

## 인산화 형태의 아미노산들에 대한 엡타머의 개발과 특성연구

<sup>1</sup>조수형 · † <sup>1,2</sup>김병기

<sup>1</sup>서울대학교 생물화학공학 협동과정, <sup>2</sup>서울대학교 화학생물공학부

(접수 : 2004. 12. 26., 게재승인 : 2005. 4. 23.)

## Development and Characterization of RNA Aptamers for Phosphorylated Amino Acids

Suhyung Cho<sup>1</sup> and Byung-Gee Kim<sup>1,2†</sup>

<sup>1</sup>Interdisciplinary Program for Biochemical Engineering and Biotechnology

<sup>2</sup>School of Chemical and Biological Engineering, Seoul National University, Seoul 151-747, Korea

(Received : 2004. 12. 26., Accepted : 2005. 4. 23.)

Phosphorylation of amino acid residues in proteins, plays a major role in biological mechanism. Phosphorylation acts as a process regulating the protein activity in variable pathways such as metabolism, signal transduction and cell division. Therefore the development of ligands for phosphoamino acids are an important work for protein analysis and proteomics studies.

In this study, RNA aptamers for o-phosphoserine, o-phosphothreonine and o-phosphotyrosine which appears frequently in nature were developed by in vitro evolution method. We could obtain similar sequences from random RNAs of 40 mer by SELEX method through 10 cycles. As result, the aptamers for o-phosphoserine and o-phosphothreonine among phosphoamino acids aptamers showed high affinity of  $K_d = 2.60$  nM and 2.65 nM for their target molecules, respectively. In addition, these aptamers could be confirmed the high selectivity for their target.

**Key Words** : Phosphorylation, phosphoamino acids, aptamer, SELEX

### 서론

단백질의 인산화 (phosphorylation) 과정은 번역 후 과정 (post-translational modification) 중의 하나로서 대부분 단백질의 생물학적 활성을 조절하는 메커니즘에 관여하고 있다. 또한 이는 호르몬, 신경전달물질과 효소들의 기능에 매우 중요한 역할을 하고 있으며 이는 진핵생물 (eukaryotes)에서 많이 발견된다. 단백질의 인산화는 아미노산 중에 특히 serine, threonine, tyrosine에서 일반적으로 발생되며 이중 serine, threonine의 경우 tyrosine의 경우에 비해 비교적 빈번히 발생되며, 척추동물 (vertebrates)의 경우 phosphoserine : phosphothreonine : phosphotyrosine의 비가 1800 : 1200 : 1 정도로 알려져 있다(1).

이와 같이 인산화 과정이 대부분의 진핵생물에서 생물학적으로 중요한 반응에 연관되어 있고 그 중요도가 매우 높기

때문에 인산화 단백질에 대한 분석이 매우 오랫동안 연구되어 왔고 현재에도 활발히 연구가 진행되고 있다. 지금까지 인산화 단백질 또는 펩타이드를 분석하기 위한 리간드 물질로 일반적으로 항체가 사용되어 왔으나 지금까지 사용되고 있는 항체의 경우에는 o-phosphoserine과 o-phosphothreonine의 구조가 비슷하기 때문에 이를 뚜렷이 구별할 수 있는 항체가 아직까지 개발되어 있지 않고 이 두 가지에 대해 모두 친화력을 가지고 있거나 o-phosphoserine의 경우에만 친화력을 가지고 있는 것이 대부분이다. 또한 항체를 생산할 때에 저분자에 대해서는 항체가 생성되지 않기 때문에 BSA와 같은 고분자에 저분자를 표지하여 제조됨으로 저분자에 대한 친화도 (affinity)와 선택성 (specificity)은 매우 낮은 편이다. 최근 들어 항체에 대한 대안으로 combinatorial biochemistry 개념을 통한 엡타머가 개발되었다(2, 3). 엡타머는 저분자인  $Zn^{2+}$ (4), ATP(5, 6), organic dyes(3), neutral disaccharides(7), aminoglycoside antibiotics(8), dopamine(9), biotin(10)으로부터 oligopeptides(11), CD4(12)와 같은 고분자에 이르기까지 목적 물질에 구애없이 발굴이 가능하다. 특히 아미노산과 같은 저분자에 대한 리간드에 대한 항체의 수용 능력이 부족하고 있는 실정에서 이를 극복하기 위해 본 연구에서는 보다 더 높은 친화력과 선

† Corresponding Author : School of Chemical and Biological Engineering, Seoul National University, Seoul 151-747, Korea

Tel : +82-2-880-6774, Fax : +82-2-883-6020,

E-mail : byungkim@snu.ac.kr

택성을 가지는 리간드를 만들기 위해 RNA 리간드인 앵타머 (aptamer)의 제조를 시도하였고, 그 중 인산화 아미노산에 대해서 개발을 시작하였다. 앵타머는 SELEX method(Fig. 1)(2)에 의해 *in vitro*로 쉽게 발굴될 수 있다. 또한 DNA, RNA로 이루어져 있는 뉴클레오티드 앵타머는 단백질인 항체보다 실온에서 더욱 더 안정하고 쉽게 합성이 가능하여 쉽게 사용이 가능하다는 장점을 가지고 있다. 또한 특정 부위의 변형 (modification)이 가능하므로 말단에 형광 물질이나 biotin, 또는 amination과 같은 수식이 용의하여 표면이나 비드에 고정화가 가능하므로 바이오 칩을 이용한 진단 및 감지기술에 응용이 가능하다. 또한 원하는 위치에 화학적 합성 (chemical synthesis) 방법으로 형광이나 다양한 기능기들의 도입이 가능하다. 또한 앵타머는 비선택적 흡착 (nonspecific binding)이 항체에 비해 적어서 목적 물질에 대한 선택성이 높다(13, 14).

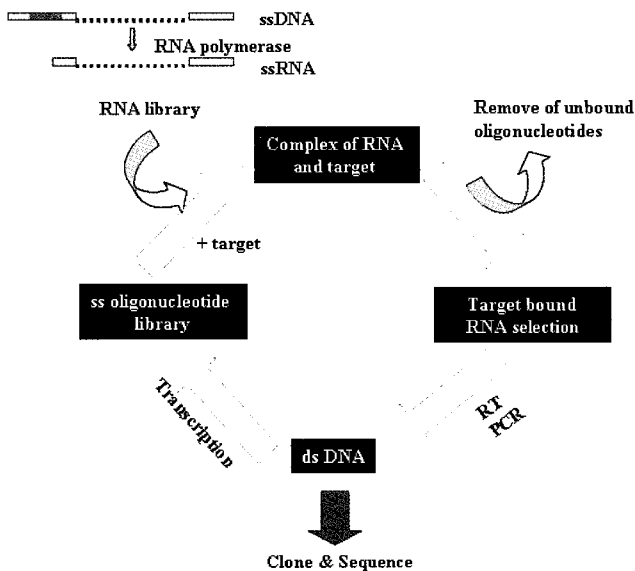


Figure 1. The aptamer selection method by *in vitro* selection.

본 연구에서는 SELEX 방법에 의해 10번의 반복 과정을 통하여 o-phosphoserine, o-phosphothreonine, o-phosphotyrosine (Fig. 2)에 대한 RNA 앵타머를 개발하였다. 개발한 앵타머 중 o-phosphoserine, o-phospho-threonine의 경우에는 매우 높은 친화도와 특이성을 확인하였다.

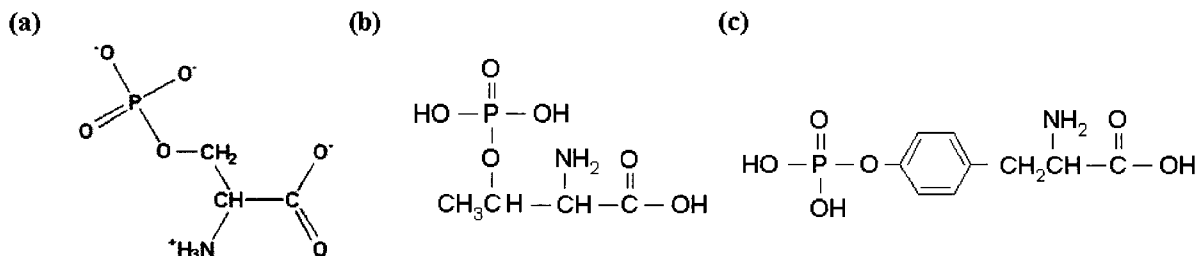


Figure 2. The phosphoamino acids (a) o-phosphoserine, (b) o-phosphothreonine and (c) o-phosphotyrosine.

## 재료 및 방법

### 실험재료

Terminal transferase, RNase inhibitor, fluorescein-12-dUTP는 Roche (Mannheim, Germany)에서, SPR 실험에 사용된 CM5 sensor chip은 Biacore (Uppsala, Sweden)에서 구입하였다. Phosphoserine, phosphothreonine, phosphotyrosine에 의해 수식된 agarose 비드와 epoxy 수식된 비드, 또한 N-hydroxysuccinimide (NHS)와 N-ethyl-N'-(dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC)는 sigma-aldrich (St. Louis, MO)에서 구입하였다. 또한 초기 앵타머 DNA library는 Integrated DNA Technologies Inc. (Coralville, LA)로부터, DNA primer는 코스모진텍㈜ (Seoul, Korea)에서 생성되었다.

### 앵타머의 개발

o-phosphoamino acids에 대한 앵타머를 개발하기 위해 bead에 target을 고정하여 target에 비선택적으로 붙는 RNA를 제거하는 negative selection과 이후 선택적으로 붙은 RNA를 정제하여 얻어내는 positive selection 과정으로 수행하였다(15). 우선 중간 40 mer를 N으로 두고 N 영역은 A, T, G, C를 동량으로 합성하였다. 양 옆은 *in vitro* transcription을 위한 T7 프로모터 영역과 cloning 및 sequencing을 위한 제한 효소의 자리로 고정하여 디자인하였다. 이 library의 순서는 5'-GCGGAAGCGTGCTGGGCCN<sub>40</sub>CATAACCCAGAGGTCGAT-3'이었고, 각각의 5'와 3' primer는 5'-GGGGGAATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAGCGGAAGCGTGCTGGG-3'와 5'-GGGGGGATCCATCGACCTCTGGGTTAT G-3'였다. 각각 PCR하여 증폭된 DNA library는 *in vitro* transcription에 의해 RNA library로 전사되었고, 페놀, 에탄올 침전법과 8 M urea 6% PAGE에 의해 정제되었다.

사용된 모든 RNA library는 RNA 구조를 만들기 위해 반응 buffer (25 mM Tris-HCl (pH 7.6), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>)에 녹인 후 80°C에서 열을 가한 후 상온에서 10분 동안 방치하였다. 이 중 20 µg RNA library를 취하여 agarose bead와 비선택적으로 친화성을 가지는 RNA를 제거하기 위해 30분 동안 agarose bead와 미리 반응시켰다. 반응 후 상등액에 남아있는 RNA들을 취하여 미리 buffer에 불려둔 (swelling) 200 nmol의 o-phosphoserine, o-phosphothreonine, o-phosphotyrosine이 수식된 비드와 상온에서 30분동안 반응하였다. 후에 5번의 0.6 ml의 buffer로 washing 후 비드에 붙어 있는 극미량의 RNA만을 phenol extraction에 의해 정제하여, RT-PCR 과정을 통해 DNA library로 만들었다. SELEX

과정의 5번 과정 후에는 더욱 더 강한 결합력을 가지는 RNA를 취하기 위해 비드의 양을 1/4배로 줄임으로 더욱 엄격한 (stringent) 조건을 부과하였다. 10번의 SELEX 과정이 끝난 후 증폭된 DNA library는 pUG19 vector에 cloning되었고, 이 중 20개의 clone을 선택하여 sequencing하였으며 이들 중 유사한 sequence를 찾기 위해 40개의 random 영역들을 서로 multiple alignments를 통해 비교하였다.

### Surface plasmon resonance (SPR)에 의한 앵타머의 친화도 분석

CM5 센서 칩에 o-phosphoserine, o-phosphothreonine, o-phosphotyrosine을 고정화하기 위해 우선 10mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 2.7 mM KCl, 50mM N-hydroxysuccinimide (NHS)와 200 mM의 N-ethyl-N'-(dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC)로 활성화시켰다. phosphoamino acids 각각의 고정화를 위해 각 시료는 10 mM sodium acetate buffer (pH 4.0)에 녹여서 반응 시키고, signal base line이 활성 전보다 증가함을 확인하였다. 잔여 활성 잔기를 제거하기 위해 1 M ethanol amine으로 반응시켜 더 이상 base line의 변화가 없을 때까지 반응시켰다. RNA는 반응시키기 전 미리 80°C에서 heating 후 상온에서 방치하여 구조를 이루게 하고, 다양한 농도의 RNA library를 flow cell에 주입시킨 후 반응 후 시그널을 확인한다. 다시 칩으로부터 RNA를 제거하기 위해 0.125 mM NaCl and 6.25 mM NaOH를 주입하여 base line이 완전히 초기와 같아질 때까지 흘려준다.

### 다중 초점 현미경을 통한 앵타머 측정

비드 위 형광 수식된 RNA 앵타머를 감지하기 위해, 각 앵타머를 형광으로 labeling하여 sephadex-G25 column chromatography (Pharmacia, USA)을 통해 반응하지 않은 형광 dye를 정제한 후 분리된 RNA 앵타머를 반응 buffer에서 녹여 heating과 상온에서 방치 후 구조를 만든다. 각각 20 pmol의 RNA aptamer를 상온에서 o-phosphoserine bead, o-phosphothreonine bead, o-phosphotyrosine bead, agarose beads와 5분간 반응을 시키고, 5번 washing 후 각각의 비드를 다중 초점 현미경으로 관찰하였다. 비드 3  $\mu$ l를 취하여 slide glass 위에 올린 후 건조시켜 krypton/argon laser의 laser-scanning confocal microscopy (Biorad MRC1024, Bio-Rad Laboratories Inc., California, USA)로 488 nm의 excitation으로 같은 intensity에서 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 인산화형태의 아미노산들에 대한 앵타머의 발굴

o-phosphoserine, o-phosphothreonine과 o-phosphotyrosine에 대한 aptamer가 random 40 mer의 영역을 포함해 총 82 mer library로부터 *in vitro* selection에 의해 10번의 반복 과정을 거쳐 발굴되었다. 최종 얻은 RNA aptamer는 RT-PCR 후 DNA로 역전사 시키고, 얻어낸 양쪽에 제한효소자리를 가지고 있는 DNA library는 양쪽모두 제한 효소로 double cutting 후 pUG19 벡터에 cloning하였고, 이 중 20개를 선택

하여 DH5 $\alpha$  competent 세포에 transformation하여 각각을 배양한 후 각각 DNA를 정제하여 각각을 sequencing하였다. 이들 앵타머 random 영역의 40 mer들을 선택하여 ClustalW(16)에 의한 multiple alignment를 통해 유사성을 비교하였는데 각각 4개 정도의 유사한 group으로 나누는 것을 관찰하였고 이들 중 가장 높은 conserved sequence를 가지고 있는 sequence들을 각각 group으로부터 선택하였다 (Table 1). o-phosphoserine과 o-phosphothreonine의 경우 거의 50 mer 이상의 sequence들을 발견할 수 있었으나, o-phosphotyrosine의 경우 13 mer 정도의 짧은 길이의 aptamer들이 selection되었다. *In vitro* selection 과정 중 생기는 mutation 인하여 다양한 길이의 앵타머 library가 생성됨으로 RNA library의 종류가 증대되는 현상이 자주 일어난다. 그러나 o-phosphotyrosine의 경우에는 내부적으로 구조를 이루기 힘든 형태의 짧은 RNA가 생성됨으로 앵타머로 사용하기가 어려울 것으로 보인다. 이는 hydrophobic한 tyrosine 잔여기의 영향으로 인한 용해도의 저해로 selection이 어려워진 것으로 판단된다.

Table 1. The selected aptamers for phosphoamino acids

SeA <sup>a</sup> -06	TAACACGGGTGGAAGTCTATCGCAACTCAATAATAAACT
SeA-09	AATCCGACTTTTGACCGCACGCCACCATTCATTATCATA
SeA-12	GTACATGTTTTGACTCTGATAACTCACCCAAATACAAT
SeA-17	TGACTGACTTTGGGCATAACATAGAAAATCTGCGACAAGGA
TrA <sup>b</sup> -04	TGCGAAGCCCTAAGCATTGTCTCCGACACTG
TrA-05	TCTACGTGAATGATAGAATNAGATAAGGAAGCAACGCCA
TrA-12	TGCATATGGTAACGGCTTACCCTGTCTATGAAATGGTGT
TrA-18	TACAGGGAAAACAGTACAGGTGAATAATG
TyA <sup>c</sup> -02	GAGTTAGTAAGTTAAGA
TyA-10	AGTGTGGAAGTTG
TyA-14	TTTACGAGTAACA
TyA-18	TAGAAGGGAAATCCTAGCCCTGAATTAGAGTTGAGTTC

a) SeA, o-phosphoserine aptamer; b) TrA, o-phosphothreonine aptamer; c) TyA, o-phosphotyrosine aptamer

Table 2. The kinetic constants of aptamer candidates for o-phosphoserine and o-phosphothreonine

Clone name	$k_{on}[M^{-1}s^{-1}]^a)$	$k_{off}[s^{-1}]^b)$	$K_D[M]^c)$
SeA-06	$4.6 \cdot 10^5$	$1.2 \cdot 10^{-3}$	$2.6 \cdot 10^{-9}$
SeA-09	$0.5 \cdot 10^5$	$5.1 \cdot 10^{-3}$	$100.0 \cdot 10^{-9}$
SeA-12	$2.2 \cdot 10^5$	$9.2 \cdot 10^{-4}$	$4.2 \cdot 10^{-9}$
SeA-17	$4.6 \cdot 10^5$	$9.8 \cdot 10^{-3}$	$21.0 \cdot 10^{-9}$
TrA-04	$2.4 \cdot 10^4$	$2.9 \cdot 10^{-4}$	$12.1 \cdot 10^{-9}$
TrA-05	$1.0 \cdot 10^5$	$2.3 \cdot 10^{-3}$	$23.0 \cdot 10^{-9}$
TrA-12	$9.6 \cdot 10^5$	$6.1 \cdot 10^{-3}$	$6.4 \cdot 10^{-9}$
TrA-18	$10.4 \cdot 10^5$	$2.8 \cdot 10^{-3}$	$2.7 \cdot 10^{-9}$

a)  $k_{on}$ , association rate constant; b)  $k_{off}$ , dissociation rate constant; c)  $K_D$ ,  $k_{off}/k_{on}$

### 앵타머의 친화도 측정

실제로 이들 발굴된 o-phosphoserine과 o-phosphothreonine에 대한 앵타머들의 친화도를 알아보기 위해 Surface plasmon

resonance (SPR)을 사용하여 이들의 친화도를 비교하여 보았다(Table 2). 그 결과 o-phosphoserine aptamer 중 SeA-06의 경우 dissociation constant가 2.6 nM의 가장 높은 친화도를 보였으며, SeA-12의 경우에는 이것보다 1.5배 정도 낮으나 이 경우도 높은 친화도를 보였다. 반면 SeA-09와 SeA-17의 경우 친화도 면에서, 10배에서 50배 정도 낮은 친화도를 보였다.

o-phosphothreonine aptamer 중 TrA-18의 경우 2.7 nM의 매우 높은 친화도를 보였다. TrA-05의 경우 10 정도 낮은 친화도를 보였다.

일반적으로 항체의 경우 저분자에 대한 친화도는 micromolar의 Kd를 가지는데, 반면 발굴된 aptamer의 경우 놀랍게도 nanomolar의 매우 높은 친화력을 가짐을 확인할 수 있었다. Aptamer의 selection 과정 중 발생하는 다양한 친화도를 가지는 여러 sequence들을 통해 만약 Affinity chromatography에서와 같이 목적 물질을 획득하는 것이 목적인 경우 친화력이 높은 aptamer를 사용하면 적당할 것이고, 리간드를 경우에 따라서 attach와 detach를 반복해야 하는 경우에는 친화력이 조금 떨어지는 aptamer를 사용하는 것이 적당할 것으로 사료된다. 이렇듯 aptamer는 다양한 친화력을 가지는 library로부터 우리는 원하는 affinity의 리간드를 선택해서 사용할 수 있는 장점을 가지고 있다.

발굴된 aptamer 중 가장 친화도가 높았던 SeA-06과 TrA-18의 RNA 구조를 mfold(17)를 사용하여 예상해 보았다(www.idtdna.com). 100 mM과 5 mM MgCl<sub>2</sub>의 buffer에서 NaClSeA-06(Fig. 3(a))의 경우 ΔG는 -25.8 kcal.mole<sup>-1</sup>, T<sub>M</sub>은 61.9°C, ΔH는 -234.4 kcal mole<sup>-1</sup>, ΔS는 -699.6 cal .K<sup>-1</sup> mole<sup>-1</sup>로 추정되었고, TrA-19의 경우(Fig. 3(b)) ΔG는 -25.08 kcal mole<sup>-1</sup>이고 T<sub>M</sub>은 63.5°C이며 ΔH는 -219.7 kcal mole<sup>-1</sup>이고, ΔS는 -652.7 kcal K<sup>-1</sup> mole<sup>-1</sup>이었다. 이들 모두 내부적으로 stem-loop

의 2차 구조를 가지고 있음을 알 수 있었다.

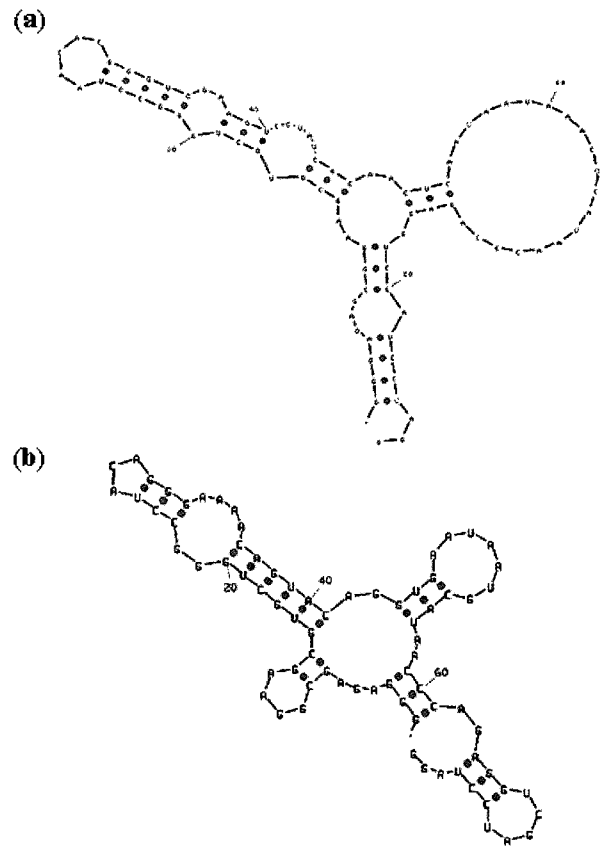


Figure 3. RNA structures of (a) o-phosphoserine aptamer and (b) o-phosphothreonine aptamer were predicted by mfold program.

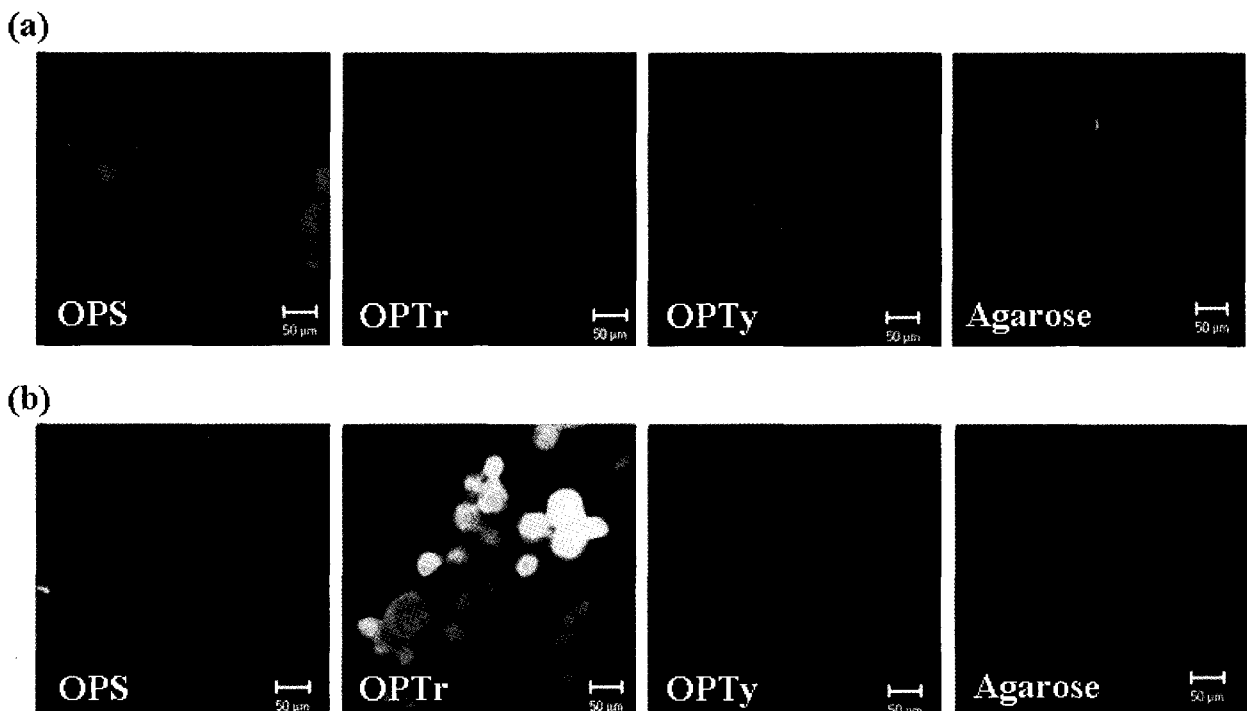


Figure 4. The specificity test of (a) o-phosphoserine aptamer (SeA-06) and (b) o-phosphothreonine aptamer (TrA-18) for o-phosphoserine (OPS), o-phosphothreonine (OPTr) and o-phospho tyrosine(OPTy) modified agarose beads and agarose beads.

### 발굴된 엡타머의 특이성 조사

매우 강한 친화도를 가지는 o-phosphoserine과 o-phosphothreonine 엡타머에 대한 다른 phosphoamino acids에 대한 selectivity를 조사해 보았다.

우선 각각의 RNA 엡타머는 fluorescein-12-dUTP를 사용해서 3'primer에 수식되었고, 각각의 20  $\mu$ l의 o-phosphoserine, o-phosphothreonine, o-phosphotyrosine 수식된 bead와 agarose beads는 1 M ethanol amine으로 1시간 동안 상온에서 blocking하였다. 반응 buffer로 비드를 3번 washing 후 형광 수식된 200  $\mu$ l의 20 pmol RNA와 5분 동안 반응시켰다. 비드를 5번 반응 buffer로 불지 않는 RNA를 washing하고, 이들을 비드를 confocal microscopy를 통하여 이들의 상호작용을 살펴 보았다. o-phosphoserine aptamer의 경우 그들의 목적 물질에 대해서 특별하게 상호작용을 하는 것을 관찰할 수 있었고, o-phosphothreonine에는 결합하는 RNA는 관찰되지 않았고, 물론 o-phosphotyrosine과 agarose bead에도 전혀 결합하지 않음을 확인할 수 있었다(Fig. 4(a)). o-phosphothreonine 엡타머의 경우에도 마찬가지로 o-phosphothreonine에만 결합함을 확인하였고, 다른 비드의 경우에는 전혀 결합하지 않았다(Fig. 4(b)). Serine과 threonine과는 methyl 그룹 하나의 차이만을 가지고 있는 저분자이기 때문에 이를 구분할 수 있는 리간드를 찾는 것은 쉽지 않을 것이다. 특히 항체의 경우에도 대부분 상업적으로 상용되고 있는 것은 phosphoserine에 대한 항체가 대부분이고 대부분의 이 항체들은 전반적으로 phosphothreonine에도 같이 특이성을 가지고 있다. 이러한 면에서 serine과 threonine을 구분할 수 있는 엡타머를 사용한다면, 이 두 가지를 구분할 수 있는 개념을 포함하여 바이오 칩, 질량 분석기를 이용한 단백질 분석, 진단, 센서 등 더욱 넓은 분석 도구에 응용할 수 있을 것이라 사료된다. 아직까지 o-phosphothreonine에 효율적인 리간드가 드물기 때문에 이 엡타머를 사용한다면 phosphothreonine에 관련된 phosphoproteomics에도 또한 넓게 연구될 수 있을 것이다.

### 요약

인산화 과정은 serine, threonine, tyrosine에서 발생하는 생화학적 반응으로, 본 연구에서는 다양한 응용의 잠재력이 있는 phosphoserine, phosphothreonine, phosphotyrosine에 대한 엡타머를 개발하였다. 우선 *in vitro* selection 방법의 의해 combinatorial chemistry로부터 얻어진 RNA library로부터 이들 phosphoamino acids와 친화도를 가지고 있는 엡타머를 찾아낼 수 있었다. 총 10번의 일련 과정을 통해 phosphoserine에 대해서 2.6 nM의 친화도를 가지고 있는 엡타머를 (SeA-06), phosphothreonine에 대해서는 2.7 nM의 친화도를 가지고 있는 엡타머 (TrA-18)를 찾아낼 수 있었고, 이들의 RNA 2차 구조를 각각 예측하여 보았다. 그러나 phosphotyrosine의 경우 짧은 길이의 엡타머가 selection됨으로 내부적으로 구조를 가지는 엡타머는 얻을 수 없었다. o-phosphoserine에 대한 항체가 기존에 보고가 되었으나 유사한 구조를 지닌 o-phosphothreonine에도 비슷한 활성을 보여 이들을 구분할 수 있는 리간드를 찾기 힘들었으나, 본 연구에서는 엡타머를 사용한 특이성 조사에서도 서로를

극명하게 구별할 수 있음을 확인할 수 있었다. 이와 같이 발굴된 엡타머를 사용하여 biochip이나 proteomics 분석 도구의 응용에 큰 기대효과를 제공할 수 있을 것이라 사료된다.

### 감사

본 연구는 정보통신부의 선도기반기술개발사업 (IMT2000-B3-2)의 지원에 의해 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

### REFERENCES

- Hunter, T. (1998), The Croonian Lecture 1997, The phosphorylation of proteins on tyrosine: its role in cell growth and disease. Philosophical Transactions: Biological Sciences, Royal Society, London, pp.583-605.
- Tuerk, C. and Gold, L. (1990), Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase, *Science* **249**, 505-510.
- Ellington, A. D. and Szostak, J. W. (1990), In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands, *Nature* **346**, 818-822.
- Ciesiolka, J., Gorski, J., and Yarus, M. (1995), Selection of an RNA Domain that Binds  $Zn^{+2}$ , *RNA* **1**, 538-550.
- Sassanfar, M. and Szostak, J. W. (1993), An RNA Motif that Binds ATP, *Nature* **364**, 550-553.
- Huizenga, D. E. and Szostak, J. W. (1995), A DNA Aptamer that binds adenosine and ATP, *Biochemistry* **34**, 656-665.
- Yang, Q., Goldstein, I. J., Mei, H. Y., and Engelke, D. R. (1998), DNA Ligands that Bind Tightly and Selectively to Cellobiose, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 5462-5467.
- Famulok, M. and Huttenhofer, A. (1996), In vitro selection analysis of neomycin binding RNAs with a mutagenized pool of variants of the 16S rRNA decoding region, *Biochemistry* **35**, 4265-4270.
- Mannironi, A., DiNardo, P., and Fruscoloni, G. P. Tocchini-Valentini (1997), In Vitro Selection of Dopamine RNA Ligands, *Biochemistry* **36**, 9726-9734.
- Wilson, C., Nix, J., and Szostak, J. (1998), Functional Requirements for specific Ligand Recognition by a Biotin-binding RNA Pseudoknot, *Biochemistry* **37**, 14410-14419.
- Nieuwlandt, D., Wecker, M., and Gold, L. (1995), In Vitro Selection of RNA Ligands to Substance P., *Biochemistry* **34**, 5651-5659.
- Kraus, E., James, W., and Barclay, A. N. (1998), Novel RNA Ligands Able to Bind CD4 Antigen and Inhibit CD4C T Lymphocyte Function, *J. Immunol.* **160**, 5209-5212.
- Romig, T. S., Bell C., and Drolet, D. W. (1999), Aptamer affinity chromatography: combinatorial chemistry applied to protein purification, *J. Chromatography B* **731**, 275-284.
- Bill, E., Lutz, U., Karlsson, B. M., Sparrman, M., and Allgaier, H. (1995), Optimization of protein G chromatography for biopharmaceutical monoclonal antibodies, *J. Mol. Recognit.* **8**, 90-94.
- Lee, S. W. and Sullenger, B. (1997), Isolation of a nuclease-resistant decoy RNA that can protect human acetylcholine receptors from myasthenic antibodies, *Nat. Biotechnol.* **15**, 41-45.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D. G. (1997), The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools, *Nucleic Acids Research* **24**, 4876-4882.
- Jaeger, J., Turner, D., and Zuker, M. (1989), Improved predictions of secondary structures for RNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 7706-7710.