

蛋白质的核酸适配体筛选及应用的研究进展

赵丽萍 杨歌 张小敏 屈锋*

(北京理工大学生命学院,“分子医学与生物诊疗”工业和信息化部重点实验室,北京 100081)

摘 要 核酸适配体是通过指数富集配体系统进化 (SELEX) 筛选方法获得的,能够与靶标分子高亲和力和特异性结合的单链 DNA 或 RNA。蛋白质是一种非常重要的生物功能大分子,迄今为止,已经开发了许多 SELEX 技术,用于蛋白质的适配体的筛选。目前,适配体的筛选优化方法主要集中在提高筛选效率、降低筛选成本,以及提升适配体性能等方面,从而获得可与靶标分子以高亲和力和高特异性结合的适配体。适配体与靶标分子亲和力的表征是关键的筛选步骤,用于判定所筛选的适配体是否可以满足后续应用需求。本文归纳总结了 2016 年以来蛋白质靶标的适配体筛选的研究进展,对核酸适配体筛选过程中有关核酸库的优化方法和筛选方法的改进、新筛选方法的开发、核酸适配体的应用等方面的研究进行了评述。

关键词 核酸适配体;蛋白质;筛选;指数富集配体系统进化;评述

1 引言

核酸适配体是指通过指数富集的配体系统进化技术 (Systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX) 在体外筛选获得的可与靶标高特异性和高亲和力结合的单链 DNA (ssDNA) 或 RNA。核酸适配体的靶标范围广,包括蛋白质、多肽、小分子、细胞、细菌,甚至组织。核酸适配体可通过化学方法合成,与抗体相比,核酸适配体具有成本低、易修饰、稳定性好等特点。此外,核酸适配体有较好的组织渗透性,易进入细胞,且无免疫原性。近年来,以蛋白质为靶标的核酸适配体在分子生物学、生物技术、生物医学等领域广受关注。

核酸适配体是通过体外筛选获得的,故可根据特定应用环境或靶标分子特征进行筛选。1990 年, Tuerk 和 Gold^[1]首次采用 SELEX 技术从随机序列中筛选获得 T4 DNA 聚合酶的 RNA 配体序列,并预测通过 SELEX 技术可筛选获得任何蛋白质或其它目标分子的高亲和力配体。同年, Ellington 和 Szostak^[2]通过亲和色谱柱方法筛选获得具有特异性结合于有机染料的 RNA 配体序列,并将其定义为“适配体”。1992 年, Toole 等^[3]筛选获得具有抑制人凝血酶催化作用的首个 DNA 适配体。核酸适配体的筛选过程主要包括随机寡核酸库的建立、核酸库与靶标的相互作用、靶标-核酸复合物的分离、次级库的形成(通过聚合酶链式反应 (PCR) 进行扩增),再重复以上筛选步骤。不同的筛选方法,重复筛选 3 次不同,一般需 4 ~ 20 轮的筛选。最后对筛选得到的核酸序列进行测序,获得与靶标分子以高亲和力特异性结合的适配体序列^[4]。

尽管以蛋白质为靶标的核酸适配体应用前景广泛,但其筛选过程复杂,一般需要十多轮筛选,耗费大量人力、财力和时间,并且,筛选所得的核酸适配体还可能亲合力不高、特异性不好等问题,影响其后续应用。因此,适配体的筛选仍是目前适配体研究应用亟待解决的问题。本研究组在之前的综述^[4]中,归纳总结了 2015 年之前的研究工作。近年来,对 SELEX 技术的改进和发展的相关研究主要集中在核酸库的优化和筛选方法的改进、适配体的结构优化和计算机辅助筛选等方面。本文综述了 2016 年以来,以蛋白质为靶标的核酸适配体的筛选过程中核酸库的优化方法和筛选方法的改进、新筛选方法的开发、适配体亲和力表征方法以及核酸适配体的应用等工作。

2020-01-09 收稿; 2020-02-25 接受

本文系国家自然科学基金项目 (Nos. 21675012, 21874010, 21827810) 资助

* E-mail: qufengqu@bit.edu.cn

2 核酸库的设计与优化

基于对 RNA 分子可形成功能性空间结构的认识,早期的 SELEX 技术中优先使用 RNA 随机文库^[5]。随后的研究表明,单链 DNA(ssDNA)能够形成比 RNA 更复杂的三级结构,且 ssDNA 的化学性质更稳定、易合成,筛选过程中不需要额外的逆转录步骤,相比于 RNA 适配体筛选更节省时间和成本^[6]。目前,超过 85% 的适配体筛选使用了 ssDNA 随机文库^[7,8]。

大多数适配体体外筛选使用 ssDNA 或 RNA 的随机文库。然而,它们在体外相对稳定,但在体内则很容易被核酸酶降解,通常在 10 s 内就会被破坏。此外,小片段的 ssDNA 或 RNA 可提供的分子结构简单,相互作用位点有限;并且,当其进入生物体体内时,循环时间短,可被肾脏快速过滤。考虑到 ssDNA 与 RNA 的结构多样性^[9]、与靶标的结合能力以及在体内的稳定性与功能等因素,初始核酸库的设计与优化是 SELEX 的重点考虑问题之一。

2.1 核酸库长度

筛选所用的核酸库一般是按照核酸合成的标准方法进行合成。通常在两端分别设计两段固定的引物序列,中间区域由 4 个核苷酸随机排序组成,核苷酸数为 N 。理论上,每个合成的核酸库应有 4^N 个不同的序列,序列的长度为引物- N -引物。核酸库中 N 的选择主要由经验决定,并因实际合成技术的限制,核酸库所含的实际的序列数约为 $10^{14} \sim 10^{15}$ 条^[10]。较短的随机区域($N < 20$)可确保合成得到完全覆盖的序列空间(即每条随机序列至少有 1 个分子),但可能会因序列较短而使核酸分子的结构多样性减少。另一方面,较长的随机区域($N > 40$)则可能提供更多的序列的三维结构与结构多样性,但仅能覆盖序列空间的一小部分(理论上应该存在的序列不能全部出现)^[11]。目前,已经筛选报道的有短至 8 个核苷酸^[12]和长至 228 个核苷酸的适配体序列^[13],而大多数筛选仍使用随机区域长度 N 为 20 ~ 60 nt 之间的核酸库。

不同长度的核酸库可同时用于蛋白质靶标的适配体筛选。Lee 等^[14]采用双库策略(Double library (DL) SELEX),将不同长度的两个核酸库(16 nt 与 20 nt)同时用于筛选 VEGF₁₆ 的 ssDNA 适配体。两个核酸库的部分碱基序列互补。通过 DL-SELEX,获得一对可结合在蛋白不同位点上的适配体。

此外,也可对次级库的核酸长度进行裁剪,缩短次级库长度以简化适配体序列并提高其亲和力。He 等^[15]通过截短(Truncation)SELEX 方法筛选了人红细胞生成素 α 的核酸适配体 In27。经首轮筛选得到次级核酸库后,对此次级库进行截短,以构建由所有可能的核苷酸序列截短组成的步进型文库,重复以上步骤,直至获得具有更高亲和力的最短适配体序列。所获得的适配体 In27 没有原始的茎环部分,但仍保留了对靶标的亲和力。

2.2 利用修饰的核酸库筛选(Modified SELEX)

对核酸序列进行化学修饰是改善适配体性能的重要一步。通过化学修饰可增加核酸序列对核酸酶的耐受性^[16],延长其血液半衰期^[17],减慢肾脏滤过,提升热稳定性^[18,19]。然而,筛选后的适配体序列修饰可能因为其结构变化,导致对靶标亲和力和特异性的降低^[20~22],故一般在 SELEX 时直接使用修饰的核酸库进行筛选。使用修饰的核酸库可增加核酸序列中官能团的种类,提升核酸库的多样性。目前,主要的核酸库修饰包括:(1)对核糖的修饰:核糖 2' 位进行氟代(2'-fluoro)^[23~25]、氨基化(2'-amino)以及甲基化(2'-omethyl)等^[26];(2)对磷酸骨架的修饰:包括硫代磷酸酯修饰与采用具有特殊核糖骨架的异种核酸(Xeno nucleic acids, XNA)^[27],如锁核酸(LNA)、己糖醇核酸(HNA)、解锁的核酸(UNA)、2'-脱氧 2'-氟- β -D-阿拉伯糖(FANA)核酸库等^[28];(3)对碱基的修饰:对碱基进行替换或者添加非天然碱基^[29,30]。

Wang 等^[31]采用在 5-dU 上进行氨基酸官能团修饰的 XNA 库,筛选了两种免疫检查点蛋白(PD-1 和 PD-L1)的适配体。两种适配体 XA-PD1-78 和 XA-PDL1-82 与 PD-1 和 PD-L1 的抗体相比,具有相似的细胞结合强度。Gawande 等^[32]对核酸库的 5-dC 和 dU 两处进行修饰,筛选了蛋白转换酵素 Subtilisin/Kexin9 型(PCSK9)蛋白的适配体 SOMAer。实验结果表明,SOMAmer 的双碱基修饰与单碱基修饰相比,对其靶蛋白不但具有良好的特异性和更高的亲和力($K_D \leq 30$ nmol/L),还具有更大的表位覆

盖;此外,其抗核酸酶性能也显著增加。

尽管经过修饰的核酸序列具有良好的核酸酶抗性,但在 PCR 扩增时难以被 DNA 聚合酶识别,导致次级库的扩增效率降低,多轮次筛选时次级库制备困难。为了解决这一难题,Chen 等^[33]开发了针对核糖修饰的核酸库为底物的 Taq DNA 聚合酶 SFM4-3 变异体,该变异体能够扩增含有 2'-OMe-和 2'-F-修饰的核酸序列。这是一种可用于扩增 XNA 的新型工程化聚合酶,利用 SFM4-3 聚合酶扩增 2'-F^[34]与 2'-OMe^[35]修饰的核酸序列,筛选了抗人嗜中性白细胞弹性蛋白酶(HNE)的适配体,该适配体含有 2'-F与 2'-Ome 修饰,解离常数 K_D 分别为 20 和 45 nmol/L。最近,SFM4-3 聚合酶的底物已经扩展到 2'-氯(2'-Cl),2'-氨基(2'-Am),2'-叠氮基(2'-Az)和阿拉伯糖(FANA)修饰的核酸库^[36],该酶的研发和应用为使用修饰的核酸库筛选适配体奠定了重要基础。

使用对磷酸骨架进行修饰的核酸库在 PCR 扩增时也需要使用特殊的聚合酶。TgoT 聚合酶 D4K(TgoT polymerase, D4K)突变体可以合成完全修饰的 FANA 核酸库,并能将修饰的 DNA 转录回天然 DNA^[37]。Larsen 等^[38]鉴定了一种 Mn^{2+} 依赖性聚合酶 Kod-RI,该酶能够扩增完全修饰的 TNA(α -L-苏糖核酸)核酸库,在整个复制周期(DNA $\rightarrow$ TNA $\rightarrow$ DNA)中,速度比 Terminator DNA 聚合酶快 5 倍,保真度高 20 倍。

2.3 其它修饰

遗传字母扩展 SELEX(ExSELEX 与 AEGIS-SELEX)^[39]是利用含有非天然碱基对的 DNA 库进行适配体筛选,通过掺入非天然碱基对可显著增加适配体功能的多样性。ExSELEX 所使用的核酸库中掺入了疏水碱基 7-(2-噻吩基)咪唑并(4,5-b)吡啶(Ds)核苷酸,可与人工合成的 Px 碱基形成 Ds-Px 碱基对。将含有 Ds 的 DNA 库与靶标进行孵育,回收的次级库用 6 种核苷酸(即 4 种天然核苷酸、Ds 和 Px)进行 PCR 扩增。Kimoto 等^[30]以含有疏水性的非天然碱基对(Ds-Px)的 DNA 库,筛选了 VEGF₁₆₅ 的 ssDNA 适配体,并在适配体的茎部区域引入了一个稳定的迷你发夹结构,以稳定含有 Ds 碱基的 DNA 序列。结果表明,筛选的适配体具有更好的热稳定性和核酸酶稳定性,并且对靶标表现出低至 pmol/L 水平的亲和力;与“著名的”VEGF₁₆₅ 的 RNA 适配体相比,该适配体可以在无 Ca^{2+} 环境下与 VEGF₁₆₅ 结合,说明引入 Ds-Px 碱基对和微型发夹基序可产生高性能的核酸适配体。Matsunaga 等^[40]通过 ExSELEX 筛选了 von Willebrand factor A1-domain(vWF)的 Ds 适配体($K_D=75$ pmol/L),同样在序列的 3'-末端引入了稳定的微型发夹基序,进一步改善了适配体在血清中的半衰期及热稳定性。AEGIS-SELEX 中引入了另一对人工合成碱基 dP-dZ,dP-dZ 系统是两个含芳香族核的碱基,显示出交替的 puAAD-pyDDA(即嘌呤“受体-受体-供体”和嘧啶“供体-供体-受体”)的氢键连接模式。互补核苷酸 dZ 和 dP 形成一个碱基对,比标准的 dG-dC 对更稳定。Zhang 等^[41]将 Glypican-3 蛋白过表达于肝细胞表面,通过 AEGIS-SELEX 方法筛选获得 5 个含 AEGIS 的适配体。

光敏筛选(Photo SELEX)是通过将带有光反应基团(卤代嘧啶)的核酸库与含有芳香族和含硫残基的靶蛋白一起孵育。当暴露于紫外线环境时,高亲和力序列通过电子传递机制与靶标共价交联,然后对复合物进行分离并酶解蛋白质靶标,通过 PCR 扩增和多轮筛选获得适配体序列。与常规的非共价结合的筛选方法得到的适配体相比,Photo SELEX 可通过核酸库的光敏性,使核酸序列与蛋白质靶标反应,形成共价键,增加了适配体对靶蛋白的亲和力^[42]。通过 Photo SELEX 技术,已获得人免疫缺陷病毒 1 型(HIV-1)Rev 蛋白的 RNA 适配体。但是,由于在光激发下,目标分子只能通过芳香族和含硫氨基酸残基共价交联,限制了该方法可筛选的靶标范围,并降低了适配体的特异性。此外,用 5-IU 或 5-BrdU 替换核酸序列中的碱基 T 时,需要进行大量的取代位置优化,也限制了该方法的普遍应用。

核酸库的设计与优化还包括镜像筛选(Spiegelmer SELEX)^[43~46]以及嵌合库(Chimeric SELEX)的设计与使用^[47]等。此外,还应考虑核酸库中引物序列的设计^[48,49],或结合生物信息学分析指导核酸库的设计与合成。而且,使用修饰的核酸库进行适配体筛选时,必须考虑由非天然核苷酸可能引起的化学毒性和免疫原性,以提高修饰适配体的生物相容性。

3 复合物分离

分离核酸与靶标形成的复合物是 SELEX 的关键步骤之一。基于复合物分离技术开发的 SELEX 方

法主要包括硝化纤维素膜过滤 SELEX、微珠/磁珠 SELEX、微柱 SELEX、毛细管电泳 (CE) SELEX、微流控自由流电泳 SELEX、微流控芯片 SELEX、SPR-SELEX、微阵列 SELEX、AFM-SELEX 等,表 1 列举了 2016 年至今蛋白质靶的适配体筛选所用的基于分离的 SELEX 方法。

表 1 不同 SELEX 方法的优点与局限

Table 1 Advantages and limitations of some systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) methods

方法 Method	靶标 Target	轮次 Round	优势 Advantages	局限 Limitations	参考文献 Ref.
硝化纤维素膜 过滤-SELEX Nitrocellulose filter binding SELEX	结核分枝杆菌分泌蛋白 MPT64, HIV-1 整合酶,CD33,埃博拉病毒分泌蛋白 Mycobacterium tuberculosis secreted protein MPT64, HIV-1 integrase, CD33, Ebolavirus secreted protein	8 ~ 10	操作简单, 无需特殊仪器, 适配体与靶标在溶液中结合 Easy operation, no need of special instrument, In solution aptamer-target binding	靶标受滤膜限制, 筛选轮次多, 存在非特异性结合 Target limited by filter, multiple selection rounds, non-selective binding	[50 ~ 53]
磁珠-SELEX Bead-based SELEX	艾滋病病毒 gp41 抗原、EpCAM、前蛋白转化酶 枯草素、凝血因子 Xia、PDL-1、PD-1、甲型流感核蛋白、CD19、人体总血红蛋白和糖化血红蛋白、BSA、CD70、谷氨酸脱氢酶、膜联蛋白 A2、β ₂ m 蛋白水解淀粉样蛋白片段、胸苷激酶 1、HA 蛋白、前列腺特异性抗原、乳铁蛋白、人 HECT 泛素连接酶 WWP1、VEGF ₁₆₅ 、葡萄球菌肠毒素 A、聚(C) 结合蛋白 2、C 反应蛋白、β-乳球蛋白、脂多糖结合蛋白 HIV gp41 antigen, EpCAM, proprotein convertase subtilisin, coagulation factor XIa, PDL-1, PD-1, influenza A nucleoprotein, CD19, human total and glycosylated hemoglobins, BSA, CD70, glutamate dehydrogenase, Annexin A2, proteolytic amyloidogenic fragment of β ₂ m, thymidine kinase 1, HA protein, prostate-specific antigen, lactoferrin, human HECT ubiquitin ligase WWP1, VEGF ₁₆₅ , staphylococcal enterotoxin A, poly(C)-binding protein 2, C-reactive protein, β-lactoglobulin, lipopolysaccharide binding protein	3 ~ 12	适用于大多数靶标, 易对筛选进行调控 Suitable for most targets, easy tuning of selection	需对靶标进行固定 Target immobilization	[14, 23 ~ 25, 31, 32, 48, 49, 54 ~ 75]
微柱-SELEX Microcolumn SELEX	血管紧张素 II 肽、趋化因子配体 21、纤维母细胞生长因子受体 3 Angiotensin II peptide, the chemokine ligand 21, fibroblast growth factor receptor 3	6 ~ 12	样品消耗量少, 存在死体积和非特异性吸附 Low consumption of analytes, small dead volume and non-specific binding	需对靶标进行固定, 需微柱装置 Target immobilization, microcolumn device	[29, 76, 77]
毛细管电泳- SELEX CE SELEX	玻璃体结合蛋白、Tau 蛋白、牛乳铁蛋白、凝血酶、MutS 蛋白、单链核酸结合蛋白、血小板衍生生长因子 Vitronectin, Tau, bovine lactoferrin, thrombin, MutS, SSB, PDGF-BB, H-TF	1 ~ 4	快速分离结合与未结合的适配体, 样品消耗量小, 适配体与靶标在溶液中结合, 筛选轮次少 Fast isolation of bound aptamers from unbound ones, low consumption of analytes, in solution aptamer-target binding, fewer selection rounds	需 CE 仪器, 初始库容量相对较小, 靶标范围局限于与适配体电泳迁移速率存在差异的 CE instrument, relatively small size of starting library, restricted to targets that cause a shift in aptamer electrophoretic mobility pattern	[78 ~ 86]
微流体-SELEX Microfluidic SELEX	MUC1、IgA、IgE、与心血管疾病相关的蛋白质生物标志物、乳铁蛋白、前列腺特异性抗原 MUC1, IgA, IgE, protein biomarkers associated with cardiovascular disease, lactoferrin, prostate-specific antigen	2 ~ 8	样品消耗量小, 筛选轮次少 Low consumption of analytes, fewer selection rounds	需对靶标进行固定或包埋, 可能会存在交叉污染 Target immobilization or encapsulation, Possible for cross contamination	[87 ~ 93]
微阵列-SELEX Microarray SELEX	恶性疟原虫乳酸脱氢酶 Plasmodium falciparum lactate dehydrogenase	1	高通量, 固定的适配体与溶液中靶标平衡结合 High throughput, equilibrium binding with in-solution target and immobilized aptamer	初始库容量小, 需要制备芯片, 需微阵列扫描仪测定结合 Small size of starting library, chip construction, microarray scanner is required to measure binding	[94]

续表 1 (Continued to Table 1)

方法 Method	靶标 Target	轮次 Round	优势 Advantages	局限 Limitations	参考文献 Ref.
In-silico SELEX	肝细胞生长因子、人雌激素反应原件、EpCAM Hepatocyte growth factor, human estrogen response elements, EpCAM	~ ~	快速, 高通量 Fast analysis, high throughput	初始库容量小, 计算方法及程序复杂 Small size of starting library, complicated computational methods and programs	[95 ~ 97]
细胞-SELEX Cell SELEX	CD33, CD20, CD24	3 ~ 12	不需预先对靶标进行了解, 靶标呈现自然状态, 有利于生物标志物的发现 No need for prior knowledge of target, target in a native state, biomarker discovery	局限于细胞表面的分子, 存在死细胞引起的非特异性吸附, 需对适配体和未知靶标进行分离 Limited to cell surface molecules, non-selective binding induced by dead cells, Isolation of aptamer against unknown targets	[52, 98, 99]
原子力显微镜-SELEX AFM SELEX	人血清白蛋白 HSA	4	筛选轮次少 Fewer selection rounds	仪器昂贵, 需对靶标或适配体进行固定 Expensive instrument; immobilization of aptamer and target	[100]
尺寸排阻-SELEX SEC SELEX	人血浆凝血因子Ⅷ Human plasma coagulation factor Ⅷ	8	适配体与靶标在溶液中结合 In solution aptamer-target binding	初始库容量小, 小分子靶标受局限, 需要 SEC 相关仪器 Small size of starting library	[101]

3.1 CE-SELEX

CE-SELEX 是快速、高效筛选核酸适配体的方法之一。在 CE-SELEX 中,通常将核酸库与靶蛋白孵育后,进行 CE 分离分析。高压电场下,未结合的核酸序列与核酸-靶蛋白复合物因迁移速率不同而分离。在毛细管的出口端收集复合物,经 PCR 扩增、纯化,生成次级库,再进行下一轮筛选。通常 CE 只需 1 ~ 4 轮筛选即可获得高亲和力和特异性的适配体^[102]。在 CE-SELEX 中,靶蛋白与适配体的结合发生在自由溶液中,避免了对靶蛋白或核酸库的固定,同时可降低非特异性结合,且二者相互作用不受空间位阻影响。CE-SELEX 方法可进一步改进为平衡混合物的非平衡毛细管电泳 (NECEEM)、平衡混合物的平衡毛细管电泳 (ECEEM) 及 Non-SELEX 等系列筛选方法^[4]。本研究组建立了两种新的 CE-SELEX 模式:同步竞争结合筛选方法 (Synchronized competition CE-SELEX, scCE-SELEX) 和一步快速 CE-SELEX (Single-step CE-SELEX, ssCE-SELEX)。Yang 等^[86]建立了双靶蛋白的 scCE-SELEX 方法,将两种靶蛋白 A、B 与核酸库同时孵育,二者竞争结合达到动态平衡状态后,将混合物注入 CE 中进行分析。两种靶蛋白与核酸库结合分别形成两种复合物,二者具有不同的迁移速率,能够与未结合的核酸库完全分离。在同步竞争结合筛选过程中,蛋白 A 和蛋白 B 彼此为反筛靶,通过竞争效应为对方增加筛选压力,显著提高了筛选效率,仅需一轮筛选即可得到高亲和力 (K_D 值在 nmol/L 级) 和特异性良好的适配体。该方法扩展了高效筛选核酸适配体的 CE-SELEX 方法的应用。Zhu 等^[79,81,82]建立了一种基于在线反应的 ssCE-SELEX 模式,将核酸序列与靶蛋白的混合、孵育、核酸序列与靶蛋白-核酸复合物的分离、检测以及复合物的收集在一步 CE 运行中完成 (图 1),并对影响复合物生成的关键因素 (如孵育缓冲溶液、靶蛋白与核酸序列的比例等) 及影响靶蛋白-核酸复合物分离与收集的因素 (电压、温度、进样时间等) 进行了考察。进一步利用该模式成功筛选了人凝血酶以及牛乳铁蛋白的适配体。此外,还利用此模式对 6 种蛋白进行了适配体筛选的初步实验,结果表明,ssCE-SELEX 模式对蛋白靶标核酸适配体的筛选具有普适性。近期,本研究组在 *Biotechnology Advance* 期刊发表了多功能 CE 用于核酸适配体筛选的综

述^[102],对近年来 CE 技术在核酸适配体筛选方面的应用进行了全面地归纳和总结。Krylov 研究组^[85]提出了理想过滤式毛细管电泳法(Ideal-filter capillary electrophoresis, IFCE),即在生理 pH 值和生理离子强度(pH 7, 150 mmol/L NaCl)时,可使游离的核酸序列与靶蛋白-核酸复合物反向移动,分离效率高达 10^9 。同时,较高的离子强度可抑制靶标与核酸序列的非特异性结合,故一步筛选可获得高亲和力适配体序列。

3.2 微流控 SELEX

微流控技术在复合物分离方面也有明显优势^[103,104]。2005 年,Hybarger 等^[105]首次将微流控芯片技术运用到 SELEX。微流控 SELEX 主要有两种方式:将靶分子固定在磁珠上,用核酸库与磁珠孵育^[106],在微通道内外加上磁铁,形成高强度的局域磁场梯度,精确控制大量的微磁珠;或用溶胶-凝胶包封靶分子,再将核酸库加入包封的溶胶-凝胶中^[107],通过将目标分子包封在凝胶液滴中,在微流控芯片内进行分离。与 CE-SELEX 相似,使用微流控分离所需的样品量非常少,可严格控制筛选条件,加速适配体进化^[108]。如筛选过程中通过控制流速,在靶标损失最小的情况下去除弱结合的或非特异性结合的核酸序列^[8],通过 1~6 轮筛选可获得高亲和力适配体^[106]。

Hong 等^[92]开发了一种基于磁珠的多功能微流控筛选平台,该芯片将筛选芯片和定量芯片结合。将 BSA(反筛靶标)包被的磁珠和粘蛋白 1(MUC1)包被的磁珠分别注入到筛选芯片反筛区域和正筛区域。将初始 ssDNA 库首先注入筛选芯片的反筛区域,在此区域中,一部分核酸库与 BSA 结合;未结合的核酸库流入正筛区域,与 MUC1 结合,从而减少了非特异性吸附。同时,可通过倒置荧光显微镜观察荧光信号的变化监测整个筛选过程。收集磁珠上与目标蛋白结合的核酸序列进行扩增生成次级库,用于下一轮筛选。重复上述步骤,进行多轮筛选,并将每个次级库注入定量评价芯片,通过荧光强度实时评价每轮筛选的富集程度。由于次级库可特异性地结合微通道中的 MUC1 包被的磁珠,当每轮富集的荧光强度不再明显增加时,停止筛选。该筛选平台可在流动的环境中同时进行正筛和反筛,并可通过连续洗涤来施加高强度筛选条件。与常规孵育方法相比,该筛选方法明显减少了核酸的非特异性结合,还可消除弱结合的核酸。通过 2 轮筛选,获得 3 条与 MUC1 高亲和力(K_D 值分别为 44.8、22.4 和 65.0 nmol/L)和特异性结合的适配体序列,并被用于癌细胞的标记和外泌体捕获。

利用荧光显微镜可监测微流控 SELEX 过程,但因观测区域的限制,荧光强度的均匀采集比较困难。Xu 研究组^[88]提出了 PMM(Protein microarray integrated into microfluidic chip)-SELEX 方法,通过静电吸附将蛋白固定在芯片上,制备蛋白质微阵列芯片,嵌入 SELEX 微流控芯片中,并注入核酸库。与靶蛋白结合的核酸序列被保留在蛋白质芯片上,未结合的序列流出。通过荧光芯片扫描仪对保留在蛋白质芯片上的核酸序列进行均匀成像,以监测筛选过程中蛋白与核酸的结合。以乳铁蛋白为靶标制备了靶蛋白芯片,以 BSA、酪蛋白、乳球蛋白等为反筛靶制备了反筛蛋白芯片,将两块蛋白芯片同时嵌入到 SELEX 微流控芯片,可同时进行正筛和反筛。通过 7 轮筛选得到了 K_D 值为 nmol/L 级的适配体。

在微流控 SELEX 中,无法在芯片上直接完成核酸序列的扩增,使得与核酸结合的靶标被磁珠可能在后续扩增与筛选过程中因移液和转移而丢失。Sinha 等^[87]设计了一个小型的自动化微流控 SELEX 平台,它集样品的输送、孵育及核酸扩增于一体,用非靶蛋白包被磁珠进行 1 轮反筛后,用靶蛋白进行 5 轮正筛。筛选过程可以在一个芯片中连续进行,6 轮筛选只需 8 h。微流控中的 PCR 过程由自制的温度控制模块进行,利用 Arduino 电路和温度传感器进行实时温度检测,实现了芯片上的 PCR 温度循环。每次循环后,收集 PCR 产物以琼脂糖凝胶电泳确认筛选过程。利用此平台,筛选了 3 种与心血管病相

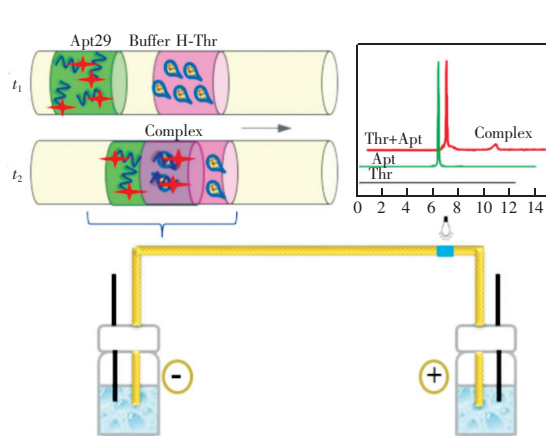


图1 基于 ssCE 模式的反应^[79]

Fig. 1 Online reaction based single-step capillary electrophoresis (ssCE) mode^[79]

关的蛋白标志物的适配体。

微流控 SELEX 在实际筛选时有所不足,如样品的注入量不稳定、微通道需要进行表面修饰提高亲水性,并且还没有商品化的微流控设备等。

3.3 原子力显微镜(AFM) SELEX

原子力显微镜(AFM)是可在分子水平上精确检测分子间亲和力、相互作用和识别特征的方法^[109]。AFM 灵活的悬臂末端的尖头,可以检测样品表面和悬臂之间的微弱力。当尖端接触到样品表面或与样品表面靠近接触时,悬臂的挠度被反射到悬臂背面的激光束记录下来^[110,111]。利用 AFM 方法可以动态检测样品表面与悬臂梁之间的作用力,并用于高亲和力适配体的筛选,即 AFM-SELEX。

Yusuke 等^[112]用 AFM-SELEX 通过 3 轮筛选得到了高亲和力的凝血酶适配体($K_D = 200 \text{ nmol/L}$)。将链霉素和素固定在悬臂顶端,再结合生物素化的 ssDNA 库,而将凝血酶固定在金片上。当悬臂末端与金片接触时,抗凝血酶的 DNA 适配体会与金片上的凝血酶结合,形成的 DNA-凝血酶复合物滞留在金片上,得到高亲和力的 DNA 适配体。Takenaka 等^[100]提出了一种新型 AFM-SELEX 方法。通过 T 和 A 碱基配对作用将核酸库(含有 35 mer 腺嘌呤(A35))固定在金芯片(含 10 mer 胸腺嘧啶(T10))上,将人血清白蛋白(HSA)固定在悬臂上。当 HSA 与核酸分子的相互作用大于 A-T 间的相互作用时,该核酸分子会因与蛋白的结合而使悬臂发生变化,基于悬臂变化可进行高亲和结合的适配体筛选。这个过程中,连接分子间的相互作用(A-T 间作用)在减少或控制筛选轮数方面起着关键作用。通过 4 轮筛选,得到了 HSA 的特异性适配体。虽然 AFM SELEX 方法筛选轮次较少,3~4 轮内即可得到高亲和力的适配体。但是,该方法存在 AFM 仪器设备昂贵、需要对靶标和适配体进行固定,以及初始库容量较小等局限。

3.4 其它 SELEX

分子印迹聚合物具有识别模板分子功能,也可用于适配体筛选。Liu 研究组^[67]开发了一种基于聚糖印迹磁性纳米颗粒(MNPs)的 SELEX 方法,有效地筛选到与糖蛋白特异性结合的适配体。采用硼酸盐亲和可控定向表面印迹方法合成了多糖印迹 MNPs,以此多糖印迹 MNPs 为亲和界面与靶标糖蛋白结合,再以靶标糖蛋白结合的 MNPs 为亲和底物筛选适配体。多糖印迹的 MNPs 对糖蛋白表现出较高的亲和力和特异性,因此可优先结合目标糖蛋白,同时排除不需要的物质。以 RNase B 和转铁蛋白两种具有代表性的糖蛋白作为靶蛋白,通过 3 轮筛选得到对两种靶蛋白具有高亲和力和特异性的适配体。该方法具有亲和度高、速度快、避免阴性筛选等优点。

4 非纯化靶蛋白的适配体筛选

4.1 全细胞蛋白的适配体筛选(Cell-SELEX)

目前报道的适配体筛选多使用重组蛋白或具有稳定构象的纯化蛋白,但当靶蛋白处于修饰状态或其结合域可能被掩蔽时,不能很好地识别核酸分子^[113]。例如,虽然 EGFRⅧ蛋白的 RNA 适配体可以结合在大肠杆菌中表达的重组 EGFRⅧ蛋白,但不能识别真核细胞表面表达的全长 EGFRⅧ蛋白^[114]。

Cell-SELEX 是将整个细胞作为靶标,由于细胞表面复杂,包含了大量的蛋白,因此,可针对多种靶标分离出相应的适配体。全细胞筛选具有以下优点:不需要预先了解靶标分子构象;细胞表面分子呈现自然构象和分布;可避免纯化过程中靶标结构的破坏;还具有筛选未知分子适配体的潜力^[115~118]。

Haghighi 等^[98]以淋巴球抗原(CD20)蛋白过表达的 HEK293T 细胞为靶标,经过 11 轮筛选得到 K_D 为 nmol/L 级的 CD20 适配体。该适配体被用于细胞的特异性识别,有望替代抗体用于免疫缺陷、自身免疫性疾病、白血病和淋巴瘤的诊断和治疗。He 等^[119]报道了两种由 Cell-SELEX 筛选获得的适配体,它们可与紫杉醇耐药卵巢癌细胞系(A2780T)表面的两种不同的糖蛋白特异性结合。这两种核酸适配体对目标细胞均有较高的选择性和较强的亲和力,并且适配体与靶细胞的结合不依赖于二价离子,对血清中的核酸酶有较强的耐受性,可用于人血清中耐药卵巢癌细胞的检测。Bing 等^[120]经 5 轮筛选获得了碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, AP)二聚体的适配体 BG2,该适配体可结合碱性磷酸酶二聚体而非其单体,可用于细胞和组织上蛋白质二聚体的原位检测。

Cell-SELEX 可以解决真实细胞表面蛋白的适配体筛选,但很难直接筛选到细胞表面表达量较少的

蛋白的适配体。此外,还需要去除死细胞(如利用流式细胞仪分选以及基于微珠的方法等)以减少非特异性结合的干扰;全细胞的靶标组成复杂而且需要多轮筛选才能获得高亲和力和高选择性的适配体。筛选过程中通常需要反筛步骤,以提高适配体的特异性,如筛选某肿瘤细胞的肿瘤标志物的核酸适配体时,需要以其它肿瘤细胞或正常细胞为反筛靶。与单一靶标的适配体筛选方法相比,全细胞表面靶蛋白的鉴定是 Cell-SELEX 筛选的难点,可将与适配体特异性结合的靶标提取后,通过质谱的方法对靶蛋白进行鉴定。但是,由于某些靶蛋白含量低、疏水性强、不易提取等,使得其分离、鉴定和表征较为困难,真正的全细胞蛋白靶的适配体筛选还难以实现。

4.2 体内蛋白的适配体筛选(In-vivo SELEX)

体外筛选的适配体可能因不具有组织通透性而无法在体内发挥作用。体内筛选(In-vivo SELEX)是指利用疾病相关模型的小鼠直接进行体内筛选。首先,将修饰后具有抗核酸酶性能的核酸库通过静脉注射到荷瘤小鼠中,收集目标靶器官/组织,提取结合的核酸序列后在体外进行扩增得到次级库。将次级库注入动物体内,重复进行体内筛选。筛选时,可使用荧光分子层析成像(FMT)对深埋器官中的肿瘤进行成像,观察核酸序列在体内的结合和迁移。体内筛选策略用于鉴定原位定位结合肿瘤的适配体,具有药物靶向递送和有效设计诊断试剂的潜力。Chen 等^[121]通过 In-vivo SELEX 鉴定了前列腺癌骨转移小鼠模型中的骨靶向适配体,筛选获得 Toll 样受体 4(TLR4)阻断适配体,有望用于急性中风治疗^[122]。Mai 等^[123]在淋巴瘤小鼠模型中筛选了对淋巴瘤骨髓细胞具有高特异性的 ssDNA 适配体。

体内筛选具有原位和实时筛选的优点,但筛选的适配体具有明显的个体差异,因此,即便筛选成功也在很大程度上限制了其普适性应用。如果使用修饰的核酸,还需考虑聚合酶扩增修饰核酸的能力限制。此外,体内结合的核酸序列的提取过程更加复杂,增加了筛选难度和成本。

5 基于生物信息学的 SELEX(In-silico SELEX)

In-silico SELEX 是一种基于计算机技术的非实验筛选和优化适配体的新方法,可为适配体筛选的 3 个关键过程提供计算解决方案,包括:增强型初始库的设计、序列的富集、高亲和适配体的鉴定。In-silico SELEX 主要包括两个步骤:(1)根据二级结构设计增强型的初始库。对核酸库的分析表明,高亲和力的适配体的热力学参数与其他序列存在差异。例如,GTP 适配体二级结构的自由能明显低于相同长度的其它随机序列。因此,在初始核酸库的设计中可以减少具有简单茎环结构或微分支结构的序列,同时,最大化稳定低能结构,以形成增强型的初始库,用于下一步筛选。(2)通过分子对接计算进行筛选。不同的分子对接工具可用于识别与靶标结合的序列。Zhang 等^[124]开发了改良版 DOVIS 包,可用于 RNA 库的高通量虚拟筛选。根据分子对接分析的数据(如结合自由能和适配体的平衡解离常数),选择适配体候选序列进一步研究。

Yokoyama 等^[95]运用 G4 启动子衍生的适配体筛选技术(G4PAS)与 In-silico maturation (ISM)技术,通过计算机辅助定向进化成功筛选了肝细胞生长因子(HGF)的适配体,并进一步通过 ISM 方法将 HGF 适配体的特异性提高了 45 倍。Ahirwar 等^[96]设计了人雌激素反应元素(ERE)的 RNA 类似物作为初始文库,筛选了雌激素受体 α (ER α)的类适配体。首先,对单链 RNA 类似物进行建模,并使用 AutoDock Vina、HADDOCK 和 PatchDock 软件完成与靶标的对接,判断其作为 ER α 适配体的可能性。进一步通过等温滴定热法测定 ER α -RNA 相互作用的热力学参数,并验证了计算机模拟预测结果。最后获得 $K_d = 1.02 \pm 0.1 \times 10^8$ mol/L 的 RNA 序列为 ER α -适配体 ERaptR4,并通过细胞化学和固相免疫分析证实了 ERaptR4 适配体的靶向特异性。Bavi 等^[97]筛选了上皮细胞粘附蛋白(EpCAM)的 15-mer RNA 适配体。首先,生成初始库序列,并模拟其全部序列的 3D 结构,通过分子对接、分子动力学模拟以及结合自由能计算筛选适配体,并估算其亲和力。进一步通过流式细胞术和荧光显微镜验证了该 RNA 适配体可结合癌细胞表面过表达的 EpCAM。

6 蛋白质适配体的应用

6.1 疾病相关蛋白的检测

蛋白质的适配体可作为检测探针用于各种传感检测。基于适配体的光学检测、电化学检测以及结

合各种纳米材料的检测方法都可以显著提高检测灵敏度^[125]。Díaz-Fernández 等^[65]经过 8 轮筛选得到了特异性识别前列腺特异性抗原(PSA)糖基化部分的适配体,将此适配体用于夹心式电化学传感器的设计可以检测人血清中的 PSA(检出限为 0.66 ng/mL)。该传感器检测的前列腺增生患者血清的结果低于标准 ELISA 方法的检测结果,表明该传感器可精确检测到含量更低的具有明显糖基结构的 PSA。所设计的传感器可为临床前列腺特异性抗原检测提供新的方法,有望改良现有临床检测方法,获得更精准的检测结果,减少不必要的前列腺癌活检。Ruan 研究组^[126]以甲胎蛋白特异性结合的适配体修饰的 CdTe 量子点(QDs)为供体,以抗 AFP 抗体的金纳米粒(AuNPs)为受体,基于 FRET 原理,实现快速灵敏检测血清中的 AFP(线性范围为 0.5~45 ng/mL,检出限为 400 pg/mL)。随着越来越多的生物标志物的适配体被筛选报道,所建立的各种传感器方法可以方便地用于多种生物标志物的检测,并且有望用于相关疾病的更好诊断,甚至现场检测。

6.2 生物成像

适配体荧光探针具有肿瘤穿透性好、生物相容性好、信噪比低和分辨率高的优点^[127],在生物成像中的应用越来越广泛。特别是以活细胞为筛选靶标的多种具有特殊生物学功能适配体的出现,为基于适配体的荧光探针在生物成像领域的应用奠定了基础,也提供了优异的分子工具^[128]。Bavi 等^[97]通过 In-silico SELEX 筛选了 EpCAM 的 RNA 适配体,利用荧光显微成像观察到所筛选的 RNA 适配体可特异性地与 EpCAM 阳性细胞结合,而不与 EpCAM 阴性细胞系结合。此实验结果表明, RNA 适配体分子小,对肿瘤生物标志物 EpCAM 具有良好的选择性和高亲和力,有望用于新型分子成像和靶向治疗。

6.3 治疗药物

由于适配体具有可与小分子药物和蛋白配体竞争结合靶标的能力^[129],被认为具有潜在的药物性能,可用于疾病治疗。此外,适配体还具有激活目标受体的功能,或可作为载体向目标细胞或组织递送治疗药物^[130]。例如,适配体有作为抗病毒药物的潜力。有研究表明,针对 gp120 的合成衍生物的 RNA 适配体可中和 HIV-1^[131]。此外, RIG-I 的 RNA 适配体可以抑制新城疫病毒(NDV)、疱疹性口炎病毒(VSV)和流感病毒的复制^[129]。

6.4 生物标记物的发现

与疾病相关的新生物标志物的发现有助于疾病的早期发现和及时治疗。生物标志物还可用于靶向给药及细胞成像等,开发新型生物标志物及其识别探针在医学研究和临床检测领域十分必要,也有强烈的市场需求。目前,抗体是最常用的识别分子。与抗体相比,适配体有可能可以根据病变细胞表面未知膜蛋白的分子差异,将病变细胞与正常细胞区分开来,因此适配体在发现新的生物标志物方面有巨大的潜力。采用 Cell-SELEX 方法进行适配体筛选,能够发现新的肿瘤生物标志物,而不需要事先对肿瘤生物标志物进行了解^[132]。先构建针对靶细胞的核酸库,然后根据核酸库的结合活性对不同蛋白进行分离,最后,通过质谱分析鉴定蛋白。例如, Berezovski 等^[133]在未成熟和成熟树突状细胞中分别发现了 6 个和 3 个生物标志物。Jia 等^[134]通过 Cell SELEX 和基于适配体的蛋白的纯化策略,鉴定出 CD109 作为鼻咽癌的潜在生物标志物,用于早期诊断和靶向治疗。

7 总结与展望

自 1990 年 SELEX 技术被提出以来,核酸适配体的研究取得了长足进步,被认为是具有发展前景的新型分子探针,所筛选的核酸适配体数量增加迅速。近年来,随着对传统 SELEX 筛选方法的改进以及高通量测序和计算机辅助设计等新技术的快速发展,核酸适配体的筛选效率已显著提高(如筛选轮次显著减少、筛选周期明显缩短以及适配体的亲和力提高等),但仍未有自动化、标准化的适配体筛选程序和方法。亲和力的测定方法虽多,但没有统一的标准或界限,用于判定筛选的适配体是否可以满足后续应用的要求。不同的筛选方法测定的亲和力难以对应,甚至在数量级上有很大差异,也缺少可将不同方法测定的亲和力之间进行转换的标尺。特别是,有效好用的适配体(如凝血酶等靶标分子的“明星”适配体)还十分有限,远不能满足实际应用的需求。因此,适配体筛选的机理和高效筛选方法还有待深入研究,适配体所面临的这些问题也将会转化为促进适配体发展和应用的研究动力。

References

- 1 Tuerk C, Gold L. *Science*, **1990**, 249 (4968): 505–510
- 2 Ellington A D, Szostak, J W. *Nature*, **1990**, 346: 818–822
- 3 Bock L C, Griffin L C, Latham J A, Vermaas E H, Toole J J. *Nature*, **1992**, 355: 564–566
- 4 YANG Ge, WEI Qiang, ZHAO Xin-Ying, QU Feng. *Chinese Journal of Chromatography*, **2016**, 34(4): 370–381
杨歌, 魏强, 赵新颖, 屈锋. 色谱, **2016**, 34(4): 370–381
- 5 Gilbert W. *Nature*, **1986**, 319: 618
- 6 Wang T, Chen C, Larcher L M, Barrero R A, Veedu R N. *Biotechnol. Adv.*, **2019**, 37(1): 28–50
- 7 McKeague M, DeRosa M C. *J. Nucleic Acids*, **2012**: 748913
- 8 Bayat P, Nosrati R, Alibolandi M, Rafatpanah H, Abnous K, Khedri M, Ramezani M. *Biochimie*, **2018**, 154: 132–155
- 9 Blind M, Blank M. *Mol. Ther. Nucleic Acids*, **2015**, 4: e223
- 10 Knight R, Yarus M. *Nucleic Acids Res.*, **2003**, 31(6): e30
- 11 Velez T E, Singh J, Xiao Y, Allen E C, Wong O Y, Chandra M, Kwon S C, Silverman S K. *ACS Comb. Sci.*, **2012**, (14): 680–687
- 12 Kwon Y S, Raston N H A, Gu M B. *Chem. Commun.*, **2014**, (50): 40–42
- 13 Li Y F, Geyer C R, Sen D. *Biochemistry*, **1996**, (35): 6911–6922
- 14 Lee K H, Zeng H. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2017**, 409(21): 5081–5089
- 15 He X, Guo L, He J, Xu H, Xie J. *Anal. Chem.*, **2017**, 89(12): 6559–6566
- 16 Griffin L C, Tidmarsh G F, Bock L C, Toole J J, Leung L L K. *Blood*, **1993**, 81(12): 3271–3276
- 17 Pagratis N C, Bell C, Chang Y F, Jennings S, Fitzwater T, Jellinek D, Dang C. *Nat. Biotechnol.*, **1997**, 15(1): 68–73
- 18 Matsunaga K, Kimoto M, Hanson C, Sanford M, Young H A, Hirao I. *Sci. Rep.*, **2015**, 5: 18478
- 19 Shoara A A, Reinstein O, Borhani O A, Martin T R, Slavkovic S, Churcher Z R, Johnson P E. *Biochimie*, **2018**, 145: 137–144
- 20 Dunn M R, Jimenez R M, Chaput J C. *Nat. Rev. Chem.*, **2017**, 1(10): 0076
- 21 Zhou J H, Rossi J. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2017**, 16(3): 181–202
- 22 Hollenstein M, Hipolito C J, Lam C H, Perrin D M. *Nucleic Acids Res.*, **2009**, 37(5): 1638–1649
- 23 Davydova A, Vorobyeva M, Bashmakova E, Vorobjev P, Krasheninina O, Tupikin A, Venyaminova A. *Anal. Biochem.*, **2019**, 570: 43–50
- 24 Liu M, Yin Q, Brennan J D, Li Y. *Biochimie*, **2018**, 145: 151–157
- 25 Aldag J, Persson T, Hartmann R. *Int. J. Mol. Sci.*, **2018**, 19(12): 3883–3398
- 26 Kratschmer C, Levy M. *Nucleic Acid Ther.*, **2017**, 27(6): 335–344
- 27 Röthlisberger P, Hollenstein M. *Adv. Drug Delivery Rev.*, **2018**, 134: 3–21
- 28 Levi-Acobas F, Katolik A, Röthlisberger P, Cokelaer T, Sarac I, Damha M J, Hollenstein M. *Org. Biomol. Chem.*, **2019**, 17(35): 8083–8087
- 29 Kamatkar N, Levy M, Hébert J M. *Mol. Ther. Nucleic Acids*, **2019**, 17: 530–539
- 30 Kimoto M, Nakamura M, Hirao I. *Nucleic Acids Res.*, **2016**, 44(15): 7487–7494
- 31 Wang H, Lam C H, Li X, West D L, Yang X. *Biochimie*, **2018**, 145: 125–130
- 32 Gawande B N, Rohloff J C, Carter J D, von Carlowitz I, Zhang C, Schneider D J, Janjic N. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2017**, 114(11): 2898–2903
- 33 Chen T J, Hongdilokkul N, Liu Z X, Adhikary R, Tsuen S S, Romesberg F E. *Nat. Chem.*, **2016**, 8(6): 557–563
- 34 Thirunavukarasu D, Chen T J, Liu Z X, Hongdilokkul N, Romesberg F E. *J. Am. Chem. Soc.*, **2017**, 139(8): 2892–2895
- 35 Liu Z X, Chen T J, Romesberg F E. *Chem. Sci.*, **2017**, 8(12): 8179–8182
- 36 Chen T J, Romesberg F E. *Angew. Chem. Int. Edit.*, **2017**, 56(45): 14046–14051
- 37 Taylor A I, Pinheiro V B, Smola M J, Morgunov A S, Peak-Chew S, Cozens C, Weeks K M, Herdewijn P, Holliger P. *Nature*, **2015**, 518(7539): 427–430
- 38 Larsen A C, Dunn M R, Hatch A, Sau S P, Youngbull C, Chaput J C. *Nat. Commun.*, **2016**, 7: 11235
- 39 Kimoto M, Yamashige R, Matsunaga K, Yokoyama S, Hirao I. *Nat. Biotechnol.*, **2013**, 31: 453–457
- 40 Matsunaga K, Kimoto M, Hirao I. *J. Am. Chem. Soc.*, **2017**, 139(1): 324–334

- 41 Zhang L Q, Yang Z Y, Trinh T L, Teng I T, Wang S, Bradley K M, Hoshika S, Wu Q F, Cansiz S, Rowold D J, McLendon C, Kim M S, Wu Y, Cui C, Liu Y, Hou W J, Stewart K, Wan S, Liu C, Benner S A, Tan W H. *Angew. Chem. Int. Edit.*, **2016**, 55(40): 12372–12375
- 42 Golden M C, Collins B D, Willis M C, Koch T H. *J. Biotechnol.*, **2000**, 81(2-3): 167–178
- 43 Maasch C, Buchner K, Eulberg D, Vonhoff S, Klussmann S. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **2008**: 61–62
- 44 Wang Z M, Xu W L, Liu L, Zhu T F. *Nat. Chem.*, **2016**, 8(7): 698–704
- 45 Pech A, Achenbach J, Jahnz M, Schulzchen S, Jarosch F, Bordusa F, Klussmann S. *Nucleic Acids Res.*, **2017**, 45(7): 3997–4005
- 46 Vater A, Klussmann S. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.*, **2003**, 6(2): 253–261
- 47 Kanwar J R, Roy K, Kanwar R K. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **2011**, 46(6): 459–477
- 48 Yang D K, Chou C F, Chen L C. *RSC Adv.*, **2018**, 8(34): 19067–19074
- 49 Tsao S M, Lai J C, Horng H E, Liu T C, Hong C Y. *Sci. Rep.*, **2017**, 7: 45478
- 50 Sypabekova M, Bekmurzayeva A, Wang R, Li Y, Nogues C, Kanayeva D. *Tuberculosis*, **2017**, 104: 70–78
- 51 Rose K M, Ferreira-Bravo I A, Li M, Craigie R, Ditzler M A, Holliger P, DeStefano J J. *ACS Chem. Biol.*, **2019**, 14(10): 2166–2175
- 52 Yang C, Wang Y, Ge M H, Fu Y J, Hao R, Islam K, Naranmandura H. *Biomater. Sci.*, **2019**, 7(3): 938–950
- 53 Shubham S, Hoinka J, Banerjee S, Swanson E, Dillard J A, Lennemann N J, Przytycka T M, Maury W, Nilsen-Hamilton M. *Sci. Rep.*, **2018**, 8: 12373
- 54 Li K, Xiu C L, Gao L M, Shi M, Zhai Y. *J. South Med. Univ.*, **2016**, 36(12): 1592–1598
- 55 Alshaer W, Ababneh N, Hatmal M, Izmirli H, Choukeife M, Shraim A, Awidi A. *PloS one*, **2017**, 12(12): 189558–189571
- 56 Donkor D A, Bhakta V, Eltringham-Smith L J, Stafford A R, Weitz J I, Sheffield W P. *Sci. Rep.*, **2017**, 7: 2102
- 57 Yazdian-Robati R, Ramezani M, Khedri M, Ansari N, Abnous K, Taghdisi S M. *Microchim. Acta*, **2017**, 184(10): 4029–4035
- 58 Leblebici P, Leirs K, Spasic D, Lammertyn J. *Anal. Chim. Acta*, **2019**, 1053: 70–80
- 59 Zhou W, Zhang Y, Zeng Y, Peng M, Li H, Sun S, Liu J. *Biochimie*, **2018**, 151: 150–158
- 60 Fukasawa K, Higashimoto Y, Ando Y, Motomiya Y. *Ther. Apher. Dial.*, **2018**, 22(1): 61–66
- 61 Hu Y, Li X, An Y, Duan J, Yang X D. *Oncotarget*, **2018**, 9(42): 26605–26616
- 62 Nazari M, Gargari S, L M, Sahebgadam Lotfi A, Rassae M J, Taheri R A. *Biochemistry*, **2019**, 58(18): 2373–2383
- 63 Alshaer W, Ababneh N, Hatmal M, Izmirli H, Choukeife M, Shraim A, Awidi A. *PloS One*, **2017**, 12(12): e0189558
- 64 Bhardwaj J, Chaudhary N, Kim H, Jang J. *Anal. Chim. Acta*, **2019**, 1064: 94–103
- 65 Díaz-Fernández A, Miranda-Castro R, de-los-Santos-Álvarez N, Rodríguez E F, Lobo-Castañón M J. *Biosens. Bioelectron.*, **2019**, 128: 83–90
- 66 Yu F, Li H, Sun W, Zhao Y, Xu D, He F. *Talanta*, **2019**, 193: 110–117
- 67 Ma Y, Li X, Li W, Liu Z. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2018**, 10(47): 40918–40926
- 68 Liu M, Yin Q, Chang Y, Zhang Q, Brennan J D, Li Y. *Angew. Chem. Int. Edit.*, **2019**, 58(24): 8013–8017
- 69 Tucker W, Kinghorn A, Fraser L, Cheung Y W, Tanner J. *Int. J. Mol. Sci.*, **2018**, 19(3): 763–778
- 70 Wang C, Du X, Xie T, Li H. *J. Sep. Sci.*, **2019**, 42(23): 3571–3578
- 71 Sedighian H, Halabian R, Amani J, Heiat M, Taheri R A, Fooladi A A I. *Anal. Biochem.*, **2018**, 548: 69–77
- 72 Bayat P, Taghdisi S M, Rafatpanah H, Abnous K, Ramezani M. *Talanta*, **2019**, 194: 399–405
- 73 Sedighian H, Halabian R, Amani J, Heiat M, Amin M, Fooladi A A I. *J. Biotech.*, **2018**, 286: 45–55
- 74 Moreno M, Fernández-Algar M, Fernández-Chamorro J, Ramajo J, Martínez-Salas E, Briones C. *Molecules*, **2019**, 24(7): 1213–1229
- 75 Eissa S, Zourob M. *Biosens. Bioelectron.*, **2017**, 91: 169–174
- 76 Heiat M, Ranjbar R, Latifi A M, Rasaee M J. *Peptides*, **2016**, 82: 101–108
- 77 Chonco L, Fernández G, Kalhapure R, Hernúiz M J, Garcia-Oliva C, Gonzalez V M, Parboosing R. *Nucleic Acid Ther.*, **2018**, 28(4): 242–251

- 78 Stuart C H, Riley K R, Boyacioglu O, Herpai D M, Debinski W, Qasem S, Gmeiner W H. *Mol. Ther. Nucl. Acids*, **2016**, 5: 386–395
- 79 Zhu C, Wang X, Li L, Hao C, Hu Y, Rizvi A S, Qu F. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2018**, 506(1): 169–175
- 80 Lisi S, Fiore E, Scarano S, Pascale E, Boehman Y, Duconge F, Ravelet C. *Anal. Chim. Acta*, **2018**, 1038: 173–181
- 81 Zhu C, Li L, Yang G, Fang S, Liu M, Ghulam M, Qu F. *Anal. Chim. Acta*, **2019**, 1070: 112–122
- 82 Zhu C, Li L, Yang G, Irfan M, Wang Z, Fang S, Qu F. *Talanta*, **2019**, 205: 120088
- 83 Wakui K, Yoshitomi T, Yamaguchi A, Tsuchida M, Saito S, Shibukawa M, Yoshimoto K. *Mol. Ther. Nucl. Acids*, **2019**, 16: 348–359
- 84 Wakui K, Abe A, Yoshitomi T, Furusho H, Yoshimoto K. *Anal. Sci.*, **2019**, 35(5): 585–588
- 85 Le A T, Krylova S M, Kanoatov M, Desai S, Krylov S N. *Angew. Chem. Int. Edit.*, **2018**, 58(9): 2739–2743
- 86 Yang G, Feng Q, Abstract. *BCEIA*, **2017**
- 87 Sinha A, Gopinathan P, Chung Y D, Lin H Y, Li, K H, Ma H P, Lee G B. *Biosens. Bioelectron.*, **2018**, 122: 104–112
- 88 Liu X, Li H, Jia W, Chen Z, Xu D. *Lab Chip*, **2017**, 17(1): 178–185
- 89 Park J W, Lee S J, Ren S, Lee S, Kim S, Laurell T. *Sci. Rep.*, **2016**, 6: 27121
- 90 Olsen T R, Tapia-Alveal C, Yang K A, Zhang X, Pereira L J, Farmakidis N, Lin Q. *J. Electrochem. Soc.*, **2017**, 164(5): B3122–B3129
- 91 Kim J, Olsen T R, Zhu J, Hilton J P, Yang K A, Pei R, Lin Q. *Sci. Rep.*, **2016**, 6: 26139
- 92 Hong S L, Wan Y T, Tang M, Pang D W, Zhang Z L. *Anal. Chem.*, **2017**, 89(12): 6535–6542
- 93 Olsen T, Zhu J, Kim J, Pei R, Stojanovic M N, Lin Q. *SLAS Technol.*, **2017**, 22(1): 63–72
- 94 Kinghorn A B, Dirkzwager R M, Liang S, Cheung Y W, Fraser L A, Shiu S C C, Tanner J A. *Anal. Chem.*, **2016**, 88(14): 6981–6985
- 95 Yokoyama T, Tsukakoshi K, Yoshida W, Saito T, Teramoto K, Savory N, Ikebukuro K. *Biotech. Bioengineer.*, **2017**, 114(10): 2196–2203
- 96 Ahirwar R, Nahar S, Aggarwal S, Ramachandran S, Maiti S, Nahar P. *Sci. Rep.*, **2016**, 6: 21285
- 97 Bavi R, Liu Z, Han Z, Zhang H, Gu Y. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2019**, 509(4): 937–942
- 98 Haghighi M, Khanahmad H, Palizban A. *Molecules*, **2018**, 23(4): 715–728
- 99 Fafiřska J, Czech A, Sitz T, Ignatova Z, Hahn U. *Nucleic Acid Ther.*, **2018**, 28(6): 326–334
- 100 Takenaka M, Okumura Y, Amino T, Miyachi Y, Ogino C, Kondo A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2017**, 27(4): 954–957
- 101 Nafissi-varcheh N, Kazemi B, Aboofazeli R, Shahhosseini S, Tabarzad M. *Iran. J. Pharm. Res.*, **2017**, 16(2): 734–741
- 102 Zhu C, Yang G, Ghulam M, Li L, Qu F. *Biotechnol. Adv.*, **2019**: 107432
- 103 Lenshof A, Laurell T. *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, 39(3): 1203–1217
- 104 Pappas D, Wang K. *Anal. Chim. Acta*, **2007**, 601(1): 26–35
- 105 Hybarger G, Bynum J, Williams R F. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2005**, 384(1): 191–198
- 106 Cho M, Xiao Y, Nie J, Stewart R, Csordas A T, Oh S S, Soh H T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2010**, 107(35): 15373–15378
- 107 Bae H, Ren S, Kang J, Kim M, Jiang Y, Jin M M, Kim S. *Nucleic Acid Ther.*, **2013**, 23(6): 443–449
- 108 Qian J, Lou X, Zhang Y, Xiao Y, Soh H T. *Anal. Chem.*, **2009**, 81(13): 5490–5495
- 109 Jiang Y, Zhu C, Ling L, Wan L, Fang X, Bai C. *Anal. Chem.*, **2003**, 75(9): 2112–2116
- 110 Allison D P, Hinterdorfer P, Han W. *Curr. Opin. Biotech.*, **2002**, 13(1): 47–51
- 111 Zlatanova J, Lindsay S M, Leuba S H. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **2000**, 74(1-2): 37–61
- 112 Miyachi Y, Shimizu N, Ogino C, Kondo A. *Nucleic Acids Res.*, **2009**, 38(4): 21–21
- 113 Ye M, Hu J, Peng M, Liu J, Liu J, Liu H, Tan W. *Int. J. Mol. Sci.*, **2012**, 13(3): 3341–3353
- 114 Liu Y, Kuan C T, Mi J, Zhang X, Clary B M, Bigner D D, Sullenger B A. *Biol. Chem.*, **2009**, 390(2): 137–144
- 115 Sefah K, Shangguan D, Xiong X, O'donoghue M B, Tan W. *Nat. Protoc.*, **2010**, 5(6): 1169–1185
- 116 Blank M, Weinschenk T, Priemer M, Schluesener H. *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276(11): 16464–16468
- 117 Shangguan D, Cao Z, Meng L, Mallikaratchy P, Sefah K, Wang H, Tan W. *J. Proteome Res.*, **2008**, 7(5): 2133–2139
- 118 Mallikaratchy P, Tang Z, Kwame S, Meng L, Shangguan D, Tan W. *Mol. Cell. Proteomics*, **2007**, 6(12): 2230–2238
- 119 He J, Wang J, Zhang N, Shen L, Wang L, Xiao X, Shangguan D. *Talanta*, **2019**, 194: 437–445

- 120 Bing T, Shen L, Wang J, Wang L, Liu X, Zhang N, Xiao X, Shangguan D. *Adv. Sci.*, **2019**, 6(11): 1900143
- 121 Chen L, He W, Jiang H, Wu L, Xiong W, Li B, Zhou Z, Qian Y. *Int. J. Nanomed.*, **2019**, 14: 149–159
- 122 Fernández G, Moraga A, Cuartero M I, García-Culebras A, Peña-Martínez C, Pradillo J M, Hernández-Jiménez M, Sacristán S, Ayuso M I, Gonzalo-Gobernado R. *Mol. Ther.*, **2018**, 26: 2047–2059
- 123 Mai J, Li X, Zhang G, Huang Y, Xu R, Shen Q, Lokesh G L, Thiviyathan V, Chen L, Liu H. *Mol. Pharm.*, **2018**, 15: 1814–1825
- 124 Zhang S, Kumar K, Jiang X, Wallqvist A, Reifman J. *BMC Bioinformatics*, **2008**, 9(1): 126
- 125 Ma H, Liu J, Ali M M, Mahmood M A I, Labanieh L, Lu M, Wan Y. *Chem. Soc. Rev.*, **2015**, 44(5): 1240–1256
- 126 Zhou L, Ji F, Zhang T, Wang F, Li Y, Yu Z, Ruan B. *Talanta*, **2019**, 197: 444–450
- 127 Opazo F, Levy M, Byrom M, Schäfer C, Geisler C, Groemer T W, Rizzoli S O. *Nat. Methods*, **2012**, 9(10): 938–939
- 128 HUANG Zi-Ke, LIU Chao, FU Qiang-Qiang, LI Jin, ZOU Jian-Mei, XIE Si-Tao, QIU Li-Ping. *Chinese J. Appl. Chem.*, **2018**, 35(1): 28–39
- 黄子珂, 刘超, 付强强, 李进, 邹建梅, 谢斯滔, 邱丽萍. *应用化学*, **2018**, 35(1): 28–39
- 129 Hwang S Y, Sun H Y, Lee K H, Oh B H, Cha Y J, Kim B H, Yoo J Y. *Nucleic Acids Res.*, **2012**, 40: 2724–2733
- 130 Zhang Y, Lai B S, Juhas M. *Molecules*, **2019**, 24(5): 941–963
- 131 Mufhandu H T, Gray E S, Madiga M C, Tumba N, Alexandre K B, Khoza T, Wibmer C K, Moore P L, Morris L, Khati M. *J. Virol.*, **2012**, 86: 4989–4999
- 132 Kunii T, Ogura S I, Mie M, Kobatake E. *Analyst*, **2011**, 136: 1310–1312
- 133 Berezovski M V, Lechmann M, Musheev M U, Mak T W, Krylov S N. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130(28): 9137–9143
- 134 Jia W, Ren C, Wang L, Zhu B, Jia W, Gao M, Zeng F, Zeng L, Xia X, Zhang X, Fu T, Li S, Du C, Jiang X, Chen Y, Tan W, Zhao Z, Liu W. *Oncotarget*, **2016**, 7: 55328–55342

Development of Apatmer Screening Against Proteins and Its Applications

ZHAO Li-Ping, YANG Ge, ZHANG Xiao-Min, QU Feng*

(School of Life Science, Beijing Institute of Technology, Key Laboratory of Molecular Medicine and Biological Diagnosis, Ministry of Industry and Information Technology, Beijing 100081, China)

Abstract Aptamers, short single stranded DNA or RNA, are selected through systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX), which can bind with target molecules with high affinity and high specificity. Proteins are vital functional macromolecules. Many SELEX techniques have been developed for screening of aptamers against proteins. In recent years, in order to obtain aptamers with high affinity and specificity, many SELEX methods have been developed to enhance selection efficiency, reduce cost and improve aptamer properties. Affinity characterization is also the key procedure in aptamer selection, which demonstrates if the obtained aptamer can satisfy the application requirement. In this review, the progress in aptamer screening for protein targets were summarized, and the optimization methods of nucleic acid library, improvement and development of screening methods and application of aptamers against proteins were mainly emphasized.

Keywords Aptamer; Protein; Selection; Systematic evolution of ligands by exponential enrichment; Review

(Received 9 January 2020; accepted 25 February 2020)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21675012, 21874010, 21827810).