

## SELEX 技术及其在植物检疫中的应用前景

李建勇<sup>1</sup>,王英超<sup>2</sup>,王飞<sup>1</sup>,纪瑛<sup>2</sup>,厉艳<sup>2</sup>,吴兴海<sup>2</sup>,王简<sup>2</sup>,邵秀玲<sup>2</sup>

1. 济南出入境检验检疫局, 山东 济南 250014

2. 山东出入境检验检疫局, 山东 青岛 266002

**摘要:** SELEX 是从人工体外合成的随机单链核酸序列库中筛选出特异性与靶物质高度亲和的适配体的筛选技术。该技术的基本途径主要是通过人工合成的随机寡核苷酸序列文库, 历经筛选、分离、富集得到能与各种配体结合的寡核苷酸适配体, 具有高特异性、高亲和力和稳定性良好的特点。本文综述了 SELEX 技术的发展, 介绍了目前的研究进展, 以及该技术在植物检疫领域中的应用情况, 并对其前景进行分析和展望。

**关键词:** SELEX 技术; 植物检验检疫; 应用

**中图分类号:** Q789

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-2324(2016)01-0060-04

## Application Prospects of SELEX Technology in Plant Quarantine

LI Jian-yong<sup>1</sup>, WANG Ying-chao<sup>2</sup>, WANG Fei<sup>1</sup>, JI Ying<sup>2</sup>, LI Yan<sup>2</sup>, WU Xing-hai<sup>2</sup>,  
WANG Jian<sup>2</sup>, SHAO Xiu-ling<sup>2</sup>

1. Jinan Entry-Exit Inspection and Quarantine, Jinan 250014, China

2. Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine, Qingdao 266002, China

**Abstract:** SELEX is a new combinatorial technique screening the oligonucleotide sequence which is specific combined with various target molecules in vitro. The selectivity, affinity and stability of SELEX are high. The specific adapters can be found in the synthetic oligonucleotide library by screening, separation and enrichment. The article reviewed the progress and application of the SELEX in plant quarantine and analyzed its prospect and an outlook.

**Keywords:** SELEX; plant quarantine; application

美国的 Gold 和 Ellington 首先提出并命名了指数富集配体系统进化(Systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX), 该技术主要是从人工体外合成的随机单链核酸序列库中筛选出特异性与靶物质高度亲和的适配体(Aptamer)的筛选技术<sup>[1]</sup>。该技术的基本途径主要是通过人工合成的随机寡核苷酸序列文库, 历经筛选、分离、富集得到能与各种配体结合的寡核苷酸适配体, 而这种适配体具有高特异性、高亲和力和稳定性良好的特点。目前 SELEX 技术筛选的靶分子不仅包括无机离子、小分子有机化学物、核酸、蛋白质等, 甚至扩展到了完整的细胞、病毒、细菌病原体等复杂靶分子<sup>[2-5]</sup>。本文主要介绍 SELEX 技术在微生物鉴定方面的应用及在植物检疫中的应用前景。

### 1 SELEX 技术的发展

随着 SELEX 技术研究的深入, 近年来在传统 SELEX 技术基础上不断发展和完善各类衍生 SELEX 技术, 如导向 SELEX 技术 (Blended SELEX)、基因组 SELEX (Genomic SELEX)、复合靶分子 SELEX (Complex targets SELEX)、细胞消减 SELEX 技术 (Subtractive SELEX) 等, 这些技术在生命科学基础研究、药物筛选、食品安全分析等领域显示出广阔的应用前景。其中, 导向 SELEX 技术是将能特定的与需要研究的物质如蛋白质结合的小分子制备成一个寡核苷酸文库, 这样借助 SELEX 筛选出的寡核苷酸适配体只与蛋白上的特异表位高度专一的结合, 避免了它与细胞内一些未知成分结合, 从而增加了筛选的特异性。基因组 SELEX, 是从生物体的基因组寡核苷酸文库中筛选蛋白质、多糖等生活活性物质的靶序列, 通过筛选的天然识别序列, 可以更快更好地发现新的蛋白结合位点、蛋白质合成以及研究蛋白与核酸间的相互作用、复杂调控元件等<sup>[6]</sup>。

复合靶分子 SELEX 技术以多种分子构成混合靶标, 可同时筛选出多种靶分子的适配子而不互相干扰。但这种有关复合靶子 SELEX 的研究均建立在已知的靶分子基础上<sup>[7-9]</sup>。细胞消减 SELEX

**收稿日期:** 2015-11-11

**修回日期:** 2015-12-16

**基金项目:** 国家质检总局科技计划项目(2015IK213、2013IK293); 山东检验检疫局科技计划项目(SK201437); 山东省科技攻关项目(2011GGB0003)

**作者简介:** 李建勇(1970-),男,博士,高级农艺师.主要从事植物检疫工作. E-mail:lijianyong1996@sohu.com

数字优先出版: 2015-12-31 <http://www.cnki.net>

(Subtractive SELEX) 的技术优势主要是在目标靶分子未知的条件下, 使用与目标细胞近似或同源性的和细胞寡核苷酸文库进行消减筛选, 从而去除文库中的均能够识别目标细胞和同源细胞的适配体, 最终获得能特异识别目标细胞(靶细胞)的寡核苷酸适配体<sup>[10]</sup>。2009 年李慧<sup>[11]</sup>等, 在目标细胞(已分化 PC12 细胞)与对照细胞(未分化 PC12 细胞)之间分子差异未知的条件下, 首次成功地应用消减细胞 SELEX 技术筛选到了能特异识别目标细胞而不识别对照细胞的单链 DNA(ssDNA) 适配体, 从而将 SELEX 技术筛选的靶分子扩展到了完整细胞等复杂分子。以上几种衍生 SELEX 技术在微生物鉴定方面也得到了较好的应用。

## 2 SELEX 技术在微生物鉴定方面的应用

近年来, SELEX 技术越来越受到人们的重视。目前, 国内外已有利用 SELEX 技术在生命科学研究、生物医药、食品安全检测中应用的相关报道。在微生物鉴定方面, 如医学疫病诊断、食品微生物检测也有相关的研究和报道。

### 2.1 在医学疫病诊断中的应用

通过 SELEX 技术筛选得到的适配体与靶物质结合具有高特异性、高亲和力和良好稳定性的特点, 这种特点可以在微生物鉴定包括医学疾病诊断中得到具体广泛的应用。在医学领域, 目前应用核酸适配体检测靶蛋白的研究比较多, 但成熟的临床应用报道还比较少。

Horii 等<sup>[12]</sup>通过 SELEX 技术筛选针对神经鞘氨醇磷酸胆碱(Sphingosyl phosphoryl choline, SPC)的特异性 RNA 适配体, 该适配体与分磷酸鞘氨醇(Sphingosine-1-phosphate, SIP)无交叉反应, 应用这种筛选技术可以较好的研究 SPC 的生物学功能及临床诊断。在流感病毒的分型诊断研究中, Gopinath 等<sup>[13]</sup>通过 SELEX 技术筛选与 B 型流感病毒血球凝集素蛋白无交叉反应的适配体, 通过该适配体的研究为该病毒的分型诊断提供了坚实的基础。詹林盛等<sup>[14]</sup>以重组的丙型肝炎病毒(Hepatitis C virus, HCV) C 蛋白为靶蛋白, 从人工体外合成的随机单链核酸序列库中筛选出特异性与靶物质高度亲和的核酸适配体, 为有效研究丙型肝炎病毒 C 蛋白抗原检测和以 C 蛋白为靶位的抗 HCV 治疗提供了有价值的工具。李卫滨等<sup>[15]</sup>运用 SELEX 技术从合成的随机单链核酸序列库中筛选到针对全血环孢素 A 的特异性适配体, 该方法采用生物素链亲和素磁珠分离法制备次级文库, 为全血环孢素 A 浓度的快速而简便的实验室诊断提供了新的思路和方法。王立峰等<sup>[16]</sup>通过 SELEX 技术, 通过 7 轮筛选获得癌胚抗原(Carcino-embryonic antigen, CEA)的特异性适配体, 该适配体与纯化的癌胚抗原和天然状态的癌胚抗原蛋白都有很好的特异性, 为建立癌胚抗原肿瘤的靶向诊断和治疗奠定了基础。甘龙杰等<sup>[17]</sup>通过 SELEX 技术筛选出了对金黄色葡萄球菌外毒素 B(Staphylococcal enterotoxin B, SEB)特异性的适配体(A11), 通过对临床 6 例患者血清标本的检测, 表明该适配体特异性强, 能够简便、快速、灵敏的识别 SEB 患者血清, 具有很好的应用前景。

### 2.2 在食品微生物检测中的应用

在食品微生物检测方面, SELEX 技术与其他技术相结合在微生物鉴定方面应用较为广泛。

Joshi 等<sup>[18]</sup>通过 SELEX 技术筛选获得了针对肠道血清型沙门氏菌的特异性适配体, 将该适配体与磁珠连接, 能够在沙门氏菌病原水平较低的情况下抓捕并检测到该菌, 检测下限为  $10 \cdot 10^2$  CFU / mL, 为食品和环境样品中沙门氏菌的检测提供了新的思路和方法。Hye 等<sup>[19]</sup>将从大肠杆菌中筛选的核酸适配体与 RT-PCR 技术相结合, 建立了检测大肠杆菌的方法, 该方法线性范围为  $10 \cdot 10^7$  CFU / mL, 检测下限为 10 E.coli / mL。Edith 和 Alociljac<sup>[20]</sup>对适配体生物传感器在微生物检测中的应用做了较为全面的回顾及展望。Ohk<sup>[21]</sup>等应用核酸适配体与抗体功能化的光导纤维生物传感器对人工污染的牛肉、鸡肉等食品中的李斯特菌进行了特异性检测, 检测下限为  $10^3$  CFU/mL。国内研究方面, 曹晓晓等<sup>[22]</sup>通过细菌消减 SELEX 技术, 以完整的金葡萄菌细菌为目标靶, 使用与金葡萄菌细菌近似或同源性的链球菌和表皮葡萄球菌为消减靶, 和寡核苷酸文库进行消减筛选, 最终获得一组能特异识别金葡萄菌的寡核苷酸适配体, 结合流式细胞仪和共聚焦显微镜检测, 能够将金葡萄菌和消减靶细菌及大肠杆菌进行有效的区分, 大大提高了对各型金葡萄菌的检出率。

### 3 SELEX 技术在植物检疫工作的应用前景

#### 3.1 口岸植物检疫存在的难题

植物检验检疫从常规的分离技术如分离、纯化、培养、鉴定逐步发展到免疫学方法、分子生物学方法。分子生物学检测从普通的 PCR 技术、巢式 PCR 到目前先进的 LAMP、实时荧光 PCR、基因芯片等检测技术,检测的灵敏度有了很大的提高,能够满足检疫部门日常检测的需要,使外来有害生物传入的风险大大降低。但在实际口岸检疫中,由于研究资料的缺乏和技术的限制,常常面临以下几个难题:

首先,现有的植物病原细菌分子检测技术,无论是常规 PCR,还是实时荧光 PCR、基因芯片等都是以前 16 SrDNA 作为细菌群落结构分析最常用的系统进化标记,分子标记单一。而细菌中其他基因的序列大部分未知,无从设计引物。急需通过新的技术发现病原细菌特异性寡核苷酸或蛋白序列,为分子检测奠定基础。

其次,变种分型难。新修订并公布的《进境植物检疫危险性病虫害名录》中有的植物病原细菌特别是致病变种,在现有技术和研究资料下,还不能有效区分,给口岸检疫鉴定带来一定的困难。

再次,富集困难。进口种子中种传病原细菌含量低,常规的病原富集技术难以实施,造成许多微量病原菌的漏检。而目前的分子检测技术都是以分离到病原菌并提取到目标病原菌的 DNA 为前提的,因此在病原菌含量低的情况下分子检测技术也无能为力。急需研究有效的病原细菌富集技术。

#### 3.2 SELEX 技术在植物检疫工作上的优势及应用前景

目前国内外还没有 SELEX 技术在植物检疫上应用的报道。在口岸检疫中,为了解决植物病原细菌分子检测采用分子进化标记单一;种传病害中致病菌的含量低而难以施检;有些病原细菌的致病变种不能很好的区分;很多致病性细菌基因水平研究不够深入,并且病原细菌在不同状态下很容易发生变异,致使很多疾病在其发病早期无法检测到或是被漏检等问题,我们可以通过构建以完整细胞为靶子的 SELEX 技术,把病原细菌看做是一个含有多种成分的复合物,以整个细菌作为靶分子进行筛选,就可以在未知细菌的内部结构、功能的情况下筛选出与其特异性结合的一组适配体,这组特异性的适配体与单个适配体相比,能提高细菌检出的敏感性和特异性。同时,适配体与靶物质的结合方式同抗原-抗体反应相似,具有高度识别并特异性结合靶物质的能力。若与磁珠偶联结合使用,可以作为病原富集的捕捉分子,大大提高对微量病原菌的富集能力。可以看出,SELEX 技术有优势可以解决目前植物检疫工作中的面临的诸多难题。

因此在植物检疫领域,我们可以建立基于 SELEX 技术的植物病原细菌特异性寡核苷酸适配体的筛选,通过筛选到的寡核苷酸适配体,结合富集技术、表面等离子共振(Surface plasmon resonance, SPR)技术、表面增强拉曼光谱(Surface enhanced raman spectroscopy, SERS)技术、微流控技术、量子点等技术中的一种或几种进行致病菌快速、高通量检测,并形成体系。不仅为植物病原细菌致病变种和植原体病害的快速检测方法建立奠定基础,实现植物病原菌快速检测的整套解决方案,而且在植物检疫领域应用 SELEX 技术,必将开拓一个集综合材料学、生物学、信息学和分子生物学等多学科在内的前沿技术领域,为口岸检测技术的飞跃打下坚实的基础。

### 4 展望

目前,应用 SELEX 技术筛选适配体在生物医学、食品检测等多个领域得到了证明,但是能够大规模应用还为时尚早。这其中重要的原因主要有,筛选的合适的适配体数目相对较少;适配体的筛选过程较为烦琐,过程中对适配体的修饰等方案还需优化,这影响了适配体的稳定性和特异性;由于体内环境的复杂性,实验室筛选的适配体在实际应用中可能效果不理想。当然随着科学技术的进步特别是 SELEX 技术的不断完善和发展,种种问题终将解决,SELEX 技术必将在各个领域,当然也包括植物检疫领域中得到广泛的应用。

#### 参考文献

- [1] Ulrich H, Martins AH, Pesquero JB. RNA and DNA aptamers in cytomics analysis[J]. *Cytometry*,2004,59A(2):220-231
- [2] Konopka K, Lee NS, Rossi J, *et al.* Rev-binding aptamer and CMV promoter decoys to inhibit HIV replication[J]. *Gene*, 2000,255(2):235-244
- [3] Gal SW, Amontov S, Urvil PT, *et al.* Selection of a RNA aptamer that binds to human activated protein C and inhibits its protease function[J]. *Eur J Biochem*, 1998,252(3):553-562
- [4] Herr JK, Smith JE, Medley CD, *et al.* Aptamer-conjugated nanoparticles for selective collection and detection of cancer cells[J]. *Anal Chem*, 2006,78:2918-2924
- [5] Tang Z, Shangguan D, Wang K, *et al.* Selection of aptamers for molecular recognition and characterization of cancer cells [J]. *Anal Chem*, 2007,79:4900-4907
- [6] Pan W, Xin P, Clawson GA. Minimal primer and primer-free SELEX protocols for selection of aptamers from random DNA libraries[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008,52(6):2097-110
- [7] Morris KN, Jensen KB, Julin CM, *et al.* High affinity ligands from in vitro selection: complex targets [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998(95):2902-2907
- [8] Blank M, Weinschenk T, Priemer M, *et al.* Systematic evolution of a DNA aptamer binding to rat brain tumor microvessels selectivetargeting of endothelial regulatory protein pigpen [J]. *J Biol Chem*,2001,276(19):16464-16468
- [9] Hick BJ, Marion C, Chang YF, *et al.* Tenascin-C aptamers are generated using tumor cells and purified protein [J]. *J Biol Chem*, 2001,276(52):48644-48654
- [10] 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]. *Biotechnology*, 2003,102:15-22
- [11] Li H, Xu H, Ding HM, *et al.* Identification of an aptamer targeting hnRNPA1 by tissue slide-based SELEX [J]. *Pathology*, 2009,218:327-336
- [12] Ho rriK, OmiK, Yo shida Y, *et al.* Development of a sphingo sylpho spho ry lcho line detection system using RNA aptamers. *Molecules*[ J]. 2010,15(8):5742-5755
- [13] Gopinath SC, Kawasaki K, Kumar PK. Selection of f RNA-aptamer against human influenza B virus[ J]. *Nucleic Acids Symp Ser( Ox f)*, 2005(49):85- 86
- [14] 詹林盛,孙红琰,彭剑淳,等.丙型肝炎病毒核心蛋白寡核苷酸适配子的筛选与鉴定[J].*中华微生物学和免疫学杂志*,2002,22(5):578-581
- [15] 李卫滨,兰小鹏,杨湘越,等.SELEX 技术在筛选环孢霉素 A 适体中的运用[J].*福州总医院学报*,2007,14(3):171-173
- [16] 王立峰,魏 嘉,殷海涛,等.癌胚抗原特异性寡核苷酸适配子的体外筛选及其意义[J].*医学研究生学报*,2007,20(9):903- 907
- [17] 甘龙杰,兰小鹏,江 丽,等.金黄色葡萄球菌外毒素 B 特异性适体的筛选及其应用[J].*生物技术通讯*,2010,21(2):232-235
- [18] Joshi R, Janagama H, Dwivedi H P, *et al.* Selection, characterization, and application of DNA aptamers for the capture and detection of *Salmonella enterica* serovars[J]. *Mol Cell Probes*, 2009,23(1):20-28
- [19] Hye JL, Byoung CK, Kyung WK, *et al.* A sensitive method to detect *Escherichia coli* based on immunomagnetic separation and real-time PCR amplification of aptamers[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009,24(12):3550-3555
- [20] Edith TC, Alocilja EC. Aptasensors for detection of microbial and viral pathogens[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009,24(11):3175-3182
- [21] Ohk S, Koo O, Sen T, *et al.* Antibody-aptamer functionalized fibre-optic biosensor for specific detection of *Listeria monocytogenes* from food[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2010,109(3):808-817
- [22] Cao X, Li S, Chen L, *et al.* Combining use of a panel of ssDNA aptamers in the detection of *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res*, 2009,37(14):4621-4628