

核酸识体的研究及应用*

汪俊^{1,2} 江雅新^{1,2} 方晓红^{1,†} 白春礼¹

(1 中国科学院化学研究所 北京 100080)

(2 中国科学院研究生院 北京 100039)

摘要 核酸识体(aptamer)是近年来发展起来的一类经体外人工进化程序筛选出的寡聚核苷酸. 它能高效、特异地结合各种配体,在蛋白质的分析检测、医学诊断治疗、生物传感器和分子开关的开发等方面有很大的应用前景. 文章对核酸识体的研究和应用进展进行了综述.

关键词 核酸识体, SELEX, 蛋白质, 生物传感器, 分子开关

Aptamers and their applications

WANG Jun^{1,2} JIANG Ya-Xin^{1,2} FANG Xiao-Hong^{1,†} BAI Chun-Li¹

(1 Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

(2 Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract Aptamers are a new class of synthetic DNA/RNA oligonucleotides generated from in vitro selection to bind with various molecules. Due to their high affinity and specificity, aptamers are becoming promising reagents in protein detection and analysis, disease treatment and new drug selection, biosensor and molecular switch development, etc. Advances in the study and applications of aptamers are reviewed.

Key words aptamer, SELEX, protein, biosensor, molecular switch

核酸识体是一段由 20—60 个碱基组成的单链寡聚核苷酸. 它通过指数富集配体系统进化(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)技术从人工构建的随机单链寡核苷酸文库里筛选出来,能特异性地结合蛋白质、多肽、有机物、金属离子等各种配体,其解离常数很小(nM 或 pM 级). 1990 年,美国的 Szostak J 和 Gold L^[1,2]等实验室各自独立地建立核酸文库,并逐步发展成一种能从超过 10^{15} 个核酸分子文库里筛选出与配体高效、专一结合的 DNA 或 RNA 片段的 SELEX 技术. 筛选出来的 DNA/RNA 寡核苷酸被称为核酸识体(aptamer, 来源于拉丁字 aptus(“适合”之意)). 核酸识体的出现,冲破了传统意义上关于核酸只是遗传信息存储和转运载体的认识. 利用核酸结构的多样性,可使它与各种配体产生高选择性的结合. 由于核酸识体具有易合成、易存储、易修饰等优点,它在核酸结构的多样性、蛋白质/DNA 相互作用等的研究及医学

诊断和治疗、传感器、分子开关等方面的应用引起了人们的极大兴趣^[3,4].

1 核酸识体的筛选——SELEX 技术

SELEX 技术是分子进化工程技术的一种^[5]. 我们知道核酸分子在一级结构上就存在着核苷酸大量不同顺序的排列组合. 利用合成化学可以将一定长度的核苷酸的不同组合都合成出来,构建成一个包含了这一长度核酸分子所有可能突变的文库,这样就可以在试管里模拟大自然的进化,有目的地施加选择压力,在很短的时间里筛选出符合特定要求的分子.

这里以图 1 为例说明利用 SELEX 技术筛选

* 国家自然科学基金杰出青年科学基金(批准号 20225516)资助项目

2003-09-30 收到

† 通讯联系人. E-mail: xfang@iccas.ac.cn

RNA 核酸识体的过程:首先用自动固相合成法建立一个碱基数为 n 的随机 DNA 文库,则文库含有数目为 4^n 的不同 DNA 序列.这些 DNA 序列的两端为固定的引物序列,5'端引物里包含一段 T7 启动子序列,可被 T7RNA 聚合酶识别,并转录为随机 RNA 文库.靶分子在一定的缓冲条件下与文库里的分子培育,然后利用硝酸纤维素滤膜法、变性凝胶电泳法或亲和层析法等分离与靶分子结合的 RNA.能结合靶分子的 RNA 经洗脱、纯化后,进行反转录-PCR 扩增,作为下一轮筛选使用的 DNA 模板.然后继续循环进行相同的步骤,随筛选轮数的增加,寡聚核苷酸与靶分子的亲和力逐渐增强,最后得到亲和力和特异性很高的核酸识体.将筛选得到的产物克隆入载体,并将选出的克隆进行测序和结构分析,可以获知高亲和力寡聚核苷酸的序列和结构特征.原则上通过 SELEX 技术可以筛选出能结合任意靶分子的核酸识体.靶分子的范围可以从金属离子、小分子到多肽、蛋白质,乃至整个细胞.

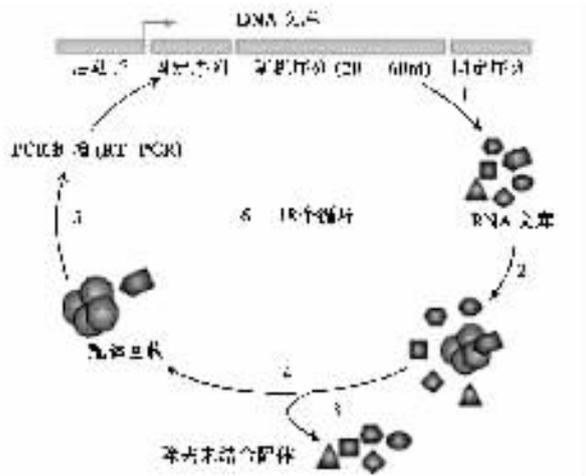


图 1 SELEX 技术路线图^[6]

2 核酸识体与配体的相互作用

核酸识体与配体结合时,通常会通过构型适配形成一些稳定的二级结构,如发卡、假结、凸环、G-四分体等.决定这些结构的碱基往往是与配体结合的重要位点.采用核磁共振及 X 射线衍射等手段可以从结构上对核酸识体与配体的作用机理进行较为深入的研究.从对获得的一些高分辨的核酸识体与配体复合物的三维结构研究中发现核酸识体与配体主要通过“假碱基对”的堆积作用、氢键作用、静电作用和形状匹配等产生高特异性的结合力^[7].

“假碱基对”的堆积是指配体的芳香环部位与

核酸分子的碱基平面平行,并有重叠,类似于核酸分子里的碱基堆积作用.如茶碱分子中的芳香环能与其核酸识体分子里的碱基重叠^[8],但茶碱分子 7-N 上的 H 被甲基取代后(即咖啡因),这种平行关系被破坏,能结合茶碱的核酸识体就不能识别咖啡因分子,亲和力相差 10^4 倍.在多数核酸识体/配体复合物里,尤其是核酸识体/蛋白质复合物,堆积作用扮演一个关键角色,其次是氢键作用.如分子的侧链进入核酸分子折叠部位的深处,与核酸的碱基形成较强的氢键是核酸识体识别精氨酸的重要原因^[9].形状匹配和静电作用是核酸识体能特异识别氨基葡萄糖苷的主要原因^[10].

我们用原子力显微镜研究了核酸识体与配体特异性相互作用力的大小.以免疫球蛋白 E (IgE)及其 DNA 核酸识体为模型体系,测定了二者的单分子相互作用力,并将 IgE/核酸识体的相互作用与 IgE/抗体的相互作用进行了比较.发现核酸识体与蛋白的作用力可以与抗体抗原的作用力相媲美,甚至强于抗体抗原的作用^[11].我们还进一步研究了离子强度对 IgE 与核酸识体特异性相互作用的影响,发现随着离子强度的增加,不仅二者的单分子相互作用力有所减弱,而且二者在结合过程中的成键几率也会有明显降低.

3 核酸识体的应用

3.1 蛋白质的分析和生物传感器

随着人类基因组计划的完成和功能基因组学、蛋白质组学研究的开展,发展能对重要蛋白质进行实时检测跟踪的高灵敏度的分析方法是后基因组时期一个重要的研究领域.蛋白质的检测通常要利用抗体-抗原的特异相互作用.核酸识体对蛋白质的结合力和特异性可与蛋白质的抗体相媲美,且与抗体相比具有许多优越性.如核酸识体是人工化学合成,合成简单,稳定性、重现性好,可以按需要对序列中的核苷酸定点标记各种官能团和报告基团(如荧光基团),便于核酸识体的固定化和信号的检测,与蛋白质作用的动力学参数可以按要求改变等.核酸识体在蛋白质分析检测上的应用倍受关注.

研究人员已开发了一种类似于 ELISA 检测蛋白质的技术——ELOS(enzyme-linked oligonucleotide assay),并用于检测血清中的血管内皮生长因子(hVEGF)^[12].ELOS 的应用模式有三种:核酸识体捕获蛋白,抗体检测蛋白;抗体捕获蛋白,核酸识体检测蛋白;核酸识体既捕获蛋白又检测蛋白.

利用核酸识体的特性,发展无须分离洗脱样品、能在均相溶液中快速实时地检测混合组分中靶蛋白的信号核酸识体(signaling aptamer)是目前较为活跃的研究方向. 信号核酸识体能在与蛋白质结合时直接产生荧光信号的改变,一般通过两种标记方法实现:

一种是核酸识体上标记单个荧光基团,通过荧光强度、各向异性等信号的变化来检测蛋白质. 当核酸识体结合上配体后,荧光基团所处的微环境发生改变,则相应荧光强度可能发生改变^[13]. 由于核酸识体分子相对较小,与蛋白质结合后,分子量发生较大变化,荧光基团的翻滚变慢,荧光偏振和各向异性大大增加^[14].

另一种更有效的方法是在核酸识体上同时标记两个不同的荧光基团,借助结合蛋白质前后核酸识体构象的变化使两个基团的荧光共振能量转移(FRET)效率发生改变,如将核酸识体的选择性和分子信标(molecule beacon)^[15]的信号传导机制相结合,发展了核酸识体信标(molecule aptamer beacon)^[16-18].

将 5' 和 3' 端分别标记上荧光素和淬灭基团 DABCYL 而构建的凝血酶核酸识体信标^[16],在结合凝血酶后形成稳定的四链结构,两端基团拉近,荧光信号降低,且信号的变化与凝血酶的浓度呈线性关系. 若淬灭基团改为可与荧光素产生荧光共振能量转移的香豆素,可进一步提高凝血酶的检测灵敏度. 利用两段 RNA 构成的核酸识体信标可用来检测 HIV 转录激活蛋白 Tat^[17]. 双标记的血小板源生长因子 PDGF 核酸识体信标,能从癌细胞培养液中检测出比正常细胞表达水平高的 PDGF^[18]. 这些研究表明,核酸识体信标将在发展各种可以取代抗体的蛋白质探针、测定体内蛋白质和研究其功能、疾病早期诊断等方面具有极大的应用潜力.

除均相溶液中的检测外,研究人员将核酸识体作为探测元件发展了各种生物传感器. 以抗体为基质的免疫传感器的重复使用受到限制(如需防抗体变性),而核酸识体可以在不同温度、盐浓度、变性剂等条件下反复变性和复性,这是核酸识体作为传感器探测元件的另一优点.

最早利用核酸识体发展的传感器采用荧光分光光度计,以渐消失场激发荧光标记的抗凝血酶核酸识体,通过核酸识体捕获蛋白质前后荧光偏振的变化来检测凝血酶蛋白^[19],其装置比较复杂. 把荧光标记的抗凝血酶核酸识体固定在硅球上,然后将硅

球嵌入光纤末端,可建立光纤微阵列传感器^[20]. 光纤传感器能在通常的传感器无法到达或不能工作的环境下工作,比如核环境、人体内部等,且容易做成多光纤的微阵列系统,方便地处理多通道信号;光纤里传输的光信号抗干扰能力也较强. 研究人员还分别将抗 IgE 的核酸识体和 IgE 的单抗固定在晶振片上了制备石英晶振天平(QCM)传感器^[21],实验结果表明基于核酸识体的检测方式其线性范围优于单抗,再生能力也比单抗强.

3.2 临床治疗

由于核酸识体与蛋白特异性结合后往往能抑制蛋白的功能,而且它缺乏免疫原性,体内渗透力强,因此是一种很有发展前途的药物分子,可用于直接干扰疾病的发生发展过程. 人们已开发出一些与肿瘤、爱滋病、肝炎等相关的蛋白质的核酸识体,一些已进入临床试验,可望发展成新型药物^[22]. 如筛选出的 RNA 核酸识体在浓度为 1nM 时就能成功地抑制碱性成纤维细胞因子(bFGF)与细胞膜上受体的结合^[23]. Raf-1 癌基因编码的胞质蛋白 Raf-1 具丝/苏氨酸激酶活性,在调控细胞生长、增殖发育分化的信号转导过程中起重要作用. Raf-1 的 RNA 核酸识体能特异性结合 Raf-1 的 Ras 蛋白结合域,使之不能被 Ras 激活进行信号传导^[24]. 这些核酸识体将可能用于癌症的治疗.

作为候选药物的核酸识体必须解决两个关键问题才能用于临床:

(1)在生物体内的稳定性. 未加修饰的核酸识体在体内很容易被核酶降解. 在嘧啶的 2' 位修饰 NH₂, F 或 OCH₃ 是一条提高稳定性的途径. 由于直接修饰核酸识体可能会影响它与配体的亲和力. 一个解决方法是在初始的文库里就使用 2' 位修饰过的核酸进行筛选. 经修饰过的 bFGF 核酸识体在血浆里的寿命比未加修饰的提高至少 1000 倍^[25].

(2)在体内的滞留时间. 由于相对分子量较小,核酸识体较容易从血液里被清除. 要提高核酸识体的滞留时间可以让它与一些大分子如聚乙二醇或链霉抗生素结合,还可以将核酸识体包入脂质体内. 美国 Gilead Sciences 公司合成的 2' 位修饰 F 并与 PEG 相连的抗血管内皮生长因子 VEGF 的核酸识体(NX1838),已经运用于 I 期临床^[26].

3.3 分子开关

核酸识体在不同条件下可以反复变性/复性以及配体结合后通过构型适配引起构型改变的特点,预示其能够成为良好的分子开关. 识体核酶(ap-

tazyme)就是核酸识体在分子开关应用领域的一个新的发展方向.它将核酸识体的配体结合能力与核酶(ribozyme)的催化活性相结合^[4,27].最常用的核酶为能在特定位点催化剪切 RNA 的锤头状酶,其催化剪切活性可通过变构调节.人们将核酸识体作为效应分子的结合序列,与核酶的催化活性部位(通常为锤头状核酶具催化活性的保守序列)通过一个通讯元件序列相连.核酸识体的配体都可用作为效应分子,与核酸识体结合后,识体核酶发生构象变化,从而影响到催化部位活性的改变,催化反应的速率常数极大改变(增加或减小).图 2 为其原理示意图^[27].

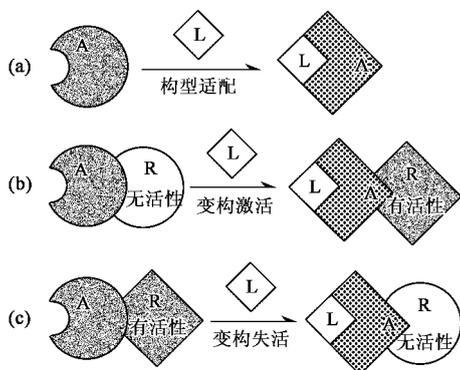


图 2 变构调节核酶的原理示意图^[27]

A: 核酸识体, 效应分子结合部位; L: 与核酸识体特异结合的配体; R: 催化活性中心

识体核酶的优势是核酸识体识别位点能特异性捕获各种配体,催化部位极大地放大信号,因此它既可用于检测分析型生物传感器的探头,而且也能发展为一个良好的分子开关.

并非将核酸识体序列与核酶的序列简单地连接在一起就可获得具有变构调节功能的识体核酶.目前识体核酶的设计一般以核酸识体和核酶序列为基础,先通过合理预测(主要是通讯元件部分的序列设计),然后经体外筛选方式完成.目前已经得到以 ATP、黄素单核苷酸 FMN、茶碱以及蛋白质等为效应分子的识体核酶. Soukup^[28]小组最近报道了一个 9-nt 通讯元件的通用序列,但应用范围仍然有限.随着人们对核酸分子多态性研究的深入,识体核酶受变构控制的机制将被清楚阐明,人们将能理性地设计出符合需要的识体核酶.

核酸识体的出现,使人们认识到核酸不仅是遗传信息的存储和转载体,而且也可作为各种功能分子.在不同环境条件下寡聚核苷酸可采取迥然不

同的构象,可以为任何靶分子提供足够多的、包纳几乎所有可能存在的空间构象的底物.通过 SELEX 技术筛选出能与配体高度特异结合且亲和力高的核酸识体,极大加速了新药的筛选.核酸识体作为诊断试剂,单独或与抗体组合应用已显示其优越性,特别是可以弥补抗体在诊断领域里的不足.核酸识体是理想的传感器的识别元件,在生物传感器、分子开关等领域里将有很广阔的应用前景,如将可能成为蛋白质组研究中的重要工具.

参 考 文 献

- [1] Ellington A D, Szostak J W. *Nature*, 1990, 346 : 818
- [2] Tuerk C, Gold L. *Science*, 1990, 249 : 505
- [3] Jay Hesselberth, Michael P R, Sulay Jhaveri *et al.* *Reviews in Molecular Biotechnology*, 2000, 74 : 15
- [4] Soukup G A, Breaker R R. *Nanotechnology*, 1999, 17 : 469
- [5] 田波等编著. 分子进化工程. 北京: 科学出版社, 1999, 1—5 [Ed. Tian B *et al.* *Molecular Evolution Engineering*. Beijing : Science Press, 1999, 1—5 (in Chinese)]
- [6] Burgstaller P, Girod A *et al.* *Drug Discovery Today*, 2002, 7 : 1221
- [7] Hermann T, Dinshaw J Patel. *Science*, 2000, 287 : 820
- [8] Jenison R D, Gill S C, Pardi A *et al.* *Science*, 1994, 263 : 1425
- [9] Yang Y, Kochoyan M, Burgstaller P *et al.* *Science*, 1996, 272 : 1343
- [10] Jiang L, Patel D J. *Nat. Struct. Biol.*, 1998, 5 : 769
- [11] Jiang Y X, Zhu C F, Ling L S *et al.* *Anal. Chem.*, 2003, 75 : 2112
- [12] Drolet D W, Moon - Mcdermott L, Romig T S. *Nat. Biotech.*, 1996, 14 : 1021
- [13] Jhaveri S D, Kirby R, Conrad R *et al.* *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122 : 2469
- [14] Fang X H, Cao Z H, Beck T *et al.* *Anal. Chem.*, 2001, 73 : 5752
- [15] Fang X, Li J J, Perlette J *et al.* *Anal. Chem.*, 2000, 72 : 747A
- [16] Li J W, Fang X H, Tan W H. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2002, 292 : 31
- [17] Yamamoto R, Baba T, Kumar P K R. *Genes Cells*, 2000, 5 : 523
- [18] Fang X, Mi Y, Li J *et al.* *Cell Biochem. Biophys.*, 2002, 37 (2) : 71
- [19] Potyrailo R A, Conrad R C, Ellington A D *et al.* *Anal. Chem.*, 1998, 70 : 3419
- [20] Lee M, Walt D R. *Anal. Biochem.*, 2000, 282 : 142
- [21] Liss M, Petersen B, Wolf H *et al.* *Anal. Chem.*, 2002, 74 : 4488
- [22] Laura Cerchia, Vittorio de Francis *et al.* *FEBS Letters*, 2002, 528 : 12
- [23] Kensch O, Connolly B A *et al.* *J. Biol. Chem.*, 2000, 275 : 18271
- [24] Kimoto M, Shirouzu M *et al.* *Eur. J. Biochem.*, 2002, 269 : 697
- [25] Jellinek D, Green L S, Bell C *et al.* *Biochemistry*, 1995, 34 : 11363
- [26] Ruckman J, Green L S, Beeson J *et al.* *J. Biol. Chem.*, 1998, 273 : 20556
- [27] Breaker R R. *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, 13 : 31
- [28] Kersburg A, Soukup G A. *Nucleic Acids Res.*, 2002, 30 : 4599