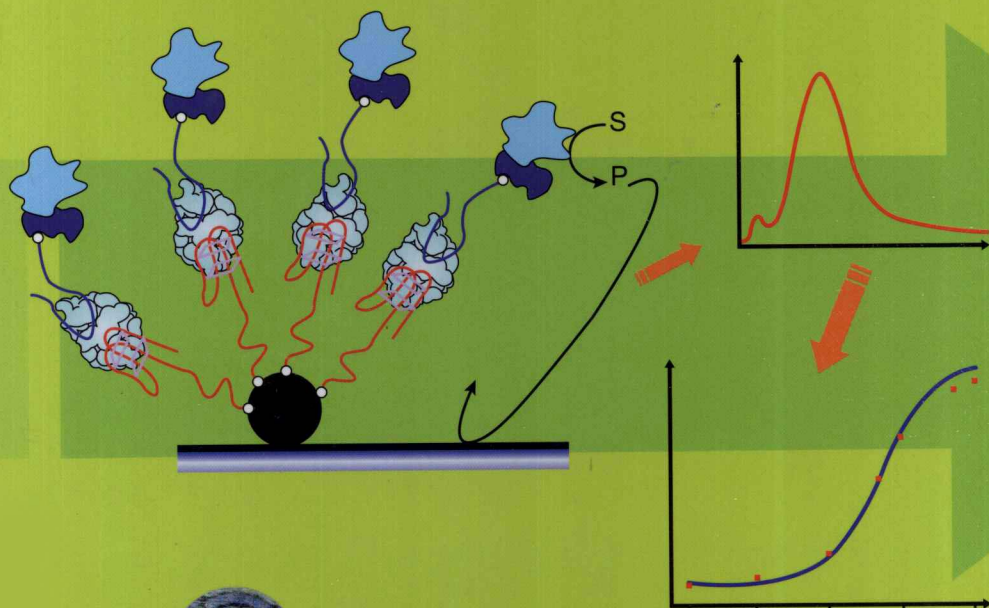


➡ [意] 马可·马希尼 (Marco Mascini) 主编
➡ 屈锋 等译



生物分析中的 核酸适配体

Aptamers in Bioanalysis



化学工业出版社

[意] 马可·马希尼 (Marco Mascini) 主编

屈锋 等译

生物分析中的 核酸适配体

Aptamers in Bioanalysis



化学工业出版社

· 北京 ·

书中介绍和总结了“适配体”的概念、产生方法以及近 20 年来在分析领域内发展动态和最新研究进展。内容涵盖了适配体作为识别元素的主要研究方向和应用范围,具体包括电化学适配体传感器、免疫标记适配体传感器、适配体酶传感器、信号放大适配体传感器、纳米功能化适配体传感器,以及毛细管电泳、液相色谱等分离技术与适配体的联合检测等,充分展现出核酸适配体在分析科学中的独特优势和应用价值。

该书主题属前沿科学领域,内容深入浅出,原理和应用相辅相成,代表了当前国际上适配体研究的整体发展水平,对国内化学界和生物医学界相关研究和科学普及具有良好的参考价值和指导意义。

图书在版编目 (CIP) 数据

生物分析中的核酸适配体/[意] 马希尼 (Mascini, M.)

主编; 屈锋等译. —北京: 化学工业出版社, 2010. 10

书名原文: Aptamers in Bioanalysis

ISBN 978-7-122-09380-6

I. 生… II. ①马…②屈… III. 生物分析 IV. O657

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2010) 第 166028 号

Aptamers in Bioanalysis, 1st ed. /by Marco Mascini

ISBN 978-0-470-14830-3

Originally published in the English language by John Wiley & Sons, Inc. under the title “Aptamers in Bioanalysis”. Copyright © 2009 by John Wiley & Sons, Inc. All rights reserved. This translation published under license. And any other copyright, trademark or other notice instructed by Wiley.

本书中文简体字版由 WILEY 授权化学工业出版社独家出版发行。

未经许可, 不得以任何方式复制或抄袭本书的任何部分。

北京市版权局著作权合同登记号: 01-2010-3832

责任编辑: 李晓红

责任校对: 战河红

文字编辑: 刘砚哲

装帧设计: 刘丽华

出版发行: 化学工业出版社 (北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印 刷: 北京永鑫印刷有限责任公司

装 订: 三河市万龙印装有限公司

720mm×1000mm 1/16 印张 18½ 彩插 4 字数 321 千字 2010 年 11 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

定 价: 68.00 元

版权所有 违者必究

序

1990 年核酸适配体 (Aptamer) 概念提出以来, 经过 20 年的研究, 它已发展成为一类广受关注的新型识别分子。近年来, 核酸适配体日益受到国内外化学、生物医学、纳米材料、蛋白质科学、物理、数学多学科研究者的广泛关注。2007~2010 年, 仅在 *Anal. Chem.*, *Biosensors & Bioelectronics*, *J. Am. Chem. Soc.*, *Nucleic Acid Research*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, *J. Bio. Chem.*, *Chem. Rev.*, *Nano Lett.*, *Current Opinion in Chemical Biology* 等国际一流杂志发表的适配体有关论文就有 300 余篇, 涉及化学生物学、分子生物学、分析化学、材料科学、生物医学等领域的生物传感与分析分离、核酸功能研究、核酸自组装材料及器件性能等研究内容。此外, 2005 年第一个核酸适配体药物 “Macugen” 仅经 3 年时间研发便被 FDA 正式批准上市, 成为核酸适配体领域的一个里程碑。核酸适配体不仅因在新药研发领域具有广阔前景而引人注目, 其在肿瘤等重大疾病的生物医学基础研究、疾病诊断领域同样显示出广阔的应用前景。

目前有关方面的基础研究和实际应用还只处于起步阶段, 面临着更大的发展空间。国内学者在适配体的相关研究中成果显著, 深受国家重视。2009 年 12 月召开了以 “核酸适配体及生物医学应用” 为主题的第 365 次香山科学会议。2010 年 “核酸适配体识别新技术新方法研究” 获批国家重大科学研究计划。由此表明核酸适配体的基础和应用研究的重要理论意义、实用价值和应用前景。

“Aptamers in Bioanalysis” 一书的主编 Marco Mascini 教授, 在该书的编辑过程中, 邀请中国科学院长春应用化学研究所的董绍俊研究员撰写了第 12 章 “不同技术制备非标记适配体传感器用于生物分析的策略”。该书其他章节分别介绍了适配体的生物传感功能研究以及适配体的筛选, 分离分析应用的新

译者的话

核酸适配体作为一种人工合成的核酸，具有稳定的二级结构和高特异性、高亲和力、便于化学修饰与功能化等特点，且易于进行大量低成本的可重复性合成。无机离子，有机分子，生物大分子蛋白质、酶、受体等乃至细胞、微生物均可能存在与其对应的高特异性亲和配体。当前，核酸适配体的有关研究是化学、生物医学、材料科学等领域的研究热点之一。

国外核酸适配体相关的书籍还比较有限，仅有 *The Aptamer Handbook* (Edited by Sven Klussmann, Wiley-VCH, 2006), *Functional Nucleic Acids for Analytical Applications* (Edited by Yingfu Li 和 Yi Lu, Springer Science, 2009)。国内还没有相关书籍出版。我们翻译的“*Aptamers in Bioanalysis*” (Edited by Marco Mascini, Wiley, 2009) 一书总结了核酸适配体的筛选方法，核酸适配体生物传感器和核酸适配体的分离分析及其在生物医学领域的应用研究。其介绍的方法和内容不仅可作为研究生和教师的参考，而且对国内热心和关注适配体研究的青年学者以及跨学科的研究人员具有一定的指导意义，并有助于其他相关领域的研究者了解适配体研究的发展、应用和最新进展。

此书的翻译工作由北京理工大学生命学院生物医学分析检测研究室，中国科学院长春应用化学研究所，北京市理化分析测试中心等单位从事适配体研究的有关人员承担。其中第1、2、6~11章分别由屈锋、梅芳、赵新颖、李倩、刘允、古力、陈巍、张经华等参与翻译，第3~5、12章分别由杜衍、李冰凌、朱进波等翻译。全书的审校工作由屈锋承担。

此书的翻译过程中承蒙中国科学院长春应用化学研究所董绍俊先生对译稿进行了修改和完善，北京理工大学生命学院郭淑元、庄力霞老师对书中分子生物学部分内容提出了修改意见和建议，在此一并表示感谢！还要特别感谢中国科学院长春应用化学研究所汪尔康先生自此书翻译之初起所给予的大力支持

前言

非常高兴担任《生物分析中的核酸适配体》一书的主编。适配体最初时是作为治疗药物，但在很短几年间就成为分析化学的热点话题。在我们的实验室，我们正在努力实现可靠的化学和生物传感器，适配体显然成为其组装的最佳组件，并作为具有特殊结合常数（微摩尔至皮摩尔范围）的一类新配体出现在这些应用中。适配体也进入了许多其他分析应用中，如基于分离科学的技术（各种色谱技术或毛细管电泳），用这些新化合物能够解决许多令人振奋的新的分析问题。

食品、空气或饮用水中日益增多的污染物，能引起中毒、疾病或慢性疾病，这使我们需要能够快速检测复杂样品，通常是对多组分进行分析的系统。这种需求也存在于医学领域，人们越来越需要多参数诊断系统，以检测所有已知的和更多近来才发现的不同疾病的生物标志物。遗憾的是，对医生来说，与疾病相关的生物标志物要么是生理上微量存在的，要么是被病人血液和体液内非特异性化合物严重污染的。因此，有效地检测这些生物标志物需要高灵敏以及特异性的识别元素。

当检测系统需要一种生物分子识别体系时，基于抗体检测的方法仍被认为是环境、食品和临床分析中的标准检测方法，所建立的这些分析方法已经表明能够满足所需的灵敏度和选择性。然而，在多组分检测和非常复杂的样品分析中使用抗体面临着一些限制，主要是源于蛋白受体的性质和蛋白受体的合成。为了规避这些缺陷，寻找其他可作为替代的识别分子一直处在研究探索中。

人们认识到核酸，特别是 RNA，可拥有稳定的二级结构，且它们易于合成和功能化修饰，这已开启了适配体在一些领域的应用之门。

核酸的主要优点是克服了使用动物或细胞系产生分子，而且，对非免疫原性的分子的抗体是很难生产的。相反，适配体是通过体外方法分离，不依赖于

原著参编人员

Moritz K. Beissenhirtz, Analytical Biochemistry, Institute of Biochemistry and Biology, University of Potsdam, Karl-Liebknecht-Strasse 24-25, Bldg. 25, D 14476 Potsdam-Golm, Germany

Jean-Pierre Daguer, Université Victor Segalen Bordeaux II, INSERM U869, Laboratoire ARNA, Bâtiment 3A 1^{er} étage, 146 Rue Léo Saignat, 33 076 Bordeaux Cédex, France

Eric Dausse, Université Victor Segalen Bordeaux II, INSERM U869, Laboratoire ARNA, Bâtiment 3A 1^{er} étage, 146 Rue Léo Saignat, 33 076 Bordeaux Cédex, France

Shaojun Dong, State Key Laboratory of Electroanalytical Chemistry, Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences Changchun, Jilin 130022, P. R. China

Tibor Hianik, Department of Nuclear Physics and Biophysics, Faculty of Mathematics, Physics and Informatics, Comenius University, Mlynská dolina F1, 842 48 Bratislava, Slovakia

Kazunori Ikebukuro, Department of Biotechnology & Life Science, Faculty of Technology, Tokyo University of Agriculture & Technology, 2-24-16 Nakacho, Koganei, Tokyo, 184-8588, Japan

Kagan Kerman, Department of Chemistry, University of Saskatchewan, 110 Science Place, Saskatoon, S7N 5C9 Saskatchewan, Canada

Sergey N. Krylov, Department of Chemistry, York University, Toronto,

D 14476 Potsdam-Golm, Germany

Regina Stoltenburg, Centre for Environmental Research Leipzig-Halle GmbH (UFZ), Environmental and Biotechnology Centre (UBZ), Permoserstr. 15, D-04318 Leipzig, Germany

Beate Strehlitz, Centre for Environmental Research Leipzig-Halle GmbH (UFZ), Environmental and Biotechnology Centre (UBZ), Permoserstr. 15, D-04318 Leipzig, Germany

Eiichi Tamiya, Nanobiotechnology and Biodevice Lab, Department of Applied Physics. Graduate School of Engineering, Osaka University, 2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

Sara Tombelli, Department of Chemistry, University of Florence, Via della Lastruccia 3, 50019 Sesto Fiorentino, Italy

Jean-Jacques Toulmé, Université Victor Segalen Bordeaux II, INSERM U869, Laboratoire ARNA, Bâtiment 3A 1^{er} étage, 146 Rue Léo Saignat, 33 076 Bordeaux Cédex, France

Hui Wei, State Key Laboratory of Electroanalytical Chemistry, Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun, Jilin 130022, P. R. China

Itamar Willner, Institute of Chemistry, The Hebrew University of Jerusalem, Jerusalem 91904, Israel

Ulla Wollenberger, Analytical Biochemistry, Institute of Biochemistry and Biology, University of Potsdam, Karl-Liebknecht-Strasse 24-25, Bldg. 25, D 14476 Potsdam-Golm, Germany

Wataru Yoshida, Department of Biotechnology and Life Science, Faculty of Technology, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2-24-16 Nakacho, Koganei, Tokyo 184-8588, Japan

Maya Zayats, Institute of Chemistry, The Hebrew University of Jerusalem, Jerusalem 91904, Israel

M3J 1P3 Ontario, Canada

Eik Leupold, Leibniz Institute of Molecular Pharmacology, Robert-Rössle-
strasse 10, D 13125 Berlin, Germany

Bingling Li, State Key Laboratory of Electroanalytical Chemistry, Changchun
Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Chang-
chun, Jilin 130022, P. R. China

Fred Lisdat, University of Applied Sciences Wildau, Biosystems Technology,
Bahnhofstrasse 1, D 15745 Wildau, Germany

Marco Mascini, Department of Chemistry, University of Florence, Via della
Lastruccia 3, 50019 Sesto Fiorentino, Italy

Linda B. McGown, Department of Chemistry and Chemical Biology, Rens-
selaer Polytechnic Institute, Troy, NY 12180, USA

Maria Minunni, Department of Chemistry, University of Florence, Via della
Lastruccia 3, 50019 Sesto Fiorentino, Italy

Oliver Pänke, Fraunhofer Institute of Biomedical Engineering, Am
Mühlenberg 13, D 14476 Potsdam-Golm, Germany

Eric Peyrin, DPM UMR 5063 CNRS/Université de Grenoble, Bât E (C)
André Rassat, Domaine Universitaire, 301 avenue de la Chimie, BP
53 38 041 Grenoble Cédex 9, France

Corinne Ravelet, DPM UMR 5063 CNRS/Université de Grenoble, Bât E (C)
André Rassat, Domaine Universitaire, 301 avenue de la Chimie, BP
53 38 041 Grenoble Cédex 9, France

Frieder W. Scheller, Analytical Biochemistry, Institute of Biochemistry and
Biology, University of Potsdam, Karl-Liebknecht-Strasse 24-25, Bldg.
25, D 14476 Potsdam-Golm, Germany

Koji Sode, Department of Biotechnology and Life Science, Faculty of Tech-
nology, Tokyo University of Agriculture & Technology, 2-24-16 Naka-
cho, Koganei, Tokyo 184-8588, Japan

Walter Stöcklein, Analytical Biochemistry, Institute of Biochemistry and Bi-
ology, University of Potsdam, Karl-Liebknecht-Strasse 24-25, Bldg. 25,

动物，它能针对任何靶物质生产和开发一个体外组合库。此外，体内抗体的产生意味着动物免疫系统选择了与抗体结合的靶蛋白的位点。体内参数条件决定了抗体识别靶蛋白只能在生理条件下，这就限制了对抗体的功能化修饰和应用的范围。

通过操控适配体的筛选过程，还可以得到结合于靶的特异区、具有特异性结合性质和在不同结合条件下结合的适配体。筛选后，适配体可通过化学合成生产和进行高度纯化，消除使用抗体时发现的批次间的差异。通过化学合成，可进行适配体的修饰，提高分子的稳定性、亲和性和特异性。通常为了获得更高的亲和性或特异性，可改变适配体-靶复合物的动力学参数。适配体另一个优于抗体的优点是对较高温度的稳定性。其实，抗体是大蛋白分子，它对温度敏感，会产生不可逆的变性。相反，适配体非常稳定，变性后还能使其天然活性构象复原。

筛选过程本身具有放大步骤，赋予了适配体一些相对于其他“非天然”受体的优点，如寡肽就不能在筛选过程中放大。因此，聚合酶链反应再次显示出其解决高选择性配体的获得问题的魔力。我们遗传系的同事正在努力克服这个问题，将来我们将会很高兴地从库里获得其他的具有不同性质的优良配体，像多肽或多糖，而不是寡核苷酸！

现在，我们有一类新的生物传感器——适配体传感器，是用适配体作为高选择性识别元件。作为受体分子，由于适配体针对分析物是均等合成的产生过程，使它们可以广泛应用于多样化的目标分析物阵列。在微纳尺度平台实现的适配体传感器拥有很多潜在的优势，如：微型化的构建；快速、灵敏和特异性的检测；高通量；成本降低；最少的材料消耗。因此，微纳适配体传感器在广泛的应用范围中极具吸引力，如蛋白质组学、代谢组学、环境监测、反恐和临床诊断和治疗。

Marco Mascini

和鼓励。化学工业出版社编辑为本书的翻译、出版付出了辛勤劳动，在此深表谢意。

由于书中内容涉及的知识面较宽和译者水平的局限，虽然每个章节都力求精心翻译，但难免会出现错误、遗漏和欠妥之处，诚请读者批评指正。

译者

成果，包括：适配体：作为配体的所有理由；SELEX 及其最新优化；电化学适配体传感器；适配体：自然和科技的融合；电化学指示剂和横向剪切模式法检测蛋白质与适配体间相互作用；适配体酶亚基生物传感器；酶的变构控制中适配体的应用；基于纳米材料的非标记适配体传感器；基于适配体的生物分析检测；放大策略；动力学毛细管电泳用于适配体的筛选、表征和分析；对映体分离中的适配体应用；适配体修饰的表面用于毛细管电泳和 MALDI-MS 中蛋白质的亲和捕获和检测。

2009 年出版的 “Aptamers in Bioanalysis”，是有关适配体生物分析的第一本专著，现及时翻译为中文出版，也成为国内第一本有关适配体的中文专著。相信该书中文版的问世对国内相关领域的青年学者，跨学科的研究人员以及研究生和教授专家们在从事适配体的研究和教学工作时有所帮助。该书作为一本很好的参考书和教科书出版，必将推动我国的适配体有关工作的进步和发展。

汪尔康

2010 年 9 月 13 日于长春

目 录

第一篇 导论

1 适配体：作为配体的所有理由	2
Jean-Jacques Toulmé, Jena-Pierre Daguer, Eric Dausse 著；屈锋，李倩 译	
1.1 引言	2
1.2 筛选的威力和适配体的精制	4
1.3 化学组成决定适配体形状	6
1.4 适配体调控子	10
1.5 适配体传感器	13
1.6 展望	16
参考文献	18
2 SELEX 及其最新优化	29
Beate Strehlitz, Rigina Stoltenburg 著；屈锋，古力，陈巍 译	
2.1 引言	29
2.2 适配体及其 SELEX 筛选	30
2.3 SELEX 技术的修饰	33
2.4 适配体及其筛选技术的优点与局限性	37
2.5 正在开发上市的适配体的应用	39
2.6 展望	43
参考文献	44

第二篇 生物传感器

3 电化学适配体传感器

Itamar Willner, Maya Zayats 著; 杜衍 译	56
3.1 引言	56
3.2 基于固定在电极表面的有氧化还原活性的适配体单分子层的电化学适配体传感器	58
3.3 基于酶放大的电化学适配体传感器	62
3.4 基于纳米粒子放大的电化学适配体传感器	66
3.5 非标记电化学适配体传感器	67
3.6 基于场效应晶体管的适配体传感器	70
3.7 结论和展望	72
参考文献	73

4 适配体: 自然和科技的融合

Mortz K. Beissenhirtz, Eik Leupold, Walter Stocklein, Ulla Wollenberger, Olivererger, Oliver Panke, Fred Lisdat, Frieder W. Scheller 著; 李冰凌 译	79
4.1 引言	79
4.2 核酸分子的特性	79
4.3 核酸分子的电化学检测	80
4.4 细胞色素 C 与适配体结合	82
4.5 DNA 机器和适配体	84
参考文献	89

5 电化学指示剂和横向剪切模式法检测蛋白质与适配体间相互作用

Tibor Hianik 著; 朱进波 译	92
5.1 引言	92
5.2 适配体在固态基底上的固定	93
5.3 适配体-配体间相互作用的检测	95
5.3.1 电化学方法	96
5.3.2 声学方法	108
5.4 结论	114
参考文献	115

6 适配体酶亚基生物传感器：酶的变构控制中适配体的应用	120
Kazunori Ikebukuro, Wataru Yoshida, Koji Sode 著；屈锋，李倩 译	
6.1 适配体作为生物传感器的分子识别元素	120
6.1.1 适配体与抗体比较	120
6.1.2 信号适配体	122
6.2 均相传感	123
6.2.1 无需结合/释放分离的生物传感器	123
6.2.2 适配体的酶亚基	124
6.3 改良适配体的模拟进化算法	126
参考文献	127
7 基于纳米材料的非标记适配体传感器	129
Kagan Kerman, Eiichi Tamiya 著；梅芳，屈锋 译	
7.1 引言	129
7.2 非标记电化学适配体传感器	129
7.3 基于场效应晶体管的适配体传感器	133
7.4 基于局域表面等离子共振的非标记适配体传感器	137
7.5 面临的挑战和结束语	140
参考文献	140
8 基于适配体的生物分析检测：放大策略	148
Sara Tombelli, Maria Minunni, Marco Mascini 著；屈锋，梅芳 译	
8.1 引言	148
8.2 基于功能化的适配体纳米粒子的生物分析检测	149
8.3 基于适配体和量子点的检测	153
8.4 适配体酶和适配体机器	157
8.5 基于适配体分析的聚合酶链反应扩增法	160
8.6 结论	164
参考文献	164



第三篇 应用

9 动力学毛细管电泳用于适配体的筛选、表征和分析	170
Sergey N. Krylov 著；屈锋，刘允 译	
9.1 引言	170

9.1.1 动力学毛细管电泳	170
9.1.2 NECEEM 和 ECEEM 的概念	172
9.2 适配体筛选的 KCE 方法分离和亲和控制	174
9.2.1 NECEEM 方法筛选适配体	175
9.2.2 ECEEM 方法筛选适配体	183
9.2.3 PCR 方法的优化	184
9.2.4 KCE 方法筛选适配体的展望	186
9.3 KCE 法测定靶分子-适配体相互作用的结合参数	187
9.3.1 基础	187
9.3.2 毛细管内温度的控制	188
9.3.3 举例	189
9.4 适配体作为亲和探针的靶分子定量亲和分析	192
9.4.1 基础	192
9.4.2 举例	194
9.5 结论	195
参考文献	195

10 对映体分离中的适配体应用 199

Corinne Ravelet, Eric Peyrin 著; 赵新颖, 屈锋, 张经华 译 199

10.1 引言 199

10.2 对映体选择性适配体的产生和性质 200

10.3 固定化的适配体用于液相色谱分离对映体 201

10.3.1 固定相的制备和柱填充 202

10.3.2 基于 DNA 适配体的手性固定相 202

10.3.3 基于 RNA 适配体的手性固定相和镜像策略 203

10.3.4 一类特定的适配体手性固定相 205

10.4 适配体用于毛细管电泳分析对映体 206

10.4.1 适配体作为背景电解质中的手性添加剂用于 CE 对映体分离 ... 206

10.4.2 基于对映体选择性竞争分析的亲和毛细管电泳的适配体设计 ... 208

10.5 结论 210

参考文献 211

11 适配体修饰的表面用于毛细管电泳和 MALDI-MS 中蛋白质的亲和捕获和检测 213

Linda B. McGown 著; 屈锋, 赵新颖, 张经华 译 213

11.1 引言 213

11.2 适配体修饰的毛细管用于亲和毛细管电泳	214
11.3 适配体修饰的表面用于亲和 MALDI-MS	215
11.3.1 概况	215
11.3.2 凝血酶的亲和 MALDI-MS	216
11.3.3 IgE 的亲和 MALDI-MS	219
11.3.4 总结	225
11.4 超越适配体: 基因组引发的 DNA 结合配体	225
参考文献	230

12 不同技术制备非标记适配体传感器用于生物分析的策略 233

Bingling Li, Hui Wei, Shaojun Dong 著; 李冰凌 译

12.1 引言	233
12.2 电化学适配体传感器	236
12.2.1 POSOALF 模式	236
12.2.2 POSOALF 模式	238
12.2.3 电化学交流阻抗适配体传感器	239
12.2.4 使用非标记氧化还原探针的电化学适配体传感器	244
12.3 荧光分子开关	247
12.3.1 POSFALF 模式	247
12.3.2 PFSFALF 模式	249
12.4 比色适配体传感器	253
12.4.1 POSFALF 模式	253
12.4.2 PFSFALF 模式	255
12.5 基于“血红素-适配体”DNA 酶的适配体传感器	261
12.6 液相色谱、电色谱和毛细管电泳(CE) 在适配体分析中的 应用	264
12.7 其他适配体传感器	269
12.8 结论	269
参考文献	270