

## 애타머와 단백질간 가교를 이용한 바이오마커 진단 방법 개발

이보람<sup>1</sup>, 김진우<sup>1</sup>, 김병기<sup>1,2\*</sup>

### The Method Development for Biomarker Diagnosis Based on the Aptamer-protein Crosslink

Bo-rahm Lee<sup>1</sup>, Ji-nu Kim<sup>1</sup>, and Byung-Gee Kim<sup>1,2\*</sup>

접수: 2011년 4월 29일 / 게재승인: 2011년 8월 3일

© 2011 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

**Abstract:** The detection of biomarkers is an important issue for disease diagnosis. However, many systems are not suitable to detect the biomarker itself directly. For direct detection of biomarker proteins in human serum, a new affinity-capture method using aptamers combined with the mass spectrometry was suggested. Since signals from protein samples cannot be amplified, modified chromatin immunoprecipitation (ChIP) and subsequent cross-linking with formaldehyde between aptamers and target proteins were used not to lose the captured target proteins, which allowed us to perform a harsh washing step to remove the non-specifically bound proteins. As a model system, a thrombin aptamer was used as a bait and thrombin as a target protein. Using our modified ChIP and affinity-capture method, non-specific binding proteins on the beads decreased significantly, suggesting that our new method is efficient and can be applied to developing diagnosis systems for various biomarkers.

**Keywords:** aptamer biomarker; formaldehyde; cross-linking; MS analysis; magnetic beads

<sup>1</sup>서울대학교 화학생물공학부

<sup>1</sup>School of Chemical and Biological Engineering, Sillim-dong, Gwanak-gu, Seoul 151-742, Korea  
Tel: +82-2-880-6774, Fax: +82-2-876-8945  
e-mail: byungkim@snu.ac.kr

<sup>2</sup>서울대학교 바이오공학 연구소

<sup>2</sup>Institute of Bioengineering, Seoul National University, Sillim-dong, Gwanak-gu, Seoul 151-742, Korea  
Tel: +82-2-880-6774, Fax: +82-2-876-8945  
e-mail: byungkim@snu.ac.kr

#### 1. 서론

SELEX를 통해 개발된 애타머는 DNA, RNA 또는 펩타이드로 이루어져 있으며 항원에 특이적으로 결합하는 항체와 같이 특정 물질에 강한 결합력을 보인다 [1,2]. 애타머의 리간드로는 이온 [3,4], ATP [5,6] 등의 저분자 물질부터 CD4 [7] 같은 고분자 물질까지 다양하게 존재한다. 애타머는 쉽게 합성이 가능하고 단백질인 항체에 비해 안정하기 때문에 다양한 형태로 응용되고 있는데, 그 중 질병 진단과 관련한 바이오마커 검출에 있어 *in vivo* 방법과 *in vitro* 방법 모두 연구되고 있다. 본 연구에서는 목적 단백질을 검출하는 방법에 있어서 전기적인 바이오마커 검출 센서나 형광 물질을 이용한 형광 이미징 등 애타머를 이용한 간접적 검출 방법 [8,9], 즉 목적 단백질에 의해 만들어지는 신호를 이용한 검출이 아닌, 애타머를 미끼로 하여 직접적인 목적 단백질의 검출을 시도하였다. 질병 여부에 대한 진단을 할 경우, 혈청 내에 존재하는 바이오마커에 대한 직접적인 동정이 진행되면 정확한 진단을 할 수 있고, 또한 한 환자의 혈청에서부터 여러 질병에 관한 바이오마커를 검출하고자 할 때에도 각각의 미끼로부터 얻어진 바이오마커에 대한 동정이 필요하다. 따라서 본 연구에서 제안하고 있는 방법을 이용하게 되면, 검출된 단백질을 질량분석기를 통하여 분석하기 때문에 여러 단백질이 섞여 있는 조건에서도 정확하게 목적 단백질을 검출해 낼 수 있다. 질량분석기를 통한 바이오마커의 분석에 있어서 생각할 수 있는 문제점은 첫 번째로 혈액 내에 대부분의 바이오마커의 경우 극소량으로 존재한다는 점이다. 암 관련 바이오마커인 CEA의 경우 5 ng/mL 이상 [10], PSA의 경우 4 ng/mL 이상인 경우 [11] 암 발생 여부를 진단하게 되는데 정상과 환자를 진단하기 위해서는 이처럼 수 ng 부근에서 목적 단백질을

직접 분석하게 된다. 이 경우 형광 물질 등 신호를 증폭할 방법이 없기 때문에 극소량의 단백질을 모두 질량분석기를 통해 분석해야 한다. 두 번째로 혈청 내에 존재하는 수많은 단백질들로 인해서 목적 단백질의 검출이 어려워진다는 점이다. 실험에 사용하게 되는 마이크로 비드 등에 비특이적으로 결합하는 단백질들을 제거하지 않으면 과량으로 존재하는 단백질들로 인해 질량 분석 시 극소량 존재하는 목적 단백질의 분석이 방해 받을 수 있다. 이런 문제점을 해결하기 위해서는 목적 단백질이 미끼에 남아 있으면서도 비특이적 결합을 한 단백질들은 세척 과정을 통해 제거될 수 있어야 한다. 애타머는 공유 결합과는 달리 이차 구조를 가지면서 리간드와 결합하기 때문에 강한 세척 과정을 진행하게 되면 목적 단백질이 떨어져 나갈 위험이 있다.

따라서 본 연구에서는 기존에 크로마틴 면역침강법 (chromatin immunoprecipitation, ChIP) [12,13]를 수정하여 새롭게 애타머의 목적 단백질을 검출하는 방법을 제시하고자 하였다. 이를 위한 모델 시스템으로 DNA 애타머인 트롬빈 (thrombin) 애타머를 미끼로, 트롬빈을 목적 단백질로 사용하였고 혈청 내에서 트롬빈을 검출할 수 있는 지에 대해 확인하고자 하였다 [14,15]. 반응에 필요한 실험 조건들을 최적화 하였고, 그 결과 혈청 내에 존재하는 단백질들에 의한 비특이적 결합은 줄이면서 트롬빈의 검출을 확인할 수 있었다. 추후 이와 같은 방법을 통해 다양한 목적 단백질을 가지는 여러 개의 애타머를 동시에 이용한 바이오마커 진단 시스템의 개발, 혹은 혈청 내에 단백질을 이용해 SELEX한 새로운 애타머의 리간드 동정 등 다양한 형태의 진단 시스템 개발이 가능할 것으로 기대한다.

**2. 재료 및 방법**

**2.1. 실험 재료**

5' 말단에 biotinylation 되어 있는 트롬빈 애타머 (5' biotin-GGTTGGTGTGGTTGG-3')는 (주)바이오니아에 의뢰하여 화학적으로 합성하였다. 비오틴 (biotin), tween 20, 37% formaldehyde, dithiothreitol, iodoacetamide, 트롬빈, casein 은 시그마 알드리치 코리아(주)에서 구입하였다. 실험에 사용한 혈청은 (주)제노프라에서 제공 받았다. 질량 분석을 위한 펩타이드 샘플을 얻기 위해 시퀀싱 등급의 트립신은 Promega 제품을 사용하였다. 스트렙타이비딘 (streptavidin)이 고정화 되어 있는 마그네틱 비드는 Invitrogen에서 구입하였다.

**2.2. 수정된 면역침강법을 이용한 목적 단백질 검출**

5' 말단에 비오틴을 고정화한 트롬빈 애타머 500 pmol을 단백질과의 반응 전에 95°C에서 2분간 가열한 후 얼음에서 식히고 애타머를 포획할 때 사용할 스트렙타이비딘 마그네틱 비드는 사용 전에 1% casein 용액으로 상온에서 1시간 동안 표면을 차단한 후 트롬빈 SELEX 버퍼로 [14] 세척하여 실험에 사용하였다. SELEX 버퍼는 20 mM Tris-acetate, pH 7.4, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>로 이루어져 있다. 애타머는 목적 단백질이 들어있는 혈청과

상온에서 30분간 반응시켰다. 혈청과 목적 단백질의 혼합물은 고정된 농도의 트롬빈과 최종 농도 0.01% tween 20 반응 용액 (protease inhibitor cocktails, salmon sperm DNAs in thrombin SELEX buffer)에 섞여 있다. 반응 후에 최종 농도에 맞춰 37% formaldehyde 용액을 첨가하고 상온에서 일정 시간 동안 가교 되도록 한 후, 최종 농도 0.2 M glycine을 넣어 상온에서 5분간 반응한 후 가교 반응을 정지하였다. 스트렙타이비딘 마그네틱 비드와 결합하기 전에 애타머와 목적 단백질의 반응 용액에 비오틴 (5 mg/mL)을 10 µL 첨가하였다. 그 후 상온에서 흔들며 30분간 반응하였다. 최종 농도 0.05% tween 20가 포함된 트롬빈 SELEX 버퍼로 세척한 후 질량 분석을 위해 염을 제거하고 용출 용액으로 바꾸기 위해 10 mM ammonium bicarbonate (ABC) 용액으로 세척을 마무리 하였다. 95°C에서 5분간 20 µL의 10 mM ABC 용액으로 용출한 후 용출 용액을 모아 56°C에서 30분간 10 mM DTT 처리를 하였다. 다음으로 10 µL의 10 mM ABC 용액을 첨가한 후 3 µL의 iodoacetamide (10 mg/mL)을 어두운 곳에서 상온 30분간 처리하였다. 추가로 20 µL의 10 mM ABC 용액을 첨가한 후 시퀀싱 등급의 트립신을 37°C에서 하룻밤 동안 처리했다.

**2.3. 질량분석기를 이용한 단백질 분석**

11 cm × 129 µm 크기의 미세관에 6-7 cm 길이로 C18 비드 (Vydac 218TP51)를 충전하여 펩타이드를 로딩하였고 분석에 사용하였다. 펩타이드는 0.5% formic acid가 포함된 acetonitrile 용매를 0.3 µL/min의 속도로 0-90%까지 농도 구배를 주어 1시간 동안 LTQ-Orbitrap 질량 분석기 (Thermo Finnigan)를 통해 분석하였다. MS/MS를 통한 펩타이드의 분석은 SEQUEST를 통해 단백질 데이터베이스를 이용하여 분석하였고 MS spectra의 분석 기준은 cross-correlation score (Xcorr) 값이 +1 charged tryptic peptide의 경우 1.7 이상, +2 charged peptide의 경우 2.5 이상, +3 charged peptide의 경우에는 3.0 이상으로 삼았다.

**3. 결과 및 고찰**

**3.1. 애타머와 마그네틱 비드를 이용한 수정된 크로마틴 면역 침강법 응용**

애타머를 미끼로 하여 목적 단백질을 검출하기 위해서 마이크로 마그네틱 비드를 사용하여 애타머와 단백질의 결합체를 포획하는 방법을 시도하였다. 하지만 앞서 언급했듯이 많은 단백질이 혼합되어 있는 혈청과 같은 샘플에서 원하는 목적 단백질만을 분석하기 위해서는 비특이적으로 결합하여 분석되는 단백질들을 충분히 제거해주어야 한다. 이를 위해 기존의 크로마틴 면역침강법을 수정한 새로운 분석 방법을 고안하였다 (Fig. 1). 먼저 애타머의 5' 말단에 비오틴을 연결한 후 혈청과 섞어서 반응하였다. 애타머가 마이크로 비드와 고정된 상태에서 리간드를 만나는 것이 아니기 때문에 좀더 자유로운 상태로 반응에 참여하게 되므로 목적 단백질과의 결합이 유리할 것으로 기대하였다. 혈청 내에 애타머와 목적 단백질

의 결합체가 이후의 실험 과정에서 유지되도록 formaldehyde를 처리하여 가교하였다. Formaldehyde에 의해 단백질의 amine기와 nucleotide의 base 부분 amine기가 공유 결합을 하게 되기 때문에 샘플 손실의 걱정 없이 좀더 강한 세척 과정을 수행할 수 있게 됨으로써 비특이적 결합을 하는 다른 단백질들의 제거 효과 역시 증가하였다. 이후 앵타머 말단에 있는 비오틴을 이용하여 앵타머-단백질 결합체를 특이적으로 스트랩타아비딘이 고정되어 있는 마그네틱 비드에 고정한다. 강한 세척 과정을 수행한 후에 비드에 남아 있는 단백질은 열을 가해 역가교 시킨 후 분리하여 질량분석기를 통해 분석하였다. Formaldehyde에 의한 가교 효과를 확인하기 위해 순수한 단백질만을 사용하여 결과를 비교하였다 (Fig. 2). 순수한 단백질의 경우 가교를 진행한 경우에만 목적 단백질을 검출할 수 있었다. 하지만 목적 단백질이 혈청 내에 섞이고 양이 줄어들 경우 가교에 의한 효과를 확인할 수 없었기 때문에 반응 조건의 최적화를 진행하였다.

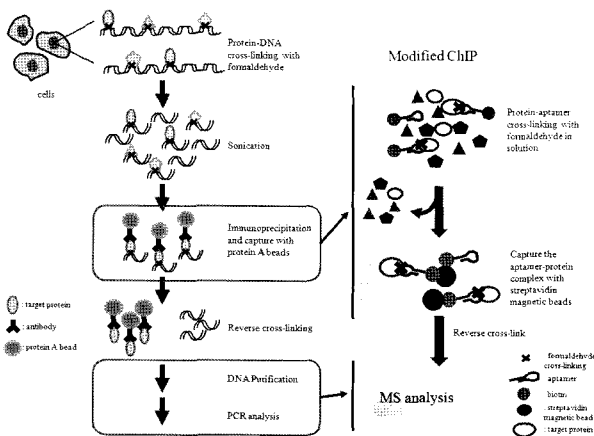


Fig. 1. Schematic procedure of modified chromatin immunoprecipitation.

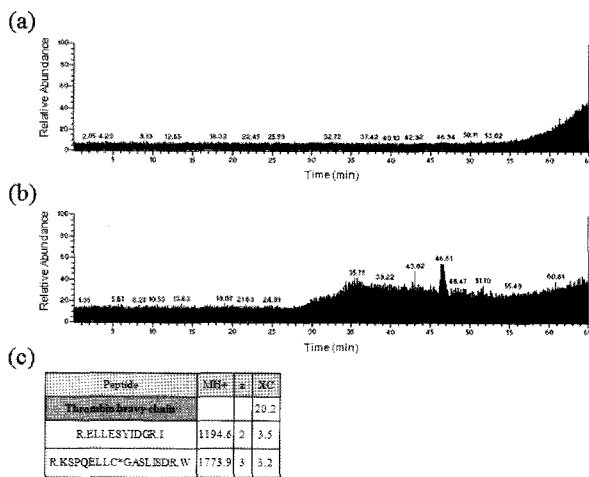


Fig. 2. The effect of the formaldehyde cross-linking shown by mass spectrometry. Total ion chromatogram of pure thrombin without formaldehyde treatment (a), total ion chromatogram of pure thrombin with formaldehyde treatment (b), detected peptide list of pure thrombin with formaldehyde treatment (c). Total peptide hits were 20. Thrombin aptamers were used in 500 pmol/20.4 × 10<sup>6</sup> beads. 1.54 μg of pure thrombin protein was used.

### 3.2. 목적 단백질 검출을 위한 반응 최적화

실험 과정에서 앵타머와 목적 단백질의 결합 및 최종적인 목적 단백질의 검출까지 영향을 줄 수 있는 여러 조건들이 존재한다. 우선 앵타머-목적 단백질 결합체를 포획하는 스트랩타아비딘 마그네틱 비드의 표면을 앵타머-목적 단백질 결합체와 반응하기 전에 차단제를 처리하였다. 일반적으로 차단제로 사용하는 1% casein 용액을 스트랩타아비딘 마그네틱 비드에 상온에서 1시간 반응 후 세척하여 이용한 결과 이전보다 비특이적 결합이 줄어드는 것을 확인했으나 여전히 다른 단백질들에 의해 목적 단백질을 분석하는데 어려움이 있었다. Formaldehyde의 경우 크기가 작고 반응성이 좋기 때문에 가교제로 사용하게 되면 주변의 단백질들도 비특이적으로 앵타머와 결합하는 확률이 늘어날 수 있다. 따라서 이후 실험 초기에 앵타머와 목적 단백질의 용액 내 결합 시 경쟁 물질을 넣어주어 앵타머와 결합력이 좋은 목적 단백질만 가교 시에 유리하게 하는 것과 formaldehyde의 가교 반응 조건을 최적화 하였다.

기본적으로 앵타머와 목적 단백질이 결합하는 반응 시 비오틴과 sheared salmon sperm DNA를 넣어주지만 추가로 계면활성제를 넣어주어 실제 결합력 있는 단백질들만 앵타머 근처에서 반응할 수 있도록 하였다. 이전 비드 표면 차단 실험과 별도로 진행하였으며 사용한 계면활성제는 tween 20와 triton X-100 두 가지 종류이고 4개의 농도 조건에서 실험하였다. 트롬빈 앵타머의 SELEX 과정에서 사용한 SELEX 버퍼 용액에 최종 농도 0.001, 0.01, 0.05, 0.1%의 계면활성제를 넣어주었을 때 목적 단백질인 트롬빈을 검출할 수 있었다 (Fig. 3). 분석 시 검출된 트롬빈의 펩타이드 시퀀스는 같았고 펩타이드의 검출 횟수로 비교하였을 때 최종 농도 0.01% tween 20를 반응 용액에 경쟁 물질로 사용하는 것이 가장 좋음을 확인하였다. 하지만 이 경우에도 여전히 비특이적인 단백질에 의해 목적 단백질인 트롬빈이 우선 검출되지 않아 이후 실험에서 formaldehyde 농도, 가교 처리한 온도 및 처리 시간, 가교 후 스트랩타아비딘 마그네틱 비드와의 결합 시간, 앵타머-목적 단백질이 포획된 마그네틱 비드의 세척 조건에 관한 최적화 실험을 계속 진행하였다 (Fig. 4(a)).

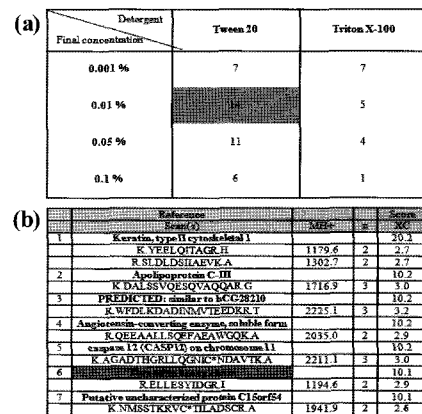


Fig. 3. The detergent effect as a binding competitor. Peptide detection hits depending on the detergents and the concentration of detergents (a), detected peptide list on 0.01% tween 20 condition (gray box in Fig. 3(a)) (b). Thrombin aptamers were used in 500 pmol/20.4 × 10<sup>6</sup> beads. 1.54 μg of pure thrombin protein was used.

마그네틱 비드의 표면 차단과 반응 시 계면활성제를 경쟁 물질로 넣어주는 과정을 모두 수행한 후 가교를 진행하게 되면 트롬빈을 우선 검출할 수 있었다. (Fig. 4(b)) Formaldehyde의 최종 농도를 2배 높이고 반응 시간을 절반으로 줄이는 경우 기존 조건보다 더 높은 검출 횟수를 보이는 것을 확인하였지만 (Fig. 4(c)) 농도를 높이면서 반응 시간은 그대로 유지할 경우 검출 횟수가 줄어드는 것을 확인하였다 (Fig. 4(d)). 이는 트롬빈과 엡타머의 결합을 formaldehyde가 최대한 도우면서 혈청 내에 다른 비특이적 단백질들이 가교에 참여하는 시간은 줄여주기 때문으로 생각할 수 있다. 또한 가교 반응 시 온도가 상온이 아닌 37°C가 될 경우 비특이적 결합이 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 4(e)). 반응 후 마그네틱 비드의 세척 시 계면활성제의 농도를 높이는 것은 큰 차이가 없었으며 비특이적 결합을 줄이기 위해 반응한 혈청 혼합물과 마그네틱 비드의 반응 시간을 줄이는 것은 단백질이 검출되지 않는 것으로 보아 효과적이지 않았다. 마지막으로 검출되는 단백질이 엡타머와 특이적으로 반응하여 분석되는 것인지 확인하기 위해 동일한 조건에서 엡타머 없이 실험을 진행하였는데 formaldehyde의 농도에 영향 없이 모두 단백질이 검출되지 않는 것으로 보아 엡타머에 특이적으로 결합하여 분석된다는 것을 확인할 수 있었다.

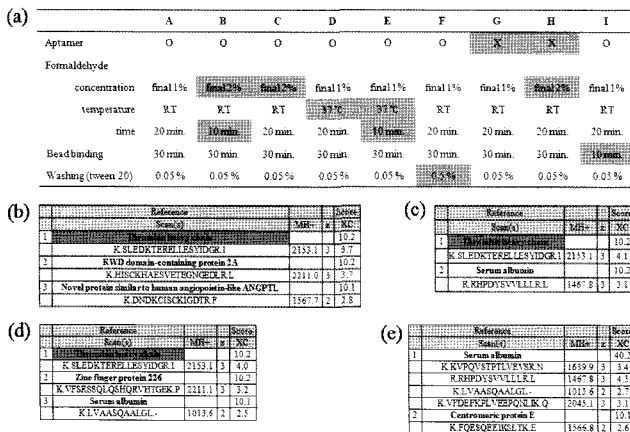


Fig. 4. The optimization of binding condition. Experimental condition is indicated, the shaded boxes are modified conditions compared to the control condition (column A) (a), peptide list of column A, peptide hits of thrombin is 8 (b), peptide list of column B, peptide hits of thrombin is 11 (c), peptide list of column C, peptide hits of thrombin is 1 (d), peptide list of D, thrombin peptides were not detected (e). Thrombin peptides were not detected in the cases of column D to I. Thrombin aptamers were used in 500 pmol/20.4 × 10<sup>6</sup> beads. 1.54 μg of pure thrombin protein was used.

3.3. 질병 진단에의 응용을 위한 검출 한도 확인

추후 실제 환자 진단에 응용하기 위해서는 앞서 언급했던 극소량의 단백질을 검출할 수 있는지가 중요하다. 단백질의 분석에 질량분석기를 이용한다면 질량분석기 자체의 검출 한도도 문제가 될 수 있지만 본 연구에서 사용한 LTQ-Orbitrap과 같은 고감도의 질량분석기를 활용함으로써 해결할 수 있다. 실험적인 단백질의 검출 한도를 확인하기 위한

예비 실험을 수행하였다. 앞서 실험한 조건인 1.5 μg 트롬빈을 1000배 희석하여 혈청 내에 1.5 ng의 트롬빈이 검출 가능한지 확인하였을 때 분석이 가능한 것을 확인하였다 (Fig. 5). 하지만 목적 단백질의 양은 극소량으로 줄었고 혈청 내 다른 단백질의 양은 상대적으로 많아졌기 때문에 이를 분석하였을 때 이전 결과들에 비해 다른 비특이적 단백질들의 검출이 우선 분석되고 검출되는 횟수도 늘었다. 단백질의 검출 한도는 질병 여부와 밀접한 관련이 있기 때문에 좀더 정밀한 실험이 수행되어야 할 것이다.

Detected Protein	
1	Keratin, type I cytoskeletal 10
2	Thrombin heavy chain
3	Serotransferrin
4	Trypsin-3
5	Apolipoprotein C-III
6	Gag polyprotein (Fragment)
7	SLZC220F6.1 (Novel protein similar to human dynein heavy chain (DHC))
8	Transcription factor 7-like 1
9	Dedicator of cytokinesis protein 2
10	Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 5
11	Poly [ADP-ribose] polymerase 8
12	Pol protein (Fragment)
13	Exportin-7
14	Coiled-coil domain-containing protein KIAA1407
15	Envelope glycoprotein (Fragment)

Fig. 5. The detected protein list of thrombin. Thrombin aptamers were used in 500 pmol/20.4 × 10<sup>6</sup> beads. 1.54 μg of pure thrombin protein was used.

4. 결론

본 연구에서는 질병 진단을 위해 엡타머를 활용함에 있어 엡타머의 목적 단백질이 되는 바이오마커를 직접 검출하는 방법을 고안하였다. 단백질 검출을 위한 항체 사용 대신 엡타머로 목적 단백질을 분리하였고, 목적 단백질이 결합하는 DNA 혹은 RNA 시퀀스를 찾는 것이 아니라 목적 단백질 자체를 질량분석기를 통해 검출하는 형태로 기존에 사용되던 크로마틴 면역침강법을 수정하였다. 그 결과 혈청과 같은 수 mg/mL의 농도를 가지는 단백질 혼합물 속에 존재하는 목적 단백질 트롬빈을 1.5 ng까지 엡타머와의 가교를 통해 검출할 수 있었다. 또한 분석된 단백질은 마이크로 마그네틱 비드나 단백질-단백질 결합을 통해서 검출되는 것이 아닌 엡타머와의 특이적 결합으로 인해 검출되는 것을 확인하였다. 엡타머와 목적 단백질의 반응 시 0.01% tween 20를 경쟁 물질로 사용하여 특이적 결합력을 높였으며 최종 농도 2% formaldehyde를 넣은 반응 용액을 상온에서 10분간 반응시켜 formaldehyde를 사용하지 않았을 때 분석하지 못했던 트롬빈을 혈청 내에서 분석할 수 있었다. 추후 마이크로 비드 대신 나노 파티클 같은 형태의 고정체를 사용하게 된다면 표면적을 줄이면서도 목적 단백질과의 반응 가능성은 높임으로써 비특이적 결합을 줄이고 보다 개선된 단백질 검출이 이루어질 수 있을 것으로 기대한다. 본 연구에서는 모델 시스템으로 트롬빈을 사용하

였으나 혈청 내에 존재하는 질병 바이오마커인 CEA, PSA, AFP와 같은 단백질에 대한 애타머를 사용하여 적용한다면 단독으로 또는 복합적으로 여러 개의 바이오마커에 대한 진단 시스템으로 개발이 가능할 것이다. 이런 복합 시스템이 개발된다면 환자의 혈청만을 이용해 여러 질병에 대한 진단을 한 번에 보다 정확히 진행할 수 있을 것으로 기대된다.

## 감사

본 연구는 2010년도 교육과학기술부의 재원으로 한국연구재단의 지원 (No. 20100018867)과 한국연구재단을 통한 교육과학기술부의 세계수준의 연구중심대학육성사업 (WCU) 으로부터 (R322010000102130) 지원받아 수행되었습니다.

## References

1. Tuerk, C. and L. Gold (1990) Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* 249: 505-510.
2. Ellington, A. D. and J. W. Szostak (1990) *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 346: 818-822.
3. Ciesiolka, J., J. Gorski, and M. Yarus (1995) Selection of an RNA domain that binds  $Zn^{2+}$ . *RNA* 1: 538-550.
4. Ma, C., H. Huang, and C. Zhao (2010) An aptamer-based and pyrene-labeled fluorescent biosensor for homogeneous detection of potassium ions. *Anal. Sci.* 26: 1261-1264.
5. Sasanfar, M. and J. W. Szostak (1993) An RNA motif that binds ATP. *Nature* 364: 550-553.
6. Huizenga, D. E. and J. W. Szostak (1995) A DNA aptamer that binds adenosine and ATP. *Biochemistry* 34: 656-665.
7. Kraus, E., W. James, and A. N. Barclay (1998) Cutting edge: novel RNA ligands able to bind CD4 antigen and inhibit CD4+ T lymphocyte function. *J. Immunol.* 160:5209-5212.
8. Feng, L., Y. Chen, J. Ren, and X. Qu (2011) A graphene functionalized electrochemical aptasensor for selective label-free detection of cancer cells. *Biomaterials* 32: 2930-2937.
9. Shi, H., X. He, K. Wang, X. Wu, X. Ye, Q. Guo, W. Tan, Z. Qing, X. Yang, and B. Zhou (2011) Activatable aptamer probe for contrast-enhanced *in vivo* cancer imaging based on cell membrane protein-triggered conformation alteration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 3900-3905.
10. Compton, C., C. M. Fenoglio-Preiser, N. Pettigrew, and L. P. Fielding (2000) American Joint Committee on Cancer Prognostic Factors Consensus Conference: Colorectal Working Group. *Cancer* 88: 1739-1757.
11. Thompson, I. M., D. K. Pauler, P. J. Goodman, C. M. Tangen, M. S. Lucia, H. L. Parnes, L. M. Minasian, L. G. Ford, S. M. Lippman, E. D. Crawford, J. J. Crowley, and C. A. Jr. Coltman (2004) Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level  $\leq 4.0$  ng per milliliter. *N. Engl. J. Med.* 350: 2239-2246.
12. Collas, P. (2010) The current state of chromatin immunoprecipitation. *Mol. Biotechnol.* 45: 87-100.
13. O'Neill, L. P. and B. M. Turner (1996) Immunoprecipitation of chromatin. *Methods Enzymol.* 274: 189-197.
14. Bock, L. C., L. C. Griffin, J. A. Latham, E. H. Vermaas, and J. J. Toole (1992) Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature* 355: 564-566.
15. Paborsky, L. R., S. N. McCurdy, L. C. Griffin, J. J. Toole, and L. L. Leung (1993) The single-stranded DNA aptamer-binding site of human thrombin. *J. Biol. Chem.* 268: 20808-20811.