

SELEX 法筛选宫颈癌前病变核酸适配子

李文慧*, 石大林*, 贾茹涵, 杨静, 张艳艳, 陈卫, 韩跃武

兰州大学 生物化学与分子生物学实验室, 甘肃 兰州 730000

李文慧, 石大林, 贾茹涵, 等. SELEX 法筛选宫颈癌前病变核酸适配子. 生物工程学报, 2018, 34(5): 785–793.

Li WH, Shi DL, Jia RH, et al. Selection of DNA aptamers to cervical intraepithelial neoplasia by SELEX. Chin J Biotech, 2018, 34(5): 785–793.

摘要: 构建随机 ssDNA 文库, 通过 SELEX 技术, 以正常、炎性宫颈脱落细胞为反筛细胞, 以上皮内低级别病变 (CIN1)、上皮内高级别病变 (CIN2、CIN3) 和鳞状细胞癌脱落细胞为正筛细胞, 经过 12 轮筛选特异性适配子高度富集得到宫颈癌前病变适配子库, 经特异性、亲和力分析和细胞免疫荧光确立高特异性适配子 CIN-Ap4 可作为诊断宫颈癌前病变生物标志物, 为宫颈癌前病变分子诊断奠定理论基础, 提供新思路。利用 Prime Premier 5.0 设计构建了随机 ssDNA 文库并根据文库两端固定序列设计引物, 对对称 PCR 和间接不对称 PCR 中的退火温度、循环数以及上、下游引物浓度比等条件进行优化, 分析确定 50 μ L 反应体系中对称 PCR 的最佳反应条件为: 最佳退火温度为 49.5 $^{\circ}$ C, 最佳循环数为 15 个循环; 间接不对称 PCR 的最佳反应条件为: 50 μ L 反应体系中上、下游引物浓度的最佳比例为 80:1, 最佳循环数为 35 个循环。实验结果表明成功构建了寡核苷酸文库, 在最适 PCR 条件下可获得理想的 dsDNA 和 ssDNA, 并具有良好的重复性, 为顺利筛选适配子提供保证。

关键词: 宫颈癌前病变, 指数式富集的配体系统进化技术, 生物标志物, PCR 条件优化

Selection of DNA aptamers to cervical intraepithelial neoplasia by SELEX

Wenhui Li*, Dalin Shi*, Ruhan Jia, Jing Yang, Yanyan Zhang, Wei Chen, and Yuewu Han

Biochemistry and Molecular Biology Laboratory, Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu, China

Abstract: An *in vitro* synthesized random ssDNA library was subjected to 12 rounds of selection against anti-screening cells and sieving cells by SELEX. Normal and inflammatory cervical exfoliation cells were selected as anti-screening cells, and the cervical exfoliation cells of low-grade squamous intraepithelial lesion (CIN1), high-grade squamous intraepithelial lesion (CIN2, CIN3) and cervical carcinoma were selected as sieving cells during the screening process. Then, the highly specific aptamer CIN-Ap4 was established by the analysis of the specificity, affinity and cell immunofluorescence, which can be used

Received: October 20, 2017; **Accepted:** February 26, 2018

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 21272107), Science-Technology Support Plan Projects of Gansu Province.

Corresponding author: Yuewu Han. Tel: +86-931-8915023; E-mail: hanyuewu730000@163.com

*These authors contributed equally to this study.

国家自然科学基金 (No. 21272107), 甘肃科技支撑计划资助。

网络出版时间: 2018-04

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.q.20180418.1711.001.html>

as biomarker for Cervical Intraepithelial Neoplasia. Prime Premier 5.0 was applied to design a random ssDNA library. According to the fixed sequence at both ends of the library, a pair of primers were designed and synthesized. At the same time, the optimal annealing temperature, cycle times and primer concentration ratio of PCR procedure were selected. The results under the optimal condition are shown as follows. In the 50 μ L reaction system, the optimum reaction conditions of symmetry PCR are as follows: annealing temperature is 49.5 $^{\circ}$ C, number of cycles is 15. The optimal reaction conditions of indirect asymmetric PCR are as follows: the primer concentration ratio is 80:1, and the number of cycles is 35. The experiment proves that the oligonucleotide library is constructed successfully, and the highly specific dsDNA and ssDNA can be obtained under optimal PCR conditions with good repeatability, which establishes the foundation for the further exploration and experimentation.

Keywords: cervical intraepithelial neoplasia (CIN), systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX), biomarker, optimize of PCR conditions

世界卫生组织 (WHO) 公布, 2012 年全世界有超过 50 万的宫颈癌新发病例, 其中超过 85% 的病例来自发展中国家。据全国肿瘤登记中心统计, 2011 年我国宫颈癌新发病例 87 000 人, 死亡病例 23 000 人, 近 30 年来宫颈癌发病率呈上升趋势, 且发病高峰趋于年轻化。宫颈癌早期没有明显症状和体征, 及早发现宫颈癌前病变, 并通过治疗阻断癌前病变的发展, 可最大程度降低宫颈癌的发生率, 因此寻找宫颈癌前病变诊断的生物标志物具有重要意义。1990 年 Tuerk 等^[1]和 Ellington 等^[2]分别报道了应用指数富集配体系统进化技术 (Systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX) 筛选得到能与噬菌体 T4 DNA 聚合酶和有机染料特异性结合的 RNA 片段, 并命名为“适配子”或“配体”^[3]。该技术原理是利用大容量的随机单链寡核苷酸文库进行体外多轮筛选、扩增, 并最终获得与非核酸靶分子高亲和力、高特异性结合的寡核苷酸序列^[4]。大容量的随机单链寡核苷酸文库进行体外多轮筛选适配体是折叠成特异性 3D 结构的具有高亲和力的单链 DNA 或 RNA, 能够特异性结合多肽、蛋白质^[5]、细胞^[6]乃至整个器官的靶分子^[7-9]。另外, 适配子在一些生理条件下, 可通过反义寡核苷酸杂交使其失活, 因此可以用于设计解毒剂^[10]。近年来, 随着研究的不断深入, 越来越多实验结果表明相比于抗体, 适配子具有更强的亲和力、热稳定性、

靶标多样性、高特异性、可化学合成等优点^[11-15], 可以代替抗体用于疾病的诊断、医药学和工业等领域^[16]。本研究采用 SELEX 技术筛选宫颈癌前病变宫颈脱落细胞特异性适配子库^[17-18], 并通过特异性、亲和力分析和细胞免疫荧光确立高特异性适配子, 可作为宫颈癌前病变诊断标志物, 为宫颈癌前病变分子诊断奠定理论基础, 提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样本

实验所用样本均取自液基薄层细胞检测结果为: 正常、炎性、上皮内低级别病变 (CIN1) 上皮内高级别病变 (CIN2、CIN3) 和鳞状细胞癌宫颈脱落细胞, 所有样本由甘肃迪安同享医学检验中心提供。

1.1.2 随机 ssDNA 文库及引物

由 Prime Premier 5.0 软件设计随机 ssDNA 文库及引物 (表 1)^[19], 随机 ssDNA 文库 5'端和 3'端均为 18 个碱基固定序列, 中间 $N_{(54)}$ 为 54 个碱基随机序列。上游引物 P_1 与 ssDNA 文库 5'端固定序列相同, 下游引物 P_2 与 ssDNA 文库 3'端固定序列互补, 同时合成 5'端 FITC 荧光标记的上游引物 P_3 。上述均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

表 1 随机 ssDNA 文库及引物序列

Table 1 Sequences of random ssDNA library and primer

Name	Sequence (5'-3')
Random ssDNA library	TAGATTGCACTTACTATC-N ₍₅₄₎ -ATTGAATAAGCTGGTATA
Primer ₁	TAGATTGCACTTACTATC
Primer ₂	TATACCAGCTTATTCAAT
Primer ₃	FITC-TAGATTGCACTTACTATC

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增反应条件优化

经 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定随机 ssDNA 文库及引物是否构建成功并确定其条带位置, 同时确定 dsDNA 条带的位置, 作为后续实验 PCR 产物目的条带的参考标准。

以 50 μ L 反应体系 (模板、引物各 2 μ L, 2 \times PCR Master Mix 25 μ L, ddH₂O 19 μ L) 进行 PCR 扩增 (95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s), 经 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, ImageJ 作灰度分析, 确定对称 PCR 最佳退火温度及循环次数^[20-22]、间接不对称 PCR 扩增反应最佳循环数及最佳上下游引物浓度比^[23]。

1.2.2 适配子库筛选

参照文献采用 SELEX 技术进行适配子筛选^[24]。筛选过程如下:

①细胞预处理: 脱落细胞经磷酸盐缓冲液洗涤数次后用 120 目钢滤过滤, 细胞计数板计数, 冻存于 -80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱。每次实验取出细胞冻存管放置 37 $^{\circ}$ C 水浴锅 1 min, 离心收集细胞。②ssDNA 文库预处理: 取 ssDNA 文库加入 500 μ L 结合缓冲液, 沸水浴 5 min, 冰浴 10 min。③筛选: 向预处理的 ssDNA 文库中加入 15 μ L 3% BSA 以降低非特异性吸附, 将其与阴性细胞 (正常、炎性) 37 $^{\circ}$ C 孵育结合, 离心取上清, 收集与反筛细胞不结合的核酸。再将收集的核酸与阳性细胞 (上皮内低级别病变 (CIN1)、上皮内高级别

病变 (CIN2、CIN3) 和鳞状细胞癌) 37 $^{\circ}$ C 孵育结合, 离心取沉淀, 加入洗涤缓冲液洗涤以弃去未与细胞结合的核酸, 再加入 200 μ L 洗脱缓冲液, 离心取上清, 收集得到与正筛细胞结合的核酸。

④次级文库获得: 收集到的核酸经苯酚: 氯仿: 异戊醇法纯化后, 经间接不对称 PCR 扩增、回收单链作为下一轮筛选的次级文库。⑤测定结合率: 以每轮筛选获得的次级文库为模板进行间接不对称 PCR 扩增, 扩增得到荧光素标记的 ssDNA。取 200 pmol 荧光修饰的 ssDNA 和 1 000 μ L 结合缓冲液, 沸水浴 5 min, 冰浴 10 min; 分别与 2×10^6 个/mL 阴性细胞、阳性细胞 37 $^{\circ}$ C 孵育结合 30 min, 荧光分光光度计测定总荧光强度; 回收细胞悬液离心后用洗涤缓冲液洗涤 3 次, 重悬于 1 000 μ L 结合缓冲液中, 荧光分光光度计测定荧光强度值, 测 3 次取平均值; 不加荧光修饰的 ssDNA 为空白对照。根据 ssDNA 文库与细胞结合率 = 荧光强度平均值 / 总荧光值 $\times 100\%$, 分别计算各轮筛选获得的次级文库与阳性细胞及阴性细胞的结合率判断筛选进度。⑥整个筛选过程通过不断增加筛选压力, 如减少加入的 ssDNA 量、减少孵育时间、增加洗涤次数, 以获得高亲和力、高特异性适配子库。经过 10-12 轮筛选, 次级文库与靶细胞结合强度不再增加, 达到平台期则筛选终止。筛选条件见表 2。⑦将最终获得的 ssDNA 核酸适配子库送生工生物工程 (上海) 股份有限公司克隆测序, 运用 DNAMAN 软件进行一级结构同源性分析。

1.2.3 高特异性适配子确立

测序后,选择长度正确且没有双峰的适配子,将其转化菌经培养、质粒抽提,制备荧光素标记的 ssDNA。

1) 特异性测定:取 200 pmol 荧光素标记的适配子加入 1 000 μ L 结合缓冲液,沸水浴 5 min,冰浴 10 min;分别与 2×10^6 个/mL 阴性细胞、阳性细胞 37 $^{\circ}$ C 孵育结合 30 min,离心去上清,洗涤缓冲液洗涤 3 次,重悬于 1 000 μ L 结合缓冲液中,测定荧光强度值,测 3 次取平均值。

2) 亲和力分析:制备不同浓度荧光素标记的适配子,取等体积适配子加入 1 000 μ L 结合缓冲液,沸水浴 5 min,冰浴 10 min;分别与 2×10^6 个/mL 阳性细胞 37 $^{\circ}$ C 孵育结合 30 min,离心去上清,洗涤缓冲液洗涤 3 次,重悬于 1 000 μ L 结合缓冲液中,测定荧光强度值,测 3 次取平均值。根据公式 $Y=B_{\max} \times X / (K_d + X)$,运用 SigmaPlot 12.1 软件,在非线形分析 Regression Wizard 公式类型中选择双曲线 (Hyperbola) 的类型,对数据进行分析,结合 SPSS 16.0 软件得出各适配子与宫颈癌前病变宫颈脱落细胞的平衡解离常数 K_d 值。

3) 细胞免疫荧光:根据特异性及亲和力分析

结果确立高特异性适配子,进一步明确该适配子能够与子宫颈癌前病变宫颈脱落细胞特异性结合。分别取 1×10^6 个/mL 阴性细胞、阳性细胞爬片后经 4% 多聚甲醛固定 30 min,0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;抗原修复液沸水浴 10 min,0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;1% Triton-X100 通透 10 min,倾去后加入 10% 正常山羊血清 37 $^{\circ}$ C 恒温封闭 30 min;倾去封闭液后加入荧光素标记的适配子(由生工生物工程(上海)股份有限公司合成),4 $^{\circ}$ C 避光过夜;0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;抗荧光衰减封片剂(含 DAPI)封片后观察。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增反应条件优化结果

以文库为模板,经对称 PCR 后得到 90 bp 的 dsDNA 目的条带,即 ssDNA 文库及引物构建成功。根据 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定(图 1),确定对称 PCR 扩增反应最佳循环数为 15 个循环;最佳退火温度为 49.5 $^{\circ}$ C;间接不对称 PCR 扩增反应最佳循环数为 35 个循环;最佳上下游引物浓度比为 80:1。

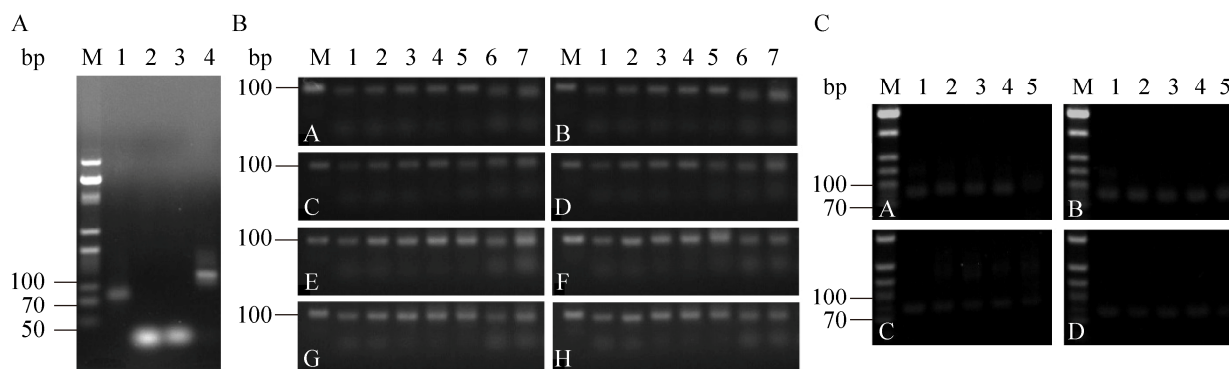


图 1 PCR 条件优化

Fig. 1 Optimization of PCR conditions. (A) The verification result of random ssDNA library, primer and ssDNA PCR products. 1: random ssDNA library; 2-3: primer; 4: ssDNA PCR products. (B) Optimization of symmetry PCR conditions. A-H annealing temperature: 55, 54.5, 53.5, 51.7, 49.5, 47.8, 46.6, 46 $^{\circ}$ C; 1-7 cycle times: 5, 8, 10, 12, 15, 20, 25. (C) Optimization of indirect asymm PCR conditions. A-D cycle times: 30, 35, 40, 45; 1-5 primer concentration ratio: 10:1, 30:1, 50:1, 80:1, 100:1.

2.2 宫颈上皮内癌变宫颈脱落细胞 SELEX 筛选

2.2.1 筛选条件

筛选过程中,一方面加入 BSA 以封闭非特异性结合位点,去除非特异性结合从而提高筛选效率;另一方面,刚开始进行筛选时,如果 ssDNA 文库加入量过少会导致筛选失败,因此要以较多量的 ssDNA 和细胞进行前几轮筛选,随着筛选的进行要不断增加筛选压力(表 2),使特异性的 ssDNA 能竞争结合在细胞膜表面的特异性物质上而特异性较弱的 ssDNA 被淘汰。

2.2.2 次级文库鉴定

每轮筛选获得的次级文库经不对称 PCR 扩增 ssDNA,产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定(图 2),可见 90 nt 目的片段 ssDNA,满足筛选要求,可作为下轮筛选的文库。

2.2.3 结合率测定

在 12 轮筛选过程中,次级文库与阳性细胞的结合率从 17% 增加至 75%;与阴性细胞的结合率从 83% 减少至 19% (图 3)。随着筛选的进行,在第 9 轮后结合率基本稳定达到平台期,说明特异

性高的适配子得到富集,即筛选结束。

2.2.4 核酸适配子库克隆测序及一结构同源性分析

随机挑选 40 个克隆子进行测序,结果发现大量重序列及 2 个错误序列,最终确定适配子库共有 9 条适配子序列(表 3)。DNAMAN 7.0 软件进行一级结构同源性分析表明(图 4)所有序列无共同的保守序列,但 CIN-Ap2、CIN-Ap3、CIN-Ap4 和 CIN-Ap9 含有保守序列 GGGAT,剩下的适配子无同源性,且无共有保守序列。

2.3 高特异性适配子确立

2.3.1 适配子特异性及亲和力分析

9 条适配子(除 CIN-Ap1)与阳性细胞和阴性细胞结合力均具有极显著性差异($P < 0.01$),其中适配子 CIN-Ap3、CIN-Ap4、CIN-Ap5、CIN-Ap6 的特异性较高。拟合各适配子与阳性细胞的结合曲线,计算得到平衡解离常数 K_d 值。根据解离常数 K_d 值越小,亲和力越大,确定 CIN-Ap4、CIN-Ap5 具有较高的亲和力(图 5)。综合上述结果,最终确立 CIN-Ap4 作为宫颈癌前病变宫颈脱落细胞高特异性适配子。

表 2 适配子各轮筛选条件

Table 2 Screening conditions of aptamer

Number	Cell (1×10^6 /mL)	ssDNA (pmol)	Incubation time (min)	Wash times (times)
1	4.0	200	240	3
2	4.0	200	180	2
3	3.0	200	120	1
4	2.0	150	60	3
5	2.0	150	60	2
6	2.0	150	60	1
7	1.0	100	45	3
8	1.0	100	45	2
9	1.0	100	45	1
10	0.5	50	30	3
11	0.5	50	30	2
12	0.5	50	30	1

2.3.2 适配子 CIN-Ap4 细胞免疫荧光

采用细胞免疫荧光法进一步验证适配子 CIN-Ap4 与阳性细胞和阴性细胞结合力 (图 6), 阳性细胞组荧光强度远高于阴性细胞组, 说明所确立的适配子 CIN-Ap4 确实能够与子宫颈癌前病

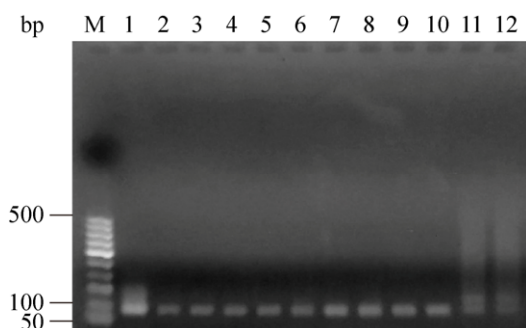


图 2 1-12 轮筛选获得的 ssDNA 次级文库产物电泳图
Fig. 2 2% agarose gel electrophoresis of ssDNA secondary library. M: marker; 1-12: ssDNA secondary library for each round.

变宫颈脱落细胞高特异性结合, 可作为子宫颈癌前病变诊断标志物, 为宫颈癌前病变宫颈分子诊断提供理论基础和新思路。

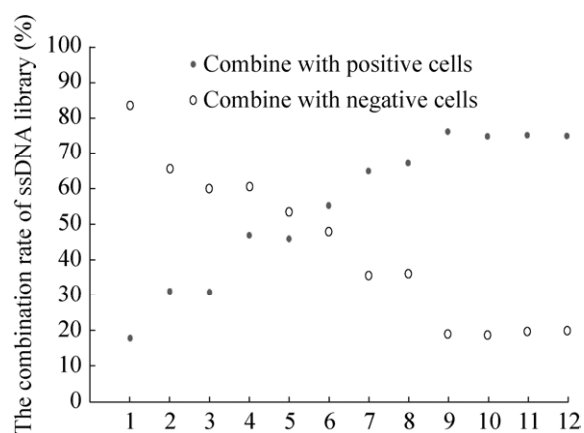


图 3 1-12 轮 ssDNA 次级文库与宫颈脱落细胞荧光结合率

Fig. 3 The combination rate of ssDNA secondary library and cervical exfoliation cells for 12 rounds.

表 3 适配子序列

Table 3 Sequences of aptamers

Name	Aptamer sequence (5'-3')
CIN-Ap1	TAGATTGCACTTACTAT <u>CCAACGGATAGTGAGGCGGTTATTAATCTGATGGTTACATCCCCGTAGTCG</u> CACTATTGAATAAGCTGGTATA
CIN-Ap2	TAGATTGCACTTACTAT <u>CCGAAGGGATCACGATTAAGGGCCTTGTCGTCCAATTCTGTACAGTAGC</u> GTGGATTGAATAAGCTGGTATA
CIN-Ap3	TAGATTGCACTTACTAT <u>CCGAAGGGATCACGATTAAGGGCCTTGTCGTCCAATTCTGTACAGTAGC</u> GTTGATTGAATAAGCTGGTATA
CIN-Ap4	TAGATTGCACTTACTAT <u>CCAAGGGGATACCTCTCAAGCTGGTGTGTTTGTATTATCGTCCTACAGT</u> TTCCATTGAATAAGCTGGTATA
CIN-Ap5	TAGATTGCACTTACTAT <u>CCAACGGATAGTGAGGCGGTTATTAATCTGATGATTACATCCCCGTAGTCG</u> CACTATTGAATAAGCTGGTATA
CIN-Ap6	TAGATTGCACTTACTAT <u>CCGGGAAGCGGATAGCGGATTACTTAGATTGAAGTGTATGCTAACGGGGTTA</u> ATAGATTGAATAAGCTGGTATA
CIN-Ap7	TAGATTGCACTTACTAT <u>CCGAAGGGGTCACGATTAAGGGCCTTGTCGTCCAATTCTGTACAGTAG</u> CGTTGATTGAATAAGCTGGTATA
CIN-Ap8	TAGATTGCACTTACTAT <u>TCCACCAGCAGTACGAGCGCCGCACCTGACACCACGCACCTCGCCATCC</u> CCGTAATTGAATAAGCTGGTATA
CIN-Ap9	TAGATTGCACTTACTAT <u>CCAAGGGGATACCTCTCAAGCTGGTGTGTTTGTATTATCGTCCCACAGT</u> TTCCATTGAATAAGCTGGTATA

The underlined sequence is the specific nucleic acid sequence of each aptamer.


```

CIN-Ap1 TAGATTGCACCTACTATCCAAACGGATAGTGAGGCGGTTATTAATCTGATGGTTCATCCCCGTAGTCGCCTATTGAATAAGCTGGTATA
CIN-Ap2 TAGATTGCACCTACTATCCCGAAGGGATCAGGATTAAGGGCCCTTGTCTGTCAGTACAGTAGCGTGGATTGAATAAGCTGGTATA
CIN-Ap3 TAGATTGCACCTACTATCCCGAAGGGATCAGGATTAAGGGCCCTTGTCTGTCAGTACAGTAGCGTGGATTGAATAAGCTGGTATA
CIN-Ap4 TAGATTGCACCTACTATCCCGAAGGGATACCTCTCAAGCTGGTGTGTTTGTATATTCGTCCTACAGTTTCCATTGAATAAGCTGGTATA
CIN-Ap5 TAGATTGCACCTACTATCCAAACGGATAGTGAGGCGGTTATTAATCTGATGATTACATCCCCGTAGTCGCCTATTGAATAAGCTGGTATA
CIN-Ap6 TAGATTGCACCTACTATCCCGAAGGGATAGCGGATTACTTAGATTGAAGTGTATGCTAACGGGTTAATAGATTGAATAAGCTGGTATA
CIN-Ap7 TAGATTGCACCTACTATCCCGAAGGGATCAGGATTAAGGGCCCTTGTCTGTCAGTACAGTAGCGTGGATTGAATAAGCTGGTATA
CIN-Ap8 TAGATTGCACCTACTATCCCAAGCAGTACGAGCGCCGCACCTGACACCACGCACCTCGCCATCCCGGTATTGAATAAGCTGGTATA
CIN-Ap9 TAGATTGCACCTACTATCCCGAAGGGATACCTCTCAAGCTGGTGTGTTTGTATATTCGTCCTACAGTTTCCATTGAATAAGCTGGTATA
    
```

图 4 适配子同源性比对结果
Fig. 4 Homology comparison.

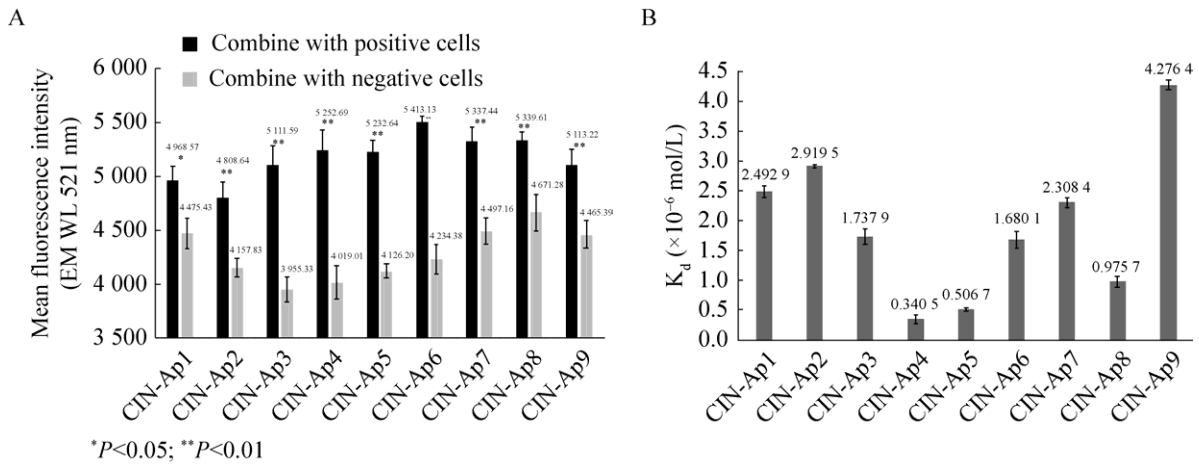


图 5 适配子特异性及亲和力分析结果
Fig. 5 Specificity and affinity analysis of aptamers. (A) Specific analysis. (B) Affinity analysis.

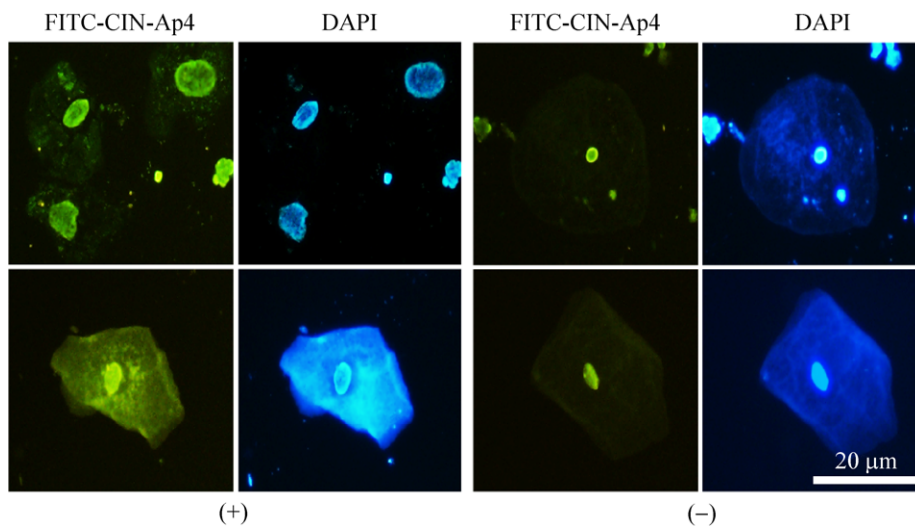


图 6 适配子 CIN-Ap4 细胞免疫荧光结果
Fig. 6 Cell immunofluorescence of CIN-Ap4.

3 讨论

对称 PCR 和不对称 PCR 是实验过程的关键, 对 PCR 反应条件进行优化, 尤其对不对称 PCR 条件进行优化, 是获得特异性和亲和力均较强的 ssDNA 适配子的核心。适配子的筛选过程就是不断重复 PCR 的过程, 所以 PCR 是筛选适配子的关键。优化 PCR 条件可以降低非特异性扩增, 得到高特异性、高纯度的 PCR 产物, 为今后筛选目标物的适配子奠定一定的基础。但值得一提的是, 我们发现在开始的几轮筛选过程中, 对称 PCR 及不对称 PCR 均能获得较高特异的产物。但在后面的几轮筛选过程中, 即使在优化的条件下, PCR 非特异性产物增多。分析原因可能是筛选之初模板纯度高, 所以 PCR 产物特异性高, 但经过多轮筛选后模板纯度降低, 故 PCR 产物特异性降低, 尤其是不对称 PCR 要经过 35 个如此多的循环, 非特异性产物会更多^[25-26], 因此在筛选过程中可采用多次胶回收的方法以提高每一轮 ssDNA 纯度。

REFERENCES

- [1] Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 1990, 249(4968): 505–510.
- [2] Ellington AD, Szostak JW. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 1990, 346(6287): 818–822.
- [3] Kou ZW, Wang JP, Zhang XM. Nucleic acid aptamers and its applications in diagnosis and therapy of Alzheimer's diseases. *J Mol Diagn Ther*, 2015, 7(4): 266–270 (in Chinese).
寇哲文, 王家鹏, 张兴梅. 核酸适配子及其在阿尔茨海默病研究中的应用. *分子诊断与治疗杂志*, 2015, 7(4): 266–270.
- [4] Radom F, Jurek PM, Mazurek MP, et al. Aptamers: molecules of great potential. *Biotechnol Adv*, 2013, 31(8): 1260–1274.
- [5] Bruno JG. A review of therapeutic aptamer conjugates with emphasis on new approaches. *Pharmaceuticals*, 2013, 6(3): 340–357.
- [6] Hernandez LI, Flenker KS, Hernandez FJ, et al. Methods for evaluating cell-specific, cell-internalizing RNA aptamers. *Pharmaceuticals*, 2013, 6(3): 295–319.
- [7] Lee SJ, Kwon YS, Lee JE, et al. Detection of VR-2332 strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus type II using an aptamer-based sandwich-type assay. *Analytical Chemi*, 2013, 85(1): 66–74.
- [8] Dong WN, Liao WJ, Lin YP. Aptamers and its review. *J Trop Med*, 2009, 9(11): 1353–1354 (in Chinese).
董婉妮, 廖伟娇, 林勇平. 核酸适配子及其筛选进展. *热带医学杂志*, 2009, 9(11): 1353–1354.
- [9] Bai H, Wang RH, Hargis B, et al. A SPR aptasensor for detection of avian influenza virus H5N1. *Sensors*, 2012, 12(9): 12506–12518.
- [10] Zhao ZL, Li Y, Yuan C. Research progress of Cell-SELEX. *Biotechnol Bull*, 2014 (5): 52–56 (in Chinese).
赵仲麟, 李燕, 袁超. Cell-SELEX 技术研究进展. *生物技术通报*, 2014 (5): 52–56.
- [11] Zhou YC, Cao LT, Chen L, et al. Optimization of asymmetric PCR reaction system and purification of Random single-strand DNA library. *Sichuan Anim Husb Vet Med*, 2015, 42(11): 33–35, 37 (in Chinese).
周晏丞, 曹立亭, 陈露, 等. 随机 ssDNA 文库不对称 PCR 扩增条件的优化及回收效率比较. *四川畜牧兽医*, 2015, 42(11): 33–35, 37.
- [12] Aptekar S, Arora M, Lawrence CL, et al. Selective targeting to glioma with nucleic acid aptamers. *PLoS ONE*, 2015, 10(8): e0134957.
- [13] Wan J, Ye L, Yang X, et al. Cell-SELEX based selection and optimization of DNA aptamers for specific recognition of human cholangiocarcinoma QBC-939 cells. *Analyst*, 2015, 140(17): 5992–5997.
- [14] Sun H, Zu Y. A highlight of recent advanced in aptamer technology and its application. *Molecules*, 2015, 20(7): 11959–11980.
- [15] Colucciello M. Current intravitreal pharmacologic therapies for diabetic macular edema. *Postgrad Med*, 2015, 127(6): 640–653.
- [16] Song KM, Lee S, Ban C. Aptamers and their biological applications. *Sensors*, 2012, 12(1): 612–631.
- [17] Tran DT, Janssen KPF, Pollet J, et al. Selection and

- characterization of DNA aptamers for egg white lysozyme. *Molecules*, 2010, 15(3): 1127–1140.
- [18] Musheev MU, Krylov SN. Selection of aptamers by systematic evolution of ligands by exponential enrichment: addressing the polymerase chain reaction issue. *Anal Chim Acta*, 2006, 564(1): 91–96.
- [19] Tian RY, Lu SY, Li L, et al. Construction of oligonucleotide library in selection of aptamer and optimization of PCR conditions. *China Anim Husb Vet Med*, 2014, 41(1): 61–65 (in Chinese).
田瑞云, 卢士英, 李琳, 等. 适配子筛选中随机寡核苷酸文库的构建和 PCR 条件的优化. *中国畜牧兽医*, 2014, 41(1): 61–65.
- [20] Ma ZW, Yuan Y, Chen Q, et al. Genes of HBV C region amplifying and optimization of PCR conditions. *J South-Cent Univ Nat: Nat Sci Ed*, 2007, 26(1): 30–32 (in Chinese).
马兆武, 袁媛, 陈强, 等. HBV C 区基因扩增与 PCR 条件的优化. *中南民族大学学报: 自然科学版*, 2007, 26(1): 30–32.
- [21] Cao LT, Xu LL, Wan X, et al. Optimization of PCR reaction system for random single-strand DNA pool in SELEX technology. *J Anhui Agri Sci*, 2012, 40(6): 3241–3242, 3297 (in Chinese).
曹立亭, 许李丽, 万向, 等. SELEX 技术中 ssDNA 文库 PCR 扩增条件的优化. *安徽农业科学*, 2012, 40(6): 3241–3242, 3297.
- [22] Shao BY, Chen B, Tang MY, et al. Optimization of DNA extraction from *Salmonella* and PCR reaction condition. *Food Sci*, 2007, 28(7): 331–334 (in Chinese).
邵碧英, 陈彬, 汤敏英, 等. 沙门氏菌 DNA 提取及 PCR 反应条件的优化. *食品科学*, 2007, 28(7): 331–334.
- [23] Wu HB. Selection and characterization of ssDNA aptamers to Ras protein *in vitro*[D]. Wuhan: Wuhan University, 2011 (in Chinese).
吴红兵. Ras 蛋白 ssDNA 适配子的筛选与鉴定[D]. 武汉: 武汉大学, 2011.
- [24] Xu P, Shao MY, Jia RH, et al. Peroxiredoxin-4 as a potential biomarker of early gastric cancer screened by cell-SELEX. *Transl Cancer Res*, 2017, 6(2): 293–303.
- [25] Tolle F, Wilke J, Wengel J, et al. By-product formation in repetitive PCR amplification of DNA libraries during SELEX. *PLoS ONE*, 2014, 9(12): e114693.
- [26] Kalle E, Gulevich A, Rensing C. External and semi-internal controls for PCR amplification of homologous sequences in mixed templates. *Microbiol Methods*, 2013, 9(95): 285–294.

(本文责编 陈宏宇)