

[综合评述]

doi: 10.7503/ejcu20210442

功能化核酸适体的筛选及分子识别应用

吉采灵, 程兴, 谈洁, 袁荃

(湖南大学化学化工学院, 化学生物学与纳米医学研究所, 化学生物传感与
计量学国家重点实验室, 长沙 410082)

摘要 核酸适体是从寡核苷酸文库中筛选获得的一段单链寡核苷酸. 由于能与多种靶标分子高特异性结合, 核酸适体已发展成为一种新兴的分子识别工具, 广泛应用于生物医学等领域. 天然核酸文库有限的化学组成限制了核酸适体的结构和功能, 进而限制了其在分子识别中的应用. 功能化核酸适体通过引入特定的化学官能团使核酸序列具有更丰富的构象和功能, 增强其分子识别能力. 然而, 功能化核酸很难与核酸扩增方法兼容, 因而难以使用传统筛选方法进行功能化核酸的筛选. 因此, 优化筛选方法对于获得具有优异性能的功能化核酸适体至关重要. 本综述总结了功能化核酸适体的筛选方法, 并介绍了其作为分子识别工具在生物医学领域中的应用.

关键词 功能化核酸适体; 筛选; 扩增; 分子识别

中图分类号 Q524

文献标志码 A

核酸适体是一类通过指数富集配体系统进化技术(SELEX)在体外筛选获得的单链寡核苷酸序列^[1,2]. 核酸适体能够折叠形成众多高级三维空间结构^[3,4]. 通过与靶标分子间的空间结构匹配以及分子间相互作用, 核酸适体可以实现针对靶标分子的特异性识别和检测^[5,6]. 与分子量约150 kDa的抗体相比, 核酸适体的分子量小(约15 kDa), 组织穿透能力强, 易进入细胞实现细胞内的分子识别^[7,8]. 核酸适体不仅能与金属离子和氨基酸等小分子结合, 还能特异性识别蛋白质、细胞及组织等, 靶标范围十分广泛^[6,9]. 此外, 核酸适体可以通过化学方法精准合成, 其化学和物理性质稳定, 易于修饰和批量生产^[10]. 基于上述优势, 核酸适体被广泛应用于疾病诊断、靶向治疗等生物医学领域^[11-13].

核酸适体具有优异的分子识别能力, 然而天然核苷酸的种类有限(仅有AUCTG 5种), 导致核酸适体的识别对象和功能具有局限性^[14]. 功能化核酸适体是指在核酸分子中引入天然核苷酸中不存在的特定化学官能团, 使核酸序列具有更丰富的构象和功能, 以增强适体的分子识别能力^[15]. 近年来, 已经报道了一系列经过化学修饰的核酸, 修饰后的核酸具有天然核酸无法实现的特定功能^[16]. 因此, 经过合理设计, 功能化核酸适体有望展现出新的特性和功能, 促进其在生物医学中的应用^[14]. 然而, 功能化核酸适体很难与核酸适体扩增方法兼容, 因而难以使用传统筛选方法进行功能化核酸适体的筛选^[17,18]. 目前, 在传统适体筛选方法SELEX的基础上, 已经发展了多种不同的技术路线, 开发出多种获得功能化核酸适体的新型筛选方法^[19,20]. 近年来, 关于功能化核酸适体新型筛选技术的综述报道较多, 但鲜见从扩增兼容与否的角度介绍筛选技术的综述. 本文将从该角度对功能化核酸适体筛选及其分子识别应用进行综述. 首先从扩增兼容和扩增不兼容两方面对功能化核酸适体的筛选方法进行阐述, 而后从生物医学领域概括了功能化核酸适体的分子识别应用能力, 最后对功能化核酸适体的筛选和应用进行了总结与展望.

收稿日期: 2021-06-28. 网络出版日期: 2021-09-30.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 21904037)和湖南省自然科学基金(批准号: 2020JJ5038, 2020JJ4173)资助.

联系人简介: 袁荃, 女, 博士, 教授, 主要从事功能纳米材料控制合成及其生物医学应用研究.

E-mail: yuanquan@whu.edu.cn

谈洁, 女, 博士, 副教授, 主要从事化学修饰核酸的设计及其生物医学应用研究.

E-mail: tanjie0416@hnu.edu.cn

1 功能化核酸适体的筛选

传统 SELEX 技术的基本流程主要包括文库构建、筛选富集、扩增、反筛、克隆测序和序列分析^[21]。首先,通过体外化学合成技术构建出一个单链寡核苷酸文库,将随机文库与靶标分子混合孵育,形成靶标-核酸的复合物;然后洗脱与靶标分子未结合的核酸,分离出与靶标分子结合的核酸;接着将这些核酸分子作为模板进行聚合酶链反应(PCR)扩增,扩增的序列作为下一轮筛选的文库再进行新一轮的筛选^[22]。随后,将所获得的筛选文库再与对照分子孵育,孵育后收集未结合的核酸序列。后续通过多轮重复筛选、分离和扩增的步骤,逐步淘汰低亲和力的核酸序列,富集与靶标分子高特异性结合的核酸序列。最后,通过对所得的核酸序列进行克隆和测序,得到具体的序列信息,挑选出最优序列,进行特异性和亲和力考察,最终确定目标核酸适体^[23]。为了增强核酸适体的分子识别能力,大量研究通过对天然核苷酸进行功能化来扩大核酸适体的化学多样性^[24,25]。经过功能化的核酸适体能够展现出新的性质和功能,提高核酸适体的分子识别能力,促进其分子识别应用^[26,27]。然而,在功能化核酸适体的筛选过程中,由于大多数功能化核苷酸不能被 SELEX 中传统的聚合酶所识别,阻碍了功能化核酸的扩增,从而限制了功能化核酸适体的筛选^[18]。为此,大量针对扩增程序的研究用来克服功能化核酸适体的筛选限制。本节从扩增兼容和扩增不兼容两方面总结了功能化核酸适体的筛选技术。

1.1 扩增兼容的功能化核酸适体筛选

为了克服功能化核酸适体的筛选限制,研究者通过合理设计功能化核苷酸分子获得了与扩增相兼容的功能化核苷酸。通过设计特殊的功能化核苷酸分子,使其保留天然核苷酸的结构特征从而适应天然聚合酶,实现有效的扩增。1994年,Latham等^[28]开发了第一个碱基修饰的功能化核酸适体。他们使用 Pd/Cu 介导的 1-碘-戊炔和 5-碘-2'-脱氧尿苷偶联制备出 5-(1-戊基)-2'-脱氧尿苷[图 1(A)]。首先运用化学合成技术构建了包含 20 个随机碱基的寡核苷酸文库。随后,在 5-(1-戊基)-2'-脱氧尿苷存在下扩增该模板以构建初始核酸文库,其中胸腺嘧啶被修饰碱基完全取代。经过 6 轮选择和 PCR 扩增后,筛选得到特异性识别凝血酶的功能化核酸适体。通过硝酸纤维素滤膜结合实验测定含不同数量修饰碱基的克隆序列与凝血酶之间的结合能力[图 1(B)],功能化核酸适体与凝血酶之间的亲和力与核酸适体中 5-(1-戊基)-2'-脱氧尿苷的含量呈正相关。利用胸苷置换序列中的 5-(1-戊基)-2'-脱氧尿苷后,发现核酸适体与凝血酶之间无法结合[图 1(B)中 Clone 5 w/T],表明修饰碱基对于核酸适体和凝血酶之间的相互作用至关重要。尽管与天然核酸适体相比,所合成的功能化核酸适体与凝血酶的结合亲和力较低,但这无疑是为扩增兼容功能化核酸适体的筛选开辟了新的途径。

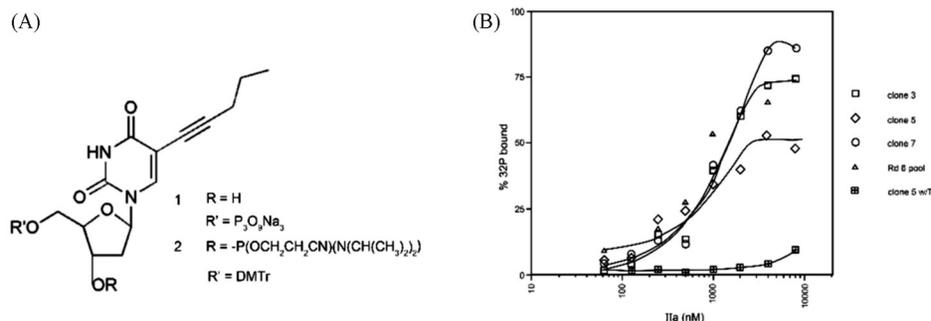


Fig. 1 Chemical structures of 5-(1-pentynyl)-2'-deoxyuridine(A) and the interaction between radiolabelled aptamers and thrombin evaluated by itrocellulose filter binding(B)^[28]

Copyright 1994, Oxford University Press.

功能化的核苷酸分子不是传统 PCR 聚合酶的天然底物,因此要使修饰后的核苷酸在功能化核酸适体的开发中得到有效应用,需要设计开发能与天然聚合酶相兼容的功能化核苷酸分子。受到 Latham 等^[28]研究发现的鼓舞,此后关于修饰核苷酸的研究越来越多。研究者对不同种类核苷酸的糖环、磷酸或碱基进行修饰,通过天然聚合酶扩增,筛选出了相应的功能化核酸适体^[29]。对糖环的修饰,如 2'-核

糖修饰(2'-deoxy, 2'-hydroxyl, 2'-fluoro 和 2'-O-methyl), 可以优化核酸适体的抗核酸酶降解能力, 增加核酸适体的稳定性. 对磷酸的修饰(如硫代磷酸)和对碱基的修饰(如嘧啶侧链修饰氨基酸), 可以增强核酸适体与靶标分子的结合亲和力. Bharat 等^[14]对胞嘧啶和尿嘧啶上的疏水芳香侧链进行双重修饰(图2). 据报道, KOD DNA 聚合酶来自耐热古生菌, 可以与多种修饰的嘧啶脱氧核苷酸相兼容^[30]. 基于此, 研究者利用 KOD DNA 聚合酶进行 PCR 扩增, 筛选出与前蛋白转化酶枯草溶菌素 9/kexin9 型(PCSK9)选择性结合的功能化核酸适体. PCSK9 属于前蛋白转化酶家族, 参与多种机体重要的功能, 与胆固醇血症、炎症和糖尿病的发生密切相关^[31,32]. 筛选得到的功能化核酸适体能够有效结合并影响 PCSK9 蛋白的活性, 展现出治疗活性. 与未功能化的核酸适体相比, 这种功能化核酸适体对底物的亲和力更高, 代谢稳定性更好, 在诊断和治疗等方面具有巨大的研究潜力.

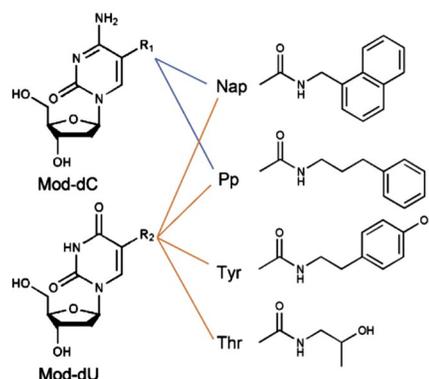


Fig. 2 Chemical structures of modified deoxycytidine (Mod-dC) and modified deoxyuridine (Mod-dU) bearing a 5-(N-substituted-carboxamide) functional group R_1 and R_2 , respectively

R_1 group: Modifications on dC; R_2 group: modifications on dU.

天然聚合酶一般仅限于结合单一的非天然核苷酸或非相邻的非天然核苷酸对, 而对于连续的非天然核苷酸序列, 其效果并不尽如人意^[17,33]. 尽管通过设计保留天然核苷酸结构可以得到与传统 PCR 扩增相兼容的功能化核酸适体, 但是使用该方法获得的功能化核酸适体的种类和功能有限^[34]. 因此, 研究者通过对 PCR 过程中聚合酶识别过程进行研究, 开发了与传统聚合酶兼容的非天然碱基对. Joyce 和 Steitz^[35]提出了小沟扫描假说, 认为聚合酶是通过识别 4 种天然核苷酸基团向双螺旋小沟呈递的电子密度进行序列扩增的. 然而一般的非天然核苷酸缺乏这种电子密度, 因此无法利用天然聚合酶进行 PCR 扩增. 基于此, Yang 等^[33]开发了含扫描电子密度的第五碱基 Z[6-amino-5-nitro-3-(1- β -D-2-deoxyribofuranosyl)-2(1H)-pyridone] 和第六碱基 P{2-amino-8-(1- β -D-2-deoxyribofuranosyl)-imidazo[1,2-a]-1,3,5-triazin-4(8H)one}, 同时氢键重排使它们只与彼此配对[图 3(A)]. 从分子结构上看, 人工碱基 P 和 Z 在结构上是互补的, 除了 Z 中的硝基外, 其余都与 DNA 中的天然碱基相似. P-Z 碱基对与天然 DNA 高度兼容, 为核酸适体提供了更丰富的构象. 随后, 研究者发现了可以很好地与含有 P 和 Z 的核苷酸相兼容的 HS Takara Taq DNA 天然聚合酶, 并且该聚合酶可以支持含有 4 个连续非天然核苷酸的序列的 PCR 扩增. 此后, 许多研究者使用含有 P 和 Z 的核酸文库来获得功能化核酸适体. Tan 等^[15]分别选择了可配对的 P-Z 碱基对、二茂铁碱基和氟碱基来建立人工扩展的筛选体系, 其中二茂铁碱基可引入蛋白-金属离子络合作用, 氟碱基可引入疏水作用, P-Z 碱基对可引入蛋白-硝基相互作用, 提供核酸序列更丰富的构象. 他们利用这 3 种类型的核酸文库, 以三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 为靶标, 筛选出可以抑制整合素 $\alpha 3 \beta 1$ (*Alpha 3 beta 1 integrin*) 生物学相关性能的核酸适体 ZAP-1[图 3(B)]. ZAP-1 可以减少 $\alpha 3 \beta 1$ 与配体的结合, 从而减少肿瘤细胞的黏附和迁移. 这些研究表明, 通过对核苷酸分子进行合理的设计, 可以筛选得到扩增兼容功能化核酸适体.

1.2 扩增不兼容的功能化核酸适体筛选

对于可兼容 PCR 扩增的功能化核苷酸, 可以实现与传统筛选过程相兼容的功能化核酸适体筛选, 然而这种方法只能对于少数可被天然聚合酶识别的功能化核苷酸有效^[17]. 对于无法被天然聚合酶识别的功能化核苷酸, 研究者尝试通过改进扩增程序来实现核酸扩增, 包括设计新的可识别功能化核苷酸的聚合酶或使用替换 PCR 扩增方法来进行功能化核酸适体的筛选.

1.2.1 设计新的聚合酶 由于在 PCR 扩增时, 修饰后的核酸序列难以被天然 DNA 聚合酶识别. 为了解

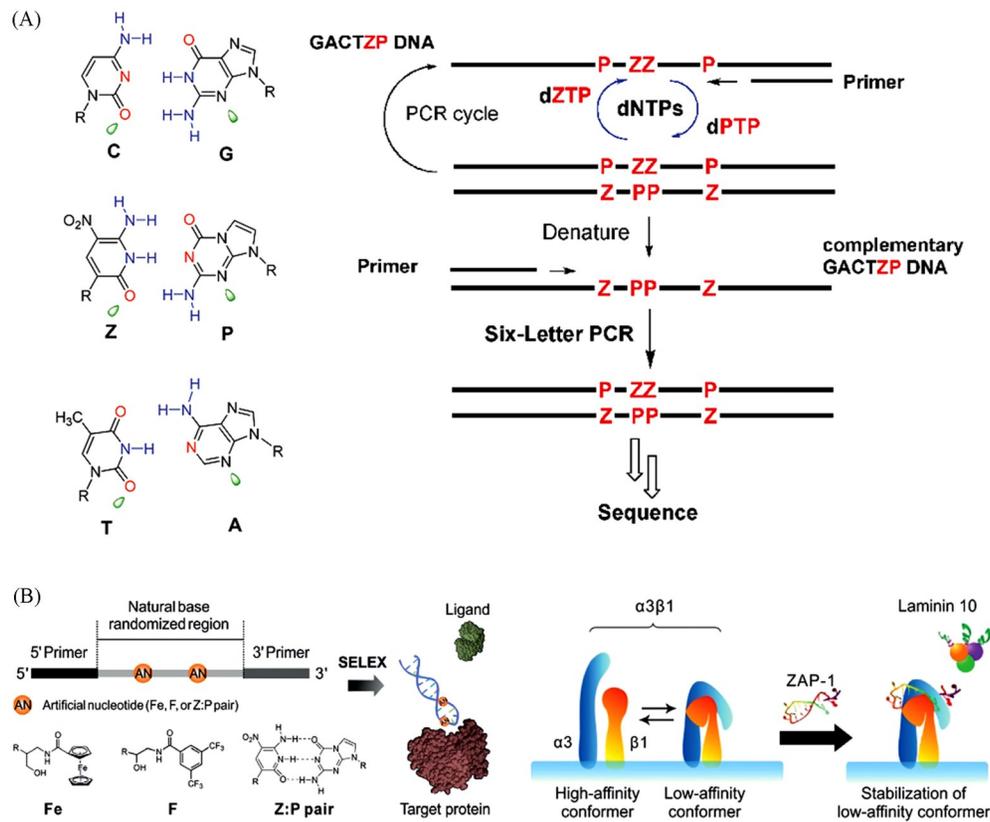


Fig. 3 GACTZP artificial genetic system(A)^[33], schematic diagram of molecular design of aptamers containing P-Z pairs and the conformational regulation of integrin $\alpha 3\beta 1$ (B)^[15]

(A) Left column: matched C-G, P-Z, and T-A pairs. Green parts: electron density presented to the minor groove. Right column: the screening process by the six-letter artificial genetic system. (A) Copyright 2011, American Chemical Society; (B) Copyright 2019, Wiley-VCH.

决这一问题, Chen等^[36]开发了Taq DNA聚合酶变体SFM4-3(Stoffel fragment mutant 4-3),它是一种可用于DNA和RNA扩增的新型工程聚合酶.首先诱导Taq聚合酶突变构建酶库,利用噬菌体展示技术从噬菌体显示的酶库中分离出具有所需特性的聚合酶变体,经过4轮筛选得到具有扩增C2位修饰的寡核苷酸能力的聚合酶SFM4-3.他们利用SFM4-3聚合酶对含糖环修饰如2'-甲氧基和2'-氟修饰的核酸序列进行扩增,筛选出抗人中性粒细胞弹性蛋白酶(HNE)的核酸适体.此后,研究者进一步研究了SFM4-3聚合酶的使用范围.目前,SFM4-3聚合酶的底物已扩展到2'-氯、2'-氨基和2'-叠氮化物修饰的核酸文库(表1)^[36-41].SFM4-3聚合酶的开发和应用为利用修饰的核酸文库筛选功能化核酸适体提供了重要基础.

Table 1 Modified substrates of SFM4-3 polymerase

Type of accepted modification	Functional aptamers were screened using modified nucleic acid library	Ref.
2'-OMe	Human neutrophil elastase(HNE) aptamer	[36, 39]
2'-Fluoro	Human neutrophil elastase(HNE) aptamer	[37, 38, 41]
2'-Azido	Blood coagulation protein factor IX aptamer, neutrophil elastase(HNE) aptamer	[40]
2'-Chloro, 2'-amino/arabinose sugars	—	[38]

1.2.2 替换PCR 除设计新的聚合酶来应对非传统PCR兼容的功能化核酸适体筛选,还可根据碱基互补配对的原理,先利用天然核苷酸将富集文库中的功能化核苷酸替换,进行PCR后再将人工碱基替换回原来的位置,从而实现目标序列的扩增^[42].这种方法称为替换PCR.

通过引入非天然碱基对,可以直接增加核酸文库的化学多样性^[43].目前,除P-Z之外,疏水性非天

然碱基对 Ds {7-(2-thienyl)imidazo[4,5-b]pyridine}-Px(2-nitro-4-propynylpyrrole) 也已广泛应用于 DNA 适体的生成^[44]. Ds 碱基高度疏水, 它的引入可以加强核酸适体与靶标蛋白疏水空腔间的相互作用, 增加核酸适体的结合亲和力. 由于 Ds 碱基中含有分子量较大的噻吩, 无法与天然碱基进行配对. Px 碱基主链为五元吡咯环, 与天然碱基相比空间位阻较小, 能与 Ds 碱基进行配对. 因此, Ds-Px 常作为第三碱基对共同被引入 PCR 过程, 从而得到具有高保真度的扩增产物. Hamashima 等^[45]提出了一种含 Ds 的 DNA 测序方法, 通过将 Ds 碱基替换为天然碱基进行 PCR(替换 PCR), 用于常规的深度测序, 从而确定 DNA 中的 Ds 位置. Kimoto 等^[20,45,46]根据特定的测序策略开发了一种含非天然碱基对的功能化核酸适体的筛选方法, 其核酸文库包含 4 个天然核苷酸和 1 个含 Ds 碱基的非天然核苷酸的[图 4(A)]. Ds 碱基能与靶标蛋白的疏水空腔间产生强相互作用, 为了促进核酸适体与靶标蛋白间的相互作用, 核酸文库中没有包含与 Ds 碱基配对的 Px 碱基, 以防止 Ds 碱基核酸适体结构中形成 Ds-Px 碱基对从而阻碍了 Ds 的作用. 此外, 文库中未配对的 Ds 还能增加核酸适体的结构多样性, 进一步增强核酸适体的结合亲和力. 如图 4(B)所示, Kimoto 等^[46]通过使用 Ds 预置库来解决筛选过程后确定富集文库中每个含 Ds 序列位置的问题. Ds 预置库包含有限数量的子库, 每个子库中在天然碱基随机序列区域的特定位置嵌入 1 个、2 个或 3 个 Ds 碱基, 并添加由 2 个或 3 个天然碱基组成的不同识别标签来识别每个子库. 由于 Ds 碱基在 DNA 复制过程中只与 Px 碱基配对, 因此 Px 碱基仅在 PCR 扩增过程中引入, 实现核酸文库的有效扩增. 利用 Ds-预置文库筛选后, 将 Ds 碱基替换成天然碱基, 在不含 Ds 和 Px 底物的情况下, 使用 Taq 聚合酶对富集的文库进行替换 PCR 扩增. 最后, 通过深度测序确定序列, 利用识别标签定位每个序列中 Ds 的位置, 再将 Ds 替换回原来的位点. Kimoto 等^[20]利用该筛选方法, 筛选出了特异性靶向 2 种人类靶蛋白血管内皮细胞生长因子-165 和干扰素- γ 的功能化 DNA 适体, 平衡解离常数(K_D)分别为 0.65 pmol/L 和 0.038 nmol/L, 亲和力比仅含天然碱基的核酸适体提高了 100 倍以上. 相比于传统的 SELEX, 这种独特的筛选方法能够在不改变天然聚合酶的基础上获得功能化核酸适体, 进一步提高了一些传统核酸适体的稳定性和亲和力.

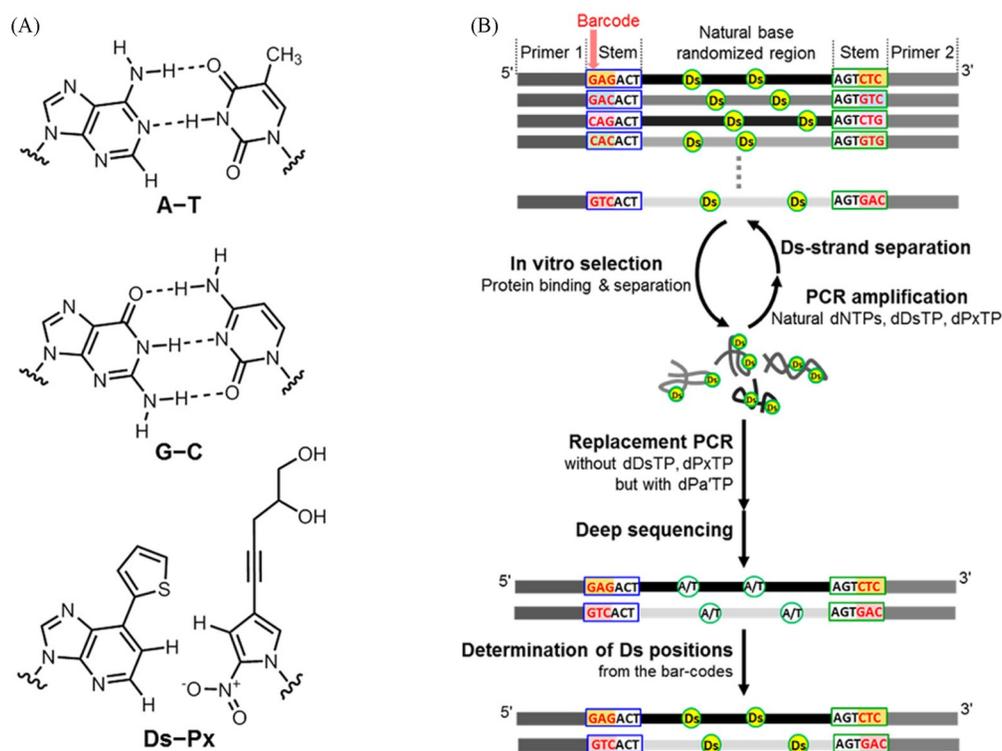


Fig. 4 Chemical structures of base pairs in DNA libraries containing hydrophobic Ds bases(A)^[45] and scheme of the SELEX procedure using DNA libraries with five different bases(B)^[46]

(A) Copyright 2019, American Chemical Society; (B) Copyright 2017, American Chemical Society.

2 功能化核酸适体的分子识别应用

分子识别在自然界中起着至关重要的作用^[47]。生物系统中存在着具有较高的结合强度和特异性的多种生物分子对,如抗原和抗体、酶和底物等^[48,49]。这些自然产生的生物分子被广泛应用于生物传感等生物学领域^[50]。基于DNA、抗体等生物分子的生物传感器的开发在临床疾病诊断中发挥着重要的作用^[51]。然而,许多生物分子的功能结构十分脆弱,在非理性条件的环境中易发生变性从而丧失功能,限制了它们的应用^[52]。因此,探索既能识别目标分子,又具有优异稳定性的分子识别工具非常重要。

核酸适体具有靶分子范围广、稳定性好、尺寸小、易于合成和修饰等天然抗体所没有的独特特性,在分子识别方面具有巨大的潜力^[53,54]。目前,核酸适体作为分子识别工具已在生物传感、医学诊断和治疗等生物学领域中广泛应用^[55,56]。然而,天然核酸文库的化学组成有限,使得传统的核酸适体不仅容易被核酸酶降解,而且缺乏化学和结构多样性,限制了其在生物分析中的应用^[14]。核酸适体的结合能力是化学多样性和结构多样性共同作用的结果,通过优化传统的筛选方法引入天然核苷酸不存在的化学基团,能够增强核酸酶抗性,提高结合亲和力,获得具有更高选择性和强识别能力的功能化核酸适体,从而促进基于核酸适体的分子识别应用^[23,57]。本节将从生物标志物的发现与检测和肿瘤治疗药物的识别与开发两方面,对功能化核酸适体的生物学应用进行概述。

2.1 生物标志物的发现与检测

生物标志物是正常生物学过程、病理过程或治疗干预药理学反应的标志性分子^[30,58]。生物标志物如蛋白质、激素和酶等,存在于患者的体液、细胞或组织中,这些标志物会在疾病发生和发展过程中异常地表达^[58]。因此,生物标志物检测可用于临床诊断、预后和风险预测^[59]。目前,已经建立了核酸、血清蛋白、多肽及抗体等分子标记,然而,对疾病特异性生物标记的有效利用仍然很少,阻碍了疾病的早期诊断和有效治疗^[60]。因此,生物标志物的识别与发现仍然是分子医学领域的一个紧迫挑战。核酸适体能够特异性识别靶标分子,具有检测疾病的潜力。然而,一些生物标志物无法通过仅含4种天然核苷酸的核酸文库找到相应的核酸适体。由于化学基团的引入,功能化核酸适体具有更丰富的空间构象,增加了筛选所需核酸适体的可能性。

胰腺癌是消化道常见恶性肿瘤之一,大多数胰腺癌患者在晚期才被诊断出来,确诊后的手术切除率低,术后五年生存率约10%,是预后最差的恶性肿瘤之一^[61]。因此,开发一种灵敏的胰腺癌早期检测的方法具有重要意义。为了识别胰腺癌的生物标志物亲环素B(CypB),Ray等^[62]将2'-氟修饰的嘧啶引入ssRNA文库,设计了一种正负筛选法,筛选出一种功能化核酸适体M9-5(图5)。该功能化核酸适体具有较高的敏感性和特异性,可以用于区分癌变和非癌变的人胰腺细胞。他们使用市售的酶联免疫吸附测定试剂盒在同一组癌症患者与健康志愿者血清中测量CypB水平,发现与健康志愿者血清相比,胰腺癌患者血清中CypB水平显著提高。此外,M9-5结合实验结果显示,与青年志愿者组相比,胰腺癌患者组M9-5适体与未稀释血清结合的比例显著升高,这与酶联免疫吸附试验的检测结果一致。作者认为这种功能化核酸适体能够特异性结合胰腺癌的生物标志物,可以作为胰腺癌早期检测的工具。甘聚糖3(GPC3)是肝细胞系表面生物标志物^[63]。Zhang等^[64]利用GPC3作为蛋白靶点,通过六字母的GACTZP文库进行基于细胞的体外筛选实验,筛选出含P-Z碱基对的功能化核酸适体。这些功能化核酸适体可以用来区分细胞是否含GPC3蛋白,因此可能对肝癌的治疗产生一定的作用。以上研究表明,核酸适体的功能化可以丰富核酸适体的结构和功能,增强核酸适体与靶标分子间的结合亲和力。因此,利用功能化核酸适体可以有效识别和检测生物标志物。

肿瘤相关细胞膜蛋白靶点的识别对于了解肿瘤进展、开发新的诊断工具以及识别新的治疗靶点具有重要意义^[64,65]。细胞膜表面表达异常的蛋白可作为肿瘤诊断、治疗和预后评估的生物标志物,然而目前由于缺少有效的技术,细胞表面生物标志物的发现仍处于初期阶段^[66-68]。随着核酸适体筛选技术、质谱技术等不断发展,研究者陆续发现了一些新的肿瘤细胞表面生物标志物,如黏集素C、免疫球蛋白M(IgM)等。Mallikaratchy等^[69]在对B细胞白血病的研究中,发现了一种能特异性识别Burkitt淋巴瘤

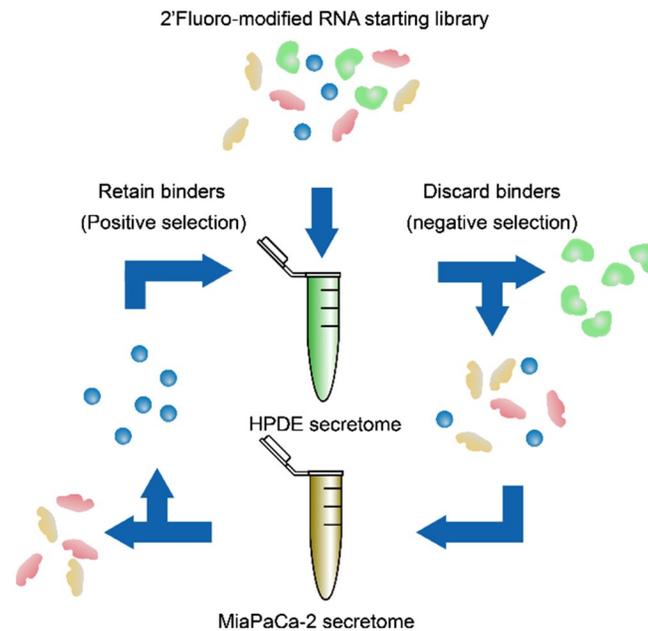


Fig. 5 Scheme of “positive/negative” SELEX strategy

Positive selection: human pancreatic ductal adenocarcinoma cell line MiaPaCa-2; negative selection: human pancreatic ductal epithelial cell line HPDE-E6E7.

细胞系 Ramos 细胞的功能化核酸适体 TD05。首先引入光活性尿嘧啶衍生物对 TD05 进行功能化，使其细胞膜上的靶标蛋白进行共价交联，增强核酸适体与靶标蛋白间的结合亲和力。接着利用链霉亲和素磁珠结合核酸适体捕获并富集靶标蛋白，最后将收集的蛋白进行质谱分析，确定了 TD05 的靶蛋白是 IgM 重链区。IgM 是 Burkitt 淋巴瘤中表达的 B 细胞受体复合物的主要成分，是 Burkitt 淋巴瘤的潜在标志物。这项研究表明，开发高质量的适体探针并鉴定其靶蛋白可用于发现新的与疾病相关的潜在标志物，从而提高肿瘤的诊断和治疗水平。

2.2 肿瘤治疗药物识别与开发

目前，肿瘤是危害人类健康的主要杀手。虽然已经开发出各种肿瘤治疗药物，但仍因药物成本高、多药耐药等问题阻碍其进一步应用。因此，有必要开发更安全、更有效的治疗药物^[70,71]。核酸适体能与靶标分子选择性结合，进一步封闭靶标的活性位点从而抑制其生物学功能，可作为肿瘤治疗的有效药物^[15,72]。功能化核酸适体可进一步丰富其识别对象，增强与靶标间的结合亲和力，因此功能化核酸适体有很大潜力通过识别药物分子指示药物设计，甚至作为治疗新药用于肿瘤治疗。

喜树碱是一种植物抗癌药物，对肠胃道和头颈部癌等有较好的疗效^[73]。Imaizumi 等^[74]针对喜树碱衍生物 1(CPT1)进行了 2 个独立的 SELEX 实验，一个使用天然 DNA 文库筛选得到天然的核酸适体作为对照，另一个使用修饰的 DNA 文库，其中利用 *N*-[2-(*N*⁶腺嘌呤基)乙基]氨基甲酰基乙烯基修饰的尿嘧啶替代胸腺嘧啶，进行筛选得到相应的功能化核酸适体。在尿嘧啶的 C5 位上引入化学官能团 *N*-[2-(*N*⁶腺嘌呤基)乙基]氨基甲酰基乙烯基，有望增加分子间和分子内氢键及堆积相互作用的形成，进一步增强核酸适体的识别能力。与筛选得到的天然核酸适体相比，功能化核酸适体对 CPT1 具有更高的结合亲和力，证明了碱基修饰对亲和力增强的卓越功效，以及非天然核酸文库在开发小分子适体方面的实用性。该功能化适体可以有效识别 CPT1 这一有效的抗肿瘤药物，具有巨大的应用潜力。

近来的研究表明，功能化核酸适体可直接用于肿瘤治疗，且具有优异的治疗效果^[75,76]。AS1411 是一种能够特异性结合肿瘤细胞表面核仁蛋白的 DNA 适体，可以诱导肿瘤细胞凋亡而不影响正常细胞的生理活性。然而，AS1411 的稳定性较差，限制了其在肿瘤治疗上的应用。Yang 等^[77]通过插入 2'-脱氧肌苷(2'-dI)提高了适体 AS1411 的稳定性[图 6(A)和表 2]。功能化的 AS1411 适体可以通过阻断 DNA 复制来抑制乳腺癌细胞的增殖，从而达到治疗肿瘤的目的[图 6(B)和(C)]。基于此，Yang 等^[78]还进行了

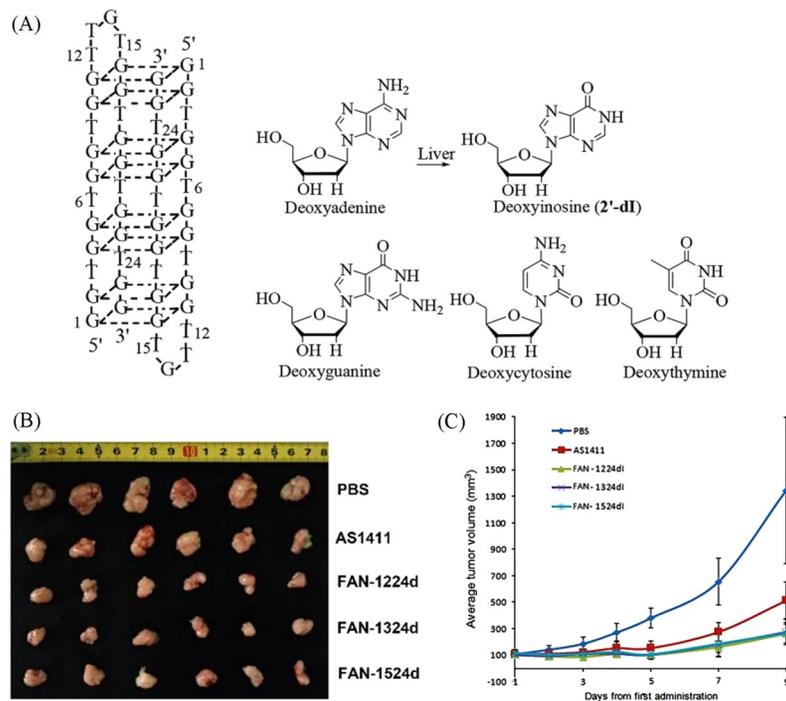


Fig. 6 The structure diagram of 2'-deoxynucleosides and AS1411(A), photographs of the dissected tumors after treated with AS1411 or functionalized AS1411(B) and average tumor volume after treated with AS1411 or functionalized AS1411(C)^[77]

Copyright 2016, Springer Nature.

更深入的研究,发现在AS1411中插入*D*-/*L*-异胸苷(*D*-/*L*-isoT)能进一步提高AS1411的稳定性,表现出更强的肿瘤抑制能力(表3)。干扰素- γ 是一种抗肿瘤细胞因子,但易引起自身的不良免疫反应,因此有必要开发与干扰素- γ 结合的物质来中和抗体^[79,80]。Matsunaga等^[81]利用Ds-Px非天然碱基对修饰的DNA适体靶向干扰素- γ ,抑制干扰素- γ 的生物活性。功能化DNA适体增强了适体的相容性和稳定性,可减少治疗时的不良免疫反应,有利于实现温和的肿瘤治疗。综上所述,功能化核酸适体能够显著提高其与靶标分子间的亲和力和选择性,可作为有效、安全的肿瘤治疗药物。

Table 2 Sequences of AS1411 and 2'-dI modified AS1411s

Aptamer	Sequence(5'-3')	Aptamer	Sequence(5'-3')
AS1411	ggg ggt ggt ggt tgt ggt ggt ggt gg	FAN-1324dI	ggg ggt ggt ggt dIgt ggt ggt ggdI gg
FAN-1224dI	ggg ggt ggt ggdI tgt ggt ggt ggdI gg	FAN-1524dI	ggg ggt ggt ggt tgdI ggt ggt ggdI gg

Table 3 Binding parameters for the affinity of *D*-/*L*-isoT(T_p/T_l) and/or 2'-dI modified AS1411 for nucleolin

Aptamer	$K_p/(\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1})$	Aptamer	$K_p/(\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1})$
AS1411	148.0	FCL-I($6_L/12_D$)	9.56
12_D	31.9	FCL-II($6_L/12_D/24_{dI}$)	4.7

3 总结与展望

自SELEX技术开发以来,已通过该技术筛选得到了能特异性结合小分子和生物大分子等靶标的核酸适体。这些核酸适体作为新型的分子识别工具,已经广泛应用到生物医学的研究中。近年来,由于天然核酸适体的功能多样性有限,人们对功能化核酸适体进行了探索,发现将功能结构单元整合到核酸适体中有望赋予其新的结构和更多的功能。基于此,进化出人工扩展遗传系统的SELEX方法,并将筛选得到的功能化核酸适体应用于生物医学等多个领域。本文主要介绍了功能化核酸适体的筛选方法

及其在生物医学方面的应用, 尽管目前已经取得了一些进展, 但仍有诸多问题需要解决: (1) SELEX 是一项复杂的技术, 筛选过程中会受到多种因素的影响, 如温度、缓冲液和离子强度等. 有时即使经过多轮筛选, 最终文库中的高丰度序列还是无法特异性结合目标分子. 针对目前核酸适体筛选效率较低这一问题, 有必要进一步研究核酸适体的筛选机理, 从根本上推动筛选技术的进步. 由于 SELEX 过程涉及核酸序列和靶标分子间复杂的相互作用, 使用机器学习算法可以帮助评估核酸适体在筛选过程中受到的多种因素的综合影响, 对于提高筛选效率具有一定的指导意义. (2) 在核酸中引入新的功能基团、开发非天然核苷酸对于功能化核酸适体的发展和应用具有重要意义. 然而, 目前用于功能化核酸适体的功能基团以及非天然碱基或碱基对种类十分有限, 所研究的功能化核酸适体的种类和数量也很少. 设计新的功能基团, 或尝试结合多种不同的功能基团对核酸适体进行功能化, 有望进一步增加核酸适体的结构和功能多样性, 提高其应用潜力. (3) 功能化核酸适体在活细胞和活体动物模型中已经取得良好的应用结果, 然而在实际应用中仍缺乏结构生物学的理论支持和大量临床样本的数据支撑. 因此, 对于核酸适体未来的实际应用还需要进一步的深入研究. 总之, 功能化核酸适体筛选技术的发展使其在生物医学等领域展现出前所未有的优势, 在未来的生命分析科学中将成为不可或缺分子识别工具.

参 考 文 献

- [1] Ng E. W., Shima D. T., Calias P., Cunningham E. T. Jr., Guyer D. R., Adamis A. P., *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2006**, 5(2), 123—132
- [2] Sefah K., Shangguan D., Xiong X., O'Donoghue M. B., Tan W., *Nat. Protoc.*, **2010**, 5(6), 1169—1185
- [3] Mayer G., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, 48(15), 2672—2689
- [4] Russo Krauss I., Spiridonova V., Pica A., Napolitano V., Sica F., *Nucleic Acids Res.*, **2016**, 44(2), 983—991
- [5] Hermann T., Patel D. J., *Science*, **2000**, 287(5454), 820—825
- [6] Mascini M., Palchetti I., Tombelli S., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, 51(6), 1316—1332
- [7] Opazo F., Levy M., Byrom M., Schafer C., Geisler C., Groemer T. W., Ellington A. D., Rizzoli S. O., *Nat. Methods*, **2012**, 9(10), 938—939
- [8] Zhu G., Ye M., Donovan M. J., Song E., Zhao Z., Tan W., *Chem. Commun.*, **2012**, 48(85), 10472—10480
- [9] Guan B., Zhang X., *Int. J. Nanomed.*, **2020**, 15, 1059—1071
- [10] Zhou J., Rossi J. J., *Mol. Ther.—Nucleic Acids*, **2014**, 3, e169
- [11] Li L., Xu S., Yan H., Li X., Yazd H. S., Li X., Huang T., Cui C., Jiang J., Tan W., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2021**, 60(5), 2221—2231
- [12] Sun H., Zhu X., Lu P. Y., Rosato R. R., Tan W., Zu Y., *Mol. Ther.—Nucleic Acids*, **2014**, 3, e182
- [13] Sun H., Zu Y., *Small*, **2015**, 11(20), 2352—2364
- [14] 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
- [15] Tan J., Zhao M., Wang J., Li Z., Liang L., Zhang L., Yuan Q., Tan W., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2019**, 58(6), 1621—1625
- [16] Li L., Xu S., Yan H., Li X., Yazd H. S., Li X., Huang T., Cui C., Jiang J., Tan W., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2021**, 60(5), 2221—2231
- [17] Lipi F., Chen S., Chakravarthy M., Rakesh S., Veedu R. N., *RNA Biol.*, **2016**, 13(12), 1232—1245
- [18] Shen R., Tan J., Yuan Q., *ACS Appl. Bio Mater.*, **2020**, 3(5), 2816—2826
- [19] Tolle F., Brandle G. M., Matzner D., Mayer G., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, 54(37), 10971—10974
- [20] Kimoto M., Yamashige R., Matsunaga K., Yokoyama S., Hirao I., *Nat. Biotechnol.*, **2013**, 31(5), 453—457
- [21] Eissa S., Siddiqua A., Chinnappan R., Zourob M., *ACS Appl. Bio Mater.*, **2019**, 2(6), 2624—2632
- [22] Zhuo Z., Yu Y., Wang M., Li J., Zhang Z., Liu J., Wu X., Lu A., Zhang G., Zhang B., *Int. J. Mol. Sci.*, **2017**, 18(10), 2142
- [23] Zhu Z., Song Y., Li C., Zou Y., Zhu L., An Y., Yang C. J., *Anal. Chem.*, **2014**, 86(12), 5881—5888
- [24] Da Rocha Gomes S., Miguel J., Azema L., Eimer S., Ries C., Dausse E., Loiseau H., Allard M., Toulme J. J., *Bioconjug. Chem.*, **2012**, 23(11), 2192—2200
- [25] Gordon C. K. L., Wu D., Pusuluri A., Feagin T. A., Csordas A. T., Eisenstein M. S., Hawker C. J., Niu J., Soh H. T., *ACS Chem. Biol.*, **2019**, 14(12), 2652—2662
- [26] Duo J., Chiriac C., Huang R. Y., Mehl J., Chen G., Tymiak A., Sabbatini P., Pillutla R., Zhang Y., *Anal. Chem.*, **2018**, 90(8), 5162—5170
- [27] Tolle F., Rosenthal M., Pfeiffer F., Mayer G., *Bioconjug. Chem.*, **2016**, 27(3), 500—503
- [28] Latham J. A., Johnson R., Toole J. J., *Nucleic Acids Res.*, **1994**, 22(14), 2817—2822
- [29] Lauridsen L. H., Rothnagel J. A., Veedu R. N., *ChemBioChem*, **2012**, 13(1), 19—25
- [30] Vaught J. D., Bock C., Carter J., Fitzwater T., Otis M., Schneider D., Rolando J., Waugh S., Wilcox S. K., Eaton B. E., *J. Am. Chem.*

- Soc.*, **2010**, *132*(12), 4141—4151
- [31] Arca M., *Recenti Prog. Med.*, **2019**, *110*(9), 401—411
- [32] Cariou B., Le May C., Costet P., *Atherosclerosis*, **2011**, *216*(2), 258—265
- [33] Yang Z., Chen F., Alvarado J. B., Benner S. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*(38), 15105—15112
- [34] Pfeiffer F., Rosenthal M., Siegl J., Ewers J., Mayer G., *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2017**, *48*, 111—118
- [35] Joyce C. M., Steitz T. A., *Annu. Rev. Biochem.*, **1994**, *63*, 777—822
- [36] Chen T., Hongdilokkul N., Liu Z., Adhikary R., Tsuen S. S., Romesberg F. E., *Nat. Chem.*, **2016**, *8*(6), 556—562
- [37] Chen T., Romesberg F. E., *J. Am. Chem. Soc.*, **2017**, *139*(29), 9949—9954
- [38] Chen T., Romesberg F. E., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2017**, *56*(45), 14046—14051
- [39] Liu Z., Chen T., Romesberg F. E., *Chem. Sci.*, **2017**, *8*(12), 8179—8182
- [40] Shao Q., Chen T., Sheng K., Liu Z., Zhang Z., Romesberg F. E., *J. Am. Chem. Soc.*, **2020**, *142*(5), 2125—2128
- [41] Thirunavukarasu D., Chen T., Liu Z., Hongdilokkul N., Romesberg F. E., *J. Am. Chem. Soc.*, **2017**, *139*(8), 2892—2895
- [42] Hirao I., Kimoto M., Lee K. H., *Biochimie*, **2018**, *145*, 15—21
- [43] Dien V. T., Morris S. E., Karadeema R. J., Romesberg F. E., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2018**, *46*, 196—202
- [44] Kimoto M., Kawai R., Mitsui T., Yokoyama S., Hirao I., *Nucleic Acids Res.*, **2009**, *37*(2), e14
- [45] Hamashima K., Soong Y. T., Matsunaga K. I., Kimoto M., Hirao I., *ACS Synth. Biol.*, **2019**, *8*(6), 1401—1410
- [46] Matsunaga K. I., Kimoto M., Hirao I., *J. Am. Chem. Soc.*, **2017**, *139*(1), 324—334
- [47] Zhang Z., Liu J., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2016**, *8*(10), 6371—6378
- [48] Fukunishi H., Shimada J., Shiraishi K., *Biochem.*, **2012**, *51*(12), 2597—2605
- [49] Qu L., Qiao X., Qi F., Nishida N., Hoshino T., *J. Chem. Inf. Model.*, **2021**, *61*(5), 2396—2406
- [50] Zhou J., Battig M. R., Wang Y., *Anal. Bioanal. Chem.*, **2010**, *398*(6), 2471—2480
- [51] Pashchenko O., Shelby T., Banerjee T., Santra S., *ACS Infect. Dis.*, **2018**, *4*(8), 1162—1178
- [52] Kang S., Hah S. S., *Bioconjug. Chem.*, **2014**, *25*(8), 1421—1427
- [53] Drabik A., Ner-Kluza J., Mielczarek P., Civit L., Mayer G., Silberring J., *J. Proteome Res.*, **2018**, *17*(6), 2174—2181
- [54] Ni S., Zhuo Z., Pan Y., Yu Y., Li F., Liu J., Wang L., Wu X., Li D., Wan Y., Zhang L., Yang Z., Zhang B. T., Lu A., Zhang G., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2021**, *13*(8), 9500—9519
- [55] Wang J., Fang X., Zhang C., Ji H., Pang Q., Li X., Luo Z., Wu Q., Zhang L., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2021**, *13*(14), 16118—16126
- [56] Yi K., Rong Y., Huang L., Tang X., Zhang Q., Wang W., Wu J., Wang F., *ACS Sens.*, **2021**, *6*(4), 1418—1429
- [57] Canoura J., Yu H., Alkhamis O., Roncancio D., Farhana R., Xiao Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **2021**, *143*(2), 805—816
- [58] Huang J., Chen X. X., Fu X. K., Li Z., Huang Y. H., Liang C., *Front. Cell Dev. Biol.*, **2021**, *9*, 659760
- [59] Califf R. M., *Exp. Biol. Med.*, **2018**, *243*(3), 213—221
- [60] Shanguan D., Cao Z. H., Meng L., Mallikaratchy P., Sefah K., Wang H., Li Y., Tan W. H., *J. Proteome Res.*, **2008**, *7*(5), 2133—2139
- [61] Werner J., Combs S. E., Springfield C., Hartwig W., Hackert T., Buchler M. W., *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, **2013**, *10*(6), 323—333
- [62] Ray P., Rialon-Guevara K. L., Veras E., Sullenger B. A., White R. R., *J. Clin. Invest.*, **2012**, *122*(5), 1734—1741
- [63] Liu B., Bell A. W., Paranjpe S., Bowen W. C., Khillan J. S., Luo J. H., Mars W. M., Michalopoulos G. K., *Hepatology*, **2010**, *52*(3), 1060—1067
- [64] Liu X., Mao D., Deng G., Song Y., Zhang F., Yang S., Li G., Liu F., Cao W., Zhu X., *Theranostics*, **2020**, *10*(10), 4410—4421
- [65] Imai K., Hirata S., Irie A., Senju S., Ikuta Y., Yokomine K., Harao M., Inoue M., Tsunoda T., Nakatsuru S., Nakagawa H., Nakamura Y., Baba H., Nishimura Y., *Clin. Cancer Res.*, **2008**, *14*(20), 6487—6495
- [66] Kumar S., Mohan A., Guleria R., *Biomarkers*, **2006**, *11*(5), 385—405
- [67] Shukla H. D., Vaitiekunas P., Cotter R. J., *Proteomics*, **2012**, *12*(19/20), 3085—104
- [68] Zhong L., Liu Y., Wang K., He Z., Gong Z., Zhao Z., Yang Y., Gao X., Li F., Wu H., Zhang S., Chen L., *BMC Cancer*, **2018**, *18*(1), 911
- [69] Mallikaratchy P., Tang Z., Kwame S., Meng L., Shanguan D., Tan W., *Mol. Cell. Proteomics*, **2007**, *6*(12), 2230—2238
- [70] Kerbel R. S., *Bioessays*, **1991**, *13*(1), 31—36
- [71] Creixell M., Peppas N. A., *Nano Today*, **2012**, *7*(4), 367—379
- [72] Wang J., Wei Y., Hu X., Fang Y. Y., Li X., Liu J., Wang S., Yuan Q., *J. Am. Chem. Soc.*, **2015**, *137*(33), 10576—10584
- [73] Thomas C. J., Rahier N. J., Hecht S. M., *Bioorg. Med. Chem.*, **2004**, *12*(7), 1585—1604
- [74] Imaizumi Y., Kasahara Y., Fujita H., Kitadume S., Ozaki H., Endoh T., Kuwahara M., Sugimoto N., *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*(25), 9412—9419
- [75] Trujillo C. A., Nery A. A., Alves J. M., Martins A. H., Ulrich H., *Clin. Ophthalmol.*, **2007**, *1*(4), 393—402
- [76] Gutsaeva D. R., Parkerson J. B., Yerigenahally S. D., Kurz J. C., Schaub R. G., Ikuta T., Head C. A., *Blood*, **2011**, *117*(2), 727—735
- [77] Fan X., Sun L., Wu Y., Zhang L., Yang Z., *Sci. Rep.*, **2016**, *6*(1), 25799
- [78] Fan X., Sun L., Li K., Yang X., Cai B., Zhang Y., Zhu Y., Ma Y., Guan Z., Wu Y., Zhang L., Yang Z., *Mol. Ther. —Nucleic Acids*, **2017**, *9*, 218—229
- [79] Ruddle N. H., *J. Immunol.*, **1986**, *136*(6), 2335—2336

- [80] Shalaby M. R., Aggarwal B. B., Rinderknecht E., Svedersky L. P., Finkle B. S., Palladino M. A. Jr., *J. Immunol.*, **1985**, 135(3), 2069—2073
- [81] Matsunaga K., Kimoto M., Hanson C., Sanford M., Young H. A., Hirao I., *Sci. Rep.*, **2015**, 5, 18478

Selection of Functionalized Aptamers and Their Applications in Molecular Recognition[†]

JI Cailing, CHENG Xing, TAN Jie*, YUAN Quan*

(*Institute of Chemical Biology and Nanomedicine, College of Chemistry and Chemical Engineering, State Key Laboratory of Chemo/Biosensing and Chemometrics, Hunan University, Changsha 410082, China*)

Abstract Aptamers are single-stranded oligonucleotides selected from oligonucleotide libraries. Due to their specific molecular binding ability, aptamers have been employed as molecular recognition tools and have been widely used in biomedicine. The finite chemical composition of natural nucleic acid libraries limits the structure and function of aptamers, thus restricting the applications of aptamers in molecular recognition. Functionalized aptamers introduce specific chemical functional groups to endow nucleic acid sequences with rich spatial conformation and new properties, enhancing their molecular recognition capabilities. However, functionalized nucleic acids are difficult to be compatible with nucleic acid amplification methods, making it difficult for traditional selection protocols to screen functionalized nucleic acids. Therefore, optimizing the selection strategies is essential to obtain functionalized aptamers with excellent performance. This review summarizes the selection methods of functionalized aptamers, and introduces the application of functionalized aptamers as molecular recognition tools in the field of biomedicine.

Keywords Functionalized aptamer; Selection; Amplification; Molecular recognition

(Ed.: N, K)

[†] Supported by the National Natural Science Foundation of China (No.21904037) and the Natural Science Foundation of Hunan Province, China (Nos.2020JJ5038, 2020JJ4173).