



· 综述 ·

核酸适体的筛选及其在养殖动物病原检测中的应用进展

李鹏飞^{1,2,3,4}, 张帅帅^{1,2}, 刘明珠², 黄静^{2*}, 王剑^{2,3}, 钟明兰^{2,3},
欧武阁^{2,3}, 何琼玉^{2,3}, 韦红玲², 余庆^{1,2*}

(1. 广西大学资源环境与材料学院, 广西南宁 530000;

2. 广西科学院广西海洋科学院, 广西水产生物技术与现代生态养殖重点实验室, 广西渔业重大疫病防控与高效健康养殖产业技术工程研究中心, 广西南宁 530007;

3. 广西玉林市鑫坚种养有限公司, 广西鑫坚投资集团有限公司, 广西壮族自治区重要鱼类遗传育种与生态渔业产业技术工程研究中心, 广西南宁 530000;

4. 北部湾海洋产业研究院, 中国-东盟现代渔业产业技术转移示范中心, 广西防城港 536007)

摘要: 动物疫病的暴发不仅造成了巨大损失, 也严重阻碍着人工养殖业的健康可持续发展, 因此亟须针对疫病病原开发快速检测技术和病原防控技术来预防病害的暴发。核酸适体 (aptamer) 是针对特定靶标, 利用指数富集配基系统进化技术 (systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX) 筛选得到具有高亲和力和高特异性的功能性单链寡核苷酸。本文结合国内外研究, 阐述了核酸适体的优势以及其在人工养殖动物病原微生物防控中的研究进展, 同时重点讨论了核酸适体在应用方面的 5 种挑战, (1) 核酸适体筛选技术的局限性; (2) 核酸适体在治疗方面缺乏稳定性与安全性; (3) 核酸适体在生物体内如何持续性发挥靶向治疗作用; (4) 核酸适体在活体实验中的精确性有待提高; (5) 核酸适体与其他检测方法能否串联, 从而构建全面性的检测平台。目前核酸适体针对养殖动物病原领域的研究只是刚刚起步, 在快速检测与靶向治疗方面具有广阔的应用前景。

关键词: 养殖动物; 病原检测技术; 核酸适体; 指数富集配基系统进化技术

中图分类号: S 942

文献标志码: A

随着我国人民生活水平的逐步提高, 以及国内养殖经济的飞速发展, 人民群众对不同健康养殖产品的需求不断增加, 这为我国养殖业的发展提供了机遇。渔业和畜牧业是我国养殖业的重要组成部分, 其发展对我国经济具有重大的影响。2021 年全国水产品总产量 6 690.29 万 t, 其中养殖

产量 5 394.41 万 t, 占总产量的 80.63%^[1]。在畜牧业养殖中, 2021 年畜牧业生产稳定增长, 全国全年猪牛羊禽肉产量 8 887 万 t, 较 2020 年增长 16.3%^[2]。而随着养殖产业的不断壮大, 导致各种养殖病原的泛滥, 这严重阻碍了养殖行业的健康可持续发展。因此, 迫切需要开发针对养殖动物病原微生物

收稿日期: 2022-11-21 修回日期: 2023-03-17

资助项目: 国家自然科学基金 (U20A20102); 广西自然科学基金 (AD23026331, 2023GXNSFAA026325, 2022GXNSFBA035521, 2022JJA130281); 国家重点研发计划 (2022YFD2401200)

第一作者: 李鹏飞 (照片), 从事水产病害防控与生态健康养殖技术的研究, E-mail: pfl2014@126.com

通信作者: 黄静, 从事水产病害检测技术的研究, E-mail: huangqinglin1220@163.com;

余庆, 从事水生动物医学的研究, E-mail: yu_qing1990@163.com



物的快速检测方法来有效预防病害的暴发^[3-5]。

核酸适体 (aptamer) 是利用指数富集的配体系统进化技术 (systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX) 筛选得到单链寡核苷酸 (ssDNA 或 ssRNA)^[4]。自核酸适体 1990 年被报道以来, 因核酸适体具有对靶标的高亲和力、高特异性和识别多种靶标等特性, 得到各国学者的广泛关注, 也吸引国内外学者对其在养殖动物病原方面的应用进行研究^[6]。近年来, 针对不同的养殖生物病原, 各国学者虽然已经筛选出不同的核酸适体, 但相较于种类繁多的养殖动物病原, 可应用于现场检测和实际治疗的核酸适体资源非常匮乏, 大多还处于实验室研究阶段。本文结合国内外研究, 综述了核酸适体针对养殖动物病原体的筛选和检测技术的研究进展, 并在核酸适体相较于抗体有诸多优点的基础上, 针对核酸适体在养殖动物病原的发展应用方面做出展望。

1 核酸适体概述

通过 SELEX 技术筛选得到的核酸适体, 都具有特定二级、三级结构, 且都会针对特定靶标发挥其功能性作用^[6]。SELEX 技术利用重复循环的筛选过程为所需的靶分子选择高度特异性的核酸适体。SELEX 技术首先将人工合成的容量通常为 $10^{14} \sim 10^{16}$ 单链随机寡核苷酸文库与靶标在一定条件下混合孵育, 得到核酸适体-靶标复合物, 移除未与靶分子或与非靶分子结合的适体, 与靶分子结合的核酸适体被洗脱作为扩增模板, 用聚合

酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 对实验所需的核酸适体进行扩增, 生成下一轮筛选的二级文库^[7-10] (图 1)。

目前核酸适体代替传统抗体作为诊断工具、治疗药物和药物传递的医疗应用已经被广泛研究^[11-12]。核酸适体与抗体对靶分子都有着高特异性和高亲和力的特点, 但核酸适体的巨大应用潜力还得益于其他优势: (1) 核酸适体的生物毒性较抗体更小; (2) 核酸适体比抗体的稳定性更高; (3) 核酸适体的相对分子质量比抗体更小; (4) 可根据实验设计对核酸适体进行结构修饰和优化; (5) 核酸适体可以通过化学手段在体外批量合成; (6) 核酸适体比抗体具有更强的组织穿透能力, 且更易被细胞内化; (7) 核酸适体具有更为广泛的靶标 (图 2); (8) 与抗体相比, 核酸适体生产成本较低、批次间差异较小^[4,11]。基于以上优势, 核酸适体作为一种新型识别分子在病原检测、分子识别元件和药物治疗应用等方面逐渐显示出能与抗体相媲美的潜力, 且开发功能性的核酸适体替代传统抗体^[4-5], 在检测和治疗养殖病原方面逐渐成为核酸适体领域的研究热点。

2 养殖生物病原相关的核酸适体

有着“化学抗体”之称的核酸适体, 不但具有和抗体相当的对特定靶标的高特异性和亲和力^[11], 还可以识别包括离子、蛋白质、病毒颗粒、细胞以及细菌等不同类型的靶标^[12]。核酸适体的出现, 让各国学者在快速检测和有效防治不同养殖病原

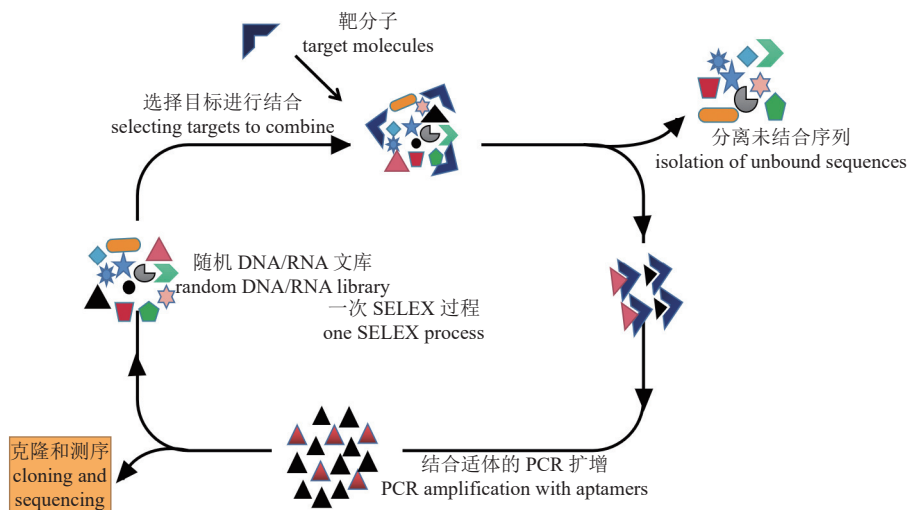


图 1 SELEX 体外筛选示意图

Fig. 1 Schematic diagram of SELEX *in vitro* screening

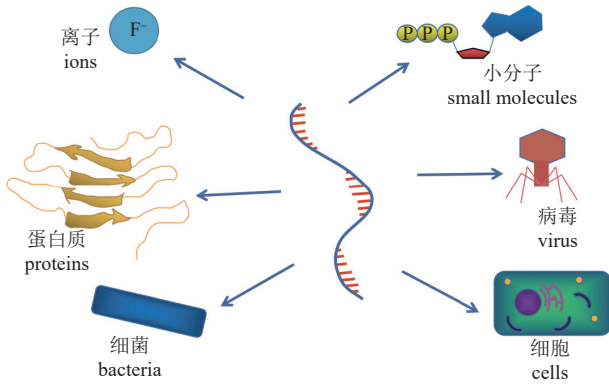


图 2 核酸适体的各种靶标分子

Fig. 2 Various target molecules for aptamers

体的研究中有了新方向。目前已报道成功筛选到特异性核酸适体的养殖动物致病菌有大肠杆菌 (*Escherichia coli*)^[13]、溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*)^[14]、创伤弧菌 (*V. vulnificus*)^[15]、哈维氏弧菌 (*V. harveyi*)^[16]、副溶血弧菌 (*V. parahaemolyticus*)^[17]、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)^[18-19]、肠炎沙门氏菌 (*S. enteritidis*)^[19]、嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)^[4] 等。成功筛选到特异性适体的病毒性病原体有牛冠状病毒 (bovine coronavirus,

BCov)^[20]、牛副流感病毒 3 型 (bovine parainfluenza virus type 3, BPIV3)^[21]、三重重组甲型流感病毒 (Neutralizing DNA aptamers against swine influenza H3N2 viruses, IAVs)^[22-23]、牛疱疹病毒 1 (bovine herpesvirus 1, BoHV-1)^[24-25]、口蹄疫病毒 (foot and mouth disease virus, FMDV)^[26]、番鸭细小病毒 (muscovy duck parvovirus, MDPV)^[27]、病毒性出血性败血症病毒 (viral hemorrhagic septicemia, VHSV)^[28]、牙鲆弹状病毒 (hiramе rhabdovirus, HIRRV)^[29]、中华鳖虹彩病毒 (soft-shelled turtle iridovirus, STIV)^[30]、新加坡石斑鱼虹彩病毒 (singapore grouper iridovirus, SGIV)^[31]、赤点石斑鱼神经坏死症病毒 (red-spotted grouper nervous necrosis virus, RGNNV)^[32]、鲤春病毒血症病毒 (spring viremia of carp virus, SVCV)^[33]、草鱼呼肠孤病毒 (grass carp reovirus, GCRV)^[34]、大口黑鲈虹彩病毒 (largemouth bass virus, LMBV)^[35-36] 等 (表 1)。

2.1 养殖家畜类病原的核酸适体

家畜等养殖动物由于自身携带病原或者外界环境的干扰等因素的影响, 常常会发生各种各样的疾病, 主要包括病毒性疾病, 如口蹄疫 (foot

表 1 养殖动物病原相关的核酸适体

Tab. 1 Aptamers associated with cultured biological pathogens

分类 classify	名称 name	靶标 targets	参考文献 references
针对养殖家畜病原体的核酸适体 aptamer for farmed livestock pathogens	核酸适体1, 核酸适体2 aptamer1, aptamer2	猪圆环病毒2型衣壳蛋白 porcine circovirus type 2 (PCV2) capsid protein	[37]
	HA68, HA7, HA2a, HA2b	猪H3N2流感甲型病毒 swine H3N2 influenza viruses	[22]
	spinach-p54	p54 RNA	[38]
	F38, F47, F52, F47tr	FMDV中RNA聚合酶(3Dpol) FMDV 3Dpol	[26]
	N-12, N-33, N-45	牛冠状病毒N蛋白 bovine coronavirus N protein	[39]
	核酸适体72 aptamer 72	A20蛋白 A20 protein	[40]
	IBRV A4、IBRV A4.7	牛疱疹病毒1 bovine herpesvirus 1	[25]
	w-32, w-33, w-34	牛副流感病毒3型的HN蛋白 HN protein of BPIV3	[21]
	12A46, 14A6, 14A31, 17OAp1-24, 17OAp1-24mm	朊病毒蛋白 prion protein (PrPc)	[41]
	apt B12	大肠杆菌K88菌株 <i>E. coli</i> K88	[42]
	WKB-14	牛支原体P48蛋白 mycoplasmas bovis P48	[43]
	Mtb36	结核分枝杆菌H37Ra <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra	[44]

· 续表 1 ·

分类 classify	名称 name	靶标 targets	参考文献 references	
针对养殖家禽病原体的核酸适体 aptamer for farmed poultry pathogens	FHN12-45-3, FHN12-36-6, FHN12-19-9; Apt_NDV01, Apt_NDV02, Apt_NDV03, Apt_NDV04, Apt_NDV05	新城疫病毒 newcastle disease virus, NDV	[45-46]	
	JH4APT, JH2APT, J3APT, J15APT	禽流感H5N2全病毒颗粒 avian influenza H5N2 whole virus particles	[47]	
	IF22, IF23, IF20, IF15, IF10	禽流感H5Nx全病毒 avian influenza H5Nx whole virus	[48]	
	核酸适体序列(1), 核酸适体序列(2), 核酸适体序列(3) aptamer sequence (1), aptamer sequence (2), aptamer sequence (3)	禽流感病毒 H5N1中的血凝素(HA) hemagglutinin from avian influenza virus H5N1	[49]	
	aptAIV	禽流感病毒 avian influenza virus (AIV)	[23]	
	apt-10	MDPV	[27]	
	C7, C19, C15, B1, B2, B6和C7-35M	禽流感H9N2病毒的血凝素H9 hemagglutinin 9 from avian influenza virus H9N2	[50]	
	A9和B4	禽流感H9N2病毒 avian influenza virus H9N2	[51]	
	针对水生养殖动物病原体的核酸适体 aptamer for aquaculture animal pathogens	F1, F2, C6	VHSV	[28]
		H1, H2, H3, H4	HIRRV	[29]
QA-9, QA-12、QA-36和QA-92		STIV	[30]	
LYST1和LYST2		STIV感染的FHM细胞 STIV-infected fathead minnow (FHM) cells	[52]	
LMB-761, LMB-764, LMB-748, LMB-439, LMB-755, LMB-767		SGIV	[31]	
Q2, Q3, Q4, Q5; LYGV1, LYGV2, LYGV3, LYGV4		SGIV感染细胞 SGIV-infected cells	[53-54]	
A5, A10, B11		RGNNV的衣壳蛋白 capsid protein of RGNNV	[32]	
TNA1, TNA4, TNA19; GBN2, GBN10, GBN34		RGNNV感染细胞 RGNNV-infected cells	[55-56]	
F2, F7, F10, F13, T10, FT6, FT7		GCRV的S10蛋白 S10 protein of GCRV	[34]	
GVI-1, GVI-7, GVI-11		GCRV I感染的CIK细胞 GCRV 1-infected CIK cells	[57]	
LA38, LB49, LA13, LA38s, LA13s		LMBV	[35-36]	
LBVA1, LBVA2, LBVA3		LMBV感染细胞 LMBV-infected cells	[58]	
VA2, VA8		溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i>	[14]	
Vapt2		创伤弧菌 <i>V. vulnificus</i>	[15]	
S1, S25, S26, S27, S35		哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	[59]	
A1P, A3P, A17P, A18P, A21P; Apt-1, Apt-2, Apt-3, apt-4		副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	[17,60]	
C14, C22		哈维氏弧菌, 溶藻弧菌 <i>V. harveyi, V. alginolyticus</i>	[16]	

and mouth disease, FMD)、H3N2猪流感 (swine influenza)、非洲猪瘟 (african swine fever)、牛疱疹病 (bovine herpes)、牛冠状病毒病 (bovine coronavirus disease)、牛痘 (vaccinia) 和传染性海

绵状脑病 (transmissible spongiform encephalopathy) 等^[22,25-26,38,61] 和细菌性疾病, 如乳腺炎、结核病、肠炎或大肠杆菌病等^[61-62], 这些高患病率和高死亡率的疾病, 严重制约畜牧业的健康可持续发展。

FMD 是一种严重威胁家猪 (*Sus scrofa*)、家牛 (*Bos taurus*)、绵羊 (*Ovis aries*) 等家畜健康的病毒性传染病^[26]。因其传染速度快、传染性强的特性, 已对世界养殖行业造成巨大的经济损失, 因此急需能够快速检测该疾病的技术。Ellingham 等^[26] 经研究成功筛选出针对 FMDV 中 RNA 依赖性 RNA 聚合酶的 RNA 适体 (F38、F47、F52 和 F47tr), 该四种适体均能抑制该酶体外活性, 可有效抑制 FMDV 的传播。BCov 是引起牛呼吸道疾病的重要病原之一^[20], 程如楠等^[39] 以 BCov N 蛋白为靶标, 筛选得到 N-12、N-33 和 N-45 适体, 均可与 BCov N 蛋白特异性结合, 为 BCov 的早期检测奠定基础。牛痘是由牛的天花病毒引起的急性感染病, 这种疾病是人畜共患传染病, 危害极大^[40]。有研究指出 A20 蛋白是牛痘病毒的一个重要组成部分, Saccucci 等^[40] 以 A20 蛋白为靶标, 通过 SELEX 技术筛选到适体 72, 该核酸适体能够明显抑制牛痘病毒的复制, 使其成为抑制牛痘病毒复制的一种潜在性药物。BoHV-1 是牛传染性牛源性鼻气管炎的主要病原体, Xu 等^[24] 通过 SELEX 技术以 BoHV-1 为靶标成功筛选到核酸适体 IBRV-A4, 该适体通过阻断病毒颗粒在细胞膜上的吸附来抑制 BoHV-1 感染。后又通过提高适体 IBRV-A4 的亲合力合成了一个优化的适体 IBRV-A4.7, 与 IBRV-A4 相比, IBRV-A4.7 提高了抗病毒活性, 有预防畜群病害暴发的效力^[25]。传染性海绵状脑病 (transmissible spongiform encephalopathy, TSE) 是由朊病毒 (prion) 引起的神经退行性疾病, 即朊病毒病^[41], 牛羊等动物在感染朊病毒后死亡率极高, Wang 等^[41] 利用 SELEX 技术成功筛选出可以区分正常和异常 PrPc 亚型的 DNA 适体 (12A46、14A6、14A31、17OAp1-24 和 17OAp1-24 mm)。猪流感病毒 (swine influenza virus, SIV) 是引起猪的急性呼吸道疾病即猪流感的主要病原之一, 主要包括 H1N1、H1N2 和 H3N2 三个亚型^[22]。猪一旦感染 SIV, 发病迅速, 且死亡率极高。Wongphatcharachai 等^[22] 以 SIV H3N2 为靶标筛选到 DNA 适体 HA68、HA7、HA2a 和 HA2b, 该 4 条核酸适体都能抑制 H3 血凝集, 且有望用于现场的快速检测猪流感。近年来流行的非洲猪瘟, 是由一种主要致病病毒非洲猪瘟病毒 (african swine fever virus, ASFV) 引发的, 严重影响我国养猪产业发展, 韩程程等^[38] 研究发现一种 RNA 核酸适体 Spinach-p54, 特异性结合 p54 RNA 后产生荧光信号, 使

其成为了检测 ASFV 的标志, 这为核酸适体针对 ASFV 的快速检测技术提供了新思路。各国学者以不同病毒性病原为靶标通过 SELEX 筛选核酸适体, 表明了核酸适体可作为新型药物或创新性检测手段在病害防治等方面的应用具有可能性。

细菌性疾病也会对家畜的养殖造成重大经济损失, 甚至威胁人体健康。牛乳腺炎是奶牛养殖中最常见的细菌性疾病之一, 它是由 200 多种感染性微生物引起的, 最常见的病原体是大肠杆菌、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、链球菌 (*Streptococcus*)、支原体 (*Mycoplasma*) 等^[63]。为应对这种疾病, 曹立亭等^[64] 以牛隐形乳腺炎的诊断指标奶牛结合珠蛋白 (haptoglobin, HP) 为靶标, 经过 8 轮的体外 SELEX 筛选, 最终筛选到能与 HP 特异性结合 5 个 DNA 适体家族 cx1、cx2、cx3、cx4 和 cx5, 这为现场检测提供了潜在工具。牛支原体 (*Mycoplasma bovis*, Mb) 是引起牛呼吸道疾病和牛乳腺炎的一种病原体, Mb 没有细胞壁, 这就是许多抗生素对支原体无效的原因^[43-44], 因此预防性检测与及时的治疗尤为关键。Fu 等^[43] 通过 SELEX 技术以 Mb P48 蛋白为靶标, 筛选到具有高亲和力和特异性的 ssDNA 适体 WKB-14, 该适体提高了现场快速检测出牛支原体的概率。另一种被报道对牛的养殖造成不良影响的疾病是牛结核病 (bovine tuberculosis, BT), 主要是由牛分枝杆菌引起^[44]。Mozioglu 等^[44] 使用 SELEX 技术筛选获得了能高特异性识别结核分枝杆菌 H37Ra 的 ssDNA 适体 Mtb36, 使现场快速检测出 BT 的可能性增加。

2.2 养殖家禽类病原的核酸适体

近年来家禽养殖行业的不断发展, 导致家禽行业逐渐商业化, 从而也产生了诸多难以解决的病害问题, 例如新城疫病毒 (newcastle disease virus, NDV)^[46]、禽流感病毒 (avian influenza virus, AIV)^[49]、番鸭细小病毒^[27,61] 等, 而针对不同的家禽类养殖病原体, 研究人员也开发出相应的核酸适体用于现场快速检测和治疗。NDV 是一种 RNA 病毒, 由 NDV 所引起的禽类传染病新城疫是一种可以引发呼吸、神经、肠道等问题的高传染性禽类疾病^[45-46]。李敏思等^[45] 以 F48E9 株 NDV 为靶标, 利用 SELEX 技术经过 12 轮筛选, 最终获得能够与 F48E9 株 NDV 特异性结合的 3 条 RNA 适体 (FHN12-19-9、FHN12-36-6 和 FHN12-

45-3), 其中 FHN12-45-3 适体能够有效抑制 NDV 的复制。Marnissi 等^[46]筛选到能够特异性识别 NDV 的 ssDNA 适体 (Apt_NDV01、Apt_NDV02、Apt_NDV03、Apt_NDV04 和 Apt_NDV05), 其中适体 Apt_NDV01 和 Apt_NDV03 对 NDV 具有较高的特异性和亲和力, 使其成为快速检测 NDV 的潜在性工具。禽流感是由 AIV 引起的一种具有较强传染性并对家禽养殖行业危害极大的病毒性疾病^[50]。Wang 等^[49]通过以 AIV H5N1 为靶标的 13 轮 SELEX 筛选, 得到能与 H5N1 特异性结合的 DNA 适体。Kim 等^[47]筛选到可以特异性结合禽流感 H5N2 全病毒颗粒的适体 (JH4APT、JH2APT、J3APT、J15APT), 为现场快速检测禽流感奠定了基础。核酸适体因其独特的靶向性、特异性及亲和性, 可作为治疗禽类疾病的一种潜在性治疗药物, 也可以在针对某种禽类病原的检测上发挥重要的作用, 对禽类养殖安全有重大的发展意义。

2.3 水生动物病原的核酸适体

在众多的水生动物病原体中, 细菌性病原体和病毒性病原体是导致水生养殖动物大规模死亡的两大重要因素。目前已报道成功筛选到特异性适体的水生病原菌有溶藻弧菌、哈维氏弧菌、副溶血弧菌、创伤弧菌、鼠伤寒沙门氏菌和嗜水气单胞菌等^[4]。溶藻弧菌是一种条件致病菌, 可以感染多种海水养殖生物。Yu 等^[14]通过体外 SELEX 技术筛选到能与溶藻弧菌具有高亲和力和特异性的 ssDNA 适体 VA2 和 VA8, 且已运用到现场快速检测中。创伤弧菌是另一种致病性的海洋细菌, 可在鱼类养殖中引起大规模感染。Yan 等^[15]首次针对创伤弧菌使用 SELEX 技术筛选到一条高特异性的 DNA 适体 Vapt2, 该适体能够在较大的浓度范围 ($8\sim 2.0\times 10^8$ CFU/mL) 内检测到创伤弧菌。郑江等^[59]运用 Bacteria-SELEX 技术, 在体外以哈维氏弧菌为靶标, 经过 15 轮的筛选, 从 ssDNA 随机文库中筛选到 5 条核酸适体 (S1、S25、S26、S27 和 S35), 这些适体均能与哈维氏弧菌特异性识别。Duan 等^[17]利用 SELEX 技术以对数期的副溶血弧菌 ATCC-17802 为靶标, 筛选到 ssDNA 核酸适体 A1P 和 A3P, 这 2 条适体均与副溶血弧菌有着较高的特异性和亲和力。Park 等^[19]通过 Cell-SELEX 技术, 筛选得到能特异性识别鼠伤寒沙门氏菌和肠炎沙门氏菌的 3 条核酸适体 Se1、Se2 和 St1, 这些核酸适体的性质和结构均不同, 为快速

检测两种病原菌提供了新思路。目前大多数报道的核酸适体都是针对单个靶标进行选择结合, 然而在不同的微生物中可能会存在相同的结合靶点位置, 这不仅对相关微生物的快速检测具有重要意义, 而且对微生物发病机制的分析也具有重要意义^[11]。Liu 等^[16]以溶藻弧菌和哈维氏弧菌为靶标在体外运用 SELEX 技术, 筛选得到的 2 条核酸适体 C14 和 C22 对两种弧菌均具有较高的特异性和亲和力。

病毒性病原体也对水产养殖造成了巨大的经济损失, 特别是目前的规模化的养殖模式, 病毒性病原极易群体性暴发和传染, 因此, 养殖人员迫切需要能快速检测病原的新技术。VHSV 可在世界范围内引起严重的鱼类疾病。Punnarak 等^[28]利用 SELEX 成功筛选到了在体内外均能特异性识别和抑制 VHSV 生长的 RNA 核酸适体 (F1、F2 和 C6), 研究结果发现, 筛选到的 RNA 适体可以作为对抗 VHSV 感染的实用性工具。HIRRV 是一种严重的致病性病毒, 可感染牙鲈 (*Paralichthys olivaceus*)、香鱼 (*Plecoglossus altivelis*) 和鳙 (*Aristichthys nobilis*) 等多种鱼类, 已经在世界范围内对鱼类养殖造成了巨大损失。Hwang 等^[29]经过 SELEX 技术筛选获得 4 条 RNA 适体 (H1、H2、H3 和 H4) 均可特异性地与 HIRRV 病毒颗粒结合。SGIV 是影响石斑鱼 (*Epinephelus*) 养殖的最具破坏性的病毒之一, 感染 SGIV 的石斑鱼在几天内就会出现大规模死亡, 致死率高达 90% 以上, 对石斑鱼养殖行业造成了巨大损失^[65]。目前已有针对 SGIV 以及 SGIV 感染的不同宿主细胞开发出不同的核酸适体的研究, Li 等^[31]以纯化的 SGIV 病毒颗粒为靶标利用 SELEX 技术在体外筛选出 6 条 ssDNA 适体 (LMB-761、LMB-764、LMB-748、LMB-439、LMB-755 和 LMB-767)。Li 和余庆等^[53-54]运用 SELEX 技术筛选到针对 SGIV 感染宿主细胞的 ssDNA 适体 (Q2、Q3、Q4 和 Q5; LYGV1、LYGV2、LYGV3 和 LYGV4), 这些核酸适体均可一定程度检测和抑制 SGIV 的感染, 为开发基于核酸适体的检测手段和治疗性药物提供了依据。RGNNV 是一种对水产养殖危害极大的病毒性病原体, 在大规模暴发的鱼类疫情中会导致死亡率超过 90%, 甚至高达 100%, 因此急需针对此种病毒的检测技术和治疗药物进行研究^[66]。Zhou 等^[32]利用 SELEX 技术筛选出 3 条新的 DNA 适体 (A5、A10 和 B11), 均可特异性识别 RGNNV 的衣

壳蛋白 (capsid protein, CP)。Yu 等^[55] 针对 RGNNV 感染的细胞, 筛选出 3 条核酸适体 TNA1、TNA4 和 TNA19。而后 Zhou 等^[56] 针对 RGNNV 感染的石斑鱼脑 (GB) 细胞筛选获得 3 条核酸适体 (GBN2、GBN10 和 GBN34), 均可特异性识别 RGNNV 感染的石斑鱼脑 (GB) 细胞, 且对 RGNNV 感染都有一定的抑制作用。GCRV 是另一种对水生动物具有致命性的病毒性病原体, 可引起草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 严重的出血性疾病, 死亡率高达 85%^[67]。Liang 等^[34] 研究发现核酸适体 FT6 和 FT7 在体外抑制 GCRV 复制最有效。余庆等^[68] 针对 GCRVI 感染的草鱼肾脏组织细胞系 (CIK) 筛选出了高特异性识别的适体 GVIK1, 而后 Yu 等^[57] 又以 GCRVI 感染细胞为靶标筛选出了具有高特异性和高亲和力的核酸适体 (GVI-1、GVI-7 和 GVI-11)。LMBV 是日本花鲈 (*Lateolabrax japonicus*) 养殖中最为常见的病毒性病原, 会对大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*) 的生长造成严重危害。Zhang 等^[35] 针对 LMBV 筛选获得 3 种适体 (LA38、LB49 和 LA13), 对 LMBV 均具有较高的特异性和亲和力。Yu 等^[58] 针对 LMBV 感染的 FHM 细胞筛选出了能特异性识别的 ssDNA 适体 (LBVA1、LBVA2 和 LBVA3)。核酸适体的在生物医学界的发展是迅速的, 但是针对水生生物病原体的核酸适体相对较少, 因此其在检测养殖病原以及靶向治疗养殖病原方面具有很大的应用前景。

3 基于核酸适体的病原检测技术

由病毒和细菌等致病性微生物引起的动物疾病严重威胁着养殖业的发展。因此, 在养殖现场对病原体的快速检测与诊断是控制病害暴发的关键环节。传统的病害检测方法有电子显微镜观察、PCR 和 RT-PCR 等技术, 这些方法因耗时长、实验操作复杂、检测成本高、试剂储存条件严格以及设备要求高等在实际应用中受到限制^[11]。因此急需一种高效的可在养殖现场检测养殖病原的技术, 核酸适体可以和各种目标特异性结合从而捕获目标, 让各国学者在检测养殖病原领域有了新思路。目前, 针对不同养殖动物病原的核酸适体技术开发, 主要包括基于核酸适体的生物传感器和酶联适体检测技术。

3.1 基于核酸适体的生物传感器

生物传感器是一种分析装置, 以生物传感元

件为基础构件, 能将生物化学反应转换成电信号或光学信号进行检测^[69]。由于核酸适体的良好特性, 当其被荧光标记物标记, 可作为生物传感器技术中的分子识别元件, 在捕获目标后可以形成稳定的结构, 产生易于检测的信号, 便于检测目标物。目前基于核酸适体开发的生物传感器主要分为光学适体传感器和电化学适体传感器^[70]。

光学生物传感器主要利用光学原理进行检测, 核酸适体作为具有不同光学原理的生物识别元件, 有着低成本、高灵敏度、易标记等优点^[69]。光学生物传感器的几种方法有荧光、化学发光、比色分析、表面等离子体共振 (surface plasmon resonance, SPR) 和表面增强拉曼散射 (surface-enhanced raman scattering, SERS) 等^[71]。量子点或者半导体纳米颗粒作为常见的荧光纳米材料被广泛应用于荧光检测传感器。Peng 等^[42] 利用荧光标记的 DNA 核酸适体 Apt B12 的特异性来实现对大肠杆菌 K88 的快速荧光检测。Duan 等^[71] 基于核酸适体应用 ST2P 快速检测鼠伤寒沙门氏菌, 检测显示 LOD 低至 25 CFU/mL。化学发光是替代荧光检测的一种方法, 也有学者基于核酸适体 Q2 的荧光分子探针 (Q2-AFMP), 利用修饰核酸适体的荧光基团化学发光性质, 用于体外快速准确检测 SGIV 感染^[72]。Sheng 等^[73] 通过 1 条发光的 RNA 适体 SA31 来检测金黄色葡萄球菌, 且不需要分离、纯化或富集过程。还有以 p54 RNA 为检测目标从而开发出适于检测 ASFV 的点亮 Spinach-p54-1 RNA 适体^[38]。Gao 等^[74] 针对神经毒素 GTX1/4 筛选出适体 GO18-T-d, 并将其应用于开发一种无标签的实时光学生物传感器。该传感器可快速检测贝类样品中 GTX1/4, 具有良好的重现性和稳定性。除了利用荧光等光信号来检测各种养殖动物病原外, 还可以通过一种操作简单、成本低廉的检测方法, 即肉眼可见的基于核酸适体的比色分析来检测病原。Duan 等^[75] 将核酸适体固定在金纳米颗粒 (AuNPs) 的表面作为比色探针来检测牛奶样品中的鼠伤寒沙门氏菌。SPR 是指在光波的作用下在金属和电介质的交界面上形成的改变光波传输的谐振波^[69-70], 该技术通过检测金属表面层 (金、银或铝薄膜) 上的折射率变化, 以响应表面固定的适体和靶标之间的相互作用^[76]。Bai 等^[76] 把生物素修饰的核酸适体与 SPR 传感器相结合来检测 AIV H5N1, 该适体传感器可以在 0.128~1.280 血凝集单位 (HAUs) 的检测范围内检测 AIV, 可用

家禽拭子样本检测其适用性。Nguyen 等^[48]使用一对适体 IF10 和 IF22, 成功开发出基于三明治型 SPR 的生物传感器, 该方法可快速、准确地从感染 AIV H5N1 的粪便样品中检测 AIV 完整病毒。SERS 是基于检测目标与表面固定化核酸适体相互作用过程中产生的拉曼信号的强弱, 从而达到检测病原的方法^[70]。Duan 等^[77]利用花青染料 3(Cy3) 修饰的适体 2(Apt 2) 开发了一种基于 SERS 的适体传感器, 已被成功用于检测副溶血弧菌, 且具有高选择性和高灵敏性等优点, 研究表明, SERS 信号与副溶血弧菌浓度之间的相关性在 $10\sim 10^6$ CFU/mL 范围内呈线性关系, 检测限为 10 CFU/mL。

电化学传感器是以电极表面作为固定化生物传感元件的平台, 通过对结合在平台上的分析物对电流变化的监控来进行检测^[70], 在基于核酸适体的电化学传感器应用中, 当被固定在电极上的适体检测到其目标时, 就会产生电信号的变化^[78]。该传感器检测限低, 灵敏度高, 检测方法简单快捷。Liu 等^[78]基于核酸适体和纳米材料修饰的电极组建了电化学生物传感器, 成功用于检测 H5N1 基因序列, 检测范围 $5.0\times 10^{-12}\sim 1.0\times 10^{-9}$ mol/L, 检测限为 4.3×10^{-13} mol/L。Diba 等^[79]开发了一种三明治分析平台, 由表面形成的适体-蛋白-抗体复合物组成, 使用 Aunp 修饰的电极检测 AIV H5N1 病毒蛋白。Zelada-Guillén 等^[80]以猪皮为样本, 开发了基于碳纳米管和核酸适体的电化学生物传感器用于检测金黄色葡萄球菌。该研究以核酸适体作为金黄色葡萄球菌的识别元件, 以单壁碳纳米管 (SWCNTs) 网络作为离子-电子电位传感器。适体通过共价和非共价连接两种方式构建, 检测限分别为 8×10^2 CFU/mL ($8\times 10^2\sim 10^8$ CFU/mL) 和 10^7 CFU/mL ($10^7\sim 10^8$ CFU/mL)。Wang 等^[81]开发了一种基于 ssDNA 交联聚合物水凝胶的石英晶体微天平 (quartz crystal microbalance, QCM) 适体传感器, 用于高效和特异地检测 AIV H5N1, 研究结果显示, 当用 3 种不同比例的水凝胶涂在传感器上检测 AIV H5N1 时, 水凝胶比例为 1:1 的检测限为 0.0 128 HAU, 且从抽样到检测的耗时仅为 30 min, 证明了水凝胶 QCM 适体传感器较抗体明显降低了检测限和检测时间。肠炎沙门氏菌和鼠伤寒沙门氏菌是最常见和最严重的食源性病原体, 可导致人类和动物的沙门氏菌病, 快速准确的检测该病菌是防控的关键, Park 等^[19]首次筛选出了可以和鼠伤寒沙门氏

菌特异性结合的 ssDNA 适体 Se1、Se2 和 St1, 且有望建立基于 3 条适体的生物传感器系统。

3.2 酶联适体检测技术

酶联免疫吸附测定 (ELISA) 是利用抗原抗体特异性结合进行免疫反应的定性和定量检测方法, 但依赖于抗体的 ELISA 检测有诸多缺点。除了抗体生产中的批间变化外, 产生特异性单克隆抗体的过程是繁琐和具有挑战性的, 特别是针对非免疫原性分子的。这些问题的出现让改进 ELISA 方法成为了研究热点, 需要一种能够与靶标特异性结合的识别元件来替代抗体。核酸适体被称为替代分子识别元件 (MRE), 它被证实有可能取代或补充抗体在 ELISA 中的作用, 从而改进 ELISA 方法, 即酶联适体免疫吸附测定 (ELASA)^[11,82]。ELASA 实验又称适体连接固定化吸附试验 (ALISA)、酶联寡核苷酸试验 (ELONA) 和酶联适体测定 (ELAA)^[82]。

Marnissi 等^[46]利用核酸适体序列开发出一种三明治 ELAA, 可以基于适体 Apt_NDV01 和 Apt_NDV03 用于快速和灵敏地检测农场样品中的 NDV。Cheng 等^[21]基于适体 w-33 开发出间接 ELAA 用于检测血清中的 BPIV3, 与商业 ELISA 试剂盒相比, ELAA 的阳性检出率略高, 且 ELAA 和 ELISA 的重合率为 88%。Yu 等^[83]开发出基于核酸适体 VA2 的 ELASA 用于快速检测海水养殖病原体溶藻弧菌。朱冬琳等^[84]开发出了一种基于核酸适体 VA8 的高效且能快速检测溶藻弧菌的核酸适体吸附检测技术 VA8-ELASA, VA8-ELASA 可溶藻弧菌实现特异性检测。Zhou 等^[32]首次鉴定了针对 RGNNV 的 CP 蛋白的适体, 并进一步开发出一种基于核酸适体 A10 的夹层 ELASA, 用于快速和准确地诊断 RGNNV 感染。该 ELASA 同时检测到病毒感染细胞中的 RGNNV 的 CP 蛋白和 RGNNV 病毒粒子, 其检测结果与 RT-PCR 的检测结果一致。Li 等^[53]筛选得到针对 SGIV 感染宿主细胞的具有高特异性和亲和力的 ssDNA 适体 Q2、Q3、Q4 和 Q5, 后 Li 等^[3]又基于核酸适体的性质, 开发了包括基于核酸适体 Q3 的 ELASA 技术, 用于体外高效检测 SGIV 感染。Zhang 等^[36]对核酸适体 LA38 和 LA13 进行结构优化, 合成了具有高特异性和亲和力的两种截短适体 LA38s 和 LA13s, 并开发了一种基于截短核酸适体的夹心 ELASA 用来快速检测 LMBV 感

染。基于这些报道, 也为核酸适体应用于快速检测养殖生物病原的发展提供理论依据, 为之后更多基于核酸适体的检测方法奠定基础。

3.3 基于核酸适体的其他检测技术

基于核酸适体开发出的检测技术不仅包含光学、电化学生物传感器和酶联适体检测技术等, 还有其他检测技术也被开发出来应用于检测各种养殖动物病原。如 Kim 等^[47] 利用一对同源夹层型核酸适体 J₃APT 和 JH₄ 可同时在不同位点与目标病毒 (AIV H5N2) 结合的特性, 对禽流感 H5N2 全病毒颗粒的特异性检测, 在已开发的侧向流动试纸上, 用肉眼可分别检测到缓冲液中低至 6×10^5 EID₅₀/mL 和在鸭粪中 1.2×10^6 EID₅₀/mL 的目标病毒 (AIV H5N2)。Zhang 等^[85] 利用 zyb1 和适体 AP15-1 研制出一种横向流动条带测定法, 形成三明治型适体传感器。利用这种新的横向流动条测定生物传感器, 可在低至 1×10^3 CCU/mL 的检测线内检测到猪鼻支原体。

4 展望

基于核酸适体对靶标的高特异性和高亲和力, 各国学者对其展开广泛研究与开发利用, 用于快速检测不同养殖动物病原, 目前已取得一定成果。各国学者利用 SELEX 技术筛选到多种高致病性、高致死率病原体的特异性核酸适体, 其中部分核酸适体显示出对养殖动物的治疗作用, 另有部分适体已经用于开发基于核酸适体的稳定检测技术^[6,11]。但实际用于养殖动物病原检测或养殖动物治疗中的核酸适体种类非常稀缺, 因此, 急需筛选出针对更多养殖动物病原体的新核酸适体, 为多种养殖动物病原的检测与治疗提供实用性工具^[4]。研究发现, 核酸适体具有不同的结构, 这导致针对相同靶标筛选到的适体性质不同, 因此, 在已筛选到的核酸适体中进行不同适体的性质研究一直是医学研究重点。

目前, 对养殖动物病原的防控主要包括检测与治疗, 研究人员对养殖动物病原的前期检测是防控病害暴发的关键。电子显微镜、PCR 和流式细胞术等检测方法可用于对养殖动物病原体的定性和定量检测。但这些方法在畜牧业和水产养殖业中的应用受到成本、时间、操作、设备等多方面的限制^[86-87]。因此, 养殖行业迫切需要新的实用检测方法。基于核酸适体对靶标的高特异性识

别能力, 它们正被应用于开发不同的检测技术, 如通过酶联反应检测养殖动物病原体的 ELISA 技术和通过信号扩增检测病原体的敏感生物传感器的开发等。

对不同养殖动物疾病的治疗是病害防控的另一重要环节。目前, 多数养殖人员使用抗生素或抗病毒药物来控制病原, 但长期使用会产生耐药性^[88]。因此, 亟须在世界范围内积极探索新的治疗养殖动物疾病的方法。近年来, 一些基于寡核苷酸的治疗方法, 如短干扰 RNA (siRNA)、microRNA 和核酸适体等已被用于病毒性疾病的诊断或治疗^[89]。目前, 核酸适体主要在以下四方面发挥治疗作用。一是核酸适体对病原的抑制作用, 利用核酸适体抑制病原的复制或抑制病原附着宿主来发挥抑制病原的作用; 二是核酸适体介导的靶向抗病毒药物传递, 利用核酸适体的靶向性, 可以将其作为靶向递药载体, 从而可能实现对养殖动物疾病的靶向治疗; 三是基于核酸适体的筛选模型, 以筛选抗病原体的有效药物, 即利用核酸适体的特异性, 对不同药物抗病毒的特性进行分析和筛选^[11]; 四是核酸适体通过识别和表征生物标志物来发挥机制研究作用。因此, 核酸适体在检测技术、药物筛选、靶向递药和机制研究等方面的研究, 将是养殖生物病原核酸适体研究的重要内容。

虽然核酸适体相较于抗体虽有着诸多优势, 但是它在检测病原和治疗养殖动物疾病的应用上还处于探索阶段, 目前核酸适体在针对养殖动物病原的应用中有诸多挑战。一是通过 SELEX 在筛选和鉴定靶标分子的候选适体时的复杂性。靶分子的变化会导致筛选适体时的不确定性和多样性, 而且当候选适体选择占比小的靶标相结合时, 就不能达到对病原的抑制作用, 从而筛选结果会产生巨大误差^[26]。二是核酸适体大规模商业化使用仍处于起步阶段, 因为目前核酸适体在养殖病原体上的治疗技术并不完善, 对于养殖生物的使用缺乏稳定性与安全性^[6]。三是核酸适体常被作为药物载体以及抗病原药物的替代品来定向抑制病毒或细菌达到靶向治疗作用, 但其使用效果会因不能在细胞内持续性积累而受到阻碍, 因此核酸适体在动物系统中的使用还是需要考虑其他因素^[6]。四是在进行活体实验时, 核酸适体作为靶向载体如何进一步增强靶向的精确性以及纳米颗粒的主动靶向能力, 避免核酸适体的非靶向性富集。五是核酸适体作为快速检测养殖病原的潜在

性工具, 如何能够与不同的检测方法相互串联, 构建出基于核酸适体的全面性检测平台, 实现检测效果的最大化。

基于以上挑战, 各国学者从不同角度来研究核酸适体, 其中对核酸适体的结构优化和修饰一直是研究的重点。核酸适体存在非必需区域, 因此对非必需区域序列的截短进行结构优化成为一个研究方向。某些截短后的核酸适体不仅具有与原核酸适体相同甚至更佳的亲和力和特异性, 且在检测养殖动物病原体 and 抑制病原体感染、传播的能力都有提升, 与完整序列的核酸适体相比截短的核酸适体其合成成本更低^[25,36,88]。另一研究方向是对核酸适体的修饰, 核酸适体与 siRNA 或纳米材料偶联, 发挥靶向抑制病原的作用^[32,90-94]。这一研究在基于适体针对人体肿瘤的治疗上比较成熟, 但针对养殖动物病原体的应用相对稀少, 因此, 核酸适体与纳米材料结合应用于检测养殖动物病原和治疗养殖动物疾病是未来研究的一个热点方向。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 中国渔业统计年鉴 2022[M]. 北京: 中国农业出版社, 2022: 1-158.
Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. China fishery statistical yearbook 2022[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2022: 1-158 (in Chinese).
- [2] 中华人民共和国农业农村部, 中国畜牧兽医年鉴编辑委员会. 中国畜牧兽医年鉴 2022[M]. 北京: 中国农业出版社, 2022: 1-522.
Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China, Editorial Committee of China Animal Husbandry and Veterinary Yearbook. China Animal husbandry veterinary yearbook 2022[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2022: 1-522 (in Chinese).
- [3] Li P, Zhou L, Wei J, *et al.* Development and characterization of aptamer-based enzyme-linked apta-sorbent assay for the detection of Singapore grouper iridovirus infection[J]. *Applied Microbiology*, 2016, 121(3): 634-643.
- [4] 周伶俐, 李鹏飞, 秦启伟. 水生生物病原核酸适配体研究进展 [J]. *广西科学*, 2018, 25(1): 26-31,35.
Zhou L L, Li P F, Qin Q W. Advances in study of aptamers in pathogens of aquatic organisms[J]. *Guangxi Sciences*, 2018, 25(1): 26-31,35 (in Chinese).
- [5] 李鹏飞, 余庆, 覃仙玲, 等. 广西北部湾海水养殖业现状与病害防控技术体系研究展望 [J]. *广西科学*, 2018, 25(1): 15-25.
Li P F, Yu Q, Qin X L, *et al.* Current situation and research prospects of disease control technology system of mariculture in Beibu Gulf of Guangxi[J]. *Guangxi Sciences*, 2018, 25(1): 15-25 (in Chinese).
- [6] Xuan W J, Peng Y B, Deng Z Y, *et al.* A basic insight into aptamer-drug conjugates (ApDCs)[J]. *Biomaterials*, 2018, 182: 216-226.
- [7] Dickinson H, Lukasser M, Mayer G, *et al.* Cell-SELEX: *in vitro* selection of synthetic small specific ligands[M]//Rederstorff M. Small non-coding RNAs. New York: Humana Press, 2015: 213-24.
- [8] Stoltenburg R, Reinemann C, Strehlitz B. SELEX-A (r) evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands[J]. *Biomolecular Engineering*, 2007, 24(4): 381-403.
- [9] Zhu H J, Li J, Zhang X B, *et al.* Nucleic acid aptamer-mediated drug delivery for targeted cancer therapy[J]. *ChemMedChem*, 2015, 10(1): 39-45.
- [10] Yan J H, Xiong H J, Cai S D, *et al.* Advances in aptamer screening technologies[J]. *Talanta*, 2019, 200: 124-144.
- [11] Yu Q, Liu M Z, Wei S N, *et al.* Research progress and prospects for the use of aptamers in aquaculture biosecurity[J]. *Aquaculture*, 2021, 534: 736257.
- [12] Sánchez-Báscones E, Parra F, Lobo-Castañón M J. Aptamers against viruses: selection strategies and bioanalytical applications[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2021, 143: 116349.
- [13] Li H, Ding X H, Peng Z H, *et al.* Aptamer selection for the detection of *Escherichia coli* K88[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2011, 57(6): 453-459.
- [14] Yu Q, Liu M Z, Su H F, *et al.* Selection and characterization of ssDNA aptamers specifically recognizing pathogenic *Vibrio alginolyticus*[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2019, 42(6): 851-858.
- [15] Yan W L, Gu L D, Liu S, *et al.* Identification of a highly specific DNA aptamer for *Vibrio vulnificus* using sys-

- tematic evolution of ligands by exponential enrichment coupled with asymmetric PCR[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2018, 41(12): 1821-1829.
- [16] Liu H M, Hao J M, Xu J, *et al.* Selection and identification of common aptamers against both *Vibrio harveyi* and *Vibrio alginolyticus*[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2020, 48(5): 623-631.
- [17] Duan N, Wu S J, Chen X J, *et al.* Selection and identification of a DNA aptamer targeted to *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(16): 4034-4038.
- [18] Duan N, Wu S J, Chen X J, *et al.* Selection and characterization of aptamers against *Salmonella typhimurium* using whole-bacterium Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX)[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(13): 3229-3234.
- [19] Park H C, Baig I A, Lee S C, *et al.* Development of ssDNA aptamers for the sensitive detection of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis*[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2014, 174(2): 793-802.
- [20] Cho S J, Woo H M, Kim K S, *et al.* Novel system for detecting SARS coronavirus nucleocapsid protein using an ssDNA aptamer[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2011, 112(6): 535-540.
- [21] Cheng J, Wang J W, Liu Y, *et al.* Screening and identification of ssDNA aptamers against HN protein for detection of bovine parainfluenza virus type 3 antibodies in serum[J]. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2018, 19(11): 896-901.
- [22] Wongphatcharachai M, Wang P, Enomoto S, *et al.* Neutralizing DNA aptamers against swine influenza H3N2 viruses[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2013, 51(1): 46-54.
- [23] Leblebici P, Leirs K, Spasic D, *et al.* Encoded particle microfluidic platform for rapid multiplexed screening and characterization of aptamers against influenza A nucleoprotein[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2019, 1053: 70-80.
- [24] Xu J, Zhang X X, Zhou S H, *et al.* A DNA aptamer efficiently inhibits the infectivity of *Bovine herpesvirus 1* by blocking viral entry[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 11796.
- [25] Xu J, Cai Y H, Jiang B, *et al.* An optimized aptamer-binding viral tegument protein VP8 inhibits the production of *Bovine herpesvirus-1* through blocking nucleocytoplasmic shuttling[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 140: 1226-1238.
- [26] Ellingham M, Bunka D H J, Rowlands D J, *et al.* Selection and characterization of RNA aptamers to the RNA-dependent RNA polymerase from foot-and-mouth disease virus[J]. *RNA*, 2006, 12(11): 1970-1979.
- [27] Lu T F, Ma Q, Yan W Z, *et al.* Selection of an aptamer against Muscovy duck parvovirus for highly sensitive rapid visual detection by label-free aptasensor[J]. *Talanta*, 2018, 176: 214-220.
- [28] Punnarak P, Santos M D, Don Hwang S, *et al.* RNA aptamers inhibit the growth of the fish pathogen viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV)[J]. *Marine Biotechnology*, 2012, 14(6): 752-761.
- [29] Hwang S D, Midorikawa N, Punnarak P, *et al.* Inhibition of hiram rhabdovirus growth by RNA aptamers[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2012, 35(12): 927-934.
- [30] Li P F, Zhou L L, Yu Y P, *et al.* Characterization of DNA aptamers generated against the soft-shelled turtle iridovirus with antiviral effects[J]. *BMC Veterinary Research*, 2015, 11: 245.
- [31] Li P F, Yan Y, Wei S N, *et al.* Isolation and characterization of a new class of DNA aptamers specific binding to Singapore grouper iridovirus (SGIV) with antiviral activities[J]. *Virus Research*, 2014, 188: 146-154.
- [32] Zhou L L, Li P F, Yang M, *et al.* Generation and characterization of novel DNA aptamers against coat protein of grouper nervous necrosis virus (GNNV) with antiviral activities and delivery potential in grouper cells[J]. *Antiviral Research*, 2016, 129: 104-114.
- [33] 于力, 王津津, 卢奕良, 等. 鲤春病毒血症病毒核酸适配体的筛选及分析 [J]. *中国动物检疫*, 2017, 34(2): 101-105.
- Yu L, Wang J J, Lu Y L, *et al.* Selection and analysis on aptamers against spring viremia of carp virus[J]. *China Animal Health Inspection*, 2017, 34(2): 101-105 (in Chinese).
- [34] Liang H R, Fu X Z, Liu L H, *et al.* Inhibition of grass carp reovirus infection by DNA aptamers against S10 protein[J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2017, 29(2): 89-94.

- [35] Zhang X Y, Wang L Q, Liu J X, *et al.* Generation and identification of novel DNA aptamers with antiviral activities against largemouth bass virus (LMBV)[J]. *Aquaculture*, 2022, 547: 737478.
- [36] Zhang X Y, Zhang Z M, Li J R, *et al.* A novel sandwich ELISA based on aptamer for detection of largemouth bass virus (LMBV)[J]. *Viruses*, 2022, 14(5): 945.
- [37] Yoon S, Lee G, Han D, *et al.* Neutralization of infectivity of porcine circovirus type 2 (PCV2) by capsid-binding 2'F-RNA aptamers[J]. *Antiviral Research*, 2010, 88(1): 19-24.
- [38] 韩程程, 夏凯, 龚茹莹, 等. 适于检测非洲猪瘟病毒的点亮 Spinach-p54 rna 适配体的设计及应用 [J]. *遗传*, 2021, 43(12): 1170-1178.
- Han C C, Xia K, Gong R Y, *et al.* Design and application of lightening Spinach-p54 RNA aptamer to detect African swine fever virus[J]. *Hereditas (Beijing)*, 2021, 43(12): 1170-1178.
- [39] 程如楠, 孔梓安, 曹莉, 等. 牛冠状病毒 N 蛋白的原核表达及核酸适配体筛选 [J]. *北京农学院学报*, 2021, 36(1): 27-32.
- Cheng R N, Kong Z A, Cao L, *et al.* Prokaryotic expression and aptamer selection of N protein of bovine coronavirus[J]. *Journal of Beijing University of Agriculture*, 2021, 36(1): 27-32 (in Chinese).
- [40] Saccucci L, Crance J M, Colas P, *et al.* Inhibition of vaccinia virus replication by peptide aptamers[J]. *Antiviral Research*, 2009, 82(3): 134-140.
- [41] Wang P, Hatcher K L, Bartz J C, *et al.* Selection and characterization of DNA aptamers against PrP^{Sc}[J]. *Experimental Biology and Medicine*, 2011, 236(4): 466-476.
- [42] Peng Z H, Ling M, Ning Y, *et al.* Rapid fluorescent detection of *Escherichia coli* K88 based on DNA aptamer library as direct and specific reporter combined with immuno-magnetic separation[J]. *Journal of Fluorescence*, 2014, 24(4): 1159-1168.
- [43] Fu P, Sun Z H, Yu Z Q, *et al.* Enzyme linked aptamer assay: based on a competition format for sensitive detection of antibodies to *Mycoplasma bovis* in serum[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(3): 1701-1709.
- [44] Mozioglu E, Gokmen O, Tamerler C, *et al.* Selection of nucleic acid aptamers specific for *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2016, 178(4): 849-864.
- [45] 李敏思, 宋战昀, 冯新, 等. 新城疫病毒血凝素蛋白 RNA 适配体的筛选及活性研究 [J]. *中国兽医学报*, 2014, 34(3): 395-401.
- Li M S, Song Z Y, Feng X, *et al.* Selection and characterization of RNA aptamer against Newcastle disease virus hemagglutinin protein RNA aptamer[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2014, 34(3): 395-401 (in Chinese).
- [46] Marnissi B, Kamali-Moghaddam M, Ghram A, *et al.* Generation of ssDNA aptamers as diagnostic tool for Newcastle avian virus[J]. *PLoS One*, 2020, 15(8): e0237253.
- [47] Kim S H, Lee J, Lee B H, *et al.* Specific detection of avian influenza H5N2 whole virus particles on lateral flow strips using a pair of sandwich-type aptamers[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2019, 134: 123-129.
- [48] Nguyen V T, Seo H B, Kim B C, *et al.* Highly sensitive sandwich-type SPR based detection of whole H5Nx viruses using a pair of aptamers[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, 86: 293-300.
- [49] Wang R H, Zhao J J, Jiang T S, *et al.* Selection and characterization of DNA aptamers for use in detection of avian influenza virus H5N1[J]. *Journal of Virological Methods*, 2013, 189(2): 362-369.
- [50] Choi S K, Lee C, Lee K S, *et al.* DNA aptamers against the receptor binding region of hemagglutinin prevent avian influenza viral infection[J]. *Molecules and Cells*, 2011, 32(6): 527-533.
- [51] Zhang Y W, Yu Z Q, Jiang F, *et al.* Two DNA aptamers against avian influenza H9N2 virus prevent viral infection in cells[J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0123060.
- [52] Yu Q, Liu M Z, Li M M, *et al.* Generating aptamers for specific recognition against soft-shelled turtle iridovirus infection[J]. *Aquaculture*, 2021, 535: 736348.
- [53] Li P F, Wei S N, Zhou L L, *et al.* Selection and characterization of novel DNA aptamers specifically recognized by Singapore grouper iridovirus-infected fish cells[J]. *Journal of General Virology*, 2015, 96(11): 3348-3359.
- [54] 余庆, 刘明珠, 肖贺贺, 等. 特异性检测珍珠龙胆石斑鱼彩虹病毒病的核酸适配体的筛选与鉴定 [J]. *分析化学*, 2020, 48(5): 650-661.
- Yu Q, Liu M Z, Xiao H H, *et al.* Selection and character-

- ization of aptamers for specific detection of iridovirus disease in cultured hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *E. lanceolatus* ♂)[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2020, 48(5): 650-661 (in Chinese).
- [55] Yu Q, Liu M Z, Wei S N, *et al.* Characterization of ssDNA aptamers specifically directed against *Trachinotus ovatus* NNV (GTONNV)-infected cells with antiviral activities[J]. *Journal of General Virology*, 2019, 100(3): 380-391.
- [56] Zhou L L, Wang S W, Yu Q, *et al.* Characterization of novel aptamers specifically directed to red-spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV)-infected cells for mediating targeted siRNA delivery[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 660.
- [57] Yu Q, Liu M Z, Wu S T, *et al.* Generation and characterization of aptamers against grass carp reovirus infection for the development of rapid detection assay[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2021, 44(1): 33-44.
- [58] Yu Q, Li M M, Liu M Z, *et al.* Selection and characterization of ssDNA aptamers targeting largemouth bass virus infected cells with antiviral activities[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 785318.
- [59] 郑江, 郝聚敏, 宋林生, 等. 哈维氏弧菌适配子的 SELEX 筛选及其亲和特异性研究 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2014, 41(7): 704-711.
- Zheng J, Hao J M, Song L S, *et al.* Selection and characterization of aptamers against *Vibrio harveyi* by SELEX[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2014, 41(7): 704-711 (in Chinese).
- [60] Song S X, Wang X Y, Xu K, *et al.* Selection of highly specific aptamers to *Vibrio parahaemolyticus* using cell-SELEX powered by functionalized graphene oxide and rolling circle amplification[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2019, 1052: 153-162.
- [61] Devi S, Sharma N, Ahmed T, *et al.* Aptamer-based diagnostic and therapeutic approaches in animals: current potential and challenges[J]. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2021, 28(9): 5081-5093.
- [62] Niederlender S, Fontaine J J, Karadjian G. Potential applications of aptamers in veterinary science[J]. *Veterinary Research*, 2021, 52(1): 79.
- [63] 韩惠琴. 中草药治疗奶牛乳腺炎的效果研究 [J]. *畜牧兽医科学*, 2021(22): 10-11.
- Han H Q. Study on the effect of Chinese herbal medicine in the treatment of mastitis in dairy cows[J]. *Grazing Veterinary Sciences*, 2021(22): 10-11 (in Chinese).
- [64] 曹立亭, 黎春秀, 文露婷, 等. 奶牛结合珠蛋白核酸适配体的筛选及鉴定 [J]. *中国兽医学报*, 2016, 36(6): 1008-1014.
- Cao L T, Li C X, Wen L T, *et al.* Selecting and characterization of DNA aptamers against bovine haptoglobin[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2016, 36(6): 1008-1014 (in Chinese).
- [65] Xiao H H, Liu M Z, Li S Q, *et al.* Isolation and characterization of a ranavirus associated with disease outbreaks in cultured hybrid grouper (♀ tiger grouper *Epinephelus fuscoguttatus* × ♂ giant grouper *E. lanceolatus*) in Guangxi, China[J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2019, 31(4): 364-370.
- [66] Yu Q, Liu M Z, Wei S N, *et al.* Isolation of nervous necrosis virus from hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂) cultured in Guangxi, China[J]. *Fish Pathology*, 2019, 54(1): 16-19.
- [67] Liang H R, Li Y G, Zeng W W, *et al.* Pathogenicity and tissue distribution of grass carp reovirus after intraperitoneal administration[J]. *Virology Journal*, 2014, 11: 178.
- [68] 余庆, 刘明珠, 李梦梦, 等. 特异性识别草鱼呼肠孤病毒感染细胞的 ssDNA 核酸适配体筛选与鉴定 [J]. *南方农业学报*, 2020, 51(12): 3057-3065.
- Yu Q, Liu M Z, Li M M, *et al.* Selection and characterization of ssDNA aptamer specifically recognizing grass carp reovirus (GCRV) infected fish cells[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2020, 51(12): 3057-3065 (in Chinese).
- [69] Pashazadeh P, Mokhtarzadeh A, Hasanzadeh M, *et al.* Nano-materials for use in sensing of salmonella infections: recent advances[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2017, 87: 1050-1064.
- [70] 王凯, 殷涌光. SPR 生物传感器在食品安全领域的应用研究 [J]. *传感器与微系统*, 2007, 26(5): 12-14,17.
- Wang K, Yin Y G. Research on application of SPR biosensor in food safety rapid assay[J]. *Transducer and Microsystem Technologies*, 2007, 26(5): 12-14,17 (in Chinese).
- [71] Duan N, Wu S J, Yu Y, *et al.* A dual-color flow cytometry protocol for the simultaneous detection of *Vibrio*

- parahaemolyticus* and *Salmonella typhimurium* using aptamer conjugated quantum dots as labels[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2013, 804: 151-158.
- [72] 李鹏飞, 余庆, 李菲, 等. 基于新型核酸适配体-荧光分子检测探针的石斑鱼虹彩病毒病快速诊断 [J]. 广西科学, 2018, 25(1): 63-67.
- Li P F, Yu Q, Li F, *et al.* Establishment and characterization of novel specific aptamer-based fluorescent molecular probe for rapid diagnosis of grouper iridovirus diseases[J]. *Guangxi Sciences*, 2018, 25(1): 63-67 (in Chinese).
- [73] Sheng L L, Lu Y H, Deng S, *et al.* A transcription aptasensor: amplified, label-free and culture-independent detection of foodborne pathogens *via* light-up RNA aptamers[J]. *Chemical Communications*, 2019, 55(68): 10096-10099.
- [74] Gao S X, Hu B, Zheng X, *et al.* Gonyautoxin 1/4 aptamers with high-affinity and high-specificity: from efficient selection to aptasensor application[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, 79: 938-944.
- [75] Duan N, Xu B C, Wu S J, *et al.* Magnetic nanoparticles-based aptasensor using gold nanoparticles as colorimetric probes for the detection of *Salmonella typhimurium* [J]. *Analytical Sciences*, 2016, 32(4): 431-436.
- [76] Bai H, Wang R H, Hargis B, *et al.* A SPR aptasensor for detection of avian influenza virus H5N1[J]. *Sensors (Basel)*, 2012, 12(9): 12506-12518.
- [77] Duan N, Yan Y L, Wu S J, *et al.* *Vibrio parahaemolyticus* detection aptasensor using surface-enhanced Raman scattering[J]. *Food Control*, 2016, 63: 122-127.
- [78] Liu X G, Cheng Z Q, Fan H, *et al.* Electrochemical detection of avian influenza virus H5N1 gene sequence using a DNA aptamer immobilized onto a hybrid nanomaterial-modified electrode[J]. *Electrochimica Acta*, 2011, 56(18): 6266-6270.
- [79] Diba F S, Kim S, Lee H J. Amperometric bioaffinity sensing platform for avian influenza virus proteins with aptamer modified gold nanoparticles on carbon chips[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, 72: 355-361.
- [80] Zelada-Guillén G A, Sebastián-Avila J L, Blondeau P, *et al.* Label-free detection of *Staphylococcus aureus* in skin using real-time potentiometric biosensors based on carbon nanotubes and aptamers[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2012, 31(1): 226-232.
- [81] Wang R H, Li Y B. Hydrogel based QCM aptasensor for detection of avian influenza virus[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, 42: 148-155.
- [82] Toh S Y, Citartan M, Gopinath S C B, *et al.* Aptamers as a replacement for antibodies in enzyme-linked immunosorbent assay[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, 64: 392-403.
- [83] Yu Q, Liu M Z, Xiao H H, *et al.* Development of novel aptamer-based enzyme-linked apta-sorbent assay (ELASA) for rapid detection of mariculture pathogen *Vibrio alginolyticus*[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2019, 42(11): 1523-1529.
- [84] 朱冬琳, 余庆, 刘明珠, 等. 基于核酸适配体吸附检测技术的卵形鲳鲹源溶藻弧菌的快速检测 [J]. 广西科学学报, 2019, 35(3): 219-224.
- Zhu D L, Yu Q, Liu M Z, *et al.* Establishment and characterization of enzyme-linked apta-sorbent assay, (ELASA) for rapid diagnosis of *Vibrio alginolyticus* infection in cultured *Trachinotus ovatus*[J]. *Journal of Guangxi Academy of Sciences*, 2019, 35(3): 219-224 (in Chinese).
- [85] Zhang Y B, Dai J, Yang Y, *et al.* Lateral flow strip assay for detection of *Mycoplasma hyorhinis* based on a pair of sandwich-type aptamers[J]. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 2022, 18(1): 166-174.
- [86] Thiel W H, Bair T, Peek A S, *et al.* Rapid identification of cell-specific, internalizing RNA aptamers with bioinformatics analyses of a cell-based aptamer selection[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e43836.
- [87] Boomer R M, Lewis S D, Healy J M, *et al.* Conjugation to polyethylene glycol polymer promotes aptamer biodistribution to healthy and inflamed tissues[J]. *Oligonucleotides*, 2005, 15(3): 183-195.
- [88] Aminov R. Acquisition and spread of antimicrobial resistance: a *tet(X)* case study[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(8): 3905.
- [89] Kim T H, Lee S W. Aptamers for anti-viral therapeutics and diagnostics[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(8): 4168.
- [90] Yu Q, Li W, Liu M Z, *et al.* Aptamer-mediated targeted siRNA delivery against grouper iridovirus infection[J]. *Aquaculture*, 2021, 544: 737148.
- [91] Sinitsyna V V, Vetcher A A. Nucleic acid aptamers in nanotechnology[J]. *Biomedicine*, 2022, 10(5): 1079.

- [92] Panigaj M, Johnson M B, Ke W N, *et al.* Aptamers as modular components of therapeutic nucleic acid nanotechnology[J]. *ACS Nano*, 2019, 13(11): 12301-12321.
- [93] Zhou J H, Rossi J J. Cell-type-specific, aptamer-functionalized agents for targeted disease therapy[J]. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 2014, 3: e169.
- [94] Wang L J, Wang R H, Wei H, *et al.* Selection of aptamers against pathogenic bacteria and their diagnostics application[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2018, 34(10): 149.

Screening of aptamers and their application progress in the detection of pathogenic microorganisms in cultured animals

LI Pengfei^{1,2,3,4}, ZHANG Shuaishuai^{1,2}, LIU Mingzhu², HUANG Jing^{2*}, WANG Jian^{2,3},
ZHONG Minglan^{2,3}, OU Wuge^{2,3}, HE Qiongyu^{2,3}, WEI Hongling², YU Qing^{1,2*}

(1. School of Resources, Environment and Materials, Guangxi University, Nanning 530000, China;

2. Guangxi Engineering Research Center for Fishery Major Diseases Control and Efficient Healthy Breeding Industrial Technology (GERCFT), Guangxi Key Laboratory of Aquatic Biotechnology and Modern Ecological Aquaculture, Guangxi Academy of Marine Sciences, Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530007, China;

3. Guangxi Engineering Research Center for Important Fish Genetic Breeding and Ecological Fishery Industry Technology, Guangxi Bama Xinjian Industrial Group Co, Guangxi Yulin Xinjian Planting and Breeding Co, Ltd, Nanning 530000, China;

4. China-ASEAN Modern Fishery Industry Technology Transfer Demonstration Center, Beibu Gulf Marine Industrial Research Institute, Fangchenggang 536007, China)

Abstract: The outbreak of pathogens has not only caused huge losses, but also seriously hindered the healthy and sustainable development of the artificial breeding industry. Therefore, it is urgent to develop rapid detection technology and pathogen prevention and control technology for pathogens to prevent the outbreak of diseases. Aptamer is the functional single-stranded oligonucleotide with high affinity and specificity for specific targets and screening by systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX). Based on domestic and foreign research, this paper described the advantages of aptamers and their research progress in the prevention and control of pathogenic microorganisms in farmed animals, and focused on five challenges in the application of aptamers. (1) The limitations of aptamer screening technology. (2) The lack of stability and safety of aptamers in therapeutic applications. (3) The sustainability of aptamers in organisms with targeted therapeutic effects. (4) The need to improve the accuracy of aptamers *in vivo* experiments. (5) The possibility of cascading aptamers with other assays to build a comprehensive testing platform. At present, the research of aptamers on cultured animal pathogens has just started, and it has broad application prospects in rapid detection and targeted therapy.

Key words: cultured animal; pathogen detection technology; aptamer; systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX)

Corresponding authors: HUANG Jing. E-mail: huangqinglin1220@163.com;

YU Qing. E-mail: yu_qing1990@163.com

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (U20A20102); Natural Science Foundation of Guangxi (AD23026331, 2023GXNSFAA026325, 2022GXNSFBA035521, 2022JJA130281); National Key R&D Program (2022YFD2401200)