

## 水生生物病原核酸适配体研究进展\*

# Advances in Study of Aptamers in Pathogens of Aquatic Organisms

周伶俐<sup>1</sup>,李鹏飞<sup>2</sup>,秦启伟<sup>3\*\*</sup>

ZHOU Lingli<sup>1</sup>,LI Pengfei<sup>2</sup>,QIN Qiwei<sup>3</sup>

(1. 湖南师范大学生命科学学院, 省部共建淡水鱼类发育生物学国家重点实验室, 湖南长沙 410006; 2. 广西科学院广西近海海洋环境科学重点实验室, 广西南宁 530007; 3. 华南农业大学海洋学院, 广东广州 510642)

(1. State Key Laboratory of Developmental Biology of Freshwater Fish, College of Life Science, Hunan Normal University, Changsha, Hunan, 410006, China; 2. Guangxi Key Laboratory of Marine Environmental Science, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China; 3. College of Marine Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong, 510642, China)

**摘要:**核酸适配体(Aptamer)是指利用指数富集配体系统进化(Systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)技术筛选得到的能特异性识别和结合靶标的 ssDNA 或 RNA 分子,具有高亲和力和高特异性的特点,在快速检测和靶向治疗方面应用广阔。近年来,水生生物细菌和病毒性病原疾病的频繁暴发,严重制约了水生态的健康以及水产养殖业的迅速发展。核酸适配体作为一种新型的识别分子,在水生生物病原的应用上也已取得了一些进展。本文对水生生物细菌和病毒性病原核酸适配体的筛选,及其在检测和治疗领域的研究现状进行综述,并对该领域核酸适配体技术的应用方向进行展望。

**关键词:**SELEX 核酸适配体 水生生物细菌 病毒性病原 快速检测

**中图分类号:**S942 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-9164(2018)01-0026-06

**Abstract:** Aptamers generated by selective evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) are short, single-stranded nucleic acid oligomers. They display a high degree of affinity and specificity for their targets, and widely used in rapid detection and targeted therapy study. In recent years, frequent outbreaks of aquatic bacterial and viral pathogenic diseases have severely restricted the health of aquatic ecosystems and the rapid development of aquaculture. As a new type of recognition molecule, aptamers have been applied in related study and acquired

some achievements. In this paper, the selection of aquatic bacterial and viral pathogen aptamers and their research status in the field of detection and treatment are reviewed, and the application prospects of aptamers in this field are prospected.

**Key words:** SELEX, aptamer, aquatic bacteria, viral pathogenic, aquatic

**收稿日期:**2017-12-06

**修回日期:**2018-01-08

**作者简介:**周伶俐(1989-),女,博士,主要从事水生经济动物病害防控技术研究。

\* 国家自然科学基金项目(41706145),广西自然科学基金项目(2017GXNSFBA198176)和广西科学院基本科研业务费项目(2017YJJ23002)资助。

\*\* 通信作者:秦启伟(1964-),男,教授,博士生导师,主要从事鱼类分子病毒学和海水高效健康养殖研究, E-mail: qinqw@scsio.ac.cn.

## 0 引言

核酸适配体(Aptamer)是通过指数富集配体系统进化(Systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)技术从体外人工合成的寡核苷酸文库中筛选得到的一种单链寡核苷酸序列(RNA 或 DNA),它可以形成特异性的二级结构和三级结构,通过结构互补或分子间作用力与靶标紧密结合<sup>[1]</sup>。适配体和其他治疗性的生物分子(例如抗体)相比具有很多优势<sup>[1-2]</sup>。自1990年,Tuerk和Elington等同时报道适配体以来,适配体的治疗潜力已经逐步显现,并且已经有应用于临床的适配体药物。默克的董事Bernhard Kirschbaum认为适配体将在下一代的治疗药物中起到非常关键的作用。适配体作为一种新型的识别分子,目前已发展成为一类广受关注的新型检测和治疗工具<sup>[3-4]</sup>。

丰富的水生生物是人类不可缺少的资源宝库,与人类的生存和发展关系极为密切。然而,近年来细菌性病原和病毒性病原等被广泛报道,这严重制约了人类对水生资源的挖掘和利用。基于核酸适配体在检测和治疗方面的优势,针对这些水生生物病原开发功能性的核酸适配体的研究也成为了病原性疾病治疗和病原检测领域的一大研究热点。本文综述了核酸适配体在水生生物病原研究中的研究进展,并展望核酸适配体在生态养殖和水产品安全领域的应用前景。

## 1 SELEX技术和核酸适配体

指数富集的配基系统进化(Systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)技术是一种生物文库技术,它利用人工合成的、容量约为 $10^{14} \sim 10^{15}$ 的随机寡核苷酸文库与靶物质结合,经过多轮筛选获得靶物质的单链DNA或RNA适配体(Aptamer)<sup>[1]</sup>。SELEX技术的出现,使得筛选能识别各种靶物质并能与靶物质有高亲和性、高特异性的寡核苷酸适配体成为可能<sup>[1,3]</sup>。这些筛选得到的适配体,开始在治疗与监测方面显示出其优势,并在临床治疗和检测方面,逐渐作为抗体试剂的代替或补充试剂<sup>[5]</sup>。由于适配体在众多领域内广泛的应用前景,SELEX技术自问世之日起就一直是各国学者的研究热点<sup>[6]</sup>。用于选择靶标特异性适配体的SELEX过程是一个通用过程,其特征在于重复5个主要步骤:结合、清洗、洗脱、扩增和正反链分离或RNA文库制备;然而任何靶标都没有标准的适配器选择流程<sup>[1]</sup>。SELEX设计和具体选择条件取决于靶标本身、寡核苷酸文库或所选择的适配体的所需特征和应用<sup>[1]</sup>。

利用SELEX技术筛选得到的、能特异性结合靶标的ssDNA或RNA分子,即核酸适配体。适配体可以通过自折叠形成更复杂而独特的立体结构,当靶分子存在的时候,适配体可以识别靶分子的结构位点,通过空间构型互补、氢键、碱基堆积和范德华力等,特异性识别和结合到靶标上<sup>[6-7]</sup>。适配体可结合的靶标种类非常广泛,包括无机和小有机分子、肽、蛋白质、碳水化合物和抗生素等单一靶标分子,以及混合物、全细胞、组织和生物体等复杂生物靶标<sup>[6]</sup>。在复杂靶标筛选情况下,最终的适配体库可能更复杂,这不仅取决于潜在的目标分子的数量和丰度,还取决于适配体的亲和力。在针对复杂混合物的大多数SELEX实验中,所选择的适配体是靶向细胞表面分子,通常是蛋白质,如针对由环境条件或疾病变化引起的细胞表面结构改变的适配体<sup>[7]</sup>。适配体可以区别靶标上非常细微的差别,甚至是一个碱基的差别<sup>[8]</sup>。

核酸适配体以其类似抗体的功能及诸多优于抗体的特点引起人们的广泛关注。除了可与抗体相媲美的靶标特异性和高亲和力以外,还有许多优于抗体的优势:(1)SELEX筛选适用于不同类别的靶标,包括金属离子、有机染料、蛋白、细胞、组织等,以及有毒靶分子和免疫原性弱的靶标分子,均可成功筛选到适配体;(2)SELEX过程也适用于非生理条件,不像抗体一样一定要在体内产生;(3)得到的适配体还可以根据应用需要进行修饰和进一步优化;(4)适配体可以通过化学合成,以高精度和重复性产生和纯化,生产成本较低,批次间差异小;(5)适配体作为一种核酸分子,稳定性比抗体高;(6)核酸适配体无明显毒性,这对于将其应用于动物或人类的疾病治疗是非常重要的;(7)核酸分子组织穿透能力强,易被细胞内化;(8)使用适配体作为治疗药物,可以容易地产生匹配的解毒剂,此特征有助于选择性地控制药物活性<sup>[5-8]</sup>。因此,核酸适配体作为新型识别分子逐渐在分析检测、药物治疗和生物标志物分子挖掘等方面,显示出能与抗体相竞争的潜力,具有广阔的应用前景。

## 2 水生生物病原相关核酸适配体的筛选

近年来,水产养殖业发展迅速,我国水产品每年总产量高达7~8千万吨,产值约8千亿元。然而,由病毒、细菌和寄生虫引起的水产病害暴发流行已经严重制约了水产养殖业的健康可持续发展,每年因为病害暴发造成的经济损失超过百亿元之巨。然而,目前仍未研发出有效的病害防治办法。核酸适配体是一种新型的识别分子,目前已发展成为一种备受关注的

新型检测和治疗工具,广泛应用于生物医学、蛋白质科学、纳米材料及疾病诊断等各研究领域,但在水产病害领域的检测和治疗的研究还比较少。目前已成功筛选到特异性核酸适配体的水生生物病原有病毒性出血性败血症病毒(Viral hemorrhagic septicemia virus, VHSV)<sup>[9]</sup>,牙鲆弹状病毒(Hirame rhabdovirus virus, HIRRV)<sup>[10]</sup>,中华鳖虹彩病毒(Soft-shelled turtle iridovirus, STIV)<sup>[11]</sup>,新加坡石斑鱼虹彩病毒(Singapore grouper iridovirus, SGIV)<sup>[12]</sup>,赤点石斑鱼神经坏死症病毒(Red spotted grouper nervous necrosis virus, RGNNV)<sup>[13]</sup>,鲤春病毒血症病毒(Spring viremia of carp virus, SVCV)<sup>[14]</sup>,副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)<sup>[15]</sup>,溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)<sup>[16]</sup>,哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)<sup>[17]</sup>,鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)<sup>[18]</sup>和嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)<sup>[19]</sup>。

## 2.1 全病毒-指数富集的配基系统进化技术(Whole virus-SELEX)筛选到的核酸适配体

利用纯化的病毒粒子构建 SELEX 系统,可筛选到以高亲和力特异性识别该病毒的核酸适配体。目前,已经运用全病毒-指数富集的配基系统进化技术(Whole virus-SELEX)筛选到了 VHSV 和 HIRRV 的 RNA 适配体,及 STIV、SGIV 和 SVCV 的 ssDNA 适配体。

VHSV 可引起一种严重的鱼类全身性疾病——病毒性出血性败血症<sup>[9]</sup>。目前,VHSV 已经在欧洲、北美和日本的多种野生和海洋养殖鱼类中检测到<sup>[9]</sup>。2012年,Punnarak 等<sup>[9]</sup>以纯化的 VHSV 作为 SELEX 筛选靶标,从  $5 \times 10^{16}$  库容量的 RNA 文库中,经过 6 轮 whole virus-SELEX 筛选,得到 3 条能特异性识别和结合 VHSV 的 RNA 适配体(F1、F2 和 C6),凝胶迁移或电泳迁移率实验(Electrophoretic mobility shift assay, EMSA)分析证实这些 RNA 适配体不仅可以特异性结合和识别作为靶标的 VHSV,还能识别其他几株 VHSV,而不结合锦鲤疱疹病毒(Koi herpesvirus, KHV)和神经坏死症病毒(Nervous necrosis virus, NNV)。Punnarak 等<sup>[9]</sup>还利用质粒 pHSR2 和光养的海洋细菌 *Rhodovulum sulfidophilum* DSM 1374<sup>T</sup>制备了 RNA 适配体用于实验。这是首次将核酸适配体应用到水生病原研究中。

HIRRV 是在日本、韩国和中国等地引起淡、海水鱼类病害发生的主要病原之一,其感染的主要临床症状是败血症,表现为内脏严重出血<sup>[10]</sup>。Hwang

等<sup>[10]</sup>以纯化的 HIRRV 为靶标,经过 9 轮筛选,从  $5 \times 10^{16}$  库容量的 RNA 文库(40 bp 随机序列,两端分别为 15 bp 和 20 bp 的固定序列,5'端磷酸化修饰)中,筛选得到了 4 条 RNA 适配体(H1、H2、H3 和 H4)。与 Punnarak 等<sup>[9]</sup>的研究类似,Hwang 等<sup>[10]</sup>也运用 EMSA 验证了得到的适配体与靶标 HIRRV 的特异性结合,并用 Punnarak 等<sup>[9]</sup>的方法将质粒 pHSR2 转化到海洋细菌 *Rhodovulum sulfidophilum* DSM 1374<sup>T</sup>中得到了目标适配体。

SGIV 是一种高致病性的虹彩病毒,其致死率可高达 90% 以上。病毒颗粒单个的病毒粒子是正二十面体,直径约为 154~176 nmol/L<sup>[12]</sup>。Li 等<sup>[12]</sup>以纯化的 SGIV 为靶标构建 whole virus-SELEX 筛选体系,从初始随机 ssDNA 文库(50 bp 随机序列,两端分别为 23 bp 和 22 bp 的固定序列)中,得到 6 条特异性识别和结合 SGIV 的核酸适配体 LMB-755、LMB-439、LMB-748、LMB-761、LMB-764 和 LMB-767。体外细胞毒性测定和体内组织毒性观察均表明,这些适配体没有明显毒性。

STIV 是近年来暴发和流行的中华鳖等“红脖子病”的病原,严重影响中华鳖养殖业的发展,引起广泛的关注<sup>[11]</sup>。Li 等<sup>[11]</sup>以 STIV 为靶标的反复多轮 whole virus-SELEX 筛选监测发现,第 8 轮富集文库达到最高的靶标亲和力,从该轮 ssDNA 文库中通过聚类分析最终得到 4 条 DNA 适配体序列(QA-9、QA-12、QA-36 和 QA-92),经 EMSA 验证和以 FITC 荧光标记的适配体的荧光共定位验证,确定这些适配体可以和 STIV 很好地结合。QA-9、QA-12、QA-36 和 QA-92 与 STIV 的结合力在纳摩尔水平, $K_d$  值在 54~81 nmol/L。

## 2.2 蛋白-指数富集的配基系统进化技术(Protein-SELEX)筛选到的核酸适配体

赤点神经坏死症病毒(Red-spotted nervous necrosis virus, RGNNV)是最具破坏性的海水鱼类病原之一,对苗种生产期的仔鱼和幼鱼危害很大,会引起鱼类中枢神经组织脑和视网膜细胞空泡化,严重者可导致一周内鱼苗死亡率高达 100%<sup>[13]</sup>。RGNNV 衣壳蛋白(Coat protein, CP)是病毒粒子唯一的结构蛋白,它在确定病毒的宿主范围、病毒感染和复制方面非常重要,可作为抗病毒治疗的理想靶标。因此,Zhou 等<sup>[13]</sup>运用原核表达的 CP 构建 Protein-SELEX,经过 11 轮筛选,最终得到了特异性识别和结合 CP 及 RGNNV 的特异性适配体 A5、A10 和 B11,3 条适配体的亲和力均可达到纳摩尔级别( $K_d$  值为 4~12 nmol/L)。且 CP 的适配体和抗体可以竞争性地

结合 CP 表面的位点。这些适配体在体内外均无明显毒性,且可随病毒粒子特异性进入感染的细胞中。

### 2.3 病毒感染细胞-指数富集的配基系统进化技术 (Virus-infected Cell-SELEX) 筛选到的核酸适配体

当细胞被病毒感染后,细胞表面会出现病毒蛋白或被病毒修饰的宿主蛋白<sup>[20]</sup>。这些修饰和改变是识别病毒感染细胞和开发抗病毒治疗药物的重要生物标志物<sup>[21]</sup>。然而,用于特定病毒感染的已知生物标志物仍然非常有限。而针对病毒感染细胞的 Cell-SELEX 可用于开发以特异性结合病毒感染期间发生修饰的蛋白质或生物标志物为靶标的核酸适配体<sup>[20]</sup>。而且,来自 Cell-SELEX 的适配体还可用于药物递送,如 Chu 等<sup>[22]</sup>报道了一种“aptamer-siRNA 缀合物”可作为抑制 HIV-1 的细胞特异性递送系统。海洋鱼类病毒性疾病发病急、传染快、流行时间长,且死亡率高,急需鉴定一批新的可用的生物标志物,开发新的检测治疗手段。通过 Cell-SELEX 筛选针对海洋鱼类病毒感染细胞的核酸适配体具有重要意义。目前,该类研究还很匮乏,只有 Li 等<sup>[23]</sup>报道了针对 SGIV 感染的石斑鱼脾脏细胞 (Grouper spleen, GS) 的 4 条核酸适配体 (Q2、Q3、Q4、Q5)。通过 Cell-SELEX 筛选到的适配体 Q2、Q3、Q4 和 Q5 不仅可识别和结合 SGIV 感染的细胞,还可识别该病毒感染的石斑鱼组织,结合亲和力高 ( $K_d$  低至 12~26 nmol/L),对 SGIV 感染的其他细胞也有很好的识别作用。适配体 Q2 的靶标位点是脂类或者对胰酶不敏感的蛋白等,而 Q3、Q4 和 Q5 在细胞膜上的靶位点是膜蛋白或膜蛋白相关结构。适配体 Q2 还可以特异性地主动内吞进入到细胞内,定位于细胞核和装配体周围。这些识别和结合病毒感染细胞的核酸适配体在靶向治疗和生物标志物发现方面都有很好的应用潜力<sup>[23]</sup>。

### 2.4 细菌-指数富集的配基系统进化技术 (Bacteria-SELEX) 筛选到的核酸适配体

对特异性识别和结合细菌的核酸适配体的筛选,主要是通过 Bacteria-SELEX 筛选系统,以处在某一固定生长期的细胞作为靶标,以其他病原菌作为反筛靶标核阴性对照,反复多轮筛选得到。筛选到的适配体与目标菌的特异性结合主要运用荧光标记的适配体和细菌结合后,通过电镜观察和流式细胞荧光技术来确定。目前已报道的成功筛选到特异性适配体的水生病原菌有哈维氏弧菌、溶藻弧菌、副溶血弧菌、鼠伤寒沙门氏菌和嗜水气单胞菌<sup>[15-19]</sup>。这些核酸适配体具有发展新型的病原快速检测技术的潜力<sup>[15-19]</sup>。

哈维氏弧菌、溶藻弧菌和副溶血弧菌等弧菌是海

洋和河口环境中广泛存在的病原菌,对很多鱼类和贻贝类有致病性,也是水产养殖中的重要条件致病菌,能引发多种水产动物发病死亡,给水产养殖业造成巨大的经济损失<sup>[17]</sup>。郑江等<sup>[17]</sup>经过 15 轮的 Bacteria-SELEX 循环,以哈维氏弧菌从 ssDNA 随机文库中筛选到 5 条可用的核酸适配体序列 (S1、S25、S26、S27、S35),这些适配体与哈维氏弧菌的亲合常数  $K_d$  值为 13~45 nmol/L。Duan 等<sup>[24]</sup>报道了以对数期的副溶血弧菌 ATCC 17802 为靶标,筛选到的 ssDNA 核酸适配体 A1P 和 A3P 与副溶血弧菌的特异性结合的亲和力达到纳摩尔水平,测定的  $K_d$  值均在 20 nmol/L 左右。之后,Duan 等<sup>[25]</sup>又报道了 2 个可用于表面增强拉曼散射传感系统的副溶血弧菌的 ssDNA 核酸适配体 APT1 和 APT2。嗜水气单胞菌在自然界分布广泛,是多种水生动物的原发性致病菌,对水产动物、畜禽和人类均有致病性,可引起多种动物的败血症和人类腹泻,给人类健康带来威胁,同时也给养殖业造成较大的经济损失<sup>[19]</sup>。李元跃等<sup>[19]</sup>通过 12 轮 Bacteria-SELEX 筛选,获得了特异性识别嗜水气单胞菌的 3 类核酸适配体,这 3 类适配体的长度和茎环的位置不同。

## 3 基于核酸适配体的水生生物病原检测方法研究

目前国际上对海洋或淡水病原的检测主要是通过宿主动物(如鱼类)的发病症状、组织病理、分子生物学和免疫学的诊断、病原培养和分离等方法。这些方法都各有优点,但在实际运用中多存在耗时长、操作繁琐、仪器平台要求高和稳定性差等诸多不足,尤其不适应于发病现场的快速诊断。故急需开发出一种操作简便、快速灵敏的检测方法用于水生生物临床快速检测。核酸适配体可以特异性地识别和结合到靶标分子,类似抗体。但是与抗体相比,又有很多优势。因此,适配体作为新型识别分子逐渐在分析检测方面显示出能与抗体相竞争的潜力,具有广阔的应用前景。在前面所述的水生动物病原核酸适配体中,已有一些核酸适配体被报道用于建立病原的检测系统中,包括核酸适配体免疫吸附测定 (Enzyme-linked apta-sorbent assay, ELASA)<sup>[26-27]</sup>,核酸适配体缀合的量子点 (Aptamer-QD) 或纳米金作为识别元件的检测方法<sup>[28]</sup>。

### 3.1 基于核酸适配体的 ELASA 检测方法

核酸适配体与抗体相比,尺寸较小,易于修饰,生产成本低,可针对各种靶分子产生。核酸适配体替代抗体在酶联免疫吸附测定 (Enzyme-linked immu-

nosorbent assay, ELISA)中的应用,称为适配体免疫吸附测定(Enzyme-linked apta-sorbent assay, ELASA)。Li 等<sup>[26]</sup>运用针对 SGIV 感染的细胞的核酸适配体 Q3,开发了基于核酸适配体的 ELASA 检测方法,可实现对 SGIV 感染细胞和被 SGIV 感染的野外鱼样品组织的 SGIV 检测。该检测方法灵敏度高,当病毒感染的细胞数目低至  $2 \times 10^4$  时,以及与病毒感染细胞结合时间短至 1 min 时,仍可检测到 SGIV 的感染<sup>[26]</sup>。Zhou 等<sup>[27]</sup>利用特异性结合 CP 的核酸适配体 A10,开发了用于 RGNNV 精确快速诊断的 sandwich ELASA 方法,该方法在病毒感染的细胞数目低至  $4 \times 10^3$  时,以及孵育时间短至 10 min 时,均可检测到 RGNNV 感染。这两种 ELASA 方法与 PCR 方法相比,对组织样品的检测结果基本一致,而 ELASA 方法操作简便快捷、稳定性强<sup>[27]</sup>。

### 3.2 适配体缀合物作为识别元件的检测方法

核酸适配体一旦在体外筛选得到,即可以通过体外化学合成获得,并且在化学合成的过程中比较容易进行修饰。因此,很多研究中,将修饰的核酸适配体缀合到某些物质上作为新的识别元件构建检测系统。

量子点(Quantitative dots, QDs)是一种半导体纳米晶体,具有独特的光学性质,在窄发光谱上有宽吸收、高量子产率、荧光不易漂白和耐化学降解等优点。Duan 等<sup>[28]</sup>将副溶血弧菌和鼠伤寒沙门氏菌的特异性核酸适配体 apt1 和 apt2 的 5'端带上  $\text{NH}_2$ ,并将适配体共价结合到量子点表面构成新的荧光探针,以这种适配体修饰的量子点(Aptamer-modified QDs, Aptamer-QD)作为流式细胞仪检测的识别元件,从而获得了能分别同时检测副溶血弧菌和鼠伤寒沙门氏菌的高灵敏、特异性的病原检测方法。该检测方法的检测限是  $5 \times 10^3 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$  细菌细胞,重复性好。

表面增强的拉曼散射(Surface-enhanced Raman scattering, SERS)是一种功能强大的痕量检测工具,以特异性的核酸适配体作为捕获和固定待测物的功能元件,形成基于适配体的 SERS 微流控芯片,可用于对病原菌等的检测。Duan 等<sup>[25]</sup>将副溶血弧菌的一条核酸适配体 apt 1 固定到纳米金颗粒表面,花青染料 3(Cy3)修饰的另一条适配体 apt 2 用于拉曼信号强度检测,当待测物存在时,构建  $\text{SiO}_2@ \text{Au-apt 1-测定目标物-apt 2-Cy3}$  三明治复合物,该检测方法对副溶血弧菌的检测线性区间在  $10 \sim 10^6 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,检测限为  $10 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

## 4 核酸适配体对病原的抑制作用

核酸适配体可折叠成不同的二级或三级结构,通

过氢键、碱基堆积、范德华力和分子识别等方式结合到各种各样的靶标,包括小分子化合物、蛋白质、病毒和全细胞,并干扰目标靶标功能<sup>[29]</sup>。因此,已筛选到的细菌和病毒性病原的核酸适配体会具有一定程度的抗病毒功能,可以作为潜在的抗细菌或抗病毒制剂。

在已经筛选出的水生生物特异性适配体中,能够特异性结合 VHSV、HIRRV、STIV、SGIV、RGNNV 和 SVCV,以及特异性识别和结合 SGIV 感染的 GS 细胞的核酸适配体,均具有阻止病毒侵染宿主细胞的能力,并且,大多数核酸适配体对病原的抑制是一种剂量依赖性的方式(HIRRV 的特异性核酸适配体 H3 不呈现剂量依赖方式)<sup>[9-19]</sup>。其中,HIRRV 的特异性核酸适配体 H1、H2、H3 和 H4,及 SVCV 的特异性核酸适配体 A2 和 A15,在细胞水平证明了可以抑制病毒对宿主细胞的侵袭<sup>[10,14]</sup>。VHSV、STIV、SGIV 和 RGNNV 的特异性核酸适配体在体内外抗病毒研究中,均呈现阻止病毒进入细胞和抑制病毒复制的功能<sup>[11-13,30]</sup>。考虑到核酸适配体的强靶标特异性和无毒性,这些病原的特异性核酸适配体对水生生物病原性疾病的防御具有重大意义,有广阔的应用前景。

## 5 面临的挑战和展望

核酸适配体由于对靶标的高亲和力和高特异性作用,在快速检测和靶向治疗方面应用广阔。在水生生物病原的应用上也已取得了一些进展,筛选到多种高致病性、高死亡率的病原的特异性核酸适配体,其中一些核酸适配体已经用于开发高效、稳定的病原检测方法,一些适配体也呈现出对目标病原的治疗潜力。但是在水生生物病原中,核酸适配体的研究仍处于起步阶段,可用的核酸适配体资源还非常匮乏。因此,急需筛选出一批新的特异性核酸适配体,为病原的检测和防御提供基础。另外,在人类病原研究中,往往会利用适配体的靶标特异性,将其作为药物的靶向载体运用到小分子药物递载中,实现对病原性疾病的治疗<sup>[30]</sup>。化学领域已开发出很多灵敏高效的传感器模型,结合适配体的高特异性,可开发出更多的适配体传感器。另外,在水生病原实际应用中,还存在一个病原感染快、发病急的特点,需要更快速、更适应临床现场检测的便捷检测方法<sup>[31]</sup>。由此,特异性的核酸适配体在靶向治疗、适配体传感器检测、现场快速检测试剂盒方面的研究,将是海洋生物病原核酸适配体研究的重要内容。

已发表的适配体在应用上也存在两个限制,一个

是每次筛选都要对 SELEX 筛选条件进行摸索, 筛选流程相对比较耗时; 另一个是核酸适配体本质上是一条核酸分子, 容易被核酸酶等分解, 因此在生物体中相对不稳定。因此需要通过修改 SELEX 条件和修饰适配体分子来克服这些缺点<sup>[1,3-5]</sup>。目前已经开发了不同的策略来克服这个问题, 例如化学改性可显著提高核酸适配体的稳定性。虽然适配体存在一些局限性, 但是基于其相对其他识别分子的优势, 在检测和治疗方面依然很有潜力<sup>[1,29]</sup>。尤其在分子标志物匮乏的水生生物病原性疾病中, 基于适配体的检测治疗方法是理想的方法之一<sup>[4]</sup>。

参考文献:

[1] STOLTENBURG R, REINEMANN C, STREHLITZ B. SELEX-A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands[J]. *Biomolecular Engineering*, 2007, 24:381-403.

[2] SONG S P, WANG L H, LI J, et al. Aptamer-based biosensors [J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2008, 27(2):108-117.

[3] GOPINATH S C B. Methods developed for SELEX[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2007, 387(1):171-182.

[4] TAN W H, DONOVAN M J, JIANG J H. Aptamers from cell-based selection for bioanalytical applications [J]. *Chemical Reviews*, 2013, 113:2842-2862.

[5] DARMOSTUK M, RIMPELOVÁ S, GBELCOVÁ H, et al. Current approaches in SELEX: An update to aptamer selection technology[J]. *Biotechnology Advances*, 2015, 33:1141-1161.

[6] BURGSTALLER P, GIROD A, BLIND M. Aptamers as tools for target prioritization and lead identification[J]. *Drug Discovery Today*, 2002, 7(24):1221-1228.

[7] 邵宁生, 李少华, 黄燕苹. SELEX 技术及 Aptamer 研究的新进展[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2006, 33(4):329-335.

SHAO N S, LI S H, HUANG Y P. Advances in the SELEX technique and aptamers [J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2006, 33(4):329-335.

[8] CHEN L, RASHID F, SHAH A, et al. The isolation of an RNA aptamer targeting to p53 protein with single amino acid mutation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(32):10002-10007.

[9] PUNNARAK P, SANTOS M D, HWANG S D, et al. RNA aptamers inhibit the growth of the fish pathogen viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV)[J]. *Marine Biotechnology*, 2012, 14(6):752-761.

[10] HWANG S D, MIDORIKAWA N, PUNNARAK P, et al. Inhibition of hirame rhabdovirus growth by RNA aptamers[J]. *J Fish Dis*, 2012, 35(12):927-934.

[11] LI P F, ZHOU L L, YU Y P, et al. Characterization of DNA aptamers generated against the soft-shelled turtle iridovirus with antiviral effects [J]. *BMC Vet Res*, 2015, 11:245-255.

[12] LI P F, YAN Y, WEI S N, et al. Isolation and characterization of a new class of DNA aptamers specific binding to Singapore grouper iridovirus (SGIV) with antiviral activities[J]. *Virus Research*, 2014, 188:146-154.

[13] ZHOU L L, LI P F, YANG M, et al. Generation and characterization of novel DNA aptamers against coat protein of grouper nervous necrosis virus (GNNV) with antiviral activities and delivery potential in grouper cells[J]. *Antiviral Research*, 2016, 129:104-114.

[14] 于力, 王津津, 卢奕良, 等. 鲤春病毒血症病毒核酸适配体的筛选及分析[J]. *中国动物检疫*, 2017, 34(2):101-105.

YU L, WANG J J, LU Y L, et al. Selection and analysis on aptamers against spring viremia of carp virus[J]. *China Animal Health Inspection*, 2017, 34(2):101-105.

[15] TANG X M, ZHENG J, YAN Q P, et al. Selection of aptamers against inactive *Vibrio alginolyticus* and application in a qualitative detection assay[J]. *Biotechnol Letters*, 2013, 35(6):909-914.

[16] ZHENG J, TANG X M, WU R X, et al. Identification and characteristics of aptamers against inactivated *Vibrio alginolyticus* [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2015, 64(2):1138-1142.

[17] 郑江, 郝聚敏, 宋林生, 等. 哈维氏弧菌适配子的 SELEX 筛选及其亲和和特异性研究[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2014, 41(7):704-711.

ZHENG J, HAO J M, SONG L S, et al. Selection and characterization of aptamers against *Vibrio harveyi* by SELEX[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2014, 41(7):704-711.

[18] DUAN N, WU S J, YU Y, et al. A dual-color flow cytometry protocol for the simultaneous detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Salmonella typhimurium* using aptamer conjugated quantum dots as labels[J]. *Anal Chim Acta*, 2013, 804:151-158.

[19] 李元跃, 王雷, 陈融斌, 等. SELEX 筛选嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 适体方法的建立[J]. *海洋与湖沼*, 2012, 43(2):318-322.

LI Y Y, WANG L, CHEN R B, et al. Establishment of SELEX technique for screening aptamer for *Aeromonas hydrophila* [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2012, 43(2):318-322.

[20] TANG Z W, PAREKH P, TURNER P, et al. Generating aptamers for recognition of virus-infected cells[J]. *Clinical Chemistry*, 2009, 55(4):813-822.

[21] GUO K T, ZIEMER G, PAUL A, et al. CELL-SELEX: Novel perspectives of aptamer-based therapeutics[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2008, 9:668-678.

[22] CHU T C, TWU K Y, ELLINGTON A D, et al. Aptamer mediated siRNA delivery[J]. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34(10):e73.

(下转第 35 页 Continue on page 35)

scene[J]. J Clin Invest, 2001, 107(1): 21-22.

[8] STOKA V, TURK B, SCHENDEL S L, et al. Lysosomal protease pathways to apoptosis: Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2001, 276: 3149-3157.

[9] CIRMAN T, ORESIC K, MAZOVEC G D, et al. Selective disruption of lysosomes in HeLa cells triggers apoptosis mediated by cleavage of bid by multiple papain-like lysosomal cathepsins [J]. J Biol Chem, 2004, 279(5): 3578-3587.

[10] DAUTIGNY A, PRAGER E M, PHAM-DINH D, et al. CDNA and amino acid sequences of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) lysozymes and their implications for the evolution of lysozyme and lactalbumin[J]. J Mol Evol, 1991, 32(2): 187-198.

[11] MITRA A, FOSTER-FREY J, REXROAD C E, et al. Molecular characterization of lysozyme type II gene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Evidence of gene duplication[J]. Anim Biotechnol, 2003, 14(1): 7-12.

[12] HIKIMA J, HIRONO I, AOKI T S. Characterization and expression of c-type lysozyme cDNA from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Mol Mar Biol Biotechnol, 1997, 6(4): 339-344.

[13] WEI S N, HUANG Y H, CAI J, et al. Molecular cloning and characterization of c-type lysozyme gene in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2012, 33(2): 186-196.

[14] HIKIMA J, MINAGAWA S, HIRONO I, et al. Molecular cloning, expression and evolution of the Japanese flounder goose-type lysozyme gene, and the lytic activity of its recombinant protein [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2001, 1520(1): 35-44.

[15] YIN Z X, HE J G, DENG W X, et al. Molecular clo-

ning, expression of orange-spotted grouper goose-type lysozyme cDNA, and lytic activity of its recombinant protein [J]. Dis Aquat Organ, 2003, 55(2): 117-123.

[16] WEI S N, HUANG Y H, HUANG X H, et al. Molecular cloning and characterization of a new G-type lysozyme gene (Ec-lysG) in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides* [J]. Dev Comp Immunol, 2014, 46(2): 401-412.

[17] WHANG I, DE ZOYSA M, NIKAPITIYA C, et al. Molecular characterization and expression analysis of cathepsin B and L cysteine proteases from rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) [J]. Fish and Shellfish Immunology, 2011, 30(3): 763-772.

[18] WEI S N, HUANG Y H, HUANG X H, et al. Characterization of cathepsin B gene from orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides* involved in SGIV infection [J]. Fish Shellfish Immunol, 2014, 36(1): 194-205.

[19] MINAGAWA S, HIKIMA J, HIRONO I, et al. Expression of Japanese flounder c-type lysozyme cDNA in insect cells [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2001, 25: 439-445.

[20] GUICCIARDI M E, DEUSSING J, MIYOSHI H, et al. Cathepsin B contributes to TNF- $\alpha$ -mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome C [J]. Journal of Clinical Investigation, 2000, 106(9): 1127-1137.

[21] GUICCIARDI M E, MIYOSHI H, BRONK S F, et al. Cathepsin B knockout mice are resistant to tumor necrosis factor- $\alpha$ -mediated hepatocyte apoptosis and liver injury [J]. The American Journal of Pathology, 2001, 159(6): 2045-2054.

(责任编辑: 陆雁)

(上接第 31 页 Continue from page 31)

[23] LI P F, WEI S N, ZHOU L L, et al. Selection and characterization of novel DNA aptamers specifically recognized by Singapore grouper iridovirus-infected fish cells [J]. Journal of General Virology, 2015, 96(11): 3348-3359.

[24] DUAN N, WU S J, CHEN X J, et al. Selection and identification of a DNA aptamer targeted to *Vibrio parahemolyticus* [J]. J Agric Food Chem, 2012, 60(16): 4034-4038.

[25] DUAN N, YAN Y L, WU S J, et al. *Vibrio parahae - molyticus* detection aptasensor using surface-enhanced Raman scattering [J]. Food Control, 2016, 63: 122-127.

[26] LI P F, ZHOU L L, WEI J G, et al. Development and characterization of aptamer-based enzyme-linked aptasorbent assay for the detection of Singapore grouper iridovirus infection [J]. J Appl Microbiol, 2016, 121(3): 634-643.

[27] ZHOU L, LI P, NI S, et al. Rapid and sensitive detection of redspotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV) infection by aptamer-coat protein-aptamer

sandwich enzyme-linked apta-sorbent assay (ELASA) [J]. Journal of Fish Diseases, 2017, 40(12): 1831-1838.

[28] DUAN N, WU S J, YU Y, et al. A dual-color flow cytometry protocol for the simultaneous detection of *Vibrio parahemolyticus* and *Salmonella typhimurium* using aptamer conjugated quantum dots as labels [J]. Anal Chim Acta, 2013, 804: 151-158.

[29] BUNKA D H J, STOCKLEY P G. Aptamers come of age- At last [J]. Nature Reviews Microbiology, 2006, 4(8): 588-596.

[30] CHU T C, TWU K Y, ELLINGTON A D, et al. Aptamer mediated siRNA delivery [J]. Nucleic Acids Research, 2006, 34(10): e73.

[31] BAGALKOT V, ZHANG L F, LEVY-NISSENBAUM E, et al. Quantum dot-aptamer conjugates for synchronous cancer imaging, therapy, and sensing of drug delivery based on bi-fluorescence resonance energy transfer [J]. Nano Letters, 2007, 7(10): 3065-3070.

(责任编辑: 陆雁)