

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2007 )03-0230-05

## B 淋巴细胞活化因子特异的单链 DNA 适体的人工进化

曾贤铭, 仲人前\*, 周琳, 杨再兴, 梁艳, 蒋廷旺, 吴传勇( 第二军医大学长征医院实验诊断科, 解放军临床免疫中心, 上海 200003 )

**[ 摘要 ] 目的:** 进化筛选与 B 淋巴细胞活化因子( B cell activating factor belonging to the TNF family, BAFF )特异结合的单链 DNA 适体, 鉴定其结合力。 **方法:** 应用指数方式富集的配体系统进化( systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX )技术, 将随机序列寡核苷酸文库与 BAFF 分子相互作用, 分离出结合的寡核苷酸配体, 经反复扩增、筛选数个循环, 获得重组人 BAFF 的单链 DNA 适体, 应用 Dot blotting 鉴定其结合力, 酶联法比较各适体序列对 BAFF 的相对结合力。 **结果:** 优化实验条件后成功进行了 13 轮次筛选, 随机选取 42 个阳性克隆测序, 各序列 GC 含量最高达 75%, 分为 6 类不同序列; Dot blotting 证实这些适体均与 BAFF 相结合; 比较各适体序列结合 BAFF 的光密度值, 以序列 44 光密度值最高( 0.752,  $P < 0.05$  ), 具有对 BAFF 相对最高结合力。 **结论:** 首次成功获得特异结合 BAFF 的高亲和力的单链 DNA 适体, 为研发防治肿瘤和自身免疫疾病新药奠定了基础。

**[ 关键词 ]** B 淋巴细胞活化因子; 适体; 单链 DNA; 指数富集的配体进化技术; 进化

**[ 中图分类号 ]** R392.11

**[ 文献标志码 ]** A

## Selection of single-strand DNA aptamer specifically binding to B cell activating factor

ZENG Xian-ming, ZHONG Ren-qian\*, ZHOU Lin, YANG Zai-xing, LIANG Yan, JIANG Ting-wang, WU Chuan-yong ( Department of Clinical Diagnosis, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, PLA Center of Clinical Immunology, Shanghai 200003, China )

**[ Abstract ] Objective:** To screen for single-strand DNA aptamers specifically binding B cell activating factor belonging to the TNF family( BAFF ) and to identify its affinity. **Methods:** Systematic evolution of ligands by exponential enrichment ( SELEX ) technique was used in our study. The ssDNA ligand was separated by interaction between random oligonucleotide library and BAFF, then ssDNA aptamers binding recombinant human BAFF were obtained through PCR amplification. The binding ability of the aptamers was identified by dot blotting and the relevant affinities of each aptamer to BAFF were compared by enzyme linked aptamer assay. **Results:** Thirteen rounds of screening was performed under optimized condition. Six different sequences were obtained from 42 randomly-chosen positive clones, whose top GC content was up to 75%. Dot blotting confirmed that all the 6 sequences were suitable to bind with BAFF. Sequence 44 had the highest optical density in the 6 sequences in enzyme linked aptamer assay(  $P < 0.05$  ), indicating it has the highest bonding force to BAF. **Conclusion:** The ssDNA aptamers binding BAFF has been obtained for the first time, which lays a base for developing new drugs for treating autoimmune diseases and tumors.

**[ Key words ]** B cell activating factor belonging to the TNF family( BAFF ); aptamer; single chain DNA; systematic evolution of ligands by exponential enrichment( SELEX ); evolution

[ Chin J Cancer Biother, 2007, 14( 3 ): 230-234 ]

通过体外模拟自然选择的过程, 可从化学合成的随机序列核酸文库中筛选出与特定靶物质结合的短链寡核苷酸, 称“指数方式富集的配体系统进化”技术( systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX ), 而经 SELEX 筛选出的配体称为适体( aptamer )。目前, 包括小分子有机物、肽、

**[ 基金项目 ]** 国家高技术研究发展( 863 )计划资助项目( No. 2006AA02Z496 ); 国家自然科学基金资助项目( No. 30471616 )。 Supported by National High Technology Research and Development Program of China( No. 2006AA02Z496 ), National Natural Science Foundation of China ( No. 30471616 )。

**[ 作者简介 ]** 曾贤铭( 1968- ), 男, 四川省成都市人, 硕士研究生, 主要从事临床免疫方面的研究。 E-mail: zzmmlg@163.com

\* Corresponding author. E-mail: rqzhong@hotmail.com

蛋白、核酸等靶物质的多种适体已用该技术成功地筛选出来<sup>[1-2]</sup>。用 SELEX 技术筛选出的与细胞因子特异结合的适体相对于抗体具有很多特点,如高特异性、自身无免疫原性,分子量小能很快进入组织,其靶分子可无免疫原性,能在体内与细胞因子结合而成为某些细胞因子的生物活性抑制剂等<sup>[3-5]</sup>。

B 细胞活化因子(B cell activating factor belonging to the TNF family, BAFF)为肿瘤坏死因子超家族的新成员(又名 BlyS、THANK、TALL-1)。BAFF 在 B 细胞的生长发育、抗体类型的转换以及 T 细胞的活化等方面具有重要的免疫调节作用,BAFF 的异常表达与淋巴细胞起源的恶性肿瘤及部分自身免疫性疾病密切相关<sup>[6-9]</sup>。通过阻断 BAFF 的生物学活性来防治 BAFF 异常表达相关疾病已成为重要的研究方向<sup>[10-12]</sup>。本研究自行设计寡核苷酸文库,并对 SELEX 技术的条件进行改造和优化,以获得重组人 BAFF 的 ssDNA 适体,并进行特异性鉴定,以期最终获得能阻断 BAFF 生物学活性的 ssDNA 型阻断剂。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和材料

BAFF(PeproTech Asia, Israel),酵母 tRNA (Invitrogen, USA),链霉亲和素标记的辣根过氧化物酶(avidin-HRP,深圳晶美生物工程有限公司),增殖诱发配体(APRIL, R&D 公司, USA),琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(EZNA kit, Omegabio-tek),B 型超纯质粒小样快速提取试剂盒(北京博大泰克公司),PCR-Mastermix(北京天为时代科技有限公司),预包被 BAFF 多克隆抗体的 96 孔聚苯乙烯微孔板(Bender MedSystems GmbH)。结合缓冲液:5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 150 mmol/L NaCl, 30 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 以 0.22 μm 孔径混合纤维素膜抽滤后备用。洗脱液:含 3.0 mol/L 甜菜碱(betaine, Fluka Biochemika), 12% 二甲亚砜。硝酸纤维素膜预处理:剪成 φ 9.0 mm 圆片,以 0.5 mol/L NaOH 浸泡 20 min,蒸馏水反复漂洗后,用结合缓冲液平衡,4 °C 浸泡保存。

### 1.2 寡聚 DNA 文库的设计与合成

应用 Primer Premier 5.0 软件自行设计寡聚随机单链 DNA 文库与引物,由上海生工公司合成。寡聚随机单链 DNA 文库序列为 5'-GTCCTGTGTTGAGCCCATC(N37)CTCTCAGGATTGGCACCTC-3', 两端 19 个核苷酸为固定序列便于 PCR 扩增,中间 37 个核苷酸为随机序列,此随机文库其理论库容约为  $1 \times 10^{22}$ ,可完全满足 SELEX 需要。PCR 上游引

物为 5'-GTCCTGTGTTGAGCCCATC-3', 下游引物为 5'-GAGGTGCCAATCCTGAGAG-3'。以结合缓冲液溶解寡聚随机单链 DNA 为 10 μmol/L。

### 1.3 经预实验确定 PCR 扩增参数

对称 PCR(symmetric PCR)预变性 94 °C 2 min;变性 94 °C 15 s,复性 50 °C 30 s,延伸 72 °C 10 s,共 17 循环;反应体系 30 μl:含 15 μl PCR-Mastermix,4% 二甲亚砜,1.0 mol/L 甜菜碱,上下游引物各 0.5 μmol/L,模板 10 μl,以双蒸水补足体积。

非对称 PCR(asymmetric PCR)预变性 94 °C 2 min;变性 94 °C 15 s,复性 50 °C 30 s,延伸 72 °C 15 s,共 7 循环;反应体系 30 μl:含 15 μl PCR-Mastermix,4% 二甲亚砜,1.0 mol/L 甜菜碱,上游引物 1.5 μmol/L,模板 4 μl,以双蒸水补足体积。

### 1.4 正向 SELEX 筛选

取寡聚随机单链 DNA 50 μl(0.5 nmol,约  $1 \times 10^{14}$  分子)94 °C 10 min 变性,冰浴 5 min,加入酵母 tRNA 5 μl(2.5 nmol),加 BAFF 液(62 ~ 32 pmol,不同轮次量不同,见表 1),以结合缓冲液补足体积至 100 μl,37 °C 40 min 进行结合反应。以硝酸纤维素膜负压抽滤此 100 μl 反应体系,以吸附 BAFF 与寡聚单链 DNA 的结合物,再用 3 ml 结合缓冲液经同一膜负压抽滤,将此硝酸纤维素膜于结合缓冲液 10 ml 中轻轻漂洗,以洗除游离的寡聚单链 DNA。剪碎 5 mm<sup>2</sup> 的吸附了 BAFF 与寡聚单链 DNA 结合物的硝酸纤维素膜于 EP 管中,加入 50 μl 洗脱液,于 94 °C 变性洗脱 4 min,13 500 × g 离心 2 min,取上清液 10 μl 作模板,进行对称 PCR,8 μl 产物作 2.0% 琼脂糖凝胶电泳观察。直接以 4 μl 对称 PCR 产物为模板,进行非对称 PCR,全部非对称 PCR 产物作 2.5% 琼脂糖凝胶电泳,溴乙啶显色观察。切胶回收纯化单链条带,定量 DNA 后用于下一轮 SELEX。

表 1 结合反应中寡聚单链 DNA 与 BAFF 分子的比例  
Tab. 1 Ratio of ssDNA and BAFF in binding reaction

Round of SELEX	ssDNA: BAFF	Amount of BAFF (n/pmol)
1 ~ 6	8:1	62
7 ~ 8	10:1	50
9 ~ 10	12:1	42
11 ~ 13	15:1	32

### 1.5 负向 SELEX 筛选

回收纯化的寡聚单链 DNA 于 94 °C 10 min 变

性,冰浴 5 min,将一张  $\Phi 9.0$  mm 的干净硝酸纤维素膜剪碎后加入,37 °C 40 min 进行非特异结合反应。13 500  $\times g$  离心 2 min,取上清液定量 DNA,用于下一轮 SELEX。每经过 3 轮正向 SELEX 后,插入 1 轮次负向 SELEX。

### 1.6 适体的克隆和测序

SELEX 完成后,将对称 PCR 产物连接到 pGM-T 载体(天根生物技术公司),转化 JM109 大肠杆菌。同时经氨苄西林抗性和蓝白斑筛选转化阳性克隆,小量提取质粒,经对称 PCR 鉴定目的片段阳性后,送菌液测定克隆 DNA 片段序列(上海联合基因公司)。DNA 序列同源性分析:应用 BioEdit V4.7.1 软件对所测全部序列进行比较,根据同源性分组。

### 1.7 Dot blotting 鉴定序列适体对 BAFF 的结合

在各组中各选一个克隆作代表,小量提取质粒。先经对称 PCR,再应用 5'端标记生物素的上游引物进行非对称 PCR,回收纯化 ssDNA 用于 Dot blotting。在未经预处理硝酸纤维素膜点样 BAFF 0.25  $\mu g$ ,另以与 BAFF 有 33% 结构相同的同源类似物增殖诱发配体(APRIL)0.25  $\mu g$  以及 1  $\mu l$  绵羊血清分别点样作为对照。用结合缓冲液溶解的脱脂奶粉 37 °C 2 h 封闭膜后,加入用结合缓冲液溶解的各序列 ssDNA 于 37 °C 1.5 h 进行结合反应,使之与膜上 BAFF 结合。经结合缓冲液反复漂洗 30 min 去除游离 ssDNA 后,加入以结合缓冲液配制的 avidin-HRP,37 °C 孵育 1.5 h,使链霉亲合素(avidin)与 ssDNA 5'端标记的生物素结合。经结合缓冲液反复漂洗 30 min 去除游离 avidin-HRP 后,加入 DAB 显色液(天根生物技术公司)显色,阳性者表明相应 ssDNA 序列可与 BAFF 结合,为 BAFF 适体。

### 1.8 酶联法比较各适体序列对 BAFF 相对结合力

在预包被 BAFF 多克隆抗体的微孔板中加入 100  $\mu l$  以结合缓冲液配制的 BAFF(25 ng/孔),室温 2.5 h,150  $\mu l$  结合缓冲液洗涤 1 次,除空白孔外每孔加入 100  $\mu l$  ssDNA 液(以 5'端标记生物素的上游引物进行非对称 PCR 制备得到,含 1.0 pmol ssDNA),每一种序列加 3 复孔,原始文库(library)ssDNA 也同法制备加入;室温 1.5 h,以 150  $\mu l$  结合缓冲液洗涤 3 次,各孔均加入 100  $\mu l$  以结合缓冲液配制的 avidin-HRP;室温 1.5 h,以 150  $\mu l$  结合缓冲液洗涤 6 次,以含四甲基联苯胺的 100  $\mu l$  显色液避光显色,加入 100  $\mu l$  终止液后 450 nm 测定光密度值。

### 1.9 统计学处理

应用 Excel 2003 统计软件,方差分析比较 6

种序列与 BAFF 的结合力;*t* 检验分析两适体序列间的差异。

## 2 结果

### 2.1 SELEX 产物的克隆

经 13 轮正向 SELEX,使与 BAFF 结合的序列得到富集,将筛选出的寡聚 DNA 克隆到 pGM-T 载体,转化 JM109 大肠杆菌,经氨苄西林抗性和蓝白斑筛选出 61 个克隆,小量提取质粒,经对称 PCR 鉴定为目的片段。

### 2.2 测序

自 61 个阳性克隆随机选取 42 个克隆测序,41 个克隆测序成功。引物区序列均未发生变异,随机区长度有 7 个克隆为 36 碱基,其余 34 个克隆为 37 碱基。各序列的编号与来源克隆号相同(表 2)。

### 2.3 同源性比较与序列分组

经 BioEdit V4.7.1 软件对 41 个克隆随机区序列进行同源性比较,分为 A(序列 2)、B(序列 3、12、17、25、27、32、35、43、44、49、51、53、54、55、60)、C(序列 52)、D(序列 10、13、29、42、47、57、58、59、262)、E(序列 6、8、16、28、41、56、222)和 F(序列 9、31、34、45、46、50、61)共 6 组。E 组随机区仅 36 碱基,其余均为 37 碱基。A 组与其他组未发现同源序列;C 组 5'端与 B 组 5'端相似,3'端与 D 组 3'端相同;E 组 5'端与 F 组 5'端相似,3'端与 D 组 3'端相似。选取 2、44、52、47、41 和 50 为各组特征性序列 Dot blotting 检测。

### 2.4 Dot blotting 鉴定各适体序列对 BAFF 的结合

结果显示,6 种适体序列均与 BAFF 结合而呈色,原始文库则不呈色;对照点中仅序列 2 在 APRIL 点有微弱呈色。结果表明 6 种序列均为 BAFF 的适体,而序列 2 与 APRIL 存在弱的交叉反应(图 1)。

### 2.5 各适体序列对 BAFF 相对结合力

经方差分析,6 种序列对 BAFF 的结合力有差异( $P < 0.05$ );经 *t* 检验,光密度均值最高的序列 44 与其他序列间均有显著差异( $P < 0.05$ ),表明序列 44 适体有相对最高的结合力。

### 2.6 适体的检索

检索美国适体数据库(The Ellington Lab Aptamer Database. <http://aptamer.icmb.utexas.edu/>),迄今尚无任何类型的 BAFF 适体登录,表明 BAFF 的核酸适体研究尚在起步阶段,本实验首先筛选获得 BAFF 的 ssDNA 型适体。

表 2 41 个克隆测序的随机区结果

Tab. 2 Sequences of 41 random domains

Clone number	Sequences of random domain
2	CGTATTTCACGCCCGCAGGTTTCGCTTCGTTGTTTT
3	GGGTGGCTTTCTTTGGTGCTGCTGGGGTGCGGATGTC
6	GAGGAGGAGGTTGGCGGTGGCCCTCGGTGTTTCGCC
8	GAGGAGGAGGTTGGCGGTGGCCCTCGGTGTTTCGCC
9	GAGGAGGAGGTTGGCGGTGGCCCTCGGTGTTTCGCC
10	AGCAGGAGGAGGAGGTTGGCGGTGGCCCTCGGTGTTTCGCC
12	GGGTGGCTTTCTTTGGTGCTGCTGGGGTGCGGATGTC
13	AGCAGGAGGAGGAGGTTGGCGGTGGCCCTCGGTGTTTCGCC
16	GAGGAGGAGGTTGGCGGTGGCCCTCGGTGTTTCGCC
17	GGGTGGCTTTCTTTGGTGCTGCTGGGGTGCGGATGTC
25	GGGTGGCTTTCTTTGGTGCTGCTGGGGTGCGGATGTC
27	GGGTGGCTTTCTTTGGTGCTGCTGGGGTGCGGATGTC
28	GAGGAGGAGGTTGGCGGTGGCCCTCGGTGTTTCGCC
29	AGCAGGAGGAGGAGGTTGGCGGTGGCCCTCGGTGTTTCGCC
31	GAGGAGGAGGTTGGCGGTGGCCCTCGGTGTTTCGCC
32	GGGTGGCTTTCTTTGGTGCTGCTGGGGTGCGGATGTC
34	GAGGAGGAGGTTGGCGGTGGCCCTCGGTGTTTCGCC
35	GGGTGGCTTTCTTTGGTGCTGCTGGGGTGCGGATGTC
37	GAGGAGGAGGTTGGCGGTGGCCCTCGGTGTTTCGCC
41	GAGGAGGAGGTTGGCGGTGGCCCTCGGTGTTTCGCC
42	AGCAGGAGGAGGAGGTTGGCGGTGGCCCTCGGTGTTTCGCC
43	GGGTGGCTTTCTTTGGTGCTGCTGGGGTGCGGATGTC
44	GGGTGGCTTTCTTTGGTGCTGCTGGGGTGCGGATGTC
45	GAGGAGGAGGTTGGCGGTGGCCCTCGGTGTTTCGCC
46	GAGGAGGAGGTTGGCGGTGGCCCTCGGTGTTTCGCC
47	AGCAGGAGGAGGAGGTTGGCGGTGGCCCTCGGTGTTTCGCC
49	GGGTGGCTTTCTTTGGTGCTGCTGGGGTGCGGATGTC
50	GAGGAGGAGGTTGGCGGTGGCCCTCGGTGTTTCGCC
51	GGCAGGTTTCTTTGGCGGTGGGGTGCGGATGTC
52	GGGTGGATTGTTTGGTGCTGGGGGGTGCTTCTGG
53	GGGTGGCTTTCTTTGGTGCTGCTGGGGTGCGGATGTC
54	GGGTGGCTTTCTTTGGTGCTGCTGGGGTGCGGATGTC
55	GGGTGGCTTTCTTTGGTGCTGCTGGGGTGCGGATGTC
56	GAGGAGGAGGTTGGCGGTGGCCCTCGGTGTTTCGCC
57	AGCAGGAGGAGGAGGTTGGCGGTGGCCCTCGGTGTTTCGCC
58	AGCAGGAGGAGGAGGTTGGCGGTGGCCCTCGGTGTTTCGCC
59	AGCAGGAGGAGGAGGTTGGCGGTGGCCCTCGGTGTTTCGCC
60	GGGTGGCTTTCTTTGGTGCTGCTGGGGTGCGGATGTC
61	GAGGAGGAGGTTGGCGGTGGCCCTCGGTGTTTCGCC
222	GAGGAGGAGGTTGGCGGTGGCCCTCGGTGTTTCGCC
262	AGCAGGAGGAGGAGGTTGGCGGTGGCCCTCGGTGTTTCGCC

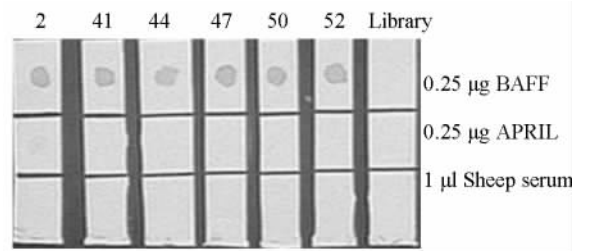


图 1 Dot blotting 鉴定 6 种适体序列对 BAFF 的结合力

Fig. 1 Dot blotting in identification of bonding force of 6 sequences to BAFF

2,41,44,47,50,52: Aptamer No.

Library: ComplexDNA from original library

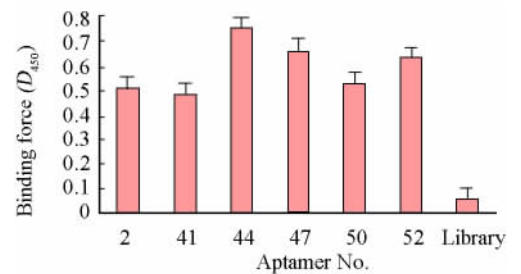


图 2 6 种适体序列对 BAFF 的相对结合力比较

Fig. 2 Comparison of the relative binding force of 6 sequences

2,41,44,47,50,52: Aptamer No.

Library: ComplexDNA from original library

### 3 讨论

SELEX 技术是利用分子生物学技术构建人工合成的单链随机寡核苷酸文库,由于单链随机寡核苷酸片段序列多变,特别是富含 GC 的序列三维构象复杂,很容易形成与靶物质结合的空间结构,因此在理论上能与各种靶分子结合。将随机寡核苷酸文库与靶分子相互作用,分离出结合的寡核苷酸配体,经反复扩增、筛选数个循环,使与靶分子特异结合的寡核苷酸序列得到富集。利用这一原理建立的 SELEX 技术已经成功获得多种靶分子的特异适体。目前,SELEX 技术已有基因组 SELEX、自动 SELEX 等多种形式,但大多需特定实验设备。硝酸纤维素膜是最易获得的分离载体,通过预处理,对核酸的吸附极低,同时对蛋白的吸附良好。另外,随机文库中可能存在特异结合硝酸纤维素膜的序列。本实验首次引入了负向 SELEX (subtractive SELEX) 以消除进化产物中的非特异序列,加快特异序列的富集。已有的适体研究表明,结合序列通常有高的 GC 含量,这不利于 PCR 扩增,而二甲亚砜、甜菜碱等可改善 GC 富集区的扩增<sup>[13]</sup>。为此,本实验优化了 PCR 反

应体系,并在每一轮正向 SELEX 均优化、微调对称 PCR 温度、时间与循环数,以消除显著增强的非特异扩增,这样做极为繁琐,但最终结果表明这是正确的,同时也有其他学者遇到了 PCR 的困难<sup>[14]</sup>。本研究最终鉴定的 6 种适体序列,GC 含量最高达 75%,连续出现 G 最多为 8 个,进一步证明之前持续优化 PCR 参数的重要性。

由于 BAFF 的过度表达与自身免疫疾病和一些肿瘤的发生高度相关,应用 BAFF 的生物效应阻断剂,可以特异性地阻断 BAFF 的生物学活性,抑制由 BAFF 介导的 B 淋巴细胞相关生物学效应,从而为部分自身免疫性疾病和淋巴细胞起源肿瘤的治疗提供新的药物。在自身免疫病方面,BAFF 的单克隆抗体 lymphostat-B 在小鼠体内可阻断由人 BAFF 导致的脾脏 B 细胞数目增加及 IgA 效价的上升,而用于猴体内可致脾与肠系膜淋巴结 B 细胞数量减少<sup>[10]</sup>。应用 BAFF 的可溶性受体 TACI-Fc 融合蛋白的动物实验中,对系统性红斑狼疮模型小鼠,给予 BAFF 的可溶性受体,可使动物蛋白尿的症状明显减轻,存活时间延长;对类风湿性关节炎模型小鼠,给予可溶性 TACI-Fc 融合蛋白能使其炎症显著减轻,并明显抑制骨的破坏及疾病的发展<sup>[15]</sup>;在恶性肿瘤方面,BAFF 可诱导慢性淋巴细胞白血病细胞产生抗凋亡蛋白,BAFF 的血清水平与非何杰金淋巴瘤治疗效果呈正相关<sup>[6,16-17]</sup>。然而,BAFF 抗体或可溶性受体均为蛋白质,应用于人体必须为人源性,制备和纯化不便,而本研究制备的 BAFF 核酸适体具有无免疫原性、能通过化学合成的方法大量制备纯化、长期储存不易失活、易于进行化学修饰等优点,国内外尚未见到有 BAFF 核酸型抑制剂的研究报道。本课题组将通过细胞学实验进一步研究 BAFF 适体对 BAFF 生物学效应的抑制作用,以期为肿瘤及自身免疫疾病的诊断和治疗探索新的药物。

## [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Blank M, Blind M. Aptamers as tools for target validation[ J ]. *Curr Opin Chem Biol*,2005,9( 4 ):336-342.
- [ 2 ] Hamula CL, Guthrie JW, Zhang H, *et al*. Selection and analytical applications of aptamers[ J ]. *Trends Anal Chem*, 2006,25( 7 ): 681-691.
- [ 3 ] Pestourie C, Tavitian B, Duconge F. Aptamers against extracellular targets for *in vivo* applications[ J ]. *Biochimie*,2005,87( 9-10 ):921-930.
- [ 4 ] Cunningham ET Jr, Adamis AP, Altaweel M, *et al*. A phase II randomized double-masked trial of pegaptanib, an anti-vascular endothelial growth factor aptamer, for diabetic macular edema [ J ]. *Ophthalmology*,2005,112( 10 ):1747-1757.
- [ 5 ] Burmeister PE, Lewis SD, Silva RF, *et al*. Direct *in vitro* selection of a 2'-O-methyl aptamer to VEGF[ J ]. *Chem Biol*,2005,12( 1 ): 25-33.
- [ 6 ] Novak AJ, Grote DM, Stenson M, *et al*. Expression of BLYS and its receptors in B-cell non-Hodgkin lymphoma: correlation with disease activity and patient outcome[ J ]. *Blood*, 2004,104( 8 ): 2247-2253.
- [ 7 ] Ju S, Zhang D, Wang Y, *et al*. Correlation of the expression levels of BLYS and its receptors mRNA in patients with systemic lupus erythematosus[ J ]. *Clin Biochem*,2006,39( 12 ):1131-1137.
- [ 8 ] Endo T, Nishio M, Enzler T, *et al*. BAFF and APRIL support chronic lymphocytic leukemia B-cell survival through activation of the canonical NF- $\kappa$ B pathway[ J ]. *Blood*, 2007, 109( 2 ): 703-710.
- [ 9 ] Sutherland AP, Mackay F, Mackay CR. Targeting BAFF: immunomodulation for autoimmune diseases and lymphomas[ J ]. *Pharmacol Ther*,2006,112( 3 ):774-786.
- [ 10 ] Baker KP, Edwards BM, Main SH, *et al*. Generation and characterization of lymphostat-B, a human monoclonal antibody that antagonizes the bioactivities of B lymphocyte stimulator[ J ]. *Arthritis Rheum*,2003,48( 11 ):3253-3265.
- [ 11 ] Cao P, Xia Z, Song W, *et al*. Neutralizing human anti-B-cell-activating factor of the TNF family ( BAFF ) scFv selected from phage antibody library[ J ]. *Immunol Lett*,2005,101( 1 ):87-94.
- [ 12 ] Cao P, Tang XM, Guan ZB, *et al*. Production and characterization of a bacterial single-chain antibody fragment specific to B-cell-activating factor of the TNF family[ J ]. *Protein Expr Purif*,2005,43( 2 ):157-164.
- [ 13 ] Kang J, Lee M, Gorenstein D. The enhancement of PCR amplification of a random sequence DNA library by DMSO and betaine: application to *in vitro* combinatorial selection of aptamers[ J ]. *J Biochem Biophys Methods*, 2005,64( 2 ):147-151.
- [ 14 ] Mushev MU, Krylov SN. Selection of aptamers by systematic evolution of ligands by exponential enrichment: addressing the polymerase chain reaction issue[ J ]. *Anal Chim Acta*,2006,564( 1 ): 91-96.
- [ 15 ] Mackay F, Mackay CR. The role of BAFF in B-cell maturation, T-cell activation and autoimmunity[ J ]. *Trends Immunol*,2002,23( 3 ):113-115.
- [ 16 ] Nishio M, Endo T, Tsukada N, *et al*. Nurselike cells express BAFF and APRIL, which can promote survival of chronic lymphocytic leukemia cells via a paracrine pathway distinct from that of SDF-1 $\alpha$ [ J ]. *Blood*, 2005;106( 3 ): 1012-1020.
- [ 17 ] Fu L, Lin-Lee Y, Pham LV, *et al*. Constitutive NF- $\kappa$ B and NFAT activation leads to stimulation of the BLYS survival pathway in aggressive B-cell lymphomas[ J ]. *Blood*, 2006, 107( 11 ): 4540-4548.

[ 收稿日期 ] 2007 - 03 - 13

[ 修回日期 ] 2007 - 05 - 21

[ 本文编辑 ] 郁晓路