

SELEX技术及 Aptamer 研究的新进展

邵宁生^{1)*} 李少华¹⁾ 黄燕苹²⁾

(¹⁾军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850, ²⁾中国人民武装警察总医院, 北京 100039)

摘要 综述了近几年指数富集的配体系统进化 (SELEX) 技术的改良与寡核苷酸配基 (aptamer) 研究应用方面的新进展. Aptamer 是指利用 SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) 技术, 从随机寡核苷酸文库中筛选获得的能够与靶分子特异结合的短单链寡核苷酸配基, 通常具有纳摩尔到皮摩尔的亲和力. 高通量筛选的技术特点与 aptamer 精确识别、易体外合成与修饰等特性, 使得 aptamer 在分析化学与生物医药研究方面具有广阔的应用前景.

关键词 指数富集的配体系统进化(SELEX), 寡核苷酸配基(aptamer), 高通量筛选

学科分类号 Q782

指数富集的配体系统进化 (SELEX) 技术^[1,2]的基本原理就是利用分子生物学技术, 构建人工合成的单链随机寡核苷酸文库, 其随机序列长度在 20~100 个碱基左右. 将随机寡核苷酸文库与靶分子相互作用, 保留结合的寡核苷酸配基(aptamer), 经反复扩增、筛选数个循环, 即可使与该靶分子特异结合的寡核苷酸序列得到富集. 由于单链随机寡核苷酸片段特别是 RNA 结构灵活易变, 三维构象复杂, 很容易形成与靶标结合的口袋结构, 因此理论上能与各种靶标分子结合. 利用上述原理建立的 SELEX 技术已经成功获得多种靶分子的特异 aptamer. SELEX 技术打破了传统的核苷酸碱基配对的思路, 称得上核酸研究与应用上的里程碑.

利用 SELEX 技术筛选获得的 aptamer 识别分子的模式与抗体类似, 但与蛋白质类抗体相比, 核酸类配基具有更多的优越性, 如不受免疫条件和免疫原性限制, 可体外人工合成, 变性与复性可逆, 可修饰并易于长期保存和室温运输等. 更重要的是, aptamer 的靶分子更为广泛, 可以是蛋白质、核酸、小肽、氨基酸、有机物甚至金属离子等. Aptamer-靶分子之间可以达到很高的亲和力, 甚至高于抗原-抗体之间的结合. Aptamer 比抗体具有更高的特异性, 甚至能识别单抗不能区分的蛋白质分子. 这些特性使得 aptamer 在生物医药研究领域得到广泛应用, 成为不可缺少的有力工具.

从 1990 年 Gold 等建立 SELEX 技术至今,

SELEX 技术和 aptamer 的研究不断受到新的挑战与更新. 经过 15 年的发展, SELEX 技术不断得到改进与完善, 实现了筛选流程的自动化、筛选形式的多样化、筛选结果的快速化, aptamer 也有了多种应用形式.

1 新近出现的改良 SELEX 技术

1.1 自动化 SELEX

2001 年 Cox 等^[3]成功地应用 Beckman-Coulter Biomek 2000 自动化工作站筛选到了溶菌酶的 aptamer, 该工作站包括机械操控台, 热循环仪, 磁珠自动分离器, 多屏真空过滤仪, 酶冷却仪, 自动移液工具等. 筛选的流程包括: 通过链酶亲和素与生物素的相互作用将生物素化的靶蛋白固定在磁珠上. 随后特异结合序列的分离, RT-PCR 扩增和转录都通过设定的程序自动化完成, 最后筛选得到的序列克隆到载体中进行测序鉴定. 通过这种自动化筛选工作台, 作者只用了不到两天的时间就完成了 12 轮的筛选. 但由于上述自动化筛选需要纯化的蛋白质作为靶标, 限制了它在蛋白质组学中的应用. 对此, 2002 年 Cox 等^[4]又做了进一步改进, 直接利用基因体外转录与翻译的方法产生靶蛋白, 通

* 通讯联系人. Tel: 010-66932311, Fax: 010-68163140

E-mail: shaons@yahoo.com

收稿日期: 2005-11-08, 接受日期: 2005-12-30

过在基因的 5'端引入 T7 启动子和一个生物素蛋白连接酶 (BPL) 识别序列 (biotag), 3'端引入 BPL 基因及 T7 终止子, 转录产生两个顺式的 mRNA, 翻译后产生 BPL 蛋白与一个 biotag 标签的目的蛋白. 当加入游离的生物素时, BPL 识别 biotag 序列, 将生物素共价结合到目的蛋白上, 便于将靶蛋白固定在链酶亲和素包被的磁珠上, 利用自动化筛选工作站筛选特异的 aptamer. 2005 年 Stoltenburg 等^[9]借助上述磁珠固定靶分子的原理, 同时引入荧光标记方法用于 DNA 定量, 发展了 FluMag - SELEX 方法, 能够快速筛选不同特性和大小的靶分子, 避免了同位素检测, 适合制备生物传感器.

1.2 消减 SELEX (subtractive SELEX)

消减 SELEX 是我们首先建立的一种改良 SELEX 技术^[6]. 其原理是在筛选过程中扣除能与已知或未知的共有靶分子的寡核苷酸配基, 消减后的次级随机文库投入特异靶标的筛选. 利用消减 SELEX 技术可以从两组高度同源的靶分子混合物中筛选获得差异靶分子的特异 aptamer. 利用该技术, 我们实验室以未分化的完整 PC12 细胞为消减靶子, 筛选获得了特异识别分化 PC12 细胞的 aptamer. 我们建立的消减 SELEX 技术重要性在于能够实现以两组高度同源的完整细胞为靶子, 筛选其差异的 aptamer, 可用于寻找某种肿瘤的特异寡核苷酸配基, 获得的 aptamer 不但有可能用于临床诊断, 还有可能作为生物导弹用于靶向治疗, 在肿瘤的个体化治疗中发挥其独特的优势.

1.3 毛细管电泳 SELEX (CE-SELEX)

SELEX 技术中结合配基与游离配基的分离至关重要, 是限制经典 SELEX 技术发展的一个难点. Mendonsa 等^[7]根据核酸配基与靶分子结合能够使其构象和质量改变并导致其电泳行为显著变化的特性, 利用毛细管电泳 (CE) 成功地将结合配基与游离配基有效分离. 利用 CE-SELEX 方法仅需 2~4 轮筛选就可获得靶分子的特异配基. Drabovich 等^[8]根据 ECEEM (equilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures) 的特征, 利用不同亲和力的 aptamer 迁移率不同并可预测的特性, 收集不同时间相的平衡混合物, 仅三轮筛选就获得了特定亲和力的 MutS 蛋白的 aptamer. 毛细管电泳 SELEX 技术的出现, 极大地提高了 SELEX 筛选效率, 缩短了 SELEX 筛选过程, 在今后几年中将会成为 SELEX 筛选主要手段之一.

1.4 加尾 SELEX (tailored SELEX)

通常人工合成的寡核苷酸序列包含中间的随机区和两端 15~25 nt 已知序列的固定区. 固定区虽然方便 PCR 扩增与体外转录, 但常常参与 aptamer 与靶分子的结合, 影响后续的截短活性序列的功能. 另外, 固定序列还有可能与中间的随机区退火而影响筛选. Vater 等^[9]建立的加尾 SELEX 技术, 克服了上述缺点, 能够直接、快速获得与靶分子结合的 RNA 序列, 而无需进一步的截短实验. 其技术原理是首先构建随机文库, 两端各含有 4 nt 和 6 nt 的固定序列, 用于与接头序列连接搭桥. 合成文库两端的单链连接序列含有 T7 启动子序列、可用碱裂解的碱基以及便于文库扩增的序列. 合成的单链接头序列, 能够与上述连接序列和文库的固定序列退火, 形成搭桥, 用于 PCR 扩增. 如此, 筛选过程中仅投入随机文库, 在筛选后通过连接、搭桥的方式加入两端连接序列与接头序列, PCR 扩增后再经碱裂解处理去除两端序列, 投入下一轮筛选.

1.5 无引物基因组 SELEX (primer-free genomic SELEX)

1999 年 Singer 和 Gold 分别根据 SELEX 技术原理将感兴趣的生物体基因组制成寡核苷酸文库, 从中筛选生物活性分子如蛋白质、辅因子、多糖、抗生素等的天然识别序列. 他们建立的 genomic SELEX 为解析细胞内基因调控、代谢调控等问题提供了大量实验数据.

由于基因组 SELEX 中用于 PCR 扩增的引物序列可能会与中间的基因组序列配对, 从而干扰靶标与基因组序列的结合, Wen 等^[10]结合加尾 SELEX 原理, 发展出了无引物基因组 SELEX (primer-free SELEX) 方法. 该方法是在筛选之前先将引物从基因组文库中除去, 文库与靶分子孵育后, 筛选获得的基因片段通过杂交 - 延伸热循环反应加入引物序列进行 PCR 扩增. 无引物基因组 SELEX 为研究基因组调控提供了新的平台技术.

1.6 切换 SELEX (toggling SELEX)

切换 SELEX 是应用不同物种的靶标蛋白, 筛选产生物种交叉反应性 aptamer. 这是 White 等^[11]在 2001 年建立的一种改良 SELEX 技术. 他们首先应用随机 RNA 文库筛选人凝血酶和猪凝血酶的混合物, 富集的文库再依次筛选人凝血酶和猪凝血酶, 如此经过 13 轮筛选, 获得能够与人凝血酶和猪凝

血酶都特异结合的 aptamer. 由于临床药物研发常常应用人体蛋白为靶标, 但在活性检测中要进行动物模型的实验, 因此这种交叉反应性 aptamer 便于在动物模型上进行药物分子的临床前评价. 另外, 对于某一蛋白质而言, 物种间保守的结构域常常是该蛋白质发挥功能所必需的. 切换 SELEX 能够获得针对该结构域特异的 aptamer, 因此能够提高 aptamer 的功能活性. 同样, 这种方法也适合筛选同一物种内具有冗余功能或重叠功能的受体家族蛋白, 配基家族蛋白或结构相关蛋白靶标.

1.7 表达盒 SELEX (expression cassette SELEX)

将 aptamer 用于基因治疗时需要将核酸序列转染哺乳细胞进行体内转录, 如将 aptamer 插入 tRNA 表达盒中转录产生嵌合 tRNA, 但转录的侧翼序列常常影响 aptamer 的空间结构进而降低 aptamer 的生物活性. Martell 等^[12]针对这一弊端将体外筛选的转录因子 E2F 的 aptamer 插入到 tRNA 中, 侧翼引入随机区, 然后再用 SELEX 流程体外筛选与 E2F 结合的序列, 这样产生的嵌合 RNA 在体内既能表达高水平的 aptamer, 又可以维持 aptamer 的活性, 由此建立的表达盒 SELEX, 为探讨 aptamer 的基因治疗奠定了基础.

1.8 变构筛选 (allosteric selection)

变构筛选的构思源于变构核酶: 将 aptamer 结合活性与锤头状核酶组合产生变构核酶, 当配基与 aptamer 结合时能够改变核酶构象, 激活或抑制核酶部分的活性. 变构筛选就是将 aptamer 相关结构域随机化, 利用核酶变构催化活性进行筛选, 获得对效应物应答的变构核酶. 同时, 利用核酶裂解底物序列的活性, 可以很容易实现结合 aptamer 与游离 aptamer 的分离^[13]. 例如, Soukup 等^[14]将体外筛选得到的茶碱 aptamer 与锤头状核酶整合, 二者连接区随机化, 然后以茶碱为靶标进行第二次筛选, 获得茶碱特异的核酶. 在 aptamer 与茶碱结合时, 连接区空间结构改变, 进而激活核酶活性. 得到连接区序列后, 若将茶碱 aptamer 序列随机突变, 筛选茶碱类似物, 可以很容易得到对茶碱类似物应答的变构核酶. 这些研究都拓展了 aptamer 的应用范围, 并实现了核酶活性的可调控性.

2 Aptamer 的多种新类型

为了增强 aptamer 的活性, 对 aptamer 本身的研究与改进也日益深入: 从体外筛选获得的 aptamer 到体内天然存在的 aptamer; 从单功能的

aptamer 到多功能 aptamer 和多价环状 DNA aptamer (multivalent circular aptamer/captamer); 从结合功能的 aptamer 到变构 aptamer; 从细胞外发挥作用的 aptamer 到细胞内的 aptamer; 从最初通过改变核苷的化学特性如核苷碱基修饰、磷酸二酯键骨架修饰等筛选前修饰的方法提高 aptamer 的稳定性, 到应用光学异构体、锁定核酸 (locked nucleic acids, LNAs) 修饰等手段进行筛选后修饰, 提高 aptamer 的体内稳定性. 这些研究为以 aptamer 为基础的生物学研究、新药研制奠定了基础.

2.1 核糖开关 (riboswitch)

这是一类存在于 mRNA 非翻译区的具有高级结构的一段 RNA 元件, 通过与代谢产物结合调控 (升高或降低) 基因表达, 包含两个功能域: 与小分子代谢产物结合的 “aptamer 功能域” 和基因调控的 “表达平台功能域” (expression platform domain). 无需蛋白质因子的参与, 直接受代谢产物调控是这类核糖开关的重要特性. 核糖开关发挥功能的机制与变构核酶类似, aptamer 功能域与代谢产物结合后, 引起表达平台功能域碱基配对及构象的改变, 或形成转录终止结构, 或解开转录终止结构, 隐蔽 Shine-Dalgarno 序列, 或者与代谢产物结合后构象改变产生新的核酶活性降解自身 mRNA, 或参与真核细胞 mRNA 的剪接. 3' 端的核糖开关还可以直接影响 mRNA 的稳定性, 最终完成基因调控功能^[15]. 目前已鉴定出 8 种核糖开关结合代谢产物: FMN、TPP、辅酶 B₁₂、SAM、甘氨酸、腺嘌呤、鸟嘌呤以及 GlcN6P, 它们主要存在于低 GC 的 G⁺ 细菌中, 如枯草杆菌. 最近发现 alpha- 朊细菌中也存在类似结构^[16]. 与每一类配基结合的核糖开关都存在于功能相关的一组基因的 mRNA 非翻译区或基因间区中, 参与该配基的代谢调控, 共有一些保守的序列和二级结构特征. 据估计, 原核生物中约有 2% 的基因存在核糖开关, 对保守 RNA 结构的研究可能会揭示更多的核糖开关机制, 真核生物中也可能存在核糖开关调控机制, 但相对会更为复杂.

2.2 Spiegelmer 及 LNA

Aptamer 尤其是 RNA aptamer 在应用中主要面临的是不稳定性. 传统方法主要是对 aptamer 进行化学修饰, 如核糖基团的 2' 位置或者对碱基和磷酸二酯键骨架的修饰, 以及 iso 碱基的应用, 用 α 硫代替脱氧核糖三磷酸, 应用 N3'→P5' 脱氧磷酸酰胺衍生物等^[17]. 但为了避免这些修饰改变 aptamer

的构象进而降低 aptamer 的活性, 通常这些修饰要在筛选之前进行. 新近出现的寡核苷酸的镜像异构体(spiegelmer)即 L-DNA 或 L-RNA 配基及 LNA 就能克服该缺点: spiegelmer 首先以 D- 肽为配基筛选获得天然寡核苷酸配基, 根据获得的 aptamer 序列人工合成其镜像异构体. 根据手性原理, 该 L 构型配基能够以相同的亲和力和特异性结合生理状态的 L- 肽^[18]. LNA 是新颖的核酸类似物, 它在核糖环上的 2'- 氧, 4'- 碳之间形成亚甲基连接, 这个连接限制着呋喃核糖的灵活性, 将其结构锁定成刚性的双环模式. LNA 寡核苷酸就是含有锁定核酸的新型寡核苷酸. 当用 LNA 修饰 aptamer 的非配基结合区域时, 能够提高双螺旋区域的热稳定性而不影响配基结合活性, 因此与常规的寡核苷酸配基相比, 它具有更广阔的应用前景^[19].

2.3 多效价环状 aptamer (multivalent circular aptamer/captamer)

构建多价环状 DNA aptamers^[20,21]的目的是用来延长 aptamer 的半衰期以及提高其与靶分子的亲和力: 将多个 aptamer 基序组合, 分子内或分子间连接, 产生多向的环状头和中间的螺旋茎, 得到环状的多效价 aptamer, 没有环化的 aptamer 经外切核酸酶降解. 这样不仅赋予 aptamer 多个配基结合活性, 还大大提高了 aptamer 活性. 如针对凝血酶中环状 aptamer 较常规筛选获得的 aptamer 具有更强的抗凝能力, 大约提高了 2~3 倍. 环型构象还能提高分子的热稳定性, 增强其核酸外切酶抗性, 通常血清中的环状 aptamer 半衰期都大于 10 h.

2.4 光交联 aptamer (photoaptamer)

光激发下, 能够与靶标分子结合并形成共价交联的一类 aptamer 称为光交联 aptamer. 光交联 aptamer 可通过体外转录产生, 具体是将具有光交联特性的核苷酸如 5- 溴 -2- 脱氧尿嘧啶 (BrdU) 或碘尿嘧啶代替 UTP 掺入到转录体系中. Kimoto 等^[22]利用 5- 碘 -2- 氧(¹H)嘧啶(5-iodo-2-oxo(¹H) pyridine, 简称为 Iy)和 2- 氨基 -6-(2- 噻吩)嘌呤(2-amino-6-(2-thienyl)purine, 简称为 s)非天然配对的特性, 发展了一种位点特异的光反应核苷酸掺入法. 首先用分别含有 T7 序列和 s 碱基的一对引物 PCR, 在转录模板中引入 T7 序列和 s 碱基, 然后用含有 IyTP 的体外转录体系将 Iy 引入 RNA 序列中与 s 碱基配对的位置. 由于是位点特异的交联, 因而能够提高 aptamer 对靶分子的特异性, 并减少由于过量引入光反应碱基而导致的对 aptamer 的损伤.

2.5 细胞内 aptamer (intracellular aptamer/intramer) 和嵌合 aptamer (chimeric aptamer)

由于临床上许多有应用前景的分子靶标是位于细胞内的, 尤其是病毒感染性疾病. 给药途径是这一类 aptamer 应用中面临的主要瓶颈问题. 利用细胞内的 tRNA 嵌合表达 aptamer 序列使这一问题迎刃而解. Chaloin 等^[23]将体外筛选获得的 HIV-1 RT 的 aptamer 活性序列嵌入到 tRNA^{Met} (tRNA^{Met})中, 实现了细胞内 aptamer 的高表达, 并能抑制感染细胞内 HIV-1 病毒颗粒的产生. Guo 等^[24]将 pRNA 的中央区置换成 ATP 结合 aptamer, 产生嵌合的 aptRNA, 既能结合 ATP, 又能在 ATP 存在的情况下组装感染病毒, 当突变 ATP 结合在病毒的某一重要功能域碱基时, 该 aptRNA 不仅失去 ATP 结合活性, 同时又使病毒丧失组装功能. 为了使嵌合表达的侧翼序列不影响 aptamer 的结合活性, 还可以利用前面所述的表达盒 SELEX 技术进行第二次的筛选, 获得体内高表达且仍然具有活性的嵌合 aptamer.

2.6 催化性核酸 aptamer (aptazyme)、变构 aptamer (allosteric aptamer)

如前所述, 由 aptamer 与锤头状核酶组合产生的变构核酶, 当配基与 aptamer 结合时能够激活或抑制核酶部分的活性. 由于能应答效应物, 变构核酶具有广泛的应用前景: 将不同效应物的变构核酶制备芯片, 可以分析并定量某一复杂体系中的特定成分, 如体外筛选获得具有连接酶活性的变构核酶; 当待检底物与变构核酶的 aptamer 结构域结合时, 变构核酶与生物素化底物连接, 从而固相化到链酶亲和素包被的微孔板上便于通量检测^[25]. 到目前为止, 已有多种变构核酶用于芯片检测, 包括对 ATP、FMN、Rev 肽段及茶碱等应答的变构核酶. 变构核酶还可以用于生物传感器和蛋白质组学的研究. 如 Srinivasan 等^[26]利用对 ADP 应答的变构核酶检测样品中的蛋白激酶活性. 方法是将变构核酶的 3'端连接荧光素基团, 反应体系还含有 ATP 底物和一段与变构核酶游离 5'端互补的寡核苷酸序列, 后者 5'端连接荧光淬灭基团. 当没有效应物存在时, 寡核苷酸与变构核酶退火, 使得荧光基团与淬灭基团靠近而不发荧光, 但当待检样品存在蛋白激酶活性时, ATP 底物转变成 ADP, 变构核酶与 ADP 结合, 发生构象变化, 激活核酶自我裂解活性, 裂解荧光素基团附近的核苷酸, 释放出游离的带有荧光基团的寡核苷酸, 从而使得反应体系产生

荧光信号. 这种方法不仅敏感、特异, 而且能够实时、定量检测激酶, 一步法完成, 在信号转导研究方面有巨大的应用潜力. 另外, 在医药应用方面, 这种受效应物调节的核酶活性更利于发展可控的生物制剂.

3 Aptamer 的应用现状与前景展望

由于 aptamer 具有精确识别、易体外合成与修饰等特性, aptamer 在分析化学、基因调控、蛋白质组研究、疾病治疗与新药研发等方面具有广阔的应用前景.

在分析化学方面, 将 aptamer 作为固定配基可用于分离技术中, 包括 HPLC, 亲和色谱分析, 毛细管电泳, 亲和基质辅助激光解析 / 离子质谱 (MALDI-MS), 生物传感器等^[27]. 以空间构象为基础的结合使得 aptamer 更适合作为选择分子用于 HPLC, 如 Michaud 等用 D- 寡肽特异的 aptamer 修饰分离柱, 可以特异分离 D- 肽与 L- 肽. Aptamer 还可以做为捕获底物制备微珠亲和色谱芯片 (microbead-based affinity chromatography chip, micro-BACC) 用来分离、分析靶标蛋白. 在微珠和 RNA aptamer 之间共轭有一个光裂解的接头, 因此通过一步 UV 照射即可实现结合蛋白的洗脱与质谱鉴定. 与传统亲和色谱洗脱方法相比, 这种光照洗脱方法能够避免洗脱溶液造成的高盐浓度、低 pH 以及去垢剂造成的样品污染, 洗脱下来的蛋白质无需进一步纯化, 即可直接用于胰蛋白酶处理和质谱鉴定. Aptamer 用于毛细管电泳, 可以避免传统的抗体糖基化程度不同的问题, 结果容易分析. 最近, Wang 等^[28]以 aptamer 为基础, 利用毛细管电泳分离, LIF 检测的方法发展了 DNA- 驱动的聚焦技术 (DNA-driven focusing technique), 用于蛋白质-DNA 结合分析实验, 提高了分离效果和检测的敏感性以及分析速度. Aptamer 用于生物传感器也有许多报道. 传统抗体介导的免疫传感器在重复使用时受到很大限制, 需要温和的条件以免破坏抗体的功能, 而核酸配基具有稳定、可反复变性和复性、可修饰和固化以及容易标记报告基团的优点, 因而受到愈来愈多的重视. 利用分子光电开关复合物或荧光激发 / 淬灭组合, aptamer 还可做为分子信标定量检测靶标分子. 如 Wang 等^[29]在 ADP 变构核酶的基础上做了进一步改进, 引入 DNA 分子光电开关复合物, 无需对 aptamer 共价标记即可完成对蛋白激酶的检测. 还有报道利用 aptamer 和 PCR 的方

法检测痕量的靶标分子: 与靶标分子结合的 aptamer 能被保护不受外切核酸酶降解, PCR 的方法扩增受保护的 aptamer 即可检测痕量的待测靶标.

在基因调控方面, aptamer 与配基结合后的变构效应拓展了催化性核酶 (aptazyme) 的研究, 使得可控的核酶成为可能. 原核生物中发现的 riboswitch 更是 aptamer 参与基因表达调控的一大里程碑, 该发现提示不需要蛋白质因子的参与, RNA 与代谢产物结合即可调控自身的转录和 / 或翻译. 根据这一原理, 人工构建的 riboswitch 能够实现目的基因的可调控表达^[30]. 利用 riboswitch 特性有可能发展出新型抗生素.

在蛋白质组学的研究中, 用 aptamer 制备成的核酸配基阵列^[31]更是具有抗体芯片和 2-D 胶不可比拟的优势, 成为备受青睐的一项工具, 目前已有 aptamer 序列的数据库形成. 近来, Cao 等^[32]以 aptamer 为基础, 结合荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 和荧光偏振的方法, 发展了一种新型的蛋白质-蛋白质相互作用的实时检测方法, 无需标记蛋白质, 即可获得蛋白质-蛋白质作用的详细信息, 提供相互作用蛋白质的结合位点, 结合动力学, 结合常数及机制方面的资料.

作为示踪剂, aptamer 在疾病诊断与成像方面也有巨大应用潜力. 已有荧光标记的抗人凝血素核酸配基用于体内诊断的报道. 在新药研发方面, aptamer 可以鉴定药物靶标, 尤其是多道自动工作站的应用更是加速了药物靶标高通量筛选和功能鉴定的进程^[33]. Aptamer 还可以作为药物分子或先导分子, 以及作为生物导弹指导靶向治疗. 利用 SELEX 技术筛选获得的针对 VEGF 的 RNA 配基 (aptamer), 经过美国 Eyetech 和 Pfizer 制药公司 15 年的研制, 已经于 2004 年 12 月获得美国 FDA 批准上市, 商品名为 Macugen, 用于老年性视网膜黄斑营养不良 (AMD) 的治疗. 同时, 根据 aptamer 的反义序列设计的 antidote^[34]还可作为解毒剂与 aptamer 联合应用, 及时清除体内过量 aptamer 分子, 在心血管疾病, 抗病毒药物, 肿瘤治疗方面都具有广阔的前景.

随着 aptamer 的研究进展, 伴随它在各个学科中的广泛应用与渗透, aptamer 已经成为生命科学研究和医药研究中不可或缺的重要工具, 并将继续推动科学研究进程.

参 考 文 献

- 1 Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 1990, **249** (4968): 505~510
- 2 Ellington A D, Szostak J W. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 1990, **346** (6287): 818~822
- 3 Cox J C, Ellington A D. Automated selection of anti-protein aptamers. *Bioorg Med Chem*, 2001, **9** (10): 2525~2531
- 4 Cox J C, Hayhurst A, Hesselberth J, *et al.* Automated selection of aptamers against protein targets translated *in vitro*: from gene to aptamer. *Nucleic Acids Res*, 2002, **30** (20): e108
- 5 Stoltenburg R, Reinemann C, Strehlita B. FluMag-SELEX as an advantageous method for DNA aptamer selection. *Anal Bioanal Chem*, 2005, **383** (1): 83~91
- 6 Wang C, Zhang M, Yang G, *et al.* Single-stranded DNA aptamers that bind differentiated but not parental cells: subtractive systematic evolution of ligands by exponential enrichment. *J Biotechnol*, 2003, **102** (1): 15~22
- 7 Mendonsa S D, Bowser M T. *In vitro* evolution of functional DNA using capillary electrophoresis. *J Am Chem Soc*, 2004, **126** (1): 20~21
- 8 Drabovich A, Berezovshi M, Krylov S N. Selection of smart aptamers by equilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures (ECEEM). *J Am Chem Soc*, 2005, **127** (32): 11224~11225
- 9 Vater A, Jarosch F, Buchner K, *et al.* Short bioactive Spiegelmers to migraine-associated calcitonin gene-related peptide rapidly identified by a novel approach: tailored-SELEX. *Nucleic Acids Res*, 2003, **31** (21): e130
- 10 Wen J D, Gray D M. Selection of genomic sequences that bind tightly to Ff gene 5 protein: primer-free genomic SELEX. *Nucleic Acids Res*, 2004, **32** (22): e182
- 11 White R, Rusconi C, Scardino E, *et al.* Generation of species cross-reactive aptamers using "toggle" SELEX. *Mol Ther*, 2001, **4** (6): 567~573
- 12 Martell R E, Nevins J R, Sullenger B A. Optimizing aptamer activity for gene therapy applications using expression cassette SELEX. *Mol Ther*, 2002, **6** (1): 30~34
- 13 Koizumi M, Soukup G A, Kerr J N Q, *et al.* Allosteric selection of ribozymes that respond to the second messengers cGMP and cAMP. *Nature Struct Biol*, 1999, **6**: 1062~1071
- 14 Soukup G A, Emilsson G A, Breaker R R. Altering molecular recognition of RNA aptamers by allosteric selection. *J Mol Biol*, 2000, **298** (4): 623~632
- 15 Mandal M, Breaker R R. Gene regulation by riboswitches. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, **5**: 451~463
- 16 Corbino K A, Barrick J E, Lim J, *et al.* Evidence for a second class of S-adenosylmethionine riboswitches and other regulatory RNA motifs in alpha-proteobacteria. *Genome Biol*, 2005, **6** (8): R70
- 17 Schultz R G, Gryaznov S M. Oligo-2'-fluoro-2'-deoxynucleotide N3' → P5' phosphoramidates: synthesis and properties. *Nucleic Acids Res*, 1996, **24** (15): 2966~2973
- 18 Leva S, Lichte A, Burmeister J, *et al.* GnRH binding RNA and DNA Spiegelmers: a novel approach toward GnRH antagonism. *Chem Biol*, 2002, **9** (3): 351~359
- 19 Schmidt K S, Borkowski S, Kurreck J, *et al.* Application of locked nucleic acids to improve aptamer *in vivo* stability and targeting function. *Nucleic Acids Res*, 2004, **32** (19): 5757~5765
- 20 Di Giusto D A, King G C. Construction, stability, and activity of multivalent circular anticoagulant aptamers. *J Biol Chem*, 2004, **279** (45): 46483~46489
- 21 Di Giusto D A, Wlassoff W A, Gooding J J, *et al.* Proximity extension of circular DNA aptamers with real-time protein detection. *Nucleic Acids Res*, 2005, **33** (6): e64
- 22 Kimoto M, Endo M, Mitsui T, *et al.* Site-specific incorporation of a photo-crosslinking component into RNA by T7 transcription mediated by unnatural base pairs. *Chem Biol*, 2004, **11** (1): 47~55
- 23 Chaloin L, Lehmann M J, Sczakiel G, *et al.* Endogenous expression of a high-affinity pseudoknot RNA aptamer suppresses replication of HIV-1. *Nucleic Acids Res*, 2002, **30** (18): 4001~4008
- 24 Shu D, Guo P. A viral RNA that binds ATP and contains a motif similar to an ATP-binding aptamer from SELEX. *J Biol Chem*, 2003, **278** (9): 7119~7125
- 25 Hesselberth J R, Robertson M P, Knudsen S M, *et al.* Simultaneous detection of diverse analytes with an aptazyme ligase array. *Anal Biochem*, 2003, **312** (2): 106~112
- 26 Srinivasan J, Cload S T, Hamaguchi N, *et al.* ADP-specific sensors enable universal assay of protein kinase activity. *Chemistry & Biology*, 2004, 499~508
- 27 Tombelli S, Minunni M, Mascini M. Analytical applications of aptamers. *Biosens Bioelectron*, 2005, **20** (12): 2424~2434
- 28 Wang H, Lu M, Le X C. DNA-driven focusing for protein-DNA binding assays using capillary electrophoresis. *Anal Chem*, 2005, **77** (15): 4985~4990
- 29 Wang J, Jiang Y, Zhou C, *et al.* Aptamer-based ATP assay using a luminescent light switching complex. *Anal Chem*, 2005, **77** (11): 3542~3546
- 30 Suess B. Engineered riboswitches control gene expression by small molecules. *Biochem Soc Trans*, 2005, **33** (Pt3): 474~476
- 31 Stadther K, Wolf H, Lindner P. An aptamer-based protein biochip. *Anal Chem*, 2005, **77** (11): 3437~3443
- 32 Cao Z, Tan W. Molecular aptamers for real-time protein-protein interaction study. *Chemistry*, 2005, **11** (15): 4502~4508
- 33 Blank M, Blind M. Aptamers as tools for target validation. *Curr Opin Chem Biol*, 2005, **9** (4): 336~342
- 34 Liu X, Cao G, Ding H, *et al.* Screening of functional antidotes of RNA aptamers against bovine thrombin. *FEBS Lett*, 2004, **562** (1~3): 125~128

Advances in The SELEX Technique and Aptamers

SHAO Ning-Sheng^{1)*}, LI Shao-Hua¹⁾, HUANG Yan-Ping²⁾

⁽¹⁾*Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China;*

⁽²⁾*Chinese People's Armed Police Forces General Hospital, Beijing 100039, China)*

Abstract Aptamers are short single-stranded nucleic acid ligands that are capable of binding almost any targets with low nano- to picomolar affinities and exceptional specificities. They are selected out of a large combinatorial oligonucleotide library through an *in vitro* evolution process termed SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment). The unique advantages of high-throughput screening technique and aptamers in precise recognition as well as easiness to synthesis and modification bring aptamers a bright prospect in analytical chemistry, biology and medicine research. The recent advances in the SELEX technique and aptamers are reviewed.

Key words SELEX, aptamer, high-throughput screening

*Corresponding author . Tel: 86-10-66932311, Fax: 86-10-68163140, E-mail: shaons@yahoo.com

Received: November 8, 2005 Accepted: December 30 2005