



甾体激素核酸适配体的筛选与应用*

唐春花¹⁾ 杨洁¹⁾ 卢晓玲¹⁾ 陈美仑¹⁾ 魏铮¹⁾ 余鹏^{1)**} 赵佳^{2)**}⁽¹⁾ 中南大学湘雅药学院, 长沙 410013; ⁽²⁾ 长沙信励致和科技有限公司, 长沙 410013)

摘要 核酸适配体作为新型的识别分子, 在分析检测领域有极大的潜力。甾体激素是一类以环戊烷多氢菲为母核的激素, 包括性激素和皮质激素, 在维持生命、调节生理状态等方面有着极其重要的医药价值。监测体内外的甾体激素含量对于疾病监测和环境保护有着重要的意义。甾体激素的适配体筛选是将适配体应用到甾体激素的分析和检测的前提。目前研究者已通过筛选获得了雌激素(如雌二醇(estradiol, E2)、雌酮(estrone, E1))、雄激素(如睾酮(testosterone, TES)、去甲睾酮)、孕激素(如孕酮(progesterone, P4)), 以及皮质激素(如皮质醇(cortisol, COR))的核酸适配体。本文总结了上述已报道的甾体激素适配体的筛选原理及策略; 对适配体序列、平衡解离常数(equilibrium dissociation constants, K_D)及测定方法等进行了简要归纳; 介绍了计算机模拟技术在适配体筛选和优化方面的新思路; 对目前开发的各类甾体激素适配体传感器进行简要介绍, 以为后续研究提供参考。

关键词 核酸适配体, 甾体激素, 筛选, 传感器**中图分类号** R917**DOI:** 10.16476/j.pibb.2022.0390

甾体激素, 即类固醇激素, 是一类以环戊烷并多氢菲为母核的激素, 由胆固醇经过一系列的酶反应而产生, 按照其功能可分为性激素和皮质激素, 在维持生命、调节性功能、调控机体发育、免疫调节、皮肤疾病治疗及生育控制等方面发挥重要作用^[1]。检测体内的甾体激素水平对于内分泌系统疾病的诊断和治疗、生理状态的监测等有着重要的意义^[2-3]; 甾体激素类药物在临床上也有着极大的医药价值。但是, 当甾体激素进入环境后, 会成为环境内分泌干扰物, 污染水资源、土壤资源, 威胁民众的身体健康^[4]。因此, 能够对体内、环境中的甾体激素进行高灵敏度和高特异性监测的技术具有极广泛的应用前景。

核酸适配体是一段寡聚核苷酸链, 可折叠成多样的二级、三级结构, 如茎、环、凸、G-四联体和发夹结构等, 与靶标特异性结合^[5]。因此可作为识别分子, 用于分析检测领域。此外, 适配体相比于抗体, 拥有稳定性高、合成周期短、无免疫原性、靶标物质更广且易修饰等优点^[5]。适配体的筛选是其应用的前提, 配体指数富集系统进化技术(systematic evolution of ligands by exponential

enrichment, SELEX)是体外筛选适配体的方法^[6]。适配体的筛选和分离方法多样, 针对各种靶标物质的结构和性质的不同, 又衍生出许多SELEX分支技术^[7]。

目前研究者已对甾体激素中的雌激素(如雌二醇(estradiol, E2)^[8-13]、雌酮(estrone, E1)^[10])、雄激素(如睾酮(testosterone, TES)^[14]、去甲睾酮^[12])、孕激素(如孕酮(progesterone, P4)^[15-16])以及皮质激素(如皮质醇(cortisol, COR)^[17-18])的核酸适配体进行了筛选。本文总结了上述已报道甾体激素适配体的筛选原理及策略; 对适配体序列、平衡解离常数(equilibrium dissociation constants, K_D)及测定方法等进行了简要归纳; 介绍了计算机模拟技术在适配体筛选和优化方面的新思路; 对目前开发的各类甾体激素适配

* 中南大学中央高校基本科研业务费(2021zzts1002)和湘基金委[2022]2号自然科学基金(2022JJ80105)资助项目。

** 通讯联系人。

余鹏 Tel: 0731-82650329, E-mail: peng.yu@csu.edu.cn

赵佳 Tel: 18810532875, E-mail: xlzh_zj@163.com

收稿日期: 2022-08-19, 接受日期: 2022-12-09

体传感器进行简要介绍, 以期为后续研究提供参考。

1 甾体激素的种类、结构及生理作用

甾体激素都含有环戊烷并多氢菲的甾体母核基本结构(图1), 系由3个六元环脂烃(A环、B环、C环)和1个五元脂环(D环)组成。甾体激素按药理作用可分为性激素和皮质激素, 按化学结构可分为雌甾烷、雄甾烷和孕甾烷三大类。

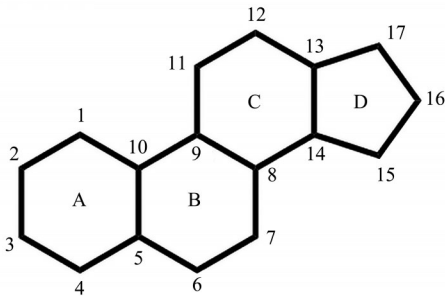


Fig. 1 The structure of the steroid nucleus
图1 甾体母核结构

雌激素以雌甾烷为母核, 雌甾烷在C-13上连有甲基, 此甲基碳原子编号为C-18, 主要代表有E2、E1等。雌激素有内源性和外源性之分, 其作用为刺激卵泡发育、促进第二性征出现、控制妊娠和哺乳等。

雄甾烷在C-13及C-10上连有甲基, 碳原子编号分别为C-18、C-19, 此类激素为雄激素, 主要代表为TES, TES由睾丸间质细胞合成, 对精子生成具有重要意义, 且可以促进第二性征出现, 加快蛋白质合成, 与临床上前列腺癌等多种疾病有密切的联系。

孕甾烷在C-13及C-10上也连有甲基, 分别为C-18、C-19, 且在C-17上连有乙酰基, 碳原子编号分别为C-20和C-21。孕激素和皮质激素都以孕甾烷为母核。孕激素中具有代表性的为P4, 它与女性的月经周期、怀孕及胎儿发育有着密切的关系。

皮质激素分为糖皮质激素和盐皮质激素, 皆以孕甾烷为母核, 由肾上腺皮质合成和分泌, 在调节体内的水盐代谢和糖代谢发挥着重要作用。甾体激素的三种母核结构及激素代表如表1所示。

Table 1 Three nucleus structures of steroid hormones and their representatives

名称	母核结构	激素代表
雌激素		
雄激素		
孕激素		
皮质激素		

甾体激素通常在非常低的浓度下以纳摩尔每升或皮摩尔每升水平的浓度与核受体结合而发挥强烈的生理作用。由于在生物体内含量极低, 不同甾体激素之间由于结构十分相似, 还存在大量的立体异构体, 因此对甾体激素的高灵敏度和高特异性检测难度较大。常见的检测甾体激素的方法有色谱法和免疫法。色谱法如高效液相色谱、液相色谱-质谱联用、气相色谱-质谱联用等; 免疫法如免疫荧光法、酶联免疫测定法和放射免疫分析法等^[19-21]。这两类方法灵敏度高、特异性强, 但存在着价格昂贵、操作繁琐、需要专业的技术人员、不适于现场检测等缺点, 因此亟需研发操作简单、结果快速、成本低廉、可用于现场检测甾体激素的方法。

核酸适配体的出现为构建新型的生物传感器带来了契机, 自适配体开发的30多年时间里, 已有

广泛的研究,在细胞^[22-23]、蛋白质^[24-25]等大分子以及激素^[26-27]、金属离子^[28-29]和生物毒素^[30-31]等小分子检测领域中都有大量实例可提供参考。

2 甾体激素的核酸适配体筛选原理与策略

SELEX 技术自 1990 年开发至今已有 30 余年^[6],并逐渐出现了多种衍生形式,如毛细管电泳 SELEX 技术 (capillary electrophoresis-SELEX, CE-SELEX)^[32]、磁珠-SELEX^[33]、细胞 SELEX^[34]、体内 SELEX^[35] 和一轮 SELEX^[36] 等。

甾体激素适配体的筛选基本原理同 SELEX 筛选其他物质一样 (图 2),其基本思路是体外先化学合成一个寡核苷酸文库,将核苷酸文库与靶物质混合形成靶物质-核酸的复合物,然后利用不同的分离方法分离出与靶物质结合的核酸,以此核酸分子为模板进行 PCR 扩增,再进行下一轮的循环筛选过程。通过重复的筛选与扩增,对多个筛选回合后选择的潜在适配体进行测序,评估其亲和力与特异性,最后得到与靶物质高亲和力与高特异性结合的适配体^[7]。

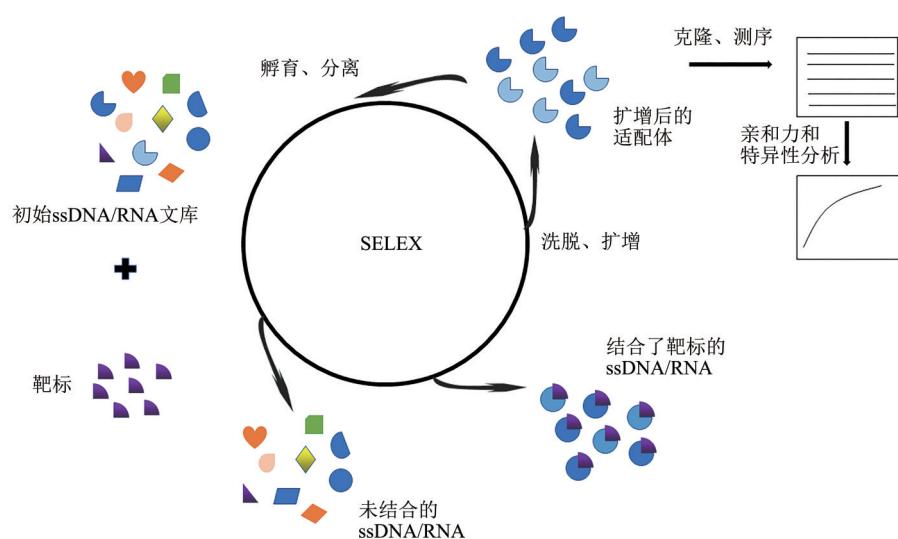


Fig. 2 The general process of aptamer isolation

图2 适配体筛选的一般流程

甾体激素属于小分子化合物,分子质量较小 (一般<500 u),已有研究指出,小分子靶点选择的适配体比其他靶点选择的适配体亲和力低,小分子的结构相比大分子来说复杂度较低,这限制了小分子和适配体之间作用力的数量和强度,导致适配体-靶标结合亲和力降低,也一定程度影响了适配体的特异性^[37]。筛选小分子靶标适配体的主要挑战之一是靶标-核酸复合物和游离核酸的分离。靶标的小尺寸并不会导致游离核酸和靶标-核酸复合物之间存在较大的质量差异,使分离过程复杂化。因此,选择小分子时通常需要固定靶标或者核酸其中一个生物分子^[38]。一般来说,SELEX 技术可以分为固定化靶标与非固定化靶标技术。

固定化靶标技术是最早运用的 SELEX 技术之一。在 1990 年, Ellington 等^[6] 通过固定化靶标技术,将靶标分子有机染料偶联到固体载体基质琼脂

糖颗粒上,随后将琼脂糖颗粒填入层析柱,通过亲和柱层析的方法洗脱分离靶标-核酸复合物与游离寡核苷酸,并通过聚合酶链式反应 (PCR) 将候选核酸序列从琼脂糖凝胶颗粒上洗脱下来,从而获得了几种小分子有机染料的 RNA 适配体。后来又有研究者将小分子靶标通过化学偶联的方式将固定在磁珠上进行筛选,即磁珠-SELEX^[39-40],当核酸文库与磁珠-靶标偶联物混合孵育后,可通过磁性分离的方法实现磁珠-靶物质-核酸复合物与游离核酸的分离,将生物磁珠作为固相载体的方式简化了分离过程,磁性分离使得适配体筛选更简便、高效。

固定化靶标的 SELEX 技术目前运用已经相当广泛,但是对于小分子化合物来说,固定靶标的方式也存在着一些局限性: a. 小分子表面可以偶联的基团少,固定化过程比较繁琐,固定成功率较低^[37]; b. 基团进行偶联后,小分子可能会形成比

较特殊的空间结构, 阻碍官能团与适配体相互识别、相互作用的过程, 甚至可能无法筛选到候选适配体^[41]; c. 小分子经过偶联后也可能产生一些比较特殊的位点, 筛选得到的适配体只对偶联后的小分子存在亲和力, 这可能会对适配体的实际应用产生不利影响^[38]。

随着研究的不断深入, 非固定化靶标技术逐渐进入人们的视野, 非固定化靶标技术分为固定文库的SELEX技术和均相SELEX^[42]。

Capture-SELEX技术就是一种固定文库的筛选技术。2005年, Nutiu 和 Li^[43]报道了一种通过固定文库而不是固定靶标的筛选方法(图3), 这种方法主要是在核酸文库的序列中设计一段序列, 这

段序列与生物素化的互补序列进行碱基配对, 进而将整个核酸文库固定在标记了链霉亲和素的珠子上。当加入靶标后, 靶标与核酸适配体相互作用, 与靶标亲和力强的核酸序列会“挣脱”互补序列, 进入到溶液中。而亲和力较弱、无亲和力的序列则会留在固体基质珠子上, 以此实现候选序列的分离与富集。Capture-SELEX可以针对“天然”状态下的靶标分子结构进行筛选, 避免了由于靶标固定带来的一系列不利影响, 但可以看出, 这种方法存在着繁琐的文库固定操作, 固定效率难以控制, 也可能出现文库在洗脱时与互补序列自发分离进而降低筛选效率、增加筛选轮数等问题^[42]。

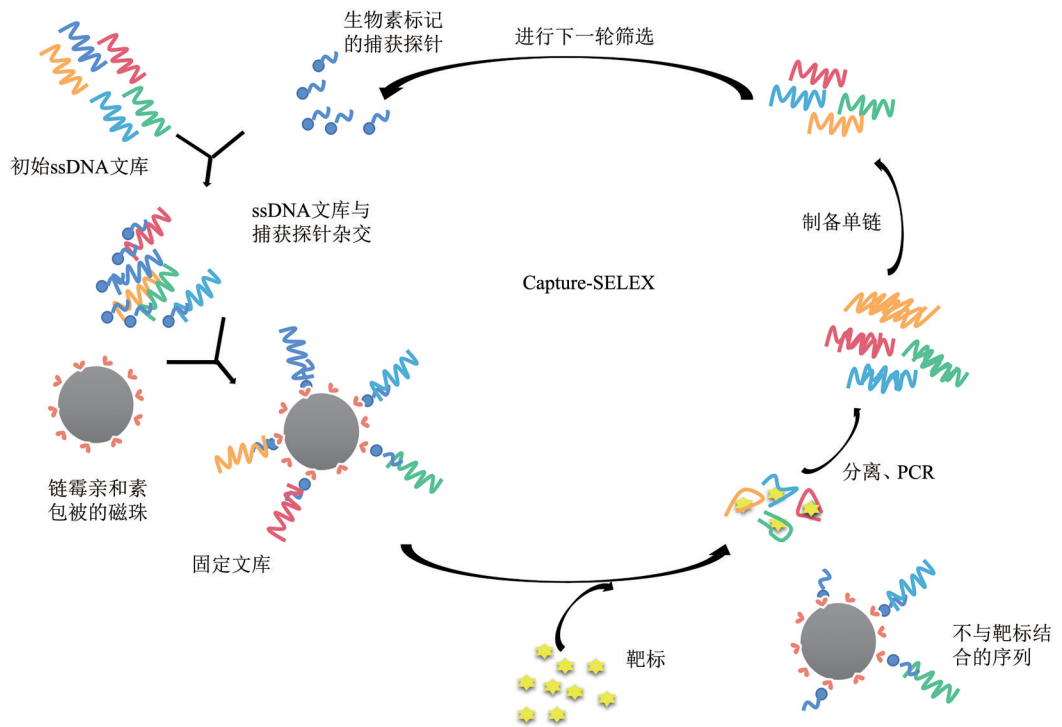


Fig. 3 *In vitro* selection of aptamers by the Capture-SELEX
图3 使用Capture-SELEX技术筛选适配体

均相SELEX技术指的是核酸-靶标复合物和游离核酸在溶液中进行分离, 文库和靶标均不进行固定的技术。CE-SELEX是一种典型的均相SELEX技术, 它利用靶标-核酸混合物与游离寡核苷酸在电泳时的迁移率差异, 实现对候选适配体的分离。在2005年, 研究人员首次将CE技术用于一种小肽靶标神经肽Y的适配体筛选中, 结果表明仅经过4轮筛选获得的ssDNA适配体的亲和力可以与传统

SELEX的12轮筛选获得的RNA适配体相媲美。但是CE-SELEX也存在着设备昂贵、操作复杂的局限性, 且对于小分子来说, 寡核苷酸在结合小分子前后, 在分子质量、电荷等方面产生的差异较小, 往往也存在着难以进行分离二者的情况^[44]。氧化石墨烯(graphene oxide, GO)具有通过 π - π 堆积吸附ssDNA/RNA的特性, 因而受到广泛关注。由于GO吸附游离单链核酸的作用力比与靶标结合的

折叠核酸结构更为紧密,因此可用于分离筛选溶液中游离的单链核酸,有研究者利用此原理构建了GO-SELEX筛选方法^[45]。GO与核酸文库、靶标共孵育,当候选核酸适配体与靶标发生相互作用时,核酸的构象产生变化,从而不能被GO吸附,通过

离心的方式分离出核酸-靶标复合物与游离核酸。近年来也有研究者指出,GO-SELEX存在着寡核苷酸自解离、靶标可能同样被GO吸附的问题^[41]。几种SELEX的常见策略见图4。

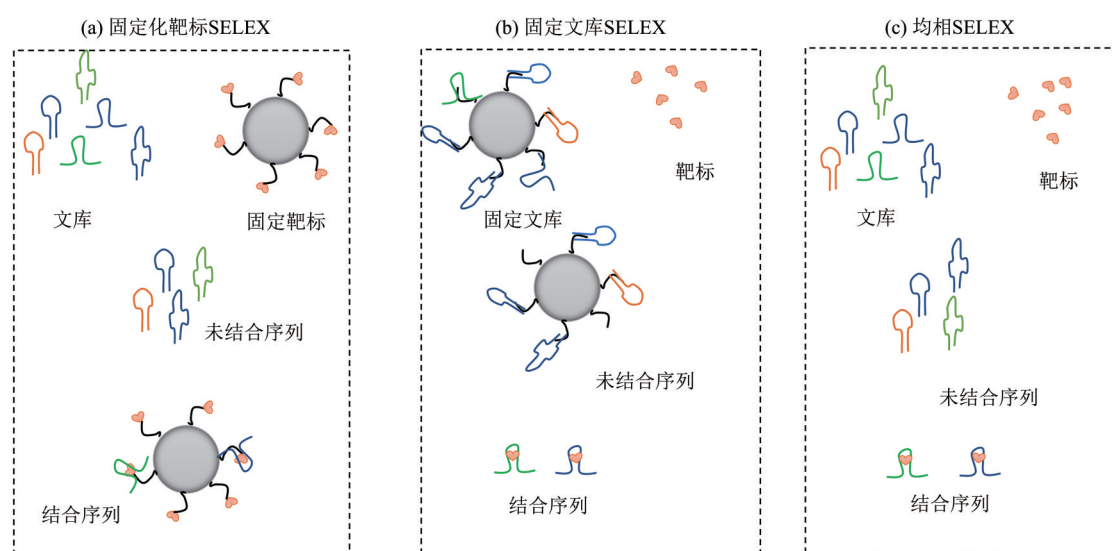


Fig. 4 Several common strategies for SELEX

图4 几种SELEX的常见策略

(a) 固定化靶标SELEX; (b) 固定文库SELEX; (c) 均相SELEX。

另外,甾体激素含有疏水的甾体母核结构,水溶性差,在筛选适配体方面也更具挑战,因为亲水的核酸适配体没有多种疏水基团来构建和调整疏水的“口袋”与靶标进行对接,这也是一个值得探究的问题。Yang等^[46]通过5种严格的筛选方式获得了三类甾体激素的高亲和力适配体,发现中等长度的天然核苷酸链(<40个核苷酸)具有较广的识别范围,具有四向连接和4×G_n的基序可形成疏水腔,易与甾体母核相互作用。关于疏水小分子的适配体筛选,也有研究者通过在结合缓冲液中加入甲醇、二甲亚砜或吐温,尽可能溶解难溶的靶标,在靠前的筛选轮次中增大靶标浓度以富集候选适配体,最后的轮次中减少靶标的浓度来提高选择的严格程度,这样也能成功得到难溶性小分子靶标的高亲和力、高特异性适配体^[47]。下面对部分已报道的甾体激素适配体根据分子结构和功能的不同分类进行总结。

2.1 雌激素

雌激素的代表性激素是E2,是适配体研究最多的一类甾体激素。最早报导的E2适配体出现在

2007年。Kim等^[8]使用传统SELEX技术,将E2固定化,经过7轮选择后分离出了E2的10条单链DNA适配体,并通过平衡过滤法测得适配体的 K_D 在0.1~3 $\mu\text{mol/L}$ 之间,进行电化学传感器的特异性测试时,发现此适配体对1-氨基蒽醌和2-甲氧基萘这两种结构相似物质几乎无亲和力,具有较好的特异性。Alsager等^[48]在2014年同样使用传统SELEX技术将靶标固定化,经过18轮选择后,得到了长度为75 mer的适配体,将此适配体与纳米颗粒进行偶联得适配体-纳米颗粒,加入一系列浓度的E2与适配体-纳米颗粒在2 mmol/L Tris-HCl缓冲液中共孵育、离心,通过荧光分光光度计检测上清液的E2的浓度,计算、拟合得到此适配体的 K_D 为50 nmol/L,特异性实验表明,此适配体不区分E2、P4和TES,由于都存在甾体母体结构,结构上只有细微差别,然而,对于不属于类固醇激素家族的分子(例如双酚A和双酚F),可以实现极好的区分。可以看出,针对相同的靶标,采用相同的筛选方法,不同的核酸库、筛选轮次和亲和力表征方法,最后得到的适配体序列、亲和力和特异性也

不同。

经 SELEX 筛选得到的适配体序列中通常含有冗余碱基, 这些碱基既不与靶标分子相互结合, 也不起接触支撑作用^[49]。在适配体传感器设计中, 这些冗余碱基可能并不利于适配体与靶标结合时复杂空间结构的形成^[50], 还会干扰适配体与纳米材料结合过程, 影响材料复合效果^[51-52]; Manimala 等^[53]也证实更短的适配体序列拥有更好的组织穿透力。因此, 许多研究者将目光转为将适配体截短, 保留适配体核心作用部位来达到优化的目的。Liu 等^[54]在原长 76 mer 的 E2 适配体截分为两个小片段 (图 5), 期望提高此适配体基于纳米金比色法检测 E2 的灵敏度, 结果表明, 分裂后的 P1+P2 建立的比色传感器将检测限 (LOD) 提高了 10 倍, 可以检测低至 0.1 $\mu\text{g/L}$ 的 E2, 分裂后的 P1+P2 对雌三醇、E1 和 19-去甲睾酮的分辨力虽较原长适配体略有降低, 却仍保留着区分雌激素样化合物双酚 A 和己烯雌酚的能力。Alsager 等^[9]通过删除核酸适配体序列中多余的侧翼核苷酸, 对 E2 适配体进行了截短优化, 生成了长度为 35 mer 和 22 mer 的适配体, 利用紫外可见分光光度法测得 K_D 分别为 14 nmol/L 和 11 nmol/L, 并发现截短后的适配体对 E2 的比色检测灵敏度可以提高 25 倍, 在特异性方面保持着对雌激素样化合物双酚 A 和双酚 F 的分辨力。Qiao 等^[13]同样对 2007 年报道的原始 E2 适配体进行了截短, 在不同的位点保留了发夹结构、内

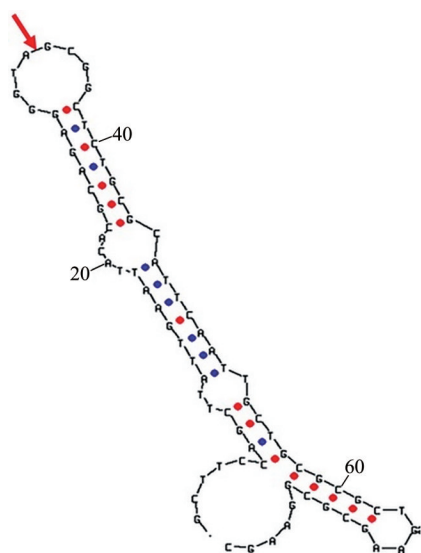


Fig. 5 Secondary structure of the E2 aptamer with length of 76 mer^[54]

图5 原长76 mer的E2适配体的二级结构^[54]
红色箭头表示该处截断产生P1和P2。

环和多环, 并保留适当的双螺旋区域, 这些特殊结构通常被认为是最小的结构域, 得到了具有不同序列的新型截短适配体, 其中长度为 15 mer 的 E09 适配体对 E2 有着较高的亲和力, 且保留着对双酚 A 等物质的分辨力, 在 E2 的分析检测中有着极大的应用潜力。

为了提高筛选适配体的特异性, Vanschoenbeek 等^[55]实现了结合 E2 结构上环戊二氢菲环的不同结构部分的两组适配体筛选 (图 6), 他们将两个核酸文库分别建立了 SELEX A 和 SELEX B 筛选程序, 两个筛选程序均通过反复的正、反选择进行。在 SELEX A 中, 以 E2 为正分子和结构类似物地塞米松作为反分子选择, 产生了特异性结合 E2 环戊烷并多氢菲 B、C、D 环上端的适配体; 在 SELEX B 中, 以 E2 作为靶分子进行正选择, 以结构类似物去甲睾酮作为反分子选择了针对 E2 的羟基化芳香 A 环的适配体。在两种方法的正选择步骤中, 将 E2 用作靶标分子, 以确保两组都能够结合 E2。在反选择步骤中, 使用地塞米松或去甲睾酮来将两组适配体集引导至 E2 的不同官能团, 以此达到能筛选出能够特异性结合 E2 某部分特定官能团的适配体。利用表面等离子共振技术测得两种适配体对 E2 的 K_D 分别为 36 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.9 $\mu\text{mol/L}$ 。在验证适配体的特异性时, 选用了几种甾体结构物质——EE、雄烯二酮、可的松、脱氧胆酸、E1、TES 等 6 种类固醇激素。在 SELEX A 中得到的适配体对 E2、EE 和 TES 均有较强的亲和和作用, 对其他激素有不同程度的结合。其中一条适配体对 E2 的亲和力明显高于 EE 和 TES, 且对雄烯二酮、可的松、脱氧胆酸、E1 这几种物质无结合现象。在 SELEX B 中得到的适配体中对 E2、EE 和 E1

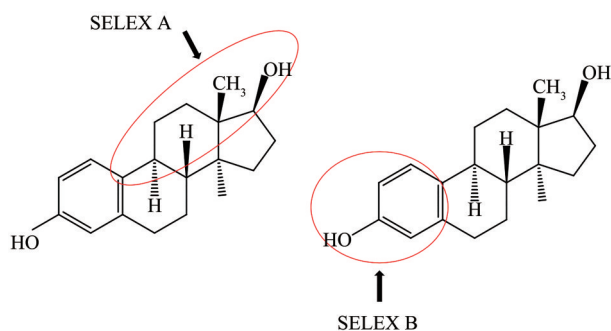


Fig. 6 Schematic illustration of the chemical structure of E2 with the most crucial epitopes for binding of aptamers of SELEX A and SELEX B

图6 SELEX A 和 SELEX B 中产生的适配体结合 E2 的最关键表位化学结构示意图

均有结合现象,其中,对EE的结合力强于E2,对E1的结合力弱于E2,但对其他激素无结合。这种针对E2的不同官能团具有亲和力的适配体可以应用于开发交叉反应性适配体传感器,为未来广泛甾体激素的现场实时监测提供了研究基础,但目前还未有学者将此类适配体应用到传感器设计中。

2.2 雄激素

TES是最常见的具有甾体结构的雄性激素。Skouridou等^[14]首次在2017年运用磁珠-SELEX,对TES的适配体进行了正、反选择,以磁珠为载体,将TES固定在磁珠上进行正选择,使用牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)作为反选择分子可除去对蛋白质分子具有亲和力的序列来增强适配体的特异性,使用P4、E2和达那唑作为反选择分子去除可与TES类似结构结合的适配体序列。最后得到了10个适配体候选物,使用微量热泳动法测得了其中的一个潜在G-四联体结构的适配体T5的 K_D 为5.7 nmol/L,证实了对睾酮的高亲和力,在特异性方面,此适配体与P4结合较弱,与E2没有结合。

19-去甲睾酮(19-nortestosterone, 19-NT)是一种将雄性激素经结构修饰后得到的雄性作用减弱、同化作用增强的合成甾体激素。目前尚未有19-NT的特异性适配体筛选成功的相关文献报道。白文芸^[56]利用其结构类似物——截短后的原始E2适配体进行亲和力验证,发现片段化后的原始E2适配体对19-NT具有很高的亲和性,并设计了适配体夹心荧光猝灭法实现了对19-NT的快速检测。

2.3 孕激素

Jimenez等^[15]首次对P4适配体进行了筛选,得到了命名为P4G13的最佳适配体,长度为60 mer。通过电化学阻抗谱和荧光分析法计算得到适配体的 K_D 为17 nmol/L,且适配体具有较好的特异性,与E2和炔诺酮有较弱结合。同样,为了优化此P4适配体,Alhadrami等^[16]在2017年对其进行了截短,通过在不同位点用荧光素标记不同的截短适配体合成FDNA,以猝灭剂标记DNA互补序列为QDNA,设计了截短的适配体/DNA双链结构。最初的双链结构中,荧光团和猝灭剂密切接触,荧光强度最小。然而,在P4存在的情况下,由于与靶标结合后适配体的构象发生变化,导致FDNA、QDNA解离,荧光强度增加。其中一个被

截短的适配体显示出对P4的高亲和力,同时保留了特异性,与E2、双酚A和维生素D有较弱结合,截短后长度为25 mer,使用荧光检测法测得 K_D 为2.1 nmol/L,比原始适配体提高了16倍。截短的P4适配体被开发为新型的荧光适配体传感器,已用于自来水和尿样中孕酮的检测。

2.4 皮质激素

COR是典型的皮质激素,张岭等^[18]在2011年通过靶标诱导变构解离SELEX技术对COR适配体进行了筛选,以磁珠为介质,氨基化的寡聚核苷酸序列(NH_2 -P3)在1,4-苯二异硫氰酸酯的作用下与氨基磁珠偶联, NH_2 -P3与核酸文库可通过碱基互补配对将文库固定。加入靶标孵育,当COR存在时,与随机序列相互作用导致核酸序列从磁珠上解离;收集解离的核酸序列,进行PCR扩增,制备次级文库,再进行第2轮的筛选,获得与靶标特异结合的核酸适配体。12轮筛选后,测序获得10个适配体,组成上均为高G含量的序列。

Martin等^[17]也在2014年使用Capture-SELEX对COR适体进行了筛选,将生物素化DNA探针固定在链霉亲和素包被的磁珠上,捕获探针与DNA文库的5'区域互补。当COR被添加到含有DNA文库的磁珠溶液中时,结合序列与靶标相互作用时发生构象变化,并从磁性珠子上分离、洗脱下来。从第3轮开始,进行反选择步骤,将P4添加到DNA文库与磁珠的孵育池中,丢弃洗脱的序列,并将COR加入到文库中,保持与cDNA/磁珠的结合。最后使用微量热泳动法测得其中一条适配体的 K_D 为6.9 $\mu\text{mol/L}$ 。此适配体也具有较好特异性,可区分去甲肾上腺素、肾上腺素和胆酸。

Jauset-Rubio等^[36]在2019年利用counter-SELEX、高通量测序技术和生物信息学等工具,在一锅选择中实现了对3个不同但结构相似的甾体激素——E2、P4和TES的筛选。结合实验表明,每种激素的适配体对各自的靶标均具有高亲和力,并且计算得到的 K_D 类似于先前报道的使用传统SELEX方法选择的甾体激素适配体。最后,将筛选出的适配体应用于微量滴定板分析中,还对每种靶标的适配体与其他两种非靶甾体进行了检测,证明了这些适配体的特异性^[36]。已有报道的部分甾体激素适配体的筛选策略、序列及长度、筛选体系、表征方法和亲和性如表2所示。

Table 2 The isolation strategy, sequence and length, buffer, characterization method, affinity and specificity of some steroid hormone aptamers have been reported

表2 已有报道的部分甾体激素核酸适配体的筛选策略、序列及长度、筛选体系、表征方法、亲和性和特异性								
甾体激素	筛选策略	适配体的序列 (5'→3')、部分命名及长度	缓冲液	表征方法	亲和性 (K_D /LOD)	特异性	参考文献	
雌二醇	固定靶标SELEX	GCTTCCAGCTTATTGAATT ACACGCAGAGGGTAGCGG CTCTGCGCATTCAATTGCT GCGCGCTGAAGCGCGGAA GC(E00, 76 mer)	100 mmol/L Tris-HCl, 200 mmol/L NaCl, 25 mmol/L KCl, 10 mmol/L MgCl ₂ , 5%乙醇, pH 8.0	平衡 过滤法	0.13 μmol/L	对 1-氨基蒽醌和 2-甲氧基蒽两种类似物无亲和力	[8]	
		固定靶标SELEX	ATACGAGCTTGTTCAATAC GAAGGGATGCCGTTTGGGC CCAAGTTCGGCATAAGTGTG GTGATAGTAAGAGCAATC (E10, 75 mer)	2 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L NaCl, 0.5 mmol/L KCl, 0.2 mmol/L MgCl ₂ , 0.1 mmol/L CaCl ₂ , 5%乙醇, pH 7.5	荧光 检测法	50 nmol/L	不能区分E2、TES 和 P4 这三种甾体结构物质, 能区分双酚A和双酚F	[48]
		截短SELEX	GCGGCTCTGCGCATTCAAT TGCTGCGCGCTGAAGCGC GGAAGC (E01a, 43 mer)	——	纳米金 比色法	0.1 μg/L	P1+P2 对 雌三醇、雌酮和19-去甲睾酮的分辨力较原长适配体略有降低, 仍保持着区分雌激素样化合物双酚A和己烯雌酚的能力	[54]
			GCTTCCAGCTTATTGAATT ACACGCAGAGGGTA (E01b, 33 mer)	——	纳米金 比色法	0.1 μg/L		[54]
	截短SELEX	AAGGGATGCCGTTTGGGC CCAAGTTCGGCATAAGTG (E10a, 35 mer)	2 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L NaCl, 0.5 mmol/L KCl, 0.2 mmol/L MgCl ₂ , 0.1 mmol/L CaCl ₂ , 5%乙醇, pH 7.5	紫外可见 分光光度法	14 nmol/L	对 P4 和 TES 有部分响应, 保持着对双酚A和双酚F的分辨力	[9]	
		GCCGTTTGGGCCCAAGTT CGGC (E10b, 22 mer)	2 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L NaCl, 0.5 mmol/L KCl, 0.2 mmol/L MgCl ₂ , 0.1 mmol/L CaCl ₂ , 5%乙醇, pH 7.5	紫外可见 分光光度法	11 nmol/L	对 P4 和 TES 有部分响应, 保持着对双酚A和双酚F的分辨力	[9]	
		固定靶标SELEX	GGCACGGGGAGGCAGGGG AGAGTGACACGCGGTCGG TGAC (E2Apt1, 40 mer)	50 mmol/L Tris-HCl, 300 mmol/L NaCl, 5 mmol/L MgCl ₂ , pH 7.5	平衡过 滤法	0.6 μmol/L	对 E2和E1 有很强的结合力, 与乙炔雌二醇无结合	[10]
			GGCACGTGACGGGGGATC TGGGATACCTGGCGGATCC GTGT (E2Apt2, 41 mer)	50 mmol/L Tris-HCl, 300 mmol/L NaCl, 5 mmol/L MgCl ₂ , pH 7.5	平衡过 滤法	0.56 μmol/L	对 E2和E1 有很强的结合力, 与乙炔雌二醇无结合	[10]

续表2

甾体激素	筛选策略	适配体的序列 (5'→3')、部分命名及长度	缓冲液	表征方法	亲和性 (K_D /LOD)	特异性	参考文献
	截短SELEX	CGCGCTGAAGCGCGG (E09, 15 mer)	——	纳米金比色法	0.02 mg/L	对 P4 有部分响应,可分辨双酚 A、四溴双酚 A、二烯雌酚	[13]
	固定靶标 SELEX	AGCAGCACAGAGGTCAGT TCGTCGAATCAGCACCTCT GCATAGGTTACGTTTATAC TGCGCCTATGCGTGCTACC GTGAA (80 mer)	1×PBS, 10%乙醇, pH 7.4	表面等离子体共振法	0.36 μmol/L	对 E2 的亲合力明显高于 EE 和 TES, 且对雄烯二酮、可的松、脱氧胆酸、E1 这几种物质无结合现象	[55]
		TGTGTGTGAGACTTCGTTC CGGCGATGGGGTAGGGGG TGGGAGGGGCCGGACGGA GGGCAGCAAGGCATCAG AGGTAT(80 mer)	1×PBS, 10%乙醇, pH 7.4	表面等离子体共振法	0.9 μmol/L	对 E2、EE 和 E1 均有结合现象, 其中, 对 EE 的结合力强于 E2, 对 E1 的结合力弱于 E2, 但对其他激素无结合	[55]
雌酮	固定靶标 SELEX	AGCCATCGACGGTCGAAA GCTAACATACACGCAAAG CGGT (EEApt1, 40 mer)	50 mmol/L Tris-HCl, 300 mmol/L NaCl, 5 mmol/L MgCl ₂ , pH 7.5	平衡过滤法	0.95 μmol/L	对 EE 有高于 E2/E1 53 倍的亲和力	[10]
		AGCGGAACGTGGGGAGCT TGCGGGCATAAACTATG GGA (EEApt2, 40 mer)	50 mmol/L Tris-HCl, 300 mmol/L NaCl, 5 mmol/L MgCl ₂ , pH 7.5	平衡过滤法	0.46 μmol/L	不结合 E2、E1 和乙炔雌二醇	[10]
睾酮	固定靶标-SELEX	TAGGGAAGAGAAGGACAT ATGATTGCGTGGGTAGGAA GGGGCGGTGTGATCTGAAT CGTTCGATTGACTAGTACA TGACCACTTGA (86 mer)	20 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 100 mmol/L NaCl, 2 mmol/L MgCl ₂	微量热泳动法	5.7 nmol/L	与 P4 结合较弱, 与 E2 没有结合	[14]
孕酮	固定靶标 SELEX	GCATCACACACCGATACTC ACCCGCCTGATTAACATTA GCCCACCGCCACCCCGC TGC (P4G13, 60 mer)	0.5 mol/L MES 缓冲液, pH 4.7	电化学阻抗谱和荧光测定法	17 nmol/L	与 E2 和炔诺酮有较弱结合	[15]
	截短-SELEX	GATTAACATTAGCCCACCG CCCACC (P4G13T2, 25 mer)	——	荧光法	2.1 nmol/L	与 E2、双酚 A 和维生素 D 有较弱结合	[16]
皮质醇	固定文库-SELEX	GGAATGGATCCACATCCAT GGATGGGCAATGCGGGGG GGAGAATGGTTGCCGCAC TTCGGCTTCACTGCAGACT TGACGAAGCTT (86 mer)	50 mmol/L Tris, 137 mmol/L NaCl, 5 mmol/L MgCl ₂ , pH 7.4	微量热泳动法	6.9 μmol/L	可区分去甲肾上腺素、肾上腺素、胆酸	[17]

3 计算机模拟技术应用于甾体激素适配体的研究

目前已有大量的研究报道各种核酸适配体的先进筛选方法, 并开发了多样的生物化学传感器, 但核酸适配体与靶标的相互作用机制研究却相对较少, 适配体-靶标作用体系的物理特征仍不明晰, 如何进行适配体序列的优化还尚待解决, 这也限制核酸适配体的广泛应用。近年来各种生物信息学工具开始在生物技术研究中大放异彩, 已有多位研究者利用计算机辅助手段对适配体和靶标进行研究^[57-60], 在借助计算机技术对核酸适配体建模及适配体的计算机设计中, 使用到一系列的计算机方法, 如分子对接、分子动力学和统计分析^[61]。常见的计算机辅助适配体筛选的经典流程从结构预测建模开始, 需要对核酸适配体及靶标进行3D建模^[62]; 然后将适配体与靶标进行分子对接, 接下来进行分子动力学模拟, 这一步可以评估适配体-靶标复合物的稳定性, 并以更高的精度确定结合能; 接着, 分析适配体与靶标的相互作用, 并对所研究的适配体进行突变; 随后返回至建模、分子对接等步骤以找到与靶标结合力更高的适配体^[59, 63-64]。

完整的计算机辅助适配体后优化过程通常步骤较多、耗时较长, 也有部分研究者根据现有的研究基础以及现实需要, 通过分析适配体的结构和分子对接等方式为适配体的开发、优化和应用提供理论和实践基础。

3.1 通过适配体的结构辅助筛选

核酸适配体与靶标的高度亲和力来源于它多样的空间结构, 这种丰富的空间结构通常由一些小的结构功能单元组成, 如茎环、G-四联体、发夹结构等。在甾体激素适配体的研究中, 一种是小的结构功能单元与适配体的功能探索研究。Vanschoenbeek等^[55]在针对E2结构中的环戊四氢菲和羟基芳香烃两个官能团分别进行适配体筛选时, 使用Mfold软件模拟适配体, 发现可识别环戊四氢菲位点的适配体序列中, 68%的序列存在3个通过公共交叉点连接的双螺旋臂组成的三通结构。Kato等^[65]也发现适配体的三通结构, 出现在结合同样含甾体结构的胆酸适配体中, 预测可能是三个茎连接的交叉点形成疏水腔与胆酸可以相互作用。后来, Yang等^[66]利用一个定向生成三通结构的DNA库生成了一系列三向连接的适配体, 这些适

配体能以不同的亲和力和选择性与四种甾体物质结合。在定向结合E2结构的羟基芳香烃结构的适配体中, Vanschoenbeek等^[55]使用QGRS映射器预测适配体则存在G-四联体结构。G-四联体结构是将一个共同的支架与在目标识别中起作用的不同环基元结合在一起, G-四联体结构允许增强疏水性结合各种类型的目标^[5, 67]。Skouridou等^[14]在关于TES的适配体筛选结果中, 使用Mfold软件预测了10个适配体候选物可能的构象, 发现几个适配体存在多个茎环结构, 以及上述结合疏水分子中常见的三通结构; 其中也有一个特殊的适配体T5, 其构象更简单, G含量高达35%, 使用QGRS映射器预测适配体中存在着G-四联体的构象。张岭等^[18]对皮质醇的适配体筛选中, 获得10个皮质醇的适配体候选物。序列分析显示, 特异核酸适配体为高G含量核酸序列, 软件预测其中8个序列主要以G-四联体二级结构为主。预测所有核酸序列的二级结构, 存在着G-四联体、发夹、茎环等特异性结构。后来, Jauset-Rubio等^[36]在对几种甾体激素适配体的一锅选择中, 也使用Mfold软件在25°C, 100 mmol/L NaCl和2 mmol/L MgCl₂的条件下对E2、P4和TES适配体的二级结构进行了预测, 也存在多个茎环结构。

综上, 研究者们对甾体激素中E2、P4、TES和皮质醇的适配体结构的大量研究, 可以找出一些共同点, 适配体在与甾体结构相互作用过程中, 是通过丰富的空间结构与靶标产生各种力的作用, 这种丰富的空间结构由一些小的结构功能单元组成, 如茎环、G-四联体、发夹结构等, 其中G-四联体、三通结构在甾体激素的适配体中出现得最多。有研究者指出, 在进行对甾体激素的实地检测分析时, 待测的溶液可以加入Mg²⁺、K⁺和Na⁺等离子, 有助于G-四联体结构的形成, 从而稳定测量的条件, 实现对甾体激素的快速精准分析^[18]。

3.2 通过分子对接辅助筛选

另外一种常见的计算机辅助适配体筛选的方式就是分子对接, 分子对接相比于结构分析更加直观, 可以通过建模、对接和打分的流程来研究分子间相互作用并预测其结合模式和亲和力。常见的可用于核酸适配体与靶标的分子对接软件有ZDOCK、NPDOCK、AutoDock和AutoDock Vina等^[68]。但由于预测软件无法考虑到体系中多种复杂因素, 通过预测软件获得的三级结构精确度不高, 与实际情况的适配体结构差距较大, 往往需要通过GROMACS等分子动力学软件重新计算出体

系中适配体最合适的分子结构。分子动力学软件主要是依靠牛顿力学的基本原理,模拟分子间的相互作用和运动变化,可以准确预测分子间的结合模式和结合能力,直观地展现分子间发生相互作用的动态过程^[61]。

甾体激素中关于E2适配体的结构与功能研究最多。Hilder等^[11]运用刚性分子对接、分子动力学模拟了2017年之前报道的和自己设计的E2适配体与E2相互作用时的特异性空间结构,并得出重要结论,E2与适配体相互作用时会结合到适配体共有的胸腺嘧啶环区域,且与E2有高亲和力的适配体存在着四个重要特征:a.适配体存在由T或G碱基组成的环状结构;b.环的大小和结构会影响与E2的结合强度;c.G与E2的结合比T强;d.适配体与E2的结合力主要是E2分子中芳香环与胸腺嘧啶环区的核酸碱基之间的范德华力。该研究证明了分子动力学模拟技术在适配体科学研究中的有效性。

Eisold等^[69]使用分子对接、分子动力学模拟

研究了截短后的35 mer E2适配体在水溶液中与E2的相互作用特点,对E2适配体的二级、三级结构预测(图7)分析了适配体与E2之间的氢键、水介导的氢键、 π - π 堆积和疏水作用力等。研究发现,与E2强烈相互作用的优势碱基是T12、T24和C26、E2与适配体的这几个碱基形成非共价键,并贡献了大部分的结合能。除上述的优势碱基外,还有与E2距离较小的碱基G11、T12、G23和T25,也参与了与E2的相互作用。由于E2是疏水小分子且为刚性骨架,疏水相互作用是评估E2结合的关键,该研究对非选择性疏水作用和水介导的氢键也进行了分析,发现它们也有助于E2在适配体结构内的结合;同时,作者也确定了适配体的5'和3'端不与E2产生任何相互作用,因此适配体可以自由地在两端被固定。适配体与E2的相互作用时的空间构象如图8所示。此项研究对有针对性地设计适配体结构提供了实践基础,有助于实现特异性结合E2的适配体优化。

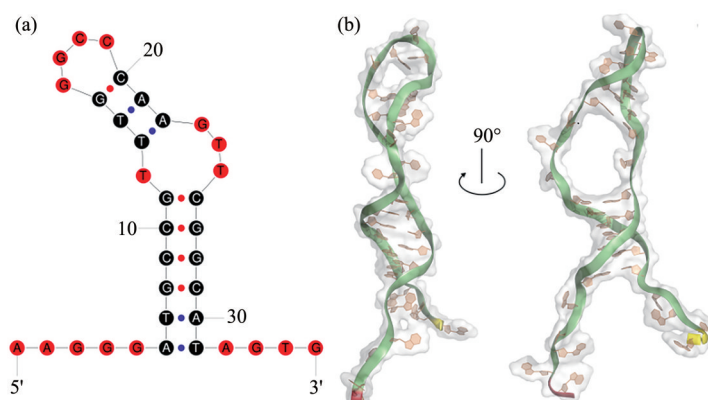


Fig. 7 The secondary structure (a) and tertiary structure (b) of E2 aptamer with length of 35 mer^[69]

图7 长度为35 mer的E2适配体的二级结构(a)及三级结构(b)^[69]

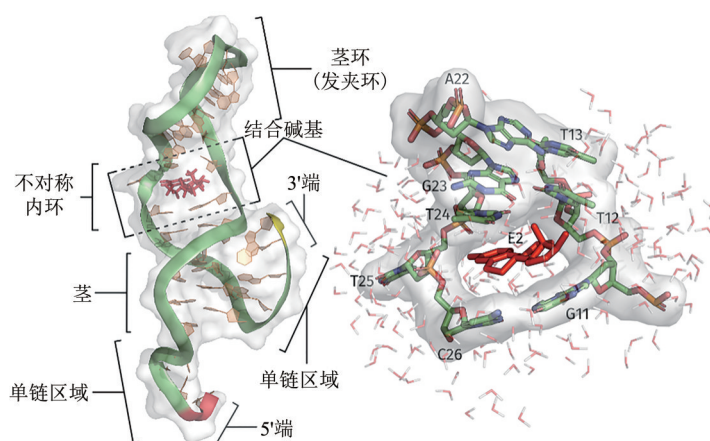


Fig. 8 Schematic representation of the spatial conformation of the 35 mer aptamer interacting with E2^[69]

图8 35 mer适配体与E2相互作用的空间构象示意图^[69]

4 适配体传感器在甾体激素检测中的应用

适配体传感器, 即基于适配体构建的生物传感器。现阶段, 基于不同原理的适配体传感器已被开发用于检测甾体激素, 包括荧光适配体传感器、电化学适配体传感器、比色适配体传感器等。毫无疑问, 基于适配体识别的独特优势, 可用于甾体激素的适配体传感器真正进入应用市场已经胜利在望。

4.1 电化学适配体传感器

电化学适配体传感器, 是以适配体特异性识别靶标为基础, 将适配体作为识别原件, 通过分析目标物结合前后电极表面的电化学响应信号变化来对目标物进行定量检测。适配体可以通过吸附、自组装和共价键结合等方式固定在电极表面。电化学检测法具有灵敏度高、测量范围宽、准确度高等优点^[70]。

根据是否有标记物标记, 可分为标记型和非标记型的电化学适配体传感器。非标记型是指不在适配体标记电话性信号分子, 适配体固定到电极表面后直接与目标物结合反应, 会产生电流、电压或阻抗等变化, 从而确定待测物质的量。Jimenez 等^[15]构建了用于快速检测 P4 的阻抗型电化学传感器。通过自组装将核酸适配体固载在工作电极表面上, 引入目标物, 适配体与目标物特异性结合, 使得适配体构象发生改变, 电子转移阻抗增强, 该传感器对 P4 的线性检测范围为 10~60 $\mu\text{g/L}$, 检出限可达 0.90 $\mu\text{g/L}$ 。标记型电化学适配体传感器是将具有电话性或催化活性的标记物通过物理吸附或化学修饰的方式标记在适配体上, 通过适配体结合靶标物质前后电话性物质产生的电信号变化, 实现对靶标的定量检测。常见的功能性标记物有亚甲基蓝 (MB)、辣根过氧化物酶 (HRP)、二茂铁 (Fc) 和生物酶等^[71]。刘玉洁等^[72]用制备的二硫化钴纳米片与金纳米颗粒的复合物修饰玻碳电极, 引入 E2 适配体及其部分互补的富 G 杂交链, 以 MB 为电化学指示剂构建电化学传感器实现了对 E2 的测定, 该传感器具有一个较宽的线性检测范围 ($1.0 \times 10^{-9} \sim 1.0 \times 10^{-12} \text{ mol/L}$), 检测限可达 $7.2 \times 10^{-13} \text{ mol/L}$ 。

与标记型电化学传感器相比, 非标记型操作简单、无需标记、且对靶分子影响小, 从实际应用出发, 非标记性电化学传感器的优势较大^[73]。考虑到甾体激素的检测环境多样化, 小型化、微型化的电化学传感设备, 是现场快速检测较为理想的检测装置。随着近年来纳米技术的不断成熟, 适配体传

感器设计策略不断得到优化, 这为开发检测甾体激素的电化学适配体传感器的发展起到了积极的推动作用。

4.2 荧光适配体传感器

荧光检测法是基于荧光染料、荧光基团、荧光纳米材料等作为信号实现对靶标的检测, 具有灵敏度高、操作简单、易自动化的优点。有研究者根据荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 原理实现了对甾体激素的特异性检测。刘晓等^[74]以黑磷晶体为原料, 利用超声辅助液相剥离技术制备了黑磷纳米片作为荧光受体, 基于 6-羧基荧光素标记的适配体与黑磷纳米片之间的 FRET 转移机制, 建立了荧光适配体传感器, 可对 E2 进行快速定量检测, 检测限为 1.0 $\mu\text{g/L}$ 。史学丽等^[75]基于 FRET 原理, 采用水热合成法制备了铜掺杂的镓酸锌长余辉纳米颗粒, 建立了一种基于荧光适配体传感器 E2 定量分析方法, 检测限为 0.4 $\mu\text{g/L}$, 该适配体传感器在检测目标激素时灵敏度高、特异性强, 并有效避免了牛奶基质等因素产生的荧光干扰。

4.3 比色适配体传感器

纳米金 (AuNPs) 是直径在 1~100 nm 的微小颗粒, 制备简单且吸附力强, 在分散状态下呈红色, 发生凝聚后变为蓝色。适配体可以吸附到 AuNPs 表面, 保护 AuNPs 免于在高盐度下聚集变蓝; 当加入靶标后, 适配体与靶标高度亲和, 从 AuNPs 上解离下来与靶标结合, 使 AuNPs 粒子在高盐度下聚集, 溶液由红变蓝。基于适配体的 AuNPs 比色法结果肉眼可见、操作简单快速、易于现场检测。

王欣等^[76]建立了基于核酸适配体的 AuNPs 比色传感器检测 E2, 将 E2 特异性适配体作为传感探针, 实验得出, 当 AuNPs 与核酸适配体浓度比为 1:11 000 时, 在牛奶中 E2 的检测限为 0.183 nmol/L。陈爱亮课题组^[77]基于 AuNPs 比色原理, 构建了快速检测 E2 的 AuNPs 比色传感器, 可在 20 min 内完成检测, 灵敏度可达 10 $\mu\text{g/L}$, 线性范围为 10~10 000 $\mu\text{g/L}$ 。由于长链适配体与 AuNPs 亲和力高于短链适配体的亲和力, 为了提高 AuNPs 比色法检测 E2 的灵敏度, 陈爱亮等^[54]又将 76 mer 适配体剪切为 P1+P2 两段, 并建立了 E2 的比色检测方法, 结果显示灵敏度提高了 10 倍, 检测限可达 0.1 $\mu\text{g/L}$ 。2015 年, Alsager 等^[9]利用圆二色谱测定到该课题组 2014 年筛选到的 E2 适配体上有 3 个

茎环, 结合 AuNPs 适配体比色法并根据 3 个环及与靶标的结合位点, 将该 75 mer 的适配体截短为 35 mer 和 22 mer 两个短链适配体, 并建立 AuNPs 比色传感器检测 E2, 该方法的检测限为 200 pmol/L, 检测灵敏度提高了 25 倍。在此基础上, Martin 等^[17] 在 2014 年使用 Capture-SELEX 技术筛选得到 COR 适配体后, 基于 AuNPs 建立了比色传感器, 检测范围为 150~600 nmol/L, 可满足人血清中游离皮质醇的浓度变化范围 (100~500 nmol/L), 此传感器具有较好选择性, 对其他应激生物标志物如肾上腺素和其他结构类似的分子无反应。基于核酸适配体的 AuNPs 比色分析检测方法具有较高的灵敏度和特异性, 简单、快速, 具有良好的应用价值, 可开发为现场及时检测仪器。需要说明的是, 由于比色法多采用溶液相均相体系进行研究, 在进行实际样品分析时, AuNPs 的选择性会受到金属离子或其他杂质的影响, 部分杂质和靶标本身也会诱导 AuNPs 聚集^[78], 这些因素会直接影响到结果的准确性和可靠性, 因此在实际操作过程中, 要考虑各种因素干扰以及靶标物质是否会引起 AuNPs 聚集, 聚焦抗干扰能力提升是比色法的重要研究方向^[79]。

5 总结与展望

适配体在甾体激素的检测领域具有广阔的应用空间, 利用适配体识别甾体靶标, 建立基于传感技术的检测方法, 有望实现实际样品中甾体激素的快速和灵敏检测。目前, 针对甾体激素的适配体筛选, 如文中所述, 已有雌激素、雄激素、孕激素和皮质激素的报道, 其中 E2 的研究最为广泛, 然而具有良好应用效果的甾体激素的适配体数量远不能满足实际需要。目前适配体在甾体激素检测领域也还存在诸多限制: a. 对于甾体激素的适配体研究还不够透彻, 适配体筛选仍是一个较大的工程, 小分子靶标或是文库的固定化仍是一个挑战, 甾体激素适配体的高效筛选仍然有很大的发展空间; b. 还需要深入分析适配体-靶标构象关系, 深入理解甾体激素的适配体筛选的本质问题和 SELEX 过程存在的不足, 建立甾体激素适配体的亲和力和特异性一致性评价标准, 这也是甾体激素适配体得以广泛应用的关键; c. 关于甾体激素的生物适配体传感器已有大量实验室的研究报道, 真正进入市场的适配体传感器还未有一例, 如何把实验室的研究成果批量、集成生产, 转化为灵敏、稳定、低成本快速的检测设备 (如试纸), 还有很长的路要走。相信在

众多学者的共同努力下, 甾体激素等小分子靶标的适配体筛选与应用研究将会越来越成熟, 越来越完善。

参 考 文 献

- [1] Dorfman R I. Biochemistry of the steroid hormones. *Annu Rev Biochem*, 1957, **26**: 523-560
- [2] Daxenbichler G. Steroid hormone receptors: mode of action and methods for detection. *Med Lab (Study)*, 1981, **34**(11): 278-286
- [3] Islam R M, Bell R J, Handelsman D J, *et al.* Longitudinal changes over three years in sex steroid hormone levels in women aged 70 years and over. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2021, **94**(3): 443-448
- [4] 杨雷, 张晋娜, 史文俊, 等. 类固醇激素在环境中的污染现状及归. *生态毒理学报*, 2019, **14**(5): 1-21
Yang L, Zhang J N, Shi W J, *et al.* *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2019, **14**(5): 1-21
- [5] Wang T, Chen C Y, Larcher L M, *et al.* Three decades of nucleic acid aptamer technologies: lessons learned, progress and opportunities on aptamer development. *Biotechnol Adv*, 2019, **37**(1): 28-50
- [6] Ellington A D, Szostak J W. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 1990, **346**(6287): 818-822
- [7] Darmostuk M, Rimpelova S, Gbelcova H, *et al.* Current approaches in SELEX: an update to aptamer selection technology. *Biotechnol Adv*, 2015, **33**(6): 1141-1161
- [8] Kim Y S, Jung H S, Matsuura T, *et al.* Electrochemical detection of 17 beta-estradiol using DNA aptamer immobilized gold electrode chip. *Biosens Bioelectron*, 2007, **22**(11): 2525-2531
- [9] Alsager O A, Kumar S, Zhu B C, *et al.* Ultrasensitive colorimetric detection of 17 beta-estradiol: the effect of shortening DNA aptamer sequences. *Anal Chem*, 2015, **87**(8): 4201-4209
- [10] Akki S U, Werth C J, Silverman S K. Selective aptamers for detection of estradiol and ethynylestradiol in natural waters. *Environ Sci Technol*, 2015, **49**(16): 9905-9913
- [11] Hilder T A, Hodgkiss J M. The bound structures of 17 beta-estradiol-binding aptamers. *ChemPhysChem*, 2017, **18**(14): 1881-1887
- [12] Liu J C, Bai W H, Niu S C, *et al.* Highly sensitive colorimetric detection of 17 beta-estradiol using split DNA aptamers immobilized on unmodified gold nanoparticles. *Sci Rep*, 2014, **4**: 7571
- [13] Qiao L, Wang H, He J L, *et al.* Truncated affinity-improved aptamers for 17 beta-estradiol determination by AuNPs-based colorimetric aptasensor. *Food Chem*, 2021, **340**: 12181
- [14] Skouridou V, Jauset-Rubio M, Ballester P, *et al.* Selection and characterization of DNA aptamers against the steroid testosterone. *Microchim Acta*, 2017, **184**(6): 1631-1639
- [15] Jimenez G C, Eissa S, Ng A, *et al.* Aptamer-based label-free impedimetric biosensor for detection of progesterone. *Anal Chem*, 2015, **87**(2): 1075-1082
- [16] Alhadrami H A, Chinnappan R, Eissa S, *et al.* High affinity truncated DNA aptamers for the development of fluorescence based progesterone biosensors. *Anal Biochem*, 2017, **525**: 78-84

- [17] Martin J A, Chavez J L, Chushak Y, *et al.* Tunable stringency aptamer selection and gold nanoparticle assay for detection of cortisol. *Anal Bioanal Chem*, 2014, **406**(19): 4637-4647
- [18] 张岭, 王新兴, 战锐, 等. 靶标诱导变构解离 SELEX 技术筛选皮质醇特异核酸适配体. *军事医学*, 2011, **35**(10): 732-736
Zhang L, Wang X X, Zhan R, *et al.* *Mil Med Sci*, 2011, **35**(10): 732-736
- [19] Wolthers B G, Kraan G P B. Clinical applications of gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry of steroids. *J Chromatogr A*, 1999, **843**(1-2): 247-274
- [20] Travers S, Martinerie L, Bouvattier C, *et al.* Multiplexed steroid profiling of gluco- and mineralocorticoids pathways using a liquid chromatography tandem mass spectrometry method. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2017, **165**: 202-211
- [21] Guedes-Alonso R, Montesdeoca-Esponda S, Sosa-Ferrera Z, *et al.* Liquid chromatography methodologies for the determination of steroid hormones in aquatic environmental systems. *Trends Environ Anal Chem*, 2014, **3**: 14-27
- [22] Kaur H. Aptamer conjugated quantum dots for imaging cellular uptake in cancer cells. *J Nanosci Nanotechnol*, 2019, **19**(7): 3798-3803
- [23] Futami K, Hirao I, Hirao M. DNA aptamer binding to cancer cell: US, 10837964. 2020-11-17
- [24] Kim J P, Park C H, Sim S J. Aptamer biosensors for label-free colorimetric detection of human IgE based on polydiacetylene (PDA) supramolecules. *J Nanosci Nanotechnol*, 2011, **11**(5): 4269-4274
- [25] Strehlitz B, Nikolaus N, Stoltenburg R. Protein detection with aptamer biosensors. *Sensors*, 2008, **8**(7): 4296-4307
- [26] Kim S Y. Nucleic acid aptamer which specifically binds to bisphenol A: US, 08410256. 2013-04-02
- [27] Kumar S, McNatty K. Aptamer biosensors useful for detecting hormones, hormone mimics, and metabolites thereof: US, 10844386. 2020-11-24
- [28] Liu Y, Deng Y, Li T T, *et al.* Aptamer-based electrochemical biosensor for mercury ions detection using AuNPs-Modified glass carbon electrode. *J Biomed Nanotechnol*, 2018, **14**(12): 2156-2161
- [29] Liu Y, Lai Y X, Yang G J, *et al.* Cd-aptamer electrochemical biosensor based on AuNPs/CS modified glass carbon electrode. *J Biomed Nanotechnol*, 2017, **13**(10): 1253-1259
- [30] Ullah N, Chen W, Noureen B, *et al.* An electrochemical Ti3C2Tx aptasensor for sensitive and label-free detection of marine biological toxins. *Sensors*, 2021, **21**(14): 4938
- [31] Ye W, Liu T M, Zhang W M, *et al.* Marine toxins detection by biosensors based on aptamers. *Toxins*, 2020, **12**(1): 1
- [32] Guo X, Chen G H. Capillary electrophoresis-based methodology for screening of oligonucleotide aptamers. *Biomed Chromatogr*, 2021, **35**(7): e5109
- [33] 徐龙峰, 王丽. 核酸适配体筛选方法的研究进展. *中国生物制品学杂志*, 2015, **28**(4): 429-433
Xu L F, Wang L. *Chinese Journal of Biologicals*, 2015, **28**(4): 429-433
- [34] Guo K T, Paul A, Schichor C, *et al.* Cell-SELEX: novel perspectives of aptamer-based therapeutics. *Int J Mol Sci*, 2008, **9**(4): 668-678
- [35] Sola M, Menon A P, Moreno B, *et al.* Aptamers against live targets: is *in vivo* SELEX finally coming to the edge?. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, **21**: 192-204
- [36] Jauset-Rubio M, Botero M L, Skouridou V, *et al.* One-pot SELEX: identification of specific aptamers against diverse steroid targets in one selection. *ACS Omega*, 2019, **4**(23): 20188-20196
- [37] Ruscito A, Derosa M C. Small-molecule binding aptamers: selection strategies, characterization, and applications. *Front Chem*, 2016, **4**: 14
- [38] Pfeiffer F, Mayer G. Selection and biosensor application of aptamers for small molecules. *Front Chem*, 2016, **4**: 25
- [39] Chen X J, Huang Y K, Duan N, *et al.* Selection and characterization of single stranded DNA aptamers recognizing fumonisin B-1. *Microchim Acta*, 2014, **181**(11): 1317-1324
- [40] Bruno J G. In vitro selection of DNA to chloroaromatics using magnetic microbead-based affinity separation and fluorescence detection. *Biochem Biophys Res*, 1997, **234**(1): 117-120
- [41] 顾华杰. 四种海洋生物毒素适配体非固定化筛选方法及生物检测应用研究[D]. 无锡: 江南大学, 2018
Gu H J. Study on Non-immobilized Screening of Aptamers Against Four Marine Biotoxins and The Application in Bioassay [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2018
- [42] Yu H X, Alkhamis O, Canoura J, *et al.* Advances and challenges in small-molecule DNA aptamer isolation, characterization, and sensor development. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2021, **60**(31): 16800-16823
- [43] Nutiu R, Li Y F. *In vitro* selection of structure-switching signaling aptamers. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2005, **44**(7): 1061-1065
- [44] Mendonsa S D, Bowser M T. *In vitro* selection of aptamers with affinity for neuropeptide Y using capillary electrophoresis. *J Am Chem Soc*, 2005, **127**(26): 9382-9383
- [45] Park J W, Tatavarty R, Kim D W, *et al.* Immobilization-free screening of aptamers assisted by graphene oxide. *Chem Commun*, 2012, **48**(15): 2071-2073
- [46] Yang K A, Chun H, Zhang Y M, *et al.* High-affinity nucleic-acid-based receptors for steroids. *ACS Chem Biol*, 2017, **12**(12): 3103-3112
- [47] Yu H X, Luo Y P, Alkhamis O, *et al.* Isolation of natural DNA aptamers for challenging small-molecule targets, Cannabinoids. *Anal Chem*, 2021, **93**(6): 3172-3180
- [48] Alsager O A, Kumar S, Willmott G R, *et al.* Small molecule detection in solution *via* the size contraction response of aptamer functionalized nanoparticles. *Biosens Bioelectron*, 2014, **57**: 262-268
- [49] Soheili V, Taghdisi S M, Khayyat M H, *et al.* Colorimetric and ratiometric aggregation assay for streptomycin using gold nanoparticles and a new and highly specific aptamer. *Microchim Acta*, 2016, **183**(5): 1687-1697
- [50] Vu C Q, Rotkrue P, Tantirungrotechai Y, *et al.* Oligonucleotide hybridization combined with competitive antibody binding for the truncation of a high-affinity aptamer. *ACS Comb Sci*, 2017, **19**(10): 609-617
- [51] Chinnappan R, Alamer S, Eissa S, *et al.* Fluorometric graphene

- oxide-based detection of *Salmonella enteritis* using a truncated DNA aptamer. *Microchim Acta*, 2018, **185**(1): 9
- [52] Tian Y, Wang Y, Sheng Z, *et al.* A colorimetric detection method of pesticide acetamiprid by fine-tuning aptamer length. *Anal Biochem*, 2016, **513**: 87-92
- [53] Manimala J C, Wiskur S L, Ellington A D, *et al.* Tuning the specificity of a synthetic receptor using a selected nucleic acid receptor. *J Am Chem Soc*, 2004, **126**(50): 16515-16519
- [54] Liu J C, Bai W H, Niu S C, *et al.* Highly sensitive colorimetric detection of 17 beta-estradiol using split DNA aptamers immobilized on unmodified gold nanoparticles. *Sci Rep*, 2014, **4**: 7571
- [55] Vanschoenbeek K, Vanbrabant J, Hosseinkhani B, *et al.* Aptamers targeting different functional groups of 17 beta-estradiol. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2015, **147**: 10-16
- [56] 白文荟. 基于适配体的农兽药残留快速检测技术研究[D]. 北京:中国农业科学院, 2016
- Bai W H. Research of Aptamer-based Analytical Methods on The Rapid Detection for Pesticides and Veterinary Drug Residues[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2016
- [57] Ameri M, Eskandari S, Nezafat N. An overview of aptamer: the prominent applications and different computational tools for its design. *Curr Pharm Biotechnol*, 2020, **22**(10): 1273-1286
- [58] Zhou Q T, Xia X L, Luo Z F, *et al.* Searching the sequence space for potent aptamers using SELEX *in silico*. *J Chem Theory Comput*, 2015, **11**(12): 5939-5946
- [59] Chen Z H, Hu L, Zhang B T, *et al.* Artificial intelligence in aptamer-target binding prediction. *Int J Mol Sci*, 2021, **22**(7): 3605
- [60] Navien T N, Thevendran R, Hamdani H Y, *et al.* In silico molecular docking in DNA aptamer development. *Biochimie*, 2021, **180**: 54-67
- [61] Buglak A A, Samokhvalov A V, Zherdev A V, *et al.* Methods and applications of *in silico* aptamer design and modeling. *Int J Mol Sci*, 2020, **21**(22): 8420
- [62] Jeddi I, Saiz L. Three-dimensional modeling of single stranded DNA hairpins for aptamer-based biosensors. *Sci Rep*, 2017, **7**(1): 1178
- [63] Emami N, Pakchin P S, Ferdousi R. Computational predictive approaches for interaction and structure of aptamers. *J Theor Biol*, 2020, **497**: 110268
- [64] Ahmad N A, Zulkifli R M, Hussin H, *et al.* In silico approach for Post-SELEX DNA aptamers: a mini-review. *J Mol Graph Model*, 2021, **105**: 107872
- [65] Kato T, Takemura T, Yano K, *et al.* In vitro selection of DNA aptamers which bind to cholic acid. *Biochim Biophys Acta*, 2000, **1493**(1): 12-18
- [66] Yang K A, Pei R J, Stefanovic D, *et al.* Optimizing cross-reactivity with evolutionary search for sensors. *J Am Chem Soc*, 2012, **134**(3): 1642-1647
- [67] Tucker W O, Shum K T, Tanner J A. G-quadruplex DNA aptamers and their ligands: structure, function and application. *Curr Pharm Des*, 2012, **18**(14): 2014-2026
- [68] Buglak A A, Samokhvalov A V, Zherdev A V, *et al.* Methods and applications of *in silico* aptamer design and modeling. *Int J Mol Sci*, 2020, **21**(22): 8420
- [69] Eisold A, Labudde D. Detailed analysis of 17-estradiol-aptamer interactions: a molecular dynamics simulation study. *Molecules*, 2018, **23**(7): 1690
- [70] 张桂兰, 朱超, 黄亚飞, 等. 基于适配体技术的雌性激素检测方法研究进展. *分析测试学报*, 2017, **36**(3): 422-430
- Zhang G L, Zhu C, Huang Y F, *et al.* *Journal of Instrumental Analysis*, 2017, **36**(3): 422-430
- [71] 俞晨虹. 电化学适配体传感器的构建及其在三聚氰胺和类固醇激素检测中的应用[D]. 上海:上海大学, 2021
- Yu C H. Construction of Electrochemical Aptasensor and Its Application in Melamine and Steroid Hormones Detection[D]. Shanghai: Shanghai University, 2021
- [72] 刘玉洁, 黄克靖, 刘彦明. 基于层状二硫化钴-金纳米的17 β -雌二醇适配体生物传感器//河南省化学学会. 河南省化学学会2014年学术年会论文摘要集. 郑州:河南省化学学会, 2014: 180
- Liu Y J, Huang K J, Liu Y M. 17 β -Estradiol aptamer biosensor based on layered cobalt disulfide and gold nanoparticles//Henan Chemical Society. 2014 Academic Annual Meeting of Henan Chemical Society. Zhengzhou: Henan Chemical Society, 2014: 180
- [73] 孟凡飞, 孟凡娜, 熊琦, 等. 电化学适配体传感器的研究进展. *检验医学与临床*, 2018, **15**(21): 3303-3307
- Meng F F, Meng F N, Xiong Q, *et al.* *Lab Med Clin*, 2018, **15**(21): 3303-3307
- [74] 刘晓, 朱成龙, 庞月红, 等. 基于黑磷纳米片的荧光适配体传感器检测雌激素17 β -雌二醇. *食品工业科技*, 2021, **42**(11): 248-254
- Liu X, Zhu C L, Pang Y H, *et al.* *Science and Technology of Food Industry*, 2021, **42**(11): 248-254
- [75] 史学丽, 高辉, 周永红, 等. 一种基于适配体传感器的17 β -雌二醇定量分析方法. *河北工业科技*, 2021, **38**(5): 431-437
- Shi X L, Gao H, Zhou Y H, *et al.* *Hebei Journal of Industrial Science and Technology*, 2021, **38**(5): 431-437
- [76] 王欣, 孙涵颖. 基于核酸适配体的牛奶和鸡蛋中雌二醇纳米金比色检测. *农业机械学报*, 2020, **51**(9): 319-328
- Wang X, Sun H Y. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2020, **51**(9): 319-328
- [77] 牛书操, 吕珍珍, 刘金钊, 等. 基于适配体的纳米金比色法快速检测雌二醇研究. *分析测试学报*, 2014, **33**(7): 835-839
- Niu S C, Lv Z Z, Liu J C, *et al.* *Journal of Instrumental Analysis*, 2014, **33**(7): 835-839
- [78] Melikishvili S, Piovarci I, Hianik T. Advances in colorimetric assay based on AuNPs modified by proteins and nucleic acid aptamers. *Chemosensors*, 2021, **9**(10): 29
- [79] 甄建辉, 孙鹏远, 巩文雯, 等. 核酸适配体生物传感器应用于食品抗生素残留检测的研究进展. *食品安全质量检测学报*, 2021, **12**(14): 5577-5585
- Zhen J H, Sun P Y, Gong W W, *et al.* *J Food Saf Qual*, 2021, **12**(14): 5577-5585

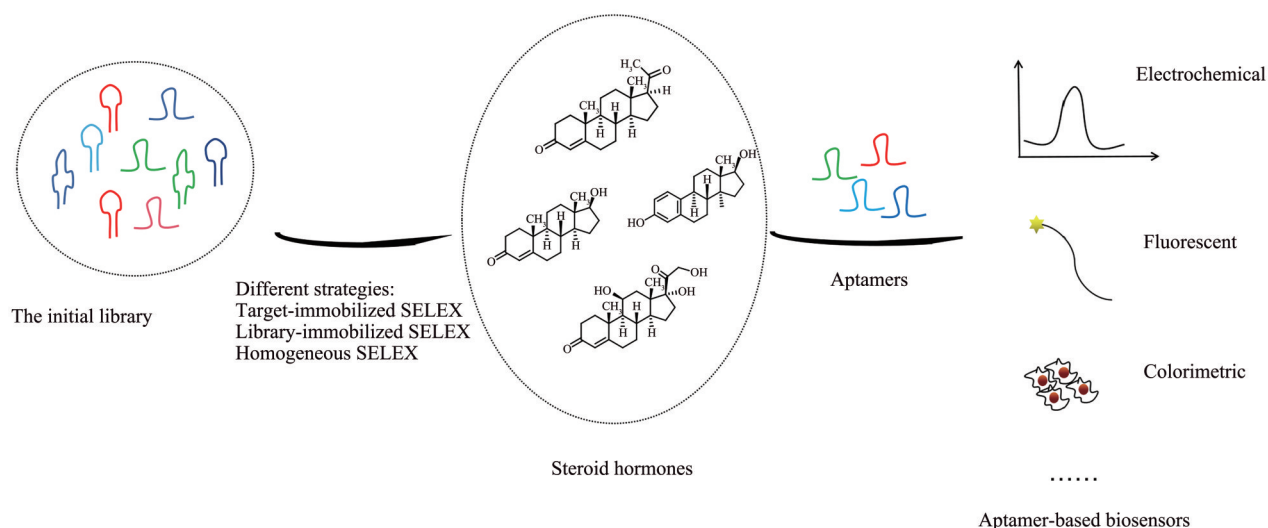
Isolation and Application of Aptamer for Steroid Hormones^{*}

TANG Chun-Hua¹⁾, YANG Jie¹⁾, LU Xiao-Ling¹⁾, CHEN Mei-Lun¹⁾, WEI Zheng¹⁾,
YU Peng^{1)**}, ZHAO Jia^{2)**}

⁽¹⁾College of Pharmaceutical Sciences, Central South University, Changsha 410013, China;

⁽²⁾Changsha Xinlizihe Technology Co., Ltd., Changsha 410013, China)

Graphical abstract



Abstract Aptamers, as novel recognition molecules, have great potential in the field of analysis and detection. Steroid hormones are a kind of hormones with cyclopentane polyhydrophene as the mother nucleus, including sex hormones and corticosteroids, which have extremely important medical value in maintaining life and regulating physiological state. It is of great significance to monitor the content of steroids *in vivo* and *in vitro* for disease monitoring and environmental protection. The aptamer isolation of steroid hormones is the prerequisite for the application of aptamers to the analysis and detection of steroidal hormones. So far researchers have isolated aptamers for estrogens such as estradiol (E2) and estrone (E1), androgens such as testosterone (TES) and nortestosterone, and progesterone (P4) and corticosteroids such as cortisol (COR). This paper summarizes the isolation principles and strategies of the reported steroid hormone aptamers. The aptamer sequence, equilibrium dissociation constants (K_D) and determination methods are summarized briefly. The new ideas of computer simulation technology in aptamer isolation and optimization are introduced. The various steroid hormone aptamer sensors developed at present are briefly introduced in order to provide reference for the follow-up research.

Key words aptamer, steroid hormones, isolation, sensor

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0390

^{*} This work was supported by grants from the Fundamental Research Funds for the Central Universities of Central South University (2021zzts1002) and the No.2 (2022) Natural Science Foundation of Hunan Foundation of China (2022JJ80105).

^{**} Corresponding author.

YU Peng. Tel: 86-731-82650329, E-mail: peng.yu@csu.edu.cn

ZHAO Jia. Tel: 86-18810532875, E-mail: xlzh_zj@163.com

Received: August 19, 2022 Accepted: December 9, 2022