中国科学: 化学 2025 年 第 55 卷 第 2 期: 444 ~ 462
SCIENTIA SINICA Chimica chemcn.scichina.com
《中国科学》杂志社 SCIENCE CHINA PRESS

评 述

核酸适配体结合亲和力评测方法的研究进展

汪凯[1,2], 李延生[1,2*], 高国伟[1,2], 宋钰[1,2], 胡敬芳[1,2]

1. 北京信息科技大学传感器重点实验室, 北京 100101
2. 北京信息科技大学现代测控技术教育部重点实验室, 北京 100192
*通讯作者, E-mail: lys2019@bistu.edu.cn

收稿日期: 2024-08-03; 接受日期: 2024-09-23; 网络版发表日期: 2024-12-13
国家自然科学基金(62101053), 北京市教育委员会科学研究计划(KM202211232004), 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(RXRC2022001), 北京市属高等学校高水平科研创新团队建设支持计划(BPHR20220124)资助项目

摘要 可体外合成的核酸适配体在生命健康领域受到越来越多的关注, 其与靶标的结合亲和力是重要的性能指标之一. 评测核酸适配体结合亲和力的方法多种多样, 我们对技术方法进行筛选分类, 详细阐述了每种技术方法的基本原理、研究进展以及需要突破的瓶颈问题. 成熟的核酸适配体结合亲和力评测方法涵盖了表面等离子体共振法、生物层干涉法、酶联适体测定法以及石英晶体微天平法等. 这些技术能够稳定且灵敏地捕捉分子结合信号, 从而显著推动核酸适配体技术的研究进展. 然而, 传统的核酸适配体固定技术可能会对分子构象产生一定影响, 从而改变其在使用环境中的真实结合亲和力. 为解决这一问题, 研究者们正积极探索新型的无需固定就能评估分子结合亲和力的方法, 例如圆二色性法、紫外-可见吸收光谱法、荧光各向异性、荧光光谱法、等温滴定量热法、凝胶阻滞法、微量热泳动法以及流体动力分散技术等. 这些新技术方法的持续进步将极大地推动核酸适配体在筛选和应用等领域的技术方法创新, 为核酸适配体的进一步商品化铺平道路.

关键词 核酸适配体, 结合亲和力, 分类策略, 评测方法

1 引言

分子之间相互作用是影响生物复杂生命活动的关键[1,2], 核酸与其他生物分子的相互作用对于正常生命活动更是不可或缺[3,4]. 核酸适配体作为核酸的一种特殊形式, 具有比传统抗体更低的成本和稳定性, 更易化学合成和修饰[5,6]. 核酸适配体通过与靶标的结合来触发相互作用机制, 相互作用的强度直接决定了核酸适配体的作用效果[7]. 分子间的相互作用越强, 结合效果越好. 衡量相互作用强度的指标叫做结合亲和力, 通常用平衡解离常数K_D来表示. 一般而言, 核酸适配体的K_D值在微摩尔到皮摩尔范围内[8~10]. 较低的K_D值意味着核酸适配体与靶标的结合更牢固, 结合亲和力更高[11]. 高结合亲和力的核酸适配体能更有效地与靶标结合, 有助于核酸适配体-靶标复合物在复杂体系中依然保持稳定的结合状态, 使核酸适配体在生物医学等领域得到更广泛地应用. 结合亲和力评测方法为评测结合亲和力提供了具体技术与实验工具, 是评测核酸适配体结合亲和力的重要保障[12].

当前, 用于评测核酸适配体的结合亲和力的技术

引用格式: Wang K, Li Y, Gao G, Song Y, Hu J. Research progress on evaluation methods of binding affinity of nucleic acid aptamer. *Sci Sin Chim*, 2025, 55: 444–462, doi: 10.1360/SSC-2024-0173

© 2024 《中国科学》杂志社

方法取得了长足进步[13~17]，有效促进了核酸适配体的实用化进程[18,19]. 我们注意到Thevendran和Jing等人在之前已经做了一些相关整理工作. Thevendran等人[20]的分类策略是基于有标签和无标签，Jing等人[21]则是基于分离与混合的方法. 这些策略有些是以核酸适配体、靶标或者复合物的浓度来测定K_D值，另一些则是通过核酸适配体与靶标结合前后探测信号或者本身的特质转变来评测核酸适配体的结合亲和力. 客观地说，核酸适配体固定与否是评测核酸适配体结合亲和力时无法绕开的问题. Qin等人[22]就发现sgc8核酸适配体与人T淋巴母细胞(CCRF-CEM)的特异性结合亲和力深受oligo-T间隔物长度的影响. 大于或者小于10个胸腺嘧啶都会减少sgc8与CCRF-CEM的结合. 此外，用10个相同oligo-T间隔物固定的sgc8比不固定状态下具有更好的靶细胞捕获能力(图1). 他们认为，受限表面的适当间隔长度消除了核酸适配体的结合空间位阻，表现出更高的结合亲和力来保证核酸适配体与靶细胞结合. 不过加入胸腺嘧啶链作为间隔层用于固定核酸适配体可能会导致核酸适配体的构象发生变化，加入核苷酸也会增加静电排斥作用，致使核酸适配体显示出更优的结合亲和力. 所以，在评测核酸适配体的结合亲和力时, 很有必要考虑核酸适配体固定与否.

本篇综述把这些技术方法分为两类，一类是核酸适配体需要固定化，另外一类是核酸适配体非固定化(图2). 固定化的意思是评测核酸适配体结合亲和力时，核酸适配体通过物理或者化学的方法被固定在表面来发生结合事件. 核酸适配体与靶标结合会导致质量、分子层等物理性质或者分子构型的变化而产生检测信号[22]. 与质量相关的直接评测结合亲和力的固定策略的方法包括原子力显微镜和光镊等，它们都是在单分子水平上探测力在样品上的作用与产生的位移或者相距的距离的关系来得到准确的结合亲和力，光镊还能实现非入侵性地操纵和测量单个分子[23,24]. 这种通过力-距离曲线来理解分子识别和分子互作的机制对于全面理解分子互作具有重要意义[25,26]. 通常情况下, 核酸适配体固定化可以增加实验的稳定性，避免核酸适配体在实验过程中丢失或者被降解[27]，也更利于清除一些非特异性结合的分子而不会减少核酸适配体的数量，获得更好的信号响应性[28]. 核酸适配体非固定化是指核酸适配体与靶标发生结合时，不对核酸适配体或者靶标做任何的锚定等束缚行为，二者处于自由状态，保证其原有三维结构与功能特性的情况下发生相互作用. 自由状态下，核酸适配体可以灵活调整构型，方便与靶标分子快速有效地结合. 相比固定化, 非固定化的核酸适配体会因为不需要考虑锚点而能更容易合成和纯化, 间接减少了背景信号和非特异性结合. 而核酸适配体被固定到表面后, 很难再将其释放出来, 影响后续实验的再回收和再应用. 固定化过程还可能会导

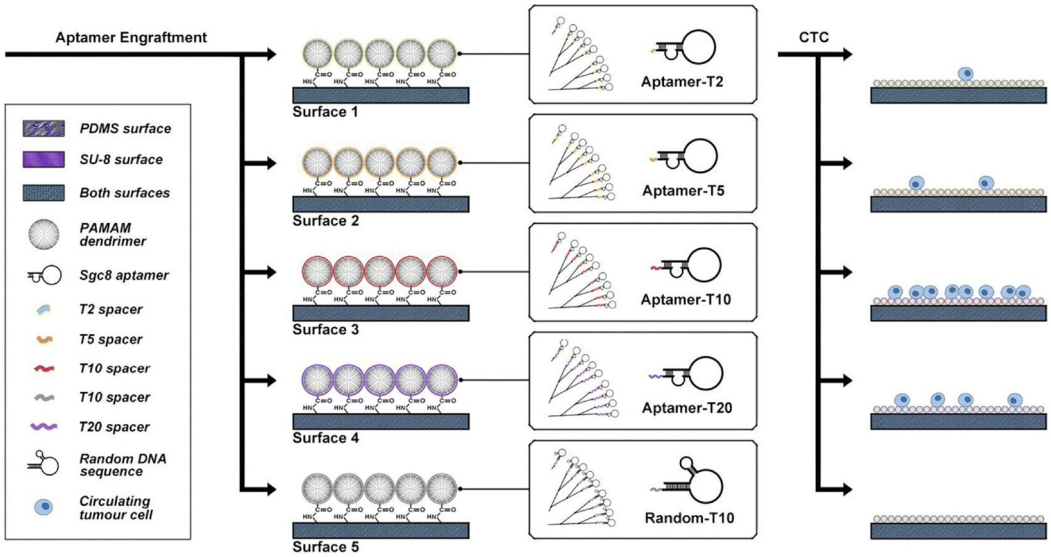


图 1　(网络版彩图)间隔物长度对sgc8核酸适配体与CCRF-CEM循环肿瘤细胞结合的影响[22]

Figure 1　(Color online) The effect of spacer length on the binding of sgc8 nucleic acid aptamer to CCRF-CEM circulating tumor cells. Reproduced with permission from Ref. [22]. Copyright 2019, Springer Nature.

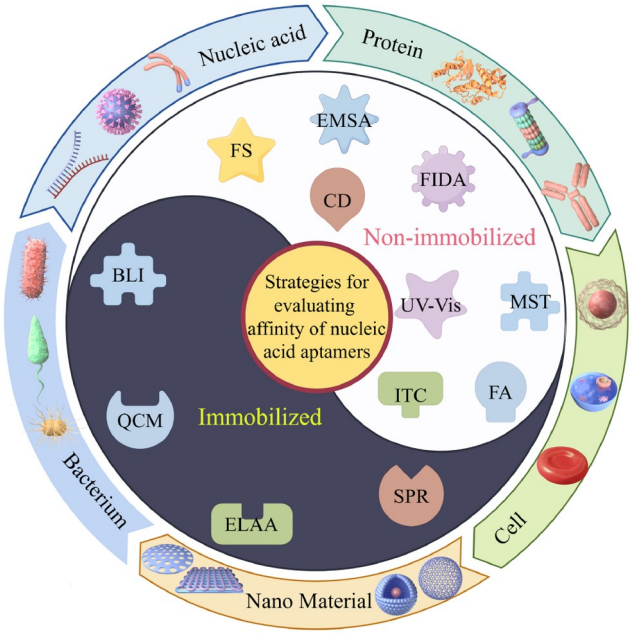


图 2 (网络版彩图)评测核酸适配体结合亲和力的策略和方法
Figure 2 (Color online) Strategies and methods for evaluating the binding affinity of nucleic acid aptamers.

致核酸适配体的构象变化和功能改变[22]，加入额外的物质也会增加无关的相互作用[15]. 因此，研究人员在采取固定化操作时，应考虑如何消除产生的影响. 本文对每种方法的原理、性能进行了阐述，以期在研究人员选择结合亲和力评测方法时提供参考.

2 固定化策略评测结合亲和力

2.1 石英晶体微天平法

石英晶体微天平(QCM)法是一种高灵敏的基于石英晶体平面质量变化响应的方法. 被固定在石英盘表面的核酸适配体与靶标分子结合后的质量变化产生压电效应导致输出信号变化[29]. QCM法评测核酸适配体的结合亲和力有许多优点，石英晶体芯片易定制、成本低，目前技术已经能够实现晶体芯片的纳米级共振频率变化检测，对于评测小分子靶标与核酸适配体的结合亲和力奠定了非常积极的优势基础[30,31]. 核酸适配体独具的高选择性又反过来使得基于QCM的传感器成为当前评测核酸适配体亲和力的有力工具[32]. 比如，Erkal-Aytemur等人[33]开发了基于核酸适配体的QCM传感器用于血清样品中癌胚抗原(CEA)的检出，同时得到比CEA1和CEA2报道的更低一个数量级的K_D值，分别为0.43 ± 0.14和0.75 ± 0.42 nM. 使用“SELEX”技术筛选核酸适配体时，QCM可以作为有力的监测工具进一步确定该核酸适配体的结合亲和力. Lin等人[34]运用QCM评测了从1431种核酸适配体突变体中筛选出来的严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2型(SARS-CoV-2)刺突蛋白的两种特异性核酸适配体，结果表明最优核酸适配体的K_D = 8.3 μM. Hu等人[35]首次把QCM与SELEX技术结合，以QCM作为监测平台通过共振频率的变化实时监测筛选过程，得到高结合亲和力的丙烯酰胺核酸适配体，K_D值低至17.2 nM.

基于QCM评测核酸适配体的结合亲和力发展迅速，可依然存在一些挑战亟需解决：(1)重复使用性问题. 根据报道，基于抗体的QCM免疫传感器的可重复使用次数不低于10次[36]. 这种传感器会在电极表面引入羧基与抗体形成偶联，通过NaOH等碱性催化剂让酯基水解实现抗体再生[37]. 然而，我们目前还没有搜索到基于核酸适配体的QCM传感器的类似报道. (2)核酸适配体要想在晶体表面固定则需要进行修饰，直接修饰很可能会造成信号转导表面损坏，改变晶体表面的机械性质，导致不可逆损坏并影响检测结果[38]. (3) QCM仪器的非便携化和工艺复杂性一直是基于QCM的快速评测方法的痛点，如何朝着轻量化、高重复性的方向优化尤其受到研究人员的关注，探索使用更轻质的材料或者融合薄膜技术可以直接减少整体质量. 同时，结合电化学的方法使核酸适配体无创附着在晶体表面达到固定的目的也不失为一种避免破坏晶体表面的可选方案.

2.2 表面等离子体共振法

表面等离子体共振(SPR)法于20世纪90年代开始用于评测核酸适配体的结合亲和力. SPR的原理是基于金属薄膜表面自由电子与入射光波相耦合产生共振，导致反射光强度发生变化，该变化与金属表面分子吸附层的质量变化关联，实时监测和量化分子间的相互作用[39]. 通常情况下，核酸适配体会被固定在金属表面，质量更大的靶标分子在与核酸适配体结合后，表面的质量变化更明显，产生的信号变化直接导出(图3)[40,41]. Mukherjee等人[42]通过SPR评测了20甲基螺内酯G(SPXR)的特异性核酸适配体的结合亲和力，确定特异性核酸适配体的K_D = 0.345 nM，表明该核酸适

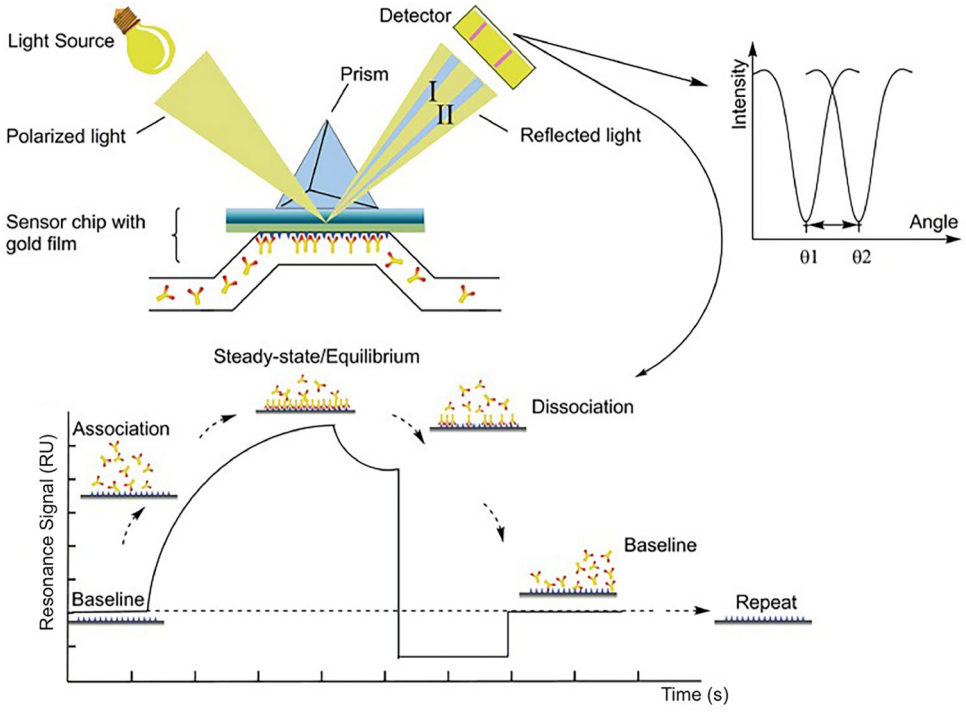


图 3　(网络版彩图) SPR技术多轮循环评测核酸适配体的结合亲和力全过程[40]

Figure 3　(Color online) The whole process of evaluating the binding affinity of nucleic acid aptamers by SPR technique. Reproduced with permission from Ref. [40]. Copyright 2015, Frontiers Media S.A.

配体对SPXR具有超高亲和力. Jia等人[43]则将凝血酶(IgE)与不同尾部长度的纳米探针连接的核酸适配体结合, 通过SPR动力学分析该核酸适配体与IgE的结合亲和力, 得到二者的结合亲和力随距离的增大而呈现先小后大的规律(图4). 可见, 除了用碱基作为间隔物, 还可以用纳米材料来替代碱基用于链接核酸适配体. 相比之下, 纳米材料具有碱基所没有的独特刚性, 可以更好地稳定核酸适配体的空间结构[44]. 针对肝纤维化, Chen等人[45]通过SPR评测了胰岛素样生长因子II受体的多种特异性核酸适配体, 得到了高亲和力的DNA核酸适配体aptamer-20, K_D值为35.5 nM, 为诊断和治疗肝纤维化提供了一个潜在的解决方案. Walker等人[46]则使用SPR发现了细胞表面蛋白卵泡抑素(FS288)与肝素/硫酸乙酰肝素(HS)进行预孵育会显著降低肌生长抑制素和激活素A的结合动力学, 得到肝素/HS通过链长来介导FS288的二聚化降低与肌生长抑制素和激活素A的缔合率的同时不影响FS288的解离率和拮抗活性, 完善了FS288与肝素/HS相互作用影响配体结合的相关信息.

在生物化学领域, SPR是评测核酸适配体结合亲和力的主流方法之一, 优点很突出: 灵敏度高、高通量、无标记以及实时监测等[47,48], SPR的稳步发展更让其成为许多领域的首选检测方法, 已成为评测分子相互作用的"金标准". 但是, SPR要考虑核酸适配体会受到空间位阻效应和构象改变可能导致的特性变化, 在复杂体系如人体血清等天然样品中评测核酸适配体的结合亲和力时, 也会因为体系中基质聚集和非特异性结合而影响SPR动力学检测. 同时, 复杂样品中不能含有甘油、蔗糖、咪唑等高折光成份, 否则容易增加光的散射和吸收, 导致反馈信号大幅减弱, 进而影响结合亲和力评测. 此外, 如何实现在复杂体系中靶标分子浓度较低时, SPR也能够准确评测核酸适配体的结合亲和力, 对于SPR技术的进一步发展很重要[49].

2.3　酶联适体测定法

酶联适体测定法(ELAA)是一种经典的核酸适配体结合亲和力评测技术, 在酶联免疫吸附测定(ELISA)上发展而来的. 在此方法中, 核酸适配体通过共价键、生物素-亲和素系统或者核酸杂交等方式固定在载体表面, 与靶标分子结合后加入酶标检测分子催化产生

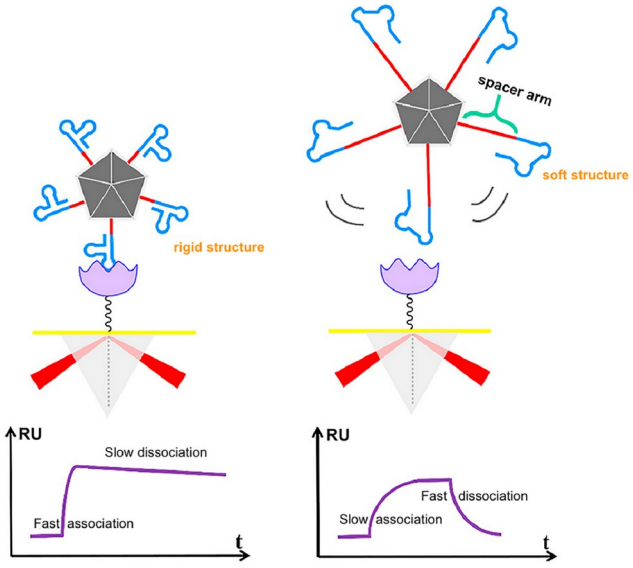


图 4 (网络版彩图)不同尾长的纳米探针影响下，核酸适配体与凝血酶的不同结合亲和力[43]

Figure 4 (Color online) Different binding affinity between nucleic acid aptamer and thrombin under the influence of nanoprobe with different tail length. Reproduced with permission from Ref. [43]. Copyright 2021, Elsevier.

颜色变化，通过颜色变化定量评测核酸适配体与靶标的结合亲和力. ELAA常被设计成便携式装置用于即时检测用于检测特定的抗原、病原，在大规模疾病、病毒筛查中绽放异彩，是疾病预防领域的宠儿. 例如，Almeida等人[50]运用“SELEX”筛选技术筛选出了寨卡病毒(ZIKV)的特异性核酸适配体(ZIKV60)，采用ELAA测定ZIKV60的K_D为2.28 ± 0.28 nM. 他们进一步基于ZIKV60开发成传感器成功实现了鉴别和诊断ZIKV，为其他类似病毒如登革热和黄热病等疾病预防提供了参考. 此外，Marnissi等人[51]通过建立夹心ELAA评测筛选出了新城疫病毒的两种高结合亲和力特异性核酸适配体，K_D值分别为31和78.1 nM. Fu等人[52]则利用“SELEX”筛选技术得到鸡病支原体PvpA蛋白的特异性核酸适配体Apt-236, K_D = 1.3 ± 0.18 nM. 根据Apt-236成功开发了间接阻断型ELAA来检测鸡病支原体PvpA蛋白(图5). 开发的新方法与商用ELISA试剂盒的结合亲和力评测结果基本一致，为检测鸡病支原体提供了一种新的方案.

ELAA评测核酸适配体的结合亲和力时需要颜色信号的变化来转导出结合的强度，酶等过程分子的功能性可能因温度、溶液PH等因素大打折扣，导致结合亲和力评测出错[53]. 多步误差的累积也会严重降低该方法的灵敏度与精度，这在评测核酸适配体与小分子的结合亲和力上是致命的. 当前，基于ELAA的微阵列芯片因其高通量和低成本常被集成到纸基芯片等便携化、微型平台上用于即时检验，但面对低结合亲和力的受体靶标时，ELAA还是显得捉襟见肘. 好消息是目前已有研究团队提出了基于DNA条形码和DNA互补配对的策略实现多靶点检测与信号放大. 如何在基于ELAA的微型装置上放大微弱信号提高结合亲和力的

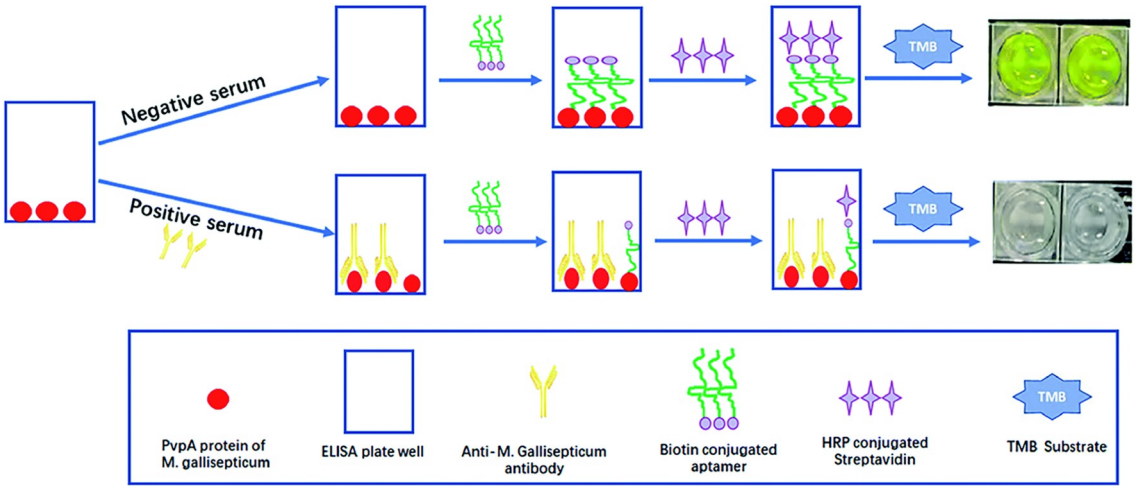


图 5 (网络版彩图)间接阻断型ELAA评测特异性核酸适配体结合亲和力的流程图[52]

Figure 5 (Color online) Flow chart for the evaluation of binding affinity of specific nucleic acid aptamers by indirect blocking ELAA. Reproduced with permission from Ref. [52]. Copyright 2021, Royal Society of Chemistry.

评测范围还需研究人员进一步深入探索.

2.4　生物层干涉法

在生物层干涉(BLI)法中, 核酸适配体被共价结合固定到平台表面. 发生特异性结合时, 平台表面的生物分子层变厚, 介质折射率的改变导致光线的路径长度发生改变. 通过监测这种变化就可以评测核酸适配体的结合亲和力(图6). 当前, 采用BLI评测核酸适配体的结合亲和力很流行, 比如Zhao等人[54]通过BLI从所有干扰素-γ (IFN-γ)中筛选评测得到了最低K_D = 101 nM的特异性核酸适配体IFNG-8, 它们把IFNG-8作为传导元件, 痕量检测IFN-γ的下限为0.0718 pM. Bai等人[55]研究合成了一种靶向人PCSK9的高结合亲和力单抗, 经BLI测得K_D的值为1.72 nM. 他们自主合成的单抗具有针对靶标的特异性高结合亲和力, 解离速率极低, 作用时间更长, 可以视为潜在的用于治疗人高胆固醇血症的候选药物. Li等人[56]则采用了BLI来实现了快速、重复性强地评测鱼血清抗原与特异性多聚体抗体IgM的强结合亲和性. 它们还把BLI与ELISA方法进行了一系列的对比, 得出BLI的高精确性和高重复性比ELISA更好. 为了更好地预防黄曲霉毒素M1 (AFM1)致家禽死亡, Liu等人[57]通过BLI评测了24种候选核酸适配体并得到了K_D为8.12 ± 1.51 nM的高结合亲和力核酸适配体. 他们提出了一种基于此核酸适配体的定量检测方法并成功实现了在乳制品中皮克数量级的AFM1的低检测限. 此外, Qi等人[58]基于多价策略设计一种新型的双核酸适配体组合体(Chi-Apt)来增强对卡那霉素(KAN)的结合强度, 经BLI法测得Chi-Apt与KAN结合时, 光谱信号的范围为0.0219~0.0443 nm, 比原核酸适配体(Ori-Apt)信号范围0.0095~0.0277 nm强得多, 得到Chi-Apt的K_D = 1.08 μM, Ori-Apt的K_D为37.2 μM, 前者的结合亲和力是后者的34倍(图7).

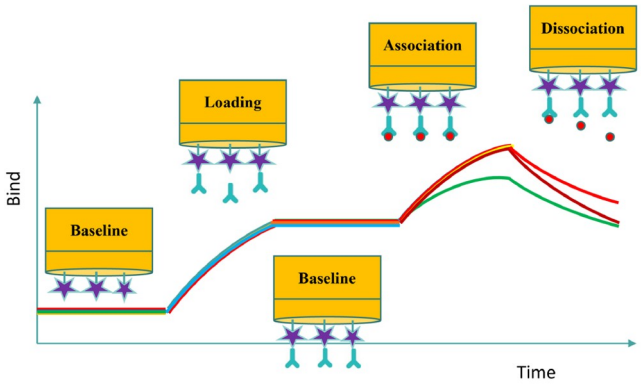


图 6　(网络版彩图)BLI评测核酸适配体结合亲和力的原理

Figure 6　(Color online) The principle of evaluating the binding affinity of nucleic acid aptamers by BLI.

BLI与SPR法在评测核酸适配体的结合亲和力上具有异曲同工之妙, 但是BLI在面对复杂体系时不会出现信号采集受损的担忧, 尤其是传统技术难以处理的领域比如免纯化样本分析中更显独特优势, 但因光学薄膜吸附导致核酸适配体的结合亲和力评测出现误差却是BLI方法发展要解决的一个难点[59,60]. 如何在现有技术上进一步提升再生能力来提高BLI性能的优异性, 也是亟待解决的一个难题[61]. 此外, 实验涉及多结合位点的相互作用或与多聚体结合时, BLI可能难以做到区分, 容易造成误估[62,63]. 我们认为, BLI要是能综合其他分子参数如三维构型, 将实现一步获得包括结合亲和力在内的全面结合信息[64].

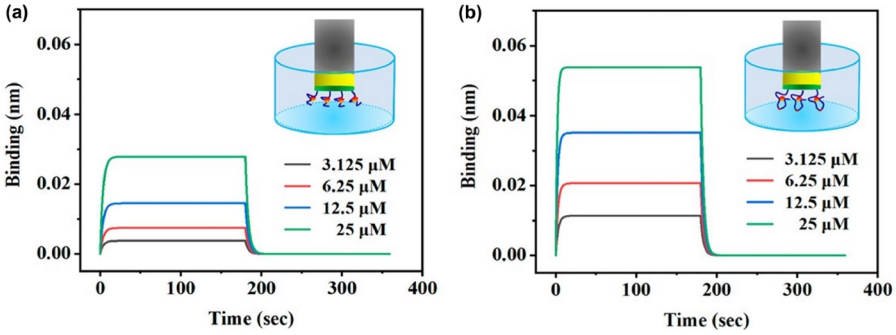


图 7　(网络版彩图) (a) Ori-Apt的BLI光谱信号; (b) Chi-Apt的光谱信号[58]

Figure 7　(Color online) (a) BLI spectral signal of Ori-Apt. (b) BLI spectral signal of Chi-Apt. Reproduced with permission from Ref. [58]. Copyright 2023, Elsevier.

3 非固定化策略评测结合亲和力

3.1 圆二色性法

圆二色性(CD)早在19世纪上叶就被Biot等人[65]发现了. CD法的主要原理是蛋白质或者核酸等生物分子中存在不对成碳，导致他们对左右圆偏振光的吸收不同产生不同的圆二色谱[66,67]. 不同的物质分子对圆偏振光的吸收不同产生不同的圆二色谱，通过圆二色谱判断构象就能区分分子种类[68]. CD法评测核酸适配体的优点有很多，需要的样本量极少，不受分子量和分子大小的限制，在检测和区分手性分子、立体异构体上，CD法更是独当一面，是其他评测方法所不具备的, 对微小的构象变化也能探测到. 比如, Dhal等人[69]合成不同链长的9-O-咪唑基烷基小檗碱衍生物(BI)并通过CD法评测了BI与小牛胸腺DNA的结合能力, 结果表明BI越长，结合亲和力越高. Rahaman等人[70]针对DNA碱基对设计了椅子形和船形构象，通过CD光谱得到了椅子形构象复合物具有更高的结合亲和力. 另外，Sun等人[71]利用九种取代苯基功能化的2,2′:6′,2″-三联吡啶适配体合成了相应的Fe(II)配合物，再利用CD法验证了九种配合物与循环肿瘤DNA (CT-DNA)的强结合亲和力, 为开发抗肿瘤药物提供候选物(图8). 同样地，Chen等人[72]也用CD法研究了九种钴基三联吡啶配合物，证实了钴基三联吡啶配合物能与CT-DNA的碱基全部对接和二者的强结合亲和力. Wang等人[73]则把关注点放在CD法对分子构象的高灵敏度上, 综合核酸外切酶消化技术与CD法开发了快速荧光核酸适配体传感器，解决了核酸适配体的结构转换功能不足和结合亲和力不强的问题.

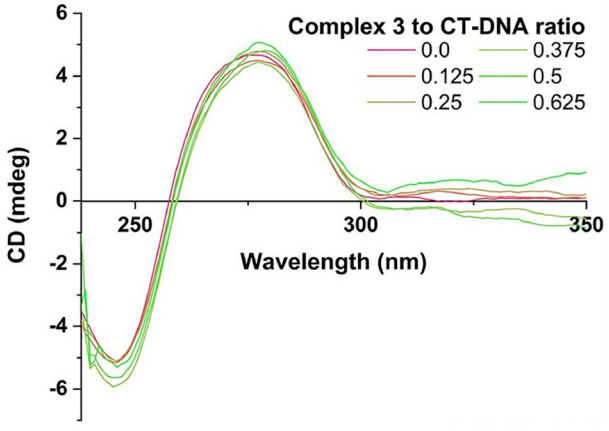


图 8 (网络版彩图)用CD研究九种配合物与CT-DNA的相互作用与结合模式, 评测他们的特异性结合亲和力[71]

Figure 8 (Color online) The interaction and binding modes of nine complexes with CT-DNA were studied by CD, and their binding affinity to CT-DNA was evaluated. Reproduced with permission from Ref. [71]. Copyright 2023, Royal Society of Chemistry.

通常情况下，检测非常微弱的分子构象变化和评测低结合亲和力的核酸适配体时研究人员都更愿意采用CD法. CD法灵敏度高、分辨率好, 微量样品就可以获得分子的完整信息. 但是CD法更倾向于检测单一的蛋白质或者核酸等生物分子的构象，对于复杂体系中的核酸适配体和靶标分子构象可能没法准确辨析[74]. 再有，CD法不适用于结构复杂和不稳定的核酸适配体，不能实时监测. 基于CD光谱评测核酸适配体结合亲和力的仪器正在朝着更小型化的方向发展，如何让CD仪器和设备的成本更低, 更智能化和高速化则是接下来CD仪器要面对的新挑战[75].

3.2 紫外-可见吸收光谱法

紫外-可见(UV–Vis)吸收光谱法的发现可以追溯到二十世纪初. UV–Vis通过不同生物分子对光的透射、反射以及选择性吸收来生成特征吸收光谱，并以此来分析推断分子种类、含量和分子构象、分子间的结合模式以及结合亲和力[20]. 不同浓度的不同反应物通过UV–Vis得到所有生物分子的吸光度峰和对应的强度，进而得到核酸适配体的结合亲和力. 比如本例中，Toro等人[68]用卟啉5,10,15,20-四酰基-(*N*-甲基-吡啶基)-21,23*H*-四酰基卟啉(TmPyP4)来滴定固定浓度的凝血酶核酸适配体(TBA). 初始滴定观察到波长430 nm处存在TmPyP4与TBA复合物的特征吸收峰. 随着滴定浓度的增加，过量的游离TmPyP4直接导致UV–Vis吸收光谱的峰从430 nm移动至422 nm. 不同的吸光度值能定量反映溶液中各种组份的浓度，进而推导得到TBA的K_D为5.7 ± 0.2 μM. Dabhade等人[76]把关注点放在基于银纳米颗粒的核酸适配体生物传感器对大肠杆菌进行快检上，用UV–Vis证实了该核酸适配体与DH5α大肠杆菌的高结合亲和力.

客观地说，利用UV–Vis评测核酸适配体的结合亲和力比较常见, 广泛运用于多个学科领域, 是实验室很常见的分子互作研究设备. 但是要注意UV–Vis的检测结果受样本浓度的影响比较大，浓度超出检测范围会导致吸光度与浓度不成正比，一定程度上限制了它的适用性. 此外，溶液中出现的阳离子也可能导致UV–

Vis产生不必要的峰而使结果分析变得复杂; 溶剂极性与pH也会影响吸收峰的波长和强度, 因此严格的实验条件对于UV–Vis评测核酸适配体的结合亲和力很有必要. 另外, 在评测构象变化微弱的核酸适配体的结合亲和力时UV–Vis无法区分溶液中的组份, 如何放大构象的微弱变化或许能帮助UV–Vis评测低构象变化的核酸适配体的结合亲和力.

3.3　荧光各向异性

荧光各向异性(FA)是指荧光分子受到垂直和水平方向上的偏振光激发后会产生各自方向上的偏振发射光, 当荧光标记的分子与其他分子结合时整体尺寸增加, 在溶液中的旋转速度变慢, 偏振发射光能保持更持久的偏振状态, 得到高的荧光各向异性值; 反之, 较小尺寸的分子则旋转速度较快, 荧光各向异性值则较低. 通过标记了荧光的靶标与核酸适配体结合前后荧光各向异性值的变化就能准确评价核酸适配体的结合亲和力[77]. FA在结合亲和力评测上有其独特的优势. FA法可以实现单分子水平上的检测, 尤其是构象动力学的监测. FA通过测量荧光分子的旋转速度直接提供完整准确的分子动态信息, 对于理解分子功能和相互作用机制是其他评测方法所不具备的. 而且, FA还能准确定位小分子如核酸适配体的结合位点, 实现在核苷酸水平探索分子间的相互作用. 据Grätz等人[78]报道, 他们做了人M2毒蕈碱型乙酰胆碱受体(M_2R)与标记了两个5-羧基四甲基罗丹明(TAMRA)荧光分子的核酸适配体的结合亲和力评测实验, 带有TAMRA的核酸适配体与M_2R结合后会导致复合体转动自由度降低而增大其各向异性. 通过FA法和生物发光共振能量转移(BREF)法实时监测结合行为, 得到特异性核酸适配体的K_D = 9.08 ± 0.12 nM (图9), 与放射性配体竞争结合实验报告的K_D值高度吻合. 可以说明, FA法与BREF法配合能够代替放射性策略来评测核酸适配体的结合亲和力. 另外, 为了使用更少的检测样本以及花费更少的时间去孵育样品, Weaver等人[79]开发了一种基于孔板的高效FA法来评测凝血酶和特异性核酸适配体的结合亲和力, 实现了减小30倍量的样品体积以及实验时间缩短至20分钟也能正确评测核酸适配体的结合亲和力. 同时, 他们还对建立核酸适配体-靶标结合模型做了一定的研究, 结果表明希尔系数n = 9才是最优拟合曲线, 对当前广泛运用的凝血酶与核酸适配体的1:1结合模型评测结合亲和力提出了质疑. Minagawa等人[80]给核酸适配体标记荧光基团后与分泌型免疫球蛋白A特异性结合, 随着复合物分子体积与质量的增加, 分子的旋转运动受限致使各向异性信号增强, 表征得到特异性核酸适配体的K_D = 13.6 nM. 他们又对该核酸适配体的链长进行了一定的优化, 发现优化后核酸适配体的K_D竟然能减小到3.7 nM, 比原始核酸适配体的结合亲和力提高了4倍(图10). 他们通过FA评测核酸适配体的结合亲和力, 并通过优化链长来改变核酸适配体的结合亲和力. 这个例子很好地说明了对核酸适配体进行筛选和结合亲和力评测时, 结合亲和力评测方法与结合亲和力优化方法相结合会成为以后评测高质量核酸适配体的优选方案.

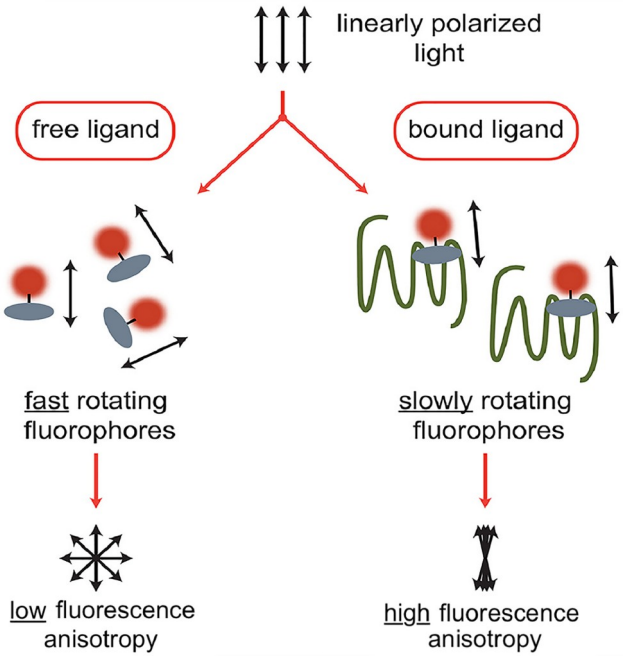


图 9　(网络版彩图) FA实时评测核酸适配体与M_2R的结合亲和力的原理图[78]

Figure 9　(Color online) Schematic diagram for real-time evaluation of binding affinity between nucleic acid aptamer and M2R by FA. Reproduced with permission from Ref. [78]. Copyright 2021, Elsevier.

FA是个很有力的核酸适配体结合亲和力评测工具, 但在核酸适配体上标记荧光的前提是对核酸适配体结合亲和力的影响很小或者可以忽略. 此外, 荧光分子本身自带电性也很可能与核酸适配体产生静电作用而影响FA的测量结果[81]. 荧光分子的寿命也是一个必须考虑的问题. 结合前后荧光分子所处的液体环境

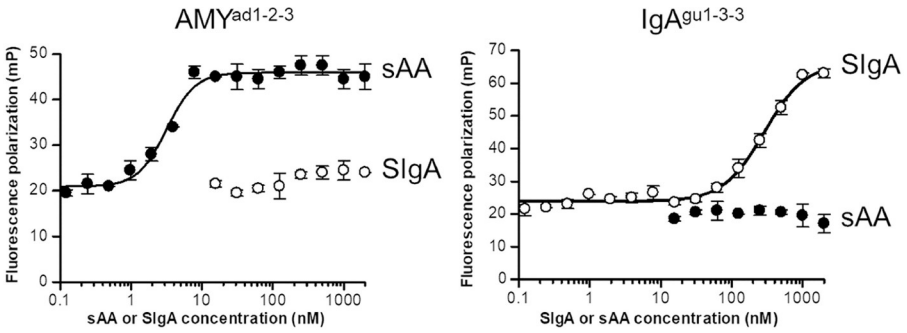


图 10 FA评测sAA和SIgA与荧光标记的AMY$^{ad1\text{-}2\text{-}3}$与IgA$^{gu1\text{-}3\text{-}3}$的特异性和结合亲和力[80]

Figure 10 Evaluation of specific binding and binding affinity of sAA and SIgA with fluorescent-labeled AMY$^{ad1\text{-}2\text{-}3}$ and IgA$^{gu1\text{-}3\text{-}3}$ by FA. Reproduced with permission from Ref. [80]. Copyright 2020, American Chemical Society.

发生变化很可能导致荧光分子发生猝灭，干扰实验结果. 要注意到，核酸适配体上修饰荧光分子可能要增加连接部分，而高柔韧性的连接部分会改变荧光分子的自由旋转能力导致反馈信号产生误差，误导结合亲和力评测[79]. 未来，如何减小甚至消除这种影响对于FA实现更加准确的结合亲和力评测具有重要意义.

3.4 荧光光谱法

荧光光谱(FS)法评测核酸适配体的结合亲和力的主要原理是核酸适配体与标记了荧光基团的蛋白等靶标分子结合并保持平衡浓度时，由于结合引起了分子构象的转变或者结合界面产生了水分子而导致荧光信号强度发生了改变[82~84]. 这种改变能定量地反映核酸适配体和靶标分子的结合量，从而得到核酸适配体的K_D. 被标记了荧光的核酸适配体可直接用于评测其本身的结合亲和力，但是化学修饰可能会改变核酸适配体的真实结合亲和力，一般都会在靶标分子上标记荧光[85]. Hou等人[86]运用FS分析比较了多巴胺的两种DNA适体，得到了结合亲和力最高的DNA适配体的K_D为2.37 μM. Sun等人[87]为了给蓖麻毒素选择高亲和性的核酸适配体，根据之前的相关报道选择了三种核酸适配体(A3，C1，C5)，并运用FS证明了C1和C5的强结合亲和力，K_D分别为80 ± 38和58 ± 19 nM. 他们以DNA分子机器为基础，提出了一种通用的评测核酸适配体结合亲和力和识别靶标的检测平台. Huang等人[88]开发了一种新型的集成四面体框架核酸和诱导荧光的磁性生物传感器用于痕量水平检测ATP生物标志物, 不仅提高了抗样品基质的干扰, 还增强了特异性核酸适配体的结合亲和力，为临床诊断ATP开辟了新方案. 同时，Meng等人[89]也开发了一种基于高结合亲和力核酸适配体的结核病便携检测仪器，实现手持荧光计或者智能手机的RGB相机就能完成结核病检测. Adhel等人[90]则首创性地把视角放到了研究恶性细胞中过度表达的叶酸受体(一种细胞表面蛋白)与胞内的碳点(一种纳米粒子)的相互作用上，采用荧光光谱法得到了二者之间的K_D为92 ± 3 nM.

荧光光谱法评测核酸适配体结合亲和力具有操作简便、成本低的特点. 其独特的优势允许荧光光谱仪检测到非常低浓度的荧光分子，特定的激发光和发射光也让荧光光谱仪可以在复杂体系中识别特定的荧光分子. 但荧光作为反馈结合事件的唯一参数, 稳定的荧光强度和准确的荧光定量对于确定K_D值非常重要. 据报道, 荧光基团对溶剂环境的微变化比较敏感, 溶液中的离子成份、pH值以及溶质的极性都会影响荧光强度, 必须慎重考虑荧光的微环境[83,91]. 当然，目前流行将荧光染料直接嵌入进核酸适配体达到不连接荧光基团的目的. 这种方法优点很多, 但是在合成时必须确保不存在残留的引物或者非核酸适配体链，否则将严重误导实验的结果. 还应关注到，核酸适配体在与靶标分子结合后的构象转变也可能导致基于供受体非辐射能量转移机制的触发，这种现象叫做荧光共振能量转移(FRET)[92]. 出现这种情况时可利用供受体荧光强度的增减来计算FRET效率, 结合靶标分子浓度变化构建结合曲线来得到核酸适配体的K_D值. 而近些年提出的单分子荧光共振能量转移(smFRET)技术则与传统的FRET主要关注分子相互作用的平均行为不同, smFRET

把关注点放在了单分子层面上, 具备单分子灵敏度, 意味着smFRET可以用于揭示单分子间的动态变化和相互作用. 并且, 传统FRET的距离检测范围仅限于3~8 nm, 而smFRET可以实现3 nm距离内细微变化的检测, 评测低结合亲和力的分子结合[93]. 比如, Nicholson等人[94]针对阳离子能够影响G-四链体(G4)的三维构象的特点, 采用smFRET技术阐明了Na^+通过诱导拟合机制适度增强反平行G4拓扑结构, 得到K_D值为228 ± 26 mM; K^+则凭借构象选择机制驱动G4形成并行或者混合拓扑结构, K_D值为1.9 ± 0.2 mM.

3.5　等温滴定量热法

从20世纪90年代开始, 用等温滴定量热(ITC)来研究核酸适配体与靶标的结合亲和力得到了广泛关注和应用. ITC具有直接评测、无标记和灵敏度高等优点, 最突出的优势在于能够在实验中直接得到分子互作过程中的热量变化, 从而提供全面的热力学信息. 实验时固定每次参比池温度不变, 向样品池中滴定一定梯度浓度的核酸适配体溶液. 发生结合时, 微量热计能够检测并记录此过程中的热量释放或吸收, 而反应引起的单元池温差则通过热功率的形式补足. 随着梯度浓度的核酸适配体加入, 其与靶标的结合逐渐趋于饱和, 热量变化缓慢减小直至稳定状态. 通过分析每个峰的面积并绘图可以得到等温线并拟合至模型导出核酸适配体的K_D[95~99]. Ratanabunyong等人[100]就利用ITC辅助筛选出了新的HIV-1逆转录酶的特异性高结合亲和力核酸适配体, 其K_D值为75.10 ± 0.29 nM. Liu等人[101]采用之前报道的一种多巴胺的高质量核酸适配体, 通过截断实验并由ITC进行结合亲和力评测得到了更高结合亲和力的核酸适配体, K_D值为0.4 μM. 此外, Wan等人[102]运用“SELEX”技术筛选出了对羟基苄基亚硫酸氢盐的高结合亲和力核酸适配体, 并用ITC获得了该核酸适配体的K_D值为26.5 μM. 他们实现了基于此核酸适配体传感器的快速检测硫熏黄麻, 为后续的相关研究提供了宝贵的经验. Niu等人[103]则针对几种雌激素化合物对环境的污染预防, 通过ITC获得了17β-estradiol (E2)的一系列特异性核酸适配体, 评测得到了核酸适配体的K_D值最小能到30 nM (图11). 根据这些高结合亲和力核酸适配体, 他们进一步开发了一种结构开关荧光生物传感器, 已经成功在废水中检测到了E2. 另外, Tian等人[104]则针对食品污染源之一的精胺污染建立了食品精胺检测的快速检测方法. 运用ITC成功分析评测了所选核酸适配体结合亲和力, K_D值为9.648 ± 0.896 nM. 再有, Liu等人[105]采用ITC对双酚A的一个60 nt的特异性DNA适配体进行了全面表征进而得到了关键的结合区域, 表明ITC对位点区域评测检测也能提供一定的帮助.

ITC评测核酸适配体结合亲和力能够得到较为全面的分子互作信息, 比如结合动力学、焓变以及熵变等[106], 但该技术存在的一些不足也需提前考虑或者尽可能规避. 首先是防止结合事件以外的反应产生放热. 比如在加液时形成气泡或者稀释时产生热量变化, 都会导致K_D值偏差[83]. ITC也没法评测复杂体系中核酸适配体的结合亲和力. 结合发生时的热辐射会迅速传导到液体中, 无法对产生的结合做出精确定位. 另外, ITC仪器每次实验只能评测一种核酸适配体的结合亲和力, 检测通量低且样品用量大, 增加检测通量和缩短反应时间将会是ITC在药物筛选、生物医学等领域取得更长远发展的必备性能[107].

3.6　凝胶阻滞法

凝胶阻滞(EMSA)法最早是在1981年由Fried等人[108]发明的, 是研究核酸适配体-靶标相互作用的常见策略[109]. EMSA常用于研究带电分析物在凝胶基质中与核酸适配体的相互作用. 具体地说, 带负电荷的物质比如核酸适配体, 因其分子量低具有很强的电泳迁移率, 单位时间内能在凝胶基质中产生大的位移; 而大分子如蛋白质, 其与核酸适配体结合后复合物的质量和体积都变大, 导致位移速度会比核酸适配体小很多. 最终通过位移差异形成不同的条带和条带强度来获得K_D值[110,111]. Manochehry等人[112]就报道了用EMSA来评测一种同源二聚体蛋白的特异性核酸适配体的结合亲和力, 得到该核酸适配体的K_D值为13.6 ± 2.7 nM. Li等人[113]利用EMSA评测了特异性核酸适配体对鳖虹彩病毒(STIV)的高结合亲和力, 得到K_D值为53.8 nM, 为研究鳖虹彩病毒的高结合亲和力核酸适配体和开发针对STIV的特效药提供了一定帮助. 此外, 以EMSA来开发治疗平台或者新的治疗方法也有不错的表现, Mohamed等人[114]开发了将阿霉素(DOX)与特定的聚合物在水中自组装形成带正电的纳米颗粒(DOX-SAN)外壳, 再与带负电的GTI2040 (一种用于核糖核苷酸还原酶抑制的反义寡核苷酸)结合形成纳米

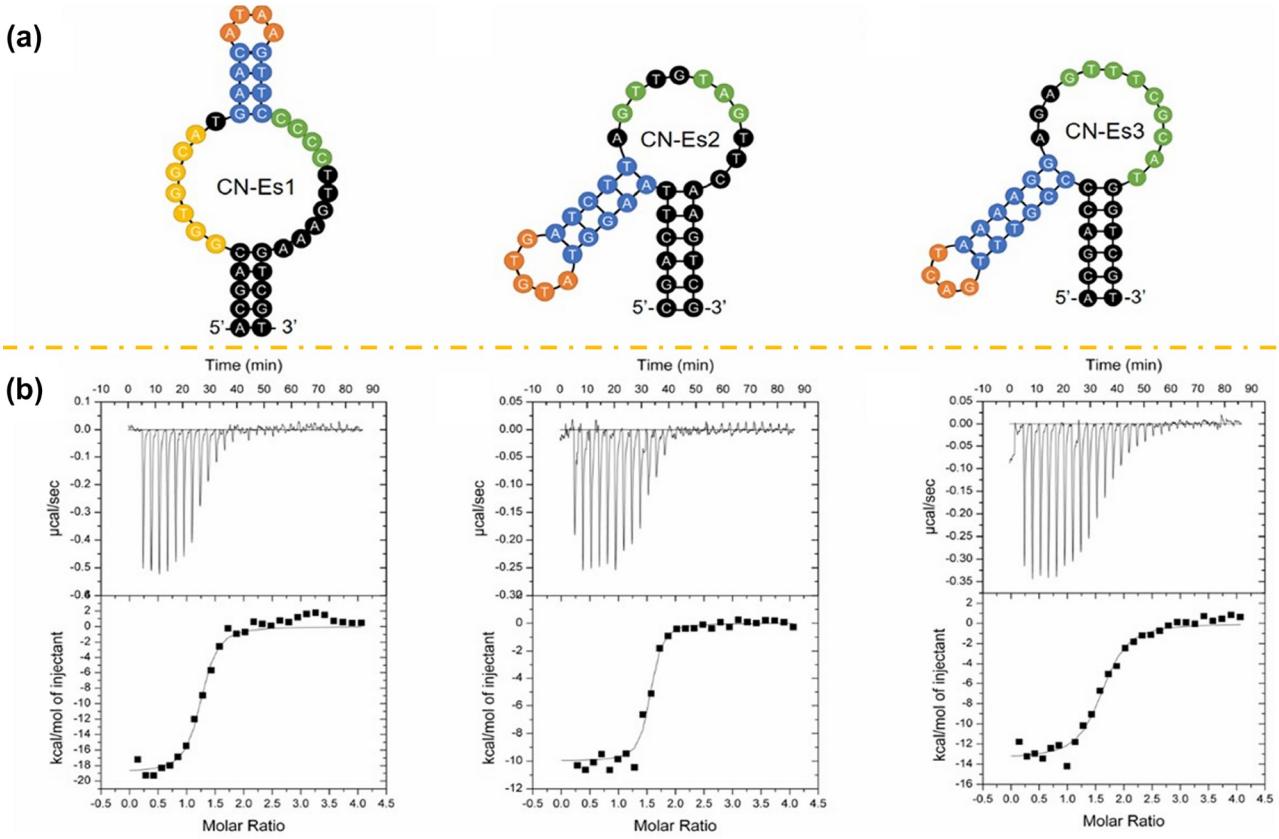


图 11 (网络版彩图) (a) 三种核酸适配体的二级结构; (b) ITC法评测E2与三种核酸适配体的结合亲和力[103]

Figure 11 (Color online) (a) The secondary structure of three nucleic acid aptamers. (b) Evaluation of binding affinity of E2 with three nucleic acid aptamers by ITC. Reproduced with permission from Ref. [103]. Copyright 2022, American Chemical Society.

复合物来靶向双重递送药物的方法. 用凝胶阻滞评测了GTI2040和DOX-SAN之间的结合亲和力, 得到了不错的实验结果. 同时, Wang等人[115]研究通过合成一种新型胆固醇来与质粒DNA结合, 通过EMSA评测了它们的高特异结合能力, 实现了引入胆固醇结构的部分疏水性质来合成生物相容并可控阳离子基因载体的方法, 为药物传递提供了一种新的思路.

EMSA评测核酸适配体结合亲和力有很多优点, 其特有的优势在于允许裸眼观察和分析整个结合过程, 实现了实验结果可视化、准确度高等, 但也有短处. 比如评测低结合亲和力时, 核酸适配体与靶标的结合难以被检测到. EMSA常用来评测中等以上的结合亲和力, 低结合亲和力表现出来的信号强度不够, 无法从背景中区分出来. 此外, EMSA除了可以很好的评测核酸适配体的结合亲和力外, 还能用来验证特异性. 核酸适配体与靶标是否结合可以通过凝胶中的位移直观看出[116]. 此外, 由于EMSA的结合亲和力评测机制关键参数是电泳迁移率, 不合适的实验参数(如凝胶浓度等)也可能会导致假阳性或假阴性的结果出现. 我们认为, EMSA除了可以进一步优化操作和方案外, 亦可探索同其他评测技术的融合、组合运用.

3.7 微量热泳动法

2010年, Wienken等人[117]详细报道了使用微量热泳动(MST)法来评测蛋白质与其他分子之间的结合. 当红外激光照射到含有荧光标记样品的毛细管时, 样品中的水分子吸收红外光形成局部温度梯度. 在这个温度梯度下, 受热分子会发生热泳现象. 热泳动的方向和强度取决于分子的理化性质, 如大小、电荷、水化作用以及与其它分子的相互作用[117,118]. 当蛋白质与核酸适配体结合时, 它们的水化层和分子特性会发生改变, 影响它们的热泳行为[117,119]. 通过高灵敏度的

检测器来监测荧光标记分子在不同核酸适配体浓度下荧光强度的变化，就可以绘制出“S”型结合曲线得到K_D值(图12)[120,121]. 目前MST法具有其独特的优势，不仅可以评测核酸适配体与小分子靶标的结合亲和力，做到样品消耗少的同时还能实现混合样品中评测特异性结合亲和力[117,119]. 此外，由于MST是基于荧光信号的变化, 因此它还可以与其他荧光技术结合使用, 获得更多关于分子相互作用的信息.

MST评测核酸适配体的结合亲和力越来越受到研究人员的钟爱. Li等人[122]针对河豚毒素(TTX)开发了一套基于核酸适配体的生物传感器. 它们通过模拟自发结合来确定关键碱基，通过MST验证了两种核酸适配体变体具有更低的K_D值，分别为13.52 ± 0.18和6.61 ± 0.22 nM (图13). Šeba等人[123]则运用MST来定量评测人血清α-1-酸性糖蛋白(AAG)和去乙酰化的人血清α-1-酸性糖蛋白与不同药物分子的结合亲和力，表明了涎酸作用会改变AAG的结构构象，影响其和药物分子的结合亲和力. Czestkowski等人[124]为了研究小分子对Chitinase-3-like-1 (CHI3L1)与生物素化小分子探针结合的干扰，利用MST评测了(CHI3L1)与多种核

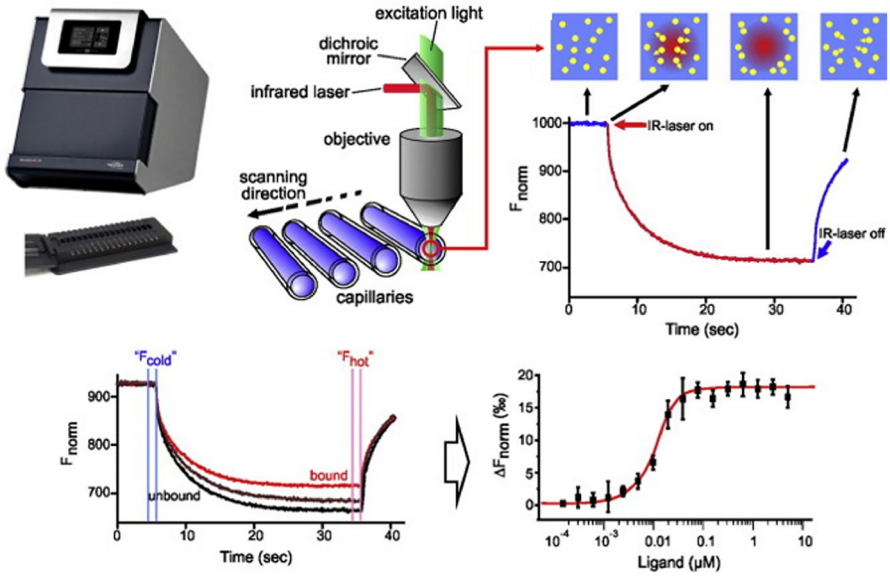


图 12　(网络版彩图) MST的实验装置以及基本原理[121]

Figure 12　(Color online) The experimental equipment and basic principles of MST. Reproduced with permission from Ref. [121]. Copyright 2017, Elsevier.

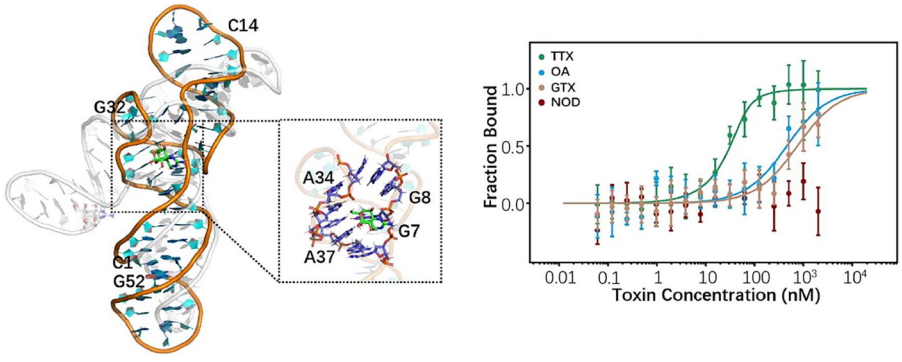


图 13　(网络版彩图)优化后的核酸适配体与TTX对接, 评测其特异性与结合亲和力[122]

Figure 13　(Color online) The optimized aptamer docked with TTX to evaluate the specificity and binding affinity. Reproduced with permission from Ref. [122]. Copyright 2022, Elsevier.

糖核酸的结合亲和力. Basu等人[125]利用MST定量评测了广泛中和抗体(bNAbs)和几种不同亚型的蛋白和核酸适配体的结合亲和力, 得到了可用于针对HIV-1包膜的bNAb, 为研发HIV-1疫苗提供了参考. 另外, Koudrina等人[126]针对人体血管中血栓的定位以及其主要成分——纤维蛋白, 通过MST评测了特异性核酸适配体与纤维蛋白的高结合亲和力(K_D = 16.6 nM), 并以此制备了一种靶向造影剂, 实现了在人血体外实验中准确定位血栓的位置.

MST作为比较新的核酸适配体结合亲和力评测技术, 可与多种荧光检测设备兼容; MST设备在检测速度和精度上也很不错, 具有的高通量潜力使其成为药物发现和蛋白质功能研究中的得力工具. 同时, MST可以在短时间内分析大量的化合物或生物分子, 缩短了新药发现的周期. 但是, MST要求必要的内部荧光或者外接荧光基团作为标记, 受标记效率和荧光猝灭的影响. 其次, MST不提供动力学信息(即缔合率和解离率)和浓度分析, 不能做到完全解析分子间的相互作用. MST是基于荧光的结合亲和力评测方法, 荧光强度是反馈真实结合情况的唯一指标. 一般来说, 升温会降低荧光的强度而低估核酸适配体的结合亲和力. 温度改变也限制了对温度敏感的荧光基团在MST中的发挥, 不利于更加深入地研究分子相互作用. 因此在使用MST评测核酸适配体的结合亲和力时, 应该综合考虑这些优缺点.

3.8 流体动力分散技术

流体动力分散(FIDA)技术是近些年提出来的结合亲和力评测技术, 主要原理为在受控层流体系中通过生物分子的自由扩散而导致荧光强度的变化来直接获取绝对生物物理参数的流体动力学技术. FIDA技术是一项基于毛细管的技术, 采用泰勒分散原理, 通过加压驱动流体系统, 驱使待测样品在毛细管管壁与管中心形成速度差异, 产生层流. 同时, 生物分子的流体动力学半径(R_h)会决定其径向扩散速率, 小半径分子扩散更快形成更加紧凑的抛物线形水平剖面; 大半径分子扩散更慢, 会使抛物线形水平截面变得更加宽泛[127,128]. 通过分子的分散程度导致的荧光强度差异生成泰勒图, 从而确定分子的R_h和分散系数D, 得到核酸适配体的K_D (图14a)[129].

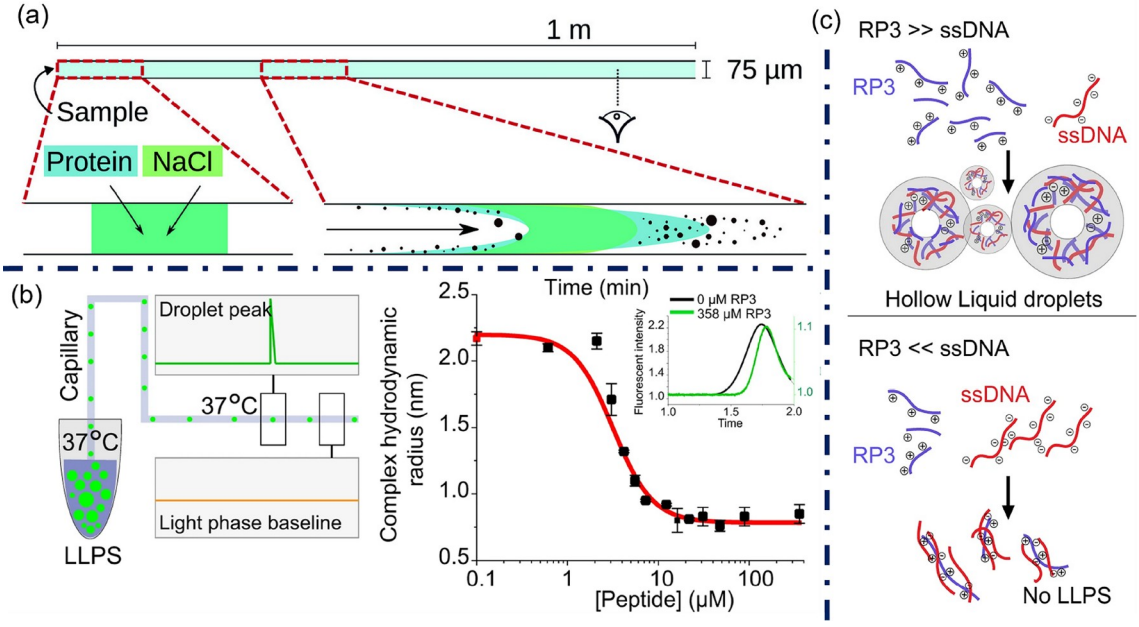


图 14 (网络版彩图) (a) FIDA的技术原理示意图[129]; (b)通过Capflex系统评测RP3与ssDNA的K_D = 5.3 ± 0.4 μM[132]; (c)在不同的RP3与ssDNA比值下, RP3与ssDNA的不同结合情况[132]

Figure 14 (Color online) (a) Schematic diagram of the technical principle of FIDA. Reproduced with permission from Ref. [129]. Copyright 2024, Wiley-VCH. (b) K_D = 5.3 ± 0.4 μM of RP3 and ssDNA evaluated by Capflex system [132]. (c) Different binding of RP3 and ssDNA under different ratios of RP3 to ssDNA. Reproduced with permission from Ref. [132]. Copyright 2021, the Authors.

FIDA技术正在被广大从事生物化学研究的科研工作者接受. Valero等人[130]利用化学修饰的RNA适配体与SARS-CoV-2的刺突蛋白的受体结合域结合的方式来阻止刺突蛋白与宿主受体的结合达到防治病毒的目的. 此外, 他们采用FIDA做了核酸适配体的二聚体和三聚体与SARS-CoV-2的刺突蛋白的结合实验, 得到的K_D值分别为72 pM和39 pM, 很好说明了FIDA能够评测超低的K_D值. Vacacela等人[131]首次证明蛋白质靶标介导的酶可以促进生成核酸适配体(EGAs), 并运用FIDA 1平台评测了合成的蛋白质模板与EGA混合物结合时, 它的K_D值为9.96 nM. 此外, 另一个实验团队的Stender等人[132]基于FIDA技术开发了一种“Capflex”方法用以快速量化蛋白液相分离(LLPS)的关键参数(图14b). 他们首先利用单链DNA会对DEAD-box解旋酶-4的n1结构域(Ddx4n1)有强的分割作用导致被测样品的分子尺寸发生明显变化的特点, 运用FIDA技术评测了结合了黄色荧光蛋白的Ddx4n1与ssDNA的相互作用, 溶液中分子尺寸从3.5 nm左右增加到了7 nm.再依据RP3肽在经过液相分离后会形成中空球形集合的特点, 他们用ssDNA来滴定RP3肽, 发现在高RP3与ssDNA比的情况下中空凝聚体进一步缩合, RP3肽的流体动力学半径从2.2 nm缩减到0.8 nm, K_D值为5.3 ± 0.4 μM (图14c)[132]. 它们基于FIDA技术做了一系列横向拓展研究, 为FIDA技术在评测核酸适配体等生物分子的结合亲和力和更广泛适用上做出了宝贵的贡献.

FIDA技术通过第一性物理原理直接获取分子的绝对Rh, 并依靠分子半径的变化和构象变化来表征生物分子的特征和行为, 对比现有的其他互作技术, 可以说是一次技术思路上的更新. FIDA技术可以评测处于自然条件下的颗粒分子的结合亲和力, 确保分子的真实状态以及足够可靠的评测结果[133]. FIDA技术还允许无固定相或者标记直接评测分子间的相互作用, 结合亲和力评测范围从毫摩尔到皮摩尔, 每次样品消耗量不超过4微升[132]. 此外, FIDA技术能够做到多参数同时分析, 评估蛋白在去折叠中局部及整体的结构变化, 满足高通量的同时快速准确检测样品[134]. 虽然FIDA技术有许多优点, 但是FIDA技术还没有被广泛接受和普及, 影响其在研究中的使用频率. 相信随着技术的更加成熟和成本的进一步降低, FIDA技术会变得越来越普及.

4　总结与展望

为了方便读者对本文提到的各种评测核酸适配体结合亲和力的技术和方法有更清晰的比较, 我们将每种分析方法及其特征汇总在了表1. 总的来说, 评测核酸适配体结合亲和力的技术方法取得了长足发展. 核酸适配体固定化策略依旧是评测核酸适配体结合亲和力的成熟策略. 通过将核酸适配体分子固定在基体上与受体分子进行自由结合, 固定化的分子结合测试策略更容易采集到结合信号, 也更容易获取微弱的结合信号. 不过固定化操作可能会引起分子的构象以及空间位阻发生转变而影响其结合亲和力, 采用例如基于DNA四面体的策略来固定核酸适配体的方法能在一定程度上弱化这种影响[135], 静电吸附[136]、疏水作用[137]、π-π堆积[138]和生物素-亲和素系统[139]等非共价相互作用策略则能将核酸适配体吸附到固相表面而不改变其本身的独特分子构象, 最大化地消除因固定化带来的分子构象破坏, 但是针对不同分子进行不同的固定化操作无疑会增加方法的操作难度. 非固定化评测策略的优势是分子自由运动, 不存在位阻以及构象的影响. 不过, 非固定化策略因为结合信号的采集方式不如固定化策略直接, 装置的敏感度有所降低, 因此需要更多的样品量如ITC法. 依据新型的信号采集策略采集分子间的结合亲和力并提高检测灵敏度也是研究者们关注的方向之一. FIDA技术通过第一性物理原理直接获得分子的动力学半径来表征其行为特征, 对K_D值的评测能到皮摩尔水平, 改善了非固定化策略信号采集的敏感性[140].

展望未来, 核酸适配体的实用化进程还要考虑实际使用场景中的结合亲和力. 首先, 在体外诊断或者核酸药物领域, 因为核酸适配体在复杂场景中的结合亲和力同实验室中得到的结合亲和力并不一致, 所以其使用效果总是会打折扣. 现有技术中MST、FIDA技术均有望实现复杂体系中核酸适配体真实结合亲和力的评测, 不过这两种技术都依赖荧光的测量, 一些体外诊断场景如全血环境对荧光是有影响的, 开拓新的不依赖荧光标记的传感方法实现复杂场景下真实的核酸适配体结合亲和力评测值得进一步探索. 其次, 如何有效评测核酸适配体与小分子靶标的结合亲和力是目前核酸适配体发展面临的又一困境. 小分子靶标结合位点少且不易固定, 评测它们的结合亲和力难度较大.

表 1 评测核酸适配体结合亲和力的技术比较

Table 1 Comparison of techniques for evaluating the binding affinity of nucleic acid aptamers

分类	方法	样品体积	K_D值范围	常见靶标	运用场景	参考文献
固定策略	石英晶体微天平	20~100 μL (取决于实验的重复次数)	≥1 pM	蛋白质、核酸、细胞、病毒	细胞生物学研究、药物开发、生物传感器、疾病检测	[28~31]
	表面等离子体共振	20 μL (最小进样体积)	≥1 pM	蛋白质、核酸、脂质、糖类、细胞、细菌、病毒、药物分子	基础生命科学研究、生物传感器、食品和环境监测、药物开发	[38,39,41~43]
	酶联适体测定	100~200 μL (标准样品量)	≥1 nM	蛋白质、核酸、药物分子、病毒	癌症研究、免疫学研究、药物开发、食品安全、传染病研究	[45~48]
	生物层干涉	20 μL (最小进样体积)	≥1 pM	蛋白质、核酸、病毒、药物分子、细菌、脂质、纳米材料、糖类	小分子药物研究、分子互作研究、环境监测、疫苗开发	[49~51,53]
非固定策略	圆二色性	100~500 μL (取决于实验的重复次数)	≥1 nM	蛋白质、核酸、有机化合物、纳米材料、脂质	生物分子结构分析、药物开发、超分子化学	[64,67~70]
	紫外-可见吸收光谱	100 μL~1 mL (取决于浓度梯度的数量)	≥1 μM	核酸、有机化合物、细菌、蛋白质、纳米材料	物质分析、动力学研究、环境检测、药物开发	[63,64,71]
	荧光各向异性	100 μL~1 mL (取决于浓度梯度的数量)	≥1 nM	蛋白质、核酸、药物分子、纳米材料、金属离子	分子间相互作用研究、药物研究与开发、功能核酸研究	[26,73~76]
	荧光光谱	100 μL~1 mL (取决于浓度梯度的数量)	≥1 nM	氨基酸、蛋白质、核酸、纳米材料、金属离子	临床诊断、生物医学研究、环境监测、食品安全、免疫分析	[17,81~85]
	等温滴定量热	200 μL~1 mL (取决于滴定浓度的梯度数量)	≥1 nM	蛋白质、核酸、药物分子、多糖、病毒	分子相互作用研究、药物制剂研究与开发、环境监测	[91~96]
	凝胶阻滞	10~20 μL (取决于通道尺寸)	≥1 nM	核酸、药物分子、蛋白质、转录因子、生物探针	分子互作研究、药物筛选、生物标志物开发、临床诊断	[103~107]
	微量热泳动	4~20 μL (取决于样品浓度)	≥1 pM	蛋白质、核酸、小分子化合物、纳米材料、金属离子	药物开发与筛选、分子动力学研究、分子理化性质研究	[114~118]
	流体动力分散	4 μL (最小进样体积)	≥1 pM	蛋白质、核酸、脂质、病毒、多肽	蛋白质功能和稳定性研究、分子互作研究、液-液分离研究、结构生物学研究	[120~126]

通过将现有技术进行有机的优势整合，以及发展更敏感的结合信号采集传感器是未来需要发展的另一个方向. 核酸适配体亲和力评测技术的不断优化将有效地推动核酸适配体的实用化进程，进一步助力新型核酸适配体诊断装置和小分子核酸药物在生命健康领域的快速发展.

参考文献

1 Miyoshi D, Sugimoto N. *Biochimie*, 2008, 90: 1040–1051

2 Vickers TA, Crooke ST. . *PLOS One*, 2016, 11: e0161930

3 Kimoto M, Yamashige R, Matsunaga K, Yokoyama S, Hirao I. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 453–457

4 Iwano N, Adachi T, Aoki K, Nakamura Y, Hamada M. *Nat Comput Sci*, 2022, 2: 378–386

5 Tuerk C, Gold L. *Science*, 1990, 249: 505–510

6 Ellington AD, Szostak JW. *Nature*, 1990, 346: 818–822

7 De Acha N, Elosúa C, Corres J, Arregui F. *Sensors*, 2019, 19: 599

8 González-Fernández E, de-los-Santos-Álvarez N, Miranda-Ordieres AJ, Lobo-Castañón MJ. *Talanta*, 2012, 99: 767–773

9 Tombelli S, Minunni M, Mascini M. *Biosens Bioelectron*, 2005, 20: 2424–2434

10 Wilcox JM, Rempel DL, Gross ML. *Anal Chem*, 2008, 80: 2365–2371

11 Jenison RD, Gill SC, Pardi A, Polisky B. *Science*, 1994, 263: 1425–1429

12 Chen Z, Zeng Z, Wan Q, Liu X, Qi J, Zu Y. *Biomaterials*, 2022, 280: 121259

13 Ji C, Wei J, Zhang L, Hou X, Tan J, Yuan Q, Tan W. *Chem Rev*, 2023, 123: 12471–12506
14 McKeague M, DeRosa MC. *J Nucleic Acids*, 2012, 2012: 748913
15 McKeague M, De Girolamo A, Valenzano S, Pascale M, Ruscito A, Velu R, Frost NR, Hill K, Smith MK, McConnell EM, DeRosa MC. *Anal Chem*, 2015, 87: 8608–8612
16 Yu AM, Choi YH, Tu MJ, Touyz RM. *Pharmacol Rev*, 2020, 72: 862–898
17 Chan KH, Wang Y, Zheng BX, Long W, Feng X, Wong WL. *ChemMedChem*, 2023, 18: e202300271
18 Li J, Xu T, Zheng Y, Liu D, Zhang C, Li J, Wang ZA, Du Y. *Anal Chem*, 2024, 96: 5056–5064
19 Patel DJ, Suri AK, Jiang F, Jiang L, Fan P, Kumar RA, Nonin S. *J Mol Biol*, 1997, 272: 645–664
20 Thevendran R, Citartan M. *Talanta*, 2022, 238: 122971
21 Jing M, Bowser MT. *Anal Chim Acta*, 2011, 686: 9–18
22 Qin Y, Yang X, Zhang J, Cao X. *Biomed Microdevices*, 2019, 21: 54
23 Li X, Chen L, Kong S, Zhong H, Jiang F, Zhao W. *Ultramicroscopy*, 2024, 263: 113986
24 Pokhrel P, Sasaki S, Hu C, Karna D, Pandey S, Ma Y, Nagasawa K, Mao H. *Anal Biochem*, 2022, 649: 114693
25 Ahmad Hidayat AF, Mohamad SB, Tayyab S, Wan Harun WHA, Abd Halim AA. *J Mol Structure*, 2025, 1321: 139670
26 Casanova-Morales N, Figueroa NL, Alfaro K, Montenegro F, Barrera NP, Maze JR, Wilson CAM, Conejeros P, Dague E. *PLoS ONE*, 2019, 14: e0222468
27 Pons M, Perenon M, Bonnet H, Gillon E, Vallée C, Coche-Guérente L, Defrancq E, Spinelli N, Van der Heyden A, Dejeu J. *Analyst*, 2022, 147: 4197–4205
28 Zhu X, Yang C, Quan W, Yang G, Guo L, Xu H. *Anal Methods*, 2023, 15: 987–992
29 Corradi E, Agostini M, Greco G, Massidda D, Santi M, Calderisi M, Signore G, Cecchini M. *Sens Actuat A-Phys*, 2020, 315: 112323
30 Vajhadin F, Ahadian S, Travas-Sejdic J, Lee J, Mazloum-Ardakani M, Salvador J, Aninwene Ii GE, Bandaru P, Sun W, Khademhossieni A. *Biosens Bioelectron*, 2020, 151: 111984
31 Zhao X, Chen XD, Liu F, Ding X, Yu X, Tang K, Li G. *Sens Actuat B-Chem*, 2022, 371: 132396
32 Akgönüllü S, Özgür E, Denizli A. *Micromachines*, 2022, 13: 1441
33 Erkal-Aytemur Aı, Mülazımoğlu İE, Üstündağ Z, Caglayan MO. *Talanta*, 2024, 277: 126376
34 Lin YC, Chen WY, Hwu ET, Hu WP. *Int J Mol Sci*, 2022, 23: 5810
35 Hu Q, Wang R, Wang H, Slavik MF, Li Y. *Sens Actuat B-Chem*, 2018, 273: 220–227
36 Pan M, Hong L, Yang J, Xie X, Liu K, Wang S. *Food Sci Hum Wellness*, 2022, 11: 1315–1321
37 Hampitak P, Jowitt TA, Melendrez D, Fresquet M, Hamilton P, Iliut M, Nie K, Spencer B, Lennon R, Vijayaraghavan A. *ACS Sens*, 2020, 5: 3520–3532
38 Nowocień S, Wielgus RS, Mroczka J. *Sensors*, 2022, 22: 8525
39 Chang AL, Maureen M, Smolke CD. *Methods Enzymol*, 2014, 549: 451–466
40 Song C, Zhang S, Huang H. *Front Microbiol*, 2015, 6: 1049
41 Gijs M, Penner G, Blackler G, Impens N, Baatout S, Luxen A, Aerts A. *Pharmaceuticals*, 2016, 9: 29
42 Mukherjee M, Sistla S, Veerabhadraiah SR, Bettadaiah BK, Thakur MS, Bhatt P. *Food Chem*, 2021, 363: 130332
43 Jia W, Xie D, Li F, Wu X, Wang R, Yang L, Liu L, Yin W, Chang S. *Anal Chim Acta*, 2021, 1183: 338976
44 Zhang L, Chen J, Lu L, Yu R, Zhang D. *Food Chem-X*, 2023, 19: 100792
45 Chen Z, Liu H, Jain A, Zhang L, Liu C, Cheng K. *Theranostics*, 2017, 7: 2982–2995
46 Walker RG, Kattamuri C, Goebel EJ, Zhang F, Hammel M, Tainer JA, Linhardt RJ, Thompson TB. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2020, 246: 467–482
47 Seigner J, Zajc CU, Dötsch S, Eigner C, Laurent E, Busch DH, Lehner M, Traxlmayr MW. *Sci Rep*, 2023, 13: 23024
48 Kim H, Kretz L, Ronin C, Starck C, Roper JA, Kahl-Knutson B, Peterson K, Leffler H, Nilsson UJ, Pedersen A, Zetterberg FR, Slack RJ. *Int J Mol Sci*, 2024, 25: 6704
49 Jucknischke U, Friebe S, Rehle M, Quast L, Schmidt SH. *Biosensors*, 2023, 13: 1030
50 Almeida NBF, Sousa TASL, Santos VCF, Lacerda CMS, Silva TG, Grenfell RFQ, Plentz F, Andrade ASR. *Beilstein J Nanotechnol*, 2022, 13: 873–881

51 Marnissi B, Kamali-Moghaddam M, Ghram A, Hmila I, Ulrich H. *PLoS ONE*, 2020, 15: e0237253
52 Fu P, Wang F, Zhang Y, Qiao X, Zhang Y, Zhou W, Yan X, Wu W. *Anal Methods*, 2021, 13: 3068–3076
53 Liu C, Lu C, Shi G. *Anal Bioanal Chem*, 2020, 412: 4235–4243
54 Zhao L, Yin Y, Xiao S, Wu Y, Ding X, Sun J, Wu D, Shao B, Dong Y. *MicroChem J*, 2024, 202: 110829
55 Bai Z, Xu M, Mei Y, Hu T, Zhang P, Chen M, Lv W, Lu C, Tan S. *Biomedicines*, 2021, 9: 1783
56 Li A, Harris RJ, Fry BG, Barnes AC. *Fish Shellfish Immunol*, 2021, 119: 231–237
57 Liu R, Zhang F, Sang Y, Liu M, Shi M, Wang X. *Foods*, 2022, 11: 1802
58 Qi X, Zhang L, Wang X, Chen S, Wang X. *Food Control*, 2023, 149: 109700
59 Chen P, Tao L, Wang T, Zhang J, He A, Lam K, Liu Z, He X, Perry K, Dong M, Jin R. *Science*, 2018, 360: 664–669
60 Amin-Wetzel N, Saunders RA, Kamphuis MJ, Rato C, Preissler S, Harding HP, Ron D. *Cell*, 2017, 171: 1625–1637.e13
61 Yang G, Li W, Zhang S, Hu B, Huang Z. *Talanta*, 2024, 266: 125039
62 Bajardi-Taccioli A, Co C, Bond C, Masci A, Brantley T, Xu C, Bergelson S, Feschenko M. *Anal Biochem*, 2020, 611: 113842
63 Takeda S, Hamamuki A, Ushirogata K, Takasuka TE. *Biophys Chem*, 2023, 300: 107069
64 Wang Z, Hu N, Zhou Y, Shi N, Shen B, Luo L, Feng J. *Sci Rep*, 2022, 12: 8469
65 Barran P. . *Science*, 2020, 368: 1426–1427
66 Garbett NC, Ragazzon PA, Chaires JB. *Nat Protoc*, 2007, 2: 3166–3172
67 Zhang H, Qi A, Li D, Li R. *Daxue Huaxue*, 2021, 0: 2105009–0
68 Toro M, Gargallo R, Eritja R, Jaumot J. *Anal Biochem*, 2008, 379: 8–15
69 Dhal A, Nayim S, Pattanayek S, Khatun M, Barman S, Paria S, Shit B, Kundu S, Jha PK, Hossain M. *Int J Biol Macromol*, 2023, 253: 126958
70 Rahaman SK, Mohammad M, Brandão P, Siddiqui MR, Wabaidur SM, Islam MM, Alam SM, Mir MH. *Eur J Inorg Chem*, 2024, 27: e202300728
71 Sun D, Huang X, Man R, Jia X, Song X, Wang S, Xue X, Liu H, Ma Z. *Dalton Trans*, 2023, 52: 18416–18428
72 Chen M, Sun D, Li J, Wang Z, Liu H, Pan L, Chen H, Ma Z. *New J Chem*, 2023, 47: 18785–18793
73 Wang Z, Zhang F, Fang L, Chen F, Yang W, Wang Z. *Sens Actuat B-Chem*, 2024, 415: 135996
74 Cai S, Yan J, Xiong H, Liu Y, Peng D, Liu Z. *Analyst*, 2018, 143: 5317–5338
75 Kelly SM, Jess TJ, Price NC. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1751: 119–139
76 Dabhade AH, Verma RP, Paramasivan B, Kumawat A, Saha B. *3 Biotech*, 2023, 13: 244
77 Chen J, Liu J, Chen X, Qiu H. *Chin Chem Lett*, 2019, 30: 1575–1580
78 Grätz L, Laasfeld T, Allikalt A, Gruber CG, Pegoli A, Tahk MJ, Tsernant ML, Keller M, Rinken A. *Biochim Biophys Acta*, 2021, 1868: 118930
79 Weaver SD, Whelan RJ. *Anal Methods*, 2021, 13: 1302–1307
80 Minagawa H, Shimizu A, Kataoka Y, Kuwahara M, Kato S, Horii K, Shiratori I, Waga I. *Anal Chem*, 2019, 92: 1780–1787
81 Gokulrangan G, Unruh JR, Holub DF, Ingram B, Johnson CK, Wilson GS. *Anal Chem*, 2005, 77: 1963–1970
82 Li JJ, Fang X, Tan W. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 292: 31–40
83 Sakamoto T, Ennifar E, Nakamura Y. *Biochimie*, 2018, 145: 91–97
84 Wei AP, Herron JN. *Anal Chem*, 2002, 65: 3372–3377
85 Turgeon RT, Fonslow BR, Jing M, Bowser MT. *Anal Chem*, 2010, 82: 3636–3641
86 Hou Y, Hou J, Liu X. *ChemBioChem*, 2021, 22: 1948–1954
87 Sun X, Wang W, Chai Y, Zheng Z, Wang Y, Bi J, Wang Q, Hu Y, Gao Z. *Analyst*, 2023, 148: 690–699
88 Huang G, Xie Q, Chi J, Lin C, Lin X, Xie Z. *Sens Actuat B-Chem*, 2024, 417: 136129
89 Meng Y, Wang Y, Zhan Z, Chen Y, Zhang C, Peng W, Ying B, Chen P. *J Mater Chem B*, 2024, 12: 6668–6677
90 Adhel E, Ha Duong NT, Vu TH, Taverna D, Ammar S, Serradji N. *Phys Chem Chem Phys*, 2023, 25: 14324–14333
91 Zhi H, Wang J, Wang S, Wei Y. *J Spectrosc*, 2013, 2013: 147128
92 Lee W, Obubuafo A, Lee YI, Davis LM, Soper SA. *J Fluoresc*, 2009, 20: 203–213
93 Habrian C, Latorraca N, Fu Z, Isacoff EY. *Nat Commun*, 2023, 14: 8288
94 Nicholson DA, Nesbitt DJ. *J Phys Chem B*, 2023, 127: 6842–6855
95 Otero TF, Sansieña JM. *Adv Mater*, 1998, 10: 491–494

96 Cao L, Wang Z, Zhang D, Li X, Hou C, Ren C. *Food Chem*, 2021, 356: 129655
97 Amano R, Takada K, Tanaka Y, Nakamura Y, Kawai G, Kozu T, Sakamoto T. *Biochemistry*, 2016, 55: 6221–6229
98 Slavkovic S, Churcher ZR, Johnson PE. *Bioorg Med Chem*, 2018, 26: 5427–5434
99 Thevendran R, Navien TN, Meng X, Wen K, Lin Q, Sarah S, Tang TH, Citartan M. *Anal Biochem*, 2020, 600: 113742
100 Ratanabunyong S, Aeksiri N, Yanaka S, Yagi-Utsumi M, Kato K, Choowongkomon K, Hannongbua S. *ChemBioChem*, 2020, 22: 915–923
101 Liu X, Hou Y, Chen S, Liu J. *Biosens Bioelectron*, 2021, 173: 112798
102 Wan F, Chen Z, Xu T, Guan J, Cui X, Kang C, Zhou T, Wang C, Guo L, Yang Y. *Talanta*, 2024, 269: 125461
103 Niu C, Zhang C, Liu J. *Environ Sci Technol*, 2022, 56: 17702–17711
104 Tian H, Duan N, Wu S, Wang Z. *Anal Chim Acta*, 2019, 1081: 168–175
105 Liu L, Yu H, Zhao Q. *Biosensors*, 2022, 12: 913
106 Zhao Y, Yavari K, Liu J. *TrAC Trends Anal Chem*, 2022, 146: 116480
107 Atxabal U, Fernández A, Moure MJ, Sobczak K, Nycholat C, Almeida-Marrero V, Oyenarte I, Paulson JC, Escosura A, Torres T, Reichardt NC, Jiménez-Barbero J, Ereño-Orbea J. *Chem Sci*, 2024, 15: 10612–10624
108 Fried M, Crothers DM. *Nucleic Acids Res*, 1981, 9: 6505–6525
109 Shaytan AK, Xiao H, Armeev GA, Gaykalova DA, Komarova GA, Wu C, Studitsky VM, Landsman D, Panchenko AR. *Nat Protoc*, 2018, 13: 2535–2556
110 Hoffman A, Wu X, Wang J, Brodeur A, Thomas R, Thakkar R, Hadi H, Glaspell GP, Duszynski M, Wanekaya A, DeLong RK. *Materials*, 2017, 10: 1430
111 Deng B, Lin Y, Wang C, Li F, Wang Z, Zhang H, Li XF, Le XC. *Anal Chim Acta*, 2014, 837: 1–15
112 Manochehry S, McConnell EM, Li Y. *Sci Rep*, 2019, 9: 17824
113 Li P, Zhou L, Yu Y, Yang M, Ni S, Wei S, Qin Q. *BMC Vet Res*, 2015, 11: 245
114 Mohamed MA, Yan L, Shahini A, Rajabian N, Jafari A, Andreadis ST, Wu Y, Cheng C. *ACS Appl Bio Mater*, 2022, 5: 4779–4792
115 Wang Z, Song W, Sheng R, Guo X, Hao L, Zhang X. *Int J Polymic Mater Polymic BioMaterials*, 2022, 72: 750–758
116 Pandya N, Rani R, Kumar V, Kumar A. *Gene*, 2023, 851: 146975
117 Wienken CJ, Baaske P, Rothbauer U, Braun D, Duhr S. *Nat Commun*, 2010, 1: 100
118 Entzian C, Schubert T. *Methods*, 2016, 97: 27–34
119 Jerabek-Willemsen M, André T, Wanner R, Roth HM, Duhr S, Baaske P, Breitsprecher D. *J Mol Structure*, 2014, 1077: 101–113
120 Skouridou V, Schubert T, Bashammakh AS, El-Shahawi MS, Alyoubi AO, O′Sullivan CK. *Anal Biochem*, 2017, 531: 8–11
121 Svobodová M, Skouridou V, Botero ML, Jauset-Rubio M, Schubert T, Bashammakh AS, El-Shahawi MS, Alyoubi AO, O'Sullivan CK. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2017, 167: 14–22
122 Li Y, Song M, Gao R, Lu F, Liu J, Huang Q. *Comput Struct Biotechnol J*, 2022, 20: 2134–2142
123 Šeba T, Kerep R, Weitner T, Šoić D, Keser T, Lauc G, Gabričević M. *Pharmaceutics*, 2024, 16: 230
124 Czestkowski W, Krzemiński Ł, Piotrowicz MC, Mazur M, Pluta E, Andryianau G, Koralewski R, Matyszewski K, Olejniczak S, Kowalski M, Lisiecka K, Kozieł R, Piwowar K, Papiernik D, Nowotny M, Napiórkowska-Gromadzka A, Nowak E, Niedziałek D, Wieczorek G, Siwińska A, Rejczak T, Jędrzejczak K, Mulewski K, Olczak J, Zasłona Z, Gołębiowski A, Drzewicka K, Bartoszewicz A. *J Med Chem*, 2024, 67: 3959–3985
125 Basu S, Gohain N, Kim J, Trinh HV, Choe M, Joyce MG, Rao M. *Cells*, 2023, 13: 33
126 Koudrina A, McConnell EM, Zurakowski JA, Cron GO, Chen S, Tsai EC, DeRosa MC. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2021, 13: 9412–9424
127 Cipelletti L, Biron JP, Martin M, Cottet H. *Anal Chem*, 2014, 86: 6471–6478
128 Jensen H, Østergaard J. *J Am Chem Soc*, 2010, 132: 4070–4071
129 Norrild RK, Mason TO, Boyens-Thiele L, Ray S, Mortensen JB, Fritsch AW, Iglesias-Artola JM, Klausen LK, Stender EGP, Jensen H, Buell AK. *Angew Chem Int Ed*, 2024, 63: e202404018
130 Valero J, Civit L, Dupont DM, Selnihhin D, Reinert LS, Idorn M, Israels BA, Bednarz AM, Bus C, Asbach B, Peterhoff D, Pedersen FS, Birkedal V, Wagner R, Paludan SR, Kjems J. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118: e2112942118
131 Vacacela J, Schaap-Johansen AL, Manikova P, Marcatili P, Prado M, Sun Y, Ashley J. *Angew Chem Int Ed*, 2022, 61: 17
132 Stender EGP, Ray S, Norrild RK, Larsen JA, Petersen D, Farzadfard A, Galvagnion C, Jensen H, Buell AK. *Nat Commun*, 2021, 12: 7289
133 Somavarapu AK, Kleijwegt G, Nagaraj M, Alam P, Nielsen J, Otzen DE. *Chem Sci*, 2023, 14: 3030–3047

134 Bøgh KL, Nielsen DM, Mohammad-Beigi H, Christoffersen HF, Jacobsen LN, Norrild RK, Svensson B, Schmidthaler K, Szépfalusi Z, Upton J, Eiwegger T, Bertelsen H, Buell AK, Sørensen LV, Larsen JM. *Food Res Int*, 2024, 181: 114063
135 Ye T, Xu Y, Chen H, Yuan M, Cao H, Hao L, Wu X, Yin F, Xu F. *Biosens Bioelectron*, 2024, 251: 116127
136 Li L, Chen Z. *Bioelectrochemistry*, 2023, 153: 108494
137 Xu G, Wang C, Yu H, Li Y, Zhao Q, Zhou X, Li C, Liu M. *Nucleic Acids Res*, 2023, 53: 14
138 Yang K, Alkhamis O, Canoura J, Bryant A, Gong EM, Barbu M, Taylor S, Nikic D, Banerjee S, Xiao Y, Stojanovic MN, Landry DW. *JACS Au*, 2024, 4: 760–770
139 Liu Y, Xia S, Xiao M, Yang M, Yang M, Yi C. *Nanoscale*, 2024, 16: 14831–14843
140 Madsen AV, Mejias-Gomez O, Pedersen LE, Skovgaard K, Kristensen P, Goletz S. *Anal Chem*, 2022, 94: 13652–13658

Research progress on evaluation methods of binding affinity of nucleic acid aptamer

Kai Wang[1,2], Yansheng Li[1,2*], Guowei Gao[1,2], Yu Song[1,2], Jingfang Hu[1,2]

[1]*Key Laboratory of Sensors, Beijing Information Science and Technology University, Beijing 100101, China*
[2]*Key Laboratory of Modern Measurement and Control Technology of Ministry of Education, Beijing Information Science and Technology University, Beijing 100192, China*
**Corresponding author (email: lys2019@bistu.edu.cn)*

Abstract: Nucleic acid aptamers which can be synthesized *in vitro* have attracted more and more attention in the field of life and health, and their binding affinity with targets is one of the important performance indexes. There are many methods to evaluate the binding affinity of nucleic acid aptamers. We screen and classify the technical methods, and describe the basic principle, research progress, and bottleneck problems of each technical method in detail. Mature methods for evaluating the binding affinity of nucleic acid aptamers include surface plasmon resonance, biological layer interference, enzyme-linked aptamer assay, and quartz crystal microbalance. These techniques can stably and sensitively capture molecular binding signals, which significantly promote the research progress of nucleic acid aptamer technology. However, the traditional aptamer immobilization technology may have a certain impact on the molecular conformation, thus changing its actual binding affinity in the environment. In order to solve this problem, researchers are actively exploring new methods to evaluate the binding affinity of molecules without immobilization, such as circular dichroism, UV–visible absorption spectroscopy, fluorescence anisotropy, fluorescence spectroscopy, isothermal titrition calorimetry, gel retardation, microscale thermophoresis, and flow induced dispersion analysis. The continuous progress of these new technologies and methods will greatly promote the innovation of nucleic acid aptamers in the fields of screening and application, and pave the way for further commercialization of nucleic acid aptamers.

Keywords: nucleic acid aptamer, binding affinity, classification strategy, evaluation method

doi: 10.1360/SSC-2024-0173