

豆 丁 推 荐



精 品 文 档

以完整细胞为靶子的 SELEX 技术研究进展

李慧^{1,2}, 李少华², 王鸣刚¹, 邵宁生²

1. 兰州理工大学 生命科学院, 甘肃 兰州 730050; 2. 军事医学科学院 基础医学研究所, 北京 100850

[摘要] 指数富集的配体系统进化(SELEX)是一种从大容量寡核苷酸文库中经反复分离扩增步骤得到针对靶分子的高亲和力和、高特异性核酸配基——适配体的体外筛选技术。自 1990 年以来, SELEX 技术得到了迅猛发展, 筛选的靶分子已由最初的单一物质发展到完整的动物细胞、细菌病原体等复杂靶子。以完整细胞为靶子的 SELEX 技术有其独特的技术优势, 可以在筛选细胞上特定靶分子未知的情况下进行筛选, 为药物筛选、临床诊断、疾病治疗和基础医学研究等带来了新的思路和方法。随着对适配体研究的深入, 尤其是纳米材料与其相结合应用, 该技术将在肿瘤诊断治疗及微生物检测领域具有更为广泛的应用前景。

[关键词] 指数富集的配体系统进化; 完整细胞; 适配体; 肿瘤诊断; 微生物检测

[中图分类号] Q75 [文献标识码] A [文章编号] 1009-0002(2009)06-0870-04

Recent Developments in Whole Cell SELEX

LI Hui^{1,2}, LI Shao-Hua², WANG Ming-Gang¹, SHAO Ning-Sheng²

1. College of Biology, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050;

2. Institute of Basic Medical Science, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850; China

[Abstract] The systematic evolution of ligands by exponential enrichmentm(SELEX) is an *in vitro* technique involving the selection of nucleic acid ligands named as aptamers with high affinity and specificity against a certain target from a combinatorial random synthesized oligo nucleic acid library by repeated rounds of partitioning and amplification. SELEX technology has developed very quickly since 1990. The range of the selection targets becomes more and more complex, extending from a single molecule to complex mixture including intact cells and pathogenic bacterium. The whole cell SELEX has a unique advantage in that it does not need a prior knowledge of target molecules of target cells, and thus brings new ideas and strategies to the drug screening, clinical diagnosis, disease treatment and the basic medical research. By combining new biotechnology with aptamers, especially the integration of nano material with aptamers, the whole cell SELEX technique holds a broad application in the diagnosis and treatment of tumor as well as in the detection of microorganisms.

[Key words] systematic evolution of ligands by exponential enrichmentm; whole cell; aptamer; tumor dignosis; microorganism identification

20 世纪 90 年代初, 随着对核酸结合蛋白研究的深入, 美国的 Gold^[1]和 Ellington^[2]受到组合化学、抗体库和随机噬菌体肽库技术的启发, 构建了一种新型的体外筛选技术, 即指数富集配体系统进化(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX), 通过该技术筛选获得的寡核苷酸被称为适配体(aptamer)。自 1990 年首次成功利用此技术筛选出有机染料分子和噬菌体 T₄ DNA 聚合酶的特异适配体以来, SELEX 技术得到迅猛发展, 筛选的靶分子已从一些简单靶分子如金属离子、有机染料、神经递质、核苷碱基类似物、单一蛋白等扩大到完整的动物细胞、细菌病原体等复杂靶分子^[3-6]。1998 年 Morris 等在经典 SELEX 技术的基础上建立并完善了复合靶子 SELEX 技术。他们以红细胞膜上的成分为靶分子, 通过 SELEX 筛选得到识别红细胞膜上所有成分的配基家族, 再经过解析获得特异识别红细胞膜上每一个单一成分的适配体^[7]。随后也有一些研究人员进行了有关复合靶子 SELEX 的研究工作, 但均建立在已知的靶分子基

础上^[8-9]。直至 2003 年, 一种改良细胞消减 SELEX 技术首次建立, 可以在靶分子情况未知的条件下, 通过引入一类近似或具有一定同源性的细胞进行消减筛选, 最终获得能特异识别两组同源细胞的寡核苷酸配基。我们利用该技术, 成功筛选到了能特异识别已分化 PC12 细胞而不识别未分化 PC12 细胞的单链 DNA(ssDNA)适配体, 这是国际上首次在对靶细胞与对照细胞之间差异分子存在情况未知的条件下成功地应用消减细胞 SELEX 技术进行筛选, 为以完整细胞为靶子的特异适配体的筛选奠定了基础^[10]。

[收稿日期] 2009-07-21

[基金项目] 国家高技术研究发展计划(2006AA02Z408);
国家重点基础研究发展计划(2005CB724600)

[作者简介] 李慧(1984-), 女, 硕士研究生

[通信作者] 邵宁生, (E-mail)shaonsh@hotmail.com
王鸣刚, (E-mail)mgywang@163.com

1 以完整细胞为靶子 SELEX 技术的原理和技术流程

以完整细胞为靶子的 SELEX 技术的基本原理和技术流程与常规的 SELEX 技术类似。首先,利用现有的分子生物学技术,人工构建一个随机寡核苷酸序列库,文库两端的序列固定,用于设计 PCR 扩增引物,中间为 25~35 个寡核苷酸随机排列,文库的总量可达 10^{14} 以上,几乎涵盖了所有可能的立体构像,可作用于自然界存在的几乎所有种类的分子。其次,在一定温度下,将文库与完整细胞置于缓冲液中共同孵育。可以采用消减 SELEX 策略^[10],即以感兴趣目标细胞为靶分子,并以同源细胞系作为消减靶子,通过同源细胞对文库进行消减,就能够去除文库中均识别目标细胞和同源细胞的适配体,从而筛选出只与靶细胞特异结合的适配体。根据这一原理,只要靶细胞和对照的同源细胞之间存在分子水平上的差异,理论上都能够通过消减 SELEX 技术筛选出特异性识别这种分子水平差异的适配体,而无须事先鉴定这些分子差异,同时也在一定程度上避免了靶分子只有在纯化后才能够被结合的问题。最后,是适配体的扩增和分离。将分离得到的序列经过严格的洗涤、洗脱,PCR 或 RT-PCR 扩增生成次级文库,用于下一轮筛选,随着每一轮筛选严谨程度的增加,低亲和力的序列逐步被淘汰,经过 10~15 轮筛选后可达到饱和亲和度,将得到的核酸适配体文库进行克隆、测序和鉴定,其中特异性强、亲和力高的适配体即可用于靶物质的分子识别研究。

2 以完整细胞为靶子的 SELEX 技术优势

与传统的 SELEX 技术相比,以完整细胞为靶子的 SELEX 具有以下优点:①筛选的靶分子范围更广泛,由最初的单一靶分子如蛋白、肽等小分子逐渐过渡到完整的肿瘤细胞、细菌病原体等复合靶分子,甚至临床的病理组织切片也可以直接作为靶分子进行筛选^[11];②在筛选过程中用同一个随机寡核苷酸文库对动物细胞、细菌病原体中的多个靶分子同时进行筛选,可将动物细胞、细菌靶子中不同靶分子的特异配基同时筛选出来而彼此互不干扰,同步并行的筛选方法将大大提高工作效率,缩短筛选周期^[12];③以完整细胞为靶子筛选时最突出的特点在于可以在不清楚靶细胞存在怎样的靶分子,也不清楚靶细胞与对照细胞之间存在怎样的分子差异,这些分子水平上的差异在疾病的发生、发展过程中起着怎样作用的情况下,依然能够筛选出与这些差异分子相结合的适配体,而这些适配体所特异结合的物质往往就是癌细胞与正常细胞之间的差异成分,对这些分子水平上的差异进行研究,将有助于新的有效的肿瘤特异分子标志物的发现;④以完整细胞为靶分子筛选时,细胞中的蛋白质可以保持其天然构象,而非孤立的纯化蛋白,因此能够更真实地反映出蛋白的一些特性^[13];⑤消减策略的引进使筛选到的适配体结合特异性更强,通过反向 SELEX 筛选,可以有效减弱甚至消除既与靶分子结合又与靶分子类似物结合的寡核苷酸配基,从而筛选出高度特异结合靶分子的适配体^[10];⑤以完整细胞为靶子的消减 SELEX 技术能够较好地弥补双向电泳和 mRNA 差异显示等技术的不足,即不但能筛选出高特异性识别肿瘤化细胞的寡核苷酸配基,利用这些配基还可以亲和分离其靶分子,这些靶分子可以是丰度很低的蛋白质、核酸、多糖或脂类分子,从而为生物标志物分子的鉴定开辟了新的途径。

3 以完整细胞为靶子 SELEX 技术的应用

3.1 在肿瘤特异标志物筛选方面的应用

肿瘤细胞和正常细胞表面及细胞内部存在许多相同成分和差异分子,形态结构上也是如此,以完整细胞为靶子的 SELEX 技术可以筛选出能区别两个高度同源但有微小差异的靶组织或完整靶细胞的特异寡核苷酸配基,并可进一步分离、鉴定配基结合的差异成分。筛选获得的适配体不仅可用作肿瘤特异诊断或导向治疗,而且还可用于肿瘤细胞适配体结合靶分子,即肿瘤特异标志物的鉴别与钓取^[14]。

Blank 等^[15]以血管内皮细胞作为靶分子,筛选得到特异识别血管内皮细胞系 YPEN-1 细胞的适配体,用荧光标记该适配体可作为探针用于胶质瘤的诊断。Hikce 等^[16]以高表达生腱蛋白(tenascin)C 的神经胶质母细胞瘤系 U251 为靶细胞,筛选得到特异性识别 U251 细胞的适配体 TTA1,并发现 TTA1 能被肿瘤组织快速摄取并滞留较长的时间,而在血液和其他非靶标组织中被迅速清除,这样通过二维闪烁成像就能获得清晰的肿瘤图像。这些适配体的筛选都是基于从已知的肿瘤细胞表面标志物入手探索 SELEX 技术用于肿瘤诊断和治疗。Tan^[17]等采用与细胞消减 SELEX 类似的技术方法,分别以 T 细胞系 ALL 的 CCEF-CEM 细胞及 B 细胞系淋巴瘤的 Ramos 细胞作为目的靶子和消减靶子,筛选获得的适配体能够特异性区分正常造血细胞和 Ramos 细胞,实现了在肿瘤标志物分子未知的情况下首先获得临床白血病细胞标本的探针。这些通过以完整细胞为靶子筛选获得的适配体,本身就可以在不需知道正常细胞和肿瘤细胞之间的差异成分的情况下,直接用于肿瘤的诊断和导向治疗,而这些适配体所特异结合的蛋白质或其他成分就是正常细胞和肿瘤细胞之间的差异成分,因此只要能够将这些差异成分进行纯化、鉴定和检测,新的分子标志物就有可能被发现,它们有可能成为新的特异性肿瘤标志物。

3.2 在肿瘤导向治疗中的应用

许多纳米材料都具有特殊的光学、电学和磁学等性质,随着近年来纳米表面化学修饰和生物偶联技术的发展,许多纳米材料都可以直接或间接地与生物分子结合构成纳米生物探针,并且可以透过生物屏障直接到达靶细胞或组织^[18],可进行实时动态示踪和监测。适配体是非携带遗传信息的小分子核酸片段,不仅能够作为药物的靶向媒介载体,同时还可以直接作为药物治疗疾病。以完整细胞为靶子筛选出来的适配体具有分子小、快速的血浆清除率、高组织穿透力、免疫原性低、稳定性好等特点,如果将以癌细胞为靶子筛选出来的适配体与纳米微粒相偶联,由于适配体能够特异识别并结合到相应的癌细胞上,与适配体相结合的纳米微粒释放所携带的药物分子就可以直接作用于癌细胞,这样不仅可以减少药物所产生的毒副作用,同时还增加了药物的疗效^[19]。Farokhzad 等^[20]制成携带多烯紫杉醇的海绵状纳米颗粒,其中含有辅聚物 PLGA-b-PEG 和对 PSMA 胞外部分特异的 RNA 适配体 A10。此复合物在体外实验中可特异性地与前列腺癌 LNCaP 细胞表面表达的 PSMA 蛋白结合,显著增强多烯紫杉醇的细胞毒性。单次瘤内注射可使 5/7 的 LNCaP 细胞移植裸鼠模型的肿瘤全部消退(不含适配体的对照组仅为 2/7),而且在 109 d 内 100%存活(对照组仅 57%存活)。

光动力学疗法(photodynamic therapy, PDT)是新兴的一种治

疗恶性肿瘤的方法,其基本原理是,恶性肿瘤能选择性摄入并滞留光敏剂,在特定波长的光激发下引起一系列光氧化反应,导致肿瘤细胞的不可逆性损伤,达到治癌目的^[21]。光敏剂是指那些在光敏化过程中起着能量转换作用而自身并不被消耗的物质。理想光敏剂的组分应为单纯化合物,肿瘤选择性摄入高,单态氧产量高,而对其他正常组织的毒副作用尽可能小。寻找合适的导向载体是构建靶向光敏剂的物质基础。以完整细胞为靶子筛选出来的适配体与抗体相比具有许多无法比拟的优势,无论是在基础研究领域还是疾病的临床靶向诊治方面都有着广阔的应用前景。因此,可考虑将特异适配体组装到光敏剂表面构建生物靶向光敏剂,利用适配体对靶分子作用的选择性和特异性,改善和强化光敏剂本身的作用,并赋予光敏剂对相应靶分子的靶向特异性。两者的有机结合不仅是对适配体研究领域的拓展,而且对构建导弹型光敏剂、生物导向光动力治疗等均具有重要意义,其研究成果必将拓宽光动力诊治恶性肿瘤的研究思路和领域,进一步增强目前光动力学疗法的效果,减少光敏毒副作用,提高诊治深度和诊断阳性符合率。

3.3 在微生物检测方面的应用

由于对很多致病性细菌或病毒的研究不够深入,而病原细菌在不同状态下很容易发生变异,致使很多疾病在其发病早期无法检测到或是被漏检。若把细菌看做是一个含有多种成分的复合物,以整个细菌作为靶分子进行筛选,就可以在未知细菌的内部结构、功能的情况下筛选出与其特异性结合的一组适配体,与单个适配体相比,一组特异性的适配体必定能提高细菌检出的敏感性和特异性;更重要的是,组合应用能够提高适配体的通用性。目前,国内外已有利用 SELEX 技术筛选出一组适配体的研究^[22-23],但利用组合适配体来实现对疾病的检测尚未见报道。我们所在研究室的曹晓晓等^[24]利用细菌消减 SELEX 技术,以完整的金葡菌为目的靶、链球菌和表皮葡萄球菌为消减靶,成功地获得了一组能够与金葡菌特异性结合的适配体,通过流式细胞仪和共聚焦显微镜检测,发现组合适配体的确能够很好地区分金葡菌和消减靶细菌及大肠杆菌,同时也提高了对各型金葡菌的检出率。这一方法为致病微生物快速、方便的检测提供了一种新的技术平台。

4 前景与展望

SELEX 技术自问世以来取得了令人鼓舞的进步,特别是一些 SELEX 衍生技术的发展,使核酸适配体作为诊断和治疗药物的想法逐渐变为事实,迄今已有适配体药物进入临床前期或临床期试验,并逐步成为一类新型药物^[25]。随着科学技术的不断进步和发展,以完整细胞为靶子的 SELEX 技术将日趋完善和成熟,将不会仅局限于以完整的动物细胞为靶子进行筛选。如果我们以作为直接反映疾病状态的临床病理组织切片为靶子建立组织切片 SELEX 技术,理论上就可以直接将病理组织切片与正常组织切片中的差异分子筛选出来,对这些差异分子进行分析和鉴定就有可能发现新的分子标志物。目前我室已经就这部分内容展开了研究,并成功获得了多个特异乳腺癌适配体,亲和钬存在于乳腺癌细胞中的各种适配体特异结合物,分析其结合物的特征和差异,这些特异结合物很可能就是潜在的肿瘤特异标志物^[26]。此外,将毛细管电泳技术与 SELEX 技术结合,能够使原

先需要几周甚至更长的筛选时间降至几天,大大提高了筛选效率。由此可以看出,以完整动物细胞、细菌病原体、病理组织切片等复合物为靶子的 SELEX 技术的发展,必将在临床诊断和治疗领域中发挥其至关重要的作用,通过筛选得到的特异适配体也将会成为基础研究和应用研究中有效的分子识别工具。

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] Ellington A D, Szostak J W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands[J]. Nature, 1990,346(6287):818-822.
- [3] Konopka K, Lee N S, Rossi J, et al. Rev-binding aptamer and CMV promoter decoys to inhibit HIV replication[J]. Gene, 2000, 255(2):235-244.
- [4] Gal S W, Amontov S, Urvil P T, et al. Selection of a RNA aptamer that binds to human activated protein C and inhibits its protease function[J]. Eur J Biochem, 1998,252(3):553-562.
- [5] Herr J K, Smith J E, Medley C D, et al. Aptamer-conjugated nanoparticles for selective collection and detection of cancer cells [J]. Anal Chem, 2006,78:2918-2924.
- [6] Tang Z, Shangguan D, Wang K, et al. Selection of aptamers for molecular recognition and characterization of cancer cells [J]. Anal Chem, 2007,79:4900-4907.
- [7] Morris K N, Jensen K B, Julin C M, et al. High affinity ligands from in vitro selection: complex targets [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998(95):2902-2907.
- [8] Blank M, Weinschenk T, Priemer M, et al. Systematic evolution of a DNA aptamer binding to rat brain tumor microvessels.selective targeting of endothelial regulatory protein pigpen [J]. J Biol Chem, 2001,276(19):16464-16468.
- [9] Hick B J, Marion C, Chang Y F, et al. Tenascin-C aptamers are generated using tumor cells and purified protein [J]. J Biol Chem, 2001,276(52):48644-48654.
- [10] Wang C, Zhang M, Yang G, et al. Single-stranded DNA aptamers that bind differentiated but not parental cells:subtractive systematic evolution of ligands by exponential enrichment [J]. Biotechnology, 2003,102:15-22.
- [11] Guo K T, Paul A, Schicho C, et al. Cell-SELEX: novel perspectives of aptamer-based therapeutics[J]. Mol Sci, 2008,9:668-678.
- [12] Shangguan D, Li Y, Tan W. et al. Aptamers evolved from live cells as effective molecular probes for cancer study [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006,103:11838-11843.
- [13] Morris K N, Jensen K B, Julin C M, et al. High affinity ligands from in vitro selection: complex targets [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998,95:2902-2907.
- [14] Shangguan D, Cao Z C, Li Y, et al. Aptamers evolved from cultured cancer cells reveal molecular differences of cancer cells in patient samples[J]. J Clin Chem, 2007,53:1153-1155.
- [15] Blank M, Weinschenk T, Priemer M, et al. Systematic evolution of a DNA aptamer binding to rat brain tumor microvessels.selective targeting of endothelial regulatory protein pigpen [J]. J Biol Chem, 2001,276(19):16464-16468.

- [16] Hicke B J, Marion C, Chang Y F, et al. Tenascin-C aptamers are generated using tumor cells and purified protein [J]. *J Biol Chem*, 2001,276(52):48644-48654.
- [17] Phillips J A, Lopez-Colon D, Zhu Z, et al. Applications of aptamers in cancer cell biology[J]. *Anal Chim Acta*, 2008,621:101-108.
- [18] Khaled A, Guo S, Li F, et al. Controllable self-assembly of nanoparticles for specific delivery of multiple therapeutic[J]. *Molecules*, 2005,5(9):1797-1808.
- [19] Xiao Z, Shang G D, Cao Z, et al. A cell-specific internalization study of an aptamer from whole cell selection[J]. *Molecules*, 2007, 14:1769-1773.
- [20] Farokhzad O C, Cheng J, Teply B A, et al. Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006,103(16):6315-6320.
- [21] Ferreira C S, Cheung M C, Missailidis S, et al. Phototoxic aptamers selectively enter and kill epithelial cancer cells[J]. *Nucleic Acids Res*, 2009,37(3):866-876.
- [22] Chen F, Zhou J, Luo F, et al. Aptamer from whole-bacterium SELEX as new therapeutic reagent against virulent mycobacterium tuberculosis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007,357:743-748.
- [23] Gopinath S C, Misono T S, Kawasaki K, et al. An RNA aptamer that distinguishes between closely related human influenza viruses and inhibits haemagglutinin-membrane fusion[J]. *Gen Virol*, 2006, 87:479-487.
- [24] Cao X X, Li S H, Chen L C, et al. Combining use of a panel of ssDNA aptamer in the detection of staphylococcus[J]. *Nucleic Acids Res*, 2009,37(14):4621-4628.
- [25] Nimjee S M, Rusconi C P, Sullenger B A. Aptamers: an emerging class of therapeutics[J]. *Annu Rev Med*, 2005;56:555-583.
- [26] Li H, Xu H, Ding H M, et al. Identification of an aptamer targeting hnRNP A1 by tissue slide-based SELEX [J]. *Pathology*, 2009, 218:327-336.

(上接第 848 页)

- [13] Higgins D R, Clegg J M. Introduction to *Pichia pastoris*[J]. *Methods Mol Biol*, 1998,103:1-15.
- [14] 刘蕾, 王慧, 颜光涛, 等. 人骨形成蛋白-7 成熟肽基因在巴斯德毕赤酵母中的分泌表达[J]. *生物技术通讯*, 2006,17(6):862-864.
- [15] 陈凌, 黄义德, 张彦定. 人骨形态发生蛋白 7(hBMP7)在毕赤酵母中的分泌表达[J]. *生物工程学报*, 2006,22(6):907-913.
- [16] Conradt H S, Nimtz M, Dittmar K E, et al. Expression of human interleukin-2 in recombinant baby hamster kidney, Ltk-, and Chinese hamster ovary cells. Structure of O-linked carbohydrate chains and their location within the polypeptide[J]. *J Biochem*, 1989,246 (29):17368-17373.
- [17] Kaufman R J, Sharp P A, Latt S A. Evolution of chromosomal regions containing transected and amplified dihydrofolate reductase sequences[J]. *Mol Cell Biol*, 1983,3(4):699-711.
- [18] Li X, Shi W, Wang H, et al. Potential bone-inducing activity in vitro of recombinant bone morphogenetic protein-7 from a CHO expression system[J]. *J Med Colleges PLA*, 2005,20(3):141-145.
- [19] Swencki-Underwood B, Mills J K, Vennarini J, et al. Expression and characterization of a human BMP-7 variant with improved biochemical properties[J]. *Protein Expr Purif*, 2008,57(2):312-319.
- [20] Lee D H, Su H, Han D W, et al. The effects of recombinant human BMP-7, prepared from a COS-7 expression system, osteoblasts on the proliferation and differentiation of rat newborn calvarial [J]. *Yonsei Med J*, 2003,44(4):593-601.
- [21] Alden T D, Varady P, Kallmes D F, et al. Bone morphogenetic protein gene therapy[J]. *Spine*, 2002,27(16):87-93.
- [22] Abe N, Lee Y P, Sato M, et al. Enhancement of bone repair with a helper-dependent adenoviral transfer of bone morphogenetic protein-2[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002,297(3):523-527.
- [23] 卜涛. 腺病毒介导的骨形态发生蛋白应用安全性的研究[J]. *国际口腔医学杂志*, 2008,35(1):41-43.
- [24] 李晖, 刘丹平. 骨形态发生蛋白-2 局部基因治疗骨缺损的研究进展[J]. *解剖与临床*, 2005,10(4):329-331.
- [25] Yang M, Ma Q J, Dang G T, et al. Adeno-associated virus-mediated bone morphogenetic protein-7 gene transfer induces C2C12 cell differentiation into osteoblast lineage cells [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2005,26(8):963-968.
- [26] Qu F J, Liu Y, Zhu D L. Construction of tissue-engineered cartilage with BMP7 gene-transfected chondrocytes [J]. *J Int Med Res*, 2008,36(4):837-847.