

第六次作业

1.核酸适配体与传统抗体相比有何优缺点，以及如何从文库中筛选？

2.比较FRET技术中turn-on和turn-off两种设计

问题分析：1.（核酸适配体与传统抗体的对比）与传统抗体相比，核酸适配体的主要优点有：（1）分子量小，具有快速的组织穿透力和细胞内化能力；（2）无/低免疫原性，不容易引起机体的排异反应；（3）核酸碱基排列顺序数目广大，可通过人工设计和筛选（如SELEX），得到与不同靶点结合的核酸适配体，提升了核酸适配体的临床应用潜能；（4）具有较高的热/化学稳定性，即使在高温下解旋变性，也能在冷却后重新形成解旋前的高级结构而复性；（5）易于化学修饰或偶联不同的功能基团；（6）能通过简单且成本低廉的固相合成技术来合成而不依赖生物途径，降低合成难度和成本；（7）批间差异小，产品均一性高。^[1]

当然，核酸适配体也存在一些缺点：（1）易被核酸酶降解；（2）分子量小，易被肾脏过滤清除；

（3）核酸适配体是在人工环境下筛选，而人工环境与生物体内环境有一定差异，因此其与靶点的亲和力略小于抗体与抗原的亲和力。^[1]

（从文库中筛选核酸适配体的方法）在将随机文库与靶标分子混合进行孵育前，要将随机文库中的单链寡聚核酸加热，然后缓缓冷却，以使这些单链寡聚核酸能折叠成（热力学）稳定的二级和三级结构^[2]；接下来，将经过前处理的随机文库与靶标分子混合，并孵育一段时间，然后通过多种分离方法，分离收集与靶标分子特异性结合的适配体-靶标复合物，然后将收集到的适配体-靶标复合物中的寡核苷酸分子洗脱下来，用作模板，进行PCR放大扩增。PCR扩增后进行单链制备，得到新的寡核苷酸文库，再进行下一轮筛选^[2-4]，整个过程如图1所示。在一些筛选方法中，由于部分待筛选的核酸适配体会与筛选用基质结合，因此为了提高核酸适配体的亲和能力，通常还需要一步反筛选，即把正筛选得到的寡核苷酸分子与空白基质混合，然后将不与空白基质结合的寡核苷酸分子分离出来，作为扩增的模板。

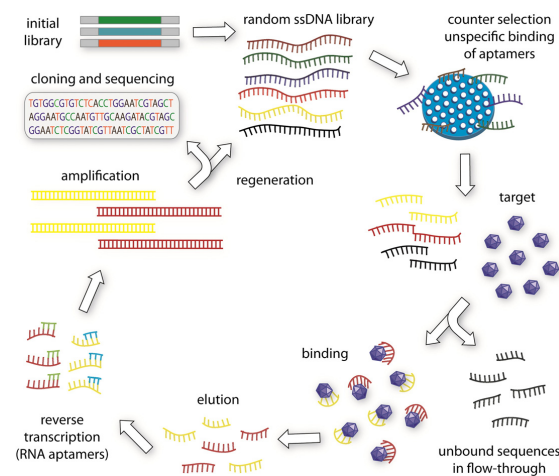


图1 SELEX构建文库和筛选核酸适配体的过程（引自[4]）

自SELEX问世以来，筛选方法层出不穷，常用的筛选方法有：硝酸纤维素膜过滤法、毛细管电泳、凝胶电泳分离法、亲和色谱分离法、微珠分离法、磁珠分离法等；针对与细胞结合的核酸适配体的筛选，有细胞SELEX；针对自动化、高通量筛选，还有微流控SELEX、微阵列SELEX等。

2.FRET技术中"turn-on"型探针和"turn-off"型探针采用不同的作用原理，对于"turn-on"型探针，常见的机理为，核酸杂交使发卡结构连接的荧光基团和猝灭基团紧密接触，荧光猝灭，当分子信标与靶目标结合时，茎杆互补区被拉开，荧光恢复，实现对目标物的检测（如图2B，图3B，图4左A、B）；对于"turn-off"型探针，常见机理则为，未折叠的核酸链使得连接的荧光基团和猝灭基团保持较远距离，荧光正常产生，当分子信标与靶目标结合时，分子信标通过自身的核酸杂交折叠成G-四连体结构，核酸链两端的荧光基团和猝灭基团紧密接触，荧光猝灭或波长变长（如图2C，图3C，图4右A）。^[6-8]

当然，构建"turn-on"型和"turn-off"型探针的方法不止一种，例如"turn-on"型探针还可以设计为两种核酸适配体，其中一个适配体携带相互靠近的荧光基团和猝灭基团，当有待测分子时，两种核酸适配体与待测分子相结合，茎杆互补区被拉开，荧光恢复（如图2A，图3A）；或是设计为一种核酸适配体和两个各自与核酸适配体的一部分互补的核酸片段，这两个片段分别携带荧光基团和猝灭基团，当未结合待

测分子时，荧光基团和猝灭基团相互接近，荧光猝灭，当有待测分子时，核酸适配体与待测分子相结合，并与携带猝灭基团的核酸片段分开，从而恢复荧光（如图2D、图3D）；对于"turn-off"型探针，可以设计为两种互补的核酸片段，其中一种在游离时自动形成茎环结构，另一种在游离时则能形成G-四联体，然后与待测分子结合，让这两种核酸分子杂交，然后在能形成茎环结构的核酸链两端分别带上荧光基团和猝灭基团，当有待测分子时，杂交区域分开，其中一条核酸形成G-四联体，并与待测分子结合，另一条核酸折叠成茎环结构，荧光基团和猝灭基团相互接近，荧光猝灭。[6-8]

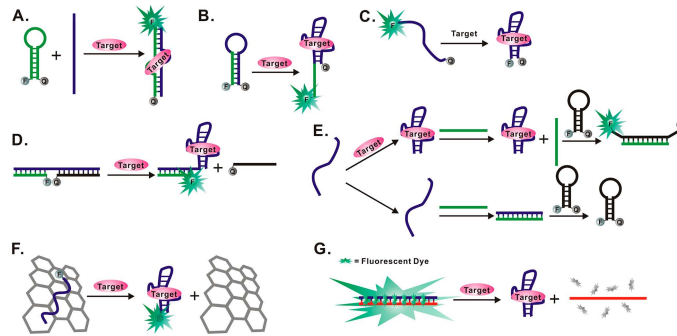


图2 不同结构的"turn-on"型和"turn-off"型探针 (引自[6])

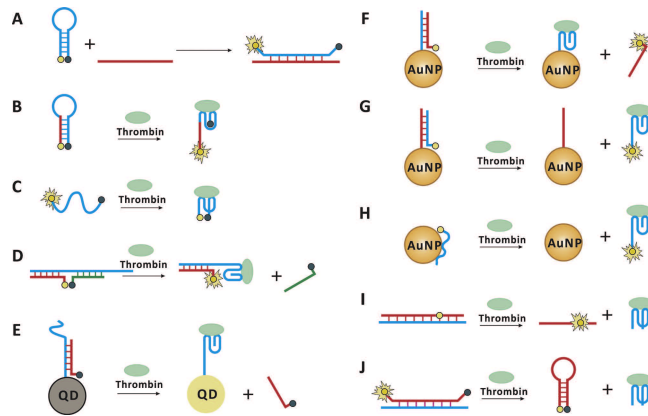


图3 不同结构的"turn-on"型和"turn-off"型探针 (续, 引自[7])

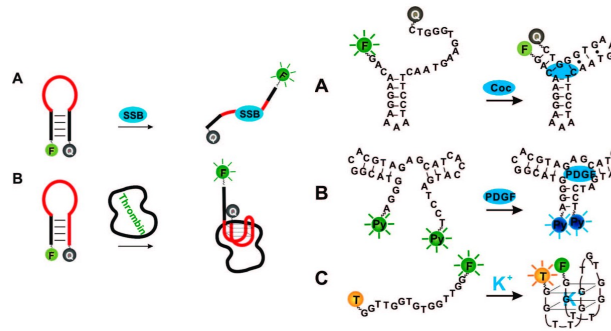


图4 不同结构的"turn-on"型和"turn-off"型探针 (续, 引自[8])

对于荧光检测，"turn-on"模式优于"turn-off"模式，因为"turn-off"模式容易被样品中存在的其它荧光猝灭剂干扰而造成假阳信号，导致较低的信噪比。[9]

Reference

- [1] Sun, H.; Zhang, J.; Wu, J.; Zu, Y.; Zhu, X. *Prog. Pharm. Sci.* **2016**, 40(8), 583.
孙红光, 张金三, 吴建波, 祖幼立, 朱迅. *药学进展*. **2016**, 40(8), 583.
- [2] Systematic evolution of ligands by exponential enrichment. *Wikipedia*. [Online]; https://en.wikipedia.org/wiki/Systematic_evolution_of_ligands_by_exponential_enrichment (accessed April 18, 2020)
- [3] Bayat, P.; Nosrati, R.; Alibolandi, M.; Rafatpanah, H.; Abnous, K.; Khedri, M.; Ramezani, M. *Biochimie* **2018**, 154, 132.
- [4] Darmostuk, M.; Rimpelova, S.; Gbelcova, H.; Ruml, T. *Biotechnol. Adv.* **2015**, 33, 1141.

- [5] Li, S.; Fu, Q.; Yan, Y. *Biotechnol. Bull.* **2017**, 33(11), 67.
李世雨, 傅强, 严亚贤. *生物技术通报*. **2017**, 33(11), 67.
- [6] Zhang, H.; Li, F.; Dever, B.; Li, X.; Le, X. C. *Chem. Rev.* **2013**, 113, 2812.
- [7] Liu, J.; Cao, Z.; Lu, Y. *Chem. Rev.* **2009**, 109, 1948.
- [8] Deng, B.; Lin, Y.; Wang, C.; Li, F.; Wang, Z.; Zhang, H.; Li, X.; Le, X. C. *Anal. Chim. Acta* **2014**, 837, 1.
- [9] Zhu, Y.; Liu, P.; Yang, X.; He, R.; Li, Q.; Wang, Q.; Wang, K.; Huang, J.; Liu, J. *Chem. J. Chin. Univ.* **2012**, 33(12), 2651.
朱颖, 刘沛, 羊小海, 何磊良, 李清照, 王青, 王柯敏, 黄晋, 刘剑波. *高等学校化学学报*. **2012**, 33(12), 2651.