

The Aptamer Handbook

Functional Oligonucleotides and Their Applications

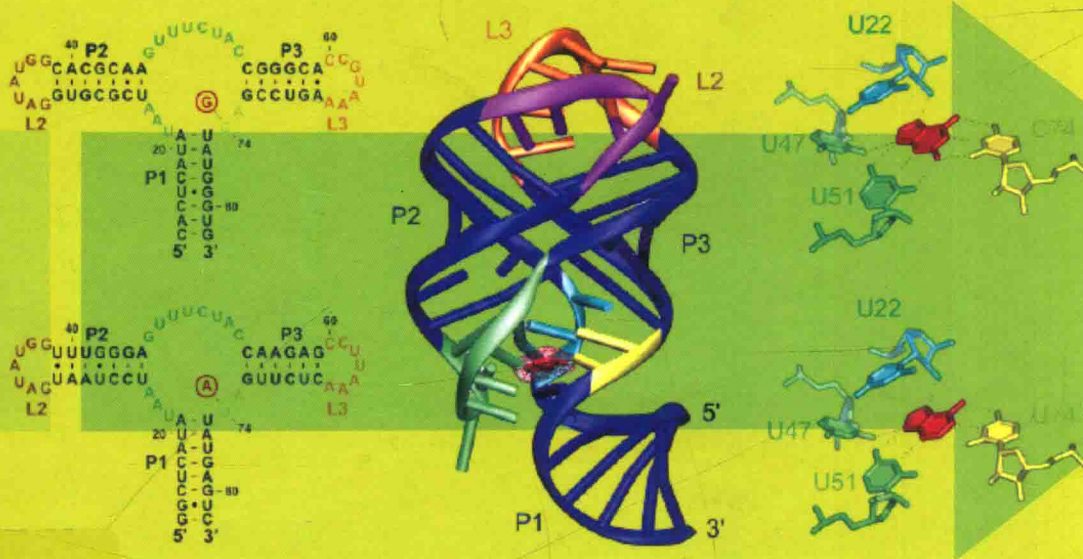


核酸适配体手册

功能性寡核苷酸及其应用

—— [德] 斯文·克卢斯曼 主编
(Sven Klussmann)

—— 屈锋 等译



化学工业出版社



The Aptamer Handbook

Functional Oligonucleotides and Their Applications

核酸适配体手册

功能性寡核苷酸及其应用

➡ [德] 斯文·克卢斯曼 主编
(Sven Klussmann)

➡ 屈锋 等译



化学工业出版社

· 北京 ·

本书系统介绍了核酸适配体的体外筛选原理、技术方法以及近年来在基础医学、临床诊断、药物研究等方面的应用。主要包括各种靶分子的适配体体外筛选技术；用核酸适配体作为药理探针在体内和体外确定靶标、蛋白功能分析、活体成像和适配体在临床治疗研究中的应用等。书中内容均为该领域最新研究成果，其介绍的内容和方法对于国内适配体研究工作者具有指导意义和良好参考价值。

适合化学、生物学、医学及生物医学工程领域的科研院所和高等院校的研究生，科研人员参考。

图书在版编目 (CIP) 数据

核酸适配体手册：功能性寡核苷酸及其应用/[德] 克卢斯曼 (Klussmann, S.) 主编. 屈锋等译. —北京：化学工业出版社，2013. 9

书名原文：The aptamer handbook: functional oligonucleotides and their applications
ISBN 978-7-122-17980-7

I. ①核… II. ①克…②屈… III. ①核酸-手册②适配体-手册③寡核苷酸 IV. ①Q52-62

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2013) 第 169665 号

The Aptamer Handbook: Functional Oligonucleotides and Their Applications, 1st ed/ by Sven Klussmann
ISBN 978-3-527-31059-3

All rights reserved. Authorised translation from the English language edition published by John Wiley & Sons Limited. Responsibility for the accuracy of the translation rests solely with Chemical Industry Press and is not the responsibility of John Wiley & Sons Limited. No part of this book may be reproduced in any form without the written permission of the original copyright holder, John Wiley & Sons Limited.

本书中文简体字版由 John Wiley & Sons Limited 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：01-2013-0364

责任编辑：李晓红
责任校对：陶燕华

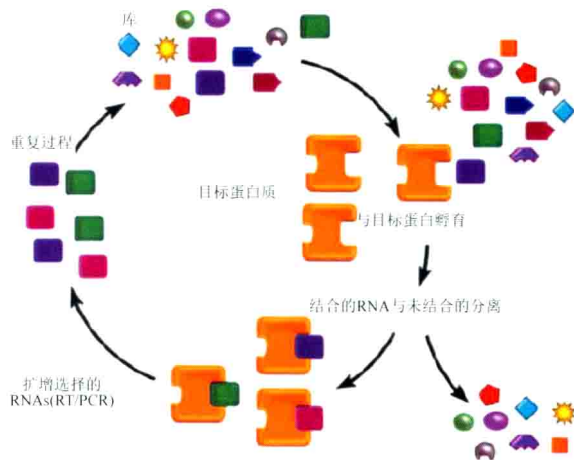
加工编辑：陈 雨
装帧设计：刘丽华

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
710mm×1000mm 1/16 印张 28¼ 彩插 2 字数 539 千字 2013 年 10 月北京第 1 版第 1 次印刷

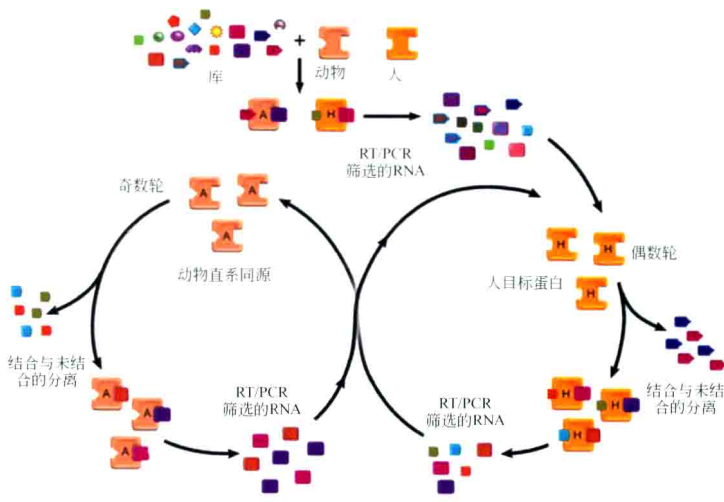
购书咨询：010-64518888（传真：010-64519686） 售后服务：010-64518899
网 址：<http://www.cip.com.cn>
凡购买本书，如有缺损质量问题，本社销售中心负责调换。

定 价：128.00 元

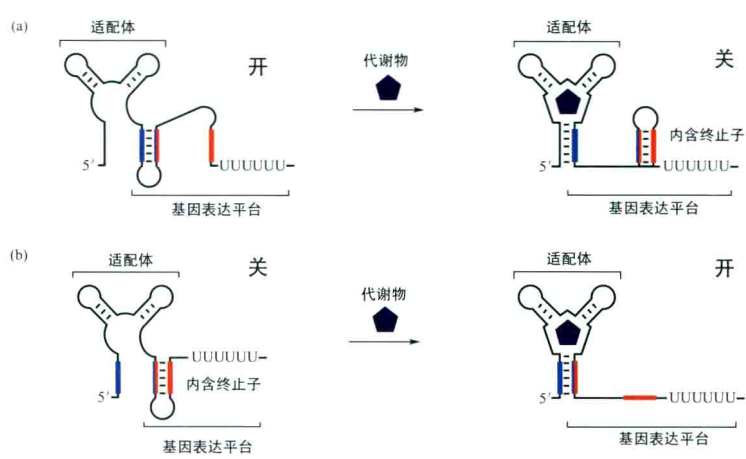
版权所有 违者必究



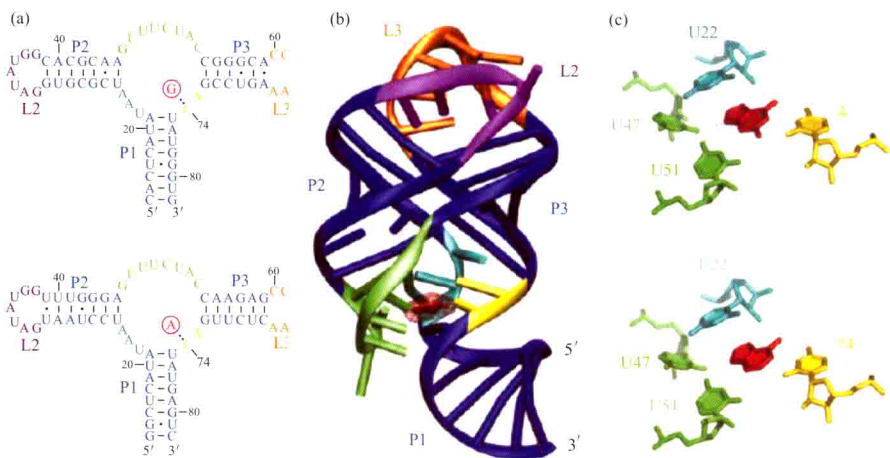
彩图1 指数富集的配体系统进化 (SELEX) (见图6.2, 120页)



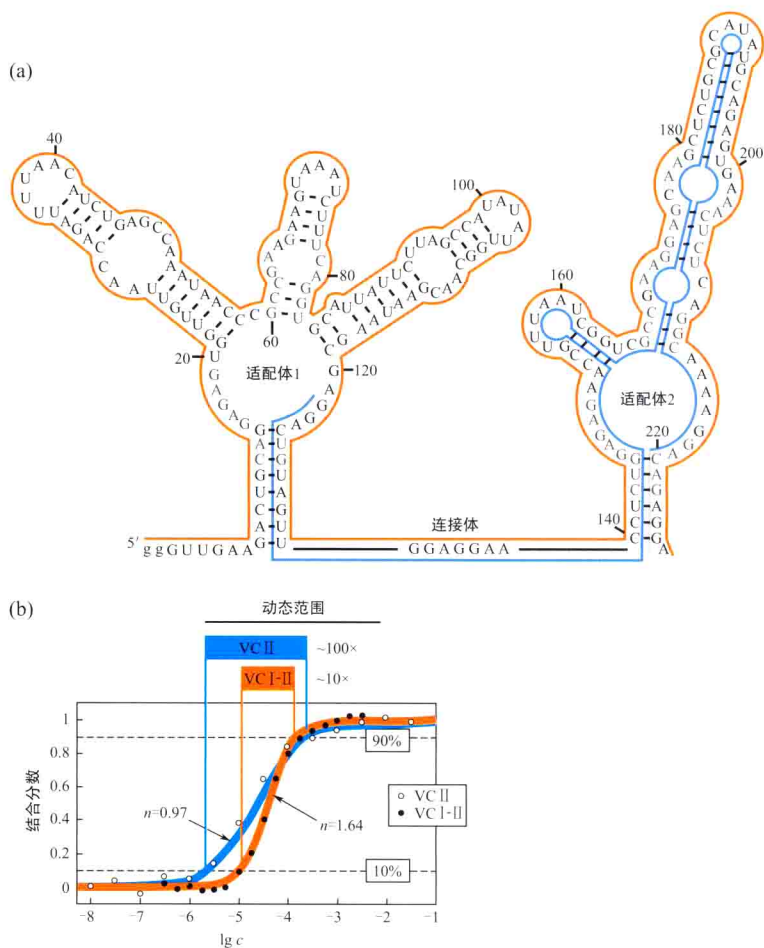
彩图2 切换 SELEX (见图6.3, 122页)



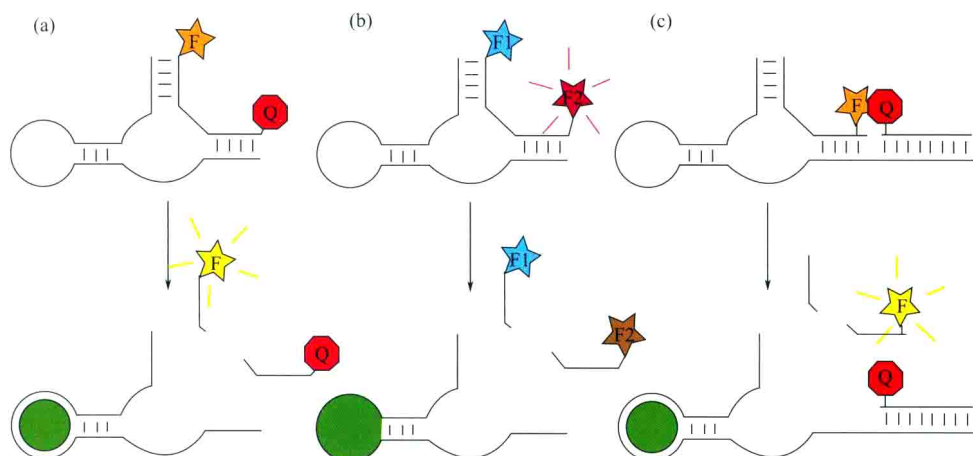
彩图3 核糖开关在转录终止水平控制基因表达 (见图8.1, 175页)



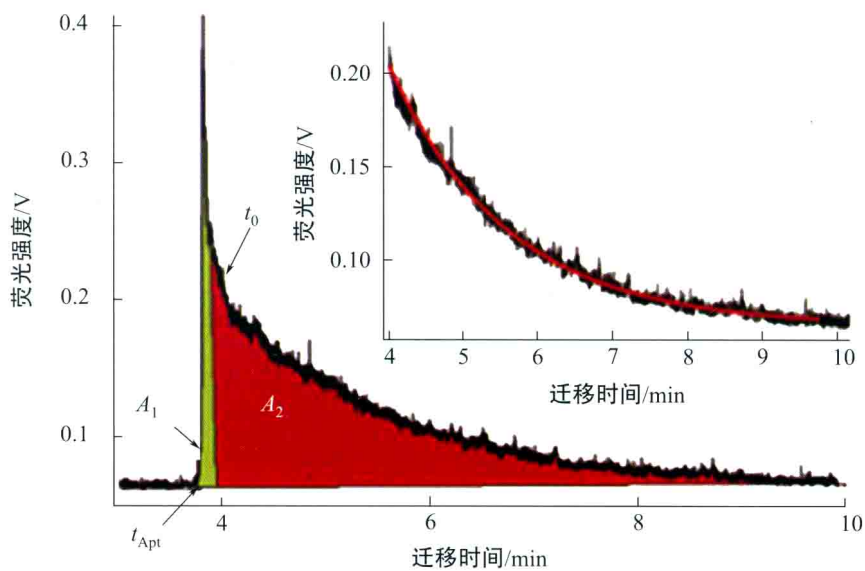
彩图4 与嘌呤结合的天然 RNA 基序的二级和三级结构图 (见图8.2, 178页)



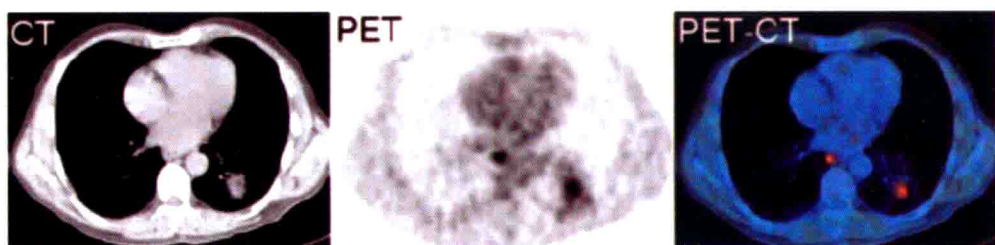
彩图5 甘氨酸核糖开关的协同结合 (见图8.3, 182页)



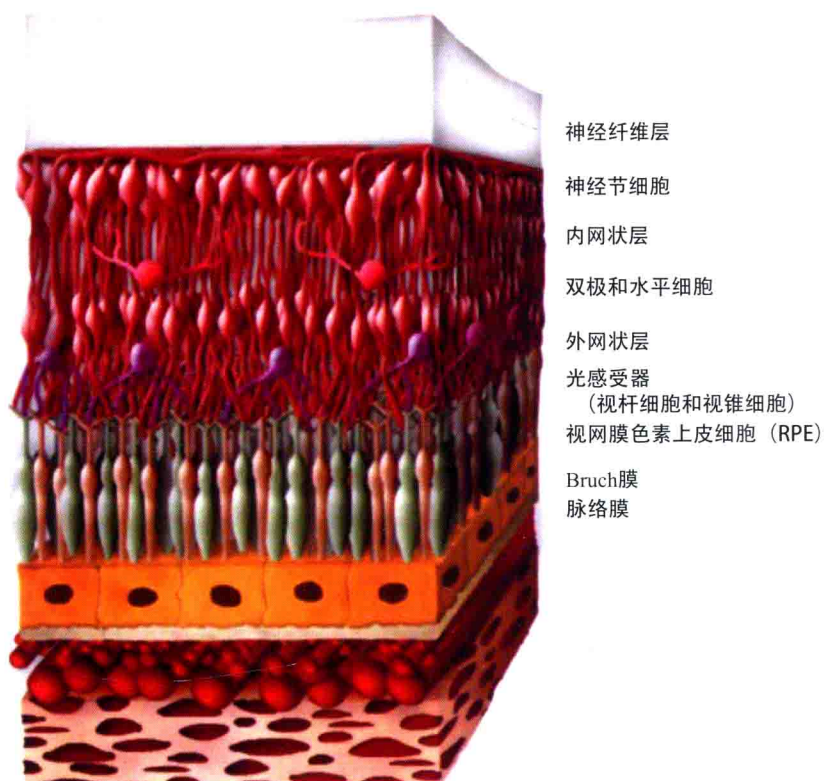
彩图6 产生荧光信号的适配体酶（见图13.7，275页）



彩图7 凝血酶和抗凝血酶 DNA 适配体的平衡混合物的 NECEEM 电泳图（见图15.9，307页）



彩图8 一名肺癌病人（非小细胞肺癌）的淋巴结转移情况的计算机断层扫描（CT），
 ^{18}F -氟脱氧葡萄糖（ ^{18}F -FDG）正电子发射扫描成像（PET）和
 融合的 PET-CT 成像(见图16.2，312页)



彩图9 视网膜层结构(见图19.2，405页)

译序

自1990年核酸适配体(Aptamer)概念提出及研究成果发表以来,它已成为生物化学、分子生物学、分析化学、医学、药学、生物信息学、纳米材料乃至物理学和数学等众多学科领域的关注热点之一,也使核酸适配体研究成为目前具有最广泛的交叉学科特点的研究领域之一。

核酸适配体既可以是天然的生物大分子,又可以通过简单的化学合成获得。它是一种新型的识别分子,其有关研究在基础生物学、化学传感与检测、医学诊断、新药研发等领域具有重要的理论意义和应用价值。2001—2008年八年间,国家自然科学基金委累计资助的核酸适配体项目仅有9项,但在2009—2012年四年间就已达到72项。此外,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。2011年“核酸适配体的分析化学基础研究”获批国家基金委“十二五”重大项目。由此说明,近年来国内的核酸适配体研究工作日益受到重视,核酸适配体的基础和应用研究具有重要的理论意义、实用价值和应用前景。

2005年出版的“The Aptamer Handbook”是国际上第一本关于核酸适配体的专著,其内容非常广泛,涵盖了核酸适配体研究的各个方面。内容涉及核酸适配体研究的历史和理论背景;RNA进化的数学模型和体外筛选概念;小分子、抗生素、蛋白质和核酸靶标的核酸适配体筛选;核糖开关、具有催化活性的DNA分子研究;核酸适配体作为药理学探针、药物的前导化合物;核酸适配体药物开发以及治疗药物适配体的性质;核酸适配体的镜像结构;亲和色谱和毛细管电泳中的核酸适配体分离介质;核酸适配体体内成像;核酸适配体临床应用等重要研究领域的研究进展。该书还对核酸适配体的未来发展方向进行了预测。

该书译者在核酸适配体研究领域有很好的研究基础，对书中相关研究内容有较深刻的理解和充分的认识。相信该书的中文版译著问世，将对国内核酸适配体相关研究领域的青年学者、研究生、跨学科的研究人员以及专家学者在从事核酸适配体的研究和教学工作时有所帮助。该书作为核酸适配体研究和应用领域一本很好的参考书和教科书出版，必将进一步推动我国核酸适配体有关研究工作的进步和发展。

A stylized handwritten signature in black ink, likely belonging to Zhang Lian, the reviewer.

2013 年 7 月 26 日于大连

译者的话

核酸适配体作为高亲和性和高特异性的“化学抗体”近年来受到多学科研究者的广泛关注。它不仅可作为生物传感和分子识别探针，而且在疾病诊断和治疗、临床检验和药物开发等方面也有着巨大的发展潜力和空间。

《核酸适配体手册》是国际上第一本核酸适配体的专著，它从多个侧面为广大的研究者和读者提供了详细而全面的视角。其内容不仅包括了生物学、生物技术和化学等基础学科领域，也强调了医学、药理学和药学等应用领域，甚至对制药公司和生物技术行业的相关从业人员也有启发。

与本研究室翻译出版的《生物分析中的核酸适配体》一书明显不同，本书全面总结了核酸适配体的发展历史，列举了多种靶标的核酸适配体的筛选实例，描述了核酸适配体的生物化学特性，介绍了核酸适配体的药物开发、功能和性质、核酸适配体的体内成像应用，并预测了核酸适配体未来研究和应用发展方向等。我们希望《核酸适配体手册》一书对国内化学、生物学、纳米材料、蛋白质组学、基因工程、新药开发、临床检验等学科领域的研究生、青年学者以及跨学科研究人员具有指导意义，有助于他们较全面、系统地了解核酸适配体的过去、现在和未来。

本书的翻译工作由北京理工大学生命学院生物医学和医药分析检测研究室、北京理工大学计算机学院、北京市理化分析测试中心等从事核酸适配体研究的人员承担。书中第1、12、13章以及前言、序言和后记部分由屈锋翻译；第2、3章由宋丹丹翻译，第4、5、15章由赵新颖翻译；第6、7、18章由吕雪飞翻译；第8章由张小莉翻译；第9、10章由屈锋、高培峰翻译；第11、14、17章由李玉娟翻译；第16章由屈锋、乐胜锋翻译；第19章由屈锋、陈尔凝翻译。书中第1、13章由冯永君审校；第7、12章由陈尔凝审校，第2~6章、8~11章、14~19章由屈锋审校。全书的审校、统稿和文字风格统一等工作由屈锋完成。

本研究室自从事核酸适配体的研究工作以来，得到国家自然科学基金(21375008、21175011、20875009)，国家973(2012CB910603、2007CB914101)的

支持，在此表示感谢。衷心感谢中国科学院大连化学物理研究所张玉奎院士和中国科学院长春应用化学研究所汪尔康院士对翻译本书所给予的鼓励和支持。感谢湖南大学谭蔚泓教授推荐我们翻译此书。还要感谢化学工业出版社编辑在本书的翻译和出版过程所付出的辛勤劳动。最后衷心感谢参加本书翻译的所有人员的热情和努力。

2011年9月起开始筹备此书翻译，至今历时2年时间。回首过去的每个日夜，翻译和审校人员在每行文字、每个章节中都付出了大量的心血和艰辛。因书中涉及的学科领域宽，知识点多，而译者的知识水平有所局限，虽对每一章节都反复核查、校对多次，甚至查阅原引文献以力求翻译精准，但翻译过程中仍感存在不少疑惑之处。因此，书中难免存在错误、疏漏和欠妥之处，在此诚请广大读者批评指正。

A handwritten signature in black ink, consisting of the characters '张玉奎' (Zhang Yankui) in a stylized, cursive script.

2013年8月20日于北京

序言

从“aptamer”和“SELEX”两个词出现以来，已经 15 年过去了。伴随着直接的分子进化领域从青春期过渡到青年时期，现在是该盘点适配体科学现在以及将来应该给予什么的合适时间了。在这第一本完全关于适配体主题的专著中，你会看到从该领域领先的研究者中精心挑选的作者，他们介绍了适配体技术的方法和应用。这既不是一本实验指南，但也不是综述文章的汇集，它是一本手册，目的是使你能够鉴赏有关应用性功能核酸的原理及实践。你本人是否已经或将要是一个从业者，或只是简单地想知道有什么值得大惊小怪的，那么这本书是值得你用荧光笔和便签做上记号的。进化是一个非常强大的过程，但令人惊奇的是它却很容易在现代的实验室中进行。你也可以为了兴趣和利益来使分子进化。

第一个适配体实际上早在大约 40 年前，在重组 DNA 技术出现以前（“B. C.，克隆之前”，如 Sydney Brenner 喜欢说的）就产生了，尽管它没有被这样提及。20 世纪 60 年代后期，Sol Spiegelman 意识到达尔文进化的三个基本过程——扩增突变和选择——可应用到体外的 RNA 分子群。使用一种 RNA 依赖的 RNA 聚合酶可以实现 RNA 扩增，该聚合酶是一种 Q β 噬菌体复制酶蛋白。在复制 Q β 基因组 RNA 变体时，聚合酶固有的错误速率导致发生突变。选择是基于特别的 RNA 分子作为有效模板，产生互补 RNA 分子的能力，以及相应地产生额外的自我拷贝的能力。Spiegelman 的著名宣言是“利用生物学的附带条件尽可能快地开始扩增”。随着多轮的选择性扩增和突变，结果是，进化的 RNA 分子群相比它们的祖先，通过复制酶得到更有效地扩增。

讨论 Spiegelman 的前沿工作时通常会聚焦在似乎不太令人吃惊的结果上，即进化的 RNA 分子是截短的 Q β 基因组 RNA 的变体，凭借它们更小的分子尺寸，相比野生型可以更快地复制。然而，更微妙的一点是，进化的 RNA 分子也能被选作为复制酶蛋白的有效配体，这确认了在正链和反链 RNA 中，RNA 特有的二级和三级结构的特点。因此，进化的 RNA 分子既是一个复制酶蛋白的适配体同时又

是蛋白质的底物，因此导致 RNA 分子后代的产生。

地球上的生命历史的重大进展之一是从基因和功能的性质都处于 RNA 分子内的“RNA 世界”过渡到 DNA 和蛋白质世界，其中基因型和表型降格为分离的大分子。直接的分子进化的另一个关键进展是技术的发展，根据它们功能的性质，将核酸分子的扩增与选择脱离。这使得筛选任何蛋白质的 RNA 分子配体成为可能，例如，Craig Tuerk 和 Larry Gold 呈现的 T4 DNA 聚合酶，甚至能筛选出与小分子结合的 RNA 分子，这一点已被 Andrew Ellington 和 Jack Szostak 所证明。

20 世纪 80 年代初，随着 Thomas Cech 和 Sidney Altman 发现了催化 RNA，人们想知道，什么会被带入到 coax Q β 复制酶来扩增包括核酶或其他一些功能性基序的 RNA 分子。Fred Kramer 和同事已经证明外源性核苷酸潜入到可被体外扩增的 Q β 基因组 RNA 的变体中是可能的。然而，那些熟悉系统细节的人知道，那只是时间问题，且通常不需要太长时间，在插入子被裁剪或完全吐出之前，就会产生更有效的扩增子。所需要的是一种多用途的 RNA 扩增方法，它对那些被扩增的序列本身毫不在意。

随后出现了聚合酶链反应 (PCR)，很快又有逆转录酶 PCR (RT-PCR)，一切都改变了。核酸分子群可承担任何事情，只要研究者们有胆量要求它们。例如，与一个靶分子结合，与一个不太密切相关的靶分子结合，催化一个反应，催化只与其他一些靶分子结合后的反应，等等。回想起来，大多数早期的努力是相当谨慎的，但很快，就摘掉了实验手套，几乎每一件事似乎都是一般的游戏。当然，确实是戴手套的时间有点长，因为 RNA 分子对生物的核酸酶高度敏感，这限制了它们的潜在应用。通过对 RNA 分子类似物进行直接的进化可以克服这个限制，这些 RNA 分子类似物抗核酸酶，并且可通过 RT-PCR 扩增。这方面特别有趣的是“Spiegelmers”，它首次作为天然的 RNA 分子被筛选出来，它与预期靶标的对映体结合，然后，作为与实际靶标结合的相应的非天然 RNA 的对映体制备出来。这些反转的适配体的命名很恰当，因为它们是其生物副本的镜像 (Spiegel)，承认了 Spiegelman 的贡献，就引发了达尔文进化的体外实践。

适配体科学现在已经趋向成熟，不仅是指它相关知识的长期积累的结果，而且是通过它在生物学和医学领域日益增大的影响。2004 年 12 月，第一个适配体化合物被批准临床应用。如 Anthony Adamis 和同事在章节中所讨论的，Macugen (pegaptanib，哌加他尼) 是化学修饰的 RNA 适配体，与血管内皮生长因子紧密地特异性结合。它已经成为老年性黄斑变性新生血管形成的首选治疗药。其他章节介绍的是正在开发的各种治疗应用的适配体，如医学成像、临床诊断、药靶确认、生物传感器应用和过程化学等。所有这些和更多的应用等

待着你们的贡献。

自然的达尔文进化已经提供给我们大量的功能性大分子。然而，就像合成有机化学已经带领我们超越了获得如天然产物一样的小分子一样，直接进化已经扩展到大分子集合，包括根据我们自己的需要进行剪裁的化合物。这并非智能设计，事实正相反。但在本书中，你将会看到实验者的想象力和技巧如何与进化搜索的力量结合，能够产生出一些令人惊叹的发现。

Gerald F. Joyce

化学和分子生物学系

Skaggs 生物化学研究所

Scripps (斯克利普斯) 研究所

美国，加州，拉贺亚 (La Jolla)

前言

为什么要写一本关于适配体的书？可能所有已经熟悉适配体的读者都会提出这个问题，因为在科学文献中有相当多的高质量的综述已经出版。但是，完全相同的问题也可能被任意一位其他读者提出来，尽管他在科学上很感兴趣，但却又完全不熟悉适配体。当出版社问我是否有兴趣编辑一本有关适配体的书时，我问了自己一个不同的问题：至今还没有一本适配体的教科书是真的吗？——从它们问世起至今已经超过了 15 年的时间。的确，我认识到现状就是这种。尽管有兴趣的读者会发现，在互联网搜索引擎 Google 上输入术语“aptamer”时，有超过 110000 个条目，尽管在科学的数据库中有成百上千的出版物，尽管有许多申请的专利和授权的专利，尽管一些公司曾经和仍然从事适配体工作，尽管最后但并非最终可用的基于适配体的药物（Macugen）已通过临床开发，进入市场，现在帮助了许多病人用于治疗破坏性的年龄相关的黄斑变性疾病，但迄今为止，还没有一本对与适配体相关的巨大机遇进行详细总结的教科书。

编写“适配体手册”的初衷考虑了从适配体的多个侧面，特别是它们的应用，提供一个详细全面的视角。从设计概念上是面向非常广大的读者群，而不仅是包括分子生物学、生物化学和化学等纯科学的学科。它也强调通常更具有应用导向的领域，如药理学和药学，但是它也对制药公司和生物技术行业的管理者有所帮助，他们（应该）考虑更广泛地使用或建立新的和创新的技术。通过许多杰出的科学家所投入的巨大的工作，以及通过公共或者商业资助所投入的资金，目前已经帮助我们获得了适配体和适配体相关的大量的、广泛的和坚实的基础知识，这些知识应该被越来越多的人所认识。

尽管早期进行了相当多的前期工作，但最耀眼的一刻却定格在 1990 年，当 Joyce Gold 和 Szostak 小组利用体外进化筛选技术来识别特有的 RNA 结构，且该结构表现出新的或可变的多功能性：其分别与靶分子和酶的活性部位结合。Ellington 和 Szostack 发表在 *Nature* 上的文章中，将结合靶标的 RNA 分子命名为“aptamers”，而 Tuerck 和 Gold 发表在 *Science* 的文章中，将确定 aptamers 的过程称作“SELEX”（指数富集的系统配体进化）。随后几年，人们提出了几乎任何可

想象的靶标类型的适配体：如小分子、肽、蛋白、或甚至核糖体和病毒微粒。当很多人认为只有抗体才能以高亲和力和特异性与靶标结合时，人们不得不承认适配体（寡核苷酸结构）也同样能做到，甚至有时更好。

在第1章中，Carothers 和 Szostak 做了适配体的总体概述，将他们的发现放在关于生命起源和 RNA 世界的讨论的上下文中。随后两章，从理论的观点，为读者提供了对有关（体外）进化和适应性曲面的深入了解。本书第2篇包括了五章，每一章涉及的都是与一定类型的靶标结合的适配体，如小分子、抗生素、蛋白质和核酸结构。最后一章介绍了由自然界自身进化而来的适配体基序，它们被称为“核糖开关”。这些“天然适配体”包埋在信使 RNA 分子中，能直接感应小分子，因此能够在基因调控中作为调节因素发挥作用。本书中篇幅较小的第3篇有两章，介绍了 RNA 和 DNA 寡核苷酸的催化功能。尽管这些所谓的核酶或脱氧核酶并不归为适配体一类，但是通过体外进化筛选方法能够得到它们，并且它们通过筛选到的三维结构行使功能。

本书第4篇展现了适配体的许多应用概述。这些应用范围包括适配体作为细胞外和细胞内（内配体）靶标确认的体外工具，涉及到所谓的适配体酶，它们由适配体和（脱氧）核酶结合组成，可用于生物传感器，包括适配体作为小分子药物开发的前导结构，以及包括适配体在亲和和色谱应用中作为配体。而且，这些灵活多变的分子也能在体内行使其功能。由于它们具有结合能力，从而可阻碍重要的疾病靶标，适配体可以作为并且已经用作体内成像试剂和治疗药物。对于这些应用，通常必须对适配体进行化学修饰以使它们具有生物稳定性。从镜像核苷酸（所谓的 Spiegelmers）构建的适配体已经表现出天然的生物稳定性，不需要进一步的稳定化处理。最后一章介绍了 Macugen，它是抗血管内皮生长因子的适配体，2004 年 12 月经美国食品与药品监督管理局批准作为可用于治疗年龄相关的黄斑变性疾病的药物。最后，在后记中，第一个将 SELEX 从学术实验室转移到生物技术公司环境中的 Larry Gold 总结了他个人对于适配体的看法。

我希望这本书会帮助有兴趣的读者获得适配体在各个充满诱惑的领域中的综合印象。我们知道在所有各种可能中，很难做到完整性，因此，我们选择了不同的主题来尽可能多地启发适配体的不同研究领域。进一步讲，我希望吸引最优秀的人才加入到这个领域，来进一步挑战极限。

非常感激使这本书得以完成的所有人。非常感谢每章的作者们所奉献的精彩章节，感谢 Jerry Joyce 的精彩序言，感谢 Christian Mihm 的封面设计，最后，但并非不重要，要感谢 Wiley-VCH 的工作人员，特别是 Frank Otmar Weinreich 和 Steffen Pauly，感谢你们一直以来的支持。

Sven Klussmann

于柏林，2005 年 12 月

原著参编人员

Anthony P. Adamis

Eyetechn Pharmaceuticals, Inc.
3 Times Square, 12th Floor
New York
New York 10036
USA

Sandra Borkowski

Research Laboratories of Schering AG
Müllerstrasse 178
13342 Berlin
Germany

Ronald R. Breaker

Department of Molecular,
Cellular and Developmental Biology
Yale University
P. O. Box 208103
New Haven
Connecticut 06520-8103
USA

James M. Carothers

Dept. of Molecular Biology,

and Center for Computational
and Integrative Biology 7215
Simches Research Center
Massachusetts General Hospital
185 Cambridge Street
Boston
Massachusetts 02114
USA

Sharon T. Cload

Archemix Corp.,
300 Third Street
Cambridge
Massachusetts 02139
USA

Eric Dausse

INSERM U386
European Institute of Chemistry
and Biology
Université Victor Segalen
146, rue Léo-Saignat
33076 Bordeaux cedex
France