

适配体及其研究进展

王周平^{1,2}, 张维潇²

(1. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 综述了适配体的筛选方法以及近几年来在分析检测、食品安全、临床医疗等领域的应用。适配体是一类能与靶分子高亲和力、高特异性结合的寡核苷酸单链。它可以通过指数级富集的配体进化技术(SELEX)从体外筛选而得。适配体类似于抗体而优于抗体, 愈渐成为各种研究项目、检测方面等的重要课题之一。

关键词: 适配体; SELEX 技术; 分析检测; 食品安全

中图分类号: Q 7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2013)09—0897—10

Aptamer and Related Progress

WANG Zhou-ping^{1,2}, ZHANG Wei-xiao²

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Aptamers are single-stranded oligonucleotides with the high affinity and high specificity binding of the target molecules. They can be obtained by systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) in vitro screening. Aptamer is similar but superior to antibody, and it is becoming one specific issue of detection nowadays. This manuscript reviews the aptamer, screening methods, as well as applications in the analysis, food safety, clinical care and other areas in recent years.

Keywords: aptamer, SELEX, analysis, food safety

数十年来, 核酸主要起承载遗传信息的作用。随着对 DNA、RNA 与蛋白质之间相互作用的研究, Ellington 和 Tuerk 在 1990 年首次提出核酸适配体的概念。核酸适配体能特异性识别靶分子, 可通过指数级富集的配体进化技术(SELEX)从体外筛选而得^[1-2], 其凭借自身固有性质, 在生化、食品、医学

等诸多领域具有很好的应用前景。本文主要介绍了适配体的筛选方法以及近期适配体在分析检测、食品安全、临床医疗等方面的研究进展。

1 适配体简介

适配体是一类能以较高亲和力与各类靶分子

收稿日期: 2013-04-11

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划项目(2012BAK08B01); 江苏省科技支撑计划项目(BE2011621); 教育部“新世纪优秀人才支持计划”项目(NCET-11-0663); 教育部博士点基金项目(20110093110002)。

作者简介: 王周平(1974—), 男, 陕西凤翔人, 理学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事食品营养与安全分析研究。

E-mail: wangzp@jiangnan.edu.cn

特异性地结合的单链寡核苷酸 (DNA、RNA、修饰 RNA)^[3]。适配体与各种靶分子结合是基于单链核酸结构和空间构象的多样性,它可通过链内某些互补碱基间的配对以及静电作用、氢键作用等自身发生适应性折叠,形成一些稳定的三维空间结构^[4],绑定于其靶分子上,从而通常对其靶分子显示出非常高的亲和力^[5]。

由于适配体的优秀特性,凡是涉及抗体的应用领域,几乎都能用适配体代替。适配体相对于一般抗体和酶的优势在于:

1) 避免了传统抗体制备中动物实验过程,而直接从体外文库中选择;可以筛选出没有免疫原性和低免疫原性甚至具有毒性的靶分子的适配体^[6]。

2) 适配体对体外筛选靶分子显示出高特异性和亲和力,目标范围广,靶分子可以是有机染料、氨基酸、蛋白质、抗生素、多肽、维生素、药物,甚至细胞、致病菌、病毒、组织等^[7]。

3) 适配体的筛选过程中可以进行操作,模拟得到一个特定区域与靶分子结合,且在不同结合条件下进行特异结合的适配体,纯度高,批次间差异小。

4) 适配体的尺寸比传统抗体小,获得方便,合成的重现性好,通过化学合成和修饰可以增强其稳定性。其与靶分子形成的复合物的解离常数 K_d 一般都在毫摩尔每升级甚至可达皮摩尔每升水平。

5) 相对于蛋白质抗体或酶,通常适配体的化学性质更稳定,保存时间长,可以在室温下运输^[8]。

筛选适配体通常采用 SELEX 技术,包括 5 个主要步骤:结合、分离、洗脱、扩增、调节。其基本过程^[9]如图 1 所示,首先建立一个包含 $10^{13} \sim 10^{15}$ 个容量的随机核苷酸文库,将靶分子加入到该文库中进行孵育,待靶分子与文库中的随机核苷酸充分结合后,再用物理方法分离与靶分子结合的核苷酸序列。洗脱和收集结合的序列,通过 PCR 对洗脱收集的序列进行扩增,集成富集的文库,再进行下一轮的筛选循环。每个靶分子要进行 6~20 个连续循环,最后富集的文库要通过克隆和测序来获得最终特异识别靶分子的适配体^[10]。需要注意的是,大多数适配体与靶分子之间的作用为氢键, RNA 文库比 DNA 文库更具有多样性,但是所得适配体高度倾向被核酸酶结合。因此需要建立动态组合文库用新的方法来克服适配体化学稳定性的问题。

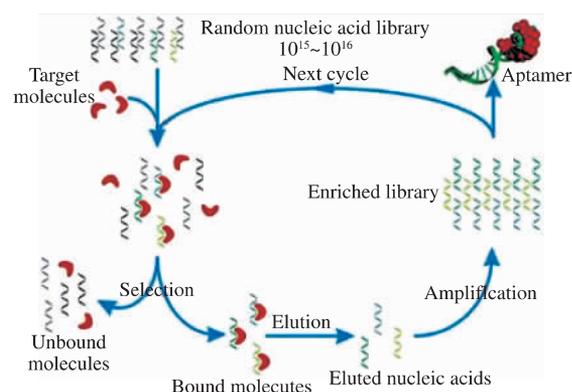


图 1 SELEX 技术基本流程

Fig. 1 Scheme of SELEX technology

2 适配体筛选技术

目前,筛选适配体的技术有很多。主要用于筛选蛋白质、多糖、氨基酸类抗生素等大分子物质的方法有:毛细管电泳 SELEX (Capillary electrophoresis SELEX)、亲和性分区筛选 (partitioning through affinity)、均衡混合物的非均衡毛细管电泳 SELEX (Non-equilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures SELEX)、亲和层析、光敏 SELEX (photo SELEX)、消减 SELEX、无引物基因组 SELEX、混合 SELEX (blended SELEX)、切换 SELEX (toggle SELEX)、表达盒 SELEX、复合靶 SELEX、定向 SELEX (Tailored SELEX)、进化模拟法、磁珠分离法、高速离心等。可用于筛选小分子物质的主要有:硝酸纤维素膜过滤法、亲和层析法等;筛选细胞、病原菌、病毒、组织等常用基因 SELEX (genomic SELEX)、细胞 SELEX (cell-SELEX) 等。这些新兴的筛选方法大大减少了适配体的筛选时间并且增强了适配体的亲和性与特异性。

2.1 筛选技术

2.1.1 毛细管电泳 SELEX 传统 SELEX 中,与靶分子结合的核苷酸序列与未与靶分子结合的核苷酸序列之间分离效率不高。Mendonsa 和 Coworkers 发展了 CE-SELEX,进行了显著的改良,仅用少数(少于 5 次)循环就能从结合与未结合序列之中分离出非常高亲和性的适配体。毛细管电泳 SELEX 的原理为,在寡核苷酸库与靶分子共同孵育后,将混合物进行毛细管电泳,具有特异性的寡核苷酸序列与靶分子结合后所形成的复合物的尺寸同未与靶分子结合的核苷酸大小相比发生明显变化,这使

得二者在毛细管柱中的迁移率产生差异,从而实现分离^[11]。毛细管电泳 SELEX 最初用来筛选蛋白质、脂多糖、多肽等大分子目标,如 IgE 蛋白、神经肽 Y、HIV 逆转录酶、蛋白激酶、蓖麻毒素等。这些筛选的适配体解离系数低至 180 pmol/L,且仅用 4 个次循环(2~4 d)就完成了分离,与一般数周的筛选时间相比,大大缩短了筛选时间。CE-SELEX 能成功实现的依据在于,文库与靶分子的结合完全在溶液中进行,结合与未结合序列经毛细管分离后进行收集,无需洗脱步骤,消除了动力学方面的不良因素^[12]。Tran 等^[13]利用 CE-SELEX 首次筛选出花生中的过敏原花生四烯酸 h1 的适配体,此适配体与花生过敏原花生四烯酸 h1 高度特异性结合,筛选出的适配体用于自制光纤表面拉曼光谱生物传感器平台,在缓冲液和食品基质样品中检测 Ara h 1 蛋白。Ashley^[14]用 CE-SELEX 筛选出人类瘦素蛋白的适配体,分别用均衡混合物的非均衡毛细管电泳 SELEX 和荧光分析验证结果不一,显示了适配体的有效性与筛选分离步骤的相似环境有关。Kasahara^[15]用 CE-SELEX 成功筛选出 40 个 2'-O,4'-C-亚甲基桥二环核糖核苷酸,其中一部分在 10 nmol/L 解离系数水平下能与人类凝血酶结合。Yang^[16]等用 CE-SELEX 首次筛选 580 g/mol 的小分子目标 N-甲基-中卟啉的适配体,筛选得到的 8 个适配体中有 2 个可以催化卟啉的金属嵌入式反应。

CE-SELEX 的新型模式叫做平衡混合物的非平衡毛细管电泳(NECEEM),它是一种基于分离相关性的方法,其动力学功能超越表面拉曼光谱且无需表面分子的固定化^[17]。NECEEM 能测定蛋白质-适配体相互作用的动态学、热力学参数,定量分析蛋白质和 DNA 与 RNA 的杂化,还可以从组合文库中筛选结合的配给^[18]。NECEEM 也能大大缩短适配体的筛选时间。有研究报道 NECEEM 技术用于筛选小型适配体^[19]。Drabovich^[20]用 3 次循环筛选出 MutS 蛋白质。

2.1.2 Non-SELEX 筛选技术 包含无扩增的反复分配步骤,此技术至少能在 4 个数量级上增强筛选靶蛋白的 DNA 文库的相关性,且与 NECEEM 联合只需 1 h 即可完成常规性筛选^[21]。non-SELEX 最显著的优点是对非扩增文库的适应能力,如 DNA 模板合成而获得的 DNA 标记小分子的筛选。Ashley^[22]用 non-SELEX 成功筛选出牛的过氧化氢酶适配体,

特异性显著。Tok^[17]用 non-SELEX 经过至少 3 轮数量优化处理成功筛选出信号传导蛋白 Cdc42-GTP、PAK1 和 MRCK α 。

Photo-SELEX 是将寡核苷酸文库序列中的一种碱基用光活性碱基取代,如 5-碘尿嘧啶和 5-溴尿嘧啶,再与靶分子孵育后,经光照射诱导靶分子与其特异作用序列共价交联,增加适配体的特异性和亲和性^[23]。

2.1.3 导向 SELEX 为增加获得的适配体的特异性,将已知的可与靶蛋白非特异性位点结合的分子掺入文库或预先与靶蛋白结合后进行筛选,可获得只与目标蛋白特异表位结合的适配体。Bless^[24]在研究弹性蛋白酶的适配体抑制剂 NX21909 时,采用筛选技术,将其从随机 DNA 表达盒杂交文库中筛选出来。expression cassette SELEX 可以看做 blended SELEX 的特殊形式,因为其转录因子是混合的。Martell^[25]用表达盒 SELEX 筛选出结合 E2F 蛋白的高亲和性 RNA 适配体,此适配体可以在哺乳动物细胞中高水平表达。

2.1.4 基因 SELEX Genomic SELEX 采用特定生物物的整个基因组作为筛选文库,并将生物活性分子作为筛选初步识别的靶分子序列的目标。Shimada^[26]用此方法鉴别了大肠杆菌肽聚糖多肽降解中初始酶表达的抑制蛋白——非典型转录因子 YcjZ。Bannikova 等^[27]用 genomic SELEX 识别 AtCyp59 的 RNA 适配体,AtCyp59 是一种包含肽脯氨基异构酶的多畴亲环蛋白。

2.1.5 切换 SELEX 一般情况下,单一靶分子和复合靶分子的筛选都只有一种目标靶。而切换 SELEX 可以同时筛选几种靶分子。切换 SELEX 过程中,不同筛选循环要针对不同的靶分子进行策略的调整。此方法可以增强适配体筛选的灵活性,使筛选更易达到研究者的特定筛选要求。Derbyshire^[28]运用 toggle SELEX 对氨基糖苷类抗生素的 RNA 适配体进行了分离,所得适配体与对应靶分子有纳摩尔水平的亲和性,且与结构相关性较弱的靶分子也能进行结合。实验过程中还运用金纳米包裹的适配体诱导性结合方法来对混合物进行快速敏感性实验。

2.1.6 自动化 SELEX 传统的适配体筛选过程包含大量重复繁琐的操作,这使得筛选耗时耗力。自动筛选系统的建立可以简化适配体筛选,节约时间和人力,达到高通量和特定范围内高效筛选多个靶

分子的平行筛选的效果。自动筛选系统需要借助现代筛选仪器来实现筛选策略。自动筛选系统的筛选循环无需直接介入步骤^[29]。Schütze^[30]实现了一种半自动的 SELEX 程序,对始于合成 DNA 寡核苷酸文库的模板靶链亲和素进行了鉴别,在第一轮筛选可以很容易得到高亲和力的对应适配体。

2.1.7 硝酸纤维素膜过滤法 Tuerk 等^[2]采用基于硝酸纤维素膜过滤的方法获得了 T4DNA 聚合酶的适配体,但是这些膜不能结合小分子和肽,并且需要至少 12 轮筛选。Zhu^[31]将靶蛋白固定于硝酸纤维素膜上,筛选出一种新型圆点印迹的脱氧核糖酶适配体来检测蛋白质,脱氧核糖酶可以催化过氧化氢氧化型 3,3',5,5'-联苯胺产生不溶性有色物,硝酸纤维素膜能吸收此有色物。Daniels^[32]在研究 G-蛋白-耦合受体特异性 RNA 适配体过程中,运用大肠杆菌硝酸纤维素膜过滤法来分析每个适配体。

2.1.8 亲和色谱法 在 SELEX 筛选步骤中,仅在文库成分具有高度亲和力或者靶分子的筛选条件下有效。这种方法不但可以筛选小分子,还可以筛选蛋白质大分子。此方法的缺点是若靶分子必须要有可以偶联玻璃珠的亲亲和标记或功能基团。Roming 等^[33]发展了一种筛选人类 L-选择素的亲和色谱适配体系统,用此系统从中国仓鼠卵巢的细胞条件介质中,成功分离出重组人类 L-选择素-免疫蛋白融合蛋白质。Zhao 等^[34]研究了一种三明治适配体亲和色谱,提高了凝血酶适配体的敏感性和选择性。

2.1.9 微流体 SELEX 为了提高筛选适配体的效率,基于微流体或芯片系统的 SELEX 开始发展。微流体 SELEX 主要采用一种在小范围内增强筛选效率的芯片。Huang^[35]研究了一种微流控芯片,它集成了一个 ssDNA 孵育模块和芯片上的核酸扩增模块,能快速筛选特定蛋白质适配体。

2.1.10 磁珠分离法 磁珠分离法可以通过亲和标记和磁珠基质之间的相互作用或者化学反应来固定靶分子。Kiani^[36]采用地高辛(治疗心脏病的药物)包裹的链霉亲和素磁珠,经过 11 轮反复循环,从合成 DNA 文库中筛选出地高辛的 DNA 适配体。Huang^[35]报道了一种基于磁珠微流体芯片的新型微流体系统,用此法成功筛选出肝癌的生物标记物 α -甲胎蛋白的适配体。Wang^[37]研究了改进磁珠分离法筛选凝血酶结合适配体的效果,凝血酶的检测限达到 0.05 nmol/L。

2.1.11 细胞-SELEX Cell-SELEX 的筛选目标是完整的细胞,由于此方法不能固定靶分子,因此操作比较复杂。但是一旦筛选成功所得到的适配体对于细胞特异诊断、细胞定向药物输送、细胞特异治疗是非常有效的。Ninomiya^[38]运用 cell-SELEX 经过 11 轮程序筛选出人体肝癌 HepG2 细胞的适配体,并验证了适配体与靶细胞的特异性相互作用,解离系数在 19~450 nmol/L 的范围内,并发现识别 HepG2 细胞的主要作用由适配体的二级结构发挥。

2.1.12 其他 SELEX 原子力显微镜、电泳流动转化试验、表面等离子体共振也应用到 SELEX 技术上。这些技术具有减少筛选循环次数的优点,但是用这些方法筛选适配体的效果还没有清楚的报道。

纤维素膜过滤、亲和程序等 SELEX 筛选技术都需要多轮筛选循环,从文库中富集需要核苷酸池,不能提供数轮筛选循环后的即时结合的效果信息和离线评估。基于表面等离子体共振的 SELEX 筛选技术能克服这些缺点,在筛选之前提供靶分子结合分子能力的有关信息。

3 适配体应用

由于适配体对靶分子的高度特异性和亲和性,在医疗诊断、治疗手段、新药物的开发、药物输送系统、生物影像、分析试剂、危害检测、食品检验等领域扮演着重要的角色。

3.1 生物分析

适配体易快速制备、经济适用、尺寸较小、通用性强,它在分析检测领域具有巨大的发展前景。目前适配体已被应用在了很多检测手段中,如电感耦合等离子体质谱、纳米金、表面等离子体共振、色谱、表面增强拉曼散射、毛细管电泳、生物传感器等,以及分子适配体信标。

Nonaka^[39]用硅胶后熟的方式筛选获得 4 个高特异性 VEGF(血管内皮细胞生长因子)的适配体,解离系数最高达到 300 pmol/L,并构建 VEGF 的检测系统。Wongphatcharachai^[40]用 SELEX 技术筛选出 IAVs(猪流感病毒 A)亚型 H3N2 的重组 HA 蛋白质的 DNA 适配体 HA68、HA7、HA2a 和 HA2b,所得适配体可以用于此病毒的快速检测。Hamula 等^[41]运用改良 cell-SELEX 筛选出嗜酸乳酸菌的完整活细胞的适配体,其平均解离系数为(13±3) nmol/L,并得到 hemag1P 特异性和亲和力最高,很可能是细胞表

面上的S层蛋白起靶分子作用。Wen等^[42]运用适配体信标作为信号传导方法,建立了以适配体为基础检测咖啡环斑弹状病毒的光学检测系统,实际运用于检测人体血清 α -凝血酶,在血清和血液中的检测限分别达2 ng/mL和4 ng/mL。Lv等^[43]运用电化学结合磁珠分离筛选出人体乳腺癌MCF-7细胞的适配体。Li等^[44]结合适配体,运用纳米银增强荧光共振能量转移系统,建立了对FDGF-BB(人类血小板源生长因子BB)的灵敏检测方法,检测限为0.8 ng/mL。

Qin等^[45]利用基于CRET(化学发光共振能量转移)的金纳米粒子系统筛选出凝血酶的适配体,对凝血酶进行检测,检测限达15 pmol/L,并且此方法做细微改良就能轻易应用于其他生物分子。Wang等^[46]运用SELEX与SPR结合检测AIV H5N1病毒,经13轮筛选的对应适配体解离系数为4.65 nmol/L,显示了对病毒高度的亲和力和特异性,此方法应用于标准禽肉样品中AIV H5N1的检测。Aslipashaki等^[47]实现了基于电喷雾电离离子流动谱与适配体结合的方法分析检测人类尿液和血浆样本中的四环素,检测限分别为0.0019,0.037 μ g/mL。

Xia等^[48]利用双重扩增巯基苯硼酸包裹金纳米和多巴胺包裹金纳米构成三明治型电化学传感器,将合成受体和适配体固定于金电极上以捕获糖蛋白。此方法能将亚皮摩级的生物素蛋白和前列腺特异抗原检测到。Li等^[49]首次运用氧化石墨烯的荧光猝灭性质结合适配体,快速、经济检测 Hg^{2+} ,将氧化石墨烯与适配体特异性结合形成T- Hg^{2+} -T复合物,从而构成发夹型双链DNA结构,插入双链DNA的 Hg^{2+} 接近氧化石墨烯表面,使氧化石墨烯荧光猝灭。此方法检测限达0.92 nmol/L,且在其他金属离子共存的环境中也可以高度特性检测。

3.2 食品安全分析

适配体结合纳米等材料在光学、电学及生物学方面展现出的优良特性,可实现在食品安全分析领域内对生物毒素、重金属离子、农药残留等食品中的危害因子进行高灵敏、高特异性的快速检测。

Handy^[50]用毒素-蛋白联合物的方法筛选出首个海洋毒素STX的适配体,体现了对小分子靶分子的适配体筛选的成功,并且能运用到食源性毒素检测中。Nguyen等^[51]用电化学法聚合带有 Fe_3O_4 /PANi膜的Pt-微电极,用戊二醛交联技术将适配体固定于 Fe_3O_4 /PANi膜上。当适配体与 AFM_1 特异结合形成

适配体- AFM_1 复合物时,微电极上的信号消失,当适配体- AFM_1 复合物解络时,信号重新出现。此方法可以检测6-60 ng/L范围内的 AFM_1 ,检测限达1.98 ng/L,可以用于检测牛奶中8 ng/L的 AFM_1 ,具有很强的实际意义。

Zhang等^[52]首次尝试用Tb、适配体、磁珠结合的方法检测OTA。由于Tb的特异荧光性质,适配体展现出超高度的灵敏信号,OTA-适配体G-四联体的形成可以使两个单链信号探针释放,Tb³⁺可以结合更多探针,即可放大荧光信号,对OTA的检测限可达20 pg/mL。OTA与适配体的结合发生在1 min之内,用链霉亲和素包裹的磁珠能特异性捕获生物素化的适配体。

Fan等^[53]运用电化学阻抗光谱建立了一种灵敏、特异、免标记的检测杀虫剂啶虫脒的方法。他们用循环伏安法将金纳米电沉积于赤裸的金电极表面,随着啶虫脒的量增加,啶虫脒-适配体复合物在纳米金-沉积电极表面形成,电子转移电阻增加。经测定,啶虫脒与适配体复合物的特异性和亲和力很强,解离系数达到23.41 nmol/L。此方法可以应用于污水和番茄中的啶虫脒检测。Yu等^[54]人将金纳米与适配体、电化学发光氧化石墨烯结合,检测2,4,6-三硝基甲苯(TNT),检测限达到3.6 pg/mL,适配体与TNT能高特异性结合,此方法已成功应用于实际水样的TNT检测中。Wang^[55]用分子信标法筛选出有机磷农药的适配体,这种适配体在有机磷农药残留中和的分析上有很大的应用潜力。

Nadal^[56]结合磁珠分离的SELEX筛选出食品过敏原Lup1, β -蓝豆蛋白的适配体,用ELONA(酶联寡核苷酸试验)与SPR对适配体进行检测,其与 β -蓝豆蛋白亲和力和特异性很高,且与其他蓝豆蛋白片段无交叉反应,这种适配体可以运用于定量检测 β 蓝豆蛋白。

Wu等^[57]首次建立了基于复合能量供体的复合FRET(荧光共振能量转移),结合多色上转换荧光金纳米和氧化石墨烯(GO)作为受体检测OTA和 FB_1 的方法。他们合成2种上转换金纳米,将其固定于OTA适配体和 FB_1 适配体上,修饰过的上转换金纳米-适配体能高度接近GO表面,强烈的上转换荧光能被GO完全猝灭。当OTA和 FB_1 存在时,上转换金纳米修饰的适配体会远离GO表面,从而展现荧光。此方法检测OTA和 FB_1 的线性范围分别为

0.05~100 ng/mL 和 0.1~500 ng/mL, 检测限分别为 0.02 ng/mL 和 0.1 ng/mL, 已被应用于污染玉米样品 OTA 和 FB₁ 水平的检测中。该小组研究人员^[58]还将与适配体结合的磁性金纳米作为识别工具, 将 UCNPs(上转化材料金纳米)作为高灵敏标记, 使适配体 DNA1 序列与 DNA2 序列修饰的 UCNPs 杂合, 当 OTA 存在时 DNA1 适配体从复合物上解离, 从而根据荧光信号的减弱来检测牛奶样品中小分子毒素 OTA, 检测限为 10~13 g/ml。Duan 等^[59]基于类似的原理, 运用双色上转换荧光材料金纳米与适配体结合, 实现了对鼠伤寒沙门氏菌和金黄色酿脓葡萄球菌的定量检测。

Wang^[60]将适配体 DNA2 用 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺(ABEI)标记, 然后将其与适配体 DNA1 结合, 运用 ABEI 的化学发光效应定量检测 OTA, 检测限达 0.007 ng/mL。Duan 等^[61]运用全细菌-SELEX 筛选出高亲和高特异性识别单增李斯特菌的适配体, 其解离系数为 (48.74±3.11) nmol/L, 检测限 75 cfu/mL。该小组^[62]用此方法筛选了对副溶血弧菌的适配体, 再用流式细胞术分析, 适配体解离系数为 (16.88±1.92) nmol/L, 亲和力高达 76%。他们还用同样的方法^[63]对鼠伤寒沙门氏菌的适配体进行筛选, 解离系数为 (6.33±0.58) nmol/L, 检测限达 25 cfu/mL。Maeng^[64]运用 RNA 适配体发展了一种检测食源性细菌的简单快速的检测系统。Liu^[65]运用 SELEX 筛选出沙门氏菌 O8 的适配体, 其中适配体 B10 与沙门氏菌 O8 结合的亲和力、特异性最强, 其解离系数达到 32.04 nmol/L, 研究了其二级结构, 结合荧光标记实验可以应用于快速检测食源性病原菌, 整个检测过程在 1.5~2 h 内可以完成。

3.3 临床医学检测

适配体的高度特异性与亲和性使其在医学诊断、治疗疾病的领域有很大应用价值。在新药物和药物输送系统的发展中, 适配体可以作为诊断治疗工具和生物传感探针。如今已有尝试筛选特定靶分子的适配体, 涉及到脉络增生血管、血管内血栓、急性冠状综合症、血管瘤、骨髓性白血病、肾癌等等^[66]。2004 年, FDA 批准 Macugen(血管内皮生长因子)的适配体, 它可以治疗新生血管性年龄相关黄斑变性 (AMD), 这是适配体应用的一个重要里程碑。

Ulrich^[67]用 SELEX 模型筛选出 RNA 适配体, 它

可以作为烟碱型受体活动的别构调节剂。Ardjomandi^[68]筛选了特异针对人类下颌骨细胞的适配体, 分析了该适配体鉴别成骨标记基因, 其表达无显著差异。MTB(结合分支杆菌)的适配体 NK2 能将对毒性菌株(H37Rv)的抑制作用标记在体外巨噬细胞, 刺激 CD4 (+) T 细胞的细胞内 IFN-伽马产生。实验结果显示, 第 10 批适配体和 NK2 在 H37Rv 的抑制上起重要作用, 且体内和体外效果不同。第 10 批适配体与体内 NK2 的治疗效果相比更好^[69]。Ditzler^[70]用高通量筛选法评估了结合人类 HIV 病毒反转录酶的 RNA 适配体, 它在治疗、诊断、研究中有巨大潜力。Bai 等^[71]构建了一种检测凝血酶的方法, 将硫醇化凝血酶适配体固定于微电极阵列金磁盘上, 以形成一个自组装层, 用巯基乙醇来阻截非特异性的点, 得到整齐的适配体单层。修饰过的微电极阵列金磁盘可以特异性结合凝血酶和亚甲基蓝, 检测限可达 0.143 pmol/L。Gerasimov 等^[72]设计了一种电化学适配体传感器, 成功检测了胰岛素, 该试验中, 适配体为与胰岛素联结的多肽区域序列, 富鸟苷酸经过折叠形成 G-四联体, 检测限达 10 nmol/L。

与适配体结合的传感器技术如电化学传感器、比色传感器、荧光传感器、表面等离子共振传感器、表面增强拉曼光谱传感器也受到了广泛的关注^[73-74]。

4 展望

适配体作为一种新兴组合化学技术, 其优势与应用已广泛展现于各种研究项目中。适配体因其可在高温或不良环境下非常稳定、经济性强, 被用来替代抗体。由于大多数适配体为核苷酸, 容易大量合成高纯度的适配体, 也可以用简单的化学反应将其与各种分子修饰。因此, 适配体在广阔范围中显示出强大的应用前景。再者, 适配体无免疫原性、无毒性, 可以运用于药物的开发来诊断和治疗疾病。还有一个适配体值得注意的优点是, 适配体的靶分子类型无限制, 筛选范围非常广泛。今后, 适配体的发展应该集中在以下方面: 揭示适配体与靶分子相互作用的具体机制; 发展耗时更短、更经济的适配体筛选方法; 建立更加自动化的筛选平台。相信适配体将在食品检测、诊断治疗以及其他领域开发一片光明的天地。

参考文献:

- [1] Ellington A D, Szostak J W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands[J]. **Nature**, 1990, 346(6287): 818–822.
- [2] Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase [J]. **Science**, 1990, 249(4968): 505–510.
- [3] Jayasena S D. Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics[J]. **Clinical chemistry**, 1999, 45(9): 1628–1650.
- [4] 谢海燕, 陈薛钗, 邓玉林. 核酸适配体及其在化学领域的相关应用[J]. 化学进展, 2007, 19(6): 1026–1033.
XIE Hai-yan, CHEN Xue-chai, DENG Yu-lin. Advance in aptamer research [J]. **Progress in Chemistry**, 2007, 19(6): 1026–1033. (in Chinese)
- [5] 冯香玲, 许杨. SELEX 技术及其应用研究[J]. 食品科技, 2008, 33(4): 175–177.
FENG Xiang-ling, XU Yang. SELEX technique and its application [J]. **Food Science and Technology**, 2008, 33(4): 175–177. (in Chinese)
- [6] 李晓佩, 杨良嵘, 黄昆, 等. 核酸适配体在生化分离及检测领域中的研究进展[J]. 化工学报, 2013, 64(1): 233–242.
LI Xiao-pei, YANG Liang-rong, HUANG Kun, et al. Research progress of aptamer in biochemical separation and detection[J]. **CIESC Journal**, 2013, 64(1): 233–242. (in Chinese)
- [7] Tombelli S, Minunni M, Mascini M. Analytical applications of aptamers[J]. **Biosensors & bioelectronics**, 2005, 20: 2424–34.
- [8] 陈敏, 高如承, 江树勋, 等. SELEX 技术研究进展[J]. 科技创业月刊, 2010, 23(3): 253–254.
CHEN Min, GAO Ru-cheng, JIANG Shu-xun, et al. The progress of SELEX [J]. **Pioneering With Science & Technology Monthly**, 2010, 23(3): 253–254. (in Chinese)
- [9] Song S, Wang L, Li J, et al. Aptamer-based biosensors[J]. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 2008, 27(2): 108–117.
- [10] Sun W, Du L, Li M. Aptamer-based carbohydrate recognition[J]. **Current pharmaceutical design**, 2010, 16(20): 2269–2278.
- [11] 郭磊. SELEX 技术及寡核苷酸适配体的近期研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2010, 37(4): 249–256.
GUO Lei. Recent advances in SELEX and applications of aptamers[J]. **Journal of International Pharmaceutical Research**, 2010, 37(4): 249–256. (in Chinese)
- [12] Wang Y X, Ye Z Z, Si C Y, et al. Application of aptamer based biosensors for detection of pathogenic microorganisms[J]. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, 2012, 40(4): 634–642.
- [13] Tran D T, Knez K, Janssen K P, et al. Selection of aptamers against Ara h 1 protein for FO-SPR biosensing of peanut allergens in food matrices[J]. **Biosensors and Bioelectronics**, 2013, 43: 245–51.
- [14] Ashley J, Li S F. Three-dimensional selection of leptin aptamers using capillary electrophoresis and implications for clone validation[J]. **Analytical biochemistry**, 2013, 434: 146–52.
- [15] Kasahara Y, Irisawa Y, Ozaki H, et al. 2',4'-BNA/LNA aptamers: CE-SELEX using a DNA-based library of full-length 2'-O, 4'-C-methylene-bridged/linked bicyclic ribonucleotides[J]. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, 2013, 23(5): 1288–1292.
- [16] Yang J, Bowser M T. Capillary Electrophoresis-SELEX selection of catalytic DNA aptamers for a Small-Molecule porphyrin target[J]. **Analytical chemistry**, 2013, 85(3): 1525–1530.
- [17] Tok J, Lai J, Leung T, et al. Selection of aptamers for signal transduction proteins by capillary electrophoresis [J]. **Electrophoresis**, 2010, 31(12): 2055–2062.
- [18] Krylov S N. Nonequilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures (NECEEM): A novel method for biomolecular screening[J]. **Journal of Biomolecular Screening**, 2006, 11(2): 115–122.
- [19] Mairal T, Ozalp V C, Sánchez P L, et al. Aptamers: molecular tools for analytical applications[J]. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 2008, 390(4): 989–1007.
- [20] Drabovich A, Berezovski M, Krylov S N. Selection of smart aptamers by equilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures (ECEEM)[J]. **Journal of the American Chemical Society**, 2005, 127: 11224–11225.
- [21] Gopinath S C. Methods developed for SELEX[J]. **Anal Bioanal Chem**, 2007, 387(1): 171–182.
- [22] Ashley J, Ji K, Li S F Y. Selection of bovine catalase aptamers using non-SELEX[J]. **Electrophoresis**, 2012, 33(17): 2783–2789.
- [23] Koch T H, Smith D, Tabacman E, et al. Kinetic analysis of site-specific photoaptamer-protein cross-linking[J]. **Journal of**

- molecular biology**, 2004, 336(5): 1159–1173.
- [24] Bless N M, Smith D, Charlton J, et al. Protective effects of an aptamer inhibitor of neutrophil elastase in lung inflammatory injury [J]. **Current Biology**, 1997, 7(11): 877–880.
- [25] Martell R E, Nevins J R, Sullenger B A. Optimizing aptamer activity for gene therapy applications using expression cassette SELEX[J]. **Molecular Therapy**, 2002, 6(1): 30–34.
- [26] Shimada T, Yamazaki K, Ishihama A. Novel regulator PgrR for switch control of peptidoglycan recycling in Escherichia coli[J]. **Genes to Cells**, 2013, 18(2): 123–134.
- [27] Bannikova O, Zywicki M, Marquez Y, et al. Identification of RNA targets for the nuclear multidomain cyclophilin atCyp59 and their effect on PPIase activity[J]. **Nucleic Acids Research**, 2013, 41(3): 1783–1796.
- [28] Derbyshire N, White S J, Bunka D H J, et al. Toggled RNA aptamers against aminoglycosides allowing facile detection of antibiotics using gold nanoparticle assays[J]. **Analytical chemistry**, 2012, 84(15): 6595–6602.
- [29] 王巍, 贾凌云. 适配体筛选方法研究进展[J]. 分析化学, 2009, 37(3): 454–460.
WANG Wei, JIA Ling-Yun. Progress in aptamer screening methods[J]. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, 2009, 37(3): 454–460. (in Chinese)
- [30] Schütze T, Wilhelm B, Greiner N, et al. Probing the SELEX process with next-generation sequencing[J]. **Plo Sone**, 2011, 6(12): e29604.
- [31] Zhu J, Li T, Hu J, et al. A novel dot-blot DNA zyme-linked aptamer assay for protein detection[J]. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 2010, 397(7): 2923–2927.
- [32] Daniels D A, Sohal A K, Rees S, et al. Generation of RNA aptamers to the G-protein-coupled receptor for neurotensin, NTS-1[J]. **Analytical Biochemistry**, 2002, 305(2): 214–226.
- [33] Romig T S, Bell C, Drolet D W. Aptamer affinity chromatography: combinatorial chemistry applied to protein purification[J]. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, 1999, 731(2): 275–284.
- [34] Zhao Q, Li X F, Shao Y, et al. Aptamer-based affinity chromatographic assays for thrombin[J]. **Analytical Chemistry**, 2008, 80(19): 7586–7593.
- [35] Huang C J, Lin H I, Shiesh S C, et al. An integrated microfluidic system for rapid screening of alpha-fetoprotein-specific aptamers[J]. **Biosensors and Bioelectronics**, 2012, 35(1): 50–55.
- [36] Kiani Z, Shafiei M, Rahimi-Moghaddam P, et al. In vitro selection and characterization of deoxyribonucleic acid aptamers for digoxin[J]. **Analytica Chimica Acta**, 2012, 748: 67–72.
- [37] Wang X, Zhao Q. A fluorescent sandwich assay for thrombin using aptamer modified magnetic beads and quantum dots[J]. **Microchimica Acta**, 2012, 178(3–4): 349–355.
- [38] Ninomiya K, Kaneda K, Kawashima S, et al. Cell-SELEX based selection and characterization of DNA aptamer recognizing human hepatocarcinoma[J]. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 2013, 23(6): 1797–1802.
- [39] Nonaka Y, Yoshida W, Abe K, et al. Affinity improvement of a VEGF aptamer by in silico maturation for a sensitive VEGF-detection system[J]. **Analytical Chemistry**, 2013, 85(2): 1132–1137.
- [40] Wongphatcharachai M, Wang P, Enomoto S, et al. Neutralizing DNA aptamers against swine influenza H3N2 viruses[J]. **Journal of Clinical Microbiology**, 2013, 51(1): 46–54.
- [41] Hamula C L A, Zhang H, Guan L L, et al. Selection of aptamers against live bacterial cells[J]. **Analytical Chemistry**, 2008, 80(20): 7812–7819.
- [42] Wen J T, Ho C M, Lillehoi P A. A coffee ring biosensor for rapid protein detection[J]. **Langmuir**, 2013, 29(1): 46–54.
- [43] Lv S, Guan Y, Wang D, et al. Aptamer based strategy for cytosensing and evaluation of HER-3 on the surface of MCF-7 cells by using the signal amplification of nucleic acid-functionalized nanocrystals[J]. **Analytica Chimica Acta**, 2013, 772: 26–32.
- [44] Li H, Wang M, Wang C, et al. Silver nanoparticle-enhanced fluorescence resonance energy transfer sensor for human PDGF-BB detection[J]. **Analytical Chemistry**, 2013, 85(9): 4492–4499.
- [45] Qin G, Zhao S, Huang Y, et al. A sensitive gold nanoparticles sensing platform based on resonance energy transfer for chemiluminescence light on detection of biomolecules[J]. **Biosensors and Bioelectronics**, 2013, 46: 119–23.
- [46] Wang R, Zhao J, Jiang T, et al. Selection and characterization of DNA aptamers for use in detection of avian influenza virus

- H5N1[J]. **Journal of Virological Methods**, 2013, 189(2): 362–369.
- [47] Aslipashaki S N, Khayamian T, Hashemian Z. Aptamer based extraction followed by electrospray ionization-ion mobility spectrometry for analysis of tetracycline in biological fluids[J]. **Journal of Chromatography B**, 2013, 925: 26–32.
- [48] Xia N, Deng D, Zhang L, et al. Sandwich-type electrochemical biosensor for glycoproteins detection based on dual-amplification of boronic acid-gold nanoparticles and dopamine-gold nanoparticles[J]. **Biosensors and Bioelectronics**, 2013, 43: 155–159.
- [49] Li M, Zhou X, Ding W, et al. Fluorescent aptamer-functionalized graphene oxide biosensor for label-free detection of mercury (II)[J]. **Biosensors & Bioelectronics**, 2013, 41: 889–893.
- [50] Handy S M, Yakes B J, De Grasse J A, et al. First report of the use of a saxitoxin-protein conjugate to develop a DNA aptamer to a small molecule toxin[J]. **Official Journal of the International Society on Toxinology**, 2013, 61: 30–37.
- [51] Nguyen B H, Tran L D, Do Q P, et al. Label-free detection of aflatoxin M1 with electrochemical Fe₃O₄/polyaniline-based aptasensor[J]. **Materials Science and Engineering: C**, 2013, 33: 2229–2234.
- [52] Zhang J, Zhang X, Yang G, et al. A signal-on fluorescent aptasensor based on Tb³⁺ and structure-switching aptamer for label-free detection of Ochratoxin A in wheat[J]. **Biosensors & Bioelectronics**, 2013, 41: 704–709.
- [53] Fan L, Zhao G, Shi H, et al. A highly selective electrochemical impedance spectroscopy-based aptasensor for sensitive detection of acetamiprid[J]. **Biosensors & Bioelectronics**, 2012, 43: 12–18.
- [54] Yu Y, Cao Q, Zhou M, et al. A novel homogeneous label-free aptasensor for 2,4,6-trinitrotoluene detection based on an assembly strategy of electrochemiluminescent graphene oxide with gold nanoparticles and aptamer[J]. **Biosensors & Bioelectronics**, 2012, 43: 137–142.
- [55] Wang L, Liu X, Zhang Q, et al. Selection of DNA aptamers that bind to four organophosphorus pesticides [J]. **Biotechnology Letters**, 2012, 34(5): 869–874.
- [56] Nadal P, Pinto A, Svobodova M, et al. DNA aptamers against the lup an 1 food allergen[J]. **PLoS ONE**, 2012, 7(4): e35253.
- [57] Wu S, Duan N, Ma X, et al. Multiplexed fluorescence resonance energy transfer aptasensor between upconversion nanoparticles and graphene oxide for the simultaneous determination of mycotoxins[J]. **Analytical Chemistry**, 2012, 84(14): 6263–6270.
- [58] Wu S, Duan N, Wang Z, et al. Aptamer-functionalized magnetic nanoparticle-based bioassay for the detection of ochratoxin A using upconversion nanoparticles as labels[J]. **Analyst**, 2011, 136(11): 2306–2314.
- [59] Duan N, Wu S, Zhu C, et al. Dual-color upconversion fluorescence and aptamer-functionalized magnetic nanoparticles-based bioassay for the simultaneous detection of salmonella typhimurium and staphylococcus aureus[J]. **Analytica Chimica Acta**, 2012, 723: 1–6.
- [60] Wang Z, Duan N, Hun X, et al. Electrochemiluminescent aptamer biosensor for the determination of ochratoxin A at a gold-nanoparticles-modified gold electrode using N-(aminobutyl)-N-ethylisoluminol as a luminescent label[J]. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 2010, 398(5): 2125–2132.
- [61] Duan N, Ding X, He L, et al. Selection, identification and application of a DNA aptamer against *Listeria monocytogenes*[J]. **Food Control**, 2013, 33(1): 239–243.
- [62] Duan N, Wu S, Chen X, et al. Selection and identification of a DNA aptamer targeted to *Vibrio parahaemolyticus*[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2012, 60(16): 4034–4038.
- [63] Duan N, Wu S, Chen X, et al. Selection and characterization of aptamers against *Salmonella typhimurium* using whole-bacterium systemic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX)[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2013, 61(13): 3229–3234.
- [64] Maeng J S, Kim N, Kim C T, et al. Rapid detection of food pathogens using RNA aptamers-immobilized slide[J]. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, 2012, 12(7): 5138–5142.
- [65] Liu G, Yu X, Xue F, et al. Screening and preliminary application of a DNA aptamer for rapid detection of *Salmonella* O8[J]. **Microchimica Acta**, 2012, 178(1–2): 237–244.
- [66] Keefe A D, Pai S, Ellington A. Aptamers as therapeutics[J]. **Nature Reviews Drug Discovery**, 2010, 9(7): 537–550.
- [67] Ulrich H, Wrenger C. Identification of aptamers as specific binders and modulators of cell-surface receptor activity[J]. **Methods in Molecular Biology**, 2013, 986: 17.
- [68] Ardjomandi N, Niederlaender J, Aicher W K, et al. Identification of an aptamer binding to human osteogenic-induced progenitor

- cells[J]. **Nucleic Acid Therapeutics**, 2013, 23(1):44-61.
- [69] Chen F, Zhou J, Huang Y H, et al. Function of ssDNA aptamer and aptamer pool against *Mycobacterium tuberculosis* in a mouse model[J]. **Molecular Medicine Reports**, 2013, 7(2):669-673.
- [70] Ditzler M A, Lange M J, Bose D, et al. High-throughput sequence analysis reveals structural diversity and improved potency among RNA inhibitors of HIV reverse transcriptase[J]. **Nucleic Acids Research**, 2013, 41(3):1873-1884.
- [71] Bai H Y, Campo F J, Tsai Y C. Sensitive electrochemical thrombin aptasensor based on gold disk microelectrode arrays[J]. **Biosensors & Bioelectronics**, 2013, 42:17-22.
- [72] Gerasimov J Y, Schaefer C S, Yang W, et al. Development of an electrochemical insulin sensor based on the insulin-linked polymorphic region[J]. **Biosensors & Bioelectronics**, 2013, 42:62-68.
- [73] Wang Q, Huang J, Yang X, et al. Surface plasmon resonance detection of small molecule using split aptamer fragments[J]. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 2011, 156(2):893-898.
- [74] Sundaram P, Kurniawan H, Byrne M E, et al. Therapeutic RNA aptamers in clinical trials [J]. **European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, 2013, 48(1-2):259-271.

会 议 信 息

会议名称(中文): 第三届亚太食品安全国际会议

所属学科: 动物食品科学, 公共卫生与预防医学

开始日期: 2013-10-29

结束日期: 2013-11-01

所在城市: 台湾省 台北市

主办单位: 国际食品保护协会

承办单位: 台湾食品保护协会

联系人: Miss Lai

联系电话: +886-2-33664130

E-MAIL: foodsafetytw@gmail.com

会议网站: <http://2013-iafptaiwan.tafp.org.tw/>

会议背景介绍: 台湾食品保护协会于今年(2012)国际食品保护协会的世界大会, 顺利成功争取到第三届亚太食品安全国际会议(The 3rd Asia Pacific International Conference on Food Safety)于2013年来台举办, 使台湾是继南韩和澳洲后成为亚洲地区第三个举办国。

将于2013年10月29日至11月1日于台北召开「第三届亚太食品安全国际会议」, 拟邀请亚太地区食品安全学界之专家学者共同交换学术研究心得、经验及成果, 对各区食品安全之流行趋势与策略作全盘及较深入的了解及交流, 以促进食品安全的研究发展, 提高食品科技与质量检验之研究与技术开发能力, 提供各国人民健康安全的饮食生活为主要目标。

过去前两届在南韩和澳洲举办之亚太食品安全会议, 报名人数踊跃且广邀国际食品保护协会 IAFP 会员国与会, 包含澳洲、加拿大、美国、纽西兰、墨西哥、英国等多达50个国家参与。本次特邀多国国际顶尖之学者专家与会演讲, 预计能吸引到500位以上全球各地之食品研究学者、政府管理部门代表、学会理事长及业者代表来台与会, 能积极有效提高台湾的国际能见度, 传播台湾在食品安全领域的热忱与重视, 展现台湾食品安全产业国际竞争力和世界领导地位, 乃2013年不能错过的食品安全亚洲盛会。