

论著 · 基础研究

癌胚抗原 ssDNA 核酸适配子的体外筛选及鉴定*

邢福军¹, 查成喜¹, 王小萍¹, 韩跃武²

(1. 甘肃省中医院, 兰州 730050; 2. 兰州大学, 兰州 730000)

摘要:目的 通过 SELEX 技术筛选获得癌胚抗原(CEA)特异性核酸适配子, 为建立 CEA 适配子检测方法和肿瘤靶向治疗奠定实验基础。方法 构建长度为 88 bp 的随机 ssDNA 文库, 体外筛选入血清 CEA 特异性适配子, 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测特异性适配子结合蛋白。结果 经过优化体外筛选条件, 经 12 轮筛选, 获得特异性核酸适配子, 经 SDS-PAGE 证实了其识别并特异性结合的物质为人血清 CEA。结论 经体外 12 轮筛选, 证实了所获得的 CEA 适配子可特异性地与人血清 CEA 蛋白结合, 为后续建立 CEA 特异性检测平台提供基础, 也为靶向治疗药物的研制提供一定的思路。

关键词:癌胚抗原; ssDNA; 检测; 靶向治疗
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.14.009 **中图法分类号:**R446.6
文章编号:1673-4130(2018)14-1694-04 **文献标识码:**A

Screening and verification of ssDNA aptamers for carcinoembryonic antigen in vitro*

XING Fujun¹, ZHA Chengxi¹, WANG Xiaoping¹, HAN Yuewu²

(1. Traditional Chinese Medicine of Gansu Provincial Hospital, Lanzhou, Gansu 730050, China;
2. Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000, China)

Abstract: **Objective** To obtain specific aptamers of carcinoembryonic antigen (CEA) by SELEX in order to lay an exper sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis imental foundation for the establishment of CEA aptamer detection and tumor targeting therapy. **Methods** A random ssDNA library with the length of 88 bp was constructed to screen specific aptamers of CEA in vitro, and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was used to detect specific aptamer binding proteins. **Results** Specific aptamers were obtained after 12 rounds of screening by optimizing screening conditions, and the specific binding substance was human serum CEA which was confirmed by SDS-PAGE. **Conclusion** Aptamers, that bind human serum CEA specifically, can be used to establish CEA specific detection platform and design targeting drugs.

Key words: carcinoembryonic antigen; ssDNA; detection; targeting therapy

广谱性肿瘤标志物癌胚抗原(CEA)已广泛应用于临床多种恶性肿瘤如结直肠癌、乳腺癌、肺癌等的疗效判断、病情发展、监测和预后评估^[1], 尤其在监测结直肠癌的复发、转移方面有着独特的价值^[2-3]。然而, 实验室检测多采用单克隆抗体, 它存在制备技术复杂、费时费工、价格昂贵、生物稳定性差等特点, 极大地限制了其在临床疾病诊断、治疗及预后检测中的应用。近年来, 随着分子生物学技术的发展, 检测研究方面开发了许多新的工具, 尤其是一种被称为核酸适配子的探针, 它是能广泛结合分子和细胞的单链 DNA 或 RNA 寡核苷酸, 通过分子间相互作用折叠成

独特的三级空间结构, 从而以高亲和性、高特异性与靶标相结合。然而目前核酸适配子在肿瘤学检测方面仍处于研究阶段。本研究旨在试图筛选出能与 CEA 特异性结合的适配子, 为后续建立 CEA 特异性检测平台提供基础, 也为靶向药物治疗研制提供一定的思路。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 链霉亲和素磁珠及磁力架购自 Promega; 帝肯酶标仪购自瑞士; 辣根过氧化物酶标记及未标记鼠抗人 CEA 抗体购自美国 Abcam; 酵母 tRNA、PCR 相关试剂、PCR 产物纯化试剂、50 bp

* 基金项目: 甘肃省卫生行业科研计划项目(GSWST2013-07)。
作者简介: 邢福军, 男, 主任技师, 主要从事临床检验研究。
本文引用格式: 邢福军, 查成喜, 王小萍, 等. 癌胚抗原 ssDNA 核酸适配子的体外筛选及鉴定[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(14): 1694-1697.

DNA step ladder 及蛋白质 ladder 购自上海生工生物工程有限公

1.2 方法

1.2.1 文库的构建和引物的合成 构建一个长度为 88 bp 的随机 ssDNA 文库,两端为 18 bp 固定引物序列,中间 52 个 nt 随机序列,库容量大约为 1 016。合成的序列如下:5'-ATA CCA GCT TAT TCA ATT-52 nt-AGA TAG TAA GTG CAA TCT-3';引物序列如下:P1 为 5'-ATA CCA GCT TAT TCA ATT-3',P2 为 5'-Bio-ATA CCA GCT TAT TCA ATT-3',P3 为 5'-AGA TTG CAC TTA CTA TCT-3'。文库和引物均由上海生工生物工程有限公司合成,高效液相色谱法纯化。

1.2.2 SELEX 筛选 未标记 CEA 抗体(100 pmol)包被于 96 孔板上,4 ℃湿盒过夜,包被液为 0.05 mol/L NaHCO₃,pH9.6,同时设 3 个阴性孔。CEA 抗体孔和 1 个阴性孔均以 3%牛血清清蛋白(BSA)于 37 ℃封闭 2 h,CEA 抗体孔加入含 CEA 血清,37 ℃结合 30 min,随机 ssDNA 文库加入 SHMCK 液,95 ℃变性 5 min 后迅速冰浴 10 min,恢复至室温。含有文库的结合缓冲液先分别与阴性孔 37 ℃结合 30 min,吸取未结合上清液至 CEA 孔,37 ℃结合 30 min。冲洗缓冲液洗孔 5 次,洗去未结合 ssDNA,再加入洗脱缓冲液 95 ℃10 min,洗脱与 CEA 结合的 ssDNA,经酚-氯仿抽提、乙醇沉淀,将 ssDNA 溶于适量 ddH₂O 中。经 PCR 扩增后磁珠和 0.1 mol/L NaOH 分离单链 DNA,作为下一轮投入的文库,按上述步骤反复进行,共筛选了 12 轮。

1.2.3 PCR 条件的优化 以筛选获得的 ssDNA 为模板,PCR 扩增,条件为:2×PCR Master 25 μL,上游、下游引物各 1 μL,模板 10 μL,ddH₂O 13 μL。95 ℃预变性 3 min,95 ℃变性 30 s,45 ℃退火 1 min,72 ℃延伸 30 s,10 个循环,最后 72 ℃延伸 7 min。以上述 PCR 产物的 10 μL 为模板,按照上述体系进行条件优化:在第 10、15、20、30 个循环处分别取样找出最适循环数。

1.2.4 适配子与 CEA 亲和力测定 分别以 P2、P3 为引物按照上述优化条件制备生物素标记原库及每轮筛选获得的 ssDNA,测定浓度。取 20 pmol/L 生物素标记适配子与 CEA 血清结合,37 ℃结合 30 min,上磁力架静置 3 min,弃上清液,用洗涤缓冲液清洗 3 次,加入辣根过氧化物酶标记 CEA 抗体,37 ℃孵育 30 min,上磁力架静置 3 min,弃上清液,用洗涤缓冲液清洗 3 次,在 405 nm 处测定吸光度值。

1.2.5 适配子结合蛋白的鉴定 在上述步骤得到的磁珠-适配子-蛋白质三联复合物中加入十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)上样缓冲液,煮

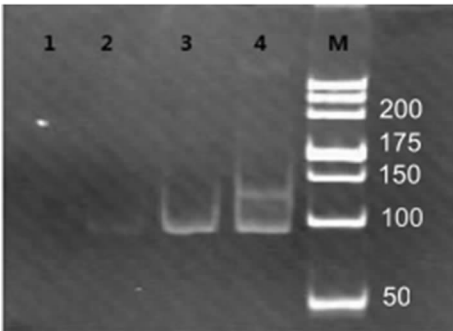
沸 5 min 后离心取上清液,以 8% SDS-PAGE 进行分离,考马斯亮蓝染色。

2 结 果

2.1 CEA 核酸适配子 SELEX 筛选 为逐步增加筛选压力,获得特异性适配子,在筛选过程中通过减少文库量、增加洗涤数和时间,见表 1;同时每轮筛选前均经过反筛(与阴性孔、抗体孔相作用)步骤以降低非特异性结合,从而筛选出具有较高亲和力和特异性的核酸适配子。另外,以筛选后 ssDNA 为模板,经 10 个循环扩增的产物为模板,按照优化后的条件进行扩增,寻找最适循环数,结果显示最佳循环数为 20,见图 1。

表 1 12 轮筛选所加 CEA 抗体、ssDNA 库及 tRNA 量

轮数	CEA 抗体(pmol/L)	ssDNA 库(pmol/L)	tRNA(mg/mL)
1	100	1 000	0.00
2	80	800	0.25
3	60	600	0.25
4	50	500	0.50
5	40	400	0.50
6	20	200	0.50
7	10	100	0.75
8	10	100	0.75
9	5	50	0.90
10	5	50	0.90
11	3	30	1.00
12	2	20	1.00



注:1 为 10 个循环,2 为 15 个循环,3 为 20 个循环,4 为 30 个循环,M 为 PCR ladder

图 1 优化最佳循环数

2.2 适配子与 CEA 亲和力测定 随着筛选过程,分别与 CEA 蛋白相结合的适配子越来越多,405 nm 处吸光度逐渐增加,当达到 10 次时,随着筛选 405 nm 处吸光度变化较小,故最佳筛选次数为 10 次,见图 2。

2.3 SDS-PAGE 蛋白电泳鉴定核酸适配子结合蛋白 经 12 轮筛选后的核酸适配子可特异性识别血清中的某种蛋白,考马斯亮蓝染色证实该蛋白为 CEA 蛋白,且与 CEA 阳性对照条带位置一致,相对分子质量大约为 200×10³,证实筛选出的核酸适配子可特异性识别人血清中 CEA,见图 3。

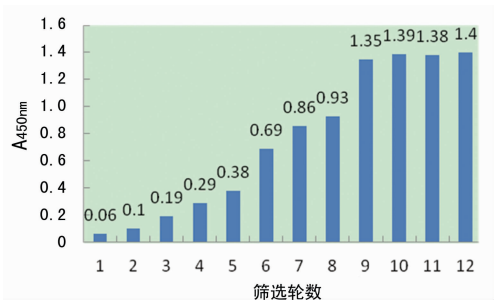
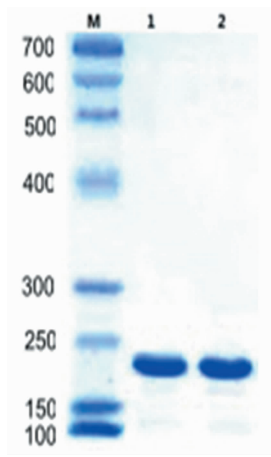


图 2 CEA 与 ssDNA 的结合率



注: M 为 Marker, 1 为适配子结合蛋白, 2 为 CEA 阳性对照
图 3 适配子结合蛋白 SDS-PAGE 电泳鉴定

3 讨 论

核酸适配子是由 SELEX 技术^[4-5] 筛选获得由 15~80 个 bp 组成的一段 ssDNA 或 RNA 分子,能形成独特的三维空间结构,可与靶物质高特异性、高亲和力和力结合的核苷酸片段,不论在诊断还是治疗领域,适配子将成为传统抗体的有力竞争对手^[6]。在检测方面,研究者已利用 SELEX 技术筛选出许多特异性识别癌症相关蛋白(如生长因子、血管内皮生长因子、HER3、NF- κ B、肌腱蛋白 C 或前列腺特异性膜抗原等^[7-9])和完整细胞(如淋巴细胞白血病、骨髓性白血病、肝癌、小细胞肺癌和非小细胞肺癌)的核酸适配子^[10-19],并利用适配子与靶物质之间的结合模式,已将许多核酸适配子应用在生物分析报告、生物医学和实验室检测阶段^[20]。另外,研究者将核酸适配子修饰后构建了高灵敏度和稳定性检测凝血酶的适配子传感器;在靶向治疗方面,具有与靶标物质特异性结合的适配子可作为靶向药物或者载体。尽管目前已经有研究报道了少数肿瘤相关适配子,然而仍然缺少能广泛适用于多种恶性肿瘤的特异性适配子^[21-24]。

CEA 作为一种广谱肿瘤相关抗原,在多种肿瘤组织中高表达,广泛应用于多种抗体靶向治疗、诊断。本研究以人血清 CEA 为靶物质,通过体外 12 轮筛选富集,获得人 CEA 特异性核苷酸适配子,亲和力测定显示,筛选获得的适配子可特异性与人 CEA 蛋白结合。另外,进一步通过 SDS-PAGE 电泳鉴定与适配

子结合蛋白即为人血清 CEA 蛋白。本研究组将进一步把获得的核酸适配子克隆测序,分析其一、二级结构,阐述其与 CEA 的结合位点及保守序列,为适配子用于肿瘤的早期诊断、监测疾病的动态变化奠定了初步的实验基础,同时也提示,以肿瘤标志物为靶标筛选相应适配子具有广阔的应用前景。

4 结 论

本研究经 12 轮 SELEX 技术筛选获得了特异性结合人 CEA 蛋白的 ssDNA 核酸适配子,为建立核酸适配子检测平台奠定了实验基础。

参考文献

[1] NAGHIBALHOSSAINI F, PAKDEL A, GHADERI A A, et al. Effective production of carcinoembryonic antigen by conversion of the membrane-bound into a recombinant secretory protein by site-specific mutagenesis[J]. Pathol Oncol Res, 2005, 11(4): 211-217.

[2] SAROBE P, HUARTE E, LASARTE J J, et al. Carcinoembryonic antigen as a target to induce anti-tumor immune response[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2004, 4(5): 443-454.

[3] GOLDSTEIN M J, MITCHELL E P. Carcinoembryonic antigen in the staging and follow-up of patients with colorectal cancer[J]. Cancer Invest, 2005, 23(4): 338-351.

[4] TUERK C, GOLD L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase[J]. Science, 1990, 249(4968): 505-510.

[5] ELLINGTON A D, SZOSTAK J W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands [J]. Nature. 1990, 346(6287): 818-822.

[6] JAYASENA S D. Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics[J]. Clin Chem, 1999, 45(9): 1628-1650.

[7] IRESON C R, KELLAND L R. Discovery and development of anticancer aptamers[J]. Mol Cancer Ther, 2006, 5(12): 2957-2962.

[8] LUPOLD S E, HICKE B J, LIN Y, et al. Identification and characterization of nuclease-stabilized RNA molecules that bind human prostate cancer cells via the prostate-specific membrane antigen[J]. Cancer Res, 2002, 62(14): 4029-4033.

[9] DANIELS D A, CHEN H, HICKE B J, et al. A tenascin-C aptamer identified by tumor cell SELEX: systematic evolution of ligands by exponential enrichment [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(26): 15416-15421.

[10] BEREZOVSKI M V, LECHMANN M, MUSHEEV M U, et al. Aptamer-facilitated biomarker discovery (Apta-BiD) [J]. J Am Chem Soc, 2008, 130(28): 9137-9143.

[11] CHEN H W, MEDLEY C D, SEFAH K, et al. Molecular recognition of small-cell lung cancer cells using aptamers [J]. Chem Med Chem, 2008, 3(6): 991-1001.

- [12] CERCHIA L, DUCONGE F, PESTOURIE C, et al. Neutralizing aptamers from whole-cell SELEX inhibit the RET receptor tyrosine kinase [J]. PLoS Biol, 2005, 3(4): e123.
- [13] SHAMAH S M, HEALY J M, CLOAD S T. Complex target SELEX[J]. Acc Chem Res, 2008, 41(1): 130-138.
- [14] BLANK M, WEINSCHENK T, PRIEMER M, et al. Systematic evolution of a DNA aptamer binding to rat brain tumor microvessels - Selective targeting of endothelial regulatory protein Pigpen [J]. J Biol Chem, 2001, 276(19): 16464-16468.
- [15] GUO K T, SCHAFER R, PAUL A, et al. A new technique for the isolation and surface immobilization of mesenchymal stem cells from whole bone marrow using high-specific DNA aptamers [J]. Stem Cells, 2006, 24(10): 2220-2231.
- [16] RADDATZ M S, DOLF A, ENDL E, et al. Enrichment of cell-targeting and population-specific aptamers by fluorescence-activated cell sorting [J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2008, 47(28): 5190-5193.
- [17] SHANGGUAN D, LI Y, TANG Z, et al. Aptamers evolved from live cells as effective molecular probes for cancer study [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(32): 11838-11843.
- [18] SEFAH K, TANG Z W, SHANGGUAN D H, et al. Molecular recognition of acute myeloid leukemia using aptamers [J]. Leukemia, 2009, 23(2): 235-244.
- [19] TANG Z, SHANGGUAN D, WANG K, et al. Selection of aptamers for molecular recognition and characterization of cancer cells [J]. Anal Chem, 2007, 79(13): 4900-4907.
- [20] OSBORNE S E, MATSUMURA I, ELLINGTON A D. Aptamers as therapeutic and diagnostic reagents: problems and prospects [J]. Curr Opin Chem Biol, 1997, 1(1): 5-9.
- [21] RADI A E, ACERO SANCHEZ J L, BALDRICH E, et al. Reusable impedimetric aptasensor [J]. Anal Chem, 2005, 77(19): 6320-6323.
- [22] LE FLOCH F, HO H A, LECLERC M. Label-free electrochemical detection of protein based on a ferrocene-bearing cationic polythiophene and aptamer [J]. Anal Chem, 2006, 78(13): 4727-4731.
- [23] NUMNUAM A, CHUMBIMUNI-TORRES K Y, XIANG Y, et al. Aptamer-based potentiometric measurements of proteins using ion-selective microelectrodes [J]. Anal Chem, 2008, 80(3): 707-712.
- [24] LI B, WANG Y, WEI H, et al. Amplified electrochemical aptasensor taking AuNPs based sandwich sensing platform as a model [J]. Biosens Bioelectron, 2008, 23(7): 965-970.

(收稿日期: 2018-01-10 修回日期: 2018-03-14)

(上接第 1693 页)

- 药评价与分析, 2015(4): 450-452.
- [4] 黄张定学, 曹高, 洁芪注射液治疗糖尿病肾病 30 例 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2014, 12(7): 103.
- [5] MA J, XU L, DONG J. Effects of zishentongluo in patients with early-stage diabetic nephropathy [J]. Am J Chin Med, 2013, 41(2): 333-340.
- [6] 梁秀军. 黄芪颗粒的药理作用及其在肾脏疾病中的临床应用 [J]. 河北医药, 2012, 34(6): 914-916.
- [7] ZHENG J M, YAO G H, CHENG Z, et al. Pathogenic role of mast cells in the development of diabetic nephropathy: a study of patients at different stages of the disease [J]. Diabetologia, 2012, 55(3): 801-811.
- [8] 常凯, 衡丙祥. 黄芪通络合剂治疗糖尿病肾病蛋白尿 75 例临床观察 [J]. 中医临床研究, 2014, 6(28): 3-5.
- [9] 张静, 陈元成. 中成药金水宝在临床疾病应用中的概况 [J]. 内蒙古中医药, 2014, 4: 123-124.
- [10] 卢献彬. 缬沙坦联合步长脑心通治疗早期糖尿病肾病疗效观察 [J]. 现代中西医结合杂志, 2014, 23(19): 2126-2128.
- [11] 魏新平, 吴增利, 王军涛. 糖尿病肾病应用黄芪注射液联合川芎嗪粉针治疗的效果研究 [J]. 中医临床研究, 2014, 6(14): 18-19.
- [12] 中华医学会内分泌学分会. 中国成人糖尿病肾脏病临床诊断的专家共识 (2014 年版) [J]. 中华内分泌代谢杂志, 2015, 5(31): 379-380.
- [13] 李红专. 黄芪对糖尿病肾病的药理作用机制研究进展 [J]. 中国社区医师: 医学专业, 2012, 14(15): 6-7.
- [14] 谢增林, 王晓光. 补脾肾活血法治疗糖尿病肾病蛋白尿的临床观察 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2015, 16(7): 621-622.
- [15] 赵鹏, 马洪. 黄芪抗肾脏疾病作用的研究进展 [J]. 贵州医药, 2014, 38(5): 464-465.
- [16] 范世珍, 陈安彬, 林松青. 尿微量清蛋白在高血压和糖尿病肾病早期诊断中意义 [J]. 中国实验诊断学, 2013, 17(2): 304-306.
- [17] 宋剑, 李彦华, 陈丽. 糖尿病肾病与血清 VEGF, SICAM-1 水平表达的关系 [J]. 中国老年学杂志, 2007, 27(23): 2313-2315.
- [18] 杨楠楠, 刚晓坤, 刘青. 糖尿病肾病与氧化应激 [J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(5): 1237-1239.
- [19] 汪超, 王亿平, 周兰. 中西医结合治疗早中期糖尿病肾病疗效观察 [J]. 中国药物与临床, 2014, 14(1): 64-65.
- [20] 白坤昊, 闫菲菲, 祝火盛, 等. 晚期氧化蛋白产物在糖尿病肾病中作用的研究进展 [J]. 中国糖尿病杂志, 2012, 20(8): 631-633.
- [21] 江波, 孙勤国, 祁青. 肾康注射液联合金水宝胶囊治疗早期糖尿病肾病的临床观察 [J]. 现代中西医结合杂志, 2013, 22(11): 1195-1196.

(收稿日期: 2018-01-04 修回日期: 2018-04-10)