

癌胚抗原特异性单克隆抗体(Anti-CEA)核酸适配体的筛选

曾家豫¹, 万波¹, 马瑾², 袁红霞², 李星¹, 赵运旺¹, 廖世奇^{2*}

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

[摘要] 目的: 筛选癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)特异性单克隆抗体(Anti-CEA)的核酸适配体(aptamers), 为肺癌血清肿瘤标志物核酸适配体的筛选奠定实验基础。方法: 利用羧基化琼脂磁珠作为筛选介质, 以 Anti-CEA 为筛选的目标靶分子, 通过消减 SELEX 技术及实时定量 PCR 技术, 从随机 ssDNA 文库中筛选出与 Anti-CEA 特异性结合的 aptamers, 并通过凝胶阻滞实验(EMSA)鉴定筛选到的 Anti-CEA-aptamer 复合物, 然后将得到的第 10 轮富集文库扩增为双链 DNA, 通过切胶纯化后, 连接 PMD18-T 载体, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 同时利用交错 PCR 技术鉴定阳性克隆, 经测序, 获得 aptamers 的序列。结果: 经过 10 轮筛选得到了 4 条与 Anti-CEA 结合的 aptamers, 测序结果显示均为不同序列。结论: 验证筛选出的与 Anti-CEA 结合的 aptamer, 特异性检测结果表明 2 号 aptamer 与靶分子结合的特异性很高, 且与非特异蛋白无明显吸附, 筛选出的 aptamers 用于识别 Anti-CEA, 将为肺癌的早期诊断和早期治疗提供新的突破口。

[关键词] 消减 SELEX 技术; 羧基琼脂磁珠; CEA 特异性单克隆抗体; 核酸适配体; 肺癌

[中图分类号] R392-33

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)06-782-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20150605

Selection of aptamers to Anti-CEA

Zeng Jiayu¹, Wan Bo¹, Ma Jin², Yuan Hongxia², Li Xing¹, Zhao Yunwang¹, Liao Shiqi^{2*}

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

[Abstract] **Objective:** To screen aptamers to carcinoembryonic antigen (Anti-CEA), which will lay the experimental foundation for obtaining aptamers to serum tumor markers of lung cancer. **Methods:** We used carboxyl magnetic microspheres (CMM) as carrier, anti-CEA for the screening target, and subtractive SELEX as well as real-time quantitative PCR techniques to screen aptamers to anti-CEA from random single-stranded oligonucleotide libraries. We identified the anti-CEA-aptamers via electrophoretic mobility shift assay (EMSA). And then, the 10th round of screening was amplified for double-stranded DNA, purified by gel after cutting, connected with PMD18-T vector and transformed in the competent cell of *E.coli.DH5 α* . Meanwhile, we identified positive clones through interlaced PCR technique. Finally, we obtained sequences of aptamers. **Results:** The results showed that four aptamers connected with Anti-CEA were obtained with different sequences after 10 rounds of screening. **Conclusion:** The specificity test of screened binding aptamers demonstrated that with No.2 aptamer has a high specificity to Anti-CEA, and it could not be bound with non-specific proteins. These aptamers could be used to recognize the Anti-CEA, ultimately, to offer a new breakthrough for the early diagnosis and early treatment of lung cancer.

[Key words] subtractive SELEX; carboxyl magnetic microspheres; Anti-CEA; aptamer; lung cancer

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(06): 782-786]

肺癌是目前全球范围内致死率最高的恶性肿瘤之一, 严重威胁人类的生命健康。许多临床就诊的肺癌患者属于癌症中晚期, 以致失去了最佳治疗

机会。此外, 肺癌患者的 5 年生存率极低, 仅有 5%~10%^[1]。因此, 早期诊断和早期治疗是提高肺癌生存率的关键。目前, 临床上采用肺癌血清肿瘤标志物联合检测的诊断手段, 提高了肺癌诊断的准确性和灵敏度^[2]。最常见的肺癌血清肿瘤标志物有: 神经元特异性烯醇化酶(NSE)、癌胚抗原(carcinoembryonic

[基金项目] 国家自然科学基金(81360333)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: shanshan00dream@163.com

antigen, CEA)、细胞角蛋白 19 片段(CYFRA21-1)、胃泌素释放肽前体(ProGRP)、鳞状细胞癌相关抗原(SCC-Ag)等^[3]。其中 CEA 是一种大分子糖蛋白,与肺癌的关系已经有大量文献报道,其可作为早期肺癌诊断及预后判断的指标。然而 CEA 的提取纯化技术有限,因此本研究选用 Anti-CEA。核酸适配体(Aptamer)是一种具有高亲和力、强特异性的识别目标靶分子的单链 DNA 或 RNA^[4]。其具有优于传统抗体的诸多优点,例如:作用的靶分子范围比较广泛,无免疫原性,稳定性很好且易于修饰等,因而可以代替抗体用于临床检测和治疗。Aptamer 的筛选主要依赖于 SELEX 技术,本实验采取的消减 SELEX 技术是一种新型的改良 SELEX 技术,其主要原理为 SELEX 筛选时去除与非特异靶分子结合的寡核苷酸序列,然后将消减后的次级文库作为目标靶分子结合的文库进行筛选^[5]。

此外,本研究采用的羧基化琼脂磁珠是目前一种新型的筛选介质,它是对琼脂磁珠进行一定的表征,使表面赋予新的官能团即-COOH,作为一种阴离子交换基团,与表面带正电荷的靶蛋白偶联,用于研究靶蛋白与 DNA 结合的特性。与普通磁性材料相比,具有较强的超顺磁性,并且修饰过的磁珠具有良好的生物相容性,易于吸附蛋白^[6-8]。最终本研究筛选到的 Anti-CEA 的 aptamers 可特异识别 Anti-CEA,为肺癌的早期诊断和早期治疗提供新的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠 Anti-CEA 抗体(100 μg , sc-48374, Santa Cruz 公司, 美国); 小鼠抗 HBsAg 单克隆抗体(2.1 mg/mL, P3G9A8, 北京科卫临床诊断试剂有限公司); 兔抗 CD133 单克隆抗体(100 μL , 3621-1, Abcam 公司, 美国); 随机 ssDNA 文库(88 nt, 1.2 nmol): 5'-CTATAGCAATGGTACGGTACTTCC(40N)CAAA-AGTGCACGCTACTTTGCTAA-3' (N=A、G、T、C), 引物 P7: 5'-CTATAGCAATGGTACGGTACTTCC-3', 引物 P11: 5'-TTAGCAAAGTAGCGTGCACTTTTG-3', 交错 PCR 通用引物 M13-47: 5'-CGCCAGGGTTTTC-CCAGTCACGAC-3' (上海生工生物工程公司); 羧基化琼脂磁珠、大肠杆菌 DH5 α (甘肃省医学科学研究院医学分子生物研究中心提供); PMD18-T 载体系统及 PCR 所用相关试剂(TaKaRa 公司, 日本); 其他试剂均为分析纯。

GeneAmp PCR System 2700PCR 仪 (Applied

Biosystems 公司, 美国); MVT-28 凝胶成像仪(Herolab 公司, 德国); ROTOR-GENE 3000 实时定量 PCR 仪 (Rotor-Gene 公司, 美国); 迷你双垂直电泳槽 DYCZ-24DN(北京六一仪器厂); SHZ-82 恒温调速摇床(常州国华仪器有限公司); TGL-16A 高速冷冻离心机(长沙平凡仪器仪表有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 Anti-CEA 核酸适配体的筛选

①结合: 取适量羧基化琼脂磁珠, 将其等量分配, 并置于 2 个 1.5 mL EP 管中, 分别为标记“+”“-”。“+”管中加入 50 μL 稀释 5 倍的 Anti-CEA (1 mg/mL), 即筛选管;“-”管中加入 50 μL 稀释 50 倍的 Anti-HBsAg 即反筛管, 将其置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h; ②封闭: 弃去抗体, 用 0.01 mol/L pH 为 7.4 的 PBS 溶液分别对筛选管和反筛管洗涤 3 遍后, 各加入 1 mL 封闭液 (含 0.1% 牛血清白蛋白及 0.1% 酪蛋白), 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h; ③结合随机 ssDNA 文库: 弃去封闭液, 用含 1.5 mmol/L Mg^{2+} 的 PBS 溶液分别对筛选管和反筛管洗涤 3 遍后, 将预处理的文库先加入反筛管中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, 然后吸取反筛管中的上清将其加入筛选管, 并置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h。收集筛选管中的上清后, 用含 0.3% Tween-20 的 1.5 mmol/L Mg^{2+} 的 PBS 溶液分别对筛选管和反筛管洗涤 3 遍, 并分别换管后用 PBS 溶液洗涤 1 遍。分别换入 PCR 管, 并加入 90 μL 1.5 mmol/L Mg^{2+} 的 PBS 溶液于“+”“-”管中, 置于 GeneAmp PCR System 2700 PCR 仪 (95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 1 min), 10 000 r/min 离心 1 min。分别吸取上清并保存; ④富集效果检测: 取保存的筛选管和反筛管中的上清各 6 μL , 加入实时定量 PCR 体系后, 置于 ROTOR-GENE 3000 实时定量 PCR 仪上机检测 ssDNA 的富集程度 (95 $^{\circ}\text{C}$ 6 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 34 s, 扩增 50 个循环)。100 μL 实时定量 PCR 体系: 10 \times Buffer 10 μL , 4 种 dNTP 混合液 (每种 25 mmol/L) 0.8 μL , 引物 P7 0.15 μL , 引物 P11 0.15 μL , Taq DNA 聚合酶 0.5 μL , 荧光染料 (super green I) 1 μL , 超纯水 87.4 μL 。配制好的体系快速混匀后, 分装置 PCR 管, 每管 24 μL 。

1.2.2 制备次级文库

参照廖世奇等^[9]实验中的不对称 PCR 技术制备次级文库。

①探索最佳双链循环数: 配制 100 μL PCR 体系: 10 \times Buffer 10 μL , 模板 10 μL (电泳后保存的筛选管中的上清), 20 mmol/L Mg^{2+} 4 μL , 4 种 dNTP 混合液 (每种 25 mmol/L) 0.8 μL , 引物 P7 1 μL , 引物

P11 1 μL , *Taq* DNA 聚合酶 0.5 μL , 超纯水 72.7 μL 。分装于 PCR 管, 每管 10 μL , 取其中 4 管置于 GeneAmp PCR System 2700 PCR 仪扩增 (95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s), 每隔 3 个循环取一管。然后对上述取出的样品进行非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳确定最佳双链循环数, 并以筛选管中的上清为模板, 加入 4 份实时定量 PCR 体系, 扩增至最佳双链循环数, 得到双链; ②探索最佳单链循环数: 配制 100 μL 不对称 PCR 体系: 10 \times Buffer 10 μL , 模板 10 μL (扩增得到的双链), 20 mmol/L Mg^{2+} 4 μL , 4 种 dNTP 混合液 (每种 25 mmol/L) 0.8 μL , 引物 P7 2 μL , 引物 P11 0.2 μL , *Taq* DNA 聚合酶 1 μL , 超纯水 72 μL 。分装于 PCR 管, 每管 10 μL , 取其中 6 管置于 PCR 仪扩增 (扩增条件同上), 每隔 5 个循环取一管。然后对上述取出的样品进行变性聚丙烯酰胺凝胶电泳确定最佳单链循环数; ③配制 200 μL PCR 混合体系, 以上述最佳单链循环数为标准大量扩增 ssDNA, 切胶纯化得到次级文库。

1.2.3 采用 EMSA 鉴定 Anti-CEA-aptamer 复合物

第 10 轮富集的筛选管 ssDNA, 取其中 10 μL , 并加入 5 μL 稀释 5 倍的 Anti-CEA 混合后记为 1 号样, 2 号样为 10 μL 稀释 5 倍的 Anti-CEA, 3 号样为 10 μL ssDNA, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$, 孵育 1 h。然后对上述 3 个样品进行琼脂糖凝胶电泳 (配制 1% 琼脂凝胶, 电压 80 V, 电泳 1 h), 观察 Anti-CEA-aptamer 复合物的阻滞条带。

1.2.4 转化克隆测序

以第 10 轮筛选产物连接 PMDTM18-T 载体, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 挑取克隆团, 并利用交错 PCR 技术鉴定后送去上海派森诺生物科技有限公司测序, 获得 aptamers 的序列。

1.2.5 Anti-CEA 与 aptamers 结合的特异性鉴定

取 4 份等量羧基化琼脂磁珠, 分别偶联 Anti-CEA、抗 HBsAg 抗体、CD133 特异性单克隆抗体、牛血清白蛋白。按照 1.2.1 方法所述, 结合文库为第 10 轮的筛选产物, 检测筛选到的 aptamers 与 Anti-CEA 结合的特异性。

2 结果

2.1 Anti-CEA 核酸适配体筛选结果

第 1 轮筛选结果: 筛选管及反筛管无区分, 即靶蛋白与文库无明显富集 (图 1)。经过 10 轮筛选后, 筛选管及反筛管中 ssDNA 的富集程度有明显差异 (图 2), 差异在 5 个循环数左右, 并且筛选到

第 10 轮时筛选管 ssDNA 的富集和第 9 轮一样, 即富集程度已经达到最大, 表明成功筛选到 Anti-CEA 的 aptamers。

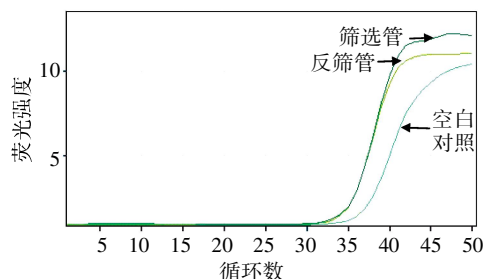


图 1 第 1 轮筛选结果

Figure 1 The result of the first round

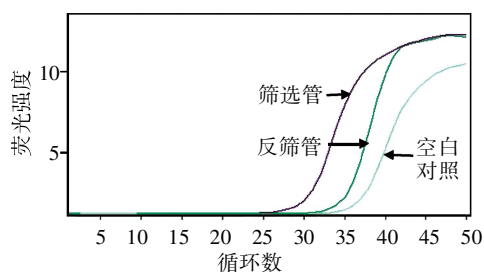


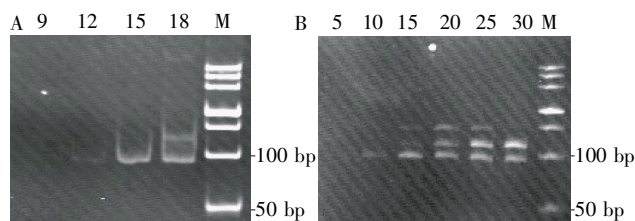
图 2 第 10 轮筛选结果

Figure 2 The result of the 10th round

2.2 制备次级文库

以阳性筛选管为模板, 寻找最佳双链循环数。如图 3A 所示, 第 10 轮筛选富集的 ssDNA 最佳双链循环数为 15, 通过实时定量 PCR 仪扩增至 15, 然后以此为模板, 寻找最佳单链循环数; 如图 3B 所示, 在循环数为 30 时, 单双链明显分开, 而且无杂带, 即 30 为最佳单链循环数; 在变性聚丙烯酰胺凝胶电泳时, 片段长度相同的 ssDNA 和 dsDNA, 其 ssDNA 的泳动速度比 dsDNA 慢, 进而能有效分离单双链^[10]。则图中 30 对应的上条条带为 ssDNA, 下条条带为 dsDNA, 按照循环数 30 大量扩增 ssDNA 切取对应的条带, 切胶纯化作为次级文库。

2.3 EMSA 鉴定 Anti-aptamer 复合物结果



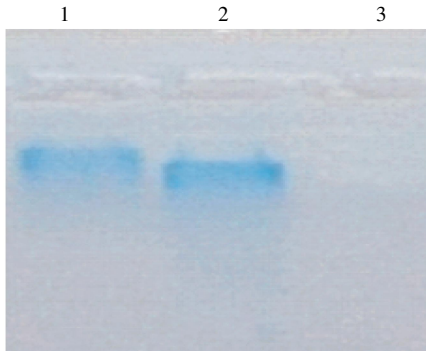
A: 筛选最佳双链循环数, 9、12、15、18 为扩增的循环数; B: 筛选最佳单链循环数, 5、10、15、20、25、30 为扩增的循环数; M: DNA marker。

图 3 最佳双链循环数和最佳单链循环数

Figure 3 The best double-stranded loop count and the best single-stranded loop count

如图 4 所示, Anti-aptamer 复合物条带, 与 Anti-CEA 和 aptamer 条带相比, 被明显阻滞。

2.4 交错 PCR 鉴定阳性克隆及测序结果



1: Anti-aptamer 复合物条带; 2: Anti-CEA; 3: aptamer.

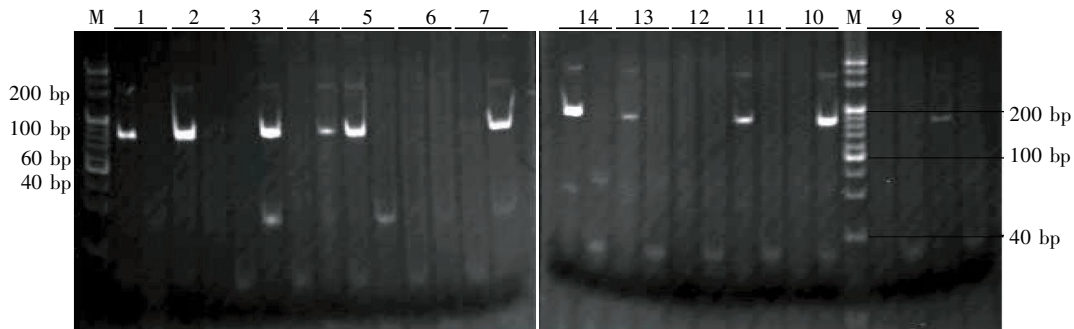
图 4 EMSA 鉴定结果

Figure 4 The result of EMSA identification

随机挑取 14 个克隆团, 通过交错 PCR 技术, 将通用引物 M13-47 分别与引物 P7、P11 组合, 并加入挑取的克隆团菌液, 经 PCR 扩增。若通用引物 M13-47 与 P7 组合在 170~180 bp 之间扩增出核酸条带, 证明目的片段正向插入载体; 若通用引物 M13-47 与 P11 组合在 170~180 bp 之间扩增出核酸条带, 证明目的片段反向插入载体。结果如图 5 所示: 170~180 bp 之间部分克隆有一条清晰组合条带, 另一条无条带, 证明筛选的 aptamer 转化成功。测序结果如下: 5'-CTAGGATCCCCACTCACCATCTCTCAGCTTGCTTCCTAGC-3'。

2.5 Anti-CEA 与 aptamers 结合的特异性鉴定结果

经特异性鉴定试验所示: 2 号 aptamer 与 Anti-CEA 作用的特异性很强, 与其他非特异蛋白均无吸附(图 6)。



M: DNA Marker; 1、2、3、4、5、7、8、9、10、11、13、14 为不同的菌液样品; 6、12 为空白对照。

图 5 交错 PCR 鉴定结果

Figure 5 The result of interlaced PCR identification

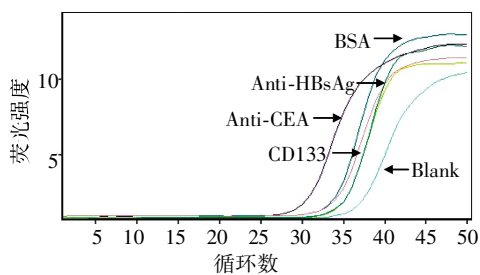


图 6 Anti-CEA 与 aptamers 结合的特异性鉴定

Figure 6 The specificity of aptamers bound with Anti-CEA

3 讨论

利用消减 SELEX 技术筛选 aptamers 的方法成本较低、操作简单、快速、高效, 并且能最大限度地去除非特异蛋白的富集, 筛选效率得到很大提高。其 aptamers 具有结构的多样性, 与各种目标靶蛋白结合时显示出高选择性、强亲和力和高特异性, 在检测蛋白方面, 优于传统的抗原-抗体免疫手段^[11-12], 具有广阔的应用前景。

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^[13]。肺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肺癌患者存活率的关键。本研究拟针对多项肺癌血清肿瘤标志物, 通过 SELEX 技术筛选其 aptamers, 建立一种利用特异性寡核苷酸适配体组, 同时检测多种肺癌血清肿瘤标志物的分子生物学检测新技术, 从提高诊断的准确度和灵敏度。同时, 利用 SELEX 技术探索未知的肺癌血清肿瘤标志物, 最终建立肺癌早期、中期、晚期血清标志物谱库, 为肺癌的早期诊断和早期治疗提供新的突破口。

本研究针对 CEA 特异性单克隆抗体筛选核酸适配体, 通过验证目标靶蛋白与适配体结合的特异性, 为今后其他肺癌血清肿瘤标志物 aptamers 的筛选奠定了良好的实验技术基础。此外, 采用羧基琼脂磁珠作为筛选介质, 提高了靶蛋白与载体的偶联率, 是目前 SELEX 筛选中良好的载体材料, 今后将通过

链霉亲和素与生物素之间较强的作用力,探索新的制备 ssDNA 的方法,进一步提高筛选效率。

[参考文献]

- [1] Cai D, Xu D, Zhang Q, et al. Classification of lung cancer using ensemble-based feature selection and machine learning methods[J]. *Molecular biolystems*, 2014, 464 (7291): 1071-1076
- [2] 杜淑英. 血清 5 种肿瘤标志物联合检测在肺癌诊断中的价值[J]. *北方医学*, 2014, 11(9): 85-86
- [3] 廖世奇, 万波, 曾家豫, 等. 肺癌血清肿瘤标志物及其检测方法研究进展[J]. *甘肃医药*, 2014, 32(11): 826-830
- [4] 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
- [5] 邵宁生, 杨光, 房涛, 等. 生物库技术[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2011: 68
- [6] 崔海燕. 磁性纳米磁珠在微生物学检测中的应用[J]. *微生物学免疫学进展*, 2011, 39(2): 57-60
- [7] 林梅双, 吴晓蔓. 羧基磁性吸附乙型肝炎病毒的表面抗原的性能研究[J]. *检验医学与临床*, 2013, 10(22): 2978-2980
- [8] 曾家豫, 杨楠, 万波, 等. 环氧基磁性微球的制备及表征[J]. *西北师范大学学报: 自然科学版*, 2014, 50(2): 93-99
- [9] Liao SQ, Liu YQ, Zeng JY, et al. Aptamer-based sensitive detection of target molecules via RT-PCR signal amplification[J]. *Bioconjugate Chem*, 2010, 21(12): 2183-2189
- [10] Ni X, Castanares M, Mukherjee A, et al. Nucleic acid aptamers: clinical applications and promising new horizons[J]. *Curr Med Chem*, 2011, 18(27): 4206-4214
- [11] 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
- [12] Willner I, Zayats M. Electronic aptamer-based sensors[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2007, 46(27): 6408-6418
- [13] 陈文学. 肝癌血清核酸适配体的筛选及其鉴定[D]. 南昌: 南昌大学, 2011

[收稿日期] 2015-01-18

(上接第 781 页)

- ceptor 4[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(7): 2348-2352
- [8] Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway[J]. *Cytokine*, 2008, 42(2): 145-151
- [9] Kumar L, Chhibber S, Harjai K. Zingerone suppresses liver inflammation induced by antibiotic mediated endotoxemia through down regulating hepatic mRNA expression of inflammatory markers in *Pseudomonas aeruginosa* peritonitis mouse model[J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e106536
- [10] Sturgeon JP, Shawcross DL. Recent insights into the pathogenesis of hepatic encephalopathy and treatments[J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2014, 8(1): 83-100
- [11] Prima V, Wang A, Molina G, et al. Inhibition of LPS toxicity by hepatic argininosuccinate synthase (ASS): novel roles for ASS in innate immune responses to bacterial infection[J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(9): 1180-1188
- [12] Lau C, Gunnarsen KS, Hoydahl LS, et al. Chimeric anti-CD14 IGG2/4 Hybrid antibodies for therapeutic intervention in pig and human models of inflammation[J]. *J Immunol*, 2013, 191(9): 4769-4777
- [13] Hurley JC. Towards clinical applications of anti-endotoxin antibodies; a re-appraisal of the disconnect[J]. *Toxins (Basel)*, 2013, 5(12): 2589-2620
- [14] Kellner C, Derer S, Valerius T, et al. Boosting ADCC and CDC activity by Fc engineering and evaluation of antibody effector functions[J]. *Methods*, 2014, 65(1): 105-113
- [15] 王宇恒, 郭薇, 王欣, 等. Fc 融合蛋白在药学领域的研究进展[J]. *药学进展*, 2014, 38(6): 419-425
- [16] Seidel UJ, Schlegel P, Lang P. Natural killer cell mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in tumor immunotherapy with therapeutic antibodies[J]. *Front Immunol*, 2013, 4: 767

[收稿日期] 2015-03-17