维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)06-0841-04

H22 肿瘤细胞 aptamer 的筛选与结构分析

周宇凡[1],张桂梅[2],冯作化[2],袁 野[2],张志仁[2]

(1.重庆医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室,重庆 400016;
2.华中科技大学同济医学院生物化学与分子生物学教研室,武汉 430030)

【摘 要】目的:获得与 H22 肿瘤细胞特异性结合的 aptamer。方法:利用 SELEX 技术,以小鼠 DC 细胞为反筛选细胞,以 H22 肿瘤细胞为靶细胞,从体外合成的 80bp 随机单链 DNA 文库中筛选出能与 H22 肿瘤细胞特异结合的 aptamer。采用荧光标记引物法检测 aptamer 与 H22 肿瘤细胞的亲和力。所获得的 aptamer 采用 MACAW v2.05 软件进行 aptamer 序列的一级结构同源序列比较,用 DNASIS v2.5 软件计算分析序列最低二级结构能量值,获得其二级结构模拟图。结果:本实验设计的文库序列:5′-CGTCGCTGCACATTCCG-N46-CGCACAGCTGGGA GTAC-3′ 具有较高的扩增效率,适合于 aptamer 与以细胞为靶物质的筛选。经过 11 轮循环筛选,随机单链 DNA 文库与靶细胞结合的荧光强度从 1%上升到 59%,结合曲线进入平台期,表明结合已基本处于稳定状态,因此可以判断 aptamer 与靶细胞的结合基本已经处于饱和状态。对所获得的 32 个 aptamer 进行测序,然后进行一级结构和二级结构分析。一级结构分析获得 5 个保守序列:AGGGA、AGAAGG、GTGAXAA、ATAGT、CAAGG, 其余 10 个 aptamer 无同源序列。二级结构分析表明,aptamer 形成的茎环、凸环结构可能是与 H22 肿瘤细胞特异性结合的结构基础。亲和力检测结果表明第 24 号 aptamer 具有最强的亲和力。结论:利用随机单链寡核苷酸文库成功获得与 H22 肿瘤细胞特异结合的 aptamer,其一级和二级结构与亲和力密切相关。

【关键词】H22 肿瘤细胞;SELEX;Aptamer
【中国图书分类法分类号】Q78 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-11-04

Screening, cloning and structure analysis of aptamer binding to H22 tumor cells

ZHOU Yufan, et al

(*Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To obtain the single-stranded DNA aptamer that specially binds H22 tumor cells. *Methods*: H22 tumor cells were acted as target and rat DC cells were acted as counter-target by using the process of systematic evolution of ligands by exponential enrichment, which was abbreviated as SELEX. Aptamer that specially bind H22 cancer cells were selected in vitro from 80bp random single-stranded DNA library. Aptamer affinity with H22 cancer cell was detected by the fluorescence-labeled primers method. The acquired aptamer was analyzed its primary structure isogenetic sequence comparisonby MACAW v2.05 software, and was predicted its secondary structure by using DNASIS v2.5 Software. *Results*: Library for this experiment 5′ - CGTCGCTGCACATTCCG - (46N)- CG-CACAGCTGGGAGTAC -3′ had a higher PCR amplification efficacy, was fit for the selection which act cell as target. After 11 cycles selection, fluorescence intensity of random single-stranded DNA binding with target cells was changed from 1% to 59%, binding curve entered platform stage, i.e., binding level was steady state, the binding that aptamer with target cells was in saturation state. There were 5 conserved sequenced and the structure analysis revealed that the stem-loops or bulge was the main motif in the interaction between aptamers and H22 cancer cell. *Conclusion*: Aptamers against H22 cancer cell have been identified by SELEX methods from an 80 bp single-stranded DNA random library.

【Key words】H22 tumor cell; SELEX; Aptamer

在肿瘤的基因诊断和基因治疗的研究过程中,获得高度特异性的肿瘤细胞定位标志是肿瘤导向治疗的重点和难点。传统上,人们以癌基因或抑癌基因及其表达产物或者肿瘤细胞抗原肽为肿瘤的特异性标志物。随着 SELEX 技术 (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment, 即配体指数级富集系统进化)[1,2]的兴起,又产生了一种新的能特异性检测肿瘤细胞并可以应用于肿瘤基因治疗的技术手段。

我们以 H22 肿瘤细胞为靶细胞,以小鼠 DC 细

作者介绍: 周宇凡(1975-),男,硕士,
主要研究方向:肿瘤的分子生物学。

维普资讯 http://www.cqvip.com

胞为反筛选细胞，从随机单链 DNA 文库中筛选出具有较强结合活性的 H22 肿瘤细胞的 aptamer，并对其结构进行了初步分析，为肿瘤细胞的检测和治疗奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 大肠杆菌 DH5α 为本室保存；工具酶及分子量标准 Taq DNA 聚合酶、PCR Marker 均购自上海博亚生物技术有限公司；随机 ssDNA 文库和引物由上海博亚生物技术有限工司合成；H22 肝癌细胞株购自武汉大学典型培养物保藏中心；琼脂糖购自上海中科院药物所；dNTPs、酵母 tRNA、牛血清白蛋白(BSA)、蛋白胨、酵母浸提物、溴化乙锭均购自上海博亚生物技术有限工司；

1.1.2 随机 ssDNA 文库的构建和引物合成

我们构建了长度为 80bp 的随机 ssDNA 文库，两端为固定序列，中间为 46bp 的随机序列。

文库序列号：

5'-CGTCGCTGCACATTCCG-N46-CGCACAGCTGGGAG TAC-3'

上游引物：5' - CGTCGCTGCACATTCCG -3'

上游 FITC 标记检测引物：5' - FITC - CGTCGCTGCA-CATTCCG -3'

下游扩增和测序引物：5' - GTACTCCCAGCTGTGCG -3'

1.2 实验方法

1.2.1 小鼠 DC 细胞的制备

颈椎脱臼处死小鼠，取出其股骨，剪除两端，用 PBS 冲洗髓腔，低渗破红细胞，1 × Hanks 液洗 3 次，用含 10%小牛血清的 RPMI 1640 液调细胞浓度为 1 × 10⁶/ml。

1.2.2 H22 肿瘤细胞的制备

取腹腔传代的 H22 肿瘤细胞，PBS 洗 3 次，悬浮于 PBS 中，调整浓度至 1 × 10⁶/ml。

1.2.3 SELEX 筛选[3]

1.2.3.1 浓度为 10 pmol/μl 的随机 ssDNA 文库 35μl 在 200μl 选择缓冲液（50 mmol/L Tris·HCl，pH 7.4，5 mmol/L KCl，100 mmol/L NaCl，1 mmol/L $MgCl_2$）通过加热 99℃ 5 min 进行变性，然后立即置于 0℃，5 min。为了降低背景结合，添加了 5 倍 mol 数的过量的酵母 tRNA 和牛血清白蛋白(BSA)。

1.2.3.2 将上述溶液分别与 1 × 10⁶ 个 H22 肿瘤细胞及空白对照管（与细胞同等体积容量的 ddH_2O）混合，孵育 37℃，30 min。

1.2.3.3 离心 1000 r/min，5 min，去上清，沉淀加入选择缓冲液，混匀，再离心，如此反复 6 次。

1.2.3.4 最后所得沉淀加入 ddH_2O，加热 100℃ 10 min。

1.2.3.5 离心 10000r/min，5min，取上清，经酚：氯仿抽提，乙醇沉淀，将 ssDNA 溶解于 20μl TE 缓冲液中。

1.2.3.6 上述溶液作为样品进行 PCR 扩增。

PCR 反应体系为：模板 20 μl，10 × PCR 缓冲液 10 μl，dNTPs 5 μl，$MgCl_2$ 3.5μl，上游引物和下游引物各 5μl，Taq 酶 1U，加去离子水至 50μl。

PCR 反应条件为：94 ℃预变性 3 min，然后进行 20 个循环，94 ℃变性 50 s，55 ℃复性 50 s，72 ℃延伸 50 min，最后 72 ℃延伸 5 min。

1.2.3.7 PCR 产物经过酚：氯仿抽提，乙醇沉淀，然后溶解于选择缓冲液中。

1.2.3.8 再按以上 3.1~3.7 所述步骤，反复 11 轮循环，最终成功获得与 H22 肿瘤细胞特异结合的 aptamer。

1.2.4. SELEX 反筛选

对于除最后一轮之外的每轮 SELEX 筛选的 PCR 产物，均以小鼠 DC 细胞为靶细胞，进行一次反筛选，以增强 aptamer 的特异性吸附。

反筛选步骤如下：

1.2.4.1 SELEX 筛选的 PCR 产物加热 99℃ 5 min 进行变性，然后立即置于 0℃，5 min。

1.2.4.2 将 1 × 10⁶ 个小鼠 DC 细胞离心，去上清后加入上述溶液，在选择缓冲液下孵育 37℃，30 min。

1.2.4.3 随机 ssDNA 文库与小鼠 DC 细胞的混合液在 1000 r/min，5 min 离心后取上清，用于下一轮 SELEX 筛选。

1.2.5 荧光标记引物法检测亲和力

在每一轮循环中，都需要检测筛选的 aptamer 的特异性程度，我们采用对每一轮的 SELEX 筛选产物进行定量 PCR，上游引物采用上游 FITC 标记检测引物代替，得到的产物经过酚：氯仿抽提，乙醇沉淀，然后溶解于选择缓冲液中，再然后与 H22 肿瘤细胞吸附，在流式细胞仪下检测荧光强度，作为判断特异性程度的标准。整个操作过程注意密闭，防止透光。

1.2.6 SELEX 筛选产物的克隆和测序

经 11 轮筛选得到的 ssDNA，用上游引物和下游测序引物经 PCR 扩增成 dsDNA，回收纯化后连接 T 载体，经筛选后随机挑选 32 个克隆子进行序列测定，序列测定由上海博亚生物技术有限公司完成。

1.2.7 寡核苷酸 aptamer 序列结构分析

用 MACAW v2.05 软件进行 aptamer 序列的一级结构同源序列比较；用 DNASIS v2.5 软件计算分析序列最低二级结构能量值，模拟出 aptamer 的二级结构图。

2 结 果

2.1 每轮循环的特异性效果检测

每轮循环 PCR 产物经过具有 FITC 荧光标记的引物进行定量 PCR 扩增后与 H22 肿瘤细胞吸附，

维普资讯 http://www.cqvip.com

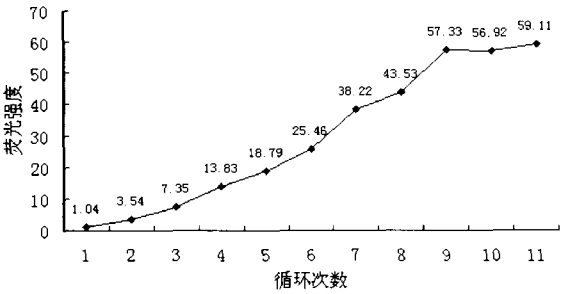


图 1 每轮循环 aptamer 亲和力荧光强度检测结果

表 1 aptamer 亲和力的检测结果

aptamer 编号	荧光强度
24	72.69
31	72.32
3	70.66
16	64.84
21	62.02
6	58.14
9	57.16
30	56.48
12	53.16
1	51.49
26	49.91
25	49.39
23	48.84
27	47.32
18	46.05
14	45.55
10	44.96
11	44.86
13	44.22
8	43.01
4	42.64
19	42.56
2	38.61
17	37.58
5	35.06
22	31.06
28	29.82
15	28.21
7	27.02
29	26.77
20	26.45
32	26.17

然后在流式细胞仪下检测 FITC 荧光强度，FITC 荧光强度的大小与 aptamer 和 H22 肿瘤细胞的亲和力成正比关系，每轮循环的荧光强度值如图 1 所示，结果显示随着筛选轮数的增加，ssDNA 寡核苷酸 aptamer 与 H22 肿瘤细胞结合的比例不断增加。

2.2 筛选出的 aptamer 亲和力的检测

被筛选出的 32 个 aptamer，经过荧光标记引物法检测，获得其与 H22 肿瘤细胞的亲和力如表 1 所示。结果显示第 24 号 aptamer 亲和力最高，第 32 号 aptamer 亲和力最低。

2.3 寡核苷酸一级结构分析

用 MACAW v2.05 软件包分析 32 个 aptamer 的同源序列，发现一级结构分析所有序列均无共同的保守序列。但可以分成 6 个家族(Family)：家族 1 含有保守序列 AGGGA(2,4,7,16,19,28)；家族 2 含有保守序列 AGAAGG(11,14,18,25,27)；家族 3 含有保守序列 GTGAXAA(1,23,26,30)；家族 4 含有保守序列 ATAGT(3,21,24,31)；家族 5 含有保守序列 CAAGG(8,10,13)，家族 6 其余 10 个 aptamer 无保守序列(5,6,9,12,15,17,20,22,29,32)(图 2)。

```
Family 1
2     GCACTAGGAAGGGACCCCGTGGCCAAGGTAGCACGCGCGAGAGGAC
4     TCGGATCGTTTGTCGCAAGCAAGTCAATAGGGAAGCAGGTTTGAAG
7     TCGGAAGAGCTAGGGGTGAAATGATAGAGTGTAGGGAATGCCCGGG
16    AACACGAGGGATGGACCTGTATTGAATGGCACAGTAAGGTATCAGA
19    ACTAGTGTCGAGGGACACGTGTTGAGGATAGGGACCATGTAAGGTA
28    ACCACGAGGGACGATCCCCGAGTGGGACTGGAAATCTCCGAGCGCA
Family 2
11    TGTAACCTGTAGGCCAGGATGGAGAAGGACTCCTGAATCGCATTGG
14    AACAGTCGGCAGAAGGTAGTACAAACGTCCCGTGTGAGTAAAAGCA
18    GGTGGACGGTAAAGGACACGGTGCGAGAAGGAGCGACCGCTAAGCG
25    ACTTAATGAATGCGCAAAGCGGGAACCAGAAGGGAGAACAAGAAGC
27    ACGCACGAGGGTGAGAAGGGGAGGAAGAGGACTCACGATAAGCCGG
Family 3
1     CCGGCACGTGCATTAAAACAGTTAAGTGAAAAAGACATCGAAGATC
23    AAGAAAGGAGATGACCAGGTGCATGGATGCGGGGGTGAAAAACTGG
26    GGCGTTTAATCGTCTAGCACTATACCAGGCAGTAAGTGATAAAGGG
30    CCACCCGGGTCGATCGGTGCGTGGGAAACGGAACAACGTGACAACT
Family 4
3     TGTGCACCTCTGATAGTGCAAGCAGGTTCCCCAGGGCCAAGCAATA
21    CGACTGTGACCGTACCTATCGACTTTCATAGTTGCATGCAATGGCC
24    AATAGTCTGAGCGGAATCAAGTGGTGCGGTGAGTTAGAGAGATCAA
31    CAAATGCCTGAAATAGTTCATGTGATCACTTGCATTGAGCGGGCAG
Family 5
8     ATTATGCTTACAGCATACTGGATAGGCCGAGCCGGCAAGGCGTTGA
10    AGGTTCCGCTGGCAAGGAATCCTCGAACCAAGCCACTCAACGGAGT
13    ATGAGATGGCGACTACCAGCCAACCCTGATGAGGCGGAAATCAAGG
Family 6
5     GACAAGTGACAGGTTGGAGATCACAGTAGGAGCAGGAGGGGGTACT
6     AGTGTCTCATGATCCGAGAGTCACTAGGAGTGTATATCATTATAGG
9     ACATAGCTCAAGCATACTAGCACGCCACCAGGAAAACATGATGACA
12    AGTGGCGCTACGGTAGCCCTGCAGCAACTGGTTTTAGGTAGCGTTA
15    CTCTCCGCATATAGACATTCGTAGCTGCCGTATCGAATAACAACTA
17    CGAATGCCTTTTGGCGTGGGATCGGGGACAATAAGGTCGAGCTGAA
20    GGAAGGTCGGGAAGACGAATGAAACCTGGGTTTGCAGACAAAGAAC
22    AGATAAGATACGATCTTGTACTAGATTGGAACAACCAATAGAAGCG
29    TCACAGTCCAGTAGAGACACGCAGTTTGCCGGACAGCCCATAATCA
32    GTTACCAAGTAAGGCTACATGCTATATTTTGTATAATAAATACGAC
```

图 2 寡核苷酸 aptamer 随机区序列

维普资讯 http://www.cqvip.com

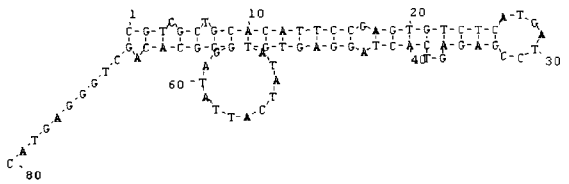


图 3 第 6 号 aptamer 模拟二级结构(第一类)

结构特点:形成中间随机序列区膨起的二级结构

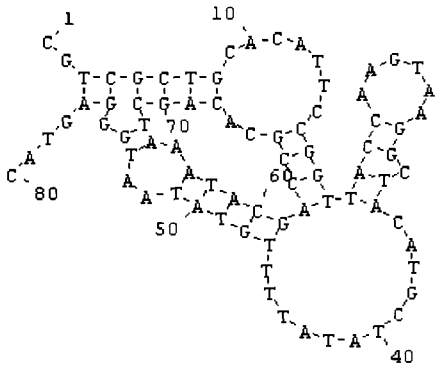


图 4 第 32 号 aptamer 模拟二级结构(第二类)

结构特点:5′ 端的固定序列区碱基与 3′ 的固定序列区碱基形成茎环结构,中间随机区形成茎环结构

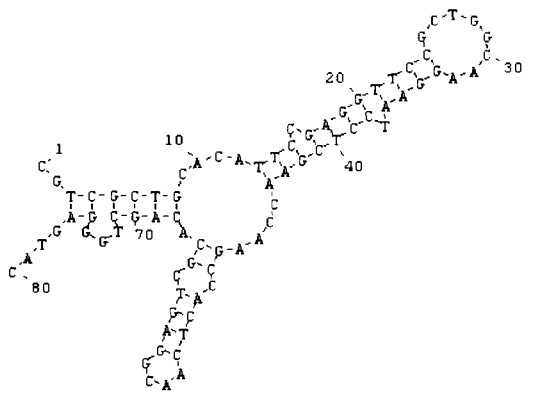


图 5 第 10 号 aptamer 模拟二级结构(第三类)

结构特点:5′ 端的固定序列区碱基与 3′ 的固定序列区碱基和中间随机区形成茎环结构,中间随机区形成茎环结构

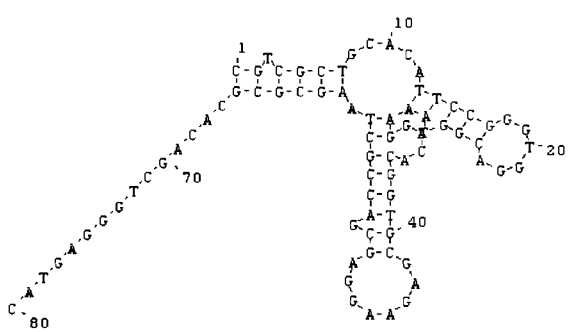


图 6 第 18 号 aptamer 模拟二级结构(第四类)

结构特点:5′ 端或 3′ 端固定序列区分别与随机序列区形成茎环结构,中间随机区形成茎环结构

2.4 寡核苷酸二级结构分析

用 DNASIS v2.5 软件包模拟 aptamer 的二级结构,将结果分为 4 类:第一类:6,9,12,13,16,21,24,31 等 8 个序列形成中间随机序列区膨起的二级结构,一级结构中家族 4 (含有保守序列 ATAGT) 中的 75%属于此类; 第二类:2,3,4,7,15,19,28,29,32 等 9 个序列的 5'端的固定序列区碱基与 3'的固定序列区碱基形成茎环结构,中间随机区形成茎环结构,一级结构中家族 1(含有保守序列 AGGGA)中的 83%属于此类;第三类:8,10,17,20,25 等 5 个序列 5'端的固定序列区碱基与 3'的固定序列区碱基和中间随机区形成茎环结构,中间随机区形成茎环结构,一级结构中家族 5(含有保守序列 CAAGG)中的 67%属于此类; 第四类:1,5,11,14,18,22,23,26,27,30 等 10 个序列 5'端或 3'端固定序列区分别与随机序列区形成茎环结构,中间随机区形成茎环结构,一级结构中家族 3(含有保守序列 GTGAXAA)中的 100%和家族 2(含有保守序列 AGAAGG)中的 80%属于此类(图 3~ 图 6)。

3 讨 论

最初 SELEX 技术应用于蛋白靶分子, 随着该技术的不断发展和完善,SELEX 过程也逐步应用到细胞等具有混合靶分子的物质中。本研究以 H22 肿瘤细胞为例, 探讨了 SELEX 技术在以细胞作为靶物质的运用, 以获得该细胞的表面标志的 aptamer,从而寻找细胞表面的新分子,特别是为找到新的肿瘤特异性表面标志物奠定了基础。

当以蛋白或分子为靶物质时,可以采取纯化蛋白或小分子作为反筛选的靶物质[4,5]以肿瘤细胞为靶分子时, 可以以正常组织的细胞作为反筛选物。例如 Blank 等[3]报道以大鼠脑神经胶质瘤血管内皮细胞为靶目标筛选后,再以正常内皮细胞为背景过滤掉相应的结合序列,得到一种仅识别肿瘤血管内皮细胞的片段,进一步确定出肿瘤血管内皮细胞表面的特定分子。反筛选的目的是为了降低两种类似细胞间的干扰, 能更快速获得靶细胞的特异性 aptamer。这种方法能用于细胞分化以及肿瘤的诊断和治疗的研究中,也可以用于从混合多功能克隆中找到新蛋白[6]。

所筛选的 32 个 aptamer 中,其一级结构、二级

(下转第 909 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

安全快速。③手术中使用生理盐水作为冲洗液，对患者的内环境的影响很小，不存在电切综合征的问题。④组织热损伤深度浅，只有 0.8mm，周围组织损伤可能性小。从理论上讲 PVP 不易穿透前列腺包膜，且能减少前列腺胞膜外勃起神经的损伤，从而减少术后勃起功能障碍的发生[7]。

在使用绿激光进行前列腺汽化手术过程中，需要有一定的操作技巧，才能快速、安全地完成手术。主要有以下几点：①汽化前列腺组织应该有一定的顺序，基本同 TURP 手术。②汽化时光纤头与组织保持在大约 0.5mm 的距离，这样汽化的速度会最快。③汽化时会在手术部位形成大量的小气泡，影响视野，手术中影每隔 5~10s 停止汽化，观察一下创面情况。④出血需要光凝时，应保持 3~4mm 的距离，其他时间避免工作距离较远时发射激光，减少光凝所致的组织水肿和坏死过多，降低手术后尿道刺激症状和尿潴留的风险。⑤鉴于一条光纤费用较高，当前列腺相对较小时，其使用寿命可以治疗多例患者，可根据前列腺大小（2 度）约定 2~3 名患者在同一手术日内先后接受此手术，发挥一条光纤最大的功效，减少患者的经济负担。我科应用情况总结发现，初期治疗的十多例患者，手术后尿频、尿急症状发生率较高，考虑与手术中光纤头与组织距离掌握不好导致光凝过多有关。随着手术技巧的熟练，后期治疗的患者术后尿路症状明显减少。

临床应用表明经尿道 KTP 激光汽化术治疗前列腺增生症具有疗效确切、手术创伤小、时间短、术中术后并发症少的优点[8]。可以作为前列腺增生症的理想手术方法，并且此手术方法特别适合高危患者的治疗[9]。我们认为 PVP 治疗前列腺增生手术安全，病人痛苦少，操作简单，术后易于护理，康复快，出血少，住院时间短，无水中毒症状，术后不需膀胱冲洗。是前列增生及高龄、高危患者较为理想的微创手术治疗方法。因患者随诊时间短，近期效果明显，远期效果待进一步观察。

参 考 文 献

[1] Donovan J L, Peters T J, Neal D E, et al. A randomized trial comparing transurethral resection of the prostate, laser therapy and conservative largment: the clasp study[J]. J. Urol, 2000; 164: 65-70.

[2] Reich O, Schneede P, Zaak D, et al. Ex-vivo comparison of the-haemostatic properties of standard transurethral resection and tranansurethral vaporization resection of prostate [J]. BJU Int, 2003; 92: 319-322.

[3] Virdi J, Kapasi F, Chandraseka P, et al. A prospective randomized study between transurethral vaporization using plasmakinetic energy nd transurethral resection of the prostate[J]. J Urol, 2000; 163(4 Suppl): 268-269.

[4] 颜 渊，高 斌，江福斌. 经尿道前列腺汽化电切术灌洗液吸收量的临床观察[J]. 中华泌尿外科杂志，2003；23：143.

[5] 苏泽轩，黄 华，符 思，等. 中华外科杂志，1995，33(12)：784.

[6] Malek RS, Barrett M, Kuntzman RS. High-power potassium-titanyl-phosphate (KTP/532) laser vaporization prostatectomy: 24 hours later[J]. Urology, 1998; 51(2): 254-256.

[7] Mebust W, Holtgzewe H, Cocket A P C, et, al. Tranurethral prostectomy: immediate[J].

[8] Malek RS, Kuntzman RS, Barrett M. High power potassium-titanyl-phosphate laser vaporization prostatectomy[J]. J Urol, 2000; 163(6): 1730-1733.

[9] 洪宝发，蔡 伟，符伟军，等. 选择性绿激光汽化术治疗良性前列腺增生的临床研究[J]. 中华泌尿外科杂志，2005；1.

（上接第 844 页）

结构与亲和力之间具有明显的相关性。例如，一级结构和二级结构提示，含有保守序列 ATAGT 的亲和力相近，含有 GTGAXAA 和 AGAAGG 的亲和力也相近，这说明一级和二级结构的分析更有助于理解 aptamer 与靶物质结合的机制。从二级结构的分析来看，aptamer 与芽孢的结合可能取决于它们形成的茎环或茎凸结构，而它们的稳定性可能受周围碱基或三级结构的影响。

本实验采取 H22 肿瘤细胞为靶细胞，正常细胞小鼠 DC 细胞为反筛选靶细胞，可通过 SELEX 来发现新的肿瘤标志、发育标志及不同的胞内信号分子，这些可能成为新的诊断或治疗用靶子。

参 考 文 献

[1] Ellington AD, Szostak JW. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands[J]. Nature, 1990; 346(6287): 818-822.

[2] Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase [J]. Science, 1990; 249(4968): 505-510.

[3] Blank M, Weinschenk T, Priemer M, et al. Systematic evolution of a DNA aptamer binding to rat brain tumor microvessels. [J]. J Biol Chem, 2001; 276(19): 16464-16468.

[4] Famulok M., Mayer G. Aptamers as tools in molecular biology and immunology[J]. Curr. Top. Microbiol. Immunol, 1999; 243: 123-136.

[5] Kopylov A.M., Spiridonova V.A. Combinatorial chemistry of nucleic acids: SELEX[J]. Mol. Biol, 2000; 34: 940-954.

[6] Wang C, Zhang M, Yang G, et al. Single-stranded DNA aptamers that bind differentiated but not parental cells: subtractive systematic evolution of ligands by exponential enrichment [J]. J Biotechnol, 2003; 102 (1): 15-22.