

# 适配子筛选技术\*

张慧卿 方 念 张焜和\*\*

(南昌大学第一附属医院 江西省消化疾病研究重点实验室 南昌 330006)

**摘要** 适配子的筛选技术近年来不断改良与发展。结合核酸与游离核酸的分离技术的改良,使适配子筛选效率得到提高;无引物结合部位适配子的筛选技术的建立和短寡核苷酸文库的应用,使适配子的应用范围更加广泛;适配子筛选技术在功能上的拓展,满足了更多的研究要求。一系列新方法的建立和应用,使适配子在基础研究和临床应用方面更具潜在价值。

**关键词** 适配子 SELEX技术

**中图分类号** Q819

适配子 (aptamer)即能与靶分子高特异性、高亲和力结合的寡核苷酸配基,系通过 SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment)技术从人工合成的大容量单链随机寡核苷酸文库中筛选并富集而得。文库中的寡核苷酸单链存在随机序列,通过 Watson-Crick碱基配对原则和分子内交互作用,每一条核苷酸单链均可有不同的三维结构,如发夹 (hairpin)、假结 (pseudoknot)、凸环 (bulge)、G-四聚体 (G-tetramer)等。由于筛选文库的容量巨大 (可达  $10^{15}$ 左右),因此理论上应用 SELEX技术能筛选到自然界几乎所有靶分子的适配子。适配子的作用有如抗体,但它在敏感性、特异性方面有时优于抗体,并且其靶分子更广泛,性质更稳定,制备更简单,无批间差异,因此具有良好的应用价值,近年来在基础研究、药物开发、临床应用等方面的研究报道不断增多,同时,其筛选技术本身也得到不断发展,适用性、简便性不断改善。本文就适配子筛选技术方面的进展作一综述。

## 1 经典 SELEX技术

Tuerk等 (1990)和 Ellington等 (1990)首先报道了应用 SELEX技术分别筛选到能与噬菌体 T4 DNA 聚合酶和有机染料特异性结合的 RNA 片段。经典的 SELEX技术首先是设计并人工合成单链随机寡核苷酸

(ssDNA)文库,寡核苷酸链中间为长度 30 ~ 60nt的随机序列,两端为 20 ~ 40nt的固定序列,可根据需要在 5端加上 T7 RNA 聚合酶启动子序列。同时设计一对相应的 PCR 引物,上游引物序列与寡核苷酸的 5端固定序列相同,下游引物与 3端固定序列互补。将合成的原始文库与靶分子孵育,过滤分离出靶分子-核酸复合物,洗脱下核酸并进行 PCR 扩增得到 dsDNA 文库,再进行链分离或不称 PCR 扩增得到 ssDNA 亚文库,或进行转录得到 RNA 亚文库。将亚文库再与靶分子孵育、分离、洗脱核酸并 PCR 扩增,得到新的亚文库,再进行第二轮筛选。重复进行上述筛选、扩增步骤,直至与靶分子结合的核酸比例不再升高时终止,此时得到的最后一轮筛选亚文库即为适配子文库。对适配子文库进行克隆、测序,制备单一适配子。鉴定各适配子与靶分子结合的特异性和亲和力,优选出有价值的适配子,人工合成供研究应用。

## 2 SELEX技术的改良

近年来,新的 SELEX技术达 10余种,这些新技术要么提高了筛选效率,要么满足了不同要求,大大增强了 SELEX技术的适用性,拓展了适配子的应用空间。

### 2.1 提高筛选效率的技术改良

经典 SELEX分离结合寡核苷酸的常用方法有硝酸纤维素法、凝胶阻滞法、微孔板法等。它们大都操作简单,成本低,易于掌握和推广,却存在相对费时费力、效率低下等不足。近年来,随着磁珠、毛细管电泳、自动

收稿日期: 2007-08-28 修回日期: 2007-11-13

\*国家“863”计划 (2007AA02Z462), 江西省科技攻关项目 (20061B0302400), 江西省教育厅科技项目 (2006061), 资助项目

\*\*通讯作者, 电子信箱: yfyzkh@sina.com

化技术等在选择技术中的应用,这些不足得到改善。

2.1.1 荧光磁珠法 Bruno(1997)首次应用基于磁珠的亲合分离方法筛选到氯代芳烃(chloroaromatics)的适配子。2003年,Murphy等<sup>[11]</sup>在筛选甲状腺转录因子1(TTF1)时,将TTF1标记His-6后再用Ni-NTA磁珠固定,能减少筛选到与污染物结合的适配子。2005年,Stoltenburg等<sup>[12]</sup>引入荧光标记进行DNA定量和用磁珠固定靶分子便于分离而建立了荧光磁珠法SELEX(FluMag-SELEX)。他们以筛选链酶亲和素的适配子为例建立了该方法,其基本过程是将链酶亲和素(作为靶分子)包被磁珠,然后与核酸文库孵育,分离去除未结合的核酸,洗脱下结合核酸,用荧光标记的引物进行PCR扩增,聚丙烯酰胺电泳,回收正链作为下一轮筛选的文库。FluMag-SELEX有不少优点:采用荧光定量,避免了同位素的使用,可直接了解与靶分子结合的核酸量;靶分子用量小(商业化的纯化靶蛋白一般价格不菲);能快速而高效地分离结合与非结合核酸;操作更为简单。

2.1.2 毛细管电泳法 毛细管电泳SELEX(CE-SELEX)是基于核酸与靶分子结合后其构象和质量发生改变而引起电泳迁移率变化来分离结合核酸,除将分离步骤通过CE完成外,其它流程与经典SELEX基本相似。CE-SELEX最明显的优点是明显提高了筛选效率。Mendonça等<sup>[13]</sup>应用CE-SELEX筛选人IgE的DNA适配子时,仅4个循环便筛选到高亲和力和高选择性的适配子,整个筛选过程也由4~6周缩短到2~4天。Tang等<sup>[14]</sup>比较了亲和层析法与CE法为分离手段进行蓖麻毒素的适配子筛选结果,前者在第9个循环时结合率仅有38.5%,而后者在第2个循环时结合率已达到60.2%,第4个循环时结合率高达87.2%,整个实验的时间未超过2周。CE-SELEX富集速度的提高,可能与分离结合和非结合寡核苷酸时选择效率更高、非特异相互作用发生几率更小有关<sup>[3,5]</sup>。以往认为靶分子大小是CE-SELEX的一个潜在限制,但新近有报道CE-SELEX同样可用于小分子靶的适配子筛选<sup>[6]</sup>。

Krylov等<sup>[17]</sup>将动力学方法引入毛细管电泳,建立了平衡混合物非平衡毛细管电泳(non-equilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures, NECEEM)技术。NECEEM法主要有3个步骤(以DNA适配子筛选为例):准备DNA文库和靶分子的平衡混合物(EM);采用NECEEM分离EM中靶分子结合的DNA平衡部分;

不同时间窗毛细管出口处收集适配子。与传统方法相比,此法主要有以下3个优势:(1)效率是传统方法的两个数量级以上,并能得到良好控制;(2)筛选适配子的同时能确定其结合参数 $K_d$ 、 $K_{off}$ 和 $K_{on}$ ,还有助于筛选预定结合参数值的适配子;(3)能通过适配子定量靶分子。Berezovski等<sup>[18]</sup>利用NECEEM,仅1个循环就筛选到亲和力为1nM的法呢基转移酶(PFTase)适配子。

2.1.3 自动化筛选技术 Cox(1998)在Biomek 2000移液机器人的基础上创建了第一个自动化筛选方案。SELEX筛选过程的自动化,使筛选过程所需时间也由数月/周缩短至几天<sup>[19]</sup>。2005年,Eulberg等<sup>[10]</sup>应用RoboAmp 4200 E仪器全自动筛选出P物质的适配子,该机器人主要包括冷热贮存室和 workstation、微量滴定板存放间、用户定制设计的用于核酸分离和RNA纯化的两套真空复合管以及防止交叉污染的NCC(non-cross-contamination)系统。与先前的自动化操作相比,这套系统有两个显著特征:通过半定量PCR实现在线监测与靶结合的核酸量;可满足在不同缓冲液和试剂以及筛选严格性(stringency)条件下时筛选要求。2006年,Hybarger等<sup>[11]</sup>建立了由PCR仪和LabView控制的活动瓣膜共同组成的微流SELEX样机(microfluidic SELEX prototype),将操作移至芯片微流环境后,SELEX有可能得到标准化,并具备提高速度、降低成本等明显优势。这些自动化模型装置很有可能为适配子的高效筛选铺平道路。

## 2.2 无引物结合序列的适配子的筛选技术

为使PCR产物达得一定数量并保持相对特异性,经典SELEX的固定系列长度一般设计在20~40nt左右。将体外筛选的适配子应用于体内试验时,常显得过长而显著增加成本。因此筛选后常进行截短等改造,但末端引物结合区有可能是靶分子识别区,甚至是功能活性的一部分,因而限制了适配子的改造。针对这一问题,出现下述SELEX扩展技术。

2.2.1 加尾SELEX技术 2003年,Vater等<sup>[12]</sup>建立了加尾SELEX技术(tailored SELEX),所筛出的适配子不含两端引物结合部位,因而无需作截短处理即可得到仅含随机区的适配子。其基本过程是:设计并合成由40nt随机区和两端分别为4nt和6nt固定区组成文库,同时合成两端的接头片段以及与接头片段和固定区互补的桥接片段,其中5端接头片段含有T7启动子序列,3端的桥接片段含有可用碱裂解的碱基;预先将接头片段与桥接片段退火形成双链,再与文库混合使文

库两端与相应的接头片段连接;然后以3端桥接片段为引物进行逆转录(RT),以逆转录产物进行PCR扩增;对扩增产物进行碱裂解去除引物片段,再转录出仅含40nt随机区和两端分别为4nt和6nt固定区的RNA文库,投入SELEX筛选;筛选出结合RNA片段再重复上述连接、RT-PCR、碱裂解和转录制备出下一轮的筛选文库。他们应用该技术成功筛选出降钙素基因相关肽1(a-CGRP)的高亲和力适配子。加尾SELEX引入连接接头片段和裂解PCR产物的两个额外步骤,解决了常规SELEX筛选出适配子后再作引物结合区截短处理所带来的问题。

**2.2.2 无引物基因组 SELEX 技术** 基因组 SELEX (genomic SELEX)能识别任何蛋白质与基因组序列亲和力和最高的位点,有利于认识蛋白-核酸间交互作用的网络<sup>[13]</sup>。要使体外获得的这种网络对认识体内的生物学事件有实际意义,靶蛋白与基因组文库的结合不应受到外在的人为因素干扰。然而,在常规的基因组 SELEX 中,引物序列有可能与基因组中片段形成碱基对,从而干扰靶蛋白与基因序列的结合。Wen 等<sup>[14]</sup>建立的无引物基因组 SELEX 技术 (primer free genomic SELEX)能有效地解决这一问题。其基本过程原理是:设计引物时引入限制性内切酶位点,扩增文库后酶切去除两端引物结合区,制备出无引物文库,用于 SELEX 筛选;筛选出的片段再连接上引物并进行 PCR 扩增。应用此方法他们筛选到与 Ff 基因 5 蛋白 (Ffg5p) 紧密结合的基因组序列。

**2.2.3 双 RNA 文库筛选技术** 人工合成体外筛选出的适配子时,为降低成本和增加效率,常保留与靶结合的最小基序而截去适配子末端。然而,引物结合部位可能是维持适配子活性结构所必需的,甚至可能是靶结合基序的一部分,故截短相当困难,这在适配子所针对的靶分子构象易变或者筛选条件严格时尤为突出。Jarosch 等<sup>[15]</sup>建立的双 RNA 文库筛选技术 (dual RNA library selection)有助于解决这一问题。该技术在文库的寡核苷酸链上设计前后相连的 RNA 聚合酶启动子 T3 和 T7,启动 T3 时转录出含引物结合部位的长文库,启动 T7 时则出不含引物结合部位的短文库(碱裂解引物序列);先以长文库进行数轮筛选,获得满意的适配子扩增和富集(满意的结合率)后再切换到短文库筛选。这种切换去除了功能上依赖引物结合部位的适配子,实现了无引物结合部位适配子的筛选与富集。他们通过该技术筛选到不含引物结合部位的高亲和力的

葛瑞林 (ghrelin) 镜像肽适配子。

## 2.3 扩展筛选功能的技术改良

经典 SELEX 筛选的适配子在特定情形下有其缺陷,如将动物实验获得的适配子应用于人体试验时,为了满足不同的功能需求,产生了以下几种改良技术。

**2.3.1 消减 SELEX 技术** 以细胞为靶标进行 SELEX 筛选有可能得到一组适配子,如果不同细胞同时拥有适配子所识别的靶分子或表位,针对某种细胞的适配子也可能与其他细胞作用。2003 年, Wang 等<sup>[16]</sup>建立了消减 SELEX (subtractive SELEX) 技术,筛选出了能与已分化 PC12 细胞结合而不与未分化的亲代 PC12 细胞结合的适配子。他们先将随机 ssDNA 文库与未分化的 PC12 细胞孵育,以消除识别分化与非分化 PC12 细胞共有靶分子的配基,再以已分化的 PC12 细胞进行筛选,经过 6 轮筛选,获得已分化 PC12 细胞特异的适配子。消减 SELEX 能筛选出有效区别同源细胞(如癌细胞和其起源的正常细胞)的适配子,还能提高筛选效率。

**2.3.2 切换 SELEX 技术** 适配子与靶分子结合的特异性及亲和力过高,不利于从动物试验过度到临床研究。2001 年, White 等<sup>[17]</sup>建立了切换 SELEX (toggle SELEX),能用于不同物种间均有作用的适配子筛选,便于在动物模型上进行适配子药物的临床前评价。他们首先将起始文库与人凝血酶和猪凝血酶的混合物共同作用,得到富集文库,然后不断切换与筛选,偶数循环与人凝血酶孵育,奇数循环与猪凝血酶孵育,13 个循环后筛选到一组与人和猪凝血酶均能结合的高亲和力 RNA 适配子。物种间的同类蛋白质的保守结构域常常是该蛋白质发挥功能所必需的,不同物种同源蛋白间的轮流筛选能得到与两种蛋白同时结合的适配子,且最有可能针对的是蛋白的保守结构域,故此技术能提高适配子的适用性。

**2.3.3 表达盒 SELEX 技术** 近年,已筛选到多种针对临床相关的功能靶蛋白的 RNA 适配子,但将其用于基因治疗时需要将核酸序列转染至哺乳细胞进行转录。事实上,因为用于基因治疗的 RNA 序列通常是作为较长转录子的一部分来表达,侧翼 RNA 序列可抑制适配子折叠成有活性构象的能力,导致所表达的适配子序列构象错误和功能丧失。为克服这一问题, Martell 等<sup>[18]</sup>建立了表达盒 SELEX (expression cassette SELEX) 技术,他们将体外筛选到的转录因子 E2F 的 RNA 适配子插入到 mRNA 表达盒中,形成嵌合 mRNA,并使适配子

两端的序列随机化,然后再用于体外筛选,最后筛选出能与 E2F 保持高亲和力结合的嵌合 tRNA<sub>s</sub>。这种嵌合 tRNA<sub>s</sub> 适配子能与 E2F 高的亲和力结合 (IC<sub>50</sub> 为 15 nM),在 293 细胞中高水平表达,且对 E2F 转化活性的抑制达到 80%。

2.3.4 复合靶解析 SELEX 技术 适配子筛选一般以纯化蛋白和小分子量单一物质为靶标,复合靶 SELEX (complex targets SELEX) 则是同时以数种分子为靶标,筛选出相互间无干扰的多种靶分子的适配子。Morris 等 (1998) 采用复合靶 SELEX 方法进行 25 轮筛选得到红细胞空壳的 ssDNA 适配子,并通过光亲和性交联实验证实不同适配子群所识别的靶分子不同。另外,他们应用复合靶解析 SELEX (deconvolution-SELEX) 筛选出每一靶标的适配子,即以前面 25 轮循环所得适配子文库进行 PCR 扩增,变性聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化分离 ssDNA,再与复合靶交联结合后,SDS-PAGE 分离结合产物并转移至硝酸纤维素膜 (NC 膜),放射自显影检测交联产物,切下 NC 膜上蛋白印迹的适当条带直接用于 PCR 扩增,筛选到单一的 DNA 分子并进行测序。相似报道还见于人血浆和 羧基谷氨酸蛋白复合靶适配子的筛选<sup>[19,20]</sup>。

### 3 其他适配子筛选技术

经典 SELEX 依据亲和力大小筛选适配子,无法避免其与功能上不重要的靶分子结构域结合,从而影响了适配子功能方面的基础研究和临床应用;SELEX 筛选中的重要步骤是 PCR 扩增适配子,限制了其在非扩增文库的使用。仿进化法、非 SELEX 适配子筛选等方法的出现,有助于解决以上问题。

#### 3.1 仿进化法

亲和力高的适配子其抑制靶分子活性的功能并不一定强,也就不一定能直接用作酶的抑制剂。Ikebuku 等<sup>[21]</sup>应用基于抑制活性的 DNA 适配子筛选方法,即仿进化法 (evolution-mimicking algorithm, EMA),筛选到针对凝血酶活性抑制的 DNA 适配子。其过程为:随机设计和合成 10 种假定能形成 G-四聚体结构的 15mer 寡核苷酸;选择抑制活性高的序列,通过突变以产生 10 个下一代新序列;重复 5 个循环后,成功得到高抑制活性的适配子。不足的是,EMA 法筛选文库中寡核苷酸的含量 105。为扩展 EMA 筛选法的潜力,Noma 等<sup>[22]</sup>建立了 SELEX 预筛选的仿进化法,对适配子进行两阶段的筛选:传统亲和力筛选和基于抑制

活性的 EMA 筛选,将文库含量提高至  $10^{10}$ ,随着筛选的重复,适配子的抑制活性不断得到增强。

#### 3.2 非 SELEX 适配子筛选

经典的 SELEX 技术包括依据亲和力法分离适配子和 PCR 法扩增适配子两个步骤。2006 年, Berezovski 等<sup>[23]</sup>首次报道了非 SELEX 适配子 (non-SELEX selection of aptamer) 筛选技术,仅有重复的分离步骤而无扩增步骤。他们用高效的 NECEEM 进行分离,重复 3 次后,将文库对靶蛋白的亲和力提高  $10^4$  倍以上,并与经典 SELEX 同步筛选出的 H-ras 蛋白适配子相比,最终富集库的亲和力相近,分别是 0.3  $\mu$ M 和 0.6  $\mu$ M。非 SELEX 筛选最大的优势是适用于非扩增文库筛选,这一特征使非 SELEX 适配子筛选成为药品探索中重要的潜在工具。与经典 SELEX 筛选方法需数周时间相比,基于 NECEEM 的整个非 SELEX 筛选过程仅需一周,而且能在测序前对所有克隆子进行筛选<sup>[24]</sup>。此外,非 SELEX 筛选法允许准确计算文库中适配子的丰度,从而使其成为研究 DNA 文库基本特性的有力工具。

#### 3.3 短小寡核苷酸筛选

为保证文库丰富的结构和构象多样性,寡核苷酸链随机序列的长度常设计在 30 nt 左右,然而,应用短于 8~10 nt 的短链文库同样有可能筛选到与靶分子特异结合的适配子。Mescalchin 等<sup>[25]</sup>筛选到针对 H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> 逆转录酶的六聚核酸适配子 Hex-S3,亲和力为 5.3  $\mu$ M,并使人体细胞内 H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> 的复制活性降低 3 个数量级。加上链短,易于进入细胞内,合成成本低,很有可能在药物开发方面有广阔前景。值得注意的是,这与 Pinskaya 等<sup>[26]</sup>报道的应用短寡核苷酸文库筛选 H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> 整合酶的适配子有所不同,其结合亲和力不是依赖寡核苷酸的特定一级序列,而是依赖能形成四重结构的嘧啶或氧胞嘧啶残基的存在。

### 4 讨论与展望

适配子筛选技术近年来不断改良与发展,使适配子的筛选效率得到提高,其适用范围得到改善,除筛选到在临床诊断和治疗中具有潜在应用价值的适配子外,还筛选到在分析化学、遗传学和蛋白组学等领域具有应用价值的适配子<sup>[27]</sup>。一些适配子药物已经进入临床前期或临床期试验,并逐步成为一类新型药物<sup>[28]</sup>。适配子与靶分子结合的亲和力和特异性方面可与抗体媲美,甚至优于抗体,并且具有抗体所不具备的其他一些优点,在诊断和治疗应用方面有独特优势:(1)适配

子通过体外筛选制备,不依赖动物、细胞,毒素分子也可作为靶标制备相应的适配子,靶标的免疫原性强弱也不影响其适配子的筛选;(2)适配子没有免疫原性,可用于体内诊断或治疗;(3)比抗体的分子小,可用于细胞内诊断和治疗;(4)适配子的变性是可逆的,变性的适配子可在数分钟内再生,因而可反复使用;(5)适配子稳定性好,可长期保存,能在常温下运输;(6)化学合成的适配子精确度高,重复性强,生产中很少存在批次间的差异;(7)报告子如荧光素或生物素等可与适配子精确地结合在操作者能识别的位点上。适配子可通过芯片技术、分子信标、双位点结合试验(夹心法)、流式细胞术、生物传感器等模式应用于疾病的实验诊断。基于适配子的生物传感器可达到“无试剂、可再生、超敏感”的靶分子检测<sup>[29]</sup>。也有人直接用荧光染料 TOYO 常温下与适配子混合即完成“标记”而用于靶分子检测<sup>[30]</sup>,简便易行,效果良好。核酸适配子对于弥补蛋白质芯片和血清蛋白组学在血清标志物高通量检测中的缺陷可能也具有重要价值<sup>[31]</sup>。

另一方面,通过所谓的后 SELEX 技术(Post-SELEX)的深入研究,目前已有多种方法对适配子进行改造,可增加其专一性和亲和力,增强抗核酸酶能力,使其更加稳定,改善其实用价值,如对核苷酸进行化学修饰(如糖基化、硫代等),或将适配子联接到高分子载体上,或制备镜像异构适配子(Spiegelmer aptamer),或引入锁核酸(locked nucleic acid)的杂合 DNA 适配子,或构建环状 DNA 适配子等。可以预见,随着适配子筛选和改造技术的发展,将进一步推动适配子在分子识别技术中的应用,为基础研究和应用研究提供更加有效的分子识别工具。

## 参考文献

- [1] Murphy M B, Fuller S T, Richardson P M, et al. An improved method for the *in vitro* evolution of aptamers and applications in protein detection and purification. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(18): e110
- [2] Stötenberg R, Reinemann C, Strehlitz B. FluMag-SELEX as an advantageous method for DNA aptamer selection. *Anal Bioanal Chem*, 2005, 383(1): 83 ~ 91
- [3] Mendonsa S D, Bowser M T. *In vitro* selection of high-affinity DNA ligands for human IgE using capillary electrophoresis. *Anal Chem*, 2004, 76(18): 5387 ~ 5392
- [4] Tang J, Xie J, Shao N, et al. The DNA aptamers that specifically recognize ricin toxin are selected by two *in vitro* selection methods. *Electrophoresis*, 2006, 27(7): 1303 ~ 1311
- [5] Mosing R K, Mendonsa S D, Bowser M T. Capillary electrophoresis-SELEX selection of aptamers with affinity for HIV-1 reverse transcriptase. *Anal Chem*, 2005, 77(19): 6107 ~ 6112
- [6] Mendonsa S D, Bowser M T. *In vitro* selection of aptamers with affinity for neuropeptide Y using capillary electrophoresis. *J Am Chem Soc*, 2005, 127(26): 9382 ~ 9383
- [7] Krylov S N, Berezovski M. Non-equilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures- appreciation of kinetics in capillary electrophoresis. *Analyst*, 2003, 128(6): 571 ~ 575
- [8] Berezovski M, Drabovich A, Kryova S M, et al. Nonequilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures: a universal tool for development of aptamers. *J Am Chem Soc*, 2005, 127(9): 3165 ~ 3171
- [9] Cox J C, Ellington A D. Automated selection of anti-protein aptamers. *Bioorg Med Chem*, 2001, 9(10): 2525 ~ 2531
- [10] Eulberg D, Buchner K, Maasch C, et al. Development of an automated *in vitro* selection protocol to obtain RNA-based aptamers: identification of a biostable substance P antagonist. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(4): e45
- [11] Hybarger G, Bynum J, Williams R F, et al. A microfluidic SELEX prototype. *Anal Bioanal Chem*, 2006, 384(1): 191 ~ 198
- [12] Vater A, Jarosch F, Buchner K, et al. Short bioactive Spiegelmers to migraine-associated calcitonin gene-related peptide rapidly identified by a novel approach: tailored-SELEX. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(21): e130
- [13] Singer B S, Shtatland T, Brown D, et al. Libraries for genomic SELEX. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(4): 781 ~ 786
- [14] Wen J D, Gray D M. Selection of genomic sequences that bind tightly to Ff gene 5 protein: primer-free genomic SELEX. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(22): e182
- [15] Jarosch F, Buchner K, Klusmann S. *In vitro* selection using a dual RNA library that allows primerless selection. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(12): e86
- [16] 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 Biotechnol*, 2003, 102(1): 15 ~ 22
- [17] White R, Rusconi C, Scardino E, et al. Generation of species cross-reactive aptamers using “toggle” SELEX. *Mol Ther*, 2001, 4(6): 567 ~ 573
- [18] Martell R E, Nevins J R, Sullenger B A. Optimizing aptamer activity for gene therapy applications using expression cassette SELEX. *Mol Ther*, 2002, 6(1): 30 ~ 34
- [19] Fitter S, James R. Deconvolution of a complex target using

- DNA aptamers *J Biol Chem*, 2005, 280(40): 34193 ~ 34201
- [20] Layzer J M, Sullenger B A. Simultaneous generation of aptamers to multiple gamma-carboxyglutamic acid proteins from a focused aptamer library using DeSELEX and convergent selection. *Oligonucleotides*, 2007, 17(1): 1 ~ 11
- [21] Ikebukuro K, Okumura Y, Sumikura K, et al. A novel method of screening thrombin-inhibiting DNA aptamers using an evolution mimicking algorithm. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(12): e108
- [22] Noma T, Ikebukuro K. Aptamer selection based on inhibitory activity using an evolution mimicking algorithm. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 347(1): 226 ~ 231
- [23] Berezovski M, Musheev M, Drabovich A, et al. Non-SELEX selection of aptamers. *J Am Chem Soc*, 2006, 128(5): 1410 ~ 1411
- [24] Berezovski MV, Musheev MU, Drabovich AP, et al. Non-SELEX: selection of aptamers without intermediate amplification of candidate oligonucleotides. *Nat Protoc*, 2006, 1(3): 1359 ~ 1369
- [25] Mescalchin A, Wunsche W, Laufer SD, et al. Specific binding of a hexanucleotide to HIV-1 reverse transcriptase: a novel class of bioactive molecules. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(19): 5631 ~ 5637
- [26] Pinskaya M, Romanova E, Volkov E, et al. HIV-1 integrase complexes with DNA dissociate in the presence of short oligonucleotides conjugated to acridine. *Biochemistry*, 2004, 43(27): 8735 ~ 8743
- [27] Mainal T, Cengizözalp V, Lozano Sánchez P, et al. Aptamers: molecular tools for analytical applications. *Anal Bioanal Chem*, in press
- [28] Cerchia L, de Francisci V. Nucleic acid-based aptamers as promising therapeutics in neoplastic diseases. *Methods Mol Biol*, 2007, 361: 187 ~ 200
- [29] Radi A E, Acero Sanchez J L, Baldrich E, et al. Reagentless, reusable, ultrasensitive electrochemical molecular beacon aptasensor. *J Am Chem Soc*, 2006, 128(1): 117 ~ 124
- [30] Zhou C, Jiang Y, Hou S, et al. Detection of oncoprotein platelet-derived growth factor using a fluorescent signaling complex of an aptamer and TOTO. *Anal Bioanal Chem*, 2006, 384(5): 1175 ~ 1180
- [31] Eisenstein M. Protein arrays: growing pains. *Nature*, 2006, 444(7121): 959 ~ 962

## Methodology for Aptamer Selection

ZHANG Hui-qing FANG Nian ZHANG Kun-he

(The First Affiliated Hospital, Nanchang University, Jiangxi Provincial Key Laboratory for Digestive Disease Research, Nanchang 330006, China)

**Abstract** The methods for aptamer selection have been modified and developed in recent years. Selection efficiency has been increased due to the improvement in separation of bound and unbound nucleic acids; applicability of aptamers has been improved due to the development of primer-free SELEX and the utilization of short oligonucleotide library; more research requirements have been satisfied due to the functional modifications of aptamer selection methods. All the methodological advances enhance the potential value of aptamers in basic researches and clinical applications.

**Key words** Aptamer SELEX