

# 小分子靶标与其核酸适配体亲和力的表征方法\*

苏 艺 蒋灵丽 林俊生\*\*

(华侨大学医学院 泉州 362021)

**摘要** 核酸适配体是指通过 SELEX 筛选得到的能与靶标高特异性、高亲和力结合的单链 DNA 或 RNA。目前国内外具有高亲和性和高特异性结合的小分子靶标的核酸适配体依然很少,究其原因,一方面是因为小分子靶标的适配体难以筛选,另一方面是小分子靶标与其候选适配体亲和力表征方法难以确定。亲和力表征是确定适配体筛选成功与否的关键步骤,就现有小分子靶标与其相应适配体亲和力表征方法进行了总结,包括纳米金比色法、等温滴定量热法、表面等离子共振、圆二色谱法、石英晶体微天平法、微量热泳动法和 SYBR Green I 染料检测法等,并分析了这些方法的优缺点及改进建议,以期有助于提高适配体表征效率。

**关键词** 核酸适配体 小分子靶标 亲和力表征

**中图分类号** Q819

核酸适配体(也称适体)是指能够以高特异性、高亲和力与靶标结合的单链 DNA 或 RNA,有“化学抗体”之称<sup>[1]</sup>。核酸适配体可以折叠成二维、进而折叠成三维的形状复杂的空间结构,它能与靶标发生类似抗原-抗体反应。核酸适配体可以通过 SELEX 筛选得到。SELEX 筛选的技术从 1990 年开始提出以来,经过多次改良,但步骤大同小异。首先要合成一个随机核酸文库,在此基础上采用感兴趣的靶标从文库里与相应的适配体序列相结合,继而以分离、洗脱、扩增、回收为一轮循环。成功获得适配体序列的筛选轮数一般为 6~20 轮。SELEX 方法针对的靶物质领域非常广泛,大到微生物、细胞和蛋白质,小到金属离子、生物毒素等,目前适配体已经广泛应用于生物医药行业以及食品环境检测等领域<sup>[2]</sup>。迄今,SELEX 方法的成功率仍不高,筛选效果常不能令人满意,尤其是针对小分子靶标的筛选效果更是差强人意。已经发表的核酸适配体筛选自动化技术尚未能获得重复性效果,主要原因在于文库的随机性,导致虽然是同样的筛选流程,但结果不一样。就小分子靶标而言,一方面是因为小分子靶标的适配体难

以筛选,小分子靶标尺寸与适配体本身大小相近且难以固定,此外与核酸适配体之间结合位点少,且结合力弱<sup>[3]</sup>,这都造成了小分子靶标的适配体筛选困难。另一方面是在筛选过程中或者筛选结束后难以确定对小分子靶标与其候选适配体亲和力表征方法。经过多轮适配体的筛选之后,得到的候选适配体文库进行测序得到的往往是多条序列,这需从大量的序列中挑选得到与靶分子特异性和亲和力高结合的序列,因此在筛选过程和结束后的表征是非常重要的一个环节。

目前,仍没有一个小分子靶标与适配体的亲和力表征通用的方法,我们可能因为表征方法选择不当导致筛选结果验证失败,因此我们需要了解目前国内外小分子靶标与适配体亲和力表征的方法,根据所需靶标的特性选择更加合适的表征方法,同时选择两种及以上不同的方法对小分子靶标与适配体进行亲和力表征,增加可信度。本文对近年来一些小分子靶标与适配体的亲和力表征方法进行梳理,根据这些方法的优缺点提出看法或改进建议,详细对比可以参照表 1。

## 1 表征方法

### 1.1 纳米金比色法

纳米金是一种极易吸附生物分子的纳米材料,具有距离依赖性的光学特性。在其分散状态下呈现红

收稿日期:2019-04-04 修回日期:2019-06-18

\* 国家重点研发计划政府间国际科技创新合作重点专项(2016YFE0101700)、福建省科技厅引导性项目(2016Y0063)资助项目

\*\*通讯作者,电子邮箱:junshenglin@hqu.edu.cn

色,发生聚集后变为紫色到蓝色。正常情况下,向纳米金悬浮液中加入一定量的盐溶液或者阳离子聚合物会破坏其稳定性,使纳米金凝聚。当纳米金悬浮液中存在单链 DNA 适配体时,ssDNA 能够非特异性地包裹在纳米金表面,从而对盐诱导的聚集具有抵抗作用,保护纳米金在高浓度的盐溶液中不发生凝聚,使溶液保持红色。当向吸附了适配体的纳米金悬浮液中加入靶标时,适配体与靶标结合并从纳米金表面解离,失去保护的纳米金在盐溶液中聚集呈现蓝色,且其变色程度与靶标浓度呈正相关。Ma 等<sup>[5]</sup>以未修饰的纳米金与不同浓度的 ssDNA 为基础,设计了用于妥布霉素的比色法检测实验,在加入妥布霉素后出现明显的从红变蓝的颜色变化。

纳米金同时也是良好的荧光猝灭剂,与普通荧光猝灭剂相比,纳米金的猝灭常数高出几个量级。若在适配体上修饰荧光基团,当无靶标存在时,纳米金猝灭适配体的荧光,当靶标存在时,靶标与适配体结合,纳米金无法猝灭荧光,荧光存在。Lv 等<sup>[8]</sup>用 5-羧基荧光素(5-carboxyfluorescein, FAM)标记赭曲霉毒素 A(ochratoxin A, OTA)的适配体,当无 OTA 时,荧光标记的适配体吸附在纳米金表面而至荧光猝灭;当 OTA 存在时,荧光标记的适配体与 OTA 结合,而无法猝灭荧光。Bahreyni 等<sup>[27]</sup>利用纳米金的荧光猝灭活性检测农药靶标啉虫脒与其适配体的结合;Ni 等<sup>[9]</sup>也用荧光猝灭原理检测了雌二醇。

研究发现,纳米金具有过氧化氢酶样活性<sup>[28]</sup>,该检测策略不再依赖纳米金的分散和聚集可用于不适于普通比色类型的适配体鉴定。Sun 等<sup>[10]</sup>用纳米金的这一特性对玉米烯酮进行亲和力检测,这种方法是基于玉米烯酮的适配体对纳米金过氧化氢酶样活性的抑制来检测的,他们首先将适配体与靶标玉米烯酮孵育一段时间后,向其中加入四甲基联苯胺(TMB)和过氧化氢( $H_2O_2$ ),适配体包裹在纳米金表面,此时过氧化氢酶样活性被抑制,TMB 并不变色;当向体系中加入靶标分子后,适配体与靶标玉米烯酮结合而从纳米金表面脱落,纳米金得以恢复过氧化氢酶样活性,从而能够催化  $H_2O_2$  氧化 TMB,使得 TMB 变为蓝色。Yan 等<sup>[11]</sup>用同样的方法鉴定了靶标磺胺二甲氧嘧啶,当向包裹有适配体的纳米金及 TMB 和  $H_2O_2$  存在的体系中加了其中加入靶标后,溶液由红变蓝。

建议:在利用纳米金的普通比色性质时,需要预先了解靶标对非修饰适配体包裹纳米金的影响。若是靶

标分子本身带有颜色,则需要借助紫外检测仪器检测最大吸收波长变化,或者利用纳米金荧光猝灭活性和酶样活性进行检测。采用纳米金检测时可以考虑与信号放大技术联用,作为信号放大原件,使得表征结果更加直观。一般纳米金的检测方法不用于计算解离常数( $K_d$ )值,而是多用于亲和性和特异性检测及纳米金传感器的制作。紫外检测纳米金分散状态下吸光值为  $A_1$ ,聚集状态下吸光值为  $A_2$ ,则以  $A_2/A_1$  来量化纳米金聚集程度。一般以靶标的浓度作为横坐标,测量得到的紫外吸收比值  $A_2/A_1$  与空白吸收比值的差值  $\Delta A_2/A_1$  为纵坐标,设置一系列梯度实验测得的数值制作拟合曲线,在拟合曲线中寻找线性范围,即可得到纳米金检测范围<sup>[29]</sup>。

## 1.2 等温滴定量热法

等温滴定量热法(ITC)是近年来一种新兴热门的适配体亲和力表征方法,这种方法主要是通过热力学特征来反映小分子靶标与适配体结合的情况,即用一种反应物滴定待测物,随着加入滴剂的数量变化,测量反应中释放的热量来达到定量检测的目的。用适配体滴定到含有小分子靶标的样品中,两者若发生反应,那么吸收或释放的热量会与两者结合量成正比,并可以通过分析软件得到  $K_d$  值。滴定结束后,通过常用的“one set of sites”模型,以适配体与靶标摩尔比为横轴,滴定峰的峰面积为纵轴,作图得到拟合曲线,可通过这条曲线得到  $K_d$  值。ITC 最大的优势就是可以对适配体与靶标结合的热力学过程进行表征,比如在滴定结束后得焓变  $\Delta H$  值,并通过计算得到自由能  $\Delta G$  值,判断适配体与靶标结合是否为自发进行的,还可以通过生物大分子与小分子作用过程中的热力学变化特征判断适配体与靶标是通过范德瓦尔斯力、氢键或静电作用等哪类作用力的结合。此外,ITC 还可以计算出适配体与靶标结合的化学计量数比及精确地判断适配体二级结构中特殊结构位点与靶标的结合力等数据<sup>[12]</sup>。

例如,Slavkovic 等<sup>[30]</sup>报道发现可卡因适配体对奎宁类物质的亲和力几乎是可卡因的 30 倍,为了证明是奎宁类似物的哪些结构与可卡因的适配体有亲和作用,他们用 13 种奎宁类似物与该适配体进行 ITC 实验,通过统计热力学数值分析得出了奎宁结构中融合的芳香环和甲氧基在两者之间结合起重要作用。Nguyen 等<sup>[31]</sup>采用 ITC 分别评价了戊唑醇和抗倒胺与其候选适配体 T2 的结合强度,辅以纳米金实验证明了他们筛选得到的 T2 适配体可以识别多个靶点;Zhang 等<sup>[32]</sup>用

ITC 证明腺苷适配体的两个结合位点均可以结合腺苷 分子,且具有相同的亲和力。

表 1 小分子靶标与其适配体亲和力检测方法总结

Table 1 Summary of affinity detection methods for small molecular targets and their aptamers

方法	基本原理	靶标案例	$K_d$ 值	适用范围	优势	不足	参考文献
纳米金法	普通比色法:纳米金聚集与分散状态颜色变化	吡虫脒	5nmol/L	靶标分子本身为无色	现象明显易制备,操作简单,耗时短	普适性不强,部分小分子靶标甚至会促进适配体更加稳定地吸附在纳米金上而出现相反的检测结果	[4]
		妥布霉素	23.3nmol/L				[5]
		钾离子	0.42nmol/L				[6]
	荧光猝灭活性	三聚氰胺	14.9nmol/L				[7]
		赭曲霉毒素 A	5nmol/L				[8]
		雌二醇	0.48nmol/L				[9]
	过氧化氢酶样活性	玉米烯酮	10ng/ml				[10]
		磺胺二甲氧嘧啶	10ng/ml				[11]
		L-酪氨酰胺	16.8 $\mu$ mol/L				[12]
		替硝唑	1nmol/L				[13]
ITC	检测靶标与适配体结合时热量变化	孔雀石绿	(50 $\pm$ 20)nmol/L	范围较广	精确度高,实时连续监测,可直接测得 $K_d$ 值	用样量较大,低通量,需专人操作	[14]
		妥布霉素	(1.24 $\pm$ 0.03)nmol/L	需固定适配体或者靶标	灵敏度高,实时性号,芯片可再生	小分子检测信号低,小分子难固定、低通量	[15]
		黄曲霉毒素 1	0.94ng/ml				[16]
		氟乙酰胺	1 $\mu$ mol/L				[17]
SPR	检测适配体与靶标结合前后光折射率变化						
CD	检测适配体与靶标结合前后左旋及右旋光变化	25-羟基维生素 D3	11nmol/L	适配体与靶标结合前后结构变化明显	快速、高效反映适配体结构变化	样品制备时纯度等要求高、前处理复杂	[18]
QCM	适配体与靶标结合前后重量变化,转化为频率变化检测	茶碱	0.526 $\mu$ mol/L	需固定适配体或者靶标	灵敏度高、实时性强	检测易受温度、湿度和震动等环境因素影响	[19]
		L-酪氨酰胺	(181 $\pm$ 27) $\mu$ mol/L				[20]
MST	靶标与适配体在毛细管中通过温度梯度热运动,检测反应体系中荧光分布的变化	17 $\beta$ -雌二醇	98nmol/L	待测物分子大小不限	样品量较少、可测量天然状态下适配体与靶标之间的结合	适配体需要修饰荧光,荧光寿命短	[21]
		ATP	(31 $\pm$ 3) $\mu$ mol/L				[22]
		ATP	23.4nmol/L				[23]
SGI	SYBR Green I 绿色荧光染料,检测结合前后荧光变化	赭曲霉毒素 A	(370 $\pm$ 250)nmol/L	靶标无荧光	简单、易操作	检测范围小、低通量	[24]
		四环素	0.10 $\mu$ g/ml				[25]
		呋喃酮	(1.1 $\pm$ 0.4) $\mu$ mol/L				[26]

建议:小分子靶标与适配体利用 ITC 表征时,我们可以将适配体溶液和靶标液用相同的缓冲液溶解,确保两者结合时有相同的离子浓度及 pH,减少实验误差。我们除了利用 ITC 进行表征外,还可以将 ITC 在适配体筛选过程中联用,在适配体筛选的前几轮利用焓变  $\Delta H$ 、熵变  $\Delta S$  等数值监测筛选进程,对筛选体系进行优化,确定选定的小分子靶标与适配体结合分离的最优条件,以减少筛选轮数,提高筛选成功率。利用 ITC 进行适配体表征时,可以利用 ITC 的优势,推测出适配

体与靶标特异性结合的作用力种类、作用位点及计量数比值,在此基础上进行适配体的截短或者定点突变,得到亲和力更高的适配体。

1.3 表面等离子体共振法

表面等离子体共振法 (SPR) 是基于物理光学原理,通过检测表面等离子共振反射光谱的共振峰变化检测适配体-靶标结合状况的方法。实验时主要是将要分析的小分子靶标 (或者适配体) 固定在金属芯片上,作为固定相;然后向其中通入流动相,即适配体溶液 (或为

小分子靶标溶液),若适配体与靶标能进行特异性结合,那么 SPR 角发生变化,产生 SPR 信号。当适配体-靶标结合达到平衡时,SPR 角稳定不再变化,SPR 检测器能实时跟踪监测适配体与靶标的结合解离情况,并可测得反应的两种分子的结合强度。同时,SPR 结果通过模型计算得到我们所需的  $K_d$  值以及适配体与靶标结合的化学计量数之比。

SPR 可以直接通过  $K_d$  值反应适配体与靶标的亲和力强弱,从而供人们选择性能更加优异的适配体。González-Fernández 等<sup>[15]</sup>利用 SPR 评价了天然的抗妥布霉素 RNA 适配体与两种对 RNA 进行修饰改造后的适配体的亲和力,结果表明该适配体经过化学修饰后,虽然稳定性得到了提高,但是亲和力均降低了。Svobodová 等<sup>[21]</sup>合成了文献已报道的 5 条 17 $\beta$ -雌二醇的适配体,然后选取 17 $\beta$ -雌二醇及类似物睾酮、黄体酮作为靶标分别偶联 BSA 蛋白固定于芯片上,然后分别通入 5 条适配体作为流动相,经过 SPR 检测,能够区分并确认结合力最强的适配体及其靶标分子。Cao 等<sup>[17]</sup>选取筛选得到的两条抗农药氟乙酰胺的候选适配体 1-1 和 6-1,通过 SPR 实验进行亲和力检测,测得两条中适配体 1-1 与靶标亲和力更大。Ohsawa 等<sup>[33]</sup>用精氨酸修饰的 DNA 文库筛选得到的三条精氨酸修饰的亲和力较高的抗谷氨酸适配体,并用 SPR 实验检测它们对 L-谷氨酸和 D-谷氨酸的亲和力,发现其中有两条能够很好地区分开谷氨酸的对映异构体,另外一条不能区分两者。

建议:对小分子靶标与适配体用这种方法进行表征时建议采用固定适配体的模式,因为小分子难以固定于芯片上,而且部分官能团可能无法暴露出来与适配体结合;而采用固定适配体这种形式,将适配体与芯片连接位点之间修饰一段碳链,这样既可以保证适配体的柔性及空间构象,又方便芯片再生回收。此外,针对此种方法的低通量仅仅是在表征时的低通量,但用此种方法对适配体进行筛选时,当我们固定适配体文库于芯片后,应通过靶标、检测信号确定此靶标是否与适配体结合,如可以则洗脱回收,若不可以,则通入另一种靶标,直到找到能引起信号变化的靶标,这样可以利用一个文库筛选不同靶标,节约成本。

#### 1.4 圆二色谱法

圆二色谱(CD)是一种特殊的吸收光谱,可用来研究靶分子和 DNA 的二级和三级结构,圆二色谱法在研究适配体与小分子靶标相互作用中应用较多。据报道

普通茎环结构 ssDNA 的 CD 谱在 275nm 和 250nm 处分别有正峰和负峰,DNA 适配体亦如此,而 RNA 适配体 CD 谱在 210nm 有负峰,在 235nm 和 265nm 处均有一个正峰<sup>[34-35]</sup>。理论上,适配体有最大吸收峰,如果小分子靶标具有紫外吸收特性,而小分子靶标的紫外吸收与 ssDNA 最大吸收峰只要不重叠,就可以通过固定靶标浓度,设置不同适配体浓度梯度后检测适配体与靶标的最大吸收波长的强度值变化计算  $K_d$  值<sup>[36]</sup>。尽管如此,我们一般不利用 CD 谱来计算  $K_d$  值,CD 谱主要用来表征适配体与靶标结合后结构的变化。

首先,CD 谱波峰的变化可以证明小分子靶标是否与适配体发生了结合。在检测适配体与靶标亲和力实验中,分别加入靶标、适配体、靶标-适配体复合物,用这三种峰进行比较,若靶标与适配体结合,引起适配体构像变化,那么复合物相应的特征峰会发生改变。最近, Lee 等<sup>[18]</sup>为了研究 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 与他们筛选得到的适配体的相互作用,利用 CD 实验进行分析,发现加入靶标之后,适配体的 CD 峰发生了改变,在原来 CD 峰谱的基础上 210nm 出现了一个峰,且特征峰 250nm 和 277nm 峰都发生改变,这足以说明靶标 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 与他们得到的适配体发生了结合。其次,CD 谱还可以对适配体与靶标结合的二级结构区域进行评估,并对它们的结合作用力进行预估。在另一个实验中, Liu 等<sup>[37]</sup>用圆二色谱法对克仑特罗的 6 条候选适配体进行了鉴定,发现复合物峰 275nm 处与适配体峰比较有显著变化,说明克仑特罗与适配体结合导致 DNA 碱基堆积减少,靶标适配体发生结合。另外, Abraham 等<sup>[38]</sup>用圆二色谱法加了靶标之后波谱的变化证实了他们筛选得到了莠去津的适配体;Chen 等<sup>[39]</sup>在筛选出的 T-2 毒素适配体中加入 T-2 毒素后,在 280nm 左右均增加,在 250nm 左右的负带明显减少,说明靶标与适配体结合促进适配体茎环结构中茎部结合范围。最后,CD 谱还可以对适配体与靶标结合条件进行优化。Sengupta 等<sup>[34]</sup>研究发现,单独的核黄素适配体的 CD 谱随着  $Mg^{2+}$  加入量的增加,在 265nm 处的峰高增加了 20%,说明在较高的  $Mg^{2+}$  浓度下, RNA 适配体的结构更加稳定。在 CD 谱中, G-四联体的特征峰在 260nm 处有最大正峰,在 240nm 处是负峰。Wiedman 等<sup>[40]</sup>通过 CD 谱分析了唑类抗真菌药物的适配体结构变化,实验表明随氯化镁的加入, 240nm 处峰增大而 260nm 的峰减小,这说明了镁离子会促进适配体 G-四联体结构的形成。

建议:虽然不同的靶标适配体其结构也不同,但大部分 DNA 适配体是会形成茎环结构或者 G-四联体结构的,此时可以使用 CD 谱来表征小分子靶标与适配体的结合力。另外,多数抗小分子靶标适配体与靶标结合后波形变化差异性是否是由于含适配体的溶液加入了靶标溶液致使溶液稀释而引起的波形高低变化,未见相关报道证明这一点,其严谨性有待进一步研究。目前 CD 表征小分子靶标与适配体亲和力最大的局限性就是结合前后无显著性差异,因为有些适配体在与靶标结合后适配体结构并未发生明细变化,导致 CD 信号很弱。针对这种现象,我们未来可以考虑信号放大技术,放大适配体靶标结合前后对比差异,这就需要软件进行升级。此外,我们可以先利用计算机模拟适配体构象,若为明显的茎环结构或者 G-四联体结构再考虑用此种方法进行表征。

### 1.5 石英晶体微天平法

石英晶体微天平(QCM)是一种用于高灵敏称量待测物质量变化的精密仪器,其精密程度可达到纳克级别。QCM 的测量原理是基于石英晶体的压电效应,将石英晶体电极表面质量变化转化为电信号的频率变化输出,然后通过计算机将信号频率变化显示出来,通过频率变化表示物质质量变化,随着石英晶体上待测物质量增大,频率随之降低。在传统 QCM 的基础上进行发展出现了耗散型石英晶体微天平(QCM-D),QCM-D 是在传统 QCM 基础上改进的,其增加了测量耗散因子,提供了芯片表面吸附物质的柔软度和硬度的信息,它可以提供所研究吸附物质在测量过程中随测量时间形变程度的信息<sup>[41]</sup>。

QCM 可以很好地用于适配体与小分子靶标亲和力检测,在测量时可以先将适配体(或靶标)固定于芯片上作为固定相,然后将靶标溶液(或适配体溶液)缓慢通入,作为流动相与芯片表面反应。如果小分子靶标与适配体可以发生特异性结合就会一起被固定于芯片表面,引起质量增加,计算机显示频率降低。如果两者不能反应,芯片表面就不会有质量变化,频率也不变。可通过设置适配体浓度梯度与检测到的频率变化情况制作拟合曲线,计算  $K_d$  值。最近的一项实验中,Osypova 等<sup>[20]</sup>改进 QCM 将水层耦合到传感器中,基于适配体与小分子靶标在相互作用时适配体构象变化导致的水层中水大量排出,通过 QCM 检测排水量变化引起的质量变化,侧面反映适配体-靶标作用,他们利用抗

L-酪氨酸胺适配体成功检测出了 L-酪氨酸胺和其对映异构体 D-酪氨酸胺。另一个实验中,Özalp 等<sup>[42]</sup>基于适配体构象变化及质量变化用 QCM-D 检测 ATP 与其适配体的结合作用,且对适配体与不同浓度 ATP 的结合进行实验,确定了靶标与适配体结合检测频率变化的最佳浓度。

建议:QCM 主要用于定性检测适配体与靶标是否结合。由于小分子靶标质量小,在小分子靶标与适配体结合作用后引起的频率变化较小,所以在用 QCM 进行检测时可以使用信号放大策略,可以用纳米金作为增质剂修饰适配体通入靶标检测,或者将小分子靶标偶联 BSA 等蛋白质增重后固定于芯片上,然后通入适配体进行检测。此外,QCM 还可以用于适配体筛选过程监控,类似上述 SPR 方法,可以固定适配体文库通入小分子靶标检测有无结合,从而改进筛选条件,缩短筛选进程。

### 1.6 微量热泳动法

微量热泳动法(MST)是目前用于超灵敏检测的小分子靶标与适配体亲和力的技术之一,它不依赖分子的大小,且亲和力检测范围广,非常适合用于检测小分子靶标与适配体的相互作用。它是根据溶液分子在毛细管中通过温度梯度中热运动的原理,在运动过程中分子的大小、电荷及水化层都对泳动结果产生影响,从而引起检测反应体系中荧光分布的变化,可以监测到分子在温度梯度内的定向运动,最终达到检测目的<sup>[25]</sup>。当我们在检测小分子靶标与适配体相互作用时,两者结合后会引起适配体的结构变化从而导致表面电荷、水化层等会有所变化,导致热泳动结果发生改变,通过分析热泳动在运动过程中引起的荧光强度变化检测亲和力。利用 MST 还可以计算  $K_d$  值,由于小分子靶标、适配体及小分子靶标-适配体复合物在热泳动过程得到的荧光变化不同,我们可通过恒定靶标浓度不变,加入不同浓度的适配体进行检测,最后根据荧光强度分析可以计算得出  $K_d$  值。

在 Svobodová 等<sup>[21]</sup>的一项研究中,他们首先合成了 Cy5 修饰的适配体,然后分别通入靶标 17 $\beta$ -雌二醇及其固醇类似物,在 MST 条件下通过检测适配体在运动过程中 Cy5 荧光强度的变化来获取适配体与靶标的相互作用,并通过 MST 计算得到所选参考文献中的适配体与靶标结合的  $K_d$  值为 98nmol/L,其与文献报道中的 130nmol/L 相近。除了检测适配体与小分子靶标的

亲和力外,MST还可以运用于确定靶标与适配体结合的位点。Entzian等<sup>[22]</sup>利用MST实验验证了ATP的适配体DH25.42与ATP结合的位点,精确定位到一个腺嘌呤位点上。此外,Biniuri等<sup>[43]</sup>还针对ATP的适配体进行突变,并对这些突变的适配体采用MST分别检测了它们与ATP的亲和力,成功发现了其中一条亲和力更高的突变适配体,所以MST还可以拓展性地应用到适配体后续突变截短提高亲和力的实验中。

建议:微量热泳动与毛细管电泳都是基于电泳检测适配体与靶标结合的情况,但是毛细管电泳更加适合用于大分子类靶标,小分子靶标检测用MST会更佳。若是我们用这种方法检测小分子靶标与适配体亲和性可以表征天然状态下的结合情况,更加贴近现实生活中应用时的条件,所以这种方法建议用于条件优化,以便于实际应用。

### 1.7 SYBR Green I 染料检测法

SYBR Green I (SGI)是一种能结合dsDNA或有G-四联体结构的ssDNA的绿色荧光染料,与普通ssDNA无结合作用<sup>[44]</sup>。Kong等<sup>[23]</sup>通过这种方法构建了检测ATP信号的适配体传感器,检测到ATP与其适配体 $K_d$ 值为23.4nmol/L。该检测原理是通过适配体与其cDNA链的互补与否检测靶标与适配体是否有亲和力。无靶标时,适配体-互补适配体构成双链,SYBR Green I染料嵌入,可以检测到荧光信号,但当加入靶标后,靶标与适配体特异性结合,双链解离,荧光减弱或消失,如此通过检测荧光信号强弱变化即可判断适配体与靶标的亲和力,并可以定量分析两者的关系计算得到 $K_d$ 值。McKeague等<sup>[24]</sup>构建了检测赭曲霉毒素A的适配体检测传感器;Abraham等<sup>[33]</sup>也用此法加了靶标之后荧光变化证实了他们筛选得到了莠去津的适配体;四环素的适配体自然环境下为G-四联体结构,与SYBR Green I结合发出强荧光,Yang等<sup>[45]</sup>向该体系中加入四环素后,靶标与适配体结合变构,染料与适配体不再结合导致荧光下降,从而可以定量检测四环素。这种方法操作简便,灵敏度高。但往往需要构建适配体互补链。另外,在加入靶标之后,可能产生更高的荧光信号,这种现象一方面可能与靶标和适配体结合后,适配体的双链区域变多有关,另一方面可能与靶标的性质有关系,所以当使用这种方法的时候需要了解靶标性质并设置适当的浓度梯度。

### 1.8 其他

例如,计算机模拟分子对接(molecular docking),可

以利用计算机软件模拟靶标分子与适配体结合的情况,有效地预测到适配体与靶标结合的位点、结合的作用方式等<sup>[46]</sup>;又如,qPCR,我们在筛选过程中需要对每一轮的筛选进行监控,利用qPCR既可到达监测目的又可以用于表征<sup>[47]</sup>。此外,荧光共振能量转移法(FRET)<sup>[48-49]</sup>、拉曼光谱<sup>[50-53]</sup>、点杂交<sup>[54-55]</sup>等方法也可以用于小分子靶标与适配体亲和力的表征。

## 2 未来的挑战与展望

我们对小分子靶标与适配体进行亲和力表征时,使用不同的亲和力检测方式可能会产生不同的 $K_d$ 值。出现这种现象的原因主要为以下几点:第一,每种检测方法的灵敏度是不一样的,如ITC和MST检测时,敏感度和检测范围都不同。第二,由于试验过程中每种方法对靶标和适配体的要求不同,如需要固定小分子或者适配体的方法与不需要固定的方法相比, $K_d$ 值就会有偏差。第三,每种表征方式作用的时间不同,检测时长从几分钟到几小时不等,这样在检测过程中适配体及靶标的变化就可能直接影响到 $K_d$ 值的大小。第四,使用不同种方法进行亲和力表征,在进行线性拟合曲线时,拟合模型就会不同,这也会对 $K_d$ 值造成影响。即使如此,使用多种方法对小分子靶标与适配体进行亲和力检验,测算 $K_d$ 值时,只要测得的 $K_d$ 值同属相同的量级范围以及有一定的误差范围即可。

目前制约小分子靶标与适配体亲和力表征的是灵敏度问题,由于小分子本身分子质量、电荷、结构等的制约,现有的表征方式都会有一定的局限性,笔者对未来可能用于亲和力表征的方法提出如下看法:第一,至今针对小分子靶标与适配体亲和力表征还没有利用检测硬度、柔度、溶解度、黏度、导电性变化的方式,未来可以对这些方面的检测方法加以开发。第二,提高灵敏度,由于同种靶标用不同种方式表征亲和力结果可能不同,所以一种小分子靶标至少要用两种不同的手段进行表征以确保结果可信。第三,大多数小分子靶标的适配体筛选和表征都是一次性针对一个靶标,未来可以在高通量筛选和监测等方向发展,这样可以用一次筛选周期得到多个靶标的适配体。第四,小分子与适配体的亲和力较弱时需要使用信号放大以达到表征目的,未来信号放大方法方面仍需发展。

由于小分子性质不同,我们在表征时应根据小分子靶标的性质设计多种表征方法联用。还可以对小分子靶标进行修饰,与蛋白质大分子进行偶联,偶联大分

子之后可以利用蛋白质适配体的检测方式进行表征。由于小分子靶标的适配体筛选过程中影响因素较多,在筛选适配体的同时进行亲和力表征,不仅有利于对筛选进程进行检测修正,同时可以确定筛选是否高效进行,避免时间和试剂的浪费。

**致谢:** 本文受华侨大学研究生科研创新基金(17013071008)项目资助;感谢俊生青年研究组全体成员对本论文的帮助。

### 参考文献

- [ 1 ] Zhou N D, Wang J Y, Zhang J, et al. Selection and identification of streptomycin-specific single-stranded DNA aptamers and the application in the detection of streptomycin in honey. *Talanta*, 2013, 108(8):109-116.
- [ 2 ] Ilgu M, Nilsenhamilton M. Aptamers in analytics. *Analyst*, 2016, 141(5):1551.
- [ 3 ] Xu S M, Yuan H, Chen S P, et al. Selection of DNA aptamers against polychlorinated biphenyls as potential biorecognition elements for environmental analysis. *Analytical Biochemistry*, 2012, 423(2):195-201.
- [ 4 ] Shi H J, Zhao G H, Liu M C, et al. Aptamer-based colorimetric sensing of acetamiprid in soil samples: sensitivity, selectivity and mechanism. *Journal of Hazardous Materials*, 2013, 260(18):754-761.
- [ 5 ] Ma Q, Wang Y X, Jia J, et al. Colorimetric aptasensors for determination of tobramycin in milk and chicken eggs based on DNA and gold nanoparticles. *Food Chemistry*, 2018, 249:98-103.
- [ 6 ] Chen Z B, Guo J X, Ma He, et al. A simple colorimetric sensor for potassium ion based on DNA G-quadruplex conformation and salt-induced gold nanoparticles aggregation. *Analytical Methods*, 2014, 6(19):8018-8021.
- [ 7 ] Hu X R, Chang K K, Wang S, et al. Aptamer-functionalized AuNPs for the high-sensitivity colorimetric detection of melamine in milk samples. *PLoS One*, 2018, 13(8):e0201626.
- [ 8 ] Lv L, Jin Y D, Kang X J, et al. PVP-coated gold nanoparticles for the selective determination of ochratoxin A via quenching fluorescence of the free aptamer. *Analytical Letters*, 2018, 25(8):1447-1451.
- [ 9 ] Ni X, Xia B, Wang L M, et al. Fluorescent aptasensor for 17 $\beta$ -estradiol determination based on gold nanoparticles quenching the fluorescence of rhodamine B. *Analytical Biochemistry*, 2017, 523:17-23.
- [ 10 ] Sun S M, Zhao R, Feng S M, et al. Colorimetric zearalenone assay based on the use of an aptamer and of gold nanoparticles with peroxidase-like activity. *Microchimica Acta*, 2018, 185:535.
- [ 11 ] Yan J, Huang Y F, Zhang C H, et al. Aptamer based photometric assay for the antibiotic sulfadimethoxine based on the inhibition and reactivation of the peroxidase-like activity of gold nanoparticles. *Microchimica Acta*, 2017, 184(1):59-63.
- [ 12 ] Lin P H, Yen S L, Lin M S, et al. Microcalorimetric studies of the thermodynamics and binding mechanism between  $\gamma$ -tyrosinamide and aptamer. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2008, 112(21):6665-6673.
- [ 13 ] Nguyen V T, Kwon Y S, Kim J H, et al. Multiple GO-SELEX for efficient screening of flexible aptamers. *Chemical Communications*, 2014, 50(72):10513-10516.
- [ 14 ] Sokoloski J E, Dombrowski S E, Bevilacqua P C. Thermodynamics of ligand binding to a heterogeneous RNA population in the malachite green aptamer. *Biochemistry*, 2012, 51(1):565-572.
- [ 15 ] González-Fernández E, De-Los-Santos-Álvarez N, Miranda-Ordieres A J, et al. SPR evaluation of binding kinetics and affinity study of modified RNA aptamers towards small molecules. *Talanta*, 2012, 99(5):767-773.
- [ 16 ] Wu W B, Zhu Z L, Li B J, et al. A direct determination of AFBs in vinegar by aptamer-based surface plasmon resonance biosensor. *Toxicon*, 2018, 146:24-30.
- [ 17 ] Cao F Q, Lu X W, Hu X L, et al. In vitro selection of DNA aptamers binding pesticide fluoroacetamide. *Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan*, 2016, 80(5):10.
- [ 18 ] Lee B H, Nguyen V T, Gu M B. Highly sensitive detection of 25-hydroxyvitaminD3 by using a target-induced displacement of aptamer. *Biosensors & Bioelectronics*, 2017, 88:174-180.
- [ 19 ] Dong Z M, Zhao G C. A theophylline quartz crystal microbalance biosensor based on recognition of RNA aptamer and amplification of signal. *The Analyst*, 2013, 138(8):2456.
- [ 20 ] Osypova A, Thakar D, Dejeu J, et al. Sensor based on aptamer folding to detect low-molecular weight analytes. *Analytical Chemistry*, 2015, 87(15):7566-7574.
- [ 21 ] Svobodová M, Skouridou V, Botero M L, et al. The characterization and validation of 17 $\beta$ -estradiol binding aptamers. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2017, 167:14-22.
- [ 22 ] Entzian C, Schubert T. Mapping the binding site of an aptamer on ATP using microscale thermophoresis. *Journal of Visualized Experiments Jove*, 2017, 119:1-9.
- [ 23 ] Kong L, Xu J, Xu Y Y, et al. A universal and label-free aptasensor for fluorescent detection of ATP and thrombin based on SYBR green I dye. *Biosensors & Bioelectronics*, 2013, 42(1):193-197.
- [ 24 ] McKeague M, Velu R, Hill K, et al. Selection and

- characterization of a novel DNA aptamer for label-free fluorescence biosensing of ochratoxin A. *Toxins*, 2014, 6(8):2435-2452.
- [25] Yang C Y, Bie J X, Zhang X M, et al. A label-free aptasensor for the detection of tetracycline based on the luminescence of SYBR green I. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2018, 202:382-388.
- [26] Komarova N, Andrianova M, Glukhov S, et al. Selection, characterization, and application of ssDNA aptamer against furaneol. *Molecules*, 2018, 23(12):1-15.
- [27] Bahreyni A, Yazdianrobbati R, Ramezani M, et al. Fluorometric aptasensing of the neonicotinoid insecticide acetamiprid by using multiple complementary strands and gold nanoparticles. *Microchimica Acta*, 2018, 185(5):272.
- [28] Lin Y H, Ren J S, Qu X G. Catalytically active nanomaterials: a promising candidate for artificial enzymes. *Accounts of Chemical Research*, 2014, 47(4):1097-105.
- [29] Mirau P A, Smith J E, Chávez J L, et al. Structured DNA aptamer interactions with gold nanoparticles. *Langmuir the Acs Journal of Surfaces & Colloids*, 2017, 34(5):2139-2146.
- [30] Slavkovic S, Altunisik M, Reinstein O, et al. Structure-affinity relationship of the cocaine-binding aptamer with quinine derivatives. *Bioorg Med Chem*, 2015, 23(10):2593-2597.
- [31] Nguyen V T, Kwon Y S, Kim J H, et al. Multiple GO-SELEX for efficient screening of flexible aptamers. *Chemical Communications*, 2014, 50(72):10513.
- [32] Zhang Z J, Oni O, Liu J W. New insights into a classic aptamer: binding sites, cooperativity and more sensitive adenosine detection. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(13):7593-7601.
- [33] Ohsawa K, Kasamatsu T, Nagashima J, et al. Arginine-modified DNA aptamers that show enantioselective recognition of the dicarboxylic acid moiety of glutamic acid. *Analytical Sciences the International Journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*, 2008, 24(1):167.
- [34] Sengupta A, Gavvala K, Koninti R K, et al. Role of  $Mg^{2+}$  ions in flavin recognition by RNA aptamer. *Journal of Photochemistry & Photobiology B Biology*, 2014, 140:240-248.
- [35] Kypr J, Kejnovska I, Renciuik D, et al. Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(6):1713-1725.
- [36] Bose A. Interaction of tea polyphenols with serum albumins: A fluorescence spectroscopic analysis. *Journal of Luminescence*, 2016, 169:220-226.
- [37] Liu X X, Lu Q, Chen S R, et al. Selection and identification of novel aptamers specific for clenbuterol based on ssDNA library immobilized SELEX and gold nanoparticles biosensor. *Molecules*, 2018, 23(9):2337.
- [38] Abraham K M, Roueinfar M, Ponce A T, et al. *In vitro* selection and characterization of a single-stranded DNA aptamer against the herbicide atrazine. *ACS Omega*, 2018, 3(10):13576-13583.
- [39] Chen X J, Huang Y K, Duan N, et al. Screening and identification of DNA aptamers against T-2 toxin assisted by graphene oxide. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2014, 62(42):10368.
- [40] Wiedman G R, Zhao Y, Mustaev A, et al. An aptamer-based biosensor for the azole class of antifungal drugs. *Mosphere*, 2017, 2(4):e00274-17.
- [41] Kypr J, Kejnovska I, Renciuik D, et al. Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(6):1713-1725.
- [42] Özalp V C. Acoustic quantification of ATP using a quartz crystal microbalance with dissipation. *Analyst*, 2011, 136(23):5046-5050.
- [43] Biniuri Y, Albada B, Willner I. Probing ATP/ATP – aptamer or ATP-aptamer mutant complexes by microscale thermophoresis and molecular dynamics simulations; discovery of an ATP-aptamer sequence of superior binding properties. *The Journal of Physical Chemistry*, 2018, 122(39):9102-9109.
- [44] Li L J, Tian X, Kong X J, et al. A G-quadruplex-based label-free fluorometric aptasensor for adenosine triphosphate Detection. *Analytical Sciences*, 2015, 31(6):469-473.
- [45] Yang C Y, Bie J X, Zhang X M, et al. A label – free aptasensor for the detection of tetracycline based on the luminescence of SYBR Green I. *Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2018, 202:382-388.
- [46] Zhang Y, Lu T, Wang Y, et al. Selection of a DNA aptamer against zearalenone and docking analysis for highly sensitive rapid visual detection with label-free aptasensor. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2008, 6(45):12102-12110.
- [47] Modh H, Witt M, Urmann K, et al. Aptamer-based detection of adenosine triphosphate via qPCR. *Talanta*, 2017, 172:199-205.
- [48] Liu R J, Wu H, Lv L, et al. Fluorometric aptamer based assay for ochratoxin A based on the use of exonuclease III. *Microchimica Acta*, 2018, 185(5):254.
- [49] Li H, Yang D B, Zhang A W, et al. Palladium nanoparticles-based fluorescence resonance energy transfer aptasensor for highly sensitive detection of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk. *Toxins*, 2017, 9(10):318.
- [50] Li M W, Qiu Y Y, Fan C C, et al. Design of SERS nanoprobe for Raman imaging; materials, critical factors and architectures. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2018, 8(3):381.
- [51] Barhoumi A, Halas N J. Label-free detection of DNA hybridization using surface enhanced Raman spectroscopy. *Journal*



- of the American Chemical Society, 2010, 132 ( 37 ): 12792-12793.
- [52] Mao K, Zhou Z L, Han S, et al. A Novel biosensor based on Au @ Ag core-shell nanoparticles for sensitive detection of methylamphetamine with surface enhanced raman scattering. *Talanta*, 2018, 190:263-268.
- [53] Shao B Y, Ma X Y, Zhao S, et al. Nanogapped Au ( core ), @ Au-Ag ( shell ), structures coupled with  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , magnetic nanoparticles for the detection of ochratoxin A. *Analytica Chimica Acta*, 2018, 1033:165-172.
- [54] Tang J J, Xie J W, Shao N S, et al. The DNA aptamers that specifically recognize ricin toxin are selected by two *in vitro* selection methods. *Electrophoresis*, 2010, 27(7):1303-1311.
- [55] Alsager O A, Kumar S, Willmott G R, et al. Small molecule detection in solution via the size contraction response of aptamer functionalized nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014, 57:262-268.

## Characterization of the Affinity Between Low Molecular Weight Targets and Their Aptamers

SU Yi JIANG Ling-li LIN Jun-sheng

(School of Medicine, HuaQiao University, Quanzhou 362021, China)

**Abstract** Aptamers are single-stranded DNA or RNA who bind to their targets with high specificity and affinity obtained by selection from a library through SELEX. At present, there are only a few aptamers with high affinity and high specificity to low molecular weight targets all over the world. The aptamers against low molecular weight targets are difficult to be screened. Moreover, it is difficult to determine the affinity of low molecular weight targets binding with their candidate aptamers. Affinity characterization is the key step to determine whether the aptamer screening is successful or not. The existing affinity characterization methods for low molecular weight targets and their corresponding aptamers are summarized, including nanogold colorimetry, isothermal drop calorimetry, surface plasmon resonance, circular dichroism, quartz crystal microbalance, microscale thermophoresis and SYBR Green I dye detection. The advantages and disadvantages of these methods and suggestions for improvement are also discussed in order to improve the efficiency of aptamer characterization.

**Key words** Aptamer Low molecular weight target Affinity characterization

## 致 谢

近期为本刊审稿的专家(按拼音首字母排列):

白仲虎 蔡海波 陈 昶 陈玲玲 陈守文 董小明 方福德 冯旭东 高 明 郭美锦  
郭正彦 胡国元 贾振华 姜 平 姜 韬 孔桂美 李海燕 李任强 李晚忱 李玉昌  
李志勇 刘纯杰 刘庆坡 刘仕平 刘相国 路福平 马彬云 苗俊英 潘 杰 庞 博  
秦成峰 邱晓忠 邵宁生 王金星 王 军 王 玲 王 娜 王雪敏 王毅刚 王永忠  
卫功元 魏 杰 徐正仁 杨培龙 姚 刚 于立权 郁惠蕾 张桂敏 张世宏 张兴群  
张忠辉 钟 成 周峻沛