

个多 caspase 抑制物至少对关键 caspase 抑制,运用化学试剂延迟细胞死亡延长生产细胞培养的时相已被阐明,添加这些化学试剂是一种简单有效的方法,将会被广泛应用到蛋白生产的工业中。

五、展 望

利用抗凋亡的策略在细胞生长、静止和死亡阶段均可延长细胞的生存期并延长培养细胞的生产时相。将来有抑制细胞凋亡能力的营养物质、基因、化学试剂会不断涌现,而且对于凋亡发生机理的阐明将会更加促进和提高细胞的生存和蛋白的生产,并且将这些方法运用到工业生产中。

参 考 文 献

- [1] Boise LH, Postema CE. 1993, *Cell*, **74**(4):597-608.
 [2] Golstein P. 1997, *Science*, **275**(5303):1081-1082.
 [3] Emery AN, Al-Rubeai M. 1994, *Cytotechnology*, **15**(1-3):65-71.

- [4] Mercille S, Massie B. 1994, *Cytotechnology*, **15**(1-3):117-128.
 [5] Xie L, Wang DI. 1997, *Trends Biotechnol*, **15**(3):109-113.
 [6] Franek F, Dolnikova J. 1991, *Cytotechnology*, **7**(1):33-38.
 [7] Reed JC. 1994, *J Cell Biol*, **124**(1-2):1-6.
 [8] Murphy TC. 2001, *Biotechnol Bioeng*, **75**(6):621-629.
 [9] Kim NS, Lee GM. 2000, *Biotechnol Bioeng*, **71**:184-193.
 [10] Simpson NH, Milner AN, Al-Rubeai M. 1997, *Biotechnol Bioeng*, **54**:1-16.
 [11] Itoh Y, Ueda H, Suzuki E. 1995, *Biotechnol Bioeng*, **48**:118-122.
 [12] Gagliardini V, Lee RK. 1994, *Science*, **263**(5148):826-828.
 [13] Hockenbery DM, Oltvai AN. 1993, *Cell*, **75**(2):241-251.
 [14] Chen Y, Jones DP. 2001, *Toxicol Appl Pharmacol*, **170**(3):172-180.
 [15] Kohler c, Orrenius S. 2002, *J Immunol Methods*, **265**(1-2):97-110.

适体及其在流式细胞术检测中的应用*

杨明杰** 周建婧

(广东省疾病预防控制中心 广州 510300)

摘 要 适体是一种本质为 RNA 或 DNA 的小分子,它们能以配基形式像抗体一样与靶蛋白呈高亲和力特异性结合,可在一定程度上取代抗体用于检测和治疗。就适体筛选的指数富集配基系统进化技术原理、适体的优越性及其适体在流式细胞术检测中的应用进行了综述。

核酸不仅是遗传信息的载体,有的核酸分子还具有酶的作用,如 DNA 酶(DNAzyme)和 RNA 酶(Ribozyme)等,还有的核酸分子能以配基形式特异地与靶蛋白高亲和力结合,像抗体一样具有识别和调节靶蛋白功能的作用,这种核酸分子称为适配子(Ligands),亦被形象地称为适体(Aptamers)。1990年,Gold等^[1]报道了适体的筛选方法——指数富集配基系统进化(Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment, SELEX)技术,这一技术迅速得到广泛应用,近年更是倍受重视,不仅筛选出了凝血酶、HIV-1 衣壳蛋白、阿默茨病淀粉肽和微管蛋白等多种蛋白质的适体,还筛选出了与小肽、氨基酸、有机物、金属离子等特异结合的适体,不少报道还成功将适体用于诊断和治疗^[2,3]。本文就 SELEX 技术原理及其适体在流式细胞术检测中的应用进行了综述。

一、SELEX 技术原理及流程

SELEX 技术的基本原理如下:在一定条件下,一些单链小分子 DNA 或 RNA 可发生适应性折叠,形成有复杂空间结构的分子,以配基的形式,通过氢键、范德华力、疏水作用等特异地与靶分子高亲和力结合,这些核酸分子即“适体”。因此,先合成一个大容量随机核酸文库,并将其扩增并转化为单链 DNA 或 RNA 分子,在一定条件下与靶分子混合,然后洗去不与靶分子结合或结合力低的核酸分子,筛

* 基金项目:中国博士后基金(编号:2002031289)、广东省医学科学技术研究基金(编号:B2002006)资助课题。

** 通讯作者。E-mail: ymingjie@sohu.com
感谢杨杏芬、曾瑞萍教授的审校!

选出与靶分子结合力高的核酸分子,扩增后再进行上述筛选过程。经过反复筛选和扩增,大量富集与靶分子亲和力高的分子。并可通过克隆、测序明确这些核酸分子的结构特征^[1]。

SELEX 技术的基本过程如图 1 所示,(1)合成一个中间为随机序列、两侧为固定序列的核酸文库。中间随机序列长度一般为 20-40 个碱基,也有多达 80 个碱基者^[4],文库容量多在 10^{13} - 10^{15} 分子间^[2,5]。两侧固定序列用为 PCR 引物的识别序列,如筛选 RNA 适体,还应在 5' 端固定序列前加一段便于进行体外转录的 T7 启动子序列。并合成相应的 PCR 引物。(2)以该随机核酸文库为模板,经 PCR 扩增为双链 DNA,进一步转化成单链核酸。进行 DNA 适体筛选,可通过不对称 PCR 等方法将双

链 DNA 转化为单链 DNA;进行 RNA 适体筛选,则通过体外转录将双链 DNA 转化为 RNA。(3)单链核酸在一定 pH 值、盐离子浓度和温度等条件下,与蛋白质等靶分子反应,洗脱去除不与靶分子结合或结合力较低的核酸分子,进而分离出与靶分子结合力较高的核酸分子,通过 PCR 或 RT-PCR 扩增为双链 DNA,进一步用不对称 PCR 技术等将双链 DNA 转化成为单链 DNA 或体外转录成 RNA,用于再一次筛选。如此经过数轮至十余轮的筛选,获得与靶分子特异性高亲和力结合的核酸分子,即适体分子。(4)采用 PCR 或 RT-PCR 扩增筛选出的适体分子,将其克隆入质粒载体,挑选若干克隆测序,分析适体分子可能形成的空间结构及其特征,并进一步鉴定不同适体分子与靶分子亲和力。

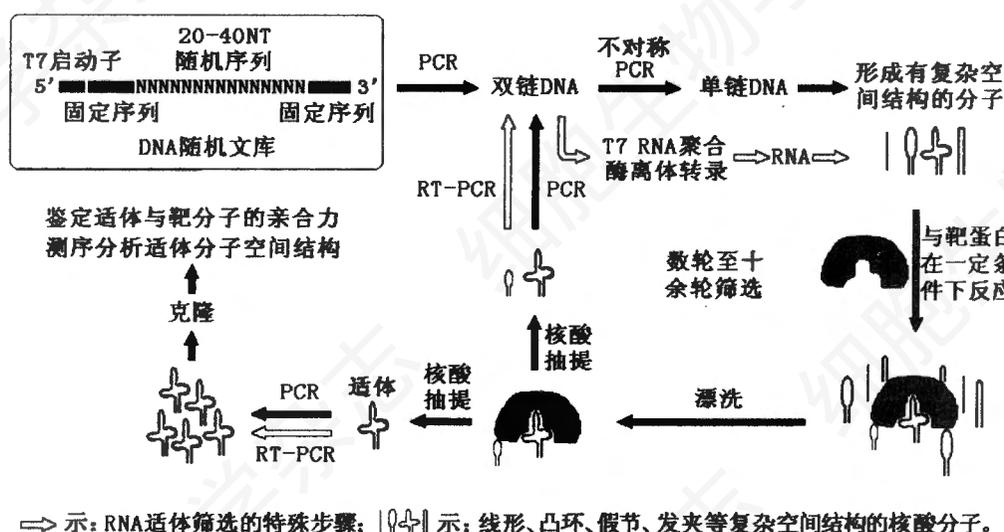


图 1 SELEX 技术基本过程图示

二、适体的优越性

适体作为一种识别分子,相对抗体而言具有较多优越性能,主要表现为以下方面:

1. 亲和力高

适体可形成发夹 (Hairpins)^[6]、凸环 (Stem-loop)^[7]、假节 (Pseudoknot)^[8] 和 G-四分体 (G-quadruplex)^[9] 等结构,以配基形式与靶分子结合,结合强度高,解离常数多在 pM - nM,有的甚至超过天然配基^[10]。

2. 特异性强

适体不仅能识别靶分子一个甲基或羟基的细微变化,还可区分旋光异构对映体,而且没有抗体 Fc

受体的非特异性结合问题^[10]。如茶碱与咖啡因在结构上非常相似,仅存在一个甲基的差异,用单抗检测茶碱与后者有交叉反应,而其特异适体与茶碱的亲和力比与咖啡因的亲和力高 10 000 倍,用以检测茶碱时无交叉反应^[11]。

3. 靶分子范围广

适体筛选的靶可以是金属离子、有机染料、神经递质、氨基酸、抗生素、辅因子、氨基糖苷、核苷碱基类似物、核苷和肽等小分子物质,也可以是酶、生长因子、抗体、基因转录调节因子、细胞黏附分子、植物血凝素等较大的蛋白质分子,还可是完整的病毒颗粒、细菌和红细胞等^[10,12]。相比之下,抗原性弱的蛋白很难获得其抗体,抗体的靶分子范围也窄得多。

4. 容易制备

虽然适体筛选要进行多轮洗脱和 PCR 扩增,但成功筛选到一个靶分子的适体只需 2-3 个月时间,获得适体的克隆后,通过 PCR 即可大量制备。而抗体筛选和制备至少 3-6 个月时间,其筛选和制备过程也较为繁琐。

5. 稳定性好

DNA 适体稳定性较好, RNA 适体在嘧啶戊糖 2 位引入氨基或氟后,能抵抗 RNA 酶降解,也有较好的稳定性,便于长期保存和运输。适体还可快速变性、复性,能反复使用^[3,10]。而抗体对温度较为敏感,需要低温运输,易发生不可逆变性。

6. 与靶分子的结合条件可调控

由于适体筛选是离体条件下进行的,可以根据实验需要设定筛选条件,从而实现适体与靶分子结合条件的调控。而抗体筛选是在在体或培养细胞条件下进行的,很难调控抗体与靶分子的结合条件。

7. 适体分子较小,易于通透细胞膜进入细胞内,可以检测细胞内的靶分子,应用更灵活方便^[2,3]。

三、适体在流式细胞术检测中的应用

流式细胞术(Flow cytometry, FCM)是借助流式细胞仪检测细胞等单分散颗粒的高通量细胞生物学分析方法,流式细胞术检测时常用荧光标记抗体进行染色,以获得细胞表面或胞质内蛋白质分子表达情况的信息,识别不同细胞亚群。尽管荧光标记抗体在流式细胞术检测中的广泛应用,极大地促进了流式细胞术的发展和拓展了流式细胞术的应用范围,但荧光标记抗体也存在一些自身的局限,如:(1)抗体制备生产较难,而且抗体容易变性,运输和保存成本较高,所以流式细胞术检测用的荧光抗体价格较为昂贵;(2)有的荧光标记抗体分子较大,难以穿过细胞膜与胞质的抗原分子结合;(3)有的抗体能与 Fc 受体非特异结合,影响流式细胞术检测结果的可靠性等^[13]。由于适体具有前述的优越性能,如果能以适体代替抗体用于流式细胞术检测,将有助于克服或弥补抗体所有的局限,有利于降低检测成本和提高检测的可靠性,促进流式细胞术检测的发展和推广应用。

1996 年 Davis 等^[13]首次报道了适体用于流式细胞术检测的研究,他们筛选到了与中性粒细胞弹性蛋白酶(Neutrophil elastase, HNE)高亲和力结合的 DNA 适体,发现荧光素(Fluorescein)标记的 DNA

适体能象抗 HNE 荧光标记抗体一样地有效检测 HNE 包被的微珠。并且发现荧光素标记的方式对检测敏感性有明显影响,荧光素通过乙二醇连接于 DNA 适体 5' 或 3' 端较荧光素直接连接于 DNA 适体 5' 或 3' 端的荧光信号强,甚至强于抗 HNE 荧光抗体的荧光信号。鉴于抗体多为双价或多价,他们还把两个 DNA 适体分子的 3' 端尾尾相连或一个分子的 5' 端与另一分子 3' 端头尾相连形成双价适体,发现双价适体与靶分子的亲和力提高了 10 倍。此外,他们还发现以生物素标记 DNA 适体后,再用藻红素(Phycoerythrin, PE)标记的链霉抗生素作间接标记也同样能检测 HNE 包被的微珠。证实了适体代替抗体用于流式细胞术检测的可行性。1998 年, Davis 等^[14]筛选了能特异识别 CD4 的 RNA 适体,并在 RNA 嘧啶戊糖 2 位以氟修饰达到增强其稳定性的目的。在适体 5' 端标记上生物素后再与荧光素或 PE 标记的链霉抗生素反应,所获得的间接荧光标记适体用于外周血 T 辅助细胞的流式细胞术检测均取得了满意结果,而且还成功地与其他荧光抗体(CD14、CD3)联合使用进行双色荧光流式细胞术检测。Blank 等^[15]采用流式细胞术检测了适体与靶细胞(YPEN-1 血管内皮细胞)结合情况,他们在适体筛选过程中,以 5' 端标记荧光素的引物 PCR 扩增每一轮的 DNA 适体,用此 PCR 产物对细胞进行荧光染色,上流式细胞仪检测,发现随着筛选轮数增加,适体与靶细胞的亲和力增加,细胞荧光强度也逐渐增强,并最后趋于稳定。他们的研究表明,不仅适体可象抗体一样用于流式细胞术检测,适体筛选中流式细胞术的应用也有利于获得适体与靶分子亲和力的信息。

四、展 望

抗体在流式细胞术检测中的应用已有 20 多年的历史,但有关适体的研究才开展 10 余年,适体在流式细胞术中应用的研究更是刚开始,不仅很多细胞表面标志分子的适体有待筛选,一些细胞表面分子虽已筛选到适体,但尚未开展应用于流式细胞术检测的研究,而且目前还没有商品化的适体试剂可供流式细胞术检测使用。最近,有学者提出了通过流式细胞术高通量筛选基于微珠的适体文库的构想,并建立了一整套行之有效的办法,为大量筛选流式细胞术用适体打下了良好基础^[16]。我国也有学者开展了应用 SELEX 技术筛选适体的研究,有报

道筛选了丙型肝炎病毒核心蛋白^[17]和炭疽芽孢^[18]等的适体。我们目前也正致力于筛选能特异识别网织红细胞的DNA适体,并拟将其以荧光标记后代替抗CD71荧光抗体,用于网织红细胞的流式细胞术检测相关研究。从适体所具有的优越性能,可以预见适体完全可能代替抗体或与抗体互为补充地应用于流式细胞术检测,适体筛选和适体在流式细胞术检测中的应用研究是很有价值的研究方向。

参 考 文 献

- [1] Tuerk C. and Gold L. 1990, *Science*, **249**: 505-510.
- [2] Clark S. L. and Remcho V. T. 2002, *Electrophoresis*, **23**: 1335-1340.
- [3] Cerchia L., et al., 2002, *FEBS Lett.*, **528**: 12-16.
- [4] Burke D. H. and Gold L. 1997, *Nucleic Acids Res.*, **25**: 2020-2024.
- [5] Marozzi A., et al., 1998, *J. Biotechnol.*, **61**: 117-128.
- [6] Darfeuille F., et al., 2002, *Biochemistry*, **41**: 12186-12192.
- [7] Lee J. H., et al., 2002, *Nucleic Acids Res.*, **30**: 5360-5368.
- [8] Chaloin L., et al., 2002, *Nucleic Acids Res.*, **30**: 4001-4008.
- [9] Wen J. D. and Gray D. M. 2002, *Biochemistry*, **41**: 11438-11448.
- [10] Jayasena S. D. 1999, *Clin. Chem.*, **45**: 1628-1650.
- [11] Jenison R. D., et al., 1994, *Science*, **263**: 1425-1429.
- [12] Morris K. N., et al., 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**(6):2902-2907.
- [13] Davis K. A., et al., 1996, *Nucleic Acids Res.*, **24**: 702-706.
- [14] Davis K. A., et al., 1998, *Nucleic Acids Res.*, **26**: 3915-3924.
- [15] Blank M., et al., 2001, *J. Biol. Chem.*, **276**: 16464-16468.
- [16] Yang X., et al., 2003, *Nucleic Acids Res.*, **31**: e54.
- [17] 詹利盛等, 2002, 中华微生物学和免疫学杂志, **22**: 578-581.
- [18] 甄蓓等, 2002, 生物化学与生物物理学报, **34**: 635-642.

十字花科作物转基因研究进展*

李春顺 陈利萍** 张明方

(浙江大学园艺系 杭州 310029)

摘 要 从转化受体、转化方法、转化频率、外源基因等方面对十字花科转基因研究进展进行了综述。并提出了当今十字花科转基因研究存在的问题。

十字花科(*Cruciferae*)植物包括许多重要的蔬菜、花卉、油料和饲料等作物,在人民生活及农业生产中有着重要的作用。培育十字花科作物的优良品种,满足社会生产和生活等各方面的需要,具有重大的理论和实践意义。迄今为止,利用常规育种技术来改良十字花科作物品种虽然取得了一定的成功^[1],但同时还存在着选育年限过长、远缘杂交不亲和以及有用亲本材料缺乏等问题,从而导致理想品种选育困难。植物转基因技术的兴起,为十字花科作物品种的改良和培育提供了一条新途径。它作为当代高效的育种辅助手段,解决了一些常规育种难以解决的问题,并取得了一定的成效。自1985年 Ooms^[2]获得了第一例十字花科转基因作物——甘蓝型油菜以来,十字花科植物转基因的研究引起了世界上包括中国在内的很多国家的科学家的关注。目前,利用十字花科植物的不同转化受体,通过直接转化或间接转化等不同方式,已经得到了拟南芥、甘

蓝型油菜、花椰菜、大白菜、甘蓝、羽衣甘蓝、芜菁等转基因植物。同时,在转化受体、转化方法、不同外源基因的导入以及转基因植物获得等方法研究上也取得了重大进展。现在已经获得的十字花科作物的抗病、抗虫、高产优质等材料有几十余份,有的已经进入田间试验。

本文将从从以下几个方面对十字花科植物转基因技术的研究进行简要综述,并对存在的问题及前景进行讨论。

一、十字花科植物转基因研究进展

1. 转化受体

*基金项目:浙江省自然科学基金(编号:302340)和省科技厅项目(编号:2003C32038)资助。

** 通讯作者。E-mail: chenliping@zju.edu.cn