

核酸适体在生物医学中的应用*

吴崔晨¹ 胡佳¹ 邹远¹ 王驰¹ 刘杰^{2**} 杨朝勇^{1**}

- (1. 厦门大学化学化工学院 福建省化学生物学重点实验室 固体表面
物理化学国家重点实验室 厦门 361005;
2. 复旦大学华山医院消化科 复旦大学生物医学研究院 上海 200040)

摘 要 核酸适体是经配体指数富集系统进化技术 (SELEX) 筛选获得的一类能够特异性地结合离子、分子,甚至整个细胞的单链 DNA 或者 RNA 分子。本文介绍了核酸适体及相关筛选技术 SELEX;综述了近年来以提高筛选效率和效果为目标的核酸适体筛选技术新进展;列举了核酸适体在无机离子、小分子、生物大分子和肿瘤细胞检测、肿瘤标记物的发现等方面的应用;讨论了基于核酸适体的靶向治疗策略;最后对核酸适体在生物医学上的应用前景进行了展望。

关键词 核酸适体 SELEX 技术 分子诊断 靶向治疗 生物医学

中图分类号: O657 文献标识码: A 文章编号: 1005-281X(2010)08-1518-13

Application of Aptamers in Biomedicine

Wu Cuichen¹ Hu Jia¹ Zou Yuan¹ Wang Chi¹ Liu Jie^{2**} Yang Chaoyong^{1**}

- (1. State Key Laboratory for Physical Chemistry of Solid Surfaces, the Key Laboratory for Chemical Biology of Fujian Province, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China;
2. Department of Digestive Diseases, Huashan Hospital, Institutes of Biomedical Sciences, Fudan University, Shanghai 200040, China)

Abstract Aptamers are a new class of nucleic acid probes, which are ssDNA/RNA molecules selected to target a wide range of ions, molecules and even cells through SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) technique. This paper presents aptamers and traditional selection approaches; summarizes recent efforts in developing new aptamer selection strategies; reviews new approaches for biomedical analysis, disease biomarker discovery and target therapy. Finally, the potential of aptamers in biomedicine is also discussed.

Key words aptamers; SELEX; molecular diagnosis; target therapy; biomedicine

Contents

- | | |
|---|---|
| 1 Introduction | 3 Aptamers for biomedical applications |
| 2 Aptamers generated from SELEX | 3.1 Detection of ions and small molecules |
| 2.1 Classical selection method | 3.2 Biomolecules monitoring |
| 2.2 Improved separation approaches in SELEX | 3.3 Analysis of tumor cells |
| 2.3 SELEX with modified nucleotides | 3.4 Discovery of biomarkers |
| | 4 Aptamer-based target therapies |
| | 5 Conclusion and prospects |

收稿: 2009 年 11 月 (特约)

* 国家重点基础研究发展计划 (973) 项目 (No. 2010CB732400) 和福建省自然科学基金项目 (No. 2008J0107) 资助

** Corresponding author e-mail: cyyang@xmu.edu.cn; jieliu28@hotmail.com

1 引言

核酸适体 (aptamer, 也译为核酸识体、核酸适配子) 是指从人工合成的 DNA/RNA 文库中筛选得到的能够高亲合性和高特异性地与靶标分子结合的单链寡核苷酸。核酸适体技术是由美国 L. Gold 和 J. Szostak (2009 年诺贝尔生理学或医学奖获得者) 两个研究组最早提出的。1990 年 Gold 研究组^[1]运用体外筛选技术获得能与 T4 DNA 聚合酶特异性结合的 RNA, 并把该技术定义为 SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment, 配体指数富集系统进化)。同年, Szostak 研究组^[2]也报道了能结合小分子有机染料的 RNA 片段, 并将其命名为核酸适体 (nucleic acid aptamers), 取自于拉丁文的“aptus”(意为适合)与希腊单词“meros”。这些突破性研究都证明核酸分子不仅能储存和传递遗传信息, 还能通过自身特有的结构和空间构型与其他分子相互作用; 同时, 证实具有复杂功能的核酸分子能够通过体外筛选获得。

核酸适体借助氢键、范德华力、疏水作用等分子间作用力形成特殊的三维结构, 如发夹、假结、凸环、G-四聚体等, 从而特异地识别靶物质并影响其生物活性。核酸本身特有的生化特性使其在生物医学应用领域具有诸多优势: (1) 靶分子范围广。小到 ATP、氨基酸、核苷酸、金属离子、毒素等小分子物质, 大到酶、生长因子、细胞黏附分子等生物大分子, 甚至完整的病毒、细菌和细胞等都可作为适体筛选的靶物质。理论上, 应用 SELEX 技术能筛选到自然界几乎所有靶分子的适体。(2) 亲合力强。核酸适体与靶分子的结合强度高, 解离常数 (K_d) 可达 μM 到 pM 水平。(3) 特异性高。核酸适体不仅能识别靶物质一个甲基或羟基的细微变化、高度同源的蛋白以及多肽个别氨基酸的变化, 还能够区分旋光异构体^[3]。(4) 制备、修饰方便快捷。通过化学合成的方法可以在体外快速灵活地合成所需要的各种核酸适体序列, 而且可以进行精确的位点修饰, 如荧光标记、生物素标记等。(5) 核酸适体可以通过分子生物工具进行剪裁, 提高其亲合能力, 有利于发展灵活多变的灵敏检测方法^[4]。(6) 稳定性好, 便于长期保存和运输, 变性复性可逆, 能反复使用, 而抗体蛋白则容易变性失活。(7) 无毒性、无免疫原性、组织渗透性好。

由于核酸适体拥有抗体无法比拟的优势, 发展核酸适体筛选技术, 以及利用核酸适体进行分子诊

断和生物体内靶向治疗在生物医学、分子生物学领域具有极其重要的意义。

2 基于 SELEX 的核酸适体筛选

2.1 传统筛选方法

核酸适体可以通过 SELEX 技术获得, 其总的思路是从通过组合化学原理设计合成的随机寡核苷酸库 (10^{15} — 10^{18} 种核酸分子) 中经多轮筛选和指数富集最终获得目标核酸适体。所合成的庞大的随机核酸库保证了库内核酸分子在序列、结构以及功能上的多样性, 使得对靶分子有不同亲合力的序列同时存在。SELEX 技术通过特定的分离手段从核酸库排除弱亲合力或无特异性序列, 结合 PCR 扩增技术对高亲合力的核酸序列进行逐级指数放大富集。图 1 介绍了传统 SELEX 技术的 5 个步骤: (1) 设计并合成容量庞大的 (10^{15} — 10^{18}) 随机核酸库, 随机库在特定缓冲体系下与靶分子温育; (2) 通过特定分离方法如离心法、滤膜法、磁珠法、毛细管电泳法、柱层析等实现与靶分子结合的核酸序列和非结合的核酸序列间的分离; (3) 对分离出的结合核酸序列进行反筛选, 进一步排除掉非特异性结合的核酸序列; (4) 对获得的特异性结合的核酸序列进行 PCR 扩增, 形成次一级核酸库, 利用生成的次一级核酸库重复步骤 (2) 和 (3), 直到获得核酸文库对靶分子的解离常数达到目标值; (5) 对所获得的核酸序列进行克隆测序, 鉴定测定序列与其靶分子结合的特异性和亲合力。表 1 总结了目前已报道的核酸适体靶标。

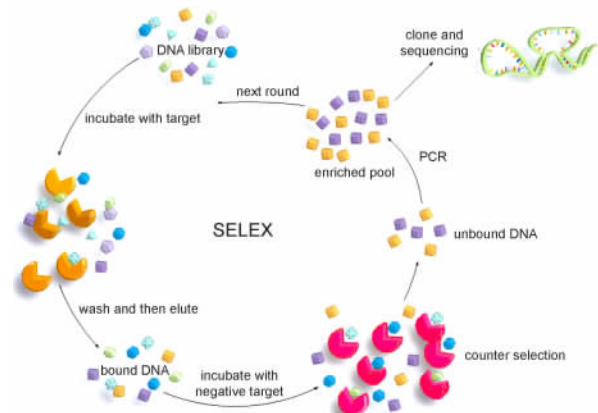


图 1 传统 SELEX 技术流程图^[5]

Fig. 1 In vitro selection of target-specific aptamers using SELEX technology^[5]

表 1 文献报道的核酸适体靶标^[76]Table 1 Literature reported DNA aptamer targets^[76]

analyte type	example and ref
metal ions	K(I) ^[6] , Hg(II) ^[7] , Pb(II) ^[8,9] , UO ₂ (II) ^[10] , Cu(II) ^[11] , Zn(II) ^[12,13]
organic dyes	reactive green 19 ^[14] , sulforhodamine B ^[15]
amino acids	L-arginine ^[16] , L-tyrosinamide ^[17] , L-citrulline ^[18] , L-valine ^[19] , L-histidine ^[20]
nucleotides and derivatives	ATP (or adenosine, AMP) ^[21] , xanthine ^[22] , cAMP ^[23]
RNA	TAR-RNA ^[24] , yeast phenylalanine tRNA ^[25] , <i>E. coli</i> 5S RNA ^[26]
biological cofactors	<i>N</i> -methylmesoporphyrin IX (NMM) or hemin ^[27] , cyanocobalamin ^[28] , riboflavin ^[29] , FMN ^[30] , <i>S</i> -adenosyl methionine ^[31] , <i>S</i> -adenosyl homocysteine ^[32] , biotin ^[33]
small organic molecules	cocaine ^[34] , cholic acid ^[35] , aspartame ^[36] , <i>R</i> -thalidomide ^[37] , 17 β -estradiol ^[38] , ethanolamine ^[39] , theophylline ^[40] , malachite green ^[41] , ricin toxin ^[42] , 4,4'-methylenedianiline ^[43] , dopamine ^[44]
oligosaccharides	cellobiose ^[45] , sialyllactose ^[46] , sialyl Lewis X ^[47] , chitin ^[48] , sephadex ^[49]
peptides	vasopressin ^[50] , RGD ^[51] , neuropeptide Y ^[52]
toxins	ricin ^[42] , abrin toxin ^[53]
enzymes	human thrombin ^[54] , neutrophil elastase ^[55] , taq DNA polymerase ^[56] , HIV-1 RNase H ^[57] , protein kinase C- δ ^[58] , HIV-1 reverse transcriptase ^[59]
growth factors	platelet-derived growth factor B-chain ^[60] , human basic fibroblast growth factor ^[61]
transcription factors	NF- κ B ^[62]
antibodies	human IgE ^[63] , kanamycin A ^[64] , streptomycin ^[65] , chloramphenicol ^[66] , neomycin ^[67]
viral proteins or components	influenza virus surface glycoproteins ^[68] , HIV MN envelope glycoprotein ^[69]
cells and bacteria	anthrax spores ^[70] , YPEN-1 endothelial ^[71] , PC12 cells ^[72] , Jurkat T leukemia cells ^[73] , CCRF-CEM leukemia cells ^[4] , small-cell lung cancer (SCLC) cells ^[74] , B-cell tumor cells ^[75]

2.2 改进型筛选方法

通常,为了获得具有高度亲和力与特异性的核酸适体,必须进行多轮筛选(一般为8—15轮)耗时耗力。为了实现筛选流程的自动化和快速化,近年来发展了多种新型 SELEX 筛选方法,如 CE-SELEX, automated-SELEX, tailored-SELEX, photo-SELEX, microfluidic-SELEX 和 FACS-SELEX 等。这些方法的建立,极大地提高了筛选效率,拓展了核酸适体的应用范围。

2.2.1 CE-SELEX

毛细管电泳技术(CE)的应用对于提高 SELEX 的筛选效率,特别是以蛋白为靶物质的筛选具有重要意义^[77]。因为毛细管电泳能从未结合的 DNA 文库中快速、高效地分离出靶分子-核酸适体复合物,因此将筛选过程大大简化,仅需要 2—4 轮^[52,77—78],而解离常数能达到 nM 甚至 180 pM^[59]。Mendonsa 等^[77]根据核酸配基与靶分子结合后构象和质量发生改变并导致其电泳行为显著变化的特性,利用毛细管电泳成功实现了结合配基与游离配基的有效分离。此外,平衡毛细管电泳(ECEEM)技术可用于有效筛选核酸适体,并测定其动力学和热力学常数。Drabovich 等^[79]最先将 ECEEM 应用于单链 DNA 核酸适体的筛选。利用不同亲和力的核酸适体迁移率不同并且可以预测的特性,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

核酸适体。但是 CE-SELEX 技术的一个主要缺陷是注射进样体积小(nl级),限制了初始库 DNA 的数量,因此与传统 SELEX 相比一般只有 10¹³ 个 DNA 分子数量的文库用于筛选^[59]。

2.2.2 Automated-SELEX

Cox 等^[80]于 1998 年基于 Beckmann Biomek 2000 Pipetting 系统创建了第一个自动化筛选工作站,并成功获得了溶菌酶的核酸适体^[81]。此方法使筛选过程所需时间由数周缩短至几天。但由于上述自动化筛选需要独立纯化的蛋白质作为靶标,限制了其应用。对此 2002 年 Cox 等^[82]又做了进一步改进,将蛋白质的基因体外转录与翻译过程整合到工作站中,这将进一步加速对以蛋白质为靶分子的核酸适体的筛选并扩大适体在蛋白质组学分析中的应用。2005 年, Eulberg 等^[83]建立了半自动筛选平台,筛选出 P 物质的 RNA 适体。该系统基于 RoboAmp 4200 E 并整合了超滤装置、荧光检测器、半定量 PCR 仪等设备,实现了在线监测与靶分子结合的核酸量,并且可满足在不同缓冲液和试剂以及其他严格筛选条件下的筛选要求。这些自动化平台的出现为核酸适体的高通量筛选铺平了道路。

2.2.3 Tailored-SELEX

为了把体外筛选出来的核酸适体应用于临床,需要提高其在生物体液中的稳定性,并且降低生产成本。目前已有的筛选前修饰(pre-SELEX

modifications)、筛选后修饰 (post-SELEX modifications)、镜像筛选 (spiegelmers) 等技术,虽然提高了核酸适体抗核酸酶的稳定性,但是所获得的修饰适体都只能通过化学合成的方法合成。由于标准的化学合成法只能保证 60 个碱基以内的核酸序列有较高的产率,序列越长产率会越低,成本也会相应增高。因此常规 SELEX 的 60—90 个碱基的适体需要进行合理的剪切才能应用于生物系统的检测。两端的固定序列虽然方便 PCR 扩增,但常常也参与了适体与靶分子的结合,因而限制了适体的优化剪切。2003 年, Vatter 等^[84]建立的加尾筛选技术解决了这一问题。该技术能够快速、直接地获得与靶分子结合的 RNA 序列,而无需进一步的剪切实验。其基本原理是首先构建两端各含有 4nt 和 6nt 固定序列的随机文库,固定序列用于与接头序列连接搭桥。同时合成文库两端的连接序列,含有 T7 启动子序列以及可用碱裂解的碱基。合成的接头序列,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。加尾筛选与传统筛选相比多了引物连接与 PCR 扩增后碱裂解除去引物两个步骤,进入下一轮循环的仍为短固定序列的寡核苷酸库。加尾筛选能够筛选出既简短、亲和力又很高的核酸适体,而且可以应用于自动化筛选体系中。

2.2.4 Photo-SELEX

Jensen 等^[85]利用光交联筛选技术筛选获得了特异性靶向 HIV-1 的 Rev 蛋白的 RNA 适体。他们把随机 RNA 核酸库中的尿嘧啶用其类似物 5-iodouracil (5-IU) 取代,当有靶蛋白存在时,用单色紫外光照射,5-IU 即与靶蛋白产生局部特异性的共价交联,使 RNA 与靶蛋白形成稳定的复合物。交联复合物可以通过变性 PAGE 胶与游离的 RNA 进行分离。这种方法利用比亲合作用更牢固的共价键进行筛选,因此所获得的适体也将具有更高的选择性。此方法可以进一步应用于研究核酸适体与靶蛋白的相互作用。

2.2.5 Microfluidic-SELEX

Soh 等^[86]通过整合磁性微珠筛选与微流控芯片技术发展了一种快速、高效、广泛且自动化的核酸适体筛选平台,即 microfluidic-SELEX 或 M-SELEX (见图 2)。这种基于微流控芯片的 SELEX 技术利用微尺度的一些独特优势来提高筛选效率:一方面在微通道内植入铁磁结构,能够可逆地形成高强度的局域磁场梯度,从而自动、精确地操控大量的微球;另一方面通过层流流体构筑的微通道装置将分

子扩散对分离纯度的负面效应降到最低,最终仅用一轮就筛选出特异性针对 BoNT/A-rLc 的核酸适体,解离常数 K_d 为 33 ± 8 nM。为了进一步提高微流控芯片筛选的分离效率和操作可控性,Soh 等^[87]又发展了一种操作更为简易的微流控芯片装置,无需借助显微镜进行调试与优化,能够有效地避免微气泡的产生,且允许更高的流速,这些细节上的改进都使得微流控筛选技术日趋成熟。采用这种方法,Soh 等通过 3 轮正向筛选就获得了 streptavidin 的 DNA 核酸适体序列,并且通过 1 轮对 BSA 的反向筛选进一步增强了核酸适体对 streptavidin 的亲合力,解离常数达到 (33 ± 5) nM。此方法首次提出将微流控技术应用于核酸适体的筛选,不仅实现了高效、快速、自动化筛选的目标,而且对微型化与集成化筛选平台的发展有重要的指导意义。

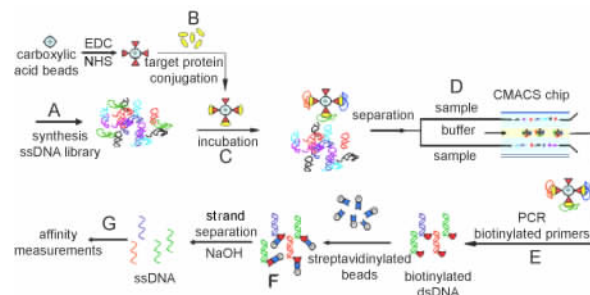


图 2 基于微流控芯片的核酸适体微磁场筛选流程图^[86]

Fig. 2 Overview of the M-SELEX process. (A) initial ssDNA library; (B) target protein (BoNT/A-rLc)-conjugated magnetic beads; (C) incubation; (D) separation in the CMACS device; (E & F) amplification via PCR and single-stranded products generated; (G) measurement of binding kinetics^[86]

2.2.6 FACS-SELEX

如何将特异性结合到靶物质上的核酸序列与未结合序列有效分离是体外筛选过程中最关键的步骤。目前 cell-SELEX 操作中通常采用离心法进行分离,但离心过程可能破坏细胞,而且无法区分活细胞与死细胞结合上的差别。因此, Mayer 等^[88]发展了 FACS (fluorescence-activated cell sorting) SELEX 以实现靶向特定细胞亚群的核酸适体的高效、快速筛选 (见图 3)。具体方法是在包含活细胞和死细胞的混合液与核酸库孵育之后,采用流式细胞仪分选,获得特异针对活细胞表型的核酸序列,然后经 PCR 放大与单链化操作形成次一级筛选库,最终经过 10 轮筛选获得高亲和力的核酸适体。该方法通过核酸

序列与特定细胞表型联合筛选获得特异性的核酸适体,而不是单纯依靠核酸序列与靶分子之间的亲合性,为从直接取自体液或一级组织的复杂细胞样本中筛选靶向特定亚型细胞的核酸适体铺平了道路。

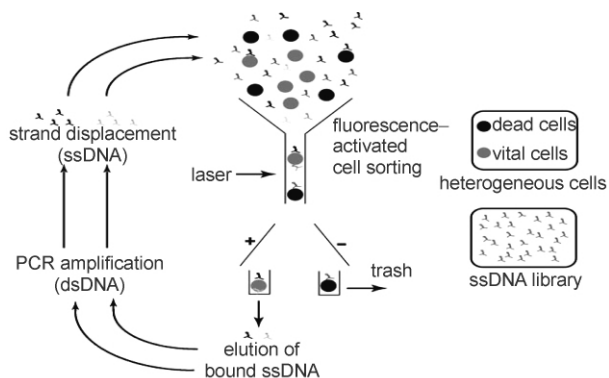


图 3 基于 FACS 的体外筛选流程图^[88]

Fig. 3 Fluorescence-activated cell sorting FACS-SELEX scheme. Composite cell mixtures, which comprise dead cells with reduced membrane integrity and vital cells, are incubated with an ssDNA library. FACS sorts the dead cells from the vital cells and thereby selects bound nucleic acids associated with the vital-cell phenotype. The selected nucleic acids can be amplified by PCR, and the resulting ssDNA library serves as a starting library for the next selection cycle^[88]

2.3 基于修饰核苷酸的筛选

DNA 或 RNA 结构在筛选过程中易受到酶降解作用的影响而失去活性,对核苷酸单体进行各种化学修饰不仅能够提高核酸适体筛选过程中抗酶解的稳定性,而且具有无毒副作用等优点。

早期常采用 2'-氟代嘧啶和 2'-羟基嘌呤组合的方式提高核酸适体的抗酶解能力,最典型的例子是筛选获得了第一个通过美国 FDA 批准上市的核酸适体药物 Macugen^[89]。Macugen 是一段抗血管内皮细胞生长因子核酸适体,用于治疗湿性老年性黄斑变性(wet AMD)。该适体序列中 12 个 2'-羟基嘌呤碱基被替换成 2'-氧代嘌呤,从而增强了抗酶解能力和化学稳定性^[90]。另一种核酸适体药物 RB006 含有 2'-氟代嘧啶碱基,是一种新型抗凝剂,能特异性结合并抑制 IXa 因子^[91,92]。RB006 与其互补核苷酸解毒剂(RB007)组成的 REG1 抗凝系统目前已经进入 II 期临床^[93]。

发展化学稳定性高、天然存在且能抗酶解的核苷酸已经成为筛选领域越来越重要的目标。2'-氧代甲基是后转录过程中常见的修饰基团,一个核糖体中存在着超过 100 个 2'-氧代甲基核苷酸^[94]。2'-

氧代甲基核苷酸不仅能够在 SELEX 筛选后提高核酸适体稳定性,而且相比 2'-氟代核苷酸合成费用低廉,更适于大规模生产合成。Burmeister 等^[95]利用包括 2'-羟基嘌呤、2'-氧代甲基嘧啶等在内的各种化学修饰碱基组成的文库进行 VEGF₁₆₅ 筛选,获得由 23 个 2'-氧代甲基核苷酸组成的核酸适体序列(ARC245),解离常数达到 2 nM。细胞实验显示 ARC245 适体能够有效抑制 VEGF₁₆₅ 受体的结合,在体外血清中可稳定存在长达 48h 而不发生降解。Burmeister 等^[96]又报道了利用 2'-脱氧嘌呤和 2'-氧代甲基嘧啶组成的 DNA 文库筛选获得能同时结合凝血酶和 IL-23 的核酸适体序列。与全部由 2'-氧代甲基核苷酸组成的抗 VEGF₁₆₅ 核酸适体类似,由 2'-脱氧嘌呤和 2'-氧代甲基嘧啶(dRmY)组成的抗 IL-23 核酸适体能够高亲合性地结合靶分子,解离常数达到 8 nM。体外试验也证实其能有效抑制靶分子的活性。

3 基于核酸适体的生物医学诊断

目前能用抗原抗体反应进行诊断的技术几乎都可以用核酸适体替代,结合其分子识别功能和特殊的信号传导机制,核酸适体在基础研究、药物研制和生物医学诊断等领域发挥着越来越重要的作用。

3.1 离子、小分子检测

核酸适体与不同的信号传导机制结合,如荧光共振能量转移、电致发光以及比色法等,可以直接用于无机离子和小分子的快速检测。Leclerc 等^[97,98]设计了一种带正电荷的共轭高分子(CCP)作为核酸适体传感器的荧光标记基团实现对碱金属离子的快速检测(见图 4A)。其原理是,没有 K⁺ 存在时,核酸适体与高分子链形成的刚性双螺旋结构使荧光信号发生猝灭;加入 K⁺ 后, K⁺ 与核酸适体特异性结合释放出的高分子链使荧光信号重新恢复(见图 4B),检测限达到 10 pM。他们还将此原理用于凝血酶的检测,用 Cy3 染料标记凝血酶核酸适体,利用荧光能量共振转移实现信号放大。该方法的检测下限是 62 pM。另外,由于核酸适体被固定在玻璃载体表面,所以只需要 0.4 μl 样品,相比普通溶液法所需的样品量(200 μl)能检测的分子数量降低了 2 个数量级。Wang 等^[99]发展了另一种利用 CCP 链对 K⁺ 进行检测的方法(见图 4C)。基本原理是 K⁺ 的加入使标记有荧光素的核酸适体折叠成紧密的四聚体结构,因为该结构具有更高的电荷密度而更接近 CCP 链,从而产生更高的荧光共振能量转移信号(见图

4D)。Huang 等^[100]利用另一种染料 OliGreen 作为信号传导器,OliGreen 可以与单链 DNA 结合而使荧光强度增强 1 000 倍。向 OliGreen 与富含 G 碱基的核酸序列混合体系中加入 K^+ 时,DNA 序列会折叠成一个四聚体结构,从而释放出 OliGreen 并导致荧光强度的减弱。

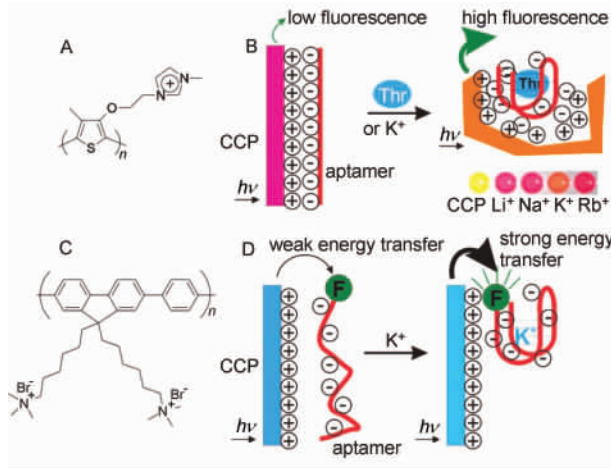


图 4 正电荷共轭高聚物传感器原理示意图^[97-99]

Fig. 4 Sensors based on cationic conjugated polymers (CCPs). (A) Structure of the CCP used in part B. (B) Fluorescent and colorimetric detection of thrombin (Thr) of K^+ . CCP and aptamer are positively and negatively charged, respectively. (C) Structure of the CCP used in part D. (D) Fluorescent detection of K^+ ^[97-99]

ATP 是生命活动能量的直接来源,分析 ATP 体内分布能够显示生命活动的进展情况。为此,Fang 等^[101]发展了一种利用金属配合物 $Ru[(phen)_2(dppz)]^{2+}$ 来检测 ATP 的方法。 $Ru[(phen)_2(dppz)]^{2+}$ 在缓冲溶液中不发光,但当与核酸相互作用时可以发出荧光。利用该原理,Fang 等利用核酸适体实现对 ATP 的定量分析,检测限达到 1 nM。Fang 等^[102]还将此原理应用于其他核酸适体传感器的设计,实现对 IgE、PDGF-BB、thrombin 的检测,检测灵敏度分别为 0.1、1.0 和 0.01 nM。Zuo 等^[103]设计了一种结构转换的核酸适体传感器,将一段核酸适体固定在电极上,与标记上二茂铁的互补 DNA 杂交形成双链,ATP 加入后使核酸适体与目标分子形成稳定的复合物结构,从而使得本来远离电极表面并标记二茂铁的 DNA 解离下来,通过测定电极表面二茂铁的循环伏安信号变化对 ATP 进行定量分析。Fan 等^[104,105]利用金纳米颗粒能够区分单链 DNA 和双链 DNA 差异的性质发展了一种非标记型核酸适体传感器,并用于 ATP 的检测。无 ATP 时,核酸适

体与其互补 DNA 形成双链结构,金纳米颗粒在一定盐浓度条件下呈聚集状态;而当 ATP 存在时,适体与 ATP 结合后释放出的游离单链 DNA 能稳定金纳米颗粒,使金纳米颗粒呈分散状态。该法不需对核酸适体进行标记即可检测 ATP,且可拓展用于其他生物分子的检测。

Stojanovic 等^[106]构建了一种针对可卡因检测的核酸适体传感器,分别在核酸适体的 3' 端和 5' 端标记上荧光基团和猝灭基团,加入可卡因后核酸适体构型发生变化,使荧光基团被靠近的猝灭基团猝灭而实现对可卡因的检测。同时,他们设计了核酸适体的比色探针应用于可卡因的检测。由于核酸适体与 cyanine 染料之间的非特异性结合可被可卡因与核酸适体间的特异性结合取代,因此可通过测定染料分子在特定波长的吸光度变化计算可卡因浓度^[107]。

Fan 等^[108]利用金纳米颗粒聚集程度不同而显示不同颜色的原理实现了对腺苷的可视化检测。具体方法是将金纳米颗粒修饰上两种可同时结合腺苷分子的核酸适体,腺苷与 DNA 片段自组装后使得金纳米颗粒聚集,从而颜色从红色变成蓝紫色(见图 5)。

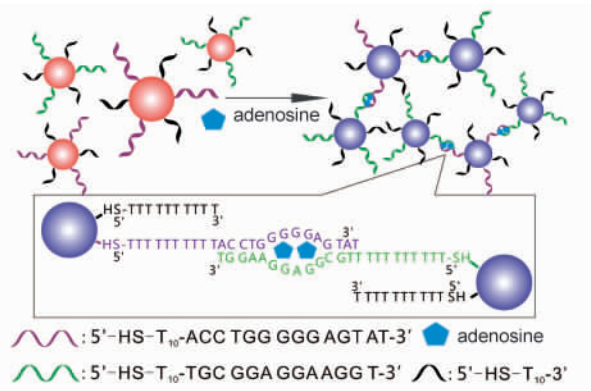


图 5 基于金纳米自组装的腺苷比色检测示意图^[108]

Fig. 5 Target-induced assembly of AuNPs for colorimetric detection of adenosine. The nanoparticles are functionalized with two different DNA molecules through thiol-gold chemistry. The two kinds of nanoparticles are linked by adenosine to form aggregates. In the presence of adenosine, the nanoparticles assemble and turn blue colored^[108]

3.2 生物大分子检测

随着人类基因组计划的完成和功能基因组学、蛋白组学研究的开展,发展蛋白质等生物大分子的实时跟踪检测、高灵敏分析方法成为后基因组学的研究热点。传统的蛋白质检测通常利用抗原-抗体免

疫分析方法,分析结果常受到抗体性质差异的影响。核酸适体可与蛋白质特异性结合,在不同温度、盐浓度、络合剂条件下进行变性与复性研究,因此在蛋白质分析检测上的应用备受关注。

Landegren 等^[109]利用核酸适体可通过 PCR 方法进行扩增的特点,提高了酶联核酸适体诊断方法的检测灵敏度。将两种不同的核酸适体结合到蛋白或蛋白复合体两个接近的结合位点上,两种核酸适体的游离 3'末端和 5'末端通过互补 DNA 链连接,最后通过 PCR 方法进行实时扩增(见图 6)。该方法对靶蛋白的检测限可以达到 400attomoles,与传统的 ELISA 检测方法相比,灵敏度提高了 1 000 倍。

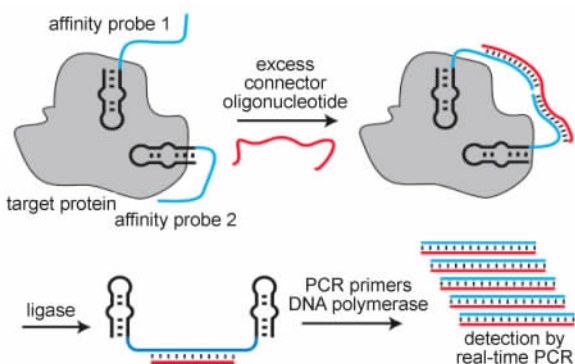


图 6 邻近连接检测法的原理示意图^[109]

Fig. 6 Principle of the proximity ligation assay^[109]

利用荧光光谱的高灵敏度性质,荧光染料标记的核酸适体在蛋白检测中发挥着重要的作用。例如,在流式细胞分析中,Davis 等^[110]用荧光素或藻红蛋白标记特异性结合 CD4 的核酸适体从而选择性地对 CD4⁺ 细胞进行染色。Ringquist 等^[111]利用荧光素标记的 L-选择素核酸适体,实现 CD62L 阳性白细胞的可视化检测。上述研究也提示可以利用核酸适体与细胞表面靶分子的相互作用通过流式细胞术进行靶细胞的特异性分选。此外,还可以用流式细胞仪监测体外筛选实验的进程。Giridharan 等^[112]利用荧光偏振的方法检测 IgE,最低检测限可达 350pM。为复现在复杂生物体系中蛋白的快速检测,Yang 等^[113]设计了一种光转换的核酸适体探针特异性检测血小板衍生生长因子(PDGF)。具体方法是将荧光苝分子标记在 PDGF 核酸适体的 5'末端和 3'末端,一旦 PDGF 与适体相互作用使其两端的苝分子相互靠近,苝分子的荧光发射波长由单体的 400nm 转变为激发态二聚体的 485nm(见图 7)。通过监测荧光信号在 400nm 处的降低和在 485nm 处的增强,复现在细胞体系中对 PDGF 的检测。该方

法的检测下限达到 4pM,线性范围 0—40nM。

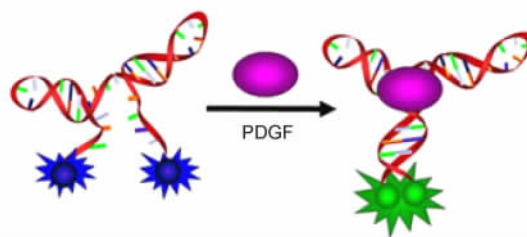


图 7 基于光转换的苝激发态二聚体检测 PDGF 示意图^[113]

Fig. 7 Use of the pyrene excimer to probe PDGF^[113]

纳米粒子由于具有比表面积大等性质,也被应用于核酸适体传感器的设计中。Chang 等^[114]将 2nm 的光致发光金纳米点连接到 PDGF 上,同时在 PDGF 核酸适体上修饰 13nm 金纳米颗粒。当体系中不存在游离 PDGF 时,两种纳米颗粒由于核酸适体与靶分子的结合而靠近导致光猝灭;然而游离 PDGF 会与连有 2nm 金纳米点的 PDGF 竞争相应的核酸适体,从而减弱光猝灭效应,增强光信号。该方法检测限可达到 80pM。此外,Chang 等^[115]将荧光分子 *N,N*-二甲基-2,7-重氮苝插入到核酸适体中,由于金纳米颗粒的猝灭作用荧光染料不发出荧光;加入的 PDGF 与核酸适体特异性结合并释放出荧光染料,从而导致荧光信号增强,检测限可达 8pM。

Lee 等^[116]将核酸适体修饰到光纤传感器上作为识别分子检测凝血酶。待测的凝血酶溶液加入已经结合核酸适体且标记有荧光素的凝血酶溶液中,通过竞争反应测定凝血酶的浓度。这种光纤生物传感器不仅具有检测限低的优势(1nM),而且操作步骤简便快速,整个测量时间仅需 15min。He 等^[117]将纳米金颗粒表面修饰上一种凝血酶核酸适体,将另一种核酸适体固定在磁性纳米颗粒上。当两种核酸适配体与凝血酶蛋白结合形成磁性颗粒/凝血酶/纳米金胶的三明治结构时,通过磁性分离后检测电极表面纳米金胶电化学信号的变化,实现对凝血酶

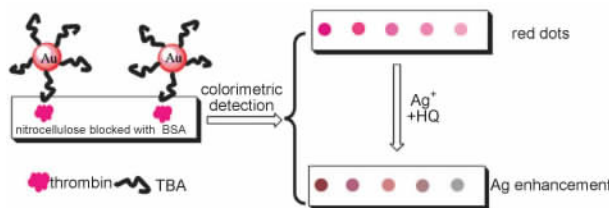


图 8 基于斑点印迹法对蛋白的可视化检测^[118]

Fig. 8 Description of colorimetric detection of protein by aptamer-AuNPs conjugates based on a dot-blot assay^[118]

的检测。Wang 等^[118]利用斑点印迹法在金纳米颗粒上修饰凝血酶的核酸适体,实现了对凝血酶快速超灵敏比色检测(见图 8)。

上述研究结果表明,核酸适体在发展各种可取代抗体的蛋白靶向探针、测定体内蛋白质含量和研究蛋白质的功能、疾病的早期诊断等方面具有巨大的应用潜力。

3.3 肿瘤细胞鉴别、分析

从分子水平实现早期癌细胞的准确检测具有重要的意义,因此设计和发展特异性分子探针成为癌细胞早期检测的关键。Charlton 等^[122]用^{99m}Tc 标记靶向人类中性粒细胞弹性蛋白酶的核酸适体并在小鼠体内进行病变组织成像,与临床经常使用的抗弹性蛋白酶 IgG 抗体相比,核酸适体具有更高的信噪比。此外,标记有^{99m}Tc 的核酸适体可以特异性结合肌腱蛋白,该分子是乳腺癌、胶质母细胞瘤、肺癌和结肠癌等多种肿瘤的标志物(见图 9)^[123]。Korgel 等^[126]利用生物素-亲和素作用将前列腺特异性膜抗原(PSMA)的核酸适体连接到具有近红外发光性能的 CdTe 量子点上,特异性地检测前列腺癌细胞,为核酸适体应用于活细胞及生物体内的分子检测提供了新思路。

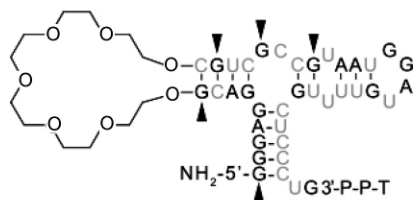


图 9 肌腱蛋白核酸适体的修饰及其二级结构^[123]

Fig. 9 Secondary structure and modification of the 39-mer tenascin aptamer^[123]

纳米材料具有特殊的光学、电学和磁学等性质,与核酸适体相结合后可显著提高检测灵敏度,具有重要的应用价值。Tan 等^[124,125]将纳米粒子连接到核酸适体上,借助纳米粒子高比表面积的性质同时与多个核酸适体结合增强信号以达到较高的检测灵敏度。他们将 80 个荧光标记的 *sgc8* 核酸适体结合到 12nm × 56nm 的 Au-Ag 纳米棒上,使得核酸适体的亲和力提高了 26 倍,荧光强度提高了 300 倍。此外,由于肿瘤细胞可使自组装的金纳米-核酸适体颗粒相互靠近,由此产生的表面等离子体共振效应使体系的颜色发生改变。只要体系中含有 1 000 个肿瘤细胞,就可以产生比色变化并被肉眼识别。利用吸收光谱测定时,检测灵敏度更可提高到 90 个肿瘤

细胞。

在癌症早期检测中,从病人血液或唾液等收集到的恶性肿瘤细胞含量通常较低,因此发展一类从低含量液体中富集并检测肿瘤细胞的方法成为癌症早期诊断的关键。Tan 等^[127]利用新型双功能纳米粒子应用于白血病细胞的快速富集与检测。采用一种修饰有核酸适体的磁性纳米粒子进行靶细胞的萃取和富集,另一种掺杂有荧光染料的纳米粒子加入到待检测体系中实现信号放大。氧化铁掺杂的二氧化硅纳米粒子具有尺寸小、比表面积大等性质,相比普通微米尺寸粒子具备更强的萃取能力,因此比较基于免疫表型或 PCR 等复杂、费时的检测技术,该方法只需 1h 即可完成分析。同时,该方法不仅能够从全血样本中重复萃取获得靶细胞,更重要的是,能应用于多种癌细胞的同时收集和检测。

此外,Tan 等^[128]将微流控芯片技术与核酸适体相结合,用经过核酸适体修饰的微流控芯片装置从大量背景细胞中分选、捕捉靶细胞。由于微流控装置所需样品用量少、通量高、检测快速等优点,所以非常适合作为廉价、快速的生物医学检测平台。尽管抗体修饰的微流控装置已经被用于癌症细胞的富集,但是核酸适体相比于抗体更适合用于微流控芯片的固定、修饰,因为 DNA 修饰的微流控装置不仅能够保存更长的时间,而且适合临床简便、快速使用。例如,通过将 *sgc8* 共价修饰到表面微结构是 PDMS 的微流控装置上,Tan 等获得了超过 80% 捕获效率和 97% 纯度的靶细胞 CEM 细胞。实验还发现,通过减小微流控装置通道深度,以及利用脉冲式细胞溶液流动替代使用恒定流速溶液能进一步提高癌细胞的捕获效率。因此,基于核酸适体的微流控富集装置将成为癌症早期诊断的快速、经济工具。

3.4 肿瘤标志物的甄选

癌症的临床诊断目前仍主要基于影像学检查组织和细胞的形态,存在分辨率较低,难以实现癌症的早期诊断等问题。特异性检测恶性肿瘤相关基因和生物标志物是实现癌症早期诊断的一个最有效方法。然而,尽管肿瘤标志物在 1978 年就用于癌症的临床实验诊断,但目前肿瘤标志物种类少,特异性和灵敏度不够,且不足以阐明各种恶性肿瘤发生发展的分子机制,无法确切地用于癌症的早期诊断。基于抗体的蛋白芯片虽已被尝试用来寻找与恶性肿瘤相关的蛋白质标志物,但由于恶性肿瘤的复杂性,以及抗体制备和应用上的局限性而效果甚微。因此,寻找一种可直接获得癌变组织、细胞的特征分子指

纹 高效发现癌症发生、发展过程中的生物标志物,并实现这些生物标志物特异灵敏检测,对于癌症的早期诊断和治疗具有非常重要的科学意义和临床价值。Tan 研究小组^[153]提出了基于细胞的 SELEX 并用于发现肿瘤标志物。与传统抗体发现方法如噬菌体展示肽库技术相比,细胞 SELEX 的一个优点是在不用事先了解特异性标记物的前提下发现可以和肿瘤干细胞结合的特异性适体,从而可直接用于各种基础和应用研究。更重要的一点是,人们可以利用这些特异性核酸适体对其所结合的细胞表面特征靶点进行表征、鉴定,为发现肿瘤干细胞的特征标记物提供一个捷径。本节将论述如何利用基于细胞 SELEX 筛选获得的分子探针特异性结合肿瘤标志物的过程。

利用 SELEX 技术进行靶向肿瘤标志物(主要是膜蛋白)的鉴别^[119]主要包括下列步骤(见图 10): (1) 利用疾病细胞作为靶细胞,正常细胞作为参照细胞筛选核酸适体;(2) 从靶细胞中获取结合有核酸适体的细胞裂解液;(3) 从溶解蛋白中分离出膜蛋白部分;(4) 萃取核酸适体-蛋白复合物;(5) 通过 SDS-PAGE 分离靶蛋白;(6) 质谱测序;(7) 鉴定靶蛋白。Tan 等^[119]通过细胞筛选获得了能与人急性淋巴细胞白血病 T 细胞(CCRF-CEM)相结合的核酸适体 sgc8。利用生物素标记的核酸适体 sgc8,与靶物质结合形成复合物后能通过链霉亲和素修饰的磁性微珠萃取获得。通过与随机 DNA 作对照,利用 sgc8 捕获的特征蛋白质消化并用 LC-MS/MS 分析后发现跨膜蛋白受体,PTK7(蛋白络氨酸激酶 7)是该核酸适体的靶物质。尽管 PTK7 同时也是结肠癌激酶-4(CCK-4)并在多种肿瘤细胞中过量表达,但是其确切功能目前尚不清楚。上述结果首次证实 PTK7 的过量表达与 T-ALL 细胞之间存在关联。

利用同样的细胞筛选方法,Tan 等^[120]筛选获得能与 Burkitt's 淋巴瘤细胞结合并具有高亲和力的核酸适体 TD05。通过对 TD05 进行化学修饰,例如标记光活化基团,进一步提高了核酸适体捕获及富集靶受体的效率。TD05 不仅能特异性地识别在 Burkitt's 淋巴瘤细胞中表达的免疫球蛋白 Mu 重链^[121],而且免疫球蛋白 Mu 重链在 B-淋巴细胞发育早期的表达水平与 Burkitt's 淋巴瘤密切相关。因此,核酸适体有效地应用于甄别肿瘤细胞异常表达的细胞膜受体。通过发展基于细胞 SELEX 筛选获得的高质量核酸适体探针识别靶蛋白,进而甄别、发现与肿瘤细胞相关的潜在标志物具有重要的临床应

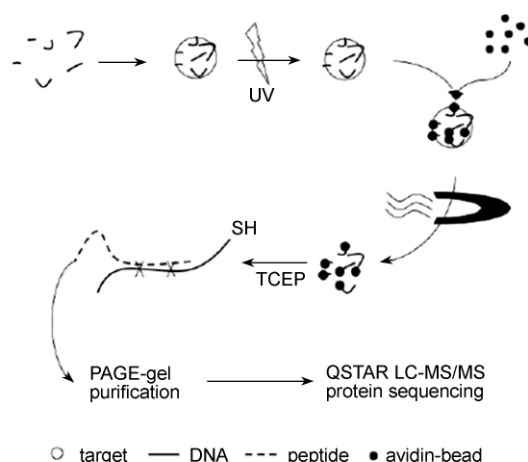


图 10 基于核酸适体的肿瘤标志物鉴别^[119]

Fig. 10 Aptamer-based biomarker discovery^[119]

用价值和意义。

4 基于核酸适体的靶向治疗

分子水平靶向治疗的目标是使癌症治疗更加高效、低毒和无副作用。基于 cell-SELEX 筛选获得的核酸适体具有比抗体更好的化学性质,能够与蛋白特异性结合并且可逆地影响蛋白功能,且不会引起体内免疫原反应,渗透性好,有望成为新的靶向治疗手段。

由于大部分核酸适体不能被细胞有效吸收,为了实现细胞内的靶向分子运输,发展高效的核酸适体载体系统成为该领域研究的关键问题。Tan 等^[129]观察了 CEM 细胞核酸适体 sgc8 的内化过程,发现内化的核酸适体能与铁传递蛋白的内涵体共存,表明该核酸适体能够定向地进入靶向细胞,而且没有细胞毒性。

将抗癌药物和靶向癌细胞表面分子的核酸适体、抗体等偶联,可将药物特异性输送到癌灶,不仅可以提高化疗效能,而且可以降低药物毒性。将易被生物降解的高分子与抗 PMSA RNA 核酸适体形成的 docetaxel 胶囊化纳米粒子应用于动物模型,结果表明不仅能够显著提高药物的效能,而且降低了毒性^[130]。Tan 等^[131]将 doxorubicin 与 DNA 核酸适体 sgc8c 共价连接后,sgc8c 显示出高亲和力以及被靶向细胞的内涵体高度内化的能力(见图 11)。由于特殊的共价连接方法,sgc8c-doxorubicin 复合体可以在酸性的内涵体环境中解离。细胞稳定性测试证明 sgc8c-doxorubicin 结合体的药效与 doxorubicin 相同,而且具有特异性分子识别能力。

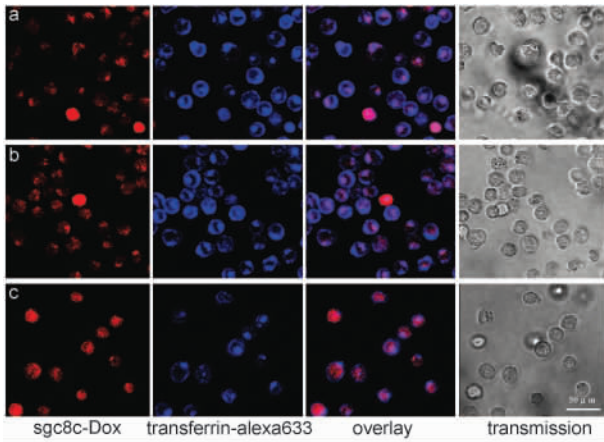


图 11 与 CCRF-CEM 细胞孵育 (a) 30 min, (b) 1 h, and (c) 2 h 后, sgc8c-Dox 复合体在细胞内的分布图^[131]

Fig. 11 Distribution of sgc8c-Dox conjugates inside CCRF-CEM cells after incubation with cells for (a) 30 min, (b) 1 h, and (c) 2 h, respectively^[131]

核酸适体直接作为药物在疾病的治疗中发挥着越来越重要的作用。以往研究^[132-142]曾经报道过核酸适体在治疗方面的应用,以及作为治疗试剂直接应用于模型体系中^[143-147]。因为核酸适体在生物体内容易被核酸酶降解,或因分子量太小而被机体清除,故需对其进行各种修饰以适应作为治疗用药的要求。Alexander 等^[93]对之前报道的抗血管内皮生长因子核酸适体进行了 2'-氟代和 2'-氧代甲基化学修饰。其中 2'-氧代甲基修饰使得 VEGF 核酸适体的亲和力提高了 17 倍,大大增加了脱氧胸苷的稳定性。聚乙二醇化延长了核酸适体在体内的半衰期,从而减少了给药剂量^[148](见图 12)。

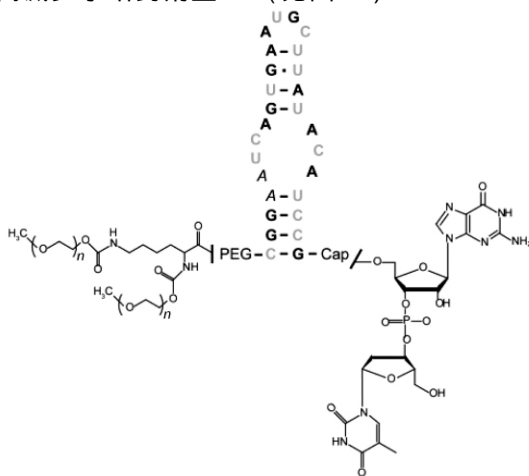


图 12 抗血管内皮生长因子核酸适体 (pegaptanib) 的修饰及二级结构示意图^[148]

Fig. 12 Secondary structure and modifications of the anti-VEGF aptamer pegaptanib (macugen)^[148]

近年来,利用光敏剂产生的活性氧自由基来杀死病变细胞的光动力学治疗受到了人们越来越多的关注^[149,150]。Tan 等^[151]将特异性识别 Burkitt 淋巴瘤细胞的核酸适体 TD05 化学连接到高效的光敏剂 Ce6 上,使光敏剂更加准确地滞留于病变部位,提高了光化学治疗的靶向性(见图 13)。Huang 等^[152]将特异性针对肿瘤细胞的核酸适体修饰到 Au-Ag 纳米棒表面作为光热治疗剂,通过激光照射导致纳米棒温度升高从而杀死癌细胞。该方法仅能高选择性地杀死目标肿瘤细胞(93%),对其他正常细胞基本不产生影响,正常细胞存活率达到 87%。上述利用核酸适体进行光热治疗的技术为今后体内靶向治疗肿瘤提供了新途径。

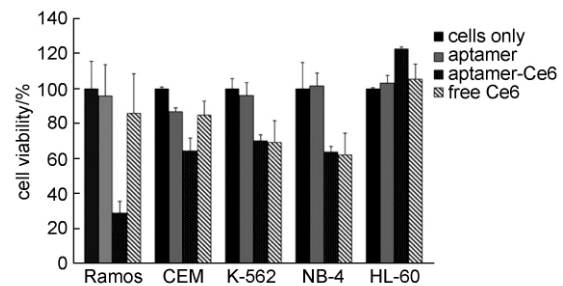


图 13 TD05-Ce6 细胞毒性分析示意图^[151]

Fig. 13 Cell toxicity assay results for Ramos cells (P < 0.05) after 30 min incubation, followed by irradiation of light for 4 h and subsequent growth for 36 h^[151]

5 结论与展望

SELEX 技术自问世以来,在筛选技术上不断丰富和完善,应用领域不断拓展。通过筛选获得的核酸适体在生物医学研究中蕴藏着巨大的价值,而且部分产品已经通过 FDA 批准上市。目前,核酸适体已经成为化学生物学、生物医学、治疗试剂研制及药物筛选等研究的有效工具。但是核酸适体与其他药物治疗方法相比仍然存在不足之处,例如核酸适体制备成本相对较高;核酸适体虽能很好地与靶序列结合,但它自身很难接近和穿透靶组织。

总体而言,SELEX 技术筛选获得了能特异性识别重要离子、小分子、生物大分子、肿瘤细胞及其标志物的核酸适体,这些核酸适体被广泛地应用于生物医学检测、疾病标志物发现以及靶向治疗。例如,利用核酸适体对癌症病人样本进行染色,通过流式细胞计数等方法实现对癌症的快速诊断。此外,凡是涉及抗体的诊断领域,几乎都可以用核酸适体替代,特别是可以弥补抗体在诊断领域应用中的不足。

SELEX 技术筛选到的核酸适体能特异地与在疾病发生发展中起重要作用的靶分子结合,阻断或封闭靶分子的功能,从而达到治疗疾病的目的。除此之外,通过现代生物技术和分析化学手段,将核酸适体整合到微流控芯片装置和纳米生物传感器上不仅可以实现疾病的早期诊断,而且特异性针对癌细胞的核酸适体作为靶向治疗药物,一方面能够降低药物本身的毒性,另一方面还能够提高治疗的有效性。同时,数量众多的特异性核酸适体的发现为个性化治疗提供了可靠的保证。总之,核酸适体及其筛选技术的不断进步,有助于人们进一步了解和认识分子间相互作用、癌症发病的分子生物学机制,促进了新兴检测、诊断和治疗技术的发展。

致谢 感谢厦门市科学技术局项目(No. 3502Z20072003, 3502Z20092008 和 3502Z20092009)资助

参 考 文 献

- [1] Tuerk C, Gold L. *Science*, 1990, 249: 505—510
- [2] Ellington A D, Szostak J W. *Nature*, 1990, 346: 818—822
- [3] Hermann T, Patel D J. *Science*, 2000, 287: 820—825
- [4] Shangguan D H, Tang Z W, Mallikaratchy P, Xiao Z Y, Tan W H. *ChemBioChem*, 2007, 8: 603—606
- [5] Kim Y M, Liu C, Tan W H. *Biomarkers Med.*, 2009, 3: 193—202
- [6] Ueyama H, Takagi M, Takenaka S. *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, 124: 14286—14287
- [7] Miyake Y, Togashi H, Tashiro M, Yamaguchi H, Oda S, Kudo M, Tanaka Y, Kondo Y, Fujimoto R S T, Machinami T, Ono A. *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128: 2172—2173
- [8] Santoro S W, Joyce G F. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1997, 94: 4262—4266
- [9] Brown A K, Li J, Pavot C M B, Lu Y. *Biochemistry*, 2003, 42 (23): 7152—7161
- [10] Liu J, Brown A K, Meng X, Cropek D M, Istok J D, Watson D B, Lu Y. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2007, 104, 7: 2056—2061
- [11] Carmi N, Balkhi H R, Breaker R R. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1998, 95(5): 2233—2237
- [12] Rajendran M, Ellington A D. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, 390(4): 1067—1075
- [13] Santoro S W, Joyce G F, Sakthivel K, Gramatikova S, Barbas C F. *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122: 2433—2439
- [14] Ellington A D, Szostak J W. *Nature*, 1992, 355 (6363): 850—852
- [15] Wilson C, Szostak J W. *Chem. Biol.*, 1998, 5(11): 609—617
- [16] Harada K, Frankel A D. *EMBO J.*, 1995, 14 (23): 5798—5811
- [17] Vianini E, Palumbo M, Gatto B. *Bioorg. Med. Chem.*, 2001, 9(10): 2543—2548
- [18] Famulok M. *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, 116: 1698—1706
- [19] Majerfeld I, Yarus M. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 1994, 1: 287—292
- [20] Majerfeld I, Puthenvedu D, Yarus M. *J. Mol. Evol.*, 2005, 61: 226—235
- [21] Huizenga D E, Szostak J W. *Biochemistry*, 1995, 34 (2): 656—665
- [22] Kiga D, Futamura Y, Sakamoto K, Yokoyama S. *Nucleic Acids Res.*, 1998, 26: 1755—1760
- [23] Koizumi M, Breaker R R. *Biochemistry*, 2000, 39: 8983—8992
- [24] Boiziau C, Dausse E, Yurchenko L, Toulme J J. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274(18): 12730—12737
- [25] Scarabino D, Crisari A, Lorenzini S, Williams K, Tocchini-Valentini G P. *EMBO J.*, 1999, 18: 4571—4578
- [26] Ko J, Lee Y, Park I, Cho B. *FEBS Lett.*, 2001, 508: 300—304
- [27] Li Y F, Geyer C R, Sen D. *Biochemistry*, 1996, 35 (21): 6911—6922
- [28] Lorsch J R, Szostak J W. *Biochemistry*, 1994, 33: 973—982
- [29] Lauhon C T, Szostak J W. *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, 117: 1246—1257
- [30] Burgstaller P, Famulok M. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1994, 106: 1163—1166
- [31] Burke D H, Gold L. *Nucleic Acids Res.*, 1997, 25: 2020—2024
- [32] Gebhardt K, Shokraei A, Babaie E, Lindqvist B H. *Biochemistry*, 2000, 39: 7255—7265
- [33] Wilson C, Nix J, Szostak J. *Biochemistry*, 1998, 37: 14410—14419
- [34] Stojanovic M N, de Prada P, Landry D W. *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122(46): 11547—12548
- [35] Kato T, Takemura T, Yano K, Ikebukuro K, Karube I. *Biochim. Biophys. Acta*, 2000, 1493: 12—18
- [36] Saitoh H, Nakamura A, Kuwahara M, Ozaki H, Sawai H. *Nucleic Acids Res. Suppl.*, 2002, 2: 215—216
- [37] Shoji A, Kuwahara M, Ozaki H, Sawai H. *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129(5): 1456—1464
- [38] Kim Y S, Jung H S, Matsuura T, Lee H Y, Kawai T, Gu M B. *Biosens. Bioelectron.*, 2007, 22(11): 2525—2531
- [39] Mann D, Reinemann C, Stoltenburg R, Strehlitz B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005, 338: 1928—1934
- [40] Jenison R D, Gill S C, Pardi A, Polisky B. *Science*, 1994, 263: 1425—1429
- [41] Grate D, Wilson C. *Bioorg. Med. Chem.*, 2001, 9: 2565—2570
- [43] Brockstedt U, Uzarowska A, Montpetit A, Pfau W, Labuda D. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004, 313: 1004—1008
- [44] Mannironi C, DiNardo A, Fruscoloni P, TocchiniValentini G P. *Biochemistry*, 1997, 36: 9726—9734
- [45] Yang Q, Goldstein I J, Mei H Y, Engelke D R. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1998, 95(10): 5462—5467
- [46] Mehedi M M, Kuwahara M, Ozaki H, Sawai H. *Bioorg. Med. Chem.*, 2004, 12(5): 1111—1120
- [47] Jeong S, Eom T, Kim S, Lee S, Yu J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001, 281: 237—243
- [48] Fukusaki E, Kato T, Maeda H, Kawazoe N, Ito Y, Okazawa A, Kajiyama S, Kobayashi A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2000,

- 10: 423—425
- [49] Srisawat C, Engelke D R. *RNA*, 2001, 7: 632—641
- [50] Williams K P, Liu X H, Schumacher T N M, Lin H Y, Ausiello D A, Kim P S, Bartel D P. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1997, 94 (21): 11285—11290
- [51] Ogawa A, Tomita N, Kikuchi N, Sando S, Aoyama Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2004, 14(15): 4001—4004
- [52] Mendonsa S D, Bowser M T. *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127 (26): 9382—9383
- [42] Tang J, Xie J, Shao N, Yan Y. *Electrophoresis*, 2006, 27(7): 1303—1311
- [53] Tang J, Yu T, Guo L, Xie J, Shao N, He Z. *Biosens. Bioelectron.*, 2007, 22(11): 2456—2463
- [54] Bock L C, Griffin L C, Latham J A, Vermaas E H, Toole J J. *Nature*, 1992, 355(6360): 564—566
- [55] Lin Y, Padmapriya A, Morden K M, Jayasena S D. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1995, 92(24): 11044—11048
- [56] Yakimovich O Y, Alekseev Y I, Maksimenko A V, Voronina O L, Lunin V G. *Biochemistry (Moscow)*, 2003, 68(2): 228—235
- [57] Andreola M L, Pileur F, Calmels C, Ventura M, Tarrago-Litvak L, Toulme J J, Litvak S. *Biochemistry*, 2001, 40(34): 10087—10094
- [58] Mallikaratchy P, Stahelin R V, Cao Z, Cho W, Tan W. *Chem. Commun.*, 2006, 3229—3231
- [59] Mosing R K, Mendonsa S D, Bowser M T. *Anal. Chem.*, 2005, 77(19): 6107—6112
- [60] Green L S, Jellinek D, Jenison R, Oestman A, Heldin C H, Janjic N. *Biochemistry*, 1996, 35(45): 14413—14424
- [61] Golden M C, Collins B D, Willis M C, Koch T H. *J. Biotechnol.*, 2000, 81: 167—178
- [62] Bassett S E, Fennewald S M, King D J, Li X, Herzog N K, Shope R, Aronson J F, Luxon B A, Gorenstein D G. *Biochemistry*, 2004, 43(28): 9105—9115
- [63] Wiegand T W, Williams P B, Dreskin S C, Jouvin M H, Kinet J P, Tasset D. *J. Immunol.*, 1996, 157(1): 221—230
- [64] Lato S M, Boles A R, Ellington A D. *Chem. Biol.*, 1995, 2: 291—303
- [65] Wallace S T, Schroeder R. *RNA*, 1998, 4: 112—123
- [66] Burke D H, Hoffman D C, Brown A, Hansen M, Pardi A, Gold L. *Chem. Biol.*, 1997, 4: 833—843
- [67] Wallis M G, von Ahsen U, Schroeder R, Famulok M. *Chem. Biol.*, 1995, 2: 543—552
- [68] Jeon S H, Kayhan B, Ben-Yedidia T, Arnon R. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279(46): 48410—48419
- [69] Koch T H, Smith D, Tabacman E, Zichi D A. *J. Mol. Biol.*, 2004, 336(5): 1159—1173
- [70] Bruno J G, Kiel J L. *Biosens. Bioelectron.*, 1999, 14(5): 457—464
- [71] Blank M, Weinschenk T, Priemer M, Schluesener H. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276(19): 16464—16468
- [72] Wang C, Zhang M, Yang G, Zhang D, Ding H, Wang H, Fan M, Shen B, Shao N. *J. Biotechnol.*, 2003, 102(1): 15—22
- [73] Lee Y J, Lee S W. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, 16(6): 1149—1153
- [74] Chen H W, Medley C D, Sefah K, Shangguan D, Tang Z W, Meng L, Smith J E, Tan W H. *ChemMedChem*, 2008, 3(6): 991—1001
- [75] Raddatz M S L, Dolf A, Endl E, Knolle P, Famulok M, Mayer G. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2008, 47(28): 5190—5193
- [76] Liu J W, Cao Z H, Lu Y. *Chem. Rev.*, 2009, 109: 1948—1998
- [77] Mendonsa S D, Bowser M T. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126: 20—21
- [78] Mendonsa S D, Bowser M T. *Anal. Chem.*, 2004, 76: 5387—5392
- [79] Drabovich A, Berezovski M, Krylov S N. *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127: 11224—11225
- [80] Cox J C, Rudolph P, Ellington A D. *Biotechnol. Prog.*, 1998, 14: 845—850
- [81] Cox J C, Ellington A D. *Bioorg. Med. Chem.*, 2001, 9: 2525—2531
- [82] Cox J C, Hayhurst A, Hesselberth J, Bayer T S, Georgiou G, Ellington A D. *Nucleic Acids Res.*, 2002, 30: e108
- [83] Eulberg D, Buchner K, Maasch C, Klussmann S. *Nucleic Acids Res.*, 2005, 33: e45
- [84] Vater A, Jarosch F, Buchner K, Klussmann S. *Nucleic Acids Res.*, 2003, 31: e130
- [85] Jensen K B, Atkinson B L, Willis M C, Koch T H, Gold L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, 92: 12220—12224
- [86] Lou X H, Qian J R, Soh H T, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009, 106: 2989—2994
- [87] Qian J R, Lou X H, Soh H T, et al. *Anal. Chem.*, 2009, 81: 5490—5495
- [88] Raddatz M L, Dolf A, Endl E, Knolle P, Famulok M, Mayer G. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2008, 47: 1—5
- [89] Chakravarthy U, Adamis A P, Patel M, et al. *Ophthalmology*, 2006, 113: 1501—1525
- [90] Ruckman J, Green L S, Janjic N, et al. *J. Biol. Chem.*, 1998, 273: 20556—20567
- [91] Rusconi C P, Scardino E, Sullenger B A, et al. *Nature*, 2002, 419: 90—94
- [92] Layzer J M, Sullenger B A. *Oligonucleotides*, 2007, 17: 1—11
- [93] Chan M Y, Rusconi C P, Becker R C, et al. *J. Thromb. Haemost.*, 2008, 6(5): 789—796
- [94] Smith C M, Steitz J A. *Mol. Cell. Biol.*, 1998, 18: 6897—6909
- [95] Burmeister P E, Lewis S D, Wilson C, et al. *Chem. Biol.*, 2005, 12: 25—33
- [96] Burmeister P E, Wang C H, Kurz M, et al. *Oligonucleotides*, 2006, 16: 337—351
- [97] Ho H A, Bera-Aberem M, Leclerc M. *Chem. Eur. J.*, 2005, 11: 1718—1724
- [98] Ho H A, Leclerc M. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126: 1384—1387
- [99] He F, Tang Y, Wang S, Li Y, Zhu D. *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127: 12343—12346
- [100] Huang C C, Chang H T. *Chem. Commun.*, 2008, 1461—1463
- [101] Wang J, Jiang Y, Zhou C, Fang X. *Anal. Chem.*, 2005, 77: 3542—3546
- [102] Jiang Y, Fang X, Bai C. *Anal. Chem.*, 2004, 76: 5230—5235
- [103] Zuo X, Song S, Zhang J, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 2007,

- 129: 1032—1043
- [104] Wang J, Wang L H, Fan C H, et al. *Advanced Materials*, 2007, 19: 3943—3946
- [105] Wang L H, Liu X F, Fan C H, et al. *Chem. Commun.*, 2006, 3780—3782
- [106] Stojanovic M N, de Prada P, Landry D W. *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123: 4928—4931
- [107] Stojanovic M N, Landry D W. *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, 124: 9678—9679
- [108] Li F, Zhang J, Cao X N, Wang L H, Li D, Song S P, Ye B C, Fan C H. *Analyst*, 2009, 134: 1355—1360
- [109] Fredriksson S, Gullberg M, Jarvius J, Olsson C, Pietras K, Gustafsdottir S M, Ostman A, Landegren U. *Nat. Biotechnol.*, 2002, 20: 473—477
- [110] Davis K A, Lin Y, Abrams B, Jayasena S D. *Nucleic Acids Res.*, 1998, 26: 3915—3924
- [111] Ringquist S, Parma D. *Cytometry*, 1998, 33: 394—405
- [112] Giridharan G, Jay R U, Douglas F H. *Anal. Chem.*, 2005, 77: 1963—1970
- [113] Yang C J, Jockusch S, Vicens M, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, 102(48): 17278—17283
- [114] Huang C C, Chiang C K, Lin Z H, Lee K H, Chang H T. *Anal. Chem.*, 2008, 80: 1497—1504
- [115] Huang C C, Chiu S H, Huang Y F, Chang H T. *Anal. Chem.*, 2007, 79(13): 4798—4804
- [116] Lee M, Walt D R. *Analytical Biochemistry*, 2000, 282: 142—146
- [117] Zheng J, Lin L, He P G, et al. *Science in China Series B: Chemistry*, 2007, 50: 351—357
- [118] Wang Y L, Li D, Ren W, Liu Z J, Dong S J, Wang E K. *Chem. Commun.*, 2008, 22: 2520—2522
- [119] Phillips J A, Lopez-Colon D, Zhu Z, Xu Y, Tan W H. *Analytica Chimica Acta*, 2008, 621: 101—108
- [120] Mallikaratchy P, Tang Z W, Tan W H, et al. *Mol. Cell. Proteomic.*, 2007, 6: 2230—2238
- [121] Shangguan D H, Cao Z H, Tan W H, et al. *J. Proteome. Res.*, 2008, 7: 2133—2139
- [122] Charlton J, Sennello J, Smith D. *Chem. Biol.*, 1997, 4: 809—816
- [123] Hicke B J, Stephens A W, Gould T, Chang Y F, Lynott C K, Heil J, Borkowski S, Hilger C S, Cook G, Warren S, Schmidt P G. *J. Nucl. Med.*, 2006, 47: 668—678
- [124] Huang Y, Chang H, Tan W. *Anal. Chem.*, 2008, 80: 567—572
- [125] Medley C, Smith J, Tang Z, Wu Y, Bamrungsap S, Tan W. *Anal. Chem.*, 2008, 80: 1067—1072
- [126] Korgel B A, Shieh F, Lavery L, et al. *Proc. SPIE*, 2005, 5705: 159—165
- [127] Herr J, Smith J, Medley C, Shangguan D, Tan W. *Anal. Chem.*, 2006, 78: 2918—2924
- [128] Phillips J, Xu Y, Xia Z, Fan Z, Tan W. *Anal. Chem.*, 2009, 81: 1033—1039
- [129] Xiao Z, Shangguan D, Cao Z, Fang X, Tan W. *Chemistry, A European Journal*, 2008, 14: 1769—1775
- [130] Farokhzad O C, Cheng J, Teply B A, Sherifi I, Jon S, Kantoff P W, Richie J P, Langer R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, 103: 6315—6320
- [131] Huang Y, Shangguan D, Liu H, Phillips J A, Zhang X, Chen Y, Tan W. *ChemBioChem*, 2009, 10: 862—868
- [132] Famulok M, Mayer G. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 1999, 243: 123—136
- [133] Brody E N, Gold L. *J. Biotechnol.*, 2000, 74: 5—13
- [134] Osborne S E, Matsumura I, Ellington A D. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1997, 1: 5—7
- [135] Stull R A, Szoka F C. *Pharm. Res.*, 1995, 12: 465—483
- [136] Ellington A D, Conrad R. *Biotechnol. Annu. Rev.*, 1995, 1: 185—214
- [137] Held D M, Kissel J D, Patterson J T, Nickens D G, Burke D H. *Front. Biosci.*, 2006, 11: 89—112
- [138] Yan A C, Bell K M, Breeden M M, Ellington A D. *Front. Biosci.*, 2005, 10: 1802—1827
- [139] Nimjee S M, Rusconi C P, Harrington R A, Sullenger B A. *Trends Cardiovasc. Med.*, 2005, 15: 41—45
- [140] Nimjee S M, Rusconi C P, Sullenger B A. *Annu. Rev. Med.*, 2005, 56: 555—583
- [141] Sullenger B A, Gilboa E. *Nature*, 2002, 418: 252—258
- [142] Rimmele M. *ChemBioChem*, 2003, 4: 963—971
- [143] Hicke B J, Marion C, Chang Y F, Gould T, Lynott C K, Parma D, Schmidt P G, Warren S J. *Biol. Chem.*, 2001, 276: 48644—48654
- [144] Daniels D A, Chen H, Hicke B J, Swiderek K M, Gold L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, 100: 15416—15421
- [145] White R R, Shan S, Rusconi C P, Shetty G, Dewhirst M W, Kontos C D, Sullenger B A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, 100: 5028—5033
- [146] Floege J, Ostendorf T, Janssen U, Burg M, Radeke H H, Vargeese C, Gill S C, Green L S, Janjic N. *Am. J. Pathol.*, 1999, 154: 169—179
- [147] Ostendorf T, Kunter U, van Roeyen C, Dooley S, Janjic N, Ruckman J, Eitner F, Floege J. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2002, 13: 658—667
- [148] Dougan H, Lyster D M, Vo C V, Stafford A, Weitz J I, Hobbs J B. *Nucl. Med. Biol.*, 2000, 27: 289—297
- [149] Dolmans D E, Fukumura D, Jain R K. *Nat. Rev. Cancer*, 2003, 3: 380—387
- [150] Oseroff A R, Ohuoha D, Hasan T, Bommer J C, Yarmush M L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, 83: 8744—8748
- [151] Mallikaratchy P, Tang Z, Tan W. *ChemMedChem*, 2008, 3: 425—428
- [152] Huang Y F, Chang H T, Tan W H. *Langmuir*, 2008, 24: 11860—11865
- [153] Shangguan D H, Li Y, Tang Z W, Cao Z C, Chen H W, Mallikaratchy P, Sefah K, Yang C J, Tan W H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, 103: 11838—11843