

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00432

• 综述 •

## SELEX 技术的靶标范围拓展

徐发良<sup>1\*</sup>, 肖 觉<sup>2</sup>

1. 重庆市肿瘤医院、重庆市肿瘤研究所乳腺疾病治疗中心, 重庆 400030
2. 重庆市肿瘤医院、重庆市肿瘤研究所病理科, 重庆 400030

**[摘要]** 靶标范围的不断拓展是指指数富集的配体系统进化(SELEX)技术和其他随机文库技术(如噬菌体表面展示技术等)的显著特征之一。经过 20 多年的发展,SELEX 的靶标已经拓展到包括金属离子、各种有机小分子、药物、蛋白质等生物大分子、致病微生物、活细胞和组织等在内的多种形式,以细胞和组织为靶标的 SELEX 筛选策略在肿瘤靶向诊断和治疗的研究中也得到了初步应用,本文综述了 SELEX 技术的靶标拓展情况。

**[关键词]** SELEX 适体技术;随机寡核酸文库;靶标;适配体

**[中图分类号]** R 349.8 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)04-0432-04

### Expanding targets for systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX)

XU Fa-liang<sup>1\*</sup>, XIAO Jue<sup>2</sup>

1. Treatment Centre of Breast Diseases, Chongqing Cancer Hospital and Institute, Chongqing 400030, China
2. Department of Pathology, Chongqing Cancer Hospital and Institute, Chongqing 400030, China

**[Abstract]** The continuous expanding of targets is a distinct character of systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) technique and other random library technologies (such as phage display technology). Over the past 20 years the targets of SELEX have expanded to various metal ions, organic molecules, drugs, proteins and biomacromolecules, pathogenic bacteria, live cells and tissue slide. The SELEX screenings using live cells and tissue slide as targets have been preliminarily applied for studying targeted diagnosis and treatment of cancers. This paper reviews the expansion of the targets of SELEX technique.

**[Key words]** SELEX aptamer technique; random oligonucleotide library; target; aptamer

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(4):432-435]

指数富集的配体系统进化(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)技术是一种筛选蛋白质分子高亲和力核酸配体的技术<sup>[1]</sup>,该技术自问世以来就以获得高特异性、高亲和力结合于靶分子的寡核苷酸配体而备受关注,目前已发展得更省时、高效,甚至实现了实验流程的自动化。SELEX 相关领域的发展是多方位的,主要包括 SELEX 技术本身的发展和改进、SELEX 靶标的扩展、核酸适配体的修饰及应用领域拓展、有关适配体识别和结合机制的分析研究,以及在蛋白质组学中结合现象的研究等。SELEX 技术的相关发展有力地促进了该技术获得的核酸适配体在更多领域的广泛应用,它在基因治疗、肿瘤靶向诊断和靶向治疗中的应用前景已经成为生物医药领域广泛关注的热点。近 20 年来,SELEX 技术的靶标在很大程度上得到了拓展,本

文就 SELEX 技术的靶标拓展情况作一简要综述。

#### 1 SELEX 与 Aptamer(适配体)简介

1990 年, Tuerk 和 Gold<sup>[1]</sup>报道了一种全新的筛选蛋白质分子高亲和力核酸配体的技术,即 SELEX。同年, Ellington 和 Szostak<sup>[2]</sup>用随机 RNA 序列文库体外筛选到能与有机染料结合的 RNA 分子,并将这种功能性核酸命名为“aptamer”。此后,用 SELEX 技术筛选获得的核酸配体被称为适体或适配体(aptamer),其英文来源于拉丁语“aptus”,意即“合适的、适当的”。这种经过多轮指数富集筛选而得到的靶分子配体具有类似于抗体但明显优于抗体的诸多特性,如亲和力更高、特异性更强、可克隆测序、分子更小、免疫原性小、易于人工大量合成、易被标记和修饰等。

**[收稿日期]** 2011-07-07 **[接受日期]** 2012-03-12

**[基金项目]** 重庆市科委科技攻关计划项目(CSTC, 2010AC5132)和重庆市卫生局医学科研项目(2010-1-55, 2009-2-122)。Supported by Grants for Tackling Key Program of Chongqing Science and Technology Committee (CSTC, 2010AC5132) and Medical Science Research Project of Chongqing Municipal Health Bureau (2010-1-55, 2009-2-122).

**[作者简介]** 徐发良, 博士, 副教授、副主任医师, 硕士生导师。

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 023-65075670, E-mail: flxu88@163.com

SELEX 属于组合化学技术,它以靶标为基础从 RNA/DNA 随机库开始,通过多轮亲和和筛选后将结合于靶标的核酸配体复制扩增,再在体外转换成富集的 RNA/DNA 库,以进入新一轮筛选,最终获取高亲和力、高特异性的核酸适配体。基于对靶标的高特异性和高亲和力结合,核酸适配体现已应用于基础研究、药物筛选、基因工程、临床诊断和临床治疗,并具有日趋广泛的应用前景。在近 20 年的发展历程中,SELEX 的靶标从最初的蛋白质分子开始,已经得到相当广泛的拓展(图 1)。

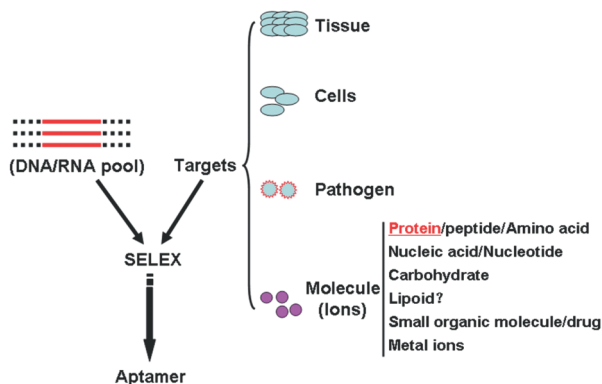


图 1 SELEX 技术的靶标拓展

Fig 1 Expansion of targets for SELEX technique

SELEX: Systematic evolution of ligands by exponential enrichment

## 2 分子或金属离子作为靶标

蛋白质分子是 SELEX 技术的主要靶标。SELEX 技术首次被报道时,所采用的靶标 T<sub>4</sub> DNA 聚合酶就是典型的蛋白质分子<sup>[1]</sup>,此后绝大多数 SELEX 筛选都直接或间接地以蛋白质分子作为靶标。基因组学时代之后是蛋白质组学时代,蛋白质是大部分生物学功能的执行者,蛋白质类靶标理所当然地成为了 SELEX 技术的主要分子靶标。为获得高特异性、高亲和力的核酸适配体,SELEX 技术对所用蛋白质靶标的基本要求是纯度高、数量足。因此,靶标蛋白的制备和纯化就成为限制 SELEX 技术广泛应用的重要原因之一。对于未知蛋白,不可能作为 SELEX 靶标进行适配体筛选;对于某些新发现的已知蛋白,获取纯品的困难也可能在一定程度上限制 SELEX 技术的应用。这些客观原因在很大程度上成为促进人们拓展经典的蛋白类 SELEX 靶标的原始动力。

碳水化合物作为 SELEX 靶标的筛选已经获得成功。碳水化合物大致分为单糖、低聚糖、多糖、糖蛋白中的多聚糖等。早在 1998 年,有人以半乳糖、葡萄糖和甘露糖等单糖作为靶标进行 SELEX 筛选并获得了 RNA 适配体,这种适配体能从其他单糖中识别半乳糖,但亲和力较低(解离常数 K<sub>d</sub> 介于 10<sup>-4</sup> 至 10<sup>-5</sup> mol/L)<sup>[3]</sup>;以纤维二糖为靶标筛选的适配体解离常数得到明显提高(K<sub>d</sub> 介于 10<sup>-5</sup> 至 10<sup>-7</sup> mol/L)<sup>[4]</sup>;而以四聚糖为靶标从 RNA 随机库中获得的适配体亲和力比原始库 RNA 高 1 000 倍<sup>[5]</sup>,与同族糖结合的特异性高于其他任

意类似糖,且与靶糖的结合能抑制细胞黏附反应,提示高特异性、高亲和力结合碳水化合物的适配体在一定程度上可以替代相应抗体(K<sub>d</sub> 介于 10<sup>-8</sup> 至 10<sup>-11</sup> mol/L);以脂多糖(LPS)为靶标进行 SELEX 筛选获得适配体的 K<sub>d</sub> 为 10<sup>-9</sup> mol/L<sup>[6]</sup>。Li 等<sup>[7]</sup>以糖蛋白模型分子纤维素蛋白原(fibrinogen)为靶标,筛选出的 DNA 适配体能高亲和力结合糖蛋白并能识别糖基化位点(K<sub>d</sub> 介于 nmol/L 数量级)。这些研究表明,SELEX 的靶标从单糖到多糖,直至糖蛋白等逐步复杂化的过程中,所获适配体的亲和力也逐渐升高,提示靶标结构越复杂,适配体的亲和力可能越高。

核酸类分子作为靶标进行 SELEX 筛选具有相当的技术难度。由于种种原因,多数 SELEX 筛选一般都采用非核酸类靶标<sup>[8]</sup>。最近,基于靶向双链 DNA 的寡核苷酸序列可能具有潜在治疗效应的推论,有研究采用双链 DNA 作为靶标成功进行了 SELEX 筛选。Ayel 等<sup>[9]</sup>建立了一种以双链 DNA 为靶标的通用 SELEX 筛选方案,他们在加入三股螺旋稳定剂(6-氨基-9-甲基-13H-苯心得静啉啉衍生物)的前提下以 133 bp 双链 DNA 为靶标,设计 70 bp 的双链 DNA 反向筛选步骤以消除筛选过程的人工假象,经过 7 轮筛选,获得了特异性结合于双链 DNA 的单链 DNA 适配体;其中的三股螺旋稳定剂能将解链温度提高到 40°C,并增强三股螺旋结构的稳定性。无独有偶,Srisawat 等<sup>[10]</sup>则采用随机 RNA 文库,以 HIV-1 病毒的 3' 端长末端重复(long terminal repeat, LTR)双链 DNA 为靶标进行 SELEX 筛选,获得了特异性结合于 LTR 的 RNA 适配体,这些适配体按照结构特点被分成 4 组,均能识别特定序列的双链 DNA。

SELEX 的分子靶标除了蛋白质、蛋白质复合体结构、碳水化合物、核酸和复合物靶标等生物大分子外,更多的是有机小分子、辅因子、氨基酸、抗生素及其他药物分子、多肽、核苷酸及其衍生物等<sup>[11]</sup>。但针对脂类分子的 SELEX 筛选尚未见报道。

在分子靶标 SELEX 日趋增多的同时,以金属离子作为靶标进行的 SELEX 体外筛选也获得了成功。Wrzesinski 等<sup>[12]</sup>以 Co<sup>2+</sup> 离子为靶标进行体外筛选获得两个适配体,尽管体外筛选过程以 Co<sup>2+</sup> 作为靶标,但这两个适配体都表现出较宽泛的特异性,它们对 Zn<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup> 和 [Co(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>]<sup>3+</sup> 也具有亲和力。无独有偶,早期采用 Zn<sup>2+</sup> 和 Ni<sup>2+</sup> 为靶标进行的 SELEX 筛选,也体现了适配体对靶标识别的相对宽容性<sup>[13-14]</sup>。这些结果提示,以金属离子作为靶标进行 SELEX 筛选所获适配体的特异性可能并不十分严格,靶标结构越简单,适配体的特异性可能越差。

## 3 病原体及其产物作为靶标

直接以病原体为靶标进行筛选是 SELEX 技术进入临床应用基础研究的重要标志。有研究以结核杆菌有毒菌株 H37Rv 进行 SELEX 筛选,获得高亲和力、高特异性适配体 NK2, NK2 通过与 H37Rv 结合能促进 CD4<sup>+</sup> T 产生干扰素,并延长注射 H37Rv 动物的生存期,动物脾脏内细菌数量显

著下降,减少了肺泡肿胀和肺泡融合的发生,提示 NK2 可抑制结核菌活性,可用于抗分支杆菌治疗<sup>[15]</sup>。Hamula 等<sup>[16]</sup>以悬浮活细菌为靶标建立了一种新的 SELEX 技术以筛选靶向细胞表面多分子的 DNA 适配体,他们选择表面富含多个表面分子(潜在的靶标)的嗜酸乳杆菌为靶标,经过 6~8 轮 SELEX 筛选获得的适配体具有高亲和力、高特异性,能高亲和力结合于乳酸杆菌表面,靶向结合于细菌表面的 S-层蛋白。Dwivedi 等<sup>[17]</sup>以空肠弯曲菌为靶标进行 SELEX 筛选,获得的适配体能有效识别空肠弯曲菌,采用这种方法对致病菌进行识别,无需事先对靶标分子进行分离纯化。

LPS 是革兰阴性细菌的重要致病因子。Bruno 等<sup>[18]</sup>采用大肠杆菌(*E. coli* O111:B4)来源的 LPS 为靶标成功获得了适配体,该适配体不但能结合 LPS,也能结合大肠杆菌并具有抗菌活性,可能具有治疗耐药性细菌感染的潜在价值。也有研究者采用 SELEX 技术筛选了 LPS 抑制性适配体,并观察了其在实验性脓毒症中的治疗效应,发现该适配体能抑制 NF- $\kappa$ B 活性,提高内毒素血症小鼠生存率<sup>[19]</sup>。

#### 4 真核细胞作为靶标

以完整的活细胞作为靶标的 SELEX 技术称为细胞 SELEX (cell SELEX)<sup>[20]</sup>,其技术流程主要包括靶细胞与核酸文库结合、收集靶细胞结合的核酸序列、用对照细胞进行负筛选以消除跟对照细胞结合的核酸序列、所得核酸序列经 PCR 扩增作为富集库进行下一轮筛选;最终获得高特异性、高亲和力结合于靶细胞的核酸适配体。目前,细胞 SELEX 已经在肿瘤靶向诊断和靶向治疗研究中取得了骄人的成果。

研究表明,以 T 细胞急性成淋巴细胞性白血病细胞株为靶标进行细胞 SELEX 筛选获得的核酸适配体,能识别所有培养的 T 细胞非白血病性白血病细胞株以及临床肿瘤患者的标本,而不与正常的造血细胞、淋巴瘤细胞和骨髓瘤细胞结合,从而实现了分子水平的瘤细胞识别,有助于肿瘤早期诊断<sup>[21]</sup>。与此相似,以卵巢癌、结直肠癌和肺癌细胞为靶标的核酸适配体也筛选成功<sup>[22-24]</sup>。值得重视的是,采用细胞 SELEX 技术筛选的核酸适配体经荧光标记后,还可实现体内肿瘤的示踪和显像,具有很高的特异性和灵敏度,并且这一过程无需事先明确靶细胞表面的分子表达和分布情况<sup>[25]</sup>。更有甚者,以急性白血病细胞为靶标进行 SELEX 筛选获得高特异性、高亲和力核酸适配体,通过偶联纳米磁珠/荧光二氧化硅纳米颗粒以增强适配体的敏感度和特异性,并借助纳米颗粒实现了从血液等复杂基质中选择性富集肿瘤细胞的目的,其中的荧光二氧化硅纳米颗粒则便于肿瘤细胞的高灵敏度检出,最后利用共聚焦显微镜对富集细胞的特异性进行验证。这种方法快速、低廉、灵敏度高,并可进行量化分析<sup>[26]</sup>。

细胞 SELEX 技术最大的优点在于直接以细胞为 SELEX 靶标进行筛选,无需事先对靶细胞表面表达的各种分子标志物进行分离鉴定。尽管如此,由于细胞表面分子标志物众多,靶标鉴定及实际筛选过程中条件和影响因素也很复

杂,并且可能受到细胞状态等的影响,其结果分析必然更复杂,要得到很好的适配体也不容易。

#### 5 病理组织作为靶标

以病理组织为靶标进行 SELEX 筛选称为“组织 SELEX”;组织 SELEX 技术无疑在细胞 SELEX 技术的基础上进一步简化了操作流程。与细胞 SELEX 类似,组织 SELEX 也无需事先对靶细胞表面表达的各种分子标志物进行分离鉴定。

Noma 等<sup>[27]</sup>报道了组织原位 SELEX 筛选方法,并通过适配体富集了多种靶标蛋白,他们用 PAGE 分离靶标蛋白后再以荧光标记适配体用作“抗体”进行蛋白质印迹分析,证明该方法能同时筛选出针对多个蛋白质分子的特异性适配体。Li 等<sup>[28]</sup>在乳腺癌研究中建立了一种全新的以石蜡组织切片为靶标的 SELEX。该研究以浸润性导管癌石蜡切片为靶标、以邻近的正常组织为对照,经过 12 轮筛选后获得单链 DNA 适配体 BC15;该适配体能有效识别组织切片和培养状态的乳腺癌细胞,与邻近肿瘤的细胞或正常细胞株仅有微弱结合。经磁珠分离、质谱仪解析和蛋白质印迹分析鉴定后,确认 BC15 的靶标是乳腺癌高表达的 hnRNP A1;利用 BC15 还可从其他病理类型的乳腺癌(小叶癌、导管癌、粉刺状癌及淋巴结转移癌)中检出导管癌细胞。该方法不但能鉴定肿瘤特异性靶标,更可用于开发诊断肿瘤的特异性分子探针。

#### 6 结 语

确定合适的靶标是 SELEX 筛选的关键和难点,靶标范围的不断拓展既是 SELEX 迅速发展的显著特征,也是 SELEX 应用拓展的重要标志。从金属离子、有机小分子到蛋白质、糖类和核酸等生物大分子,乃至病原体、真核动物细胞和病理组织切片,都可用作 SELEX 的靶标进行筛选。SELEX 筛选的目标是获取高亲和力、高特异性的适配体;以碳水化合物为靶标的 SELEX 筛选初步提示,靶标结构越复杂,适配体的亲和力可能越高;以金属离子为靶标的 SELEX 筛选提示,靶标结构越简单,适配体的特异性可能越差。

SELEX 靶标的每一次拓展都可能为实际应用带来革命性的流程简化;细胞和组织 SELEX 技术无需事先对靶细胞表面表达的各种分子标志物进行分离鉴定,可能成为肿瘤基础研究、靶向诊断和靶向治疗的新型技术手段。然而,以真菌、放线菌、衣原体、支原体、噬菌体、病毒或寄生虫等病原体为靶标,以及以脂类分子为靶标进行的 SELEX 筛选研究目前尚未见报道。

#### 7 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

#### [参 考 文 献]

- [1] Tuerk C,Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment:RNA ligands to bacteriophage T<sub>4</sub> DNA polymerase

- [1]. Science, 1990, 249: 505-510.
- [2] Ellington A D, Szostak J W. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands[J]. Nature, 1990, 346: 818-822.
- [3] Kawakami J, Kawase Y, Sugimoto N. *In vitro* selection of aptamers that recognize a monosaccharide[J]. Anal Chim Acta, 1998, 365(1-3): 95-100.
- [4] Yang Q, Goldstein I J, Mei H Y, Engelke D R. DNA ligands that bind tightly and selectively to cellobiose[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 5462-5467.
- [5] Jeong S, Eom T, Kim S, Lee S, Yu J. *In vitro* selection of the RNA aptamer against the Sialyl Lewis X and its inhibition of the cell adhesion[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 281: 237-243.
- [6] Ding J L, Gan S T, Ho B. Single-stranded DNA oligoaptamers: molecular recognition and LPS antagonism are length- and secondary structure-dependent[J]. J Innate Immun, 2009, 1: 46-58.
- [7] Li M, Lin N, Huang Z, Du L, Altier C, Fang H, et al. Selecting aptamers for a glycoprotein through the incorporation of the boronic acid moiety[J]. J Am Chem Soc, 2008, 130: 12636-12638.
- [8] Torres-Chavolla E, Alocilja E C. Aptasensors for detection of microbial and viral pathogens[J]. Biosens Bioelectron, 2009, 24: 3175-3182.
- [9] Ayel E, Escud C. *In vitro* selection of oligonucleotides that bind double-stranded DNA in the presence of triplex-stabilizing agents[J]. Nucleic Acids Res, 2010, 38: e31.
- [10] Srisawat C, Engelke D R. Selection of RNA aptamers that bind HIV-1 LTR DNA duplexes: strand invaders[J]. Nucleic Acids Res, 2010, 38: 8306-8315.
- [11] Stoltenburg R, Reinemann C, Strehlitz B. SELEX—a (r) evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands[J]. Biomol Eng, 2007, 24: 381-403.
- [12] Wrzesinski J, Ciesiolka J. Characterization of structure and metal ions specificity of Co<sup>2+</sup>-binding RNA aptamers[J]. Biochemistry, 2005, 44: 6257-6268.
- [13] Ciesiolka J, Gorski J, Yarus M. Selection of an RNA domain that binds Zn<sup>2+</sup>[J]. RNA, 1995, 1: 538-550.
- [14] Hofmann H P, Limmer S, Hornung V, Sprinzl M. Ni<sup>2+</sup>-binding RNA motifs with an asymmetric purine-rich internal loop and a G-A base pair[J]. RNA, 1997, 3: 1289-1300.
- [15] Chen F, Zhou J, Luo F, Mohammed A B, Zhang X L. Aptamer from whole-bacterium SELEX as new therapeutic reagent against virulent *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 357: 743-748.
- [16] Hamula C L, Zhang H, Guan L L, Li X F, Le X C. Selection of aptamers against live bacterial cells[J]. Anal Chem, 2008, 80: 7812-7919.
- [17] Dwivedi H P, Smiley R D, Jaykus L A. Selection and characterization of DNA aptamers with binding selectivity to *Campylobacter jejuni* using whole-cell SELEX[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2010, 87: 2323-2334.
- [18] Bruno J G, Carrillo M P, Phillips T. *In vitro* antibacterial effects of antilipopolysaccharide DNA aptamer-C1qrs complexes[J]. Folia Microbiol (Praha), 2008, 53: 295-302.
- [19] Wen A Q, Yang Q W, Li J C, Lv F L, Zhong Q, Chen C Y. A novel lipopolysaccharide-antagonizing aptamer protects mice against endotoxemia[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 382: 140-144.
- [20] Sefah K, Shangguan D, Xiong X, O'Donoghue M B, Tan W. Development of DNA aptamers using Cell-SELEX[J]. Nat Protoc, 2010, 5: 1169-1185.
- [21] Shangguan D, Cao Z C, Li Y, Tan W. Aptamers evolved from cultured cancer cells reveal molecular differences of cancer cells in patient samples[J]. Clin Chem, 2007, 53: 1153-1155.
- [22] Van Simaey D, López-Colón D, Sefah K, Sutphen R, Jimenez E, Tan W. Study of the molecular recognition of aptamers selected through ovarian cancer cell-SELEX[J]. PLoS One, 2010, 5: e13770.
- [23] Sefah K, Meng L, Lopez-Colon D, Jimenez E, Liu C, Tan W. DNA aptamers as molecular probes for colorectal cancer study[J]. PLoS One, 2010, 5: e14269.
- [24] Kunii T, Ogura S, Mie M, Kobatake E. Selection of DNA aptamers recognizing small cell lung cancer using living cell-SELEX[J]. Analyst, 2011, 136: 1310-1312.
- [25] Shi H, Tang Z, Kim Y, Nie H, Huang Y F, He X, et al. *In vivo* fluorescence imaging of tumors using molecular aptamers generated by cell-SELEX[J]. Chem Asian J, 2010, 5: 2209-2213.
- [26] Estévez M C, Huang Y F, Kang H, O'Donoghue M B, Bamrungsap S, Yan J, et al. Nanoparticle-aptamer conjugates for cancer cell targeting and detection[J]. Methods Mol Biol, 2010, 624: 235-248.
- [27] Noma T, Ikebukuro K, Sode K, Ohkubo T, Sakasegawa Y, Hachiya N, et al. Screening of DNA aptamers against multiple proteins in tissue[J]. Nucleic Acids Symp Ser (Oxf), 2005, 49: 357-358.
- [28] Li S, Xu H, Ding H, Huang Y, Cao X, Yang G, et al. Identification of an aptamer targeting hnRNP A1 by tissue slide-based SELEX[J]. J Pathol, 2009, 218: 327-336.