《核酸适体活性评价标准操作规范》

(征求意见稿)

编制说明

**一、任务来源**

本国家标准的制定任务列入国家标准化管理委员会《二0一六年国家标准制修订项目》，项目编号“20161339-T-424”。本项任务由中国标准化研究院提出并归口，定于2016年完成。本标准起草工作组由河北食品检验研究院等单位共同组成。

**二、标准编制原则**

本标准遵循GB/T1.1-2009《标准化工作导则第1部分：标准的结构和编写》和标准编写内容参考了与核酸适体筛选制备标准操作规范相关文献，标准参照了 GB/T6379.1-2004《测量方法与结果的准确度（正确度与精密度）》第1部分总则与定义和 GB/T 6379.2-2004《测量方法与结果的准确度》第2部分确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法。

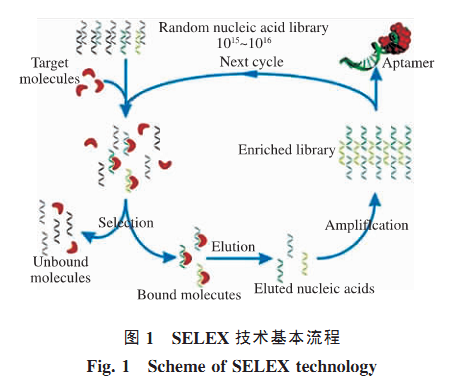
1. **标准制定的背景及意义**

20世纪以来，生物学飞速发展，人类不断解密生命，不断发现自我。几十年来，核酸一直作为遗传物质被大众所熟知。随着脱氧核糖核酸（DNA）、核糖核酸（RNA）和蛋白质相互作用研究的深入开展，Tuerk和Gold在1990年率先从含有8个随机序列的RNA文库中筛选到了能特异性结合噬菌体 T4 DNA聚合酶（gp43）的RNA序列，并将该技术命名为配体指数富集系统进化技术（Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment，SELEX）。而后，Ellington和Szoatak成功的运用该技术从含150bp随机序列的RNA库中筛选到6种针对有机小分子染料的RNA寡核苷酸，并命名为“Aptamer”，国内一般将其翻译为为“适配体”、“核酸适（识）体”、“核酸适配子（体）”。1992年，Ellington和Szoatak又成功地从含有157bp的随机序列ssDNA库中筛选出cibacronblue、reactive green 19和 reactive blue 4的aptamer。从此，核酸适配体进入人们的视野，并不断在新的领域得到应用。

核酸适配体是经体外筛选技术得到的，由十几个或几十个核苷酸组成的寡聚核苷酸片段（即ssDNA或RNA）。尽管ssDNA和RNA不同，但是经核磁共振及X射线晶体衍射等手段研究发现，SELEX技术筛选得到的两种适配体都能够折叠形成热力学稳定的特殊三维空间结构，如发夹（Hairpin）、茎环（Stem-Loop）、假结（Pseudoknot）和G-四聚体（G-tetramer），基于其单链核酸结构及其空间结构的多样性，适配体可通过结构互补、碱基堆积力、范德华力、氢键和静电等作用与靶分子特异性结合。

SELEX技术通过靶分子与大容量化学合成的随机寡核苷酸文库作用，将所形成的靶分子-寡核苷酸复合物与游离寡核苷酸分离，再利用PCR体外扩增技术对形成复合物的寡核苷酸进行扩增。多次重复以上筛选步骤（一般需要4~20轮）以获得亲和力高、特异性好的适配体。人工构建的核酸库一般包括正向引物序列、20~60 个随机核苷酸序列、反向引物序列3部分。通过对可与靶分子特异性结合的寡核苷酸进行数轮反复的体外筛选、扩增，达到指数级富集的效果，最终获得与靶分子有特异结合作用的核酸适配体。

SELEX技术筛选核酸适配体包括5个主要步骤，结合、分离、洗脱、扩增和调节。其基本过程如图1所示：首先建立一个随机寡核苷酸文库，库容约1013~1015个，将靶分子加入到该文库中，在特定的缓冲液体系和适宜的温度下孵育，待靶分子与文库中的随机核苷酸充分结合后，再利用过滤、亲和层析、磁珠分离、毛细管电泳等物理方法分离与靶分子结合的核苷酸序列。洗脱和收集结合的序列，PCR扩增洗脱收集的序列，集成富集的次级文库，再与原靶分子进行下一轮的筛选循环。每个靶分子要进行6~20个连续循环，每轮筛选的同时，设立平行的亲和力检测试验，当获得的核酸文库对靶分子的亲和力不再增高，筛选过程就可停止。最后富集的文库要通过克隆和测序来获得最终特异识别靶分子的适配体。需要注意的是，大多数适配体与靶分子间的作用力为氢键，RNA文库比DNA文库更具有多样性，但是所得适配体高度倾向被核酸酶结合。因此需要建立动态组合文库用新的方法来克服适配体化学稳定性的问题。

**图1 SELEX技术基本流程**

SELEX近年来获得了快速发展，开发出了多种新型的筛选方法，大大提高了适配体的筛选周期和筛选效率，如以提高核酸适配体选择性为目的的筛选方法：反向筛选（counter SELEX）、消减筛选（subtractive SELEX）、光交联筛选（photo SELEX）、负筛选（negative SELEX）；以提高核酸适配体普适性为目的的核酸适配体筛选方法：混合筛选（blended SELEX）、复合靶筛选（complex targets SELEX）、表达盒筛选（expression SELEX）、切换筛选（toggling SELEX）；以缩短筛选周期为目的的高效筛选方法：自动化筛选（automated SELEX）、不放大筛选（non-SELEX）、荧光磁珠筛选（FluMag SELEX）；不同结合库相结合以增加目标核酸适配体筛选机率的方法：加尾筛选（tailored SELEX）、基因筛选（genomic SELEX）。

核酸适配体的功能与抗体很相似，核酸适配体—分子的结合与抗原—抗体的结合类似，但核酸适配体还具有更多的优点：核酸适配体的靶分子范围广泛，除蛋白质等大分子外，还能结合金属离子、生物毒素、工业染料心等小分子，也可结合细胞气病毒等[8-9]，被喻为“化学抗体”；核酸适配体寡核苷酸分子自身间可形成发夹（hairpin）、假结（pseudoknot）、凸环（bulge）或四聚体（G-quartet ）等空间结构，并通过静电、氢键、范德华力等非共价作用力，与靶分子间发生空间形状切合的、高亲和力、高特异性的相互作用；核酸适配体还有以下几方面优势：

（1）筛选方便

核酸适配体通过化学合成的方法得到，不依赖于生物体，避免了动物实验，因此有可能筛选出没有免疫源性或低免疫源性甚至具有毒性的靶分子的核酸适配体。通常制备免疫抗体至少需要3-6个月，而核酸适配体的筛选周期一般为2-3个月，有的甚至只需几周。

（2）易于修饰和标记

核酸适配体的末端易于连接一些活性基团，容易固定在基质上，可以在末端修饰一些指示基团，便于进行检测。而抗体的修饰要困难得多。

（3）特异性强，靶分子范围广

核酸适配体对体外筛选靶分子有很高的特异性和亲和力，目标范围广泛，包含有机染料、氨基酸、蛋白质、抗生素、多肽、维生素、药物，甚至整个细胞、致病菌、病毒、组织等。从理论上讲，任何靶物质都可以通过SELEX技术筛选得到相应的核酸适配体。

（4）亲和力高

核酸适配体与靶分子形成的复合物的解离常数Kd一般都在mmol/L级别，甚至可达到pmol/L水平。

（5）稳定性好

相较于抗体的容易变性，核酸适配体具有较高的热稳定性，变性的适配体也很容易再生。且相对于蛋白质抗体和酶，适配体的化学性质更稳定，保存时间更长，制成干粉可室温保存，便于常温下运输。

（6）分子量小

核酸适配体的分子量小，渗透性好，结合靶分子时空间位阻小，具有高通量筛选的潜力。

基于上述的优点，核酸适配体生物传感器在众多领域应用的前景十分广阔。比如说在常见的化学领域，疾病诊断领域、食品生物安全领域、分子诊断领域、微生物检测领域以及兽药残留的检测等方面。目前已经商业化生产和销售，但根据文献、调研显示，对于核酸适配体的筛选制备，目前仍然没有形成统一的标准，各生产和销售厂商对核酸适配体筛选制备标准各自定义，结果差异显著。鉴于此，开展核酸适配体筛选制备标准操作规范的制定，具有重要的现实意义，可有助于规范市场上此类产品的乱象，切实保障消费者的使用。经济全球化浪潮使标准竞争上升到了战略地位，特别是进入21世纪以后，生物技术和生物产品发展迅速，发达国家纷纷制定包括核酸适配体在内的各自的标准化发展战略，以应对因经济全球化对自身带来的影响。此外，此类标准的制定也同样满足《国家中长期科学和技术发展规划纲要（2006-2020年）》中明确把实施技术标准战略作为我国科技发展的两大战略之一的目标，有助于保障国家科学发展、社会和谐。

1. **标准工作过程**

（1）确立标准制定的基本原则，收集国际和国内生物产业领域的标准。

（2）比较与研究我国原国家标准及国际标准相关内容，并结合方法的研究工作，制定出标准的讨论稿。

（3）将标准讨论稿提交专家组审查。

（4）发出《征求意见稿》征求意见，汇总专家意见，根据专家意见对标准文本进行完善。

（5）提交《核酸适体活性评价标准技术通则》（送审稿）、《编制说明》和《征求意见汇总表》供食品安全国家标准审评委员会审议。

1. **标准的重要内容**

1、标准的主要内容

本标准包括7个部分，第1-3部分为范围、引用和专业术语与定义，第4-7为细胞，大分子，小分子，复杂靶标等不同层次靶标体系的核酸适体与靶标结合的性能评价和防污染措施。

2、具体内容

（1）1-3部分为规定了核酸适配体活性评价标准、引用规范性文件和专业术语。包括核酸适体与靶标结合的亲和力和特异性的评价，确立核酸适体与靶标结合的专一性和选择性的方法验证，建立性能评价的标准操作规范。其中的核酸适配体适用范围为不同层次靶标体系。专业术语与定义包括对核酸适配体和平衡解离常数解释说明。

（2）4-7部分为规定了具体的核酸适配体活性评价方式。包括主要设备和材料、主要培养基和试剂、核酸适配体活性评价方式等。评价方式可分为两个部分　核酸适体与靶标的结合能力分析和核酸适体与靶标结合特异性验证两个部分。其中核酸适体与靶标的结合能力分析包括了荧光光谱法、流式细胞法、表面等离子共振法、等温滴定微量热法、酶联适配体分析法、毛细管电泳、DNA捕获元件法、生物膜干涉法、超滤法和荧光成像法。

1. **其他需要说明的事项**

无。