

胃癌血清适配体的筛选及其鉴定

蒺玉琴¹, 赵运旺¹, 李东东², 曾家豫¹, 廖世奇^{2*}

(¹西北师范大学生命科学学院, 甘肃 兰州 730070; ²甘肃省医学科学院医学分子生物学研究中心, 甘肃 兰州 730050)

[摘要] **目的:**以羧基化琼脂磁珠为筛选介质,利用 RT-PCR 和靶标替换消减 SELEX 技术从胃癌血清中筛选得到高特异性、强亲和力的适配体。**方法:**以离心超滤(50 000 超滤管)法处理后的胃癌血清作为靶分子,羧基化琼脂磁珠为载体,先将寡核苷酸文库与反筛磁珠(结合正常血清)结合,取上清再与筛选磁珠(结合胃癌血清)结合,洗去未结合的寡核苷酸分子,对结合在磁珠上的寡核苷酸分子进行分离和扩增, λ 酶切法制备 ssDNA 次级库,进行 10 轮筛选,将第 10 轮的文库扩增得到 dsDNA,利用胶回收试剂盒回收纯化目的片段的 dsDNA,并与 pMDTM18-T 载体连接,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,挑取阳性克隆,测序获得适配体序列,同时用流式细胞术测定胃癌血清适配体的 K_d 值。**结果:**经过 10 轮筛选后,得到 20 条与胃癌血清结合的适配体。**结论:**特异性检测表明,筛选得到的胃癌血清适配体与胃癌血清的结合解离常数均在纳摩尔级水平,其中 5、7、16、17、18 号适配体能高特异性、强亲和力结合胃癌血清,与正常人血清不结合。该研究为胃癌的早期诊断提供了实验基础。

[关键词] 胃癌血清;适配体;鉴定

[中图分类号] R735.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)11-1306-07

doi: 10.7655/NYDXBNS20161105

Screening and identification of gastric cancer serum aptamers

Xi Yuqin¹, Zhao Yunwang¹, Li Dongdong², Zeng Jiayu¹, Liao Shiqi^{2*}

(¹College of Life Sciences, Northwest Normal University, Lanzhou 730070; ²Medical Molecular Biology Research Center, Gansu Academy of Medical Sciences, Lanzhou 730050, China)

[Abstract] **Objective:** By using carboxylated agar magnetic beads as selection medium, we sought to use RT-PCR and target replacement subtractive SELEX technology from the serum of gastric cancer screening to obtain aptamers with high specificity and affinity. **Methods:** The target molecules were gastric cancer serum performed with centrifugal ultrafiltration (ultrafiltration 50 000), and the carriers were the carboxylated agar magnetic beads. Firstly, oligonucleotide library and anti-screening agar magnetic beads (normal serum binding) were bound, then supernatant was combined with screening magnetic beads (gastric binding serum). We washed away unbound oligonucleotide molecules, and oligonucleotide molecules binding on the magnetic beads were isolated and amplified. λ enzyme digestion method was performed to prepare ssDNA second library for 10 rounds of screening. The library of the 10th round was amplified to obtain dsDNA, then we used gel extraction kit recovering purified fragment of dsDNA and connected it with pMDTM18-T vector and transformed into *E. coli* DH5 α competent cells. we selected positive cloning group and sequenced them to obtain aptamers sequence. Simultaneous determination of K_d values of gastric cancer serum aptamer was performed by flow cytometry. **Results:** After 10 rounds of selection, 20 gastric cancer serum specific aptamers were screened. **Conclusion:** The specific detection showed that the K_d values of gastric cancer serum binding aptamers were at the nanomolar level, and No. 5, 7, 16, 17, 18 aptamers can bind to gastric cancer serum with high specificity and affinity, and didn't bind to normal human serum. It provides an experimental basis for the early diagnosis of gastric cancer.

[Key words] gastric serum; aptamers; identification

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(11): 1306-1312]

胃癌是世界范围内位居第二的常见恶性肿瘤^[1], 严重威胁人类的生命健康。新发病例中诊断时大部

分已经是胃癌晚期,因此早期筛查是提高胃癌生存率的关键。目前胃癌诊断主要依赖于胃镜,血清肿瘤标志物是理想的肿瘤筛查手段^[2]。血清中蕴藏着丰富的与疾病早期诊断相关的组织学信息,但由于

[基金项目] 国家自然科学基金(81560346)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: liaoshiqi@126.com

血清蛋白组成的复杂性和蛋白质之间巨大的丰度差异使得血清蛋白质组学的分析有一定困难,因此在进一步深入研究之前,高丰度蛋白的去除是首要解决的问题^[3-4]。血清中包含有白蛋白、免疫球蛋白、转铁蛋白、脂蛋白等高丰度蛋白^[5-6]。小分子量蛋白质组学研究的对象包含几类重要生理学功能的蛋白,像细胞因子类、炎症趋化因子类、多肽类激素^[7-8],另外还有大分子量蛋白的酶切片段和大量的肿瘤标志物,它们与疾病的发生发展关系密切^[9-11]。最常见的胃癌血清肿瘤标志物有:癌胚抗原(CEA)、癌抗原 125(CA12-5)、MG7 抗原等^[12]。

适配体是通过指数扩增的配基进化(SELEX)技术从人工合成的单链随机寡核苷酸文库中筛选获得^[13-14],能高特异性、强亲和力结合靶分子,对肿瘤诊断具有良好的应用前景。本研究用离心超滤法(50 000 超滤管)去除胃癌血清大分子量高丰度蛋白,以去除高丰度蛋白的胃癌血清为靶标,利用靶标替换消减 SELEX 技术进行筛选。主要原理是在筛选过程中扣除相似非目标靶物质上所具有的靶分子适配体,消减后的次级库再投入到目标靶物质进行筛选,得到目标靶分子的适配体;靶标替换是将每轮筛选目标靶物质换成同类目标靶物质,这样筛选得到的适配体为同类目标靶物质上共同的靶分子标志物。然后再利用消减从两组高度同源的靶分子混合物中筛选获得差异靶分子的特异性适配体,同时利用靶标替换又可筛选到不同靶标相同部分的适配体。最终筛选得到 1 组高特异性胃癌血清适配体,为胃癌的早期诊断提供了新方法。

1 材料和方法

1.1 材料

ssDNA 文库序列(88 nt, 1.2 nmol, 吸光度值 1.0): 5'-CTATAGCAATGGTACGCTACTTCC-40NAAAAG-TGCACGCTACTTTGCTAA-3'(N=A、G、T、C);上游引物 P7 序列:5'-CTATAGCAATGGTACGCTACTTCC-3'(9.6 nmol, 吸光度值 2.0),下游引物 P11 序列:5'-TTAGCAAAGTAGCGTGCACCTTTG-3'(4.2 nmol, 吸光度值 1.0)及 Bio-P11(4.2 nmol, 吸光度值 1.0)引物均由上海生工合成,10 000、30 000、50 000 超滤管购自上海俊晟生物科技有限公司,羧基化琼脂磁珠由甘肃省医学科学研究院医学分子生物学中心提供。

λ 酶(10 U/ μ L)(上海生工);胃癌患者血清由甘肃省肿瘤医院提供,正常人血清由甘肃省中医院

提供;封闭液(0.1 g 蔗糖,12.5 mg 牛血清白蛋白,12.5 mg 酪蛋白溶于 10 mL 1×Binding buffer 中),1×Binding buffer(137 mmol NaCl,2.7 mmol KCl,6.5 mmol Na₂HPO₄,1.8 mmol NaH₂PO₄,2.5 mmol MgCl₂,1 mmol CaCl₂);2×SSC 洗液:17.53 g NaCl,8.82 g 柠檬酸三钠溶于 100 mL 蒸馏水中,灭菌后常温保存。

1.2 方法

1.2.1 血样的预处理

本研究选用 50 000、30 000、10 000 超滤管处理胃癌患者血样,从而去除血清中的高丰度蛋白。

收集 10 例胃癌患者全血,室温下 1 500 r/min 离心 5 min 去除血细胞并收集血清,然后将收集的血清在 4℃条件下 12 000 r/min 离心 5 min,进一步去除残留的血细胞,离心后收集血清,-80℃保存待用^[15-16]。用 50 000、30 000、10 000 超滤管截留,去除高丰度蛋白。

1.2.2 离心超滤法去除血清大分子量高丰度蛋白

超滤管按厂家说明进行清洗和使用。取上述 10 例胃癌患者充分混匀的血清 8 mL,加入 16 mL 去离子水进行稀释后,混匀 30 s,各取 4 mL 分别加入到截留分子量为 10 000、30 000、50 000 的超滤管中。15 000 r/min 20℃离心 15 min。滤液立即置于-80℃冷冻。

1.2.3 SDS-PAGE 电泳

取 20 μ L 不同膜型号超滤管处理后的溶液,加入上样缓冲液,置于 95℃水浴 5 min,20 μ L 等体积上样,SDS-PAGE 凝胶电泳(10%分离胶、5%浓缩胶),100 V 电泳 4 h,考马斯亮蓝染色,脱色液脱色。

1.2.4 混合血清的配置

将收集到的 100 例胃癌患者血清各取 200 μ L 混匀,用 50 000 超滤管离心处理,制备成胃癌混合血清,500 μ L/管分装,-20℃冰箱保存备用。以同样的方法制备正常混合血清,分装后冻存备用。

1.2.5 正常混合血清消减 SELEX 筛选

取 4 mL 羧基化琼脂磁珠,结合 1 mL 制备好的正常混合血清,37℃孵育 2 h,弃去 EP 管中的正常混合血清,同时加入 10 μ mol/L tRNA(tRNA 是非特异性竞争剂,增加筛选的特异性),37℃孵育 30 min,用 1×Binding buffer 洗 3 次,每次 1 min,再结合初级 ssDNA 文库(用 3 mL 1×Binding buffer 溶解初级 ssDNA 文库,充分混匀,95℃ 5 min,4℃ 10 min,37℃ 5 min),37℃孵育 1 h。弃去未结合的 ssDNA 文库,用 1×Binding buffer 洗 3 次,每次 1 min,加入 3 mL 纯水,95℃ 10 min,收集上清加入到 10 000 超滤管中,5 000 r/min 离心 15 min,收集超滤管中的上清,作

为下一轮筛选的次级库。重复上述步骤进行下一轮筛选,共进行 3 轮递减 SELEX 筛选。

1.2.6 RT-PCR 扩增获得 dsDNA

dsDNA 反应体系包括上游引物 P7 (25 pmol/ μ L) 0.8 μ L、下游引物 Bio-P11 (25 pmol/ μ L) 0.8 μ L、dNTP 混合物 (2.5 mmol/L) 8 μ L、10 \times buffer 10 μ L、荧光染料(super green I) 2 μ L、模板 DNA 160 μ L、rTaqDNA 聚合酶(5 U/ μ L) 1 μ L、去离子水 57.4 μ L、充分混用,每管 30 μ L,分成 8 管,RT-PCR 进行扩增。S 型曲线达到最高点停止扩增。

1.2.7 λ 酶切法制备 ssDNA

取 25 μ L 10 U/ μ L 的 λ 酶加入 25 μ L RNA-free water 进行稀释,用移液枪混匀。按以下顺序加入试剂于 0.5 mL EP 管中:①35 μ L RNA-free water;② 2 μ L 10 \times λ buffer;③ 5 μ L λ 酶。进行酶切 RT-PCR 扩增得到的 dsDNA 产物,在 PCR 仪上运行如下程序:①37 $^{\circ}$ C 30 min;②80 $^{\circ}$ C 15 min;③ 4 $^{\circ}$ C 10 min。

1.2.8 反筛

取 4 mL 羧基化琼脂磁珠放置于 15 mL EP 管中,标记为“1+”,即正筛管,偶联 1 mL 制备好的胃癌血清;取 4.5 mL 羧基化琼脂磁珠平均放置于 3 个 4 mL EP 管中,分别标记为“2-”、“3-”、“4-”即反筛管,分别偶联 1 mL 制备好的正常人血清。正筛管、反筛管置于 37 $^{\circ}$ C 滚筒式恒温振荡器中孵育 1 h;“2-”EP 管与制得的 ssDNA 结合,置于 37 $^{\circ}$ C 滚筒式恒温振荡器中孵育 30 min;吸取“2-”EP 管中的 ssDNA 加入到“3-”EP 管中,置于 37 $^{\circ}$ C 滚筒式恒温振荡器中孵育 30 min;吸取“3-”EP 管中的 ssDNA 加入到“4-”EP 管中,置于 37 $^{\circ}$ C 滚筒式恒温振荡器中孵育 30 min;吸取“4-”EP 管中的上清加入到“1+”EP 管中,置于 37 $^{\circ}$ C 滚筒式恒温振荡器中孵育 1 h;把“2-”、“3-”、“4-”反筛管中的羧基化琼脂磁珠收集到 15 mL EP 管中,正筛管、混合后的反筛管用 2 \times SSC 洗 5 遍,加入 1 mL 纯水,95 $^{\circ}$ C 5 min,12 000 r/min 离心 5 min,重复上述步骤 3 次,共收集 3 mL 上清,加入到 10 000 超滤管中,5 000 r/min 离心 15 min,收集超滤管中的上清,作为下一轮筛选的次级库。

重复上述筛选步骤,并在每轮筛选中加入 tRNA 非特异性竞争剂进行筛选,增加筛选的特异性。共进行 10 轮筛选。

1.2.9 克隆、测序

取筛选过程中第 10 轮正筛管中的上清作为模板,配制 300 μ L PCR 体系。体系配方:10 \times Buffer(含 Mg^{2+})30 μ L、模板 45 μ L(筛选管中的上清)、4 种

dNTP 混合液(每种 25 pmol/L)2.4 μ L、引物 P7 3 μ L、引物 P11 3 μ L、5 U/L rTaq 酶 2 μ L、超纯水 214.6 μ L,充分混匀后,每管 50 μ L 分装,并置于普通 PCR 仪扩增 (95 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,20 个循环),然后紫外光下切割含目的 DNA 条带的胶块,利用胶回收试剂盒回收纯化目的片段的 dsDNA。将制好的 dsDNA 用超纯水溶解,然后与 pMDTM18-T 载体连接,连接体系配方:pMDTM18-T 0.5 μ L,插入的目的片段 2 μ L,solution 5 μ L,ddH₂O 383.5 μ L,16 $^{\circ}$ C 反应 30 min,得到次级库 dsDNA 重组质粒。取已连接好的重组 DNA 10 μ L 加入感受态细胞,并设置阴性对照。涂板,置于含氨苄青霉素的 LB 固体培养基上培养。阳性克隆送上海生工测序。

SELEX 技术筛选过程见图 1。

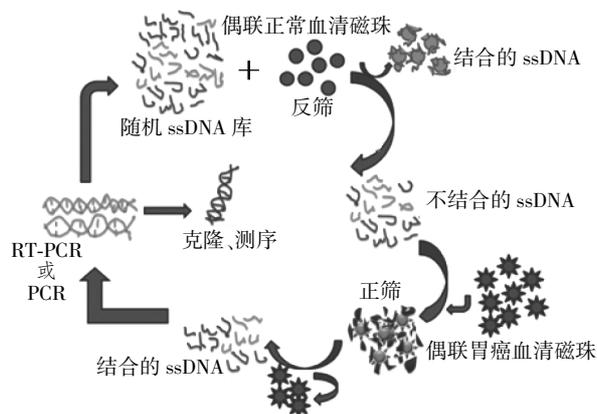


图 1 SELEX 技术筛选过程图^[17]

Figure 1 Process of aptamer selection by SELEX

1.2.10 流式细胞术测定胃癌血清适配体的 K_d 值

经过 10 轮筛选后富集得到的胃癌血清适配体连接上 FITC 标签,与羧基化琼脂磁珠在 1 \times Binding buffer 溶液中 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,用 1 \times Binding buffer 洗 3 次,每次 1 min。羧基化琼脂磁珠结合正常混合血清,偶联带有 FITC 标签的胃癌血清适配体,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,用 1 \times Binding buffer 洗 3 次,每次 1 min,作为阴性对照。FITC 标记的适配体用流式细胞术测定。用 Sigma Plot software 12.5(Jandel Scientific)分析,胃癌血清适配体的 K_d 值通过下面的方程式计算获得: $Y=B_{max}X/(K_d+X)$,其中 Y 代表平均荧光强度; B_{max} 代表所测得的最大荧光强度; K_d 为解离常数;X 为所加适配体的浓度。

1.2.11 胃癌血清适配体二级结构预测

测序所得序列,采用 RNA structure 5.3 软件,依据 DNA 最低自由能的运算法则,进行适配体二级结构预测和结构分析。

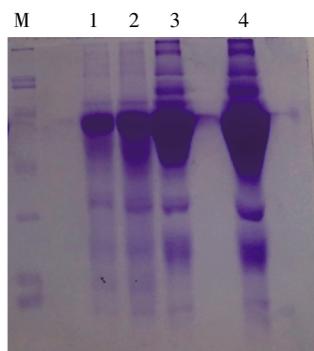
1.2.12 胃癌血清适配体特异性鉴定

将 5、7、16、17、18 号高特异性的胃癌血清适配体的序列送到上海生工合成。随机取 6 个胃癌患者血清, 分成 3 组, 分别标记为 A、B、C。A 组取 4 份等量羧基化琼脂磁珠, 分别标记为“1”、“2”、“a”、“b”, “1”、“2”EP 管偶联胃癌患者血清, “a”、“b”EP 管偶联正常人血清。“1”、“2”、“a”、“b”EP 管置于 37℃ 滚筒式恒温振荡器中孵育 1 h, 弃去上述载体中孵育的血清, “1”、“2”、“a”、“b”EP 管各加入 1 mL ssDNA (将 5、7、16、17、18 号合成的适配体用 4 mL 1× Binding buffer 溶解, 充分混匀, 95℃ 5 min, 4℃ 5 min), 置于 37℃ 滚筒式恒温振荡器中孵育 1 h; 弃去载体中的 ssDNA, “1”、“2”、“a”、“b”EP 管分别用 2×SSC 洗 5 遍, 分别加入 300 μL 纯水, 95℃ 5 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 收集上清, 通过 RT-PCR 进行检测。RT-PCR 反应体系包括上游引物 P7(25 pmol/μL)0.8 μL, 下游引物 Bio-P11(25 pmol/μL)0.8 μL, dNTP 混合物(2.5 mmol/L)8 μL, 10×buffer 10 μL, 荧光染料(super green I) 2 μL, rTaqDNA 聚合酶(5 U/μL)1 μL, 加去离子水使总体积为 100 μL, 充分混匀, 每管 20 μL 分装, 分别加入收集的上清各 10 μL, RT-PCR 检测。B、C 组按照 A 组的操作步骤进行。

2 结果

2.1 SDS-PAGE 电泳结果

截留分子量为 50 000 超滤管与 30 000、10 000 超滤管超滤后相比, 随着膜孔径的减小, 保留的蛋白质分子量也逐渐降低(图 2)。



1: 10 000 超滤管; 2: 30 000 超滤管; 3: 50 000 超滤管; 4: 未处理的胃癌血清; M: 蛋白分子量 Marker。

图 2 不同型号超滤管对小分子量低丰度蛋白富集效果比较的 SDS-PAGE 凝胶谱图

Figure 2 Comparison of the enrichment effect of different types of ultrafiltration tubes on small molecular weight and low abundance protein by SDS-PAGE gel spectrum

根据 SDS-PAGE 图谱可以看出, 截留标准分子量为 50 000 的超滤管保留蛋白质数量相对较多, 因此我们选择保留信息更多的 50 000 超滤管处理胃癌血清作为筛选用的目标靶分子。

2.2 胃癌混合血清复合靶 SELEX 筛选条件

共进行了 10 轮筛选, 各轮筛选条件如表 1。随着 SELEX 筛选轮数增多, 筛选条件越来越苛刻, ssDNA 文库/磁珠结合血清比例不断提高, 孵育时间不断缩短。

表 1 胃癌血清适配体 SELEX 筛选条件

Table 1 SELEX screening condition of gastric serum aptamers

轮次	磁珠量 (mL)	收获 ssDNA 文库量 (pmol)	ssDNA 文库量 (pmol)	胃癌混合血清量 (μL)	文库/磁珠结合血清	孵育时间 (min)
1	4.0	69.5	69.5	600	2	60
2	4.0	46.3	46.3	300	2	60
3	3.0	79.8	52.0	350	4	50
4	3.0	59.7	50.0	300	4	50
5	2.0	42.9	40.0	275	6	50
6	2.0	51.6	45.0	250	6	40
7	2.0	49.1	40.0	225	8	40
8	1.5	30.1	30.0	200	8	40
9	1.0	28.1	28.0	175	10	30
10	1.0	31.0	29.6	150	10	30

2.3 胃癌血清适配体的 K_d 值

筛选得到的胃癌血清适配体与正常人血清的结合明显弱于与胃癌血清的结合(图 3)。

采用流式细胞术进行适配体亲和性测定。结果显示, 与对照组相比, 筛选得到的 20 条适配体序列中的 5、7、16、17、18 号与胃癌血清结合的亲和性较高, 其中 17 号的亲和力最高。

2.4 测序结果

经过 10 轮筛选得到 20 个胃癌血清适配体序列(表 2)。

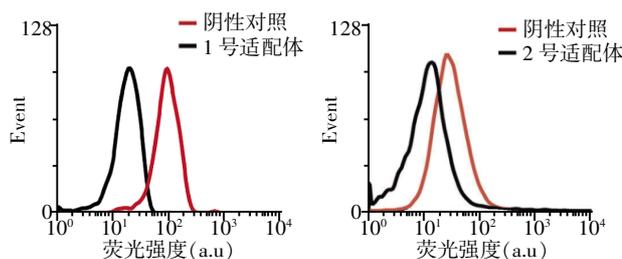


图 3 部分胃癌血清适配体 K_d 值测定结果

Figure 3 K_d value measurement results of part of gastric cancer serum aptamers

表 2 胃癌血清适配体序列

Table 2 Primer sequences of gastric cancer serum

编号	序列(5'→3')	K _d (nmol/L)
1	GGCAGTGCAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACGATTTTAGC	53.0 ± 7.2
2	TGCACTTTTGTCCCCCAGAGGCCGAATGCATAACCGGGT	79.0 ± 4.9
3	GGAAGTACCGTACCATTGCTATAAGTGAGTCGTAATCTCT	89.0 ± 9.6
4	GCTCGAATTCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTG	74.0 ± 6.6
5	CCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAA	99.0 ± 4.2
6	CTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCC	34.0 ± 2.4
7	TGCCCCGTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCA	109.0 ± 4.6
8	GGCCAACGCGCGGGGAGAGCGGTTTGCCTATTGGGCGCT	84.0 ± 6.9
9	GACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTAT	25.0 ± 4.9
10	AAAGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAAC	56.0 ± 5.6
11	AAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGGAACCGTAAAAAGCCCGC	67.0 ± 3.9
12	TTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAA	66.0 ± 4.6
13	GACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGC	55.0 ± 7.9
14	GCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGTTACCGGATACCTGTC	51.0 ± 2.6
15	CCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCACGCTGTA	46.0 ± 3.8
16	TTCGGTGTAGGTCGTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCAC	107.0 ± 7.9
17	TTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCT	112.0 ± 8.6
18	CCGGTAAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCAGCCA	106.0 ± 4.9
19	TTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTT	64.0 ± 3.6
20	GCCTGCAGGTCGACGATTTACGACTCACTATAGCAATGGT	61.0 ± 5.9

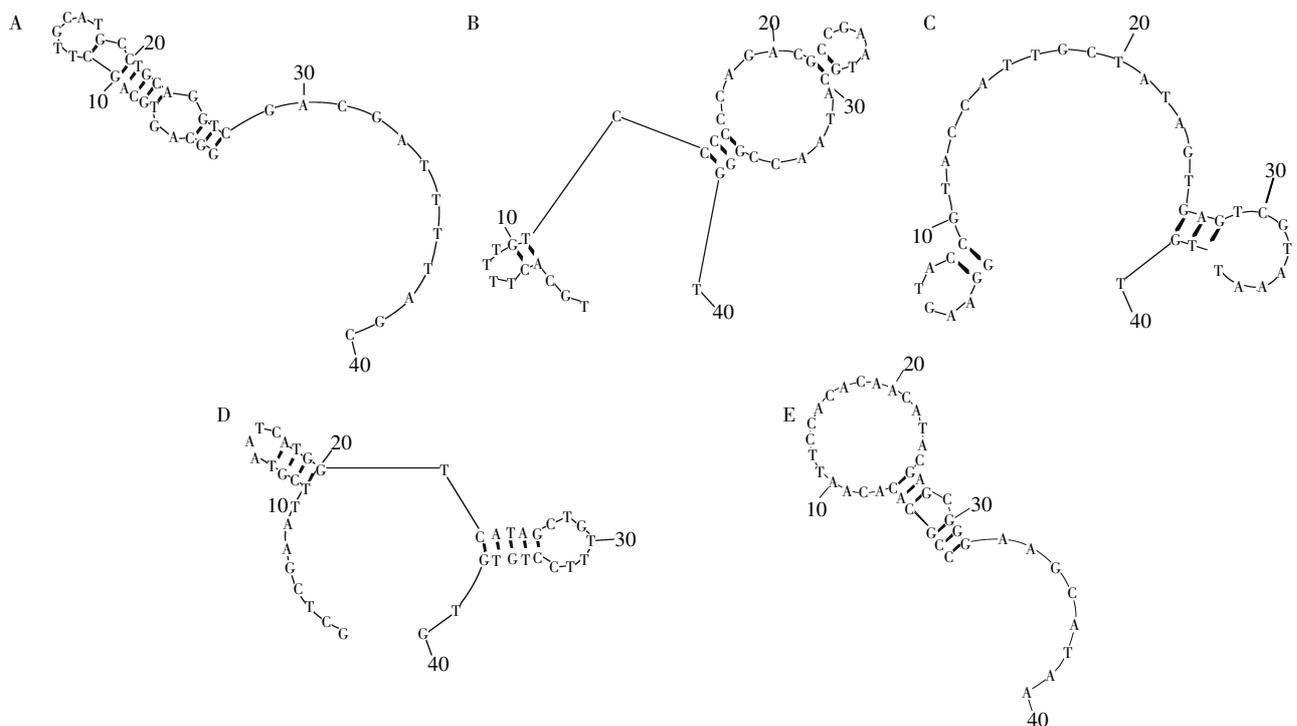
2.5 胃癌血清适配体二级结构预测结果

采用 RNA structure 5.3 软件,依据 DNA 最低自由能的运算法则,对部分胃癌血清适配体的核酸序列进行二级结构模拟分析,显示适配体有丰富的二

级结构(图 4)。

2.6 胃癌血清适配体进化树分析结果

将筛选得到的 20 个胃癌血清适配体序列导入 DNAMAN 软件得到聚类分析结果(图 5)。聚类分析



A: 1 号适配体; B: 2 号适配体; C: 3 号适配体; D: 4 号适配体; E: 5 号适配体。

图 4 部分胃癌血清适配体二级结构预测

Figure 4 Secondary structure prediction of part of gastric cancer serum aptamers

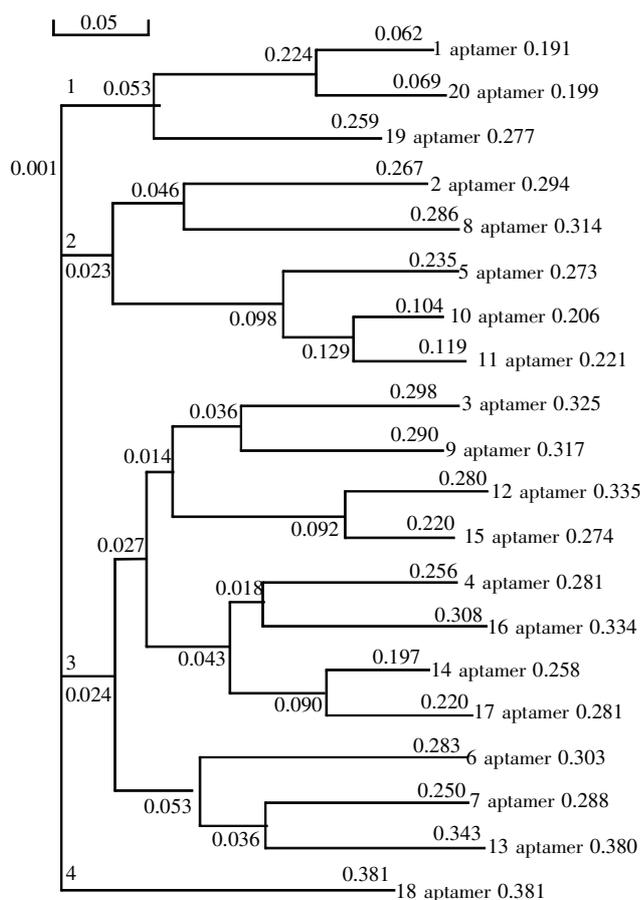


图 5 胃癌血清适配体进化树分析

Figure 5 Phylogenetic analysis of gastric serum aptamer

将 20 个胃癌血清适配体分为 4 个亚家族, 其中第 3 亚家族的适配体分布最多。

2.7 胃癌血清适配体特异性鉴定结果

经特异性鉴定试验, 合成的 5、7、16、17、18 号适配体序列只与胃癌血清特异性结合, 与正常人血清不结合(图 6)。说明筛选得到了高特异性、高亲和力的胃癌血清适配体。

3 讨论

SELEX 是应用大容量的随机寡核苷酸库, 并结合 PCR 体外扩增技术, 以指数富集与靶分子特异结

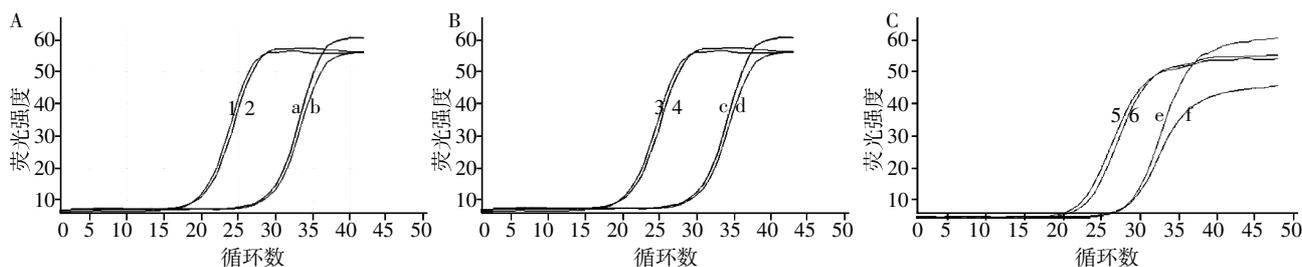
合的寡核苷酸, 经过几轮或数十轮筛选, 获得高亲和力和、高特异性的适配体。随机单链寡核苷酸文库中的 ssDNA 可以形成发夹、假结、凸环和 G-四分体等空间结构^[18-19], 然后与靶物质稳定地结合, 通过筛选和富集, 最终获得高亲和力、高特异性的适配体序列。适配体是功能上与抗体类似的单链 DNA 或 RNA 片段, 但又具有抗体无法比拟的优越性, 如稳定性、可修饰性以及与靶物质结合的高特异性^[20-21]。

为了在筛选过程中扣除相似非目标靶物质上所具有的靶分子适配体, 筛选时先进行 3 轮反筛, 反筛后的上清再与胃癌血清磁珠复合物孵育。筛选中所用的 ssDNA 与胃癌血清用量直接关系到筛选是否成功。ssDNA 与胃癌血清用量要大。后续的筛选是为了筛选得到特异性更强的胃癌血清适配体, ssDNA 与胃癌血清的用量随着筛选轮数的增加逐渐减少, 但 ssDNA/胃癌血清要提高, 使亲和力更强的 ssDNA 竞争到胃癌血清蛋白上的结合靶点, 同时逐渐加大洗脱力度洗去亲和力相对较弱的 ssDNA, 以获得特异性更高、亲和力更强的胃癌血清适配子。

利用 RNA structure 模拟适配体的二级结构, 结果显示, 适配体以茎环和口袋结构为主, 这可能是适配体与胃癌血清蛋白结合的结构基础。

血清是体外诊断研究的最佳标本, 同时, 肿瘤标志物的检测是临床上唯一的无创性诊断手段^[22]。胃癌作为严重威胁人类健康及生命的恶性肿瘤之一, 受到人们的高度关注, 早期诊断和早期治疗是提高胃癌患者存活率的关键。本研究针对多项胃癌血清肿瘤标志物, 通过 SELEX 技术筛选其适配体组, 建立一种利用特异性寡核苷酸适配体组检测多种胃癌血清肿瘤标志物的分子生物学检测新技术, 从而提高了诊断的准确度和灵敏度。同时, 利用靶标替换消减 SELEX 技术筛选得到未知的胃癌血清肿瘤标志物, 最终建立胃癌早期、中期、晚期血清标志物谱库^[23], 为胃癌的诊断和治疗提供新的突破口。

综上所述, 本研究通过靶标替换消减 SELEX 技



1~6: 分别代表 6 个不同的胃癌患者血清; a~f: 分别代表 6 个不同的正常人血清。

图 6 胃癌血清适配体特异性鉴定结果

Figure 6 Results of specific identification of gastric serum cancer aptamers

术及 λ 酶切法制备 ssDNA, 成功筛选得到 20 条胃癌血清适配体, 其中 5、7、16、17、18 号适配体能高特异性、高亲和力结合胃癌血清, 与正常人血清不结合。

[参考文献]

- [1] 陈万青, 郑荣寿, 曾红梅, 等. 1989-2008 年中国恶性肿瘤发病趋势分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2012, 34(7): 517-524
- [2] 李岩. 胃癌肿瘤标志物及临床意义[J]. 实用医院临床杂志, 2011, 8(1): 11-15
- [3] 李茵, 廖明, 何晓, 等. 乙腈、乙醇、色谱柱去除血清高丰度蛋白方法的比较[J]. 卫生研究, 2012, 41(6): 976-980
- [4] 廖秋林, 丁彦青, 赵亮. 血清蛋白质组学研究中高丰度蛋白去除方法的建立[J]. 北京医学, 2007, 29(5): 293-296
- [5] 黄晶, 李涛, 周克元. 血清肿瘤标志物[J]. 生命的化学, 2010, 30(4): 567-570
- [6] 徐明星, 李曼, 彭波. 肿瘤标志物联检在胃癌早期诊断临床应用研究[J]. 中国实验诊断学, 2015, 18(6): 899-902
- [7] 李克, 曹璐颖. 血清蛋白质组学技术在肿瘤血清标志物筛选中的应用[J]. 医学前沿, 2012, 41(9): 18-21
- [8] 李萃, 肖志强. 人肺鳞癌组织的血清蛋白质组学的比较分析[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2005, 21(3): 357-368
- [9] Jou YJ, Lin CD, Lai CH. Proteomic identification of salivary transferrin as a biomarker for early detection of oral cancer[J]. Anal Chim Acta, 2010, 68(1): 41-48
- [10] Du J, Yang S, Lin X. Use of anchor chip time of flight spectrometry technology to screen tumor biomarker proteins in serum for small cell lung cancer [J]. Diagn Pathol, 2010, 5(5): 60-65
- [11] Elyse DB, Kathy CN, Maria C. Development of a bead-based aptamer/antibody detection system for C-reactive protein[J]. Anal Biochem, 2015, 62(6): 67-74
- [12] Sturgeon CM, Duffy MJ, Hofmann BR, et al. National academy of clinical biochemistry laboratory medicine practice guidelines for use of tumor markers in liver, bladder, cervical, and gastric cancers [J]. Clin Chem, 2010, 56(6): 1-48
- [13] Ellington AD, Szostak JW. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands[J]. Nature, 1990, 346(6287): 818-822
- [14] 胡燕, 杨先达. 核酸适配体在肿瘤学中的应用研究进展[J]. 基础医学与临床, 2012, 32(3): 345-348
- [15] 覃健, 张志勇, 何敏, 等. 两种去除血清高丰度蛋白方法的比较[J]. 预防医学情报杂志, 2010, 26(4): 322-324
- [16] 王维林, 白鑫, 屠红. 肝癌血清标志物研究的新进展[J]. 肿瘤, 2009, 29(4): 389-391
- [17] Wang DL, Song YL, Zhu Z, et al. Selection of DNA aptamers against epidermal growth factor receptor with high affinity and specificity[J]. Bioc Biophys Res Commun, 2014, 453: 681-685
- [18] Szeitner Z. Is less more lessons from aptamer selection strategies[J]. J Pharm Biomed Anal, 2014, 6(101): 58-65
- [19] Wang CY, Hung TC. Sequence-constructive SELEX: A new strategy for screening DNA aptamer binding to Globo H [J]. Bioc Biophys Res Commun, 2014, 33(8): 484-489
- [20] 赵娟, 顾月清. 核酸适配体在肿瘤诊断与治疗中的研究进展[J]. 药物生物技术, 2013, 20(4): 369-372
- [21] Willner I, Zayats M. Electronic aptamer-based sensors[J]. Angew Chem Int Ed, 2007, 46(27): 6408-6418
- [22] 陈文学. 肝癌血清核酸适配体的筛选及其鉴定[J]. 肿瘤, 2011, 25(5): 364-369
- [23] 曾家豫, 万波, 马瑾, 等. 癌胚抗原特异性单克隆抗体(Anti-CEA)核酸适配体的筛选[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2015, 35(6): 782-786

[收稿日期] 2016-03-03