

论著·基础研究

结核分枝杆菌多聚磷酸盐激酶 2 核酸适配体的抗结核效果评价

杨 扬，李岱容，黎友伦，陈雨晗，万 秋，刘静姝

重庆医科大学附属第一医院呼吸与危重症医学科，重庆 400016

[摘要] 目的·探讨结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) 多聚磷酸盐激酶 2 (polyphosphate kinase 2, PPK2) 核酸适配体对体外 MTB 的抑菌效果。**方法·**运用生物信息学方法分析 MTB PPK2 与呼吸道部分常见病原菌的同源性，构建 PPK2 进化树。通过酶联寡核苷酸分析 (enzyme-linked oligonucleotide assay, ELONA) 测定 PPK2 核酸适配体与 MTB 标准株 H₃₇Rv、卡介苗 (BCG)、耻垢分枝杆菌、铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌的结合亲和力。将 PPK2 核酸适配体加入血清中孵育 24 h，运用琼脂糖凝胶电泳分析其在血清中的生物稳定性。采用微量刃天青显色法测定 PPK2 核酸适配体对 H₃₇Rv 的最低抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC)。将 H₃₇Rv 与 1 μmol/L 的 PPK2 核酸适配体在罗氏培养基上培养 10 d，观察菌落生长情况。运用酶标仪测定与不同浓度的 PPK2 核酸适配体共培养 10 d 后 H₃₇Rv 菌液的 D(600 nm) 值，观察 PPK2 核酸适配体对 H₃₇Rv 生长的影响。**结果·**生物信息学方法构建的 PPK2 进化树显示，H₃₇Rv 的 PPK2 蛋白与呼吸道部分常见病原菌亲缘性较远，与铜绿假单胞菌亲缘关系相对较近。ELONA 测定结果显示 PPK2 核酸适配体能与 H₃₇Rv 选择性结合。琼脂糖凝胶电泳分析显示 PPK2 核酸适配体在血清中至少稳定存在 8 h。PPK2 核酸适配体对 H₃₇Rv 的 MIC 为 50 nmol/L。罗氏培养基菌落生长结果显示 PPK2 适配体对 H₃₇Rv 生长具有抑制作用。生长抑制试验表明随着 PPK2 核酸适配体浓度增加，H₃₇Rv 的 D(600 nm) 呈现下降趋势，说明 PPK2 核酸适配体对 H₃₇Rv 生长存在抑制作用。**结论·**PPK2 核酸适配体对体外 H₃₇Rv 表现出良好的抑菌活性。

[关键词] 多聚磷酸盐激酶；核酸适配体；结核分枝杆菌；抑菌活性

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2018.01.007 **[中图分类号]** R378.91¹¹ **[文献标志码]** A

Evaluation of anti-tuberculosis effect of *Mycobacterium tuberculosis* polyphosphate kinase 2 aptamer

YANG Yang, LI Dai-rong, LI You-lun, CHEN Yu-han, WAN Qiu, LIU Jing-shu

Department of Respiratory and Critical Care Medicine, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

[Abstract] **Objective·** To investigate the bacteriostasis effect of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) polyphosphate kinase 2 (PPK2) aptamer on MTB *in vitro*. **Methods·** The bioinformatics method was used to analyze the homology of MTB PPK2 and common pathogens of respiratory tract, and the PPK2 phylogenetic tree was constructed. The binding affinity of the PPK2 aptamer to H₃₇Rv, BCG, *Mycobacterium smegmatis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* was analyzed by enzyme-linked oligonucleotide assay (ELONA). The PPK2 aptamer was incubated for 24 h in serum and its biological stability in serum was analyzed by agarose gel electrophoresis. The minimum inhibitory concentration (MIC) of the PPK2 aptamer to H₃₇Rv was determined by micro-azure method. H₃₇Rv was inoculated with 1 μmol/L PPK2 aptamer or random sequence on Roche culture medium for 10 d and colony growth status was observed. H₃₇Rv was co-cultured with different concentrations of PPK2 aptamer for 10 d, absorbance at 600 nm was measured by microplate reader. The effect of PPK2 aptamer on the growth of H₃₇Rv was observed. **Results·** PPK2 phylogenetic tree constructed by bioinformatics analysis showed that PPK2 protein of H₃₇Rv was not closely related to the common pathogens of respiratory tract, and it was relatively close to *Pseudomonas aeruginosa*. The ELONA assay results showed that the PPK2 aptamer binded selectively to H₃₇Rv. Agarose gel electrophoresis analysis showed PPK2 aptamer in serum was at least stable for 8 h. The MIC of the PPK2 aptamer to H₃₇Rv was 50 nmol/L. The colony growth of Roche culture showed that PPK2 aptamer had an inhibitory effect on H₃₇Rv growth. Growth inhibition test showed that the absorbance at 600 nm of H₃₇Rv showed a decreasing trend with the increase of PPK2 aptamer concentration, which indicated that PPK2 aptamer had an inhibitory effect on H₃₇Rv growth.

Conclusion· PPK2 aptamer has good antibacterial activity against H₃₇Rv *in vitro*.

[Key words] polyphosphate kinase; aptamer; *Mycobacterium tuberculosis*; antibacterial activity

结核病是由结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) 感染引起的，是导致全球高发病率和病死率的呼吸道感染的慢性传染病之一。世界卫生组织在《2016 年全球结核病报告》中指出：2015 年全球结核病有 1 040 万新发病例，

其中多耐药结核 (MDR-TB) 约占 4.6%，140 万病患死亡^[1]。因结核病药物治疗周期长、发病率逐年增加，以及 MDR-TB 的出现，迫切需要开发出高效、低毒的新抗结核药物^[2]。

为了实现这个目标，更多的研究倾向于以 MTB 生长

[基金项目] 国家自然科学基金 (81101216)；重庆市科学技术委员会资助项目 (cstc2016shmszx130029) (National Natural Science Foundation of China, 81101216; Project of Chongqing Science and Technology Commission, cstc2016shmszx130029)。

[作者简介] 杨 扬 (1992—)，女，硕士生；电子信箱：yangzi878019@163.com。

[通信作者] 黎友伦，电子信箱：liyoulun83@163.com。



必需的基因及产物为靶点开发新的药物，比如 gp120、HCV NS3、多聚磷酸盐激酶 2 (polyphosphate kinase 2, PPK2) 都是 MTB 的重要药物靶点^[3-5]。Sureka 等^[6]研究发现 PPK2 通过与 MTB 中的核苷二磷酸激酶 (nucleoside diphosphate kinase, NDK) 相互作用来调节 MTB 属细胞内 GTP 的合成，以确保细菌在生长中有连续和丰富的能量供应；研究还发现表达 PPK2 的基因点突变能够部分改变细胞内 GTP 的合成，表明 MTB 在机体内生存时 PPK2 能起到维持 MTB 存活的作用。

适配体 (aptamer, 或称“化学抗体”) 是一类利用体外筛选技术——指数富集的配体系统进化技术 (systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)，从核酸分子文库中得到的短链单核苷酸 (DNA 或 RNA，以 DNA 为主)，能高亲和力和高特异性地识别靶标^[7]。与蛋白质抗体相比，适配体容易合成，无体内免疫原性^[8-10]。当其与对应的靶蛋白的功能区域特异结合时，靶蛋白的功能将会受到抑制，从而影响细胞的生理过程，因此可以直接作为药物来治疗疾病^[11-12]。此外，适配体已被开发为有效的靶向药物递送系统，以减少或消除化学疗法的严重不良反应，并用作癌细胞、细菌、抗原等的分子识别探针^[13-16]。Shum 等^[8]筛选出 PPK2 蛋白的核酸适配体，并验证了其能与 MTB 的 PPK2 蛋白结合，从而抑制 PPK2 酶活性，而其突变体对 PPK2 酶活性没有影响。本实验旨在进一步探究 Shum 等筛选到的 PPK2 核酸适配体及其突变体对体外 H₃₇Rv 的抑菌活性。

1 材料与方法

1.1 菌株

耻垢分枝杆菌 mc2155 (CMCC 93202)、MTB 标准株 H₃₇Rv (CMCC 93004) 由重庆医科大学附属第一医院 P2 实验室保存；大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌由重庆医科大学病原生物学实验室保存。

1.2 主要试剂

7H9 干粉、罗氏培养基购自美国 BD 公司；琼脂糖购自天根生化科技（北京）有限公司；刃天青购自美国 Sigma 公司；PPK2 核酸适配体序列 (5'-AACACATAGGTT TGGTTAGGTTGGTGGTTGAATTA-3'，有或无 biotin 标记)、PPK2 突变体序列 (5'-AACACATAGCTTGTTAG GTTGGTTGGTGAATTA-3'，从 5' → 3' 端第 10 个碱基 G 突变为 C)、随机序列 (5'-AACNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTA-3') 均由生工生物工程（上海）股份有限公司合成；内源性生物素封闭液购自北京雷根生物技术有限公司；Streptavidin-HRP 购自生工生物工程

(上海) 股份有限公司；TMB 显色液、quickblock 封闭液 (PBS) 购自碧云天生物科技公司。

1.3 PPK2 蛋白的同源性分析及分子进化树构建

运用美国国家生物技术信息中心 (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 提供的蛋白数据库搜索得到 PPK2 蛋白的氨基酸序列 (NP_217749.1) 组成。将 H₃₇Rv 的 PPK2 序列与 NCBI 数据库中已知的氨基酸序列进行同源性分析，运用 DNAMAN 软件将其与耻垢分枝杆菌、卡介苗 (BCG)、鸟分枝杆菌、金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、大肠埃希菌、鲍曼不动杆菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌进行多重序列比对，结果应用 MEGA5 软件采用邻接法 (neighbor-joining, NJ) 和最大似然法 (maximum likelihood, ML) 构建进化树。如果 2 种不同方法所得到的进化树类似，则认为构建的进化树较可靠。

1.4 通过 ELONA 测定 PPK2 核酸适配体与 H₃₇Rv 结合亲和力

酶联寡核苷酸分析 (enzyme-linked oligonucleotide assay, ELONA) 操作步骤同酶联免疫吸附试验 (ELISA)，具体如下：①将 H₃₇Rv、BCG、耻垢分枝杆菌及铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌，用包被液稀释至 1 mg/mL，置于 65 ℃水浴 30 min；冷却至室温，加入过氧化氢、内源性链亲和素处理 30 min；洗涤 3 次，以去除过氧化物酶干扰；将处理后的菌液加入 96 孔板，每孔 100 μL，4 ℃过夜。②用封闭液封闭 30 min 后，将用包被液稀释的生物素标记的适配体 (适配体终浓度为 500 nmol/L，缓慢加热至 90 ℃处理 1 min，迅速降至 4 ℃) 加入 96 孔板，每孔 100 μL，室温孵育 1 h，洗涤 4 次，每次 10 min。③加入 Streptavidin-HRP (1:1000) 100 μL，室温孵育 2 h，洗涤 6 次，每次 10 min。④加入 TMB 显色液，观察 3 min，然后加终止液，运用酶标仪测定其 D (450 nm) 值。

1.5 测定 PPK2 核酸适配体在体外的生物稳定性

分别用含 20%、10%、5% 血清及不含血清的稀释液，将 PPK2 核酸适配体稀释至终浓度为 500 nmol/L，37 ℃孵育。分别于 0、2、4、8、24 h 取出，经 3% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定其在不同浓度血清中的生物稳定性。

1.6 微量刃天青显色法测定 PPK2 核酸适配体对 H₃₇Rv 的最低抑菌浓度

参照陈军等^[17]的刃天青显色法测定最低抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC)。步骤如下：①在



96孔板中每孔加7H9培养基100 μL; 第1孔加入PPK2适配体, 双倍连续稀释直至第9孔, 各孔适配体最终浓度分别为6.4、3.2、1.6、0.8、0.4、0.2、0.1、0.05、0.025 μmol/L。②取培养10 d的H₃₇Rv, 用含0.05%吐温80的生理盐水稀释至1 mg/mL, 再用培养基1:20倍稀释后, 第1~10孔每孔接种100 μL, 设置第11孔为阴性对照组(无菌加等量的培养基), 第10孔为阳性对照组(加菌株不加适配体), 混匀。③用无菌膜封板, 于37 ℃孵育到第6日, 在第10孔加除菌的0.01%刃天青30 μL, 继续孵育24 h; 如第10孔变成粉红色, 则在其他各孔加等量刃天青, 继续孵育24 h后记录颜色变化。如第10孔仍为蓝色, 则延长观察时间。颜色从蓝色变为粉色即提示细菌生长。以保持蓝色的最低药物浓度为MIC。

1.7 PPK2核酸适配体的抑菌活性实验

①罗氏培养基法: 将7H9肉汤培养的H₃₇Rv研磨成乳酪样, 采用麦氏比浊法测定浓度后, 10倍稀释至10² mg/mL, 设置PPK2适配体与H₃₇Rv组、随机序列与H₃₇Rv组、H₃₇Rv组, 使PPK2适配体、随机序列终浓度为1 μmol/L, 分别接种100 μL至罗氏培养基, 37 ℃孵育, 4周后观察结果。②液体培养法: 制备菌悬液同前, 加入96孔板, 每孔100 μL; 再加入等量稀释后的PPK2适配体、PPK2适配体突变体, 混匀, 使适配体终浓度为4、3.5、3、2.5、2、1.5、1、0.5 μmol/L。37 ℃孵育, 分别于第10日使用酶标仪测定D(600 nm)值。③将7H9肉汤培养的耻垢分枝杆菌和在普通琼脂培养基上培养的大肠埃希菌、金黄色葡萄

球菌稀释至10² mg/mL, 加入96孔板, 每孔100 μL, 加入等量PPK2适配体(终浓度3.5 μmol/L), 混匀。大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌组及耻垢分枝杆菌组分别于37 ℃孵育12、48 h, 测定其D(600 nm)值。

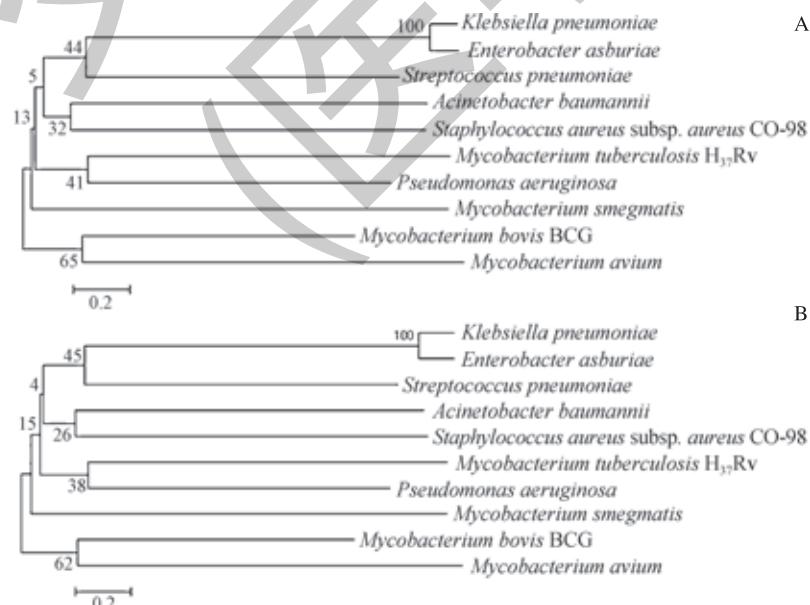
1.8 统计学方法

实验均在相同条件下设置3个平行组, 所需数据均通过SPSS 24统计软件分析。2组比较采用t检验, P<0.05认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 PPK2蛋白进化树构建

MTB是通过呼吸道感染而致病, 本实验选择呼吸道常见病原菌及部分常见分枝杆菌构建进化树, 从而推测MTB的PPK2蛋白在这些菌株中有无同源蛋白, 进一步得出PPK2核酸适配体能否与H₃₇Rv选择性结合。首先运用DNAMAN进行多重序列比对, 运用NJ法、ML法构建进化树, 得到2个类似的进化树, 说明进化树结果较可靠(图1)。进化树结果显示H₃₇Rv的PPK2蛋白与铜绿假单胞菌的PPK2蛋白亲缘关系相对较近, 与耻垢分枝杆菌、牛分枝杆菌、鸟分枝杆菌、金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、大肠埃希菌、鲍曼不动杆菌、肺炎克雷伯菌亲缘关系远。蛋白亲缘关系较近其结合选择性较高, 亲缘关系较远则结合选择性较低, 推测PPK2核酸适配体与H₃₇Rv的PPK2蛋白选择性结合, 从而影响H₃₇Rv的活性。



注: A. 邻接法; B. 最大似然法。

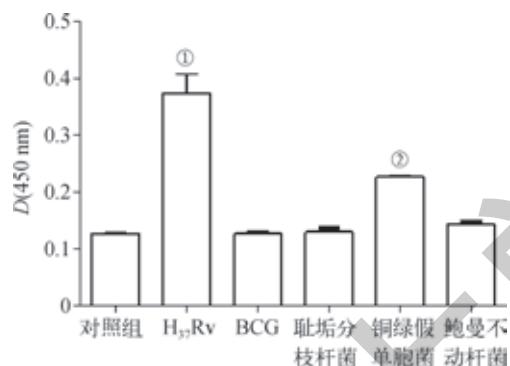
图1 PPK2蛋白进化树

Fig 1 PPK2 protein molecular phylogenetic tree



2.2 ELONA 测定 PPK2 核酸适配体与 $H_{37}Rv$ 的选择性结合

Shum 等^[5]验证了随着 PPK2 核酸适配体浓度增加, PPK2 酶活性逐渐降低。本实验使用 ELONA 方法来测定 PPK2 核酸适配体与 $H_{37}Rv$ 的选择性结合, 结果显示适配体 + $H_{37}Rv$ 组 $D(450 \text{ nm})$ 值相比 BCG、耻垢分枝杆菌、鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌、对照组高, 铜绿假单胞菌组 $D(450 \text{ nm})$ 高于除 $H_{37}Rv$ 组以外的其他组 (图 2)。结果经统计分析, $H_{37}Rv$ 、铜绿假单胞菌组与对照组差异具有统计学意义 (均 $P<0.05$), $H_{37}Rv$ 组与铜绿假单胞菌组亦有显著性差异 ($P=0.015$), 在检测的菌种内 $H_{37}Rv$ 表现出最高的亲和力。

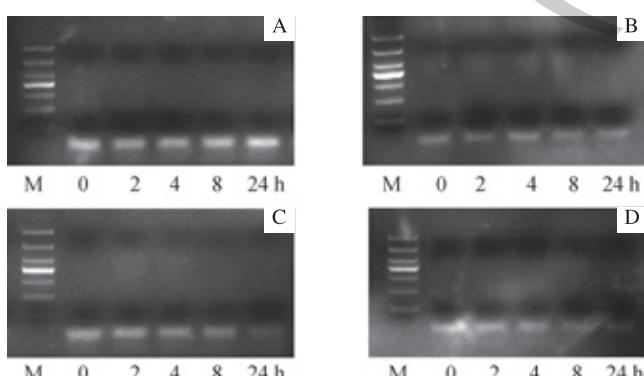


注: ^① $P=0.002$, ^② $P=0.000$, 与对照组比较。

图 2 酶联寡核苷酸分析测定 PPK2 核酸适配体与几种常见菌株的亲和力
Fig 2 Affinity of PPK2 aptamer and several common bacterial strains detected by ELONA

2.3 PPK2 核酸适配体的生物稳定性

观察 PPK2 核酸适配体在不同浓度血清中的生物稳定性, 将 PPK2 核酸适配体溶入含 20%、10%、5% 血清及无血清的稀释液中, 经 3% 琼脂糖凝胶电泳分析, 结果 0、2、4、8 h 可见唯一清晰的特异性条带, 在 24 h 见条带出现弥散现象 (图 3)。表明 PPK2 核酸适配体在不同浓度血清中能稳定存在至少 8 h。



注: A. 无血清; B. 5% 血清; C. 10% 血清; D. 20% 血清。

图 3 PPK2 适配体在血清中的生物稳定性
Fig 3 Biological stability of PPK2 aptamer in serum

2.4 PPK2 核酸适配体抑菌活性

微量刃天青显色法测定 PPK2 核酸适配体对 $H_{37}Rv$ 的 MIC 值为 50 nmoL/L (图 4)。

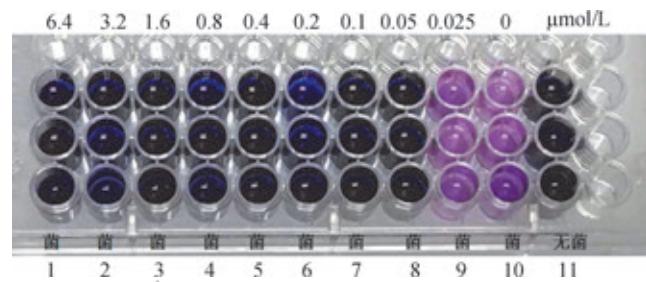
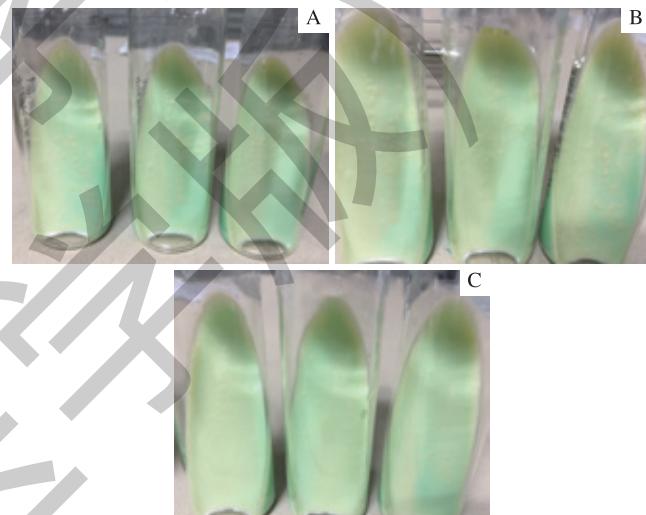


图 4 PPK2 核酸适配体对 $H_{37}Rv$ 的最低抑菌浓度

Fig 4 Minimal inhibitory concentration (MIC) of PPK2 aptamer to $H_{37}Rv$

罗氏培养基菌落生长情况见图 5。结果显示 PPK2 适配体组培养基斜面无肉眼可见的 $H_{37}Rv$ 生长, 随机序列组与对照组均有菌落生长, 说明 PPK2 适配体对 $H_{37}Rv$ 生长具有抑制作用。



注: A. $H_{37}Rv$ 组; B. $H_{37}Rv$ 组 + 随机序列组; C. $H_{37}Rv$ 组 + PPK2 核酸适配体组。

图 5 $H_{37}Rv$ 的罗氏培养结果

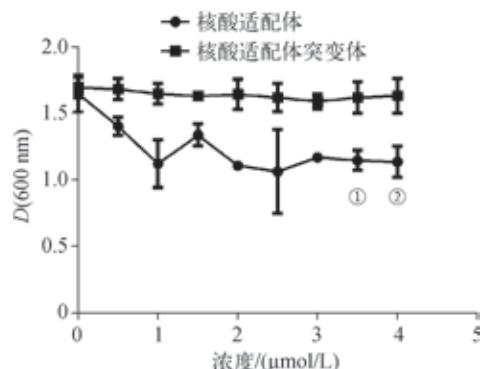
Fig 5 Roche culture of $H_{37}Rv$

7H9 液体培养细菌生长情况见图 6。运用酶标仪测定不同浓度 PPK2 核酸适配体及其突变体与 $H_{37}Rv$ 共培养 10 d 后, 菌液的 $D(600 \text{ nm})$ 值。结果显示, 随着 PPK2 适配体浓度增加, $H_{37}Rv$ 的 $D(600 \text{ nm})$ 值呈现降低趋势, 与对照组相比有显著性差异 (均 $P<0.05$), 表明 PPK2 核酸适配体对 $H_{37}Rv$ 生长具有抑制作用, 而其突变体则无此种作用。

3.5 $\mu\text{mol/L}$ PPK2 核酸适配体对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、耻垢分枝杆菌的抑菌活性见图 7。结果显示, 大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、耻垢分枝杆菌组与各自对照组的 $D(600 \text{ nm})$ 值无明显差异, 而 $H_{37}Rv$ 组与其对

照组有明显差异 ($P=0.035$)，表明 PPK2 核酸适配体对 $H_{37}Rv$ 表现出良好的抑菌活性，而对大肠埃希菌、金黄色

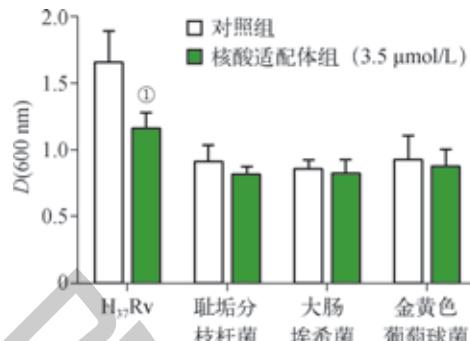
葡萄球菌、耻垢分枝杆菌的抑菌效果不明显。



注：^① $P=0.040$ ，^② $P=0.034$ ，与核酸适配体突变体组比较。

图 6 不同浓度 PPK2 核酸适配体对 $H_{37}Rv$ 的抑制活性

Fig 6 Inhibition activity of PPK2 aptamer on $H_{37}Rv$ at different concentrations



注：^① $P=0.035$ ，与相对照组比较。

图 7 PPK2 核酸适配体的抑菌活性

Fig 7 Antibacterial activity of PPK2 aptamer

3 讨论

由于核酸适配体与其靶标具有特异的结合力，并能抑制靶标的功能，使其已成功地应用于不同的生物技术领域，如生物标志物的发现、癌细胞检测、新药开发、药物运输、疾病诊断和治疗^[18]。2004 年底，第一个核酸适配体药物“Macugen”用于治疗老年黄斑变性，经美国食品药品监督管理局（FDA）批准上市，至此核酸适配体在治疗方面的应用取得突破性进展。目前，国内外已经成功筛选到多种 MTB 适配体，其中 MPT64、CFP-10、ESAT-6、ZXL1、AHAS、ManLAM、EsxG 被报道用于体外抗结核研究^[19-24]。本研究选用 PPK2 核酸适配体用于抗结核实验，原因是 MTB 的 PPK2 蛋白的活性形式是八聚体，其主要的功能是利用 polyP 合成核苷三磷酸，因为其催化 polyP 转换为 ATP 的反应速率是其合成 polyP 速率的 838 倍^[5]。已有研究表明多聚磷酸盐激酶是小鼠肺 MTB 生长所必需的，其在某种程度上可抑制某些关键因子（如肺巨噬细胞趋化因子）的表达；并且 PPK2 基因的表达下调能够降低 MTB 在巨噬细胞中的存活能力，而抑制 PPK2 的活性可降低多聚磷酸盐激酶对致病菌的依赖，进而抑制 MTB 的生长活性^[5, 25]。

本实验选用 PPK2 核酸适配体用于抗结核效果研究。为了明确 PPK2 适配体是否能够与 $H_{37}Rv$ 特异性结合，我们构建了 PPK2 进化树，结果显示 $H_{37}Rv$ 与铜绿假单胞菌的 PPK2 蛋白亲缘关系稍近，与已有研究在铜绿假单胞菌基因组的 BLAST 查询结果吻合^[26]。进一步通过 ELONA 实验证明 PPK2 适配体能与 $H_{37}Rv$ 的 PPK2 蛋白选择性结合。生物稳定性实验显示 PPK2 适配体在不同浓度的血清中至少稳定存在 8 h，表明 PPK2 适配体在血清中能保持较好的稳定性。微量刃天青法测定适配体对 $H_{37}Rv$ 的 MIC 为 50 $\mu\text{mol/L}$ 。罗氏培养结果显示 PPK2 适配体对 $H_{37}Rv$ 生长存在抑制作用；进一步使用不同浓度 PPK2 适配体与 $H_{37}Rv$ 共培养 10 d，结果显示在一定浓度范围内随着适配体浓度增加，MTB 生长活性降低，表明 PPK2 核酸适配体对液体培养的 $H_{37}Rv$ 也有较好的抑菌活性。PPK2 核酸适配体对体外 $H_{37}Rv$ 有明显的抑制作用，有望作为治疗结核病的新药物。而 Chuang 等^[25] 研究表明 PPK2 对于调节细胞内重要的调控分子和保持一线抗结核药物异烟肼在细胞内的敏感性是必需的，故后期实验拟将考虑 PPK2 核酸适配体联用异烟肼对耐药结核生长活性的影响。但本实验中使用菌株数少，而且仅为体外实验，结论有待体内研究进一步证实和明确。



参·考·文·献

- [1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2016 [M]. Geneva: WHO Library, 2016. <http://www.who.int/tb/en/>.
- [2] Ducati RG, Bassi LA, Santos DS. Mycobacterial shikimate pathway enzymes as targets for drug design[J]. Curr Drug Targets, 2007, 8(3): 423-435.
- [3] Zhou J, Swiderski P, Li H, et al. Selection, characterization and application of new RNA HIV gp 120 aptamers for facile delivery of Dicer substrate siRNAs into HIV infected cells[J]. Nucleic Acids Res, 2009, 37(9): 3094-3109.
- [4] Trahantherts A, Gal-Tanay M, Zemel R, et al. Inhibition of hepatitis C virus RNA replicons by peptide aptamers[J]. Antiviral Res, 2008, 77(3): 195-205.
- [5] Shum KT, Lui EL, Wong SC, et al. Aptamer-mediated inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* polyphosphate kinase 2[J]. Biochemistry, 2011, 50(15): 3261-3271.
- [6] Sureka K, Sanyal S, Basu J, et al. Polyphosphate kinase 2: a modulator of nucleoside diphosphate kinase activity in mycobacteria[J]. Mol Microbiol, 2009, 74(5): 1187-1197.
- [7] Parekh P, Tang Z, Turner PC, et al. Aptamers recognizing glycosylated hemagglutinin expressed on the surface of vaccinia virus-infected cells[J]. Anal Chem, 2010, 82(20): 8642-8649.
- [8] Sundaram P, Kurniawan H, Byrne ME, et al. Therapeutic RNA aptamers in clinical trials[J]. European J Pharm Sci, 2013, 48(1-2): 259-271.
- [9] Ireson CR, Kelland LR. Discovery and development of anticancer aptamers[J]. Mol Cancer Ther, 2006, 5(12): 2957-2962.
- [10] Song KM, Lee S, Ban C. Aptamers and their biological applications[J]. Sensors, 2012, 12(1): 612-631.
- [11] Prosko D, Blank M, Buhmann R, et al. Aptamers—basic research, drug development, and clinical applications[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2005, 69(4): 367-374.
- [12] Pan Y, Guo M, Nie Z, et al. Selective collection and detection of leukemia cells on a magnet-quartz crystal microbalance system using aptamer-conjugated magnetic beads[J]. Biosens Bioelectron, 2010, 25(7): 1609-1614.
- [13] Wen J, Tao W, Hao S, et al. A unique aptamer-drug conjugate for targeted therapy of multiple myeloma[J]. Leukemia, 2016, 30(4): 987-991.
- [14] Nimjee SM, White RR, Becker RC, et al. Aptamers as therapeutics[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2017, 57(1): 61-79.
- [15] Gross S, Piwnica-Worms D. Molecular imaging strategies for drug discovery and development[J]. Curr Opin Chem Biol, 2006, 10(4): 334-342.
- [16] Hong H, Goel S, Zhang Y, et al. Molecular imaging with nucleic acid aptamers[J]. Curr Med Chem, 2011, 18(27): 4195-4205.
- [17] 陈军, 陈志飞, 饶有益, 等. 微量刃天青显色法快速测定结核分枝杆菌 MIC 及菌型鉴定 [J]. 临床检验杂志, 2011, 29(3): 174-175.
- [18] Nimjee SM, Rusconi CP, Harrington RA, et al. The potential of aptamers as anticoagulants[J]. Trends Cardiovasc Med, 2005, 15(1): 41-45.
- [19] Qin L, Zheng R, Ma Z, et al. The selection and application of ssDNA aptamers against MPT64 protein in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Clin Chem Lab Med, 2009, 47(4): 405-411.
- [20] Tang XL, Zhou YX, Wu SM, et al. CFP10 and ESAT6 aptamers as effective *Mycobacterial* antigen diagnostic reagents[J]. J Infect, 2014, 69(6): 569-580.
- [21] Pan Q, Wang Q, Sun X, et al. Aptamer against mannose-capped lipoarabinomannan inhibits virulent *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice and rhesus monkeys[J]. Mol Ther, 2014, 22(5): 940-951.
- [22] Baig IA, Moon JY, Lee SC, et al. Development of ssDNA aptamers as potent inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* acetohydroxyacid synthase[J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1854(10 Pt A): 1338-1350.
- [23] Tang XL, Wu SM, Xie Y, et al. Generation and application of ssDNA aptamers against glycolipid antigen ManLAM of *Mycobacterium tuberculosis* for TB diagnosis[J]. J Infect, 2016, 72(5): 573-586.
- [24] Ngubane NA, Gresh L, Pym A, et al. Selection of RNA aptamers against the *M. tuberculosis* EsxG protein using surface plasmon resonance-based SELEX[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 449(1): 114-119.
- [25] Chuang YM, Belchis DA, Karakousis PC. The polyphosphate kinase gene *ppk2* is required for *Mycobacterium tuberculosis* inorganic polyphosphate regulation and virulence[J]. MBio, 2013, 4(3): e00039-13.
- [26] Nocet B, Kochinyan S, Proudfoot M, et al. Polyphosphate-dependent synthesis of ATP and ADP by the family-2 polyphosphate kinases in bacteria[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(46): 17730-17735.

[收稿日期] 2017-08-30

[本文编辑] 邵碧云

