

- regulators of hematopoietic stem cell development downstream of Notch signaling[J]. J Exp Med, 2013, 210(1): 71-84.
- [13] Bernstein ID, Boyd RL, van den Brink MR. Clinical strategies to enhance posttransplant immune reconstitution [J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2008, 14(1): 94-99.
- [14] Sun J, Krawczyk CJ, Pearce EJ. Suppression of Th2 cell development by Notch ligands Delta1 and Delta4[J]. J Immunol, 2008, 180(3): 1655-1661.
- [15] Maillard I, Koch U, Dumortier A, et al. Canonical notch signaling is dispensable for the maintenance of adult hematopoietic stem cells[J]. Cell Stem Cell, 2008, 2(4): 356-366.
- [16] Radtke F, Macdonald HR, Tacchini-Cottier F. Regulation of innate and adaptive immunity by Notch[J]. Nat Rev Immunol, 2013, 13(6): 427-37.
- [17] Yashiro-Ohtani Y, Ohtani T, Pear WS. Notch regulation of early thymocyte development [J]. Semin Immunol, 2010, 22(5): 261-269.
- [18] Yuan JS, Kousis PC, Suliman S, et al. Functions of notch signaling in the immune system: consensus and controversies[J]. Annu Rev Immunol, 2010, 28(2): 343-365.
- [19] Bell JJ, Bhandoola A. The earliest thymic progenitors for T cells possess myeloid lineage potential[J]. Nature, 2008, 452(7188): 764-776.
- [20] Feyerabend TB, Terszowski G, Tietz A, et al. Deletion of Notch1 converts pro-T cells to dendritic cells and promotes thymic B cells by cell-extrinsic and cell-intrinsic mechanisms [J]. Immunity, 2009, 30(1): 67-79.
- [21] Sauma D, Ramirez A, Alvarez K, et al. Notch signalling regulates cytokine production by CD8⁺ and CD4⁺ T cells[J]. Scand J Immunol, 2012, 75(4): 389-400.
- [22] Aster JC, Bodnar N, Xu L, et al. Notch ankyrin repeat domain variation influences leukemogenesis and Myc transactivation[J]. PLoS One, 2011, 6(10): 25645.
- [23] Cho OH, Shin HM, Miele L, et al. Notch regulates cytolytic effector function in CD8⁺ T cells[J]. J Immunol, 2009, 182(6): 3380-3389.
- [24] Pillai S, Cariappa A. The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision[J]. Nat Rev Immunol, 2009, 9(5): 767-777.
- [25] Zhang Z, Zhou L, Yang X, et al. Notch-RBP-J-independent marginal zone B cell development in IgH transgenic mice with VH derived from a natural polyreactive antibody[J]. PLoS One, 2012, 7(6): e38894.
- [26] Tan JB, Xu K, Cretigny K, et al. Lunatic and manic fringe cooperatively enhance marginal zone B cell precursor competition for delta-like1 in splenic endothelial niches [J]. Immunity, 2009, 30(2): 254-263.
- [27] Song R, Kim YW, Koo BK, et al. Mind bomb 1 in the lymphopoietic niches is essential for T and marginal zone B cell development [J]. J Exp Med, 2008, 205(11): 2525-2536.

(收稿日期: 2013-12-26)

• 综 述 •

核酸适配体及其应用研究进展^{*}

姚 远 综述, 张 波[△] 审校

(第三军医大学西南医院全军检验医学中心, 重庆 400038)

关键词: 适配体; 指数富集的配基系统进化技术; 核酸

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2014. 08. 032

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)08-1011-03

1990 年 Tuerk 等^[1]报道了一种新的寡核苷酸筛选技术。该技术与 PCR 扩增相结合, 在体外人工构建的短链核苷酸文库中筛选出能与噬菌体 T4DNA 聚合酶特异性结合的 RNA 配体。其原理基于生物自然进化机制, 即: 变异、选择和复制, 故被命名为指数富集的配基系统进化(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)技术, 筛选出的短链 DNA 或 RNA 配体称为适配体。由于适配体与相应靶标结合具有较高的特异性和亲和力, 生产技术及分子稳定性方面的优势可与抗体媲美, SELEX 技术已被广泛应用于生物医学众多研究领域, 本文就寡核酸适配体及其筛选技术的研究现状和应用前景做一综述。

1 适配体的筛选

1.1 适配体筛选的基本原理 SELEX 技术利用分子生物学技术, 设计并构建随机单短链核苷酸(single strand DNA/single strand RNA, ssDNA/ssRNA)文库, 通过靶标物质与随机文库混合后形成靶标-ssDNA/ssRNA 复合物; 洗脱掉未结合

的适配体, 分离结合于靶物质上的核酸分子, 以后者为模板进行 PCR 扩增, 进行下一轮筛选过程。通过多轮循环筛选, 与靶标不结合或低亲和性结合的核酸分子被去除, 而与靶分子高亲和性的“适配体”被分离出来, 且纯度随着筛选进程而增高。若在 SELEX 的每轮筛选循环后增加核酸反转录步骤, 则可筛选到 RNA 适配体。将筛选出的高特异性适配体进行人工体外合成, 用于靶物质的识别、实验诊断和治疗研究。

1.2 适配体筛选过程 适配体筛选步骤主要包括, (1)筛选方法的选择: 根据研究目的和靶标特点确定适配体应具有的特性, 以此设计具体的 SELEX 筛选方法; (2)寡核苷酸文库的建立: 依据选择的筛选方法建立具有合适长度和足够容量的寡核苷酸组合文库; (3)循环筛选: 以固态化或游离态的靶标为基础, 通过多次循环筛选获得适配体; (4)SELEX 筛选结束后, 对适配体进行测序和特异性修饰, 以提高适配体的选择性。

1.3 适配体筛选技术发展 自上世纪 90 年代以来, SELEX 筛选技术发展比较迅速, 可满足多种不同的筛选需要, 陆续出

^{*} 基金项目: 重庆市科技攻关课题资助项目(CSTC2012gg-yyjs10046); 第三军医大学回国人员启动基金资助项目(SWH2011LC022); 西南医院临床创新基金资助项目(SWH2012LC12); 第三军医大学成果转化基金资助项目(2013XZHO4)。 作者简介: 姚远, 男, 博士, 主要从事临床检验诊断学研究工作。[△] 通讯作者, E-mail: zhangbocq@aliyun. com。

现了混合 SELEX^[2]、亲和层析 SELEX^[3]、组织切片 SELEX^[4]、毛细管电泳 SELEX^[5]、基因组 SELEX^[6] 等多种技术形式。

2 适配体的特点

2.1 适配体的分子结构 适配体是一种经 SELEX 技术筛选得到的短链 DNA 或 RNA 序列,对其靶物质有特异的识别能力和高度的亲和力^[7],多种适配体的分子结构已经通过酶学、X 衍射探测和核磁共振等技术得以确定。通常情况下,适配体分子应尽量小以便降低成本,更易与靶物质结合;但由于寡核苷酸的功能折叠区域是有限的,适配体的最小长度往往比有效的空间序列大。

2.2 适配体的靶物质及结合基础 适配体随机序列中的每个核苷酸均有 4 种可能类型,随机序列长度通常为 30~40 个核苷酸,其文库容量可达到 1 015 以上。核苷酸文库中随机序列种类的多样性决定了适配体立体构象的广泛性,巨大库容所蕴含构象丰富的适配体能够与众多自然界的分子发生作用。大量 SELEX 筛选结果也显示适配体可以特异性的结合任何靶物质。

人工构建的 ssDNA/ssRNA 文库中,众多构型各异短链核苷酸的存在是 SELEX 技术成功筛选出自然界中各种靶标相应适配体的物质基础。单短链核苷酸,尤其是 RNA 适配体的某些二级结构,有利于核酸分子形成特定的三维结构,成为适配体与靶标相应区域结合的结构基础。它们通过氢键、疏水作用、假碱基对堆积作用和形状匹配等形式结合到靶分子上,形成较强亲和力的复合物。

2.3 适配体的特异性和亲和力 适配体仅识别与其互补的分子结构,能够分辨靶分子上的细微差别,与靶物质的结合通常表现出高度的特异性。

适配体结合靶物质的亲和力变化范围较大。一般与小分子靶标的亲和力相对较低,但与反转录病毒整合酶、核酸结合蛋白、抗生素、免疫球蛋白等大分子物质则具有比其他类型配基更高的特异性和亲和力^[8],通常可避免非特异性结合。适配体有时也会发生非特异性结合,如黄嘌呤的适配体能够结合鸟嘌呤,而识别辅酶 A 的适配体也可以结合 AMP。

2.4 适配体的易修饰性和稳定性 适配体为短链核苷酸片段,易被生物体内的核酸酶降解,对于 RNA 结构的适配体尤其如此。为了增加适配体的功能,提高其在临床诊断和治疗方面的应用,可对适配体主链骨架的核酸序列进行必要的位点特异性修饰,进而在保持原有生物学活性前提下提高生物利用度,以便精确地构建报告分子和效应分子。

总之,适配体的分子小、特异性和亲和性高、无免疫源性、便于长期保存、基本无毒副作用等众多优点为其在生物医学领域的广泛应用奠定了基础。

3 适配体在生物医学中的应用

抗原抗体反应为多种分子的特异识别提供了可靠方法,与单克隆抗体技术相比,采用 SELEX 技术筛选高亲和性适配体不需要免疫动物,不需考虑机体是否会产生免疫耐受和免疫原性的问题,易于体外合成、修饰和保存,在基础研究和临床诊断治疗中具有广泛的应用前景。

3.1 适配体在临床实验诊断中的应用

3.1.1 肿瘤细胞及其标志物检测 肿瘤细胞及其标志物早期检测方法的探索对该病的治疗效果及预后极为重要。近年来已筛选出多种肿瘤标志蛋白的适配体,它们能够高特异性地识别肿瘤细胞的标志蛋白,仅需少量肿瘤细胞即能对其进行

准确鉴别和分型,在肿瘤的早期诊断方面显示出明显的优势。Zhao 等^[9]采用 DNA 适配体成功鉴别出非小细胞肺癌的腺癌亚型,为该类肿瘤的早期诊断与鉴别诊断提供了一种可靠方法。Farokhzad 等^[10]应用纳米载体系统技术,把与 pSMA 高特异结合的适配体靶向传送到前列腺肿瘤组织中用于相应检测,这也是医学领域中首次报道应用纳米技术靶向运送适配体的实例。

3.1.2 病原微生物检测 近年发展起来的适配体检测抗原技术,采用“夹心法”将一个适配体(或抗体)末端固定于固相载体上,以捕获待测标本中的靶物质,另一个适配体序列末端标记如生物素、荧光素、胶体金或放射性同位素等指示剂而作为待检测分子,其与相应靶标结合后即可产生信号,以达到检测目的。

3.1.3 其他 毛细管电泳(capillary electrophoresis)是在毛细管中进行的电泳,能够对多种组分进行快速分离,并可进行在线检测,有学者采用非竞争模式将人类免疫缺陷病毒反转录酶的适配体应用于毛细管电泳,取得了很好的效果。

分子信标(molecular beacon)是基于荧光共振能量转移现象而构建的新型核酸定性和定量检测方法,具有灵敏、特异、易于自动化等特点,近年来有较大的发展。最近有学者将不同的荧光淬灭分子分别应用到该生长因子的检测,并取得了较好效果,这为应用适配体分子信标技术进行多靶标检测奠定了良好的基础^[11]。

适配体也可用于制作生物芯片和生物传感器,建立高通量的检测方法。以适配体制成的生物芯片,能同时定量检测 3 种血清和细胞提取混合物中的肿瘤相关蛋白,展现出较好的特异性和应用前景。此外,由于适配体分子小,易于扩散于机体组织之间,在体液循环中能够被快速降解或清除,部分适配体还能够结合细胞受体等特点,使其应用于活体内的生物显像技术成为可能。黏蛋白 1(mucin 1, MUC1)是一种细胞跨膜糖蛋白,在恶性上皮组织肿瘤的细胞表面表达显著升高^[12],该蛋白的适配体可与恶性细胞高特异性结合而被应用于肿瘤的显像技术^[13]。适配体同时能够与胞外基质的靶标蛋白结合,结合腕蛋白-C 是一种细胞外基质蛋白,在多种肿瘤组织中均过量表达,相应的适配体也可用于靶蛋白的识别而进行肿瘤的准确定位^[14]。

3.2 适配体在临床治疗中的应用

3.2.1 适配体的治疗作用 在临床治疗方面,适配体类似于单克隆抗体,但其体外筛选不依赖于生物体,生产过程中可较容易地控制反应条件,同时相对于其他寡核苷酸治疗手段,适配体治疗靶标可以在胞内、胞外或胞膜表面。抑制性适配体具有治疗实体瘤的潜能,动物模型中的研究发现,血小板衍生因子-B 适配体可以降低血管生成相关疾病的发生和发展^[15-16]。Mi 等^[17]已筛选出骨桥蛋白的 RNA 适配体,其能够抑制动物模型体内肿块的生长。

此外,适配体经过多年发展,已筛选出多种针对调节因子、解螺旋酶、核衣壳蛋白等在内的广泛靶分子类型的适配体。2009 年, Kikuchi 等^[18]筛选出针对丙型肝炎病毒的内部核糖体进入位点(IRES)序列 II 的适配体,该结构对 mRNA 的转录有重要意义,适配体通过影响核酸转录而抑制病毒的复制,达到治疗的目的。

3.2.2 适配体的药物运输作用 核酸适配体也可作为运输工具,特异性地将其运输至靶细胞或组织,达到治疗的目的。Zhou 等^[19]将人免疫缺陷病毒 gp120 的适配体-siRNA 嵌合体

作用于感染 HIV 的细胞,发现二者均能抑制病毒复制^[20];而将该适配体结合到 HIVgp160 上,也可抑制 HIV-1 复制,降低传染性。适配体还能够靶向运输治疗药物、毒素和放射性同位素,明显减少其毒副作用和有效治疗剂量。Huang 等^[21]将阿霉素连接到酪氨酸蛋白激酶-7 (tyrosine protein kinase -7, PTK7) 适配体 sgc8c 上,发现该复合体对表达目的蛋白的细胞有高选择性,明显提高化疗效果。

4 展 望

随着 SELEX 筛选技术的不断发展和完善,众多可用于临床检测和疾病治疗的适配体被逐步筛选出来,并广泛地用于临床诊断与治疗研究。然而,适配体在临床诊断和治疗中的大规模应用还面临许多问题,但随着适配体研究的不断深入,将会有更多高特异性适配体不断问世,并将在疾病诊断和治疗中发挥重要作用。

参考文献

- [1] 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.
- [2] Shamah SM, Healy JM, Cload ST. Complex target SELEX[J]. *Acc Chem Res*, 2008, 41(1): 130-138.
- [3] Liu J, Stormo GD. Combining SELEX with quantitative assays to rapidly obtain accurate models of protein-DNA interactions[J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(17): e141.
- [4] Li S, Xu H, Ding H, et al. Identification of an aptamer targeting hnRNP A1 by tissue slide-based SELEX[J]. *J Pathol*, 2009, 218(3): 327-336.
- [5] Mendonsa SD, Bowser MT. In vitro selection of high-affinity DNA ligands for human IgE using capillary electrophoresis[J]. *Anal Chem*, 2004, 76(18): 5387-5392.
- [6] Kim HJ, Kwon M, Yu J. Elucidation of the RNA target of linezolid by using a linezolid-neomycin B heteroconjugate and genomic SELEX[J]. *Bioorg Med Chem*, 2007, 15(24): 7688-7695.
- [7] Li T, Wang E, Dong S. A grafting strategy for the design of improved G-quadruplex aptamers and high-activity DNAzymes[J]. *PLoS One*, 2009, 4(4): e5126.
- [8] Missailidis S, Thomaïdou D, Borbas KE, et al. Selection of aptamers with high affinity and high specificity against C595, an anti-MUC1 IgG3 monoclonal antibody, for antibody targeting[J]. *J Immunol Methods*, 2005, 296(1/2): 45-62.
- [9] Zhao Z, Xu L, Shi X, et al. Recognition of subtype non-small cell

lung cancer by DNA aptamers selected from living cells[J]. *Analyst*, 2009, 134(9): 1808-1814.

- [10] Farokhzad OC, Jon S, Khademhosseini A, et al. Nanoparticle-aptamer bioconjugates: a new approach for targeting prostate cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(21): 7668-7672.
- [11] Nowak M, Helleboid-Chapman A, Jakel H, et al. Insulin-mediated down-regulation of apolipoprotein A5 gene expression through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway: role of upstream stimulatory factor[J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(4): 1537-1548.
- [12] Singh R, Bandyopadhyay D. MUC1: a target molecule for cancer therapy[J]. *Cancer Biol Ther*, 2007, 6(4): 481-486.
- [13] Pieve CD, Perkins AC, Missailidis S. Anti-MUC1 aptamers; radio-labelling with (99m) Tc and biodistribution in MCF-7 tumour-bearing mice[J]. *Nucl Med Biol*, 2009, 36(6): 703-710.
- [14] Hicke BJ, Stephens AW, Gould T, et al. Tumor targeting by an aptamer[J]. *J Nucl Med*, 2006, 47(4): 668-678.
- [15] Akiyama H, Kachi S, Silva RL, et al. Intraocular injection of an aptamer that binds PDGF-B; a potential treatment for proliferative retinopathies[J]. *J Cell Physiol*, 2006, 207(2): 407-412.
- [16] Sennino B, Falcon BL, McCauley D, et al. Sequential loss of tumor vessel pericytes and endothelial cells after inhibition of platelet-derived growth factor B by selective aptamer AX102[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(15): 7358-7367.
- [17] Mi Z, Guo H, Russell MB, et al. RNA aptamer blockade of osteopontin inhibits growth and metastasis of MDA-MB231 breast cancer cells[J]. *Mol Ther*, 2009, 17(1): 153-161.
- [18] Kikuchi K, Umehara T, Nishikawa F, et al. Increased inhibitory ability of conjugated RNA aptamers against the HCV IRES[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 386(1): 118-123.
- [19] Zhou J, Li H, Li S, et al. Novel dual inhibitory function aptamer-siRNA delivery system for HIV-1 therapy[J]. *Mol Ther*, 2008, 16(8): 1481-1489.
- [20] Zhou J, Swiderski P, Li H, et al. Selection, characterization and application of new RNA HIV gp 120 aptamers for facile delivery of Dicer substrate siRNAs into HIV infected cells[J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(9): 3094-3109.
- [21] Huang YF, Shangguan D, Liu H, et al. Molecular assembly of an aptamer-drug conjugate for targeted drug delivery to tumor cells[J]. *Chembiochem*, 2009, 10(5): 862-868.

(收稿日期: 2014-01-15)

• 综 述 •

HIV 新发感染的实验室检测方法进展

韩 梅^{1,2}综述, 张 波^{1△}审校

(1. 第三军医大学西南医院检验科, 重庆 400038; 2. 重庆市疾病预防控制中心, 重庆 400042)

关键词: 人类免疫缺陷病毒; 新发感染; 检测方法

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2014. 08. 033

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)08-1013-03

人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)是艾滋病的病原体,其发病率是衡量 HIV 流行程度的最重要参数,用以描述艾滋病的流行特征,如识别高危人群、评估干预

效果。在 HIV 感染早期,患者无典型临床症状,难以判断感染时间,造成艾滋病发病率无法准确统计。传统的发病率计算方法通常复杂、成本昂贵、不精确,如通过在 HIV 阴性人群中开