vermeye çalıştık. Antikorlara alternatif olan aptamerler, benzer şekilde birçok konuda kullanıma ve geliştirmeye açık bir alandır. Günümüzde ticari olarak mevcut "rapid-test"lerin büyük çoğunluğunda kullanılan immünokimyasal etkileşimler, kendisini tekrarlanabilirlik, spesiflik ve hassasiyet konularında kanıtlamıştır. Ancak, bu etkileşimlerin dezavantajı, sensör yapısının ortam koşullarından etkilenmesi ve özellikle de protein yapısının sıcaklığa duyarlı olmasıdır. Bu tür sorunlara sahip olmayan aptasensörlerin en büyük dezavantajı ise, spesifliğin her durumda sağlanamamasıdır. Ancak, farklı stratejiler kullanılarak (örneğin sandviç analiz) bu



Şekil 4. (a) anti-L-aminoasit antikor kullanımı- Doğrudan bağlı veya alkil-tiyol bağlı antikorları içeren nanoparçacık çözeltisi parmak izi üzerine uygulanır ve parmak izlerinde bulunan L-aminoasit ile bağlanır. Floresan etiket 590 nm'de uyarılır (Spindler ve diğ., 2011). (b) CAL-Fluor Orange 560 ile etiketlenen aptamerler doğrudan lizozim içeren parmak izine uygulanır, aptamer kendine özgü üç boyutlu formasyonunu alarak lizozim ile etkileşir. Uyarım 505 nm ile gerçekleştirilir (Wood ve diğ., 2012).



Şekil 5. Poliviniliden diflorit (PVDF) üzerinde, aptamer esaslı kimyasal ile develope edilmiş parmak izi görüntüsü. Parmak izi uygulama öncesi 24 saat bekletilmiştir (Wood ve diğ., 2012).

tür spesifiklik problemlerinin üstesinden gelinmesi mümkündür. Uygulamada, mevcut immüno-sensör temelli yapılara alternatif aptasensörlerin bulunmaması, bu tür sensörler için araştırmaların çok kısa bir süre önce laboratuvar dışına çıkmasından kaynaklanabilir. Patent literatürü incelendiğinde, son on yıl içerisinde az sayıda da olsa aptamer esaslı sensörlerin ve uygulamaların, adli tıp da dahil olmak üzere, ortaya çıktığı görülmektedir. Bir hedef molekül için uygun aptamerin seçilmesinde temel yöntem SELEX olsa da, bazı rastgele veya sistematik mutasyonlar içeren aptamerlerin üretilip denenmesi, immüno-sensörlere kıyasla daha kolay ve ucuzdur. Bu nedenle, spesifiklik ve karmaşık ortamlarda (plazma, idrar, tükürük vb.) hassasiyet ve tekrarlanabilirlik koşullarının sağlanması zor olsa da, araştırma sırasında farklı aptamer uzunlukları ve dizilimlerinin denenmesi sürecinin ucuz ve kolay olması, bu dezavantajı hafifletmektedir.

Özellikle üretim ve çoğaltma aşaması antikorlara oranla çok daha ucuz (ve kolay) olan aptamerlerin, herhangi bir küçük molekülde nasıl bir konformasyon ile bağlanacağını modellenmesi de mümkündür. Mevcut bilgisayar altyapıları proteinlerin çoklu bağlanma bölgelerini modellemekte zorlanırken, ortalama 30 mer'lik aptamerlerin moleküller ile etkileşimleri çok daha rahat modellenmektedir. Bu nedenle, teorik olarak geliştirilen aptamerlerin SELEX veya benzeri yöntemler yüksek afinite ile hedefe özgü olarak çoğaltılması, iş yükünü de azaltabilir. 30 yıl içerisinde aptamerler ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmış olmasına rağmen, aptasensörler ve diğer aptamer uygulamaları, halen geliştirilmeye devam eden ve sonsuz konfigürasyonda çalışma yapılabilir bir alandır.

Kaynaklar

1. Almog J, Cohen Y, Azoury M, Hahn TR. Genipin--A Novel Fingerprint Reagent with Colorimetric and Fluorogenic Activity. *J Forensic Sci.* 2004; 49(2):255-7.
2. Brittany B, Hipp RE, Morgan NR, Morgan SL. Chemical Composition of Latent Fingerprints by Gas Chromatography–Mass Spectrometry. An Experiment for an Instrumental Analysis Course. *J Chem Educ.* 2007; 84 (4): 689-73.
3. Çağlayan MO. Electrochemical Aptasensors for Early Cancer Diagnosis: A Review. *Curr Anal Chem.* 2017; 13(1): 18-30.
4. Cekan P, Jonsson EO, Sigurdsson ST. Folding of the Cocaine Aptamer Studied by EPR and Fluorescence Spectroscopies using the Bifunctional Spectroscopic Probe Ç. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(12):3990-5.
5. Champad C, Lennard CI, Margot P, Stoilovic M. Fingerprints and Other Ridge Skin Impressions, CRC Press, Boca Raton 2004.
6. Cox JC, Ellington AD. Automated Selection of Anti-Protein Aptamers. *Bioorg Med Chem.* 2001; 9(10): 2525-31.
7. Drapel V, Becue A, Champod C, Margot P. Identification of Promising Antigenic Components in Latent Fingerprint Residues. *Forensic Sci Int.* 2009; 184(30): 47-53.
8. Ellington AD, Szostak JW. In Vitro Selection of RNA Molecules That Bind Specific Ligands. *Nature.* 1990; 346: 818–22.
9. Gandhi S, Suman P, Kumar A, Sharma P, Capalash N, Suri CR. Recent Advances in Immunosensor for Narcotic Drug Detection. *Bioimpacts.* 2015; 5(4):207-13.
10. Ge J, Liu Z, Zhao XS. Cocaine Detection in Blood Serum Using Aptamer Biosensor on Gold Nanoparticles and Progressive Dilution. *Chin J Chem.* 2012; 30: 2023–8.
11. Heemstra J. Aptamer-Based Lateral Flow Assay and Associated Methods, US 2014/0011193 A1, 2014, US. Pat. Office.
12. Herman T, Patel D. Adaptive Recognition by Nucleic Acid Aptamers. *Science.* 2000; 287: 820–5.
13. Holmes A. Detechip: Molecular Color and Fluorescent Sensory Arrays for Small Molecules, US 2010/0197516 A1, 2010, US. Pat. Office.
14. Hua M, Tao M, Wang P, Zhang Y, Wu Z, Chang Y, Yang Y. Label-Free Electrochemical Cocaine Aptasensor Based On A Target-Inducing Aptamer Switching Conformation. *Anal Sci.* 2010; 26(12):1265-70.
15. Jenison RD, Gill SC, Pardi A, Polisky B. High-Resolution Molecular Discrimination by RNA. *Science.* 1994; 263: 1425–9.
16. Jiang B, Wang M, Chen Y, Xie J, Xiang Y. Highly Sensitive Electrochemical Detection of Cocaine on Graphene/AuNP Modified Electrode via Catalytic Redox-Recycling Amplification. *Biosens Bioelectron.* 2012; 32(1):305-8.
17. Kawano R, Osaki T, Sasaki H, Takinoue M, Yoshizawa S, Takeuchi S. Rapid Detection of a Cocaine-Binding Aptamer Using Biological Nanopores on a Chip, *J Am Chem Soc.* 2011; 133 (22): 8474-7
18. Leggett R, Smith L, Emma E, Jickells SM, Russell A. Intelligent Fingerprinting: Simultaneous Identification of Drug

- Metabolites and Individuals by Using Antibody-Functionalized Nanoparticles. *Angew Chem Int Ed.* 2007; 46: 4100–3.
19. Lennard C. Fingerprint Detection: Future Prospects. *Aus J Forensic Sci* 2007; 39(2): 73-80.
 20. Li Y, Qi H, Peng Y, Yang J, Zhang C. Electrogenerated Chemiluminescence Aptamer-Based Biosensor For The Determination Of Cocaine. *Electrochem Commun.* 2007; 9(10): 2571-5.
 21. Liu J, Lu Y. Fast Colorimetric Sensing of Adenosine and Cocaine Based on a General Sensor Design Involving Aptamers and Nanoparticles. *Angew Chem Int Ed.* 2006; 45: 90–4.
 22. Liu J, Mazumdar D, Lu Y. A Simple and Sensitive “Dipstick” Test in Serum Based on Lateral Flow Separation of Aptamer-Linked Nanostructures. *Angew Chem Int Ed.* 2006; 45(47):7955-9.
 23. Luzzi E, Minunni M, Tombelli S, Mascini M. New Trends in Affinity Sensing: Aptamers for Ligand Binding. *Trends Anal Chem.* 2003; 22: 810–8.
 24. Marshall KA, Ellington AD. In Vitro Selection of RNA Aptamers. *Meth Enzymol.* 2000; 318:193–214.
 25. Mckeague M, DeRosa M. Challenges and Opportunities for Small Molecule Aptamer Development. *J Nucleic Acids.* 2012, 748913
 26. Neves MA, Reinstein O, Saad M, Johnson PE. Defining the Secondary Structural Requirements of a Cocaine-Binding Aptamer by a Thermodynamic and Mutation Study. *Biophys Chem.* 2010; 153(1):9-16.
 27. Sharon E, Freeman R, Tel-Vered R, Willner I. Impedimetric or Ion-Sensitive Field-Effect Transistor (ISFET) Aptasensors Based on the Self-Assembly of Au Nanoparticle-Functionalized Supramolecular Aptamer Nanostructures. *Electroanalysis.* 2009; 21:1291–6.
 28. Shen B, Li J, Cheng W. Electrochemical Aptasensor for Highly Sensitive Determination of Cocaine Using a Supramolecular Aptamer and Rolling Circle Amplification. *Microchim Acta.* 2015; 182(1): 361-7.
 29. Spindler X, Hofstetter O, McDonagh AM, Roux C, Lennard C. Enhancement of latent fingerprints on non-porous surfaces using anti-L-amino acid antibodies conjugated to gold nanoparticles. *Chem Commun (Camb).* 2011 21; 47(19): 5602-4.
 30. Stojanovic MN, de Prada P, Landry DW. Aptamer-Based Folding Fluorescent Sensor for Cocaine. *J Am Chem Soc.* 2001; 123 (21): 4928-31.
 31. Stojanovic MN, Landry DW. Aptamer-Based Colorimetric Probe for Cocaine. *J Am Chem Soc.* 2002; 124 (33): 9678-9.
 32. Stoltenburg S, Reinemann C, Strehlitz B. SELEX—A (R) Evolutionary Method to Generate High-Affinity Nucleic Acid Ligands. *Biomol Eng.* 2007; 24(4): 381-403
 33. Taghav S, Ayatollahi S, Alibolandi M, Lavaee P, Ramezani M, Abnous K. A Novel Label Free Cocaine Assay Based on Aptamer-Wrapped Single-Walled Carbon Nanotubes. *Nanomed. J.*, 2014; 1(2):100-6.
 34. Tombelli S, Minunni M, Mascini M, Analytical Applications of Aptamers. *Biosens Bioelectron.* 2005; 20: 2424-34.
 35. Tuerk C, Gold L. Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: RNA Ligands to Bacteriophage T4 DNA Polymerase. *Science.*1990; 249: 505–10.
 36. Wilson M. *Microbial Inhabitants of Humans: Their Ecology and Role in Health and Disease*, Cambridge University Press, Cambridge, 2005.
 37. Wolstenholme R, Bradshaw R, Clench MR, Francese S. Study Of Latent Fingermarks by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Mass Spectrometry Imaging of Endogenous Lipids. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2009; 23: 3031–39.
 38. Wood M, Maynard P, Spindler X, Lennard C, Roux C. Visualization of Latent Fingermarks Using an Aptamer-Based Reagent. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2012; 51: 12272–74. doi:10.1002/anie.201207394
 39. Xia F, Zuo X, Yang R, Xiao Y, Kang D, Vallée-Bélisle A, Gong X, Yuen JD et al., Colorimetric detection of DNA, small molecules, proteins, and ions using unmodified gold nanoparticles and conjugated polyelectrolytes, *PNAS* 2010 107 (24) 10837-10841
 40. Yang Y, Yang D, Schluesener HJ, Zhang Z, *Advances In SELEX and Application of Aptamers in the Central Nervous System.* *Biomol Eng.* 2007; 24(6): 583-92.
 41. You KM, Lee SH, Im A, Lee SB. Aptamers as Functional Nucleic Acids: In Vitro Selection and Biotechnological Applications. *Biotechnol Bioprocess Eng.* 2003; 8: 64–75.
 42. Zhang DW, Sun CJ, Zhang FT, Xu L, Zhou YL, Zhang XX. An Electrochemical Aptasensor Based on Enzyme Linked Aptamer Assay. *Biosens Bioelectron.* 2012; 31(1): 363-8.
 43. Zhang DW, Zhang FT, Cui YR, Deng QP, Krause S, Zhou YL, Zhang XX. A Label-Free Aptasensor for the Sensitive and Specific Detection of Cocaine Using Supramolecular Aptamer Fragments/Target Complex by Electrochemical Impedance Spectroscopy. *Talanta.* 2012; 15(92):65-71.
 44. Zhang J, Wang L, Pan D, Song S, Boey FYC, Zhang H, Fan C. Visual Cocaine Detection with Gold Nanoparticles and Rationally Engineered Aptamer Structures. *Small.* 2008; 4: 1196–200.
 45. Zhang Y, Sun Z, Tang L. Aptamer Based Fluorescent Cocaine Assay Based on the Use of Graphene Oxide and Exonuclease III-Assisted Signal Amplification. *Microchim Acta.* 2016; 183: 2791-7.