

# 肝癌血清肿瘤标志物适配体的筛选及其亲和力和特异性的鉴定

郑岳<sup>1</sup>, 邸娅<sup>1</sup>, 赵运旺<sup>1</sup>, 卢坤玲<sup>1</sup>, 黄百海<sup>2</sup>, 徐欢<sup>1</sup>

<sup>1</sup>秦皇岛市第一医院消化内科, 河北 秦皇岛 066000; <sup>2</sup>燕山大学环境与化学工程学院, 河北 秦皇岛 066004

**[摘要]** **目的:**采用指数富集的配基系统进化技术(SELEX)筛选获得一组已知和未知肝癌血清肿瘤标志物的适配体,为肝癌的早期诊断提供新的便捷方法。**方法:**收集50例首次经诊断证实为原发性肝癌的患者血清,以及50例体检无异常的正常人血清,并分别等比例混合制备成肝癌混合血清和正常人混合血清,作为筛选的靶标分子,磁珠作为分离载体。先将磁珠-正常人血清复合物与ssDNA文库结合,取上清再与磁珠-肝癌血清结合,经过洗脱、分离与肝癌血清结合的特异性ssDNA,并进行扩增,链霉亲和素磁珠法制备次级ssDNA,进行9轮筛选,将9轮筛选获得的饱和文库与PMD18-T载体连接进行转化、挑选单克隆送上海生工进行测序,同时利用流式细胞术测定肝癌血清肿瘤标志物适配体的亲和力(Kd值)。**结果:**经9轮筛选,成功分离出200个核酸序列,其中序列不同的有10个。特异性检测表明,筛选得到的肝癌血清肿瘤标志物适配体与肝癌血清的结合解离常数均在纳摩尔级水平,其中Seq-1、Seq-16、Seq-17、Seq-56、Seq-72号适配体能高特异性结合肝癌血清,与正常人血清不结合,再通过200例肝癌血清和200例正常人血清进一步鉴定5条肝癌血清肿瘤标志物适配体检出肝癌的阳性率,阳性检出率达91%以上。**结论:**利用随机单链寡核苷酸文库成功获得与肝癌患者血清特异性结合的适配体,所获得的适配体具有拮抗肝癌血清的能力,有可能为肝癌的早期诊断提供新的便捷方法。

**[关键词]** 原发性肝癌;血清;SELEX;适配体

**[中图分类号]** R735.7

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2018)10-1350-07

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20181004

## Screening of liver cancer serum tumor markers' aptamers and identification of their affinity and specificity

Zheng Yue<sup>1</sup>, Di Ya<sup>1</sup>, Zhao Yunwang<sup>1</sup>, Lu Kunling<sup>1</sup>, Huang Baihai<sup>2</sup>, Xu Huan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Gastroenterology, the First Hospital of Qinhuangdao, Qinhuangdao 066000; <sup>2</sup>College of Environment & Chemical Engineering, Yanshan University, Qinhuangdao 066004, China

**[Abstract]** **Objective:** To obtain a set of aptamers of liver cancer serum markers by SELEX screening, and to provide new molecular biological detection method for the early diagnosis of liver cancer. **Methods:** Serum samples from 50 patients with primary hepatocellular carcinoma (HCC) and 50 normal serum samples of which physical examination showed no abnormalities were collected and mixed in equal proportions to prepare mixed sera of HCC and normal subjects. The serum was used as the target molecule for screening. Magnetic beads-normal human serum complex was combined with ssDNA library. The supernatant was then combined with magnetic beads-liver cancer serum to elute and isolate the specific ssDNA binding to serum of liver cancer. Nine rounds of ssDNA were screened by the method of the streptavidin biotin method, and transformed into PMD18-T vector. The single clones were selected and sequenced by Shanghai Biosystems. Affinity determination of serum tumor marker aptamers in patients was performed by flow cytometry. **Results:** After 9 rounds of screening, 200 nucleic acid sequences were successfully isolated, of which 10 sequences were different. Specificity test showed that the binding dissociation constants of serum tumor marker aptamers and HCC serum were all in nanomolar level. Among them, Seq-1, Seq-16, Seq-17, Seq-56, Seq-72 aptamers could be bound to the serum of liver cancer with highly specificity, and could not bound to the normal serum. The positive rate of serum tumor marker aptamers was detected in 200 cases of liver cancer serum and 200 cases of normal human serum, positive detection rate was more than 91%. **Conclusion:** The use of a random single-stranded oligonucleotide library to successfully obtain an aptamer that specifically binds to liver cancer patient serum, and the obtained aptamer has the ability to antagonize liver cancer serum, which may provide a new convenient method for the early diagnosis of liver cancer.

**[Key words]** primary liver cancer; serum; SELEX; aptamer

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(10): 1350-1356]

目前,原发性肝癌的发病率位列世界第5,且发病率在世界范围内逐年上升<sup>[1-2]</sup>。近年来临床治疗手段有了进步,但5年生存率极低。而治疗手段对早期肝癌患者都有较好的疗效。因此,早期诊断、治疗是目前提高肝癌患者生存率的最有效手段,建立有效的肝癌早期检测方法具有重要意义。目前影像学检查是肝癌诊断的主要方法,而血清标志物检测是唯一无创伤的诊断手段<sup>[3]</sup>。血清标志物具有易检测、可重复等优点<sup>[4]</sup>,在肝癌诊断中占有重要地位。甲胎蛋白(AFP)是全世界应用最广泛的肝癌肿瘤血清标志物<sup>[5]</sup>,但敏感性、特异性并不理想,有30%~40%呈假阴性<sup>[6-7]</sup>。因此,寻找特异性更高、亲和力更强的肝癌血清标志物是研究的热点。

指数富集的配基系统进化技术(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)是一种体外组合化学技术<sup>[8-9]</sup>,它利用体外人工合成大容量的随机寡核苷酸文库,从中筛选出能与靶分子特异性结合的寡核苷酸,通过PCR扩增技术进行指数富集,最终筛选得到高亲和力、高特异性的适配体。依靠其折叠形成的特定二级或三级空间结构实现与靶物质高亲和性、高特异性的结合<sup>[10-12]</sup>。因此,适配体有望取代抗体成为新型的靶物质特异识别分子<sup>[13-15]</sup>。本研究采用消减SELEX技术,以磁珠为载体,肝癌混合血清为靶标分子进行筛选。主要原理是通过在筛选过程中扣除相似非目标靶物质上所具有的靶分子适配体,消减后的次级库再投入到目标靶物质进行筛选,得到目标靶分子的适配体;靶标替换是将每轮筛选目标靶物质换成同类目标靶物质,这样筛选得到的适配体为同类目标靶物质上共同的靶分子标志物。然后再利用消减从两组高度同源的靶分子混合物中筛选获得差异靶分子的特异性适配体,同时利用靶标替换又可筛选到不同靶标相同部分的适配体。最终筛选得到的一组高特异性肝癌血清肿瘤标志物适配体,有可能为肝癌的早期诊断提供新的便捷方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

磁珠:普洛麦格(北京)生物技术有限公司;随机ssDNA文库(83 nt, 1.2 nmol):5'-CTATAGCAATG-GTACGGTACTTCC(35N)CAAAAGTGCACGCTACT-TTGCTAA-3'(N=A、G、T、C),引物P1:5'-CTATAG-CAATGGTACGGTACTTCC-3',引物P2:5'-TTAG-CAAAGTAGCGTGCACCTTTTG-3',引物Bio-P2:5'-bio-

tin-TTAGCAAAGTAGCGTGCACCTTTTG-3'均由上海生工合成。肝癌患者血清、正常人血清由秦皇岛市第一医院提供。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 肝癌血清肿瘤标志物适配体筛选

##### 1.2.1.1 混合血清的配制

将收集到的50例首次经诊断证实为原发性肝癌血清各取50 μL混匀,制备成肝癌混合血清,50 μL/管分装,-80℃冰箱保存备用。以同样的方法制备正常混合血清,分装后冻存备用。

##### 1.2.1.2 正常混合血清消减SELEX筛选

取1 mL磁珠,结合600 μL正常混合血清,37℃孵育2 h,弃去EP管中的正常混合血清,加入10 μmol/L tRNA(非特异性竞争剂进行筛选,增加筛选的特异性),37℃孵育30 min,用筛选缓冲液洗2次,每次1 min,再用结合缓冲液洗1次,1 min,结合初级ssDNA文库(95℃,5 min;4℃,10 min;37℃,5 min),37℃孵育1 h。弃去未结合ssDNA文库,用筛选缓冲液洗3次,每次1 min,加入200 μL纯水,95℃,10 min,收集上清,作为下一轮筛选的次级库。重复上述步骤进行下一轮筛选,共进行2轮消减SELEX筛选。

##### 1.2.1.3 荧光定量PCR扩增获得dsDNA

对消减后的ssDNA文库进行荧光定量PCR扩增,反应体系包括上游引物P1 1 μL,下游引物Bio-P2 1 μL,dNTP混合物8 μL,10×buffer 10 μL,荧光染料(super green I)2 μL,模板DNA 160 μL,rTaqDNA聚合酶(5 U/μL)1 μL,纯水57 μL,充分混用,30 μL/管,分成8管,实时定量PCR进行扩增。熔解曲线达到平台期停止扩增。

##### 1.2.1.4 链霉亲和素磁珠法制备ssDNA

取0.1 mL链霉亲和素磁珠于1.5 mL EP管中,加入扩增后的dsDNA,37℃,孵育30 min,弃上清液,用PBS 37℃水浴4 min,加入200 μL结合缓冲液,95℃,5 min,收集上清液,然后将上清液加入到反筛管中,37℃,孵育45 min,将未结合的ssDNA文库再与正筛管于37℃旋转孵育1 h,除去未结合的ssDNA文库。

##### 1.2.1.5 反筛

取0.3 mL磁珠于1.5 mL EP管中,标记为“1+”,即正筛管,偶联200 μL肝癌混合血清,37℃,孵育2 h。取0.3 mL磁珠于1.5 mL EP管中,标记为“1-”,即反筛管,偶联200 μL正常混合血清,37℃,孵育2 h。弃去正筛管、反筛管中的血清,加入10 μmol/L

tRNA, 37 °C, 孵育 30 min, 用筛选缓冲液洗 2 次, 每次 1 min, 再用结合缓冲液洗 1 次, 1 min, 结合初级 ssDNA 文库 (95 °C, 5 min; 4 °C, 10 min; 37 °C, 5 min), 37 °C 孵育 1 h。弃去未结合 ssDNA 文库, 用筛选缓冲液洗 3 次, 每次 1 min, 加入 200 μL 去离子水, 95 °C, 10 min, 收集上清, 作为下一轮筛选的次级库, 重复上述筛选步骤。

### 1.2.2 克隆、测序

取筛选过程中第 9 轮正筛管中的上清作为模板, 配制 300 μL PCR 体系。体系配方: 10×Buffer (含 Mg<sup>2+</sup>) 30 μL、模板 45 μL (筛选管中的上清)、4 种 dNTP 混合液 2.4 μL、引物 P1 3 μL、引物 P2 3 μL、5 uL rTaq 酶 2 μL、超纯水 214.6 μL, 充分混匀后, 50 μL/管分装, 并置于普通 PCR 仪扩增 20 个循环 (95 °C, 5 min; 94 °C 30 s; 55 °C 30 s; 72 °C 30 s), 然后紫外光下切割含目的 DNA 条带的胶块, 利用胶回收试剂盒回收纯化目的片段的 dsDNA。

### 1.2.3 目的片段 dsDNA 与 pMD18-T 载体连接

将制好的 dsDNA 用超纯水溶解, 然后与 pMD18-T 载体连接, 连接体系配方: pMD18-T 0.5 μL、插入的目的片段 2 μL、solution 5 μL、ddH<sub>2</sub>O 383.5 μL, 16 °C 反应 30 min, 得到次级库 dsDNA 重组质粒。取已连接好的重组 DNA 10 μL 加入到解冻的感受态细胞, 并设置阴性对照。涂板, 置于含 Amp 的 LB 固体培养基上培养, 待形成单克隆。阳性克隆团送上海生工测序。

### 1.2.4 肝癌血清肿瘤标志物适配体识别靶标分子的亲和力

经过 9 轮筛选后富集得到的肝癌血清肿瘤标志物适配体连接上 FITC 标签, 与磁珠在筛选缓冲液 (C<sub>i</sub> = 200 nmol/L, V<sub>r</sub> = 200 μL) 中 37 °C 孵育 30 min, 用筛选缓冲液洗 3 次, 每次 1 min。磁珠结合正常混合血清, 偶联带有 FITC 标签肝癌血清肿瘤标志物适配体 37 °C 孵育 30 min, 用筛选缓冲液洗 3 次, 每次 1 min, 作为阴性对照。FITC 标记的适配体用流式细胞术测定。用 SigmaPlot software 12.5 (Jandel Scientific) 分析, 肝癌血清肿瘤标志物-适配体的结合解离常数 (K<sub>d</sub> 值) 通过下面的方程式计算获得:  $Y = B_{max} X / (K_d + X)$ , 其中 Y 代表平均荧光强度; B<sub>max</sub> 代表所测得的最大荧光强度; X 为所加适配体的浓度。

### 1.2.5 肝癌血清适配体特异性

经亲和力测定分析结果可知, Seq-1、Seq-16、Seq-17、Seq-56、Seq-72 序列亲和力最高, 将 5 条序列送上海生工进行合成。取 0.1 mL 磁珠于 1.5 mL EP 管

中, 标记为“1+”, 偶联 50 μL 肝癌患者血清, 37 °C, 孵育 1 h; 取 0.1 mL 磁珠于 1.5 mL EP 管中, 标记为“1-”, 偶联 50 μL 正常人血清, 37 °C, 孵育 1 h; 弃去上述载体中的血清, 用筛选缓冲液洗 3 遍, 每次 1 min, “1+”、“1-”EP 管各结合 100 μL 筛选得到的肝癌血清肿瘤标志物适配体 (95 °C, 5 min, 4 °C, 10 min), 37 °C, 孵育 30 min, 用 1 % Tween+PBS 洗 3 遍, 加 100 μL 纯水, 95 °C, 10 min, 收集上清, RT-PCR 检测。收集的 200 份首次经诊断证实为原发性肝癌血清和 200 份正常人血清按上述步骤进行特异性鉴定。

### 1.2.6 肝癌血清肿瘤标志物适配体二级结构预测

测序所得序列, 采用 DNAMAN 软件, 依据 DNA 最低自由能的运算法则, 进行适配体二级结构预测和结构分析。

## 2 结果

### 2.1 肝癌混合血清复合靶 SELEX 筛选结果

#### 2.1.1 肝癌混合血清复合靶 SELEX 筛选条件

共进行了 9 轮筛选, 各轮筛选条件如表 1。随着 SELEX 筛选轮数增多, 筛选条件越来越苛刻, 文库/磁珠结合血清比例不断提高, 孵育时间不断缩短。

表 1 肝癌血清肿瘤标志物适配体 SELEX 筛选条件  
Table 1 SELEX screening conditions of hepatoma serum tumor marker aptamers

轮次	磁珠量 (mL)	收获 ssDNA 文库量 (pmol)	ssDNA 文库量 (pmol)	肝癌混合血清量 (μL)	文库/磁珠结合血清	孵育时间 (min)
1	1.00	69.5	69.5	600	2	60
2	1.00	46.3	46.3	300	2	60
3	0.50	79.8	52.0	350	4	50
4	0.50	59.7	50.0	300	4	50
5	0.30	42.9	40.0	275	6	50
6	0.25	51.6	45.0	250	6	40
7	0.20	49.1	40.0	225	8	40
8	0.15	30.1	30.0	200	8	40
9	0.10	28.1	28.0	175	10	30

#### 2.1.2 肝癌混合血清与 ssDNA 文库结合状况

以肝癌混合血清为靶标进行消减 SELEX 筛选过程中, 随着筛选轮数的增加, ssDNA 文库与肝癌混合血清的结合不断增多, 表明能与肝癌血清结合的特异性适配体不断被富集。至第 9 轮, ssDNA 文库与肝癌血清的结合已经达到饱和, 故而终止筛选 (图 1)。整个筛选过程用实时定量 PCR 进行动态检测。

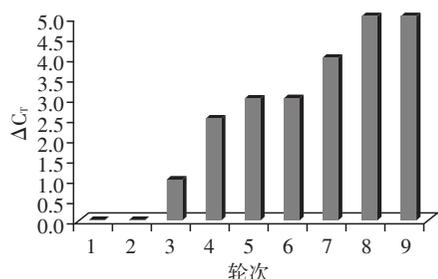


图1 实时定量PCR检测肝癌血清肿瘤标志物适配体富集结果

Figure 1 Real-time PCR detection of liver cancer serum tumor marker aptamers enrichment results

## 2.2 肝癌血清肿瘤标志物适配体的Kd值

通过消减SELEX技术筛选得到的肝癌血清肿瘤标志物适配体与正常人血清(Negative)的结合明显弱于与肝癌血清的结合(图2)。

经过9轮筛选得到10个肝癌血清肿瘤标志物适配体序列,其测序结果见表2。

## 2.3 肝癌血清肿瘤标志物适配体同源性分析及进化树分析结果

利用DNAMAN软件对10条肝癌血清肿瘤标志物适配体进行多序列比对和同源性分析。测序结

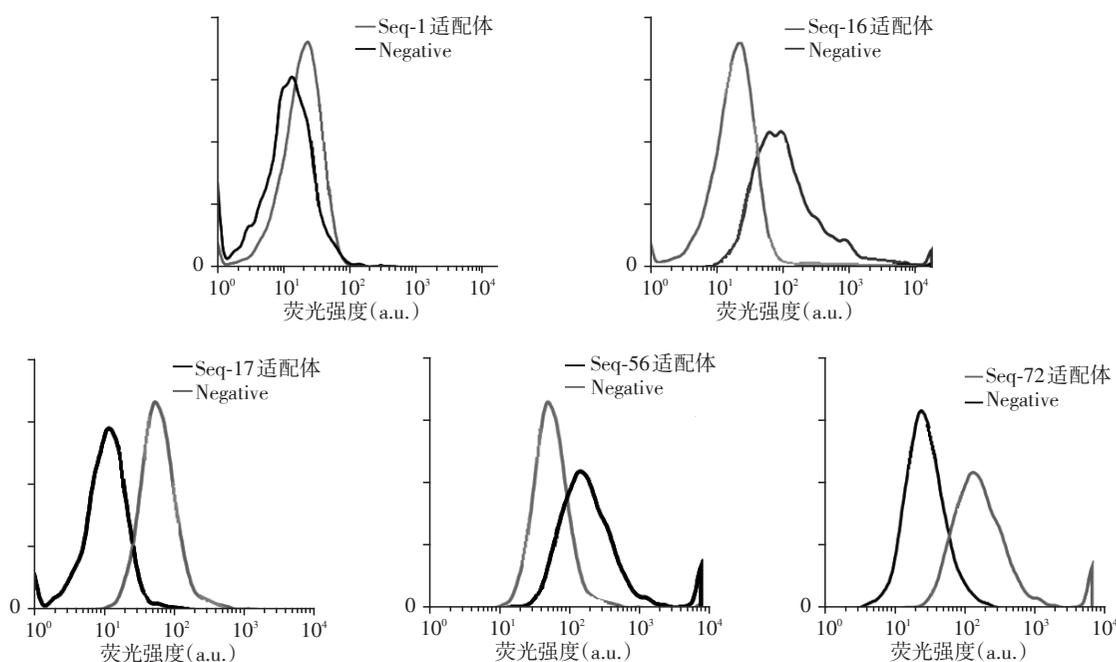


图2 部分肝癌血清肿瘤标志物适配体亲和力分析结果

Figure 2 Affinity analysis results of serum tumor marker aptamers in partial hepatocellular carcinoma

表2 肝癌血清肿瘤标志物适配体序列

Table 2 Sequences of hepatoma serum tumor marker aptamers

名称	序列(5'→3')	Kd(nmol/L)
Seq-1	GCCAGTGCAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACGATT	22 ± 7
Seq-3	CCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCACG	79 ± 5
Seq-16	GCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATAC	15 ± 10
Seq-17	GACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTG	23 ± 7
Seq-25	TTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCA	106 ± 6
Seq-29	AAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGGAACCGTAAAAAAG	99 ± 7
Seq-36	AAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGG	67 ± 8
Seq-56	GACTCGTGGCTCGGTCGTTCCGGCTGCGGCGAGC	12 ± 5
Seq-72	GGCCAACGCGGGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGG	21 ± 8
Seq-76	TGCCCCGTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAG	126 ± 6

果与预期长度一致。获得的适配体富含G和T碱基,主要可分为3个区域。另外进一步绘制进化树

(图3),可以发现所得的核酸适配体主要分为F1、F2和F3 3个家族。

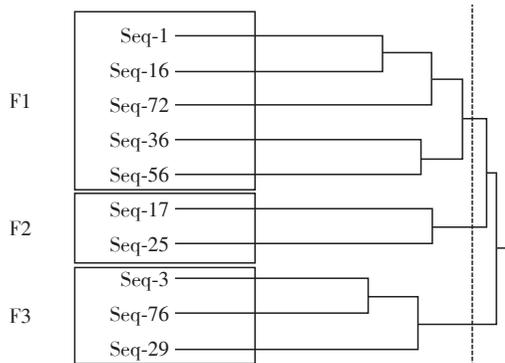


图3 肝癌血清肿瘤标志物适配体进化树分析

Figure 3 Phylogenetic tree analysis of tumor marker aptamers in liver cancer

2.4 肝癌血清肿瘤标志物适配体二级结构预测结果  
采用DNAMAN软件,依据DNA最低自由能的

运算法则,对肝癌血清肿瘤标志物适配体的核酸序列进行二级结构模拟分析,显示适配体有丰富的二级结构,主要以茎环结构和茎凸环结构为主(图4)。

2.5 肝癌血清肿瘤标志物适配体特异性鉴定结果

200份肝癌血清、200份正常人血清分别与5条肝癌血清肿瘤标志物适配体的特异性鉴定结果如图5所示,与肝癌血清孵育后结合的ssDNA的 $C_T$ 值(循环数)与正常人血清孵育后结合的ssDNA的 $C_T$ 值的差值,即 $\Delta C_T$ 值,鉴定结果表明5条肝癌血清肿瘤标志物适配体的 $\Delta C_T$ 值都在4~5个循环左右,说明我们成功筛选得到高特异性、强亲和力的肝癌血清肿瘤标志物适配体(图5)。通过检测200份肝癌血清样本,其中183份肝癌血清样本的 $\Delta C_T$ 值在4~5个循环,17份肝癌血清样本的 $\Delta C_T$ 值在1.0~2.5个循环左

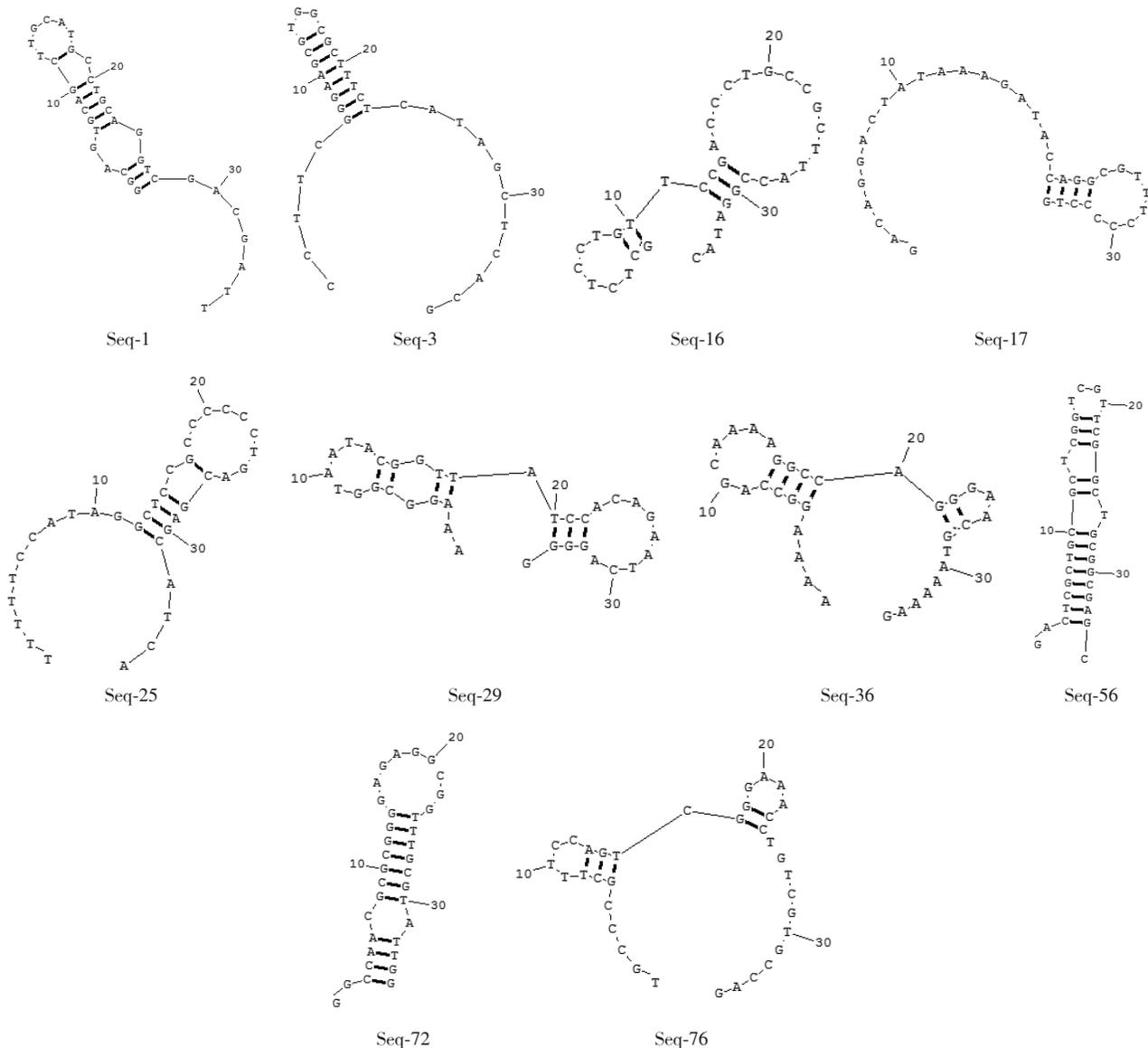


图4 新获得的肝癌血清肿瘤标志物适配体二级结构预测图

Figure 4 Secondary structure prediction of novel tumor marker aptamers for newly acquired hepatocellular carcinoma

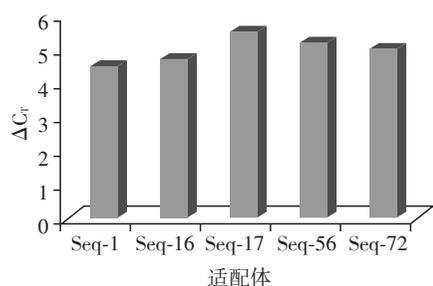


图5 肝癌血清肿瘤标志物适配体特异性鉴定结果

Figure 5 The results of specificity identification of serum tumor marker aptamers in liver cancer

右。阳性检出率达91%以上,有可能为肝癌的早期诊断提供新的便捷方法。

### 3 讨论

利用消减 SELEX 技术筛选适配体的方法成本较低、操作简单、快速、高效,并且能最大限度地去除非特异蛋白的富集,筛选效率得到很大提高。SELEX 筛选所用的随机寡核苷酸文库常用的有 ss-DNA 文库和 RNA 文库。RNA 文库空间结构丰富<sup>[16]</sup>,与不同靶分子结合的特异性更强,但易受 RAN 酶降解。血清中含有大量的 RNA 酶,所以限制了 RNA 文库在血清核酸适配体筛选中的应用。ssDNA 文库稳定性好,易变性和复性,可长期保存。其适配体具有结构的多样性,与各种目标靶蛋白结合时显示出高选择性、强亲和力和高特异性,在检测蛋白方面,优于传统的抗原-抗体免疫手段<sup>[17-18]</sup>,具有广阔的应用前景。

血清是体外诊断研究的最佳标本,同时,肿瘤标志物的检测是临床上唯一的无创性诊断手段<sup>[19-21]</sup>。肝癌作为严重威胁人类健康及生命的恶性肿瘤之一,受到人们的高度关注,早期诊断和早期治疗是提高肝癌患者存活率的关键。血清成分特别复杂,肝癌血清中理论上蕴藏着丰富的肝癌标志物,包括已知的和未知的标志物,而且血清易获得、创伤小,检测方便,因此,肝癌血清是非常好的寻找肝癌标志物的材料,也是肝癌体外诊断研究的最佳标本。适配体能与靶标分子高特异性结合,是良好的新型分子识别工具。本研究针对多项肝癌血清肿瘤标志物,通过 SELEX 技术筛选其适配体,建立一种利用特异性寡核苷酸适配体组同时检测多种肝癌血清肿瘤标志物的分子生物学检测新技术,从而提高诊断的准确度和灵敏度。同时,可以利用 SELEX 技术筛选得到未知的肝癌血清肿瘤标志物,最终建立肝癌早期、中期、晚期血清标志物谱库,为肝癌的早

期诊断和早期治疗提供新的突破口。

利用 DNAMAN 软件模拟适配体的二级结构,结果显示,适配体以茎环和口袋结构为主。这可能是适配体与肝癌血清蛋白结合的结构基础。

本研究针对肝癌血清肿瘤标志物筛选适配体,通过验证目标靶蛋白与适配体结合的特异性,为检测肝癌试剂盒奠定了理论基础。另外,采用磁珠作为筛选介质,提高了靶蛋白与载体的偶联率,是目前 SELEX 筛选中良好的载体材料。

综上所述,本研究以磁珠为 SELEX 筛选介质,以肝癌混合血清为 SELEX 复合靶标分子,通过 9 轮消减 SELEX 技术筛选,成功筛选得到 10 个肝癌血清肿瘤标志物适配体,其中 Seq-1、Seq-16、Seq-17、Seq-56、Seq-72 号适配体能高特异性、强亲和力结合肝癌血清,与正常人血清不结合,有可能为肝癌的早期诊断提供新的便捷方法。

### [参考文献]

- [1] Kim MC, Frank G. Liver resection for cancer: New developments in prediction, prevention and management of postresectional liver failure[J]. *J Hepatol*, 2016, 65(6): 1217-1231
- [2] Yim W, Sharon W. Tumor reference resolution and characteristic extraction in radiology reports for liver cancer stage prediction[J]. *J Biomed Inform*, 2016, 64(5): 179-191
- [3] Sasaki T, Kuniyasu H, Luo Y, et al. Serum CD10 is associated with liver metastasis in colorectal cancer[J]. *J Surg Res*, 2014, 192(2): 390-394
- [4] Barrachina L, Remacha AR, Soler L, et al. Acute phase protein haptoglobin as inflammatory marker in serum and synovial fluid in an equine model of arthritis[J]. *Vet Immunol Immunop*, 2016, 182(6): 74-78
- [5] Sauzay C, Petit A, Bourgeois AM, et al. Alpha-fetoprotein (AFP): A multi-purpose marker in hepatocellular carcinoma[J]. *Clin Chim Acta*, 2016, 463(1): 39-44
- [6] Gong X, Yan H, Yang J, et al. High-performance fluorescence-encoded magnetic microbeads as microfluidic protein chip supports for AFP detection[J]. *Anal Chim Acta*, 2016, 939(15): 84-92
- [7] Zhang B, Zhang Y, Peng J, et al. Effect of recombinant plasmid pEGFP-AFP-hTNF on liver cancer cells in vitro when delivered by PEG-PEI/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanomagnetic fluid[J]. *J Formos Med Assoc*, 2011, 110(5): 326-335
- [8] Jou YJ, Lin CD, Lai CH, et al. Proteomic identification of salivary transferrin as a biomarker for early detection of oral cancer[J]. *Anal Chim Acta*, 2010, 68(12): 41-48
- [9] Du J, Yang S, Lin X, et al. Use of anchorchip-time-of-

- flight spectrometry technology to screen tumor biomarker proteins in serum for small cell lung cancer [J]. *Diagn Pathol*, 2010, 69(5):60-70
- [10] Szczyba J, Loprich E, Wach S, et al. The microRNA profile of prostate carcinoma obtained by deep sequencing [J]. *Mol Cancer Res*, 2010, 89(3):105-112
- [11] Willner I, Zayats M. Electronic aptamer-based sensors [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2007, 46(27):6408-6418
- [12] Takahashi M, Sakota E, Nakamura Y. The efficient Cell-SELEX strategy using isogenic cell lines for selection and counter-selection to generate RNA aptamers to cell surface proteins [J]. *Biochimie*, 2016, 131(12):77-84
- [13] Wu YX, Kwon Y. Aptamers: The evolution of SELEX [J]. *Methods*, 2016, 106(15):21-28
- [14] Hoinka J, Przytycka T. AptPLEX - A dedicated multi-threaded demultiplexer for HT-SELEX data [J]. *Methods*, 2016, 106(15):82-85
- [15] Moghadam M, Sankian M, Abnous K, et al. Cell-SELEX-based selection and characterization of a G-quadruplex DNA aptamer against mouse dendritic cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 36(16):324-332
- [16] Lee YJ, Lee SW. Regression of hepatocarcinoma cells using RNA aptamer specific to alpha-fetoprotein [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 417(1):521-527
- [17] Tian Y, Wang Y, Sheng Z, et al. A colorimetric detection method of pesticide acetamiprid by fine-tuning aptamer length [J]. *Anal Biochem*, 2016, 513(15):87-92
- [18] Shamsipur M, Pashabadi A, Molaabasi F, et al. Impedimetric monitoring of apoptosis using cytochrome-aptamer bioconjugated silver nanocluster [J]. *Biosens Bioelectron*, 2016, 90(15):195-202
- [19] Zhu D, Yang RX, Tang YP, et al. Robust nanoplasmonic substrates for aptamer macroarrays with single-step detection of PDGF-BB [J]. *Biosens Bioelectron*, 2016, 85(15):429-436
- [20] Suzuyo I, Seyama M, Toru M, et al. A reliable aptamer array prepared by repeating inkjet-spotting toward on-site measurement [J]. *Biosens Bioelectron*, 2016, 85(15):943-949
- [21] Chen H, Xie S, Liang H, et al. Generation of Biostable L-aptamers against Achiral Targets by Chiral Inversion of Existing D-aptamers [J]. *Talanta*, 2016, 158(3):56-63
- [收稿日期] 2018-03-04

## 参考文献著录原则和方法

1. 为了反映论文的科学依据和作者尊重他人研究成果的严肃态度,以及读者提供有关信息的出处,应在论文的结论(无致谢段时)或致谢之后列出参考文献。
2. 参考文献列出的一般应限于作者直接阅读过的、最主要的、发表在正式出版物上的文献。私人通信和未公开发表的资料,一般不宜列入参考文献,可紧跟在引用的内容之后注释或标注在当页的地脚。
3. 参考文献著录应执行GB7714-2005的规定,建议采用顺序编码制。
4. 顺序编码制的要求如下:
  - (1) 在引文处按论文中引用文献出现的先后,用阿拉伯数字连续编序,将序号置于方括号内,并视具体情况把序号作为上角标,或作为语句的组成部分。如“张××<sup>[1]</sup>研究发现……”,“李××等<sup>[2]</sup>认为……”,“模型构建参考文献[3]”。
  - (2) 参考文献的每条文献著录项目应齐全,著录格式为:  
主要责任者. 题名:其他题名信息[文献类型标志]. 其他责任者. 版本项. 出版地:出版者,出版年,引文页码[引用日期]. 获取和访问路径
  - (3) 论文中若同一篇参考文献出现引用多次的情况,则不需重复著录,按参考文献首次出现的顺序标注上角即可。