

丙型肝炎病毒相关适配分子的研究进展

徐冬, 曹俊娜

背景资料
丙型肝炎易发生慢性化并可能进展为肝硬化和肝细胞癌。目前针对HCV的研究及诊治方法并不多, 一些研究开始转向HCV相关的适配子的研究。本文介绍了SELEX技术的原理、适配子的技术优势, 并就目前国际上针对HCV的适配子的最新研究成果作一综述。

徐冬, 曹俊娜, 中国人民解放军第161中心医院干部病房 湖北省武汉市 430010
作者贡献分布: 徐冬与曹俊娜对本文所作贡献均等; 本文写作由徐冬完成; 曹俊娜审核。
通讯作者: 徐冬, 430010, 湖北省武汉市, 中国人民解放军第161中心医院干部病房。wsygdmmw@163.com
电话: 027-50166447
收稿日期: 2008-01-09 修回日期: 2008-02-29

Advances in research of aptamers targeting at hepatitis C virus

Dong Xu, Jun-Na Cao

Dong Xu, Jun-Na Cao, Cadre Ward, the 161st Central Hospital of Chinese PLA, Wuhan 430010, Hubei Province, China
Correspondence to: Dong Xu, Cadre Ward, the 161st Central Hospital of Chinese PLA, Wuhan 430010, Hubei Province, China. wsygdmmw@163.com
Received: 2008-01-09 Revised: 2008-02-29

Abstract

Systematic evolution of ligand by exponential enrichment (SELEX) is a new combinational chemical methodology for *in vitro* selection of specific aptamers. Aptamers are artificial oligonucleotide ligands with high affinity binding to target molecules. They are isolated from combinational libraries of synthetic oligonucleotide by an iterative process of affinity selection, recovery and amplification. Several properties of aptamers such as convenient affinity selection and high affinity and specificity make them widely used. Their affinity and specificity for a given protein are superior to antibodies and make it possible to isolate a matching ligand and adjust its bioactivity. This article reviews the development and potentially clinical application of aptamers targeting at hepatitis C virus.

Key Words: Aptamer; Hepatitis C virus; Systematic evolution of ligand by exponential enrichment

Xu D, Cao JN. Advances in research of aptamers targeting at hepatitis C virus. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(13): 1440-1445

摘要

指数富集配基的系统进化(systematic evolution

of ligand by exponential enrichment, SELEX)技术是一类新的组合化学技术, 应用人工合成的随机寡核苷酸文库, 通过体外筛选、分离、富集获得能与靶物质特异性结合的寡核苷酸适配子。具有实用范围广、筛选过程简便、适配子有高通特异性和高亲和性等特点。适配子的选择性在很多方面优于抗体, 在分子识别研究中具有重要价值, 可用于靶物质的测定、阻断靶物质的生物活性。本文综述SELEX技术及寡核苷酸适配子在丙型肝炎病毒诊断和治疗领域的最新进展, 并且对其前景进行分析和预测。

关键词: 适配子; 丙型肝炎病毒; 指数富集配基的系统进化技术

徐冬, 曹俊娜. 丙型肝炎病毒相关适配分子的研究进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16(13): 1440-1445

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1440.asp>

0 引言

Tuerk *et al*^[1]和Ellington *et al*^[2]在1990年分别研究出一种新型体外筛选技术, 即建立人工设计的随机寡核苷酸库, 从这类随机序列库中筛选出与靶分子高度特异结合片段, 此过程称为配体系统进化的指数富集过程(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX), 经SELEX筛选出的配体称为aptamer, 即适配子(适配分子)。Shtatland和Singer *et al*^[3]又创造性地发挥此技术, 建立了基因组筛选技术, 将筛选形式从单靶物质筛选扩展到多靶物质筛选, 为生物界、生物化学界、医学界提供了高效、快速的检测手段和治疗方法。本文就与丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)相关的适配分子作一综述。

1 适配分子筛选的一般程序和要点

各种分子的适配分子筛选的程序大同小异, 多采用亲合方法, 即固定配体, 使其与扩增的寡核苷酸库混合培养, 待配体与寡核苷酸结合后洗去非结合核酸, 然后洗脱配体-适配分子复合物, 回收核酸, 扩增, 再进入下一轮筛选。筛选适配分子最重要的是如何保证核酸库的多样性。从理论上

同行评议者
刘正稳, 教授, 西安交通大学医学院第一附属医院

讲, 自由核酸的长度越大, 库容就越大, 但一般说来与蛋白或其他分子相互作用的核酸序列不会超过100 bp, 多集中于15-45 bp之间. 对双链DNA来说, 库容达 10^{13} 便可进行有效筛选, 单链DNA及RNA库容要求更低. 为保证PCR扩增的效果, 寡核苷酸两端应为AT丰富区且不应有对称结构. PCR扩增时, 为防止某些特殊序列的超比例扩增, 循环次数一般不超过20次.

2 寡聚核苷酸适配子的特性和优点

寡聚核苷酸适配子容易形成各种形状的二级结构和三级结构, 如发夹、口袋、假结、凸环和G-四聚体等空间结构, 通过这些空间结构与靶分子间通过氢键、范德华力等相互作用形成稳定的复合物. 有研究表明当靶目标存在时, 单链DNA或RNA发生适应性折叠, 与靶分子相互识别^[4].

SELEX技术所筛选的靶分子广泛, 可包括蛋白质、小分子有机物、金属离子、多糖、有机染料, 甚至可以是完整的细胞、病毒和孢子等^[5-7].

寡聚核苷酸适配子对靶物质的识别具有高亲和力. 寡聚核苷酸作为拮抗剂时解离常数为50 pmol/L-10 nmol/L, 与细胞因子与受体结合常数基本相同^[8]. 适配子对靶物质的结合具有高特异性. 核苷酸、氨基酸的寡聚核苷酸适配子能将他们与突变体、镜像体区分开来. 适配子甚至能够分辨出靶分子结构上1个甲基或1个羟基的差别, 如茶碱特异性RNA适配子对茶碱的亲合力比对咖啡因(与茶碱仅差1个甲基)高10 000倍^[9].

与抗体相比寡聚核苷酸适配子的筛选周期很短, 一般只需要8-15个循环, 约2-3 mo, 而制备mAb至少需要3-6 mo. 目前已建立多种用于适配子筛选的自动化系统^[10], 其筛选效率大大提高. 在合成过程中, 各种报告分子和功能基团能够很容易地被精确地标记到适配分子上的特定部位. 同时适配分子的性质是可逆的, 变性后可以很快地复性, 他可以长期保存并可在常温下运输.

3 寡聚核苷酸适配子的优化

目前已有多种方法对适配子进行优化, 以增加其抗核酸酶能力, 或使其更加稳定. 如镜像异构适配子(spiegelmer aptamer)以L-核糖代替D-核糖合成的寡核苷酸抗核酸酶的能力明显增强^[11]. 将适配子链接到大分子载体上, 可使其血浆中的存留时间更长^[12]. 引入锁核酸(locked nucleic acid)的杂合DNA适配子也明显增强了抗核酸酶

的能力^[13]. 环状DNA适配子在血清或血浆中的半衰期超过10 h^[14]. 对寡聚核苷酸适配子进行化学修饰(如荧光染料、放射性核素的标记、糖基化和硫代等)^[15-16], 也可以提高他的稳定性, 增加他的生物利用度, 使其更易于检测. 在血浆中, 未经修饰的RNA适配子的半衰期是几秒钟, 将核糖的五碳环上的第二位进行化学修饰可以使适配子的半衰期延长到5-15 h^[17-18].

4 HCV相关的适配分子研究进展

HCV被认为是引起输血后肝炎的主要致病因子, 丙型肝炎易发生慢性化并可能进展为肝硬化和肝细胞癌. HCV属于人类黄病毒属, 是一单股、正链RNA病毒, 基因组全长约9.5 kb, 由5'非编码区, 3'非编码区及中间一单一开放阅读框架组成. 单一开放阅读框架编码约3010-3030个氨基酸的多蛋白前体(NH₂ C E1 E2/NS1 NS2 NS3 NS4A NS4B NS5A NS5B COOH), 其中C E1 E2在宿主信号肽酶作用下裂解成核心蛋白和包膜蛋白; 而NS2 NS5是非结构蛋白区, 在NS2 NS3蛋白酶和NS3编码的丝氨酸蛋白酶的作用下裂解产生成熟的NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B蛋白. 在这些蛋白中, NS5B是一条重要的RNA依赖的RNA聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RDRP), 其对HCV的复制起重要作用.

Vo *et al*^[19]使用SELEX技术得到了8组NS5B特异的RNA适配分子, 60%在40 nt长的随机区内的5'端有保守序列YGUAGR(Y = 嘧啶, R = 嘌呤), 并且74%的配体分子在3'端以(A/C)U结尾, 适配分子与NS5B形成的特异结合解离常数极低. 但是, 这些适配子必须以包括两端的保守核苷酸在内的整体才能与NS5B形成极强的结合, 研究发现其结构中包含三个茎环结构, 带有内凸出部分, NS5B的结合区域在5'端的两个茎环结构之间. 针对HCV亚型3a的NS5B Jones *et al*^[20]筛选得到两种DNA适配子r10/43和r10/47, 均能抑制NS5B的RDRP活性. 其解离常数估计分别为 1.3 ± 0.3 nmol/L(r10/43)和 23.5 ± 6.7 nmol/L(r10/47), 而抑制常数分别为 1.4 ± 2.4 nmol/L和 6.0 ± 2.3 nmol/L. 这两种适配子显示极高的特异性, 仅能对HCV亚型3a的NS5B起作用, 而不能抑制HCV亚型1a和1b的NS5B多聚酶活性. Bellecave *et al*^[21]利用SELEX技术得到两种适配子, 可特异性抑制HCV NS5B的多聚酶活性, 而不能抑制脊髓灰质炎病毒3D多聚酶的活性. 其中被标记为27v的适配子的35 nt长的可

研发前沿
HCV的治疗一直是医学界的难题, HCV相关的适配子的研究刚刚起步, 其应用大都在实验室检测方面. 对HCV有治疗作用且能投入实用的适配子是一亟待研究的问题. 适配子与抗体相比优点不少, 但其自身也有缺点, 如何降低生产成本, 增加稳定性, 加强靶向性, 将是今后适配子治疗领域的研究重点.

相关报道
SELEX技术是一种新型体外筛选技术,近年在不同方面进行了改进,向着高效、自动化、筛选更高亲和力适配子的方向发展。适配子在医药、基础研究、疾病诊治和分子识别等领域有广泛应用。Stoltenburg *et al*对SELEX技术的发展、适配子的优缺点和应用进行了详细论述。

变区与其和NS5B结合及抑制能力有关,他能与RNA模板竞争结合到HCV多聚酶上。而Biroccio *et al*^[22]针对NS5B进行筛选,得到2条有特异性高亲和力的适配子,其解离常数到达nmol级,并且与GB病毒B的NS5B根本不结合。通过变异分析发现这2条适配子有相同的茎环结构,此结构与适配子和NS5B之间的紧密结合有关,并且这2条适配子可抑制NS5B的多聚酶活性,与模板RNA之间不存在竞争性,表明适配子与模板RNA并没结合在同一位点上。这些适配子有助于研究NS5B的空间结构与功能之间的关系,作进一步的修饰后具有潜在的治疗应用价值。

HCV非结构蛋白3(HCV NS3)具有蛋白酶、NTP酶和RNA解旋酶活性,在病毒的复制及病毒体的成熟和装配中起着重要作用。

Kumar *et al*^[23]筛选得到适配分子G6-G16和G6-G19,动力学研究表明G6-G16和G6-G19均能抑制NS3的RNA解旋酶活性,而且G6-G16还能抑制NS3的蛋白酶活性,抑制常数为3 $\mu\text{mol/L}$ 。Nishikawa *et al*^[24]从一个随机DNA库得到数种适配分子,其共同特点为都有一5'端单链区及一有保守序列(5'-GGA(U/C)GGAGCC-3')的茎环区。其中适配子5在体外实验中表现了很强的抑制解旋酶活性的能力,其含有保守序列的茎环区相当重要,若其结构被破坏则适配子5失去抑制解旋酶活性的能力。

Fukuda *et al*^[25]在一个有30个核苷酸可变核心区的RNA库中得到一批NS3蛋白酶活性区(DeltaNS3)特异性的适配子。这些适配分子被分成3组: G9- I, - II 和-III, 其结合常数大致为10 nmol/L, 可抑制大约90%的DeltaNS3和MBP-NS3(融合了麦芽糖结合蛋白的全长NS3)蛋白酶活性。进一步研究发现这些适配子有共同序列5'-GA(A/U)UGGGAC-3', 这一序列通过二级结构形成一个环^[26]。其中G9- I 对NS3蛋白酶活性的抑制是非竞争性的,通过蛋白酶抑制试验分析表明DeltaNS3的161位精氨酸和130位精氨酸对于NS3与G9- I 的结合起着基本作用^[27]。在G9- I 中发现一个51 nt长的片段(NEO-III)是G9- I 发挥抑制能力的最小有效片段,并利用此片段发现G9- I 抑制酶活性需要适配子的茎 I, 茎III和环III的参与^[28]。Fukuda *et al*^[29]将(U)14加到G9适配分子NEO-III的3'端,形成的NEO-III-14U比原适配分子更有效的抑制了NS3的蛋白酶活性,并且也能抑制解旋酶活性。在细胞中也证实NEO-III-14U能抑制NS3的蛋白酶活

性,可能是通过降低NS3与HCV正链的3'非编码区(3'-UTR)的特异性结合来发挥作用。Umehara *et al*^[30]将解旋酶适配子的结构域#5Delta通过寡核苷酸U链连接于双功能适配子NEO-III-14U和蛋白酶适配子G9- II 的3'端。通过优化间隔序列的长度得到了两种适配子NEO-35-s41和G925-s50,这两种适配子在体外都更有效的抑制了NS3的蛋白酶和解旋酶活性,特别是与NEO-III-14U相比对解旋酶活性的抑制能力上升了4-5倍。其中G925-s50在细胞内抑制了NS3的蛋白酶活性,在体外实验中抑制了HCV复制。Umehara *et al*^[31]在此基础上又设计和构建了新的双功能适配子NEO-35-sX和G925-sX(X: 5-51 nts),这些适配子通过寡U区与HCVNS3区结合,其对NS3蛋白酶及解旋酶活性均有抑制,对NS3解旋酶活性的抑制能力较前面的适配子增强了10倍。

Nishikawa *et al*^[32]构建了一个G9适配子表达系统,其中使用了巨细胞病毒增强子和鸡beta-肌动蛋白(CAG)启动子,将丁型肝炎病毒(hepatitis D virus, HDV)核酶与G9- II 适配子相结合,构建了一个HDV核酶-G9- II 适配子嵌合体(HA),这个嵌合体能在体内产生稳定的RNA从而产生串联的功能单位重复序列。为将转录成的RNA适配子运送至胞浆中去,对来自逆转录病毒的转运构成单位作了一个小改动后连接到HA的3'端(HAC),而从HA(n)和HAC(n)形成的转录本RNA都被HDV核酶处理成G9- II 适配子单位。HDV核酶-G9- II 适配子表达质粒被导入HeLa细胞中后成功抑制了NS3的蛋白酶活性。

Urvil *et al*^[33]筛选得到一个RNA适配子10G-1,其与NS3的结合常数为650 nmol/L,在体外能抑制NS3的蛋白酶活性。通过磷酸盐修饰干扰分析发现10G-1结合至NS3过程中G28-U34和A47-A55的磷酸化起着关键作用。

HCV的5'非编码区(341 nt)在所有HCV分离株中是最保守的区域,高度有序,有发夹型结构,形成稳定的二级结构,且含有帽非依赖性mRNA翻译所必须的内部核糖体进入位点(internal ribosomal entry site, IRES)。IRES包括HCV5' NCR和部分C区基因,有稳定的空间构象,含有核糖体的有效结合部位和与内部翻译起始相关的起始因子的结合部位,以内部起始调控介导HCV蛋白的翻译启动,在翻译调控中具有重要作用^[34-36]。据推测IRES的二级结构是由四个结构区(I, II, III, IV)组成,对翻译的起始十分重要。从44到118位的核苷酸是构成II区的关键结

构, 研究表明这个区的结构的完整性对IRES指导的翻译的有效性十分重要. Da Rocha Gomes S *et al*^[37]筛选出一种RNA适配分子, 此分子形成一个不完全的发夹结构, 带有一个内环, 与II区的顶端环相互作用, 形成一个顶端环-内环复合体, 通过分析发现的这类RNA-RNA的相互作用中由富含鸟嘌呤、胞嘧啶的上端和下端茎组成的互补环起着至关重要的作用. HCV IRES的III d亚单位对IRES与核糖体40 s亚单位的结合有关. 针对III d亚单位Toulmé *et al*^[38]筛选出特异的适配分子, 不论是与核糖体40 s亚单位一起加入IRES中, 或是加入已经形成的40 s亚单位-IRES复合体中, 适配分子在8 nmol/L浓度下使得IRES的保持率减少50%. Romero-López *et al*^[39]通过新的体外筛选方法得到10个RNA适配子, 能结合到IRES上抑制翻译启动, 其抑制效率高达95%. Kikuchi *et al*^[40]得到的RNA适配子结合于IRES的II区及III-IV区, 在体外实验中成功抑制了IRES依赖性翻译, 其中结合于III d区的3-07适配子的抑制能力特别强.

5 HCV相关适配分子的应用

HCV相关的适配分子目前主要用于实验室检测HCV的存在. Cho *et al*^[41]将NS3特异性适配子嵌入入锤头状核酶茎I和茎III中构成适配核酶, 并制成生物感应器, 可用于检测HCV的存在. 而Lee *et al*^[42]将通过基于蛋白芯片分析得到HCV核心抗原特异性适配子制成生物感应器, 用于HCV诊断, 结果其特异性在HCV感染患者的血清中得了很好的证实. Cho *et al*^[43]将HCVNS5B特异性的适配子应用于HCV检测, 可以从含有96 fmol NS5B的800 nL HCV患者血清中检测出NS5B的存在, 其检测极限被推测为9.6 fmol/L. Hwang *et al*^[44]通过纳米工程微悬臂技术使用RNA适配子作为受体分子可以探测极微量的HCV解旋酶的存在. 随着HCV适配子的研究进展, 相信高特异性及高灵敏度的HCV生物感应器很快可投入临床使用.

6 结论

HCV的治疗一直是医学界的难题, 随着SELEX技术的发展, 适配子已从寡聚核苷酸适配子发展到多肽适配子, 目前已发现一种能抑制NS3解旋酶活性的多肽适配子^[45]. 随着越来越多的针对HCV的适配分子被发现, 对适配分子及与相应HCV成分的研究必将导致对HCV的进一步的了

解, 相信对HCV的诊断和治疗会有一个新的突破. 虽然前景非常乐观, 适配子的大量应用也存在一些限制性因素: 早期的主要问题是适配子的稳定性, 通过努力目前已克服了药物代谢动力学的限制, 适配子在血液中的半衰期有望达到24 h以上; 与其他制药方法相比, 适配子制备的成本较高; 而且与抗体一样, 适配子很难独立接近和穿透靶组织; 适配子的高特异性使针对动物靶物质的特异性适配子不能用于人体, 如与牛凝血酶高特异性结合的寡核苷酸配基不能识别人凝血酶^[46]; SELEX的筛选条件与天然条件不可能完全相同, 因此, 获得的适配子的结合位点与天然条件下的结合位点可能不一致^[47]. 如何降低生产成本, 增加稳定性, 加强靶向性, 将是今后适配子治疗领域的研究重点.

7 参考文献

- 1 Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* 1990; 249: 505-510
- 2 Ellington AD, Szostak JW. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 1990; 346: 818-822
- 3 Shtatland T, Gill SC, Javornik BE, Johansson HE, Singer BS, Uhlenbeck OC, Zichi DA, Gold L. Interactions of Escherichia coli RNA with bacteriophage MS2 coat protein: genomic SELEX. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: E93
- 4 Hermann T, Patel DJ. Adaptive recognition by nucleic acid aptamers. *Science* 2000; 287: 820-825
- 5 Shanguan D, Meng L, Cao ZC, Xiao Z, Fang X, Li Y, Cardona D, Witek RP, Liu C, Tan W. Identification of liver cancer-specific aptamers using whole live cells. *Anal Chem* 2008; 80: 721-728
- 6 Xiao Z, Shanguan D, Cao Z, Fang X, Tan W. Cell-Specific Internalization Study of an Aptamer from Whole Cell Selection. *Chemistry* 2008; 14: 1769-1775
- 7 Chen F, Zhou J, Luo F, Mohammed AB, Zhang XL. Aptamer from whole-bacterium SELEX as new therapeutic reagent against virulent Mycobacterium tuberculosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 357: 743-748
- 8 Schlecht U, Malavé A, Gronewold T, Tewes M, Löhndorf M. Comparison of antibody and aptamer receptors for the specific detection of thrombin with a nanometer gap-sized impedance biosensor. *Anal Chim Acta* 2006; 573-574
- 9 Jenison RD, Gill SC, Pardi A, Polisky B. High-resolution molecular discrimination by RNA. *Science* 1994; 263: 1425-1429
- 10 Drolet DW, Jenison RD, Smith DE, Pratt D, Hicke BJ. A high throughput platform for systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX). *Comb Chem High Throughput Screen* 1999; 2: 271-278
- 11 Vater A, Klussmann S. Toward third-generation aptamers: Spiegelmers and their therapeutic prospects. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2003; 6: 253-261
- 12 Healy JM, Lewis SD, Kurz M, Boomer RM,

应用要点
在HCV的研究中大量开发HCV相关适配分子, 这对HCV致病机制的研究、早期发现及治疗有相当重要的意义.

名词解释
生物传感器: 是将生物活性材料(酶、蛋白质、抗体、抗原等)与物理化学换能器有机结合, 是物质分子水平的快速、微量分析方法。

- Thompson KM, Wilson C, McCauley TG. Pharmacokinetics and biodistribution of novel aptamer compositions. *Pharm Res* 2004; 21: 2234-2246
- 13 Schmidt KS, Borkowski S, Kurreck J, Stephens AW, Bald R, Hecht M, Friebe M, Dinkelborg L, Erdmann VA. Application of locked nucleic acids to improve aptamer in vivo stability and targeting function. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: 5757-5765
- 14 Di Giusto DA, King GC. Construction, stability, and activity of multivalent circular anticoagulant aptamers. *J Biol Chem* 2004; 279: 46483-46489
- 15 Kusser W. Chemically modified nucleic acid aptamers for in vitro selections: evolving evolution. *J Biotechnol* 2000; 74: 27-38
- 16 Adler A, Forster N, Homann M, Göringer HU. Post-SELEX chemical optimization of a trypanosome-specific RNA aptamer. *Comb Chem High Throughput Screen* 2008; 11: 16-23
- 17 Pieken WA, Olsen DB, Benseler F, Aurup H, Eckstein F. Kinetic characterization of ribonuclease-resistant 2'-modified hammerhead ribozymes. *Science* 1991; 253: 314-317
- 18 Beigelman L, McSwiggen JA, Draper KG, Gonzalez C, Jensen K, Karpeisky AM, Modak AS, Matulic-Adamic J, DiRenzo AB, Haeberli P. Chemical modification of hammerhead ribozymes. Catalytic activity and nuclease resistance. *J Biol Chem* 1995; 270: 25702-25708
- 19 Vo NV, Oh JW, Lai MM. Identification of RNA ligands that bind hepatitis C virus polymerase selectively and inhibit its RNA synthesis from the natural viral RNA templates. *Virology* 2003; 307: 301-316
- 20 Jones LA, Clancy LE, Rawlinson WD, White PA. High-affinity aptamers to subtype 3a hepatitis C virus polymerase display genotypic specificity. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 3019-3027
- 21 Bellecave P, Andreola ML, Ventura M, Tarrago-Litvak L, Litvak S, Astier-Gin T. Selection of DNA aptamers that bind the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus and inhibit viral RNA synthesis in vitro. *Oligonucleotides* 2003; 13: 455-463
- 22 Biroccio A, Hamm J, Incitti I, De Francesco R, Tomei L. Selection of RNA aptamers that are specific and high-affinity ligands of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol* 2002; 76: 3688-3696
- 23 Kumar PK, Machida K, Urvil PT, Kakiuchi N, Vishnuvardhan D, Shimotohno K, Taira K, Nishikawa S. Isolation of RNA aptamers specific to the NS3 protein of hepatitis C virus from a pool of completely random RNA. *Virology* 1997; 237: 270-282
- 24 Nishikawa F, Funaji K, Fukuda K, Nishikawa S. In vitro selection of RNA aptamers against the HCV NS3 helicase domain. *Oligonucleotides* 2004; 14: 114-129
- 25 Fukuda K, Vishnuvardhan D, Sekiya S, Hwang J, Kakiuchi N, Taira K, Shimotohno K, Kumar PK, Nishikawa S. Isolation and characterization of RNA aptamers specific for the hepatitis C virus nonstructural protein 3 protease. *Eur J Biochem* 2000; 267: 3685-3694
- 26 Sekiya S, Fukuda K, Hwang J, Kakiuchi N, Taira K, Kusakabe I, Nishikawa S. Analysis of interaction between RNA aptamer and protein using nucleotide analogs. *Nucleic Acids Symp Ser* 2000; 163-164
- 27 Hwang J, Fauzi H, Fukuda K, Sekiya S, Kakiuchi N, Shimotohno K, Taira K, Kusakabe I, Nishikawa S. The RNA aptamer-binding site of hepatitis C virus NS3 protease. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 279: 557-562
- 28 Sekiya S, Nishikawa F, Fukuda K, Nishikawa S. Structure/function analysis of an RNA aptamer for hepatitis C virus NS3 protease. *J Biochem* 2003; 133: 351-359
- 29 Fukuda K, Umehara T, Sekiya S, Kunio K, Hasegawa T, Nishikawa S. An RNA ligand inhibits hepatitis C virus NS3 protease and helicase activities. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 325: 670-675
- 30 Umehara T, Fukuda K, Nishikawa F, Kohara M, Hasegawa T, Nishikawa S. Rational design of dual-functional aptamers that inhibit the protease and helicase activities of HCV NS3. *J Biochem* 2005; 137: 339-347
- 31 Umehara T, Fukuda K, Nishikawa F, Sekiya S, Kohara M, Hasegawa T, Nishikawa S. Designing and analysis of a potent bi-functional aptamers that inhibit protease and helicase activities of HCV NS3. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)* 2004: 195-196
- 32 Nishikawa F, Kakiuchi N, Funaji K, Fukuda K, Sekiya S, Nishikawa S. Inhibition of HCV NS3 protease by RNA aptamers in cells. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: 1935-1943
- 33 Urvil PT, Kakiuchi N, Zhou DM, Shimotohno K, Kumar PK, Nishikawa S. Selection of RNA aptamers that bind specifically to the NS3 protease of hepatitis C virus. *Eur J Biochem* 1997; 248: 130-138
- 34 Sizova DV, Kolupaeva VG, Pestova TV, Shatsky IN, Hellen CU. Specific interaction of eukaryotic translation initiation factor 3 with the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and classical swine fever virus RNAs. *J Virol* 1998; 72: 4775-4782
- 35 Otto GA, Lukavsky PJ, Lancaster AM, Sarnow P, Puglisi JD. Ribosomal proteins mediate the hepatitis C virus IRES-HeLa 40S interaction. *RNA* 2002; 8: 913-923
- 36 Jubin R. Hepatitis C IRES: translating translation into a therapeutic target. *Curr Opin Mol Ther* 2001; 3: 278-287
- 37 Da Rocha Gomes S, Dausse E, Toulmé JJ. Determinants of apical loop-internal loop RNA-RNA interactions involving the HCV IRES. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 322: 820-826
- 38 Toulmé JJ, Darfeuille F, Kolb G, Chabas S, Staedel C. Modulating viral gene expression by aptamers to RNA structures. *Biol Cell* 2003; 95: 229-238
- 39 Romero-López C, Barroso-delJesus A, Puerta-Fernández E, Berzal-Herranz A. Interfering with hepatitis C virus IRES activity using RNA molecules identified by a novel in vitro selection method. *Biol Chem* 2005; 386: 183-190
- 40 Kikuchi K, Umehara T, Fukuda K, Hwang J, Kuno A, Hasegawa T, Nishikawa S. Structure-inhibition analysis of RNA aptamers that bind to HCV IRES. *Nucleic Acids Res Suppl* 2003; : 291-292
- 41 Cho S, Kim JE, Lee BR, Kim JH, Kim BG. Bis-aptazyme sensors for hepatitis C virus replicase

- and helicase without blank signal. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: e177
- 42 Lee S, Kim YS, Jo M, Jin M, Lee DK, Kim S. Chip-based detection of hepatitis C virus using RNA aptamers that specifically bind to HCV core antigen. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 358: 47-52
- 43 Cho S, Lee SH, Chung WJ, Kim YK, Lee YS, Kim BG. Microbead-based affinity chromatography chip using RNA aptamer modified with photocleavable linker. *Electrophoresis* 2004; 25: 3730-3739
- 44 Hwang KS, Lee SM, Eom K, Lee JH, Lee YS, Park JH, Yoon DS, Kim TS. Nanomechanical microcantilever operated in vibration modes with use of RNA aptamer as receptor molecules for label-free detection of HCV helicase. *Biosens Bioelectron* 2007; 23: 459-465
- 45 Trahtenherts A, Gal-Tanamy M, Zemel R, Bachmatov L, Loewenstein S, Tur-Kaspa R, Benhar I. Inhibition of hepatitis C virus RNA replicons by peptide aptamers. *Antiviral Res* 2008; 77: 195-205
- 46 Liu X, Zhang D, Cao G, Yang G, Ding H, Liu G, Fan M, Shen B, Shao N. RNA aptamers specific for bovine thrombin. *J Mol Recognit* 2003; 16: 23-27
- 47 Shultzaberger RK, Schneider TD. Using sequence logos and information analysis of Lrp DNA binding sites to investigate discrepancies between natural selection and SELEX. *Nucleic Acids Res* 1999; 27: 882-887

同行评价
本文综述了SELEX技术及HCV相关适配分子的研究进展,但对分子机制的描述较为浅显,若作者能对分子机制进行深入介绍,将是一篇很好的论文。

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

第二十次全国中西医结合消化学术会议征文通知

本刊讯 中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会决定于2008-11在上海市召开第二十次全国中西医结合消化系统疾病学术会议,并同时举办全国中西医结合消化疾病(重点为肝病、内镜与胃癌)新技术新理论继续教育学习班。学习班招收对象:中西医结合、中医或西医的消化专业医师、科研人员、研究生等。参加学习班者授予国家级1类继续教育学分;大会论文报告者另授继续教育学分6分。

1 征稿内容

消化内镜技术及其中西医结合临床应用;脂肪肝、慢性肝炎与肝硬化等常见肝病的中西医结合基础与临床研究;消化道肿瘤中西医结合诊疗;脾胃学说及其临床应用;其他消化系统疾病(包括食管、胃、肝、胆、胰腺等疾病)的基础研究、临床研究与实践等。

2 征稿要求

请注明作者姓名、单位、详细通讯地址、邮编。稿件请附800字论文摘要,尽可能以电子信件的形式将稿件传送,截稿日期:2008-09-30。

3 联系方式

刘成海, 201203, 上海市浦东新区张衡路528号上海中医药大学附属曙光医院肝病所, 传真: 021-51324445或51328500, shxhhy2008@yahoo.cn或czs.xiaohua@163.com