doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.11.010

SELEX 技术筛选纤维蛋白适配子的研究 *

李保玉[1] 刘家云[2] 屈园利[1] 董 雯[1] 李旭枝[1] 龙 钢[1△]

（1 第四军医大学西京医院中医科 陕西 西安 710032；2 第四军医大学西京医院检验科 陕西 西安 710032）

摘要 目的：用纤维蛋白作为靶物质对 ssDNA 随机序列文库进行筛选，旨在获得高亲和力的纤维蛋白适配子。**方法：**在体外人工合成长度为 99 个核苷酸的 ssDNA 随机序列文库，文库中间区域为 63 个核苷酸的随机序列，两端为 18 个核苷酸的固定的引物序列；然后以羧基磁珠为介质包被纤维蛋白，利用指数级富集的配体系统进化技术（SELEX）对 ssDNA 随机序列文库进行反复筛选，当结合率不再提高时对筛选出的适配子进行连接、转化及测序分析。**结果：**羧基磁珠成功地包被了纤维蛋白，包被效率为 87.65%，经 15 轮逐步递增压力的筛选，获得了纤维蛋白适配子群，经测序分析比对发现适配子有很好的多样性。**结论：**应用 SELEX 技术初步筛选出了亲和力较高的纤维蛋白适配子群，为下一步的鉴定及功能研究奠定了良好基础。

关键词：纤维蛋白；适配子；SELEX；PCR

中图分类号：R2-031；R543 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273（2015）11-2037-05

The Study of Screening Fibrin Aptamer by SELEX Technology*

LI Bao-yu[1], LIU Jia-yun[2], QU Yuan-li[1], DONG Wen[1], LI Xu-zhi[1], LONG Yin[1△]

(1 Department of Traditional Chinese Medicine, Xi-jing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an Shaanxi, 710032, China; 2 Department of Clinical Laboratory, Xi-jing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: In order to obtain the high affinity aptamers of fibrin, fibrin was used as target for screening random oligonucleotides library. **Methods:** A single-stranded DNA(ssDNA) random oligonucleotides library of 99 nucleotides was constructed in vitro, with 63 nucleotides random sequence at middle region and 18 nucleotides immobilized primer sequences at both ends. The carboxyl magnetic beads coated with fibrin were repeatedly screened by the stematic evolution of ligand by exponential enrichment (SELEX) technique. When the combination rate was no longer increased, the screened aptamers pool were cloned into T vector and transformed into Escherichia coli competent cells, and positive clones were sequenced. **Results:** We successfully coated the carboxyl magnetic beads with fibrin and the efficiency was 87.65%. The fibrin aptamers were obtained after 15 cycles of gradually increasing screening pressure by SELEX technique. Sequence alignment results showed a good diversity of aptamers. **Conclusions:** We successfully screened the high affinity aptamers of fibrin by SELEX technique, this would lay a good foundation for identification and functional research of next experiment.

Key words: Fibrin; Aptamer; SELEX; PCR

Chinese Library Classification(CLC): R2-031; R543 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2015)11-2037-05

前言

血栓的形成在心脑血管病的发生发展中占有重要的地位，可导致脑卒中、心梗等严重疾病[1]，因此，防止血栓的形成对心脑血管疾病的防治有着巨大意义。众所周知，纤维蛋白是在凝血瀑布[2]的最后一过程形成，是血栓的关键成分，而目前现有的抗凝药物多以抗凝血酶或抗血小板为主，有着诸多的不足和副作用，比如易出血[3]、诱发血小板减少[4]等，因此，不少国内外学者一直致力于新型抗凝药[5-7]的研发；中药归经历史渊源[8]，它的理论可以追溯到《内经》，它体现了药物对机体脏腑或某部分的选择性作用[9]，即药物作用的归属部位[10]。本研究用纤维蛋白作为靶物质，以羧基磁珠为介质对单链 DNA(single-stranded DNA, ssDNA)随机文库进行筛选，拟获得纤维蛋白适配子；因适配子的高亲和力高特异性的特点[11,12]，类似于中药的归经，很有可能实现疾病的靶向治疗[13]；纤维蛋白适配子的成功筛选为下一步的治疗血栓性疾病的功能研究提供了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 设计引物与构建随机 ssDNA 文库 引物 1 为 5’

* 基金项目：国家自然科学基金项目（81073095）

作者简介：李保玉（1984-），男，硕士研究生，主要研究方向：心脑血管病的中西医结合治疗，电话：15102931170，E-mail：libaoyu1@hotmail.com

△通讯作者：龙钢，女，医学博士，硕士研究生导师，副主任医师，副教授，主要研究方向：心脑血管病的中西医结合治疗，

E-mail: longyin@fmmu.edu.cn

(收稿日期：2014-11-20 接受日期：2014-12-08)

-CCATCCACACTCCGCAAG-3’，引物 2 为 5’-ATGTAGAG-GCAGCCGACG-3’，引物 3 为 5’-FAM-CCATCCACACTCCG-CAAG-3’，引物 4 为 5’-biotin-ATGTAGAGGCAGCC-GACG-3’；构建了长度为 99 个核苷酸（nucleotide，nt）的随机 ssDNA 文库，5’-CCATCCACACTCCGCAAG-N63-CGTCG-GCTGCCTCTACAT，两端为固定的引物序列，中间 63 个随机序列，库容量大约为 1017~1018。随机文库、引物 1 和引物 2 由福州总医院兰小鹏教授惠赠，引物 3 与引物 4 由上海生工公司合成。

1.1.2 **主要试剂** 0.1 mol/L 磷酸盐（pH7.4）：0.59 g NaH_2PO_4，5.8 g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$，溶于 150 mL 蒸馏水中，用 NaOH 调节 pH 至 7.4，定容至 200 mL，高压蒸汽灭菌；3 mol/L 硫酸铵：39.6 g $(NH_4)_2SO_4$ 溶于 60 mL 0.1 mol/L 磷酸盐（pH7.4）中，磷酸盐定溶至 100 mL，高压蒸汽灭菌；1× 选择缓冲液：1.21 g Tris·HCl，1.169 g NaCl，0.041 g $MgCl_2$，0.075 g KCl，溶于 150 mL 蒸馏水中，用 HCl 调节 pH7.4，定容至 200 mL，高压蒸汽灭菌；1× 洗涤选择缓冲液：100 mL 的 PH7.4 的 1× 选择缓冲液中加入 0.2 g 牛血清蛋白（BSA），充分混匀，然后滤膜(0.22 μm)过滤，于冰箱 4 ℃保存备用；2× 磁珠结合 - 洗涤缓冲液：2.0 mol/L NaCl，10 mmol/L Tris·HCl，1 mmol/L 乙二胺四乙酸（EDTA），调节 pH7.5，常温保存；封闭液：将 0.1 g BSA 加入 100 mL 灭菌 pH7.4 PBS 缓冲液中，充分溶解后混匀，用 0.22 μm 滤膜过滤，于冰箱 4 ℃保存备用；2 mol/L NaOH：小心秤取 8 g NaOH，加入 80 mL 蒸馏水的烧杯中，待充分溶解后，用蒸馏水定容至 100 mL，室温保存。1 mol/L HCl：85 μL 浓盐酸，加入 915 μL 蒸馏水；酵母 tRNA 购自于 Invitrogen 公司；BCA 蛋白质浓度测定试剂盒购于生工生物工程股份有限公司；环氧羧基磁珠（Dynabeads M-270 Epoxy）与生物素标记的磁珠（DynabadsM-280 Streptavidin）均购自于 Dynal 公司。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 **羧基磁珠包被蛋白** ①用 2 mL DMF 充分溶解 Dynabeads M-270 Epoxy（60 mg，4× 10^9 个）磁珠，使其浓度为 2× 10^9/mL；②漩涡震荡混匀磁珠，取 660 μL 磁珠平均分装于 2 个 1.5 mL EP 管，于磁力架上放置 4 min，小心去除上清；③各加 0.1 mol/L 磷酸盐 1 mL，漩涡震荡 30 s 混匀，摇床慢摇 10 min，置于磁力架上 2 min，小心去上清；④从磁力架上取下 EP 管，各加 1 mL 0.1 mol/L 磷酸钠重悬磁珠，漩涡震荡 30 s，置于磁力架上 2 min，小心去上清；⑤加 400 μL 0.1 mol/L 磷酸钠，充分混匀；加 400 μL 0.5 mg/mL 的纤维蛋白，充分混匀；加 400 μL 3 mol/L 的硫酸铵，充分混匀；⑥37 ℃恒温摇床孵育 20 h，次日把 EP 管放磁力架上 2 min，小心颠倒磁力架以收集到全部磁珠，吸出上清保存；⑦用 1 mL 封闭液洗涤包被磁珠 4 次，每次充分混匀，放磁力架 2 min，吸弃上清；⑧用 600 μL 封闭液重悬磁珠，4 ℃保存备用；⑨按 BCA 蛋白定量试剂盒说明测定孵育前、后纤维蛋白溶液中的蛋白含量，计算羧基磁珠包被纤维蛋白的效率。

1.2.2 **筛选** 将 1.5 mL EP 管中加满封闭液，4 ℃冰箱放置过夜。用 0.5 mL 1× 选择缓冲液将随机 ssDNA 文库（1.1 nmol，1 个 OD 随机库）溶解于 1.5 mL EP 管，95 ℃变性 5 min，立即置于冰水混合物中 10 min。吸取 ssDNA 文库于 BSA 封闭的 EP 管中，于 37 ℃摇床中孵育 1 h（去除与管壁结合的 ssDNA）。另取一个 BSA 包被的 EP 管，加入 100 μL 包被 fibrin 的磁珠溶液，用 150 μL 的 2× 磁珠结合 - 洗涤缓冲液洗 3 次（每次漩涡震荡充分混匀，放置磁力架 2 min）。包被了 fibrin 的磁珠溶液中加入 ssDNA 随机文库，充分混匀（从第 3 轮开始递增性加入 tRNA），置于 37 ℃恒温摇床孵育 1 h，置磁力架上 3 min 后去上清液。用 500 μL 的 1× 洗涤选择缓冲液洗掉未与磁珠结合的 ssDNA，每次放置于磁力架 5 min 后小心去掉上清液，共洗涤 3 次。然后加入 200 μL 双蒸灭菌水，于干式恒温器中 100 ℃加热 5 min，置磁力架上约 3 min，待液体清澈后吸取上清作为 DNA 模板进行扩增。

1.2.3 **扩增 PCR** 反应体系为 DNA 2 μL，引物 1、2（10 μmol/L）各 1 μL，Taq Mix 25 μL，ddH_2O 补充至 50 μL。PCR 扩增参数：首先 94 ℃下预变性 5 min；其次为循环参数 -①94 ℃变性 30 s，②60 ℃复性 30 s，③72 ℃延伸 20 s，总共设 30 个循环；最后 72 ℃下进行 5-10 min 的后延伸。取适量 PCR 产物于 2~3 %琼脂糖电泳，观察条带大小位置是否正确。如条带大小正确，大批量扩增 30~40 管。

1.2.4 **产物纯化** 产物纯化按照 TAKARA 纯化试剂盒步骤进行：①首先请确认 Buffer WB 中已经加入了制定体积的无水乙醇；②其次空离步骤很重要，确保无残留的乙醇；③洗脱时将灭菌水或 Elution Buffer 加热至 60 ℃使用有利于提高洗脱效率，并加在 Spin Column 膜的中央处；④最后对纯化后的产物再次电泳观察条带大小位置是否正确。

1.2.5 **分离 ssDNA 文库** 重悬混匀 Dynabeads M-280 streptavidin，取 100 μL 于 EP 管中，放置于磁力架上约 2 min（确保溶液变澄清），小心吸弃上清。从磁力架上取下 EP 管，加入 100 μL 的 2× 结合 - 洗涤缓冲液，混匀后置磁力架 2 min，吸弃上清液。取下 EP 管，加入 200 μL 2× 结合 - 洗涤缓冲液，重悬磁珠，加入 200 μL 的 PCR 纯化后产物，置于恒温摇床孵育 30 min，在磁力架上放置 2 min 后小心吸弃上清。然后用 1× 磁珠结合 - 洗涤缓冲液洗涤 3-5 次，加入 50 μL 100 mmol/L NaOH 溶液，在 37 ℃恒温摇床上孵育 30 min，目的是使 dsDNA 解链为 ssDNA。放置于磁力架上后，含生物素的 ssDNA 因与 Dynabeads M-280 streptavidin 结合而随磁珠贴附于管壁，不含生物素的 ssDNA 却仍留于溶液中，吸取 ssDNA 并用微量核酸定量仪进行 ssDNA 定量。加入 5 μL 的 1 mol/L HCl（中和 NaOH），即为次一轮筛选的 ssDNA 文库。

1.2.6 **新一轮筛选** 第 2 轮的筛选条件和第 1 轮一致，从第 3 轮开始加大筛选的压力，加入 tRNA 竞争性结合（从 5 μL 逐渐递增），逐渐加大纤维蛋白和 ssDNA 随机文库的比例，并逐渐增多了洗涤的次数、减少了孵育时间、加快了摇床转数等。在偶数轮筛选过程中，我们用引物 4 和引物 3 进行 PCR 扩增，经纯化后分离单链，这样通过测定下一轮筛选前后的 ssDNA 荧光值，来计算各轮 ssDNA 与纤维蛋白的结合百分率。

1.2.7 **适配子的克隆测序** 将第 15 轮筛选产物扩增，纯化后连接 T 载体，转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞，每 100 μL 感受态细胞加入 10 μL 的连接产物，冰浴 30 s，42 ℃热休克 90 s，冰浴 1-2 min，然后加入 890 μL SOC 培养基震荡培养 1 小时，离心后取适量菌液（约 100 μL）涂 LB 板，待液体干后倒置于

37 ℃ 孵箱中过夜培养。挑取单克隆进行菌落 PCR 验证，选取阳性克隆子接种于 5 mL 含 AMP 抗性的液体培养基，37 ℃ 摇床过夜，提取质粒送 Invitrogen 公司测序并对结果进行比对分析。

2 结果

2.1 纤维蛋白包被磁珠的效率

如图 1 所示，标准曲线成直线关系，关系方程为 y=0.0017x+0.1566，相关系数 R^2=0.9993。根据关系方程计算，纤维蛋白包被羧基磁珠前的溶液浓度为 0.413 mg/mL，包被后为 0.051 mg/mL，包被效率为 87.65 %。

2.2 纤维蛋白适配子的筛选

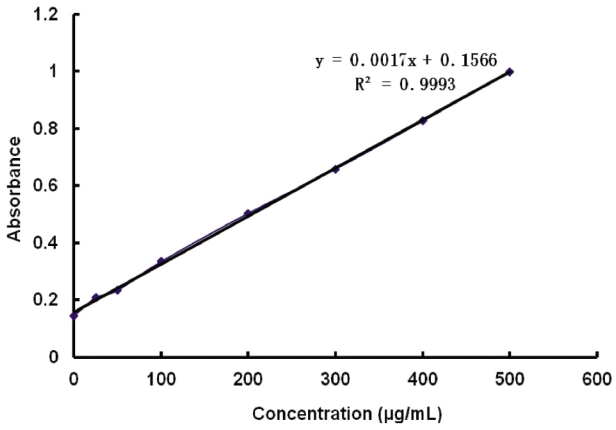

图 1 BCA 蛋白定量试剂盒的标准曲线

Fig. 1 Standard Curve of BCA Protein Assay Kit

2.2.1 ssDNA 的扩增和纯化 每轮洗脱下来与纤维蛋白结合的 ssDNA，经 PCR 扩增，取适量(3-5 μL)产物于 2~3%的琼脂糖凝胶进行电泳，电压 100 V，时间 20~30 min，然后置紫外灯下观察条带大小。可见单一条带、大小在 100 bp 附近(见图 2)。

2.2.2 ssDNA 富集库与纤维蛋白的结合率 结果表明，结合率大致经历了由高到低，又由低到高的过程，直至 13 轮后，基本保持稳定，继续筛选 2 轮后，结合率无明显升高，遂停止筛选。起初 2 轮，为了得到尽可能多的适配子，没有加入 tRNA 竞争结合，所以结合率较高；第 3 轮后，逐渐增加了 tRNA 的用量，致使低亲和力的适配子被淘汰，所以结合率有所下降；后期高亲和力的适配子越来越富集，结合率就得到提高，最后结合率稳定在 34.23 %左右(见图 3)。

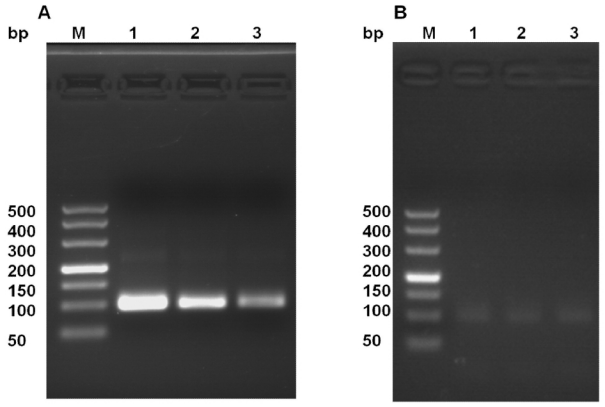

图 2 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of PCR products

Note : A: the results of 3rd cycle, B: the results of 15th cycle; M:500bp maker; 1,2,3 stand for PCR products

2.3 适配子的测序

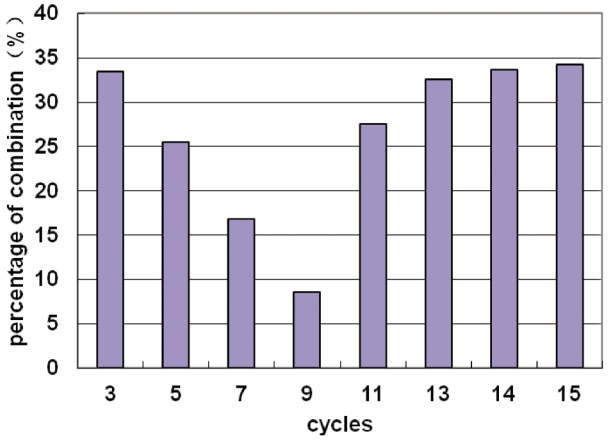

图 3 ssDNA 富集库与纤维蛋白的结合百分率

Fig. 3 The combination percentage of ssDNA enrichment library with fibrin

将第 15 轮筛选的产物 PCR 扩增，经纯化后连接到 T 载体上并转化 JM109 大肠杆菌中，挑取阳性克隆，接种于 AMP 抗性的液体 LB 培养基中摇菌，按试剂盒说明提取质粒后送 Invitrogen 测序。比对 10 个测序结果发现片段大小与预期相符，且两端均含有引物序列，中间部分 51-73 位有较高的相似性，其余部分不同，体现了较好的序列多样性(图 4)。

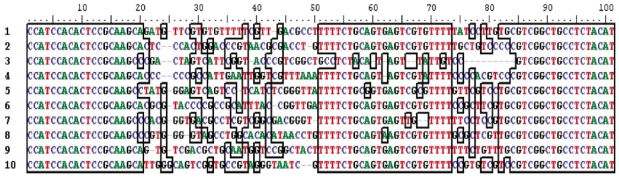

图 4 测序比对结果

Fig. 4 The alignment results of sequence

3 讨论

指数级富集的配体系统进化技术(SELEX)自上个世纪 90 年代开始兴起[14]，是一门将分子生物学与分子化学相结合的新型技术，旨在通过重复的筛选，得到与靶物质高特异性高亲和力结合的适配子；其基本原理是在体外人工合成一个随机 ssDNA 文库，将文库与靶物质一起孵育，其中一部分 ssDNA 可以与靶物质结合，把这部分结合的 ssDNA 与未结合的 ssDNA 分离开来，以此与靶物质结合的 ssDNA 为模板进行 PCR 扩增，进行下一轮的筛选过程。通过重复的筛选与扩增，把一些与靶物质无亲和力、低亲和力和中亲和力的分子洗去，而高亲和力的分子即适配子被分离出来，接下来对适配子进行克隆、测序即可得到其核酸序列。经过对其功能验证后，就可根据疾病的需要，人工的大量合成特定的适配子，从而达到诊疗的目的[15]。

在筛选过程中，磁珠包被蛋白的效率严重影响后续的实

验，我们选用 Dynal 公司的 Dynabeads M-270 Epoxy 环氧羧基磁珠为介质，这种磁珠的羧基能够与蛋白的氨基端相结合，操作简便。然后利用 BCA 蛋白定量法测定包被前后的纤维蛋白溶液浓度，从而计算蛋白包被效率(87.65%)。纤维蛋白的成功包被，为实验的顺利开展奠定了良好的基础。

影响 SELEX 筛选结果的主要因素之一是适配子 - 靶物质分离方法的有效性，我们采用羧基磁珠作为介质[16]，操作简单，整个筛选的过程完全可在液相环境中完成，这大大提高了分离的效率；同样，把 PCR 产物 dsDNA 拆分为 ssDNA 也是 SELEX 过程的重要环节，我们利用生物素标记磁珠为介质，其可以与标记生物素的 ssDNA 结合，利用磁力架将其与未标生物素的 ssDNA 分离，方法简单、快速[17]，分离效率高，分离效果好。

为了降低背景环境的结合，我们在每轮的结合反应前使用封闭液包被 EP 管；为了提高筛选的效率，在筛选的过程中递增性加入 tRNA 与 ssDNA 竞争结合，这样有利于从 ssDNA 文库中筛选出具有较高亲和力的纤维蛋白适配子；为了除去在 SELEX 过程中与磁珠、管壁结合的非特异性扩增序列，我们在 6、9、12 轮进行了反筛；为了提高筛选的特异性[18]，我们增加了摇床转数及洗涤次数，降低了孵育时间，这些都加大了筛选难度，但缺大大加快了筛选的进程。

PCR 扩增条件的优化对于生成 ssDNA 次级文库和 SELEX 的成功筛选起着至关重要的作用，在前几轮的 SELEX 筛选中，由于随机库中存在 10^{17} 条序列，很容易获得与靶蛋白结合的序列，但是高亲和力结合的分子非常有限，所以要求较高的退火温度和循环数来提高这部分核酸分子的浓度，随着筛选轮数的增加，这些特异结合的核酸分子的量也增加并得到大量富集，这就需要降低 PCR 的退火温度和循环次数来调整核酸分子产物的质与量。

第 15 轮筛选出的适配子群，经克隆、测序得到了适配子序列，通过比对测序结果发现中间部分序列有较高的相似性，这些部分是适配子的保守序列，推测这很有可能是与纤维蛋白结合的结构基础[19]，其余不同的部分表现了序列的多样性。适配子与靶物质特异性结合作用类似于中药的归经，可以认为是对中医归经理论的新认识，这无疑是把现代科技与传统中医理论联系在一起，有助于推动中药的现代化[20,21]。

本研究经过 15 轮的筛选，我们得到了与纤维蛋白特异性结合、序列多样性的适配子，纤维蛋白适配子的成功筛选为其下一步的鉴定及功能研究奠定了良好基础。

参 考 文 献(References)

[1] 谭宇卫, 郑玉姣, 王雅君, 等. 血脂异常及动脉粥样硬化中医研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(16): 3197-3200
Tan Yu-wei, Zheng Yu-jiao, Wang Ya-jun, et al. The research progress of traditional Chinese medicine of dyslipidemia and atherosis [J]. Progress in Modern Biomedcine, 2013, 13 (16): 3197-3200

[2] Johari V, Loke C. Brief overview of the coagulation cascade [J]. Disease-a-month: DM, 2012, 58(8): 421-423

[3] Boudal P, Sommet A, Bagheri H, et al. Bleedings induced by oral anticoagulants: a study of adverse drug reactions reported to Midi-Pyrenees PharmacoVigilance Centre between 2003 and 2006 [J]. Therapie, 2010, 65(6): 567-569

[4] Walenga JM, Prechel M, Hoppensteadt D, et al. Apixaban as an alternate oral anticoagulant for the management of patients with heparin-induced thrombocytopenia [J]. Clinical and Applied Thrombosis/ Hemostasis, 2013, 19(5): 482-487

[5] Zhang H, Lowenberg EC, Crosby JR, et al. Inhibition of the intrinsic coagulation pathway factor XI by antisense oligonucleotides: a novel antithrombotic strategy with lowered bleeding risk [J]. Blood, 2010, 116(22): 4684-4692

[6] Douketis J, Bell AD, Eikelboom J, et al. Approach to the new oral anticoagulants in family practice: Part 2: addressing frequently asked questions[J]. Can Fam Physician, 2014, 60(11): 997-1001

[7] Hohnloser SH. Apixaban: a new direct oral anticoagulant for stroke prevention in atrial fibrillation [J]. European heart journal, 2014, 35 (28):1828-1829

[8] 黄璐明, 唐仕欢. 中药归经理论的概念渊源和内涵探析 [J]. 中医杂志, 2009, 50(08): 680-682
Huang Lu-ming, Tang Shi-huan. The tropism theory concept origin and connotation of traditional Chinese medicine [J]. Journal of Traditional Chinese Medicine, 2009, 50(08): 680-682

[9] 吴文莉, 马威, 管竞环. 疾病归经在中医临床中的应用探讨[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(09): 2630-2631
Wu Wen-li, Ma Wei, Guan Jing-huan. Discussion on disease tropism application in clinical traditional Chinese medicine [J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2013, 28 (09): 2630-2631

[10] 姜楠, 张冰冰. 中药归经理论浅析 [J]. 中药与临床, 2011, 2(04): 37-38
Jiang Nan, Zhang Bing-bing. An analysis of attributive channel theory of Chinese herbal medicine [J]. Pharmacy and Clinics of Chinese Madteria Medica, 2011, 2(04): 37-38

[11] Gopinath SC. Anti-coagulant aptamers [J]. Thrombosis research, 2008, 122(6): 838-847

[12] 兰小鹏. 适配体技术及其在医学检验研究中的作用 [J]. 临床检验杂志, 2012, 30(10): 765-768
Lan Xiao-peng. Aptamer technology and its role in the inspection of medical research [J]. Chinese Journal of Clinical Laboratory Science, 2012, 30(10): 765-768

[13] 汪江波, 李赞东, 赵延斌, 等. SELEX 技术筛选耐甲氧西林金黄色葡萄球菌适配子的研究 [J]. 中华医院感染学杂志,2013, 23(13): 3041-3043
Wang Jiang-bo, Li Zan-dong, Zhao Yan-bin, et al. In vitro selection of aptamers against methicillin-resistant Staphylococcus aureus by SELEX [J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2013, 23 (13): 3041-3043

[14] Zhang Y, Chen Y, Han D, et al. Aptamers selected by cell-SELEX for application in cancer studies [J]. Bioanalysis, 2010, 2(5): 907-918

[15] Dassie JP, Giangrande PH. Current progress on aptamer-targeted oligonucleotide therapeutics [J]. Therapeutic delivery, 2013, 4(12): 1527-1546

[16] 江丽, 兰小鹏, 曾燕丽, 等. 用 SELEX 技术筛选葡萄球菌肠毒素 B 特异性适配体[J]. 临床检验杂志, 2009, 27(6): 420-421
Jiang Li, Lan Xiao-peng, Zeng Yan-li, et al. Screening staphylococcal

enterotoxin B aptamers by SELEX technology [J]. Chinese Journal of Clinical Laboratory Science, 2009, 27(6): 420-421

[17] 刘中成, 解瑶, 张艳芬, 等. 一种适用于 SELEX 技术的单链 DNA 制备方法[J]. 中国农业科技导报, 2014, 16(02): 149-154
Liu Zhong-cheng, Xie Yao, Zhang Yan-fen, et al. A method to generate single-strabded DNA through SELEX technology[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2014, 16(02): 149-154

[18] Marimuthu C, Tang TH, Tominaga J, et al. Single-stranded DNA (ssDNA) production in DNA aptamer generation [J]. The Analyst, 2012, 137(6): 1307-1315

[19] Hanazato M, Nakato G, Nishikawa F, et al. Selection of an aptamer against mouse GP2 by SELEX[J]. Cell Structure and Function, 2014, 39(1): 23-29

[20] 曾春桂, 刘涛. 中药现代化研究进展 [J]. 湖北中医杂志, 2013, 35 (07): 81-82
Zeng Chun-gui, Liu Tao. Research progress of the modernization of traditional Chinese Medicine [J]. Hubei Joural of Traditional Chinese Medicine, 2013, 35(07): 81-82

[21] 许仕杰,黄纯美,刘小虹,等.中药现代化的内涵及若干问题反思[J]. 新中医, 2013, 45(02): 160-161
Xu Shi-jie, Huang Chun-mei, Liu Xiao-hong, et al. Reflection on the connotation of the modernization of traditional Chinese medicine and some related problems [J]. Journal of New Chinese Medicine, 2013, 45 (02): 160-161

（上接第 2036 页）

[12] Ventura M, Boerman OC, Franssen GM, et al. Monitoring the biological effect of BMP-2 release on bone healing by PET/CT [J]. J Control Release, 2014, 183: 138-144

[13] Santos AP, Oliveira BH, Nadanovsky P. Effects of low and standard fluoride toothpastes on caries and fluorosis: systematic review and meta-analysis[J]. Caries Res, 2013, 47(5): 382-390

[14] Huo L, Liu K, Pei J, et al. Fluoride promotes viability and differentiation of osteoblast-like Saos-2 cells via BMP/Smads signaling pathway[J]. Biol Trace Elem Res, 2013, 155(1): 142-149

[15] Garcí a-Pérez A, Irigoyen-Camacho ME, Borges-Yáñez A.Fluorosis and dental caries in Mexican schoolchildren residing in areas with different water fluoride concentrations and receiving fluoridated salt [J]. Caries Res, 2013, 47(4): 299-308

[16] Manfrin TM, Poi WR, Okamoto R, et al. Expression of OPG, RANK, and RANKL proteins in tooth repair processes after immediate and delayed tooth[J]. J Craniofac Surg, 2013, 24(1): e74-80

[17] Longo A, Librizzi M, Naselli F, et al. PTHrP in differentiating human mesenchymal stem cells: transcript isoform expression, promoter methylation, and protein accumulation [J]. Biochimie, 2013, 95(10): 1888-18896

[18] Xu S, Zheng G, Li M, et al. Direct effects of fluoride on activities of bone morphogenetic protein [J]. Chinese Journal of Preventive Medicine, 2012, 34(4): 215-217

[19] Caldeira EM, Fidalgo TK, Passalini P, et al. Effect of fluoride on tooth erosion around orthodontic brackets [J]. Braz Dent J, 2012, 23 (5): 581-585

[20] Bolay S, Cakir FY, Gurgan S. Effects of toothbrushing with fluoride abrasive and whitening dentifrices on both unbleached and bleached human enamel surface in terms of roughness and hardness: an in vitro study[J]. J Contemp Dent Pract, 2012, 13(5): 584-589