

寡核苷酸适配子在分析化学中的应用

唐吉军 邵宁生[#] 谢剑炜^{*}

(军事医学科学院月份毒物药物研究所 [#]基础医学研究所 北京 100850)

摘 要 指数富集配基的系统进化(SELEX)技术是一种新的组合化学技术,应用人工合成的随机寡核苷酸文库,通过筛选、分离、富集获得能与氨基酸、蛋白、药物、有机小分子、无机离子等靶物质特异性结合的寡核苷酸适配子,且具有高亲和力。随着 SELEX 技术的发展,寡核苷酸适配子作为一种分析工具,在生物传感器、流式细胞检测、毛细管电泳、亲和色谱等分析化学领域的应用越来越广泛。本文介绍了寡核苷酸适配子作为生物识别元件在生物传感器中的应用以及作为色谱固定相的应用。

关键词 指数富集配基的系统进化 适配子 生物传感器 毛细管电泳 亲和色谱

Applications of Oligonucleotide Aptamers in Analytical Chemistry

Tang Jijun, Shao Ningsheng[#], Xie Jianwei^{*}

(Institute of Pharmacology Toxicology, [#]Institute of Basic Medicine, Academy of Military Medical Science, Beijing 100850)

Abstract Systematic Evolution of Ligand by Exponential enrichment (SELEX) is a new combinational chemistry methodology for in vitro selection of specific aptamers. Aptamers are artificial nucleic acid ligands that are capable of high-affinity binding to target molecules, such as amino acids, drugs, proteins and other small molecules or ions etc. They are isolated from combinational libraries of synthetic nucleic acid by an iterative process of adsorption, recovery and reamplification. The use of aptamers as tools in analytical chemistry is on the rise due to the development of the SELEX technology. These aptamers have been used in biosensors, flow cytometry, capillary electrophoresis, and affinity chromatography. In this review, were discussed the applications of aptamers as biocomponents in biosensors, and the applications of aptamers as chromatographic stationary phases.

Key words SELEX, Aptamer, Biosensor, Capillary electrophoresis, Affinity chromatography

上世纪 90 年代初,美国的 Joyce^[1]、Szostak^[2]和 Gold^[3]三个研究小组分别报道了一种寡核苷酸体外筛选(in vitro selection)、扩增(amplification)技术,通过这项技术可以得到能与非核酸靶分子具有高亲和力、高特异性结合的寡核苷酸序列。这项技术被称为指数富集配基的系统进化(Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment, SELEX),筛选获得的寡核苷酸序列命名为适配子(aptamer)。在过去的十几年中,SELEX 技术得到了充分的发展,筛选得到了能和小分子、多肽、蛋白甚至整个细胞均有高亲和力、特异性的适配子。如, Jenison 等^[4]筛选获得

唐吉军 男, 24 岁, 硕士生, 现从事寡核苷酸适配子的筛选。*联系人, E-mail: xiejw@nic.bmi.ac.cn

国家自然科学基金资助项目(20305013)

2003-12-02 收稿, 2004-06-11 接受

的特异性识别茶碱的寡核苷酸适配子,可在嘌呤、黄嘌呤、次黄嘌呤等类似物中特异性识别茶碱,其解离常数小于 $1\mu\text{mol/L}$ 。表 1 列举其中一部分。

表 1 部分适配子及其靶分子
Tab.1 Some aptamers and their target molecules

靶分子	文库类型	参考文献
有机染料	RNA/ssDNA	2,5
可卡因	ssDNA	18,19
L-精氨酸	RNA	12
茶碱	RNA	4
ATP	RNA	6
人凝血酶	ssDNA	13
血管内皮生长因子	RNA	14
HIV-1 逆转录酶	ssDNA/RNA	7,8
T4 DNA 聚合酶	RNA	3
PC 12 细胞	ssDNA	9

1 寡核苷酸适配子的筛选——SELEX 过程

SELEX 筛选过程是应用大容量的随机寡核苷酸文库,结合 PCR 体外扩增技术,以指数级富集与靶分子特异结合的寡核苷酸,经过数轮反复的体外筛选、扩增,获得与靶分子特异结合的寡核苷酸适配子。

核酸文库是由组合化学合成,主要有 RNA 文库、DNA 文库和含有修饰核苷酸的文库。文库中由中间为一定长度的随机序列和 5'、3'端的固定序列构成。两端固定序列长度一般为 20~25 个碱基,作用是增加文库的稳定性和为扩增准备。随机区的每一个核苷酸位置都存在四种可能性,如果随机序列长度为 N ,则随机序列的多样性有 4^N 种,即文库的库容量为 4^N 。典型的文库至少有 $10^{13} \sim 10^{18}$ 个独立序列,其随机区域长度是 30 个核苷酸左右。有文献报道大约在 10^{10} 个随机 RNA 序列中有一个序列与靶分子特异结合^[2]。因此,起始文库库容量必须很大,这样才能增加获得“活性”适配子的可能性。

筛选流程是将文库和靶分子在一定温度下(通常为 37)孵育,在最初几个循环中只有少数(约 0.1%~0.5%)的序列与靶分子作用,这些序列通过亲和色谱、纤维膜过滤等分离技术将结合复合物与未结合的序列分开。分离得到的序列再扩增产生次级文库,用于下一轮筛选。由此进入一个反复筛选富集的过程。对于 RNA 文库,扩增步骤还包括 RNA 序列的反转录,得到的双链 DNA 文库再转录生成次级 RNA 文库。经过数轮的筛选富集,分离得到的随机序列与靶物质亲和力不再提高,即可对筛选获得的寡核苷酸适配子进行克隆、测序、生物活性及分子识别等功能研究。一个典型的 SELEX 过程可能持续几个星期至几个月,然而,随着“自动化 SELEX”技术的出现^[10,11],不仅降低了人为因素的干扰,且可在数天内完成一个 SELEX 过程。

2 适配子在分析化学中的应用

自上世纪 90 年代初 SELEX 技术诞生以来,SELEX 技术得到了突飞猛进的发展。由于其筛选的靶物质范围广,得到的适配子亲和力高、特异性强,所以该技术在基础研究、临床诊断和

治疗以及新药的筛选等诸多领域中都展示了广阔的应用前景。本文主要综述了 SELEX 技术筛选得到的适配子在生物传感器、流式细胞、毛细管电泳(CE)和毛细管电色谱(CEC)、亲和色谱等分析化学方面的应用。

2.1 在生物传感器方面的应用

生物传感器是依赖于分子识别元件的作用来构建的。通常,生物传感器的识别元件主要是抗体、酶、受体和核酸等。目前已有大量的各类型生物传感器应用在实际工作中。但是这些传感器均具有一定的局限性,如单抗或多抗的制备比较繁琐、固定时活性易损失、活性保存时间有限、使用时对环境和样品条件要求比较高。然而,通过 SELEX 技术筛选得到的寡核苷酸适配子具备类似抗体一样的对靶分子高的亲和力和特异性,但相比大分子的抗体,寡核苷酸适配子分子量小,结构简单,能保证合成的精确性及易连接其它分子进行修饰,如荧光素、生物素等。同时,寡核苷酸适配子可以变性、复性且速度快,可反复使用、长期保存。基于寡核苷酸适配子的这些优点,将适配子作为生物传感器的识别元件,制成适配子生物传感器(Aptasensors),具有不可替代的优势。

目前寡核苷酸适配子生物传感器尚处于起步阶段,在已报道的文献中绝大多数生物传感器是基于荧光方式检测的。第一个适配子传感器是由 Kleinjung 等^[15]在 1998 年设计的,用来特异检测 *L*-腺苷。他们将抗生物素的链霉亲和素通过衍生化反应连接在光纤表面,再将筛选得到的 RNA 适配子的 3'端标记上生物素,通过生物素和链霉亲和素特异结合作用把适配子固定到传感器探针表面。通过适时监测荧光强度的变化可以获得寡核苷酸适配子和 *L*-腺苷的结合与解离常数。将未标记的 *L*-腺苷加到反应混合物中竞争异硫氰酸荧光素标记的 *L*-腺苷,通过竞争法可以检测亚微摩尔浓度水平的 *L*-腺苷。

Potyrailo 等^[16]设计的适配子传感器被用来检测人凝血酶。当靶分子凝血酶和荧光素标记的适配子结合,导致荧光各向异性的变化。因此,测量荧光各向异性的变化就能测定凝血酶的浓度。该分析方法可在 10min 内完成,检出限为 5nmol/L。Lee 等^[17]也报道过用寡核苷酸适配子为识别分子的光纤生物传感器检测凝血酶,与 Potyrailo 等设计不同之处是采用竞争模式的分析方法。将待检测的凝血酶溶液加入到适配子已结合标记荧光素的凝血酶溶液中,通过竞争反应测定凝血酶的浓度。这种光纤芯片系统的检出限是 1nmol/L,包括活化传感器在内,测量时间仅为 15min。

Stojanovic 等^[18]报道了检测可卡因的适配子生物传感器。他们巧妙地把适配子设计成三叉结构(图 1),其中可变的茎环是可卡因结合部位。在这个茎环的 5'端标记荧光发光基团,3'端标记荧光猝灭基团。当可卡因不存在时,茎环呈打开状态,发出荧光;当存在可卡因时,3'端和 5'端闭合形成三叉结构,同时也导致荧光的猝灭。根据荧光强度的变化可测定分析物的浓度。该传感器在对可卡因和其代谢产物检测时显示较好的选择性,并且可以在血浆中进行检测。在此基础上,Stojanovic 等^[19]又设计出了基于适配子的比色探针用于可卡因的检测。基本原理是:先将 DNA 适配子和青蓝染料结合,由于是非特异性结合,当加入可卡因后,可卡因取代染料和适配子特异结合。通过测量染料分子在特定波长的吸光度变化可以计算出可卡因的浓度。这种比色传感器比上述荧光传感器在特异性和选择性上均略有提高。

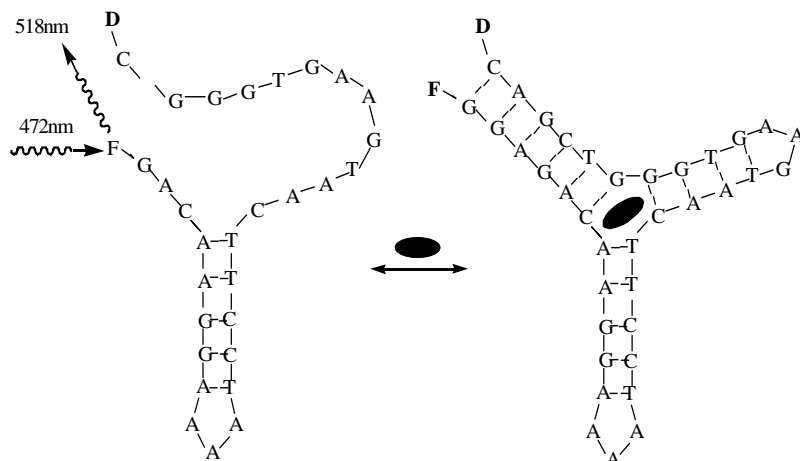


图 1 传感器通过结构改变导致荧光猝灭指示溶液中可卡因的存在^[18]

Fig.1 Sensor signals the presence of cocaine in solution by conformational change that approximates 5' and 3' ends^[18]

F 指荧光基团, D 指猝灭基团

2.2 在流式细胞检测中的应用

流式细胞技术能够对细胞或者微球同时进行多参数分析以及从不同种类的混合物中分离特定细胞, 目前已经广泛应用于临床诊断。SELEX 技术筛选得到的寡核苷酸适配子与靶分子的结合具有与抗体相当甚至更高的亲和力和特异性。由于寡核苷酸适配子结构简单、分子量小, 比抗体更适合用于流式细胞技术。Davis 等^[20]将筛选得到的特异识别人中性粒细胞胰肽酶 E(HNE) 的 DNA 适配子, 在其 5'端或 3'端标记荧光素, 用以检测包被在聚苯乙烯微珠表面的 HNE。实验结果表明适配子的荧光强度高于荧光素交联的抗 HNE 抗体, 这也说明寡核苷酸适配子在流式细胞术中的应用是可行的、有效的。Davis 等^[21]还利用筛选到的适配子通过流式细胞仪从不同种类的细胞混合液中鉴定特定细胞群体, 得到了与抗体平行的结果。还有研究人员^[22]在进行适配子与抗体对照研究中发现, 非标记的特异识别 *L*-选择素的 DNA 配基能完全阻断荧光素标记配基在中性粒细胞表面的染色, 非标记的抗 *L*-选择素抗体只能部分阻断荧光素标记抗体的染色, 可能的解释为荧光素标记抗体结合在中性粒细胞表面的 Fc 段受体上, 在抗体 Fc 段与细胞表面 Fc 段受体之间存在非特异相互作用。这使得寡核苷酸适配子在流式细胞检测技术中的应用更具优势。

2.3 在毛细管电泳(CE)和毛细管电色谱(CEC)中应用

电泳是一种传统的分离技术, 它是基于被分析物的大小和电荷的不同达到分离的目的; 而亲和探针毛细管电泳和毛细管电色谱能分离不带电荷的样品。亲和探针毛细管电泳利用高亲和力结合来测定被分析物; 毛细管电色谱采用固定相分离被分析物。German 等^[23]将荧光发光团标记的 ssDNA 适配子应用到毛细管电泳研究中, 采用亲和探针毛细管电泳(APCE)模式, 通过激光诱导荧光(LIF)检测方式测定人免疫球蛋白 E(IgE), 最低检出限为 46pmol/L。当在样品中加入 IgG 并未影响 IgE 和 DNA 适配子的结合, 显示出适配子具有很高的选择性。

Kotia 等^[24]用两个 ssDNA 适配子作为毛细管电色谱的固定相来分离非预定目标分子。这两个 ssDNA 适配子的三维结构中都含有两个 G-四聚体(图 2), 主要差异是在连接 G-四聚体环的部

位。毛细管经这两种适配子衍生化后成功分离了氨基酸混合物(*D*-色氨酸、*D*-酪氨酸)、对映体混合物(*D*-色氨酸、*L*-色氨酸)以及多环芳烃混合物。

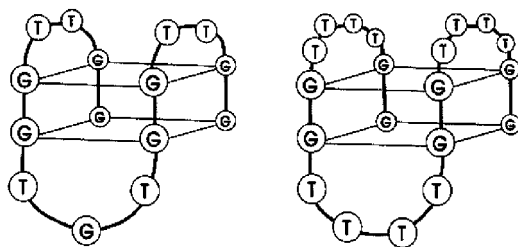


图 2 ssDNA 适配子的结构^[24]
Fig.2 Structure of ssDNA aptamer^[24]

2.4 在亲和色谱中的应用

亲和色谱法是一种从混合物中分离纯化目标化合物的有力手段，它是基于固定相对分析物特异的分子识别能力。经典的亲和色谱是利用抗原-抗体相互作用的高选择性、高亲和力。然而把抗体作为固定相存在一些不足：大分子抗体存在空间位阻，限制载体表面结合量，从而影响亲和柱的容量；抗体有潜在的降解和变性，以及一些毒素小分子难以产生抗体。通过 SELEX 技术筛选到的适配子在这个领域被认为是很有应用前景的，一方面在于它具有特异的分子识别能力；另一方面，从理论上讲能够得到与任何分子特异结合的适配子。Roming 等^[25]将特异结合人 *L*-选择素的适配子作为亲和试剂填充到亲和色谱柱中，当适配子色谱柱用于初步纯化，取得 1500 倍的纯化效果和 83% 的回收率。这些结果说明寡核苷酸适配子能成为高效的亲和纯化试剂。

Deng 等^[26]用特异结合腺苷/ATP 的适配子作为弱亲和固定相分离 cAMP、NAD⁺、AMP、ADP、ATP 和腺苷，制成亲和色谱柱，每 100 μ l 介质拥有 20 nmol 结合位点，是先前报道固定 IgG 抗体介质结合量的 3.3 倍，图 3 为其分析结果。Michaud 等^[27]报道将特异结合靶分子的 DNA 适配子作为新的高效液相色谱手性选择剂，他们将结合 *D*-精氨酸-加压素(AVP)的 DNA 适配子固定在色谱载体上。通过研究诸如柱温、洗脱液的 pH、盐浓度等参数对 *L*-、*D*-AVP 保留时间的影响，为研究结合机制和确定洗脱条件提供了信息。结果表明：在理想的结合条件和适宜的洗脱条件下，能够获得很好的立体异构选择性-*D*-构型结合很牢固，保留时间较长；而 *L*-构型很快被洗脱。

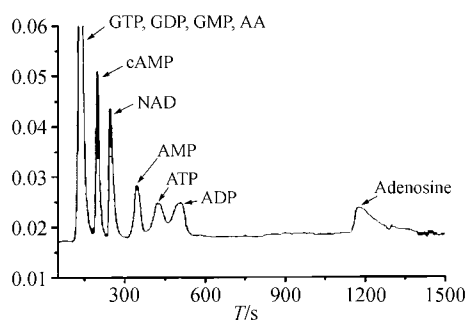


图 3 腺苷和类似物的亲和分离结果^[26]
Fig.3 Separation of adenosine and analogues on aptamer affinity chromatography column^[26]

3 前景展望

SELEX 技术自问世十几年来发展非常迅速,得到了不断改进,出现了复合靶 SELEX^[28]、混合 SELEX^[29]和基因组 SELEX^[30]等改进技术,使得 SELEX 技术的应用前景更加广阔。对于分析化学,寡核苷酸适配子作为新型的分析工具,其应用也在不断的扩展和深入。尤其是 SELEX 技术依靠其自身的优势在分析化学一些难点分析中将起到特殊的作用,例如对映体的拆分一直是分析化学中的难点和热点,这也是制药领域面临的挑战,而将适配子应用于手性拆分已经有了成功的典范^{[24], [27]}。随着 SELEX 技术的完善,特异性适配子获得的周期越来越短,将适配子作为液相色谱的固定相用于手性拆分就更具现实意义。寡核苷酸适配子在分析领域的应用目前尚处于起步阶段,这方面的报道也相对较少,但相信不久的将来依靠适配子自身的特点,在分析领域的应用会越来越多。

参考文献

- [1] D L Robertson, G E Joyce. *Nature*, 1990, 344 (6265): 467~468.
- [2] A D Ellington, J W Szostak. *Nature*, 1990, 346 (6287): 818~822.
- [3] C Tuerk, L Gold. *Science*, 1990, 249 (4968): 505~510.
- [4] R D Jenison, S C Gill, A Pardi et al. *Science*, 1994, 263: 1425~1429.
- [5] A D Ellington, J W Szostak. *Nature*, 1992, 355: 850~852.
- [6] M Sassanfar, J W Szostak. *Nature*, 1993, 364: 550~553.
- [7] D J Schneider, J Feigon, Z Hostomsky et al. *Biochemistry*, 1995, 34 (29): 9599~9610.
- [8] O Kensch, B A Connolly, H J Steinhoff et al. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275 (24): 18271~18278.
- [9] C Wang, M Zhang, G Yang et al. *J. Biotech.*, 2003, 102: 15~22.
- [10] C J Cox, D Andrew, A D Ellington. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2001, 9 (10): 2525~2531.
- [11] J C Cox, A Hayhurst, J Hesselberth et al. *Nucleic Acids Res.*, 2002, 30 (20).
- [12] M Famulok. *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, 116: 1698~1706.
- [13] L C Bock, L C Griffin et al. *Nature*, 1992, 355: 564~566.
- [14] D Jellinek, L S Green, C Bell et al. *Biochemistry*, 1994, 33 (34): 10450~10456.
- [15] F Kleinjung, S Klussman, V A Erdmann et al. *Anal. Chem.*, 1998, 70: 328~331.
- [16] R A Potyrailo, R C Conrad, A D Ellington. *Anal. Chem.*, 1998, 70: 3419~3425.
- [17] M Lee, D R Walt. *Anal. Biochem.*, 2000, 282 (1): 142~146.
- [18] M N Stojanovic, D W Landry. *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123: 4928~4931.
- [19] M N Stojanovic, D W Landry. *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, 124: 9678~9679.
- [20] K A Davis, B Abrams, S D Jayasena. *Nucleic Acids Res.*, 1996, 24: 702~706.
- [21] K A Davis, Y Lin, S D Jayasena. *Nucleic Acids Res.*, 1998, 26: 3915~3924.
- [22] B J Hicke, S R Watson, A Koenig et al. *J. Clin. Invest.*, 1996, 98: 2688~2692.
- [23] I German, D Buchanan, R T Kennedy. *Anal. Chem.*, 1998, 70: 4540~4545.
- [24] R B Kotia, L Li, L B McGown. *Anal. Chem.*, 2000, 72: 827~831.
- [25] T S Roming, C Bell, D J Drolet. *Chromatogr. B.*, 1999, 731: 275~284.
- [26] Q Deng, I German, D Buchanan et al. *Anal. Chem.*, 2001, 73: 5415~5421.
- [27] M Michaud, E Jourdan, A Villet et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125: 8672~8679.
- [28] K N Morris, K N Jensen, C M Julin et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95: 2902~2907.
- [29] N M Bless, D Smith, J Charlton et al. *Curr. Biol.*, 1997, 7: 877~880.
- [30] B S Singer, T Shtatlang, D Brown et al. *Nucleic Acids Res.*, 1997, 25: 781~786.