

论著·基础研究

艰难梭菌毒素 B 适配子的筛选和鉴定*

苏恒, 刘红菊, 吴爱武△

(广州医科大学金域检验学院, 广州 510182)

摘要:目的 筛选和鉴定艰难梭菌毒素 B 适配子(Apt)。方法 体外合成 80 bp 的单链 DNA(ssDNA)随机文库, 重组表达艰难梭菌毒素 B 蛋白, 利用指数富集配体系统进化(SELEX)技术筛选艰难梭菌毒素 B 的核酸适配子。使用 DNA MAN5.2.2.0 软件和 mfold 软件筛选出的适配子序列进行同源性和二级结构的分析, 并利用非竞争酶联免疫吸附试验(ELISA 法)测定其亲和常数。结果 经过 12 轮筛选, 文库中随机 ssDNA 与艰难梭菌毒素 B 的结合率从 0.8% 增加到 39.6%, 筛选出 51 条适配子, 二级结构最稳定的是 Apt-B₂₀, 其亲和常数为 3.76×10^{-7} 。结论 利用 SELEX 技术成功筛选出高亲和力的 Apt, 为临幊上艰难梭菌感染的实验室快速诊断提供一定的参考依据。

关键词:艰难梭菌毒素 B; SELEX; 适配子; 亲和常数**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2018.20.001**文章编号:**1673-4130(2018)20-2465-07**中图法分类号:**R446.5; R378**文献标识码:**ASelection and identification of ssDNA aptamers to *Clostridium difficile* toxin B*

SU Heng, LIU Hongju, WU Aiwu△

(KingMed School of Laboratory Medicine of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510182, China)

Abstract: Objective To select and screen the aptamers of *Clostridium difficile* (*Cd*) toxin B. **Methods**

By using the recombinant *Cd* toxin B protein for the screening target, 80 bp single stranded DNA (ssDNA) library were synthetised in vitro and used to select and screen the aptamers of *Cd* toxin B by systematic evolution of ligands by exponential (SELEX) technology. The homology analysis and secondary structure on the aptamers were analysed by the software of DNA MAN5.2.2.0 and mfold, and the affinity constants of toxin B aptamer were measured by non-competitive ELISA. **Results** After 12 cycles of selection, the binding affinity of toxin B and ssDNA in the library increased to 39.6% (for 0.8% at first). Fifty-one aptamers were selected randomly and sequenced, and the aptamer with the most stable secondary structure was the Apt-B₂₀, whose affinity constant was 3.76×10^{-7} . **Conclusion** The aptamers against *Cd* toxin B was successfully obtained by SELEX method, which maybe provided certain reference tools for the laboratory diagnosis of *Cd* infection.

Key words: *Clostridium difficile* toxin B; SELEX; aptamer; affinity constant

艰难梭菌是一种革兰染色阳性的专性厌氧芽孢梭状杆菌, 可通过产生的毒素 A、毒素 B 引起抗菌药物相关性腹泻、结肠炎甚至致死性假膜性肠炎, 统称为艰难梭菌感染^[1]。毒素 A 又称肠毒素, 可引起肠壁分泌大量液体并发生出血性坏死; 毒素 B 又称细胞毒素, 能破坏细胞骨架导致肠壁细胞固缩坏死, 毒素 B 的细胞毒性比毒素 A 至少强 1 000 倍^[2]。艰难梭菌感染诊断的主要参考实验是艰难梭菌毒素中和试验和产毒培养^[3]。但这两种方法费用较高, 需要的设备仪器较高端, 难以推广^[3-4]。同时, 艰难梭菌培养实验

的敏感性较差、耗费时间长。酶联免疫吸附试验(ELISA 法)的特异度可以高达 90%, 但由于存在假阴性而导致敏感性不高^[5-6]。目前尚未建立艰难梭菌感染的最佳实验室检测方法。适配子是一种可以通过指数富集配体系统进化(SELEX)技术筛选得到的具有识别功能的新型寡核苷酸链^[7], 其本质为单链 DNA(ssDNA)或 RNA 片段, 它们可以形成各种二级结构(假结、发夹、凸环、G-四分体等)折叠成稳定独特的三维空间结构与靶分子配体进行高亲和力和特异性的结合^[8-9], 与特异性抗体识别相应抗原表位的过

* 基金项目: 广州市科技计划项目(201510010241)。

作者简介: 苏恒, 男, 硕士研究生, 主要从事临床检验诊断学研究。 △ 通信作者, E-mail: aiwu66@163.com。

本文引用格式: 苏恒, 刘红菊, 吴爱武. 艰难梭菌毒素 B 适配子的筛选和鉴定[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(20): 2465-2470.

程类似,具有库容量大、靶分子范围广、亲和力高、特异性强等优点^[10],已成为诊断方法最热门的研究领域之一,在检测特定的分子、细胞、小分子蛋白、毒素等方面均有涉及。本研究以重组的艰难梭菌毒素B蛋白为靶分子,运用SELEX技术,筛选出与艰难梭菌毒素B特异性结合的寡核苷酸适配子,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒 携带B毒素基因的艰难梭菌菌株为分离自临床并保存于广州医科大学检验系实验室的菌株^[11];pET-28b为广州医科大学检验系实验室保存质粒;大肠埃希菌DH5 α 和BL21感受态细胞购自北京天根生化科技有限公司。

1.2 主要试剂 抗艰难梭菌毒素B抗体购自Abcam公司;UNIQ-10寡核苷酸纯化试剂盒购自上海生工生物有限公司;T4 DNA连接酶、DNA Ladder、Premix Taq聚合酶均购自Takara公司;蛋白Marker、限制性内切酶BamH I、Hind III、羊抗鼠IgG-HRP均购自Thermo Scientific公司;双排磁力架、链霉亲和磁珠购自Invitrogen公司;tRNA购自Sigma公司;辣根过氧化物酶标记-抗地高辛抗体购自美国Jackson公司;TMB检测试剂盒购自北京鼎国生物技术有限公司。所有试剂均在有效期内使用。

1.3 构建ssDNA文库 构建长度为80 bp的随机DNA文库,引物和ssDNA文库合成及测序由上海英潍捷基有限公司完成。见表1。

表1 艰难梭菌 tcdB 基因和 ssDNA 文库 PCR 所用引物

基因/文库	引物	碱基序列 5'→3'
tcdB	tcdB-F	CGCGGATCCGATGAGTTAGTTAATAGAAAAACAGT
	tcdB-R	GCGCAAGCTTCTAAAGAGAACCTTCAAAATAATTG
ssDNA	ssDNA-F	AGTCAGTAGTTCAGGCAGCG-40N-CACAGCACACTCACACGCAC
	ssDNA-R	AGTCAGTAGTTCAGGCAGCG
	ssDNA-R-biotin	GTGCGTGTGAGTGCTGTG
		biotin-GTGCGTGTGAGTGCTGTG

1.4 方法

1.4.1 艰难梭菌毒素B氨基末端序列的克隆、表达与纯化 根据Genbank提供的艰难梭菌序列信息(登录号:Genbank JQ809336.1; GI: 395135689)设计引物,在上下游引物的5'端分别加入BamH I、Hind III内切酶序列,上游引物5'-CGCGGA TCC GAT GAG TTT AGT TAA TAG AAA ACA GT-3',下游引物5'-GCGCAAG CTTCTA AAG AGA ACC TTC AAA ATA ATT C-3',以临床艰难梭菌毒素阳性菌培养后提取的DNA基因组做模板进行聚合酶链式反应(PCR)。双酶切回收后的PCR产物和pET-28b质粒经连接反应、转化和筛选后获得重组表达质粒,挑选测序正确的菌株进行毒素蛋白表达并用特异性抗体鉴定。收集工程菌裂解液过镍柱纯化。用Ni-NTA柱对携带His标签的tcdB融合蛋白进行亲和吸附,先后用含20、50、100、200、500 mmol/L的咪唑缓冲液分步洗脱,收集对应浓度的穿透液,并进行SDS-PAGE分析。

1.4.2 SELEX筛选 根据相关文献操作流程进行毒素B适配子的SELEX筛选^[12],取预定量的纯化重组蛋白tcdB包被于96孔板,同时用ddH₂O设空白对照,4℃包被过夜,洗涤3次,空白对照孔和蛋白包被孔分别用3%牛血清清蛋白(BSA)溶液封闭2 h。用

10 pmol/ μ L的ssDNA先与空白对照孔结合45 min,反筛去除与BSA结合的ssDNA,并测定此时ssDNA的浓度,再与蛋白包被孔结合45 min,洗涤6次,加入洗脱缓冲液在80℃下加热15 min,洗脱下与毒素B结合的ssDNA,回收ssDNA并测定其浓度(每轮筛选所用的量见表2)。利用下游引物5'端标记了生物素的引物,PCR扩增ssDNA成双链DNA(dsDNA)后,用0.1 mol/L的NaOH溶液解离dsDNA成ssDNA,再利用链霉亲和素包被磁珠分选并获得反义ssDNA作为下一轮筛选的模板文库,如此重复直至ssDNA文库与毒素B结合率不再增加为止。

1.4.3 ssDNA文库与毒素B结合率的测定 筛选纯化后所得的ssDNA文库的总量与反筛后ssDNA文库总量的比值,即得到每轮文库与蛋白的结合率。

1.4.4 文库的克隆和测序 将第12轮获得的ssDNA扩增为dsDNA后,与pMDTM 19-T载体进行连接,导入DH5 α 感受态细胞于LB/Amp/X-Gal/IPTG平板培养基37℃培养24 h。挑取60个转化阳性菌落进行测序。

1.4.5 适配子同源性和二级结构分析 根据测序结果,分别选择DNA MAN5.2.2.0软件和mfold软件进行序列的同源性和二级结构的分析。

1.4.6 适配子-B₂₀亲和常数的测定

1.4.6.1 重组毒素 B 包被浓度的确定 96 孔微孔板每孔加入 200 μL 浓度分别为 2、1、0.5、0.25、0.125、0.0625、0.03125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 毒素 B 重组蛋白, 同时设立空白对照孔, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜包被, 洗涤 3 次后, 空白对照孔和蛋白包被孔均加入 200 μL 封闭液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h。去除封闭液, 洗涤缓冲液洗涤 4 次。在各蛋白孔中分别加入 200 μL 的 40 ng/ μL 的 Apt-B₂₀ 溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, 洗涤缓冲液洗涤 4 次, 向各反应孔中加入 200 μL 辣根过氧化物酶标记的地高辛抗体稀释液(稀释度为 1:10 000), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 45 min, PBST 溶液洗涤 5 次, 加入 100 μL 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB) 显色剂后 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 后加入 100 μL 终止液终止反应, 测定其 OD₄₅₀ 值。

表 2 不同筛选轮数重组蛋白 tcdB 及 ssDNA 的用量

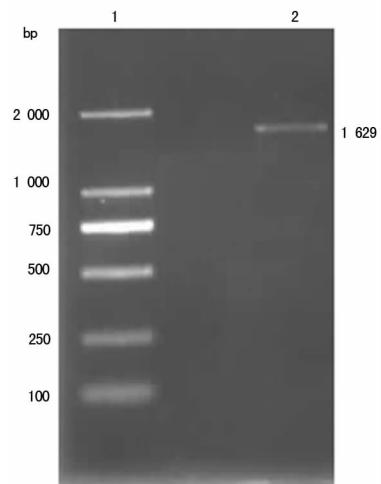
轮数	ssDNA (pmol)	毒素 B 蛋白 水平(μg)	tRNA (mg/L)	ssDNA 与 蛋白相对比值
1	2 000	200	0.00	10.0
2	1 500	150	0.10	10.0
3	1 200	120	0.20	10.0
4	1 000	100	0.25	10.0
5	1 000	95	0.30	10.5
6	900	82	0.40	11.0
7	800	70	0.50	11.5
8	700	58	0.60	12.0
9	600	50	0.70	12.0
10	500	40	0.80	12.5
11	400	30	0.90	13.3
12	200	10	1.00	20.0

1.4.6.2 利用非竞争 ELISA 法测定 Apt-B₂₀ 的亲和常数 每孔加入 200 μL 浓度分别为 2、1、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 重组蛋白毒素 B, 每个浓度均设立 10 个反应孔, 同时每孔用 ddH₂O 设立空白对照孔, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜包被。次日去除孔中液体, 用洗涤缓冲液洗涤 3 次后, 空白对照孔和蛋白包被孔均加入 200 μL 封闭液, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h。去除封闭液后, Apt-B₂₀ 依次稀释为 40、20、10、5、2.5、1.25、0.625、0.3125、0.15625、0.078 ng/ μL , 每孔 200 μL 的梯度浓度溶液分别加入蛋白包被孔中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, 洗涤缓冲液洗涤 4 次, 向各反应孔中加入 200 μL 辣根过氧化物酶标记的地高辛抗体稀释液(稀释度为 1:10 000), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 45 min, 洗涤 5 次, 加入 100 μL TMB 显色剂后 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 后加入 100 μL 终止液终止反应, 测定其 OD₄₅₀ 值。根据 BEATTY 等^[13]建立的方法, 亲和常数 $K_A = (n-1)/(n[\text{Apt}']_{\text{总}} - [\text{Apt}]_{\text{总}})$, 其中 $[\text{Apt}]_{\text{总}}$ 和 $[\text{Apt}']_{\text{总}}$ 分别表示当重组蛋白浓度为 $[\text{Ag}_{\text{重}}]$ 和 $[\text{Ag}_{\text{重}}']$ 时, 相应

OD_{450} (50%) 值时适配子浓度($\text{ng}/\mu\text{L}$), $n = [\text{Ag}_{\text{重}}]_{\text{总}} / [\text{Ag}_{\text{重}}']_{\text{总}}$, 将结果导入公式 $K_A = (n-1)/(n[\text{Apt}']_{\text{总}} - [\text{Apt}]_{\text{总}})$ 中, Apt-B₂₀ 分别可得到 3 个 K_A 值, 计算其平均值。

2 结 果

2.1 艰难梭菌毒素 B 氨基末端基因扩增 池道 2 在 DNA 长度为 1 629 bp 处有 1 条清晰的条带, 与预期目的片段 1 629 bp 大小一致。见图 1。

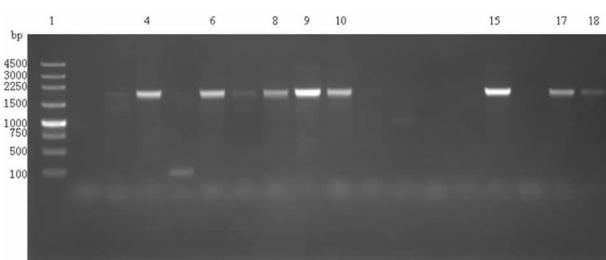


注:1 为 DNA Marker;2 为 tcdB 毒素氨基末端扩增产物

图 1 毒素 B 氨基末端基因 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳分析

2.2 大肠埃希菌 BL21 pET-28b-tcdB-N 表达载体的构建及 tcdB 重组蛋白的表达

2.2.1 用 pET-28b 通用引物 T7 与反 T7 做菌落 PCR 阳性鉴定 将 pET-28b-tcdB 重组质粒转入大肠埃希菌 DH5 α 中随机挑去 17 个白色菌落做菌落 PCR 扩增目的条带后进行 DNA 琼脂糖凝胶电泳分析。如果 tcdB 氨基末端与载体片段连接上, 用 T7 与反 T7 扩增会出现比目的稍大的条带。电泳结果见图 2, 在 1 500 bp 与 2 250 bp 中央处有第 4、6、8、9、10、15、17、18 泳道出现了目的条带, 泳道对应的菌落测序结果均与 NCBI 上的序列 100% 吻合, 没有出现突变现象。

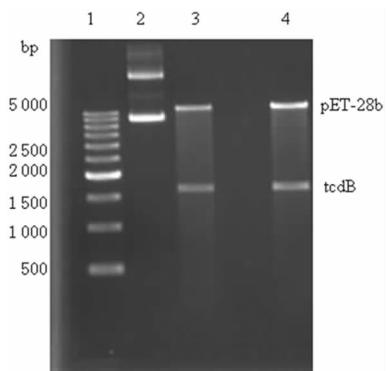


注:1 为 DNA Marker;4、6、8、9、10、15、17、18 为菌落 PCR 扩增结果

图 2 pET-228b-tcdB 重组质粒菌落 PCR 扩增产物 DNA 琼脂糖电泳分析

2.2.2 pET-28b-tcdB 的酶切鉴定 对 pET-28b-tcdB 重组质粒酶切前后产物进行琼脂糖凝胶电泳。电泳

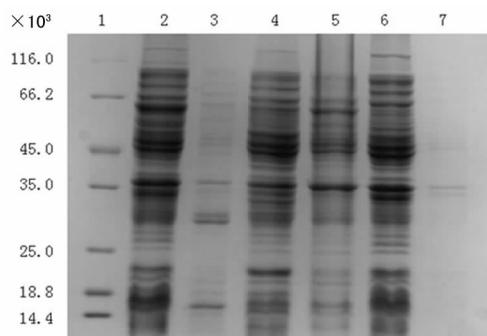
结果见图3,泳道2为酶切前重组质粒,泳道3、4为重组质粒酶切后结果,出现2条DNA条带,分别在1 500 bp和5 000 bp处。该结果证明了tcdB目的基因片段已插入pET-28b载体中。



注:1为DNA Marker;2为酶切前重组质粒;3~4为酶切后重组质粒

图3 pET-28b-tcdB酶切前后琼脂糖凝胶电泳分析

2.2.3 pET-28b-tcdB的诱导优化表达 根据预实验得出pET-28b-tcdB重组表达质粒的最佳表达条件为菌液OD值取0.6诱导温度为25℃,IPTG的终浓度取0.8 mmol/L,诱导时间取10 h。按照此条件诱导重组质粒,收集细菌裂解液的上清液和沉淀进行SDS-PAGE。结果见图4,目的蛋白表达量较高。



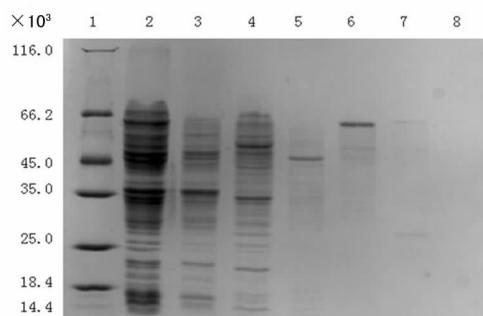
注:1为蛋白Marker条带;2为pET-28b经IPTG诱导的上清;3为pET-28b经IPTG诱导的沉淀;4为pET-28b-tcdB经IPTG诱导的上清;5为pET-28b-tcdB经IPTG诱导的沉淀;6为pET-28b-tcdB经IPTG诱导的上清;7为pET-28b-tcdB未经IPTG诱导的沉淀

图4 pET-28b-tcdB重组质粒在最佳诱导表达条件下菌液裂解液的SDS-PAGE电泳分析

2.2.4 目的蛋白的Western blot鉴定 经Western blot鉴定,tcdB抗体可识别目的蛋白,不能识别pET-28b菌株蛋白。

2.3 重组蛋白的纯化 根据可溶性蛋白纯化的要求配制含有20、50、100、200、500 mmol/L咪唑的磷酸盐缓冲液,收集各个缓冲液洗脱下的液体,SDS-PAGE电泳分析可见在上柱前,于 66.2×10^3 下方出现目的条带(泳道1)、上柱后目的条带缺失,说明目的蛋白已结合在纯化柱上(泳道3),用含不同浓度的咪唑洗脱目的蛋白,发现在咪唑含量为100 mmol/L时,目的蛋白

可被洗脱下来,且杂条带较少(泳道6),即重组蛋白纯化成功。见图5。



注:1为蛋白Marker;2为上柱前蛋白标本;3为上柱后收集穿透溶液;4为20 mmol/L咪唑缓冲液洗脱收集穿透溶液;5为50 mmol/L咪唑缓冲液洗脱收集穿透溶液;6为100 mmol/L咪唑缓冲液洗脱收集穿透溶液;7为200 mmol/L咪唑缓冲液洗脱收集穿透溶液;8为500 mmol/L咪唑缓冲液洗脱收集穿透溶液

图5 Ni-NTA亲和柱纯化蛋白SDS-PAGE电泳分析

2.4 各轮ssDNA随机文库与艰难梭菌重组蛋白毒素B结合率 第1~9轮筛选随机文库与重组蛋白毒素B的结合率为0.8%、5.2%、8.9%、10.9%、14.6%、18.5%、25.7%、31.8%、36.3%,第10、11、12轮筛选后适配子的结合率为39.4%、38.7%、39.6%,变化不明显,说明结合率峰值趋于饱和。

2.5 克隆测序结果 艰难梭菌重组毒素B筛选后克隆测序的有效适配子为51条。

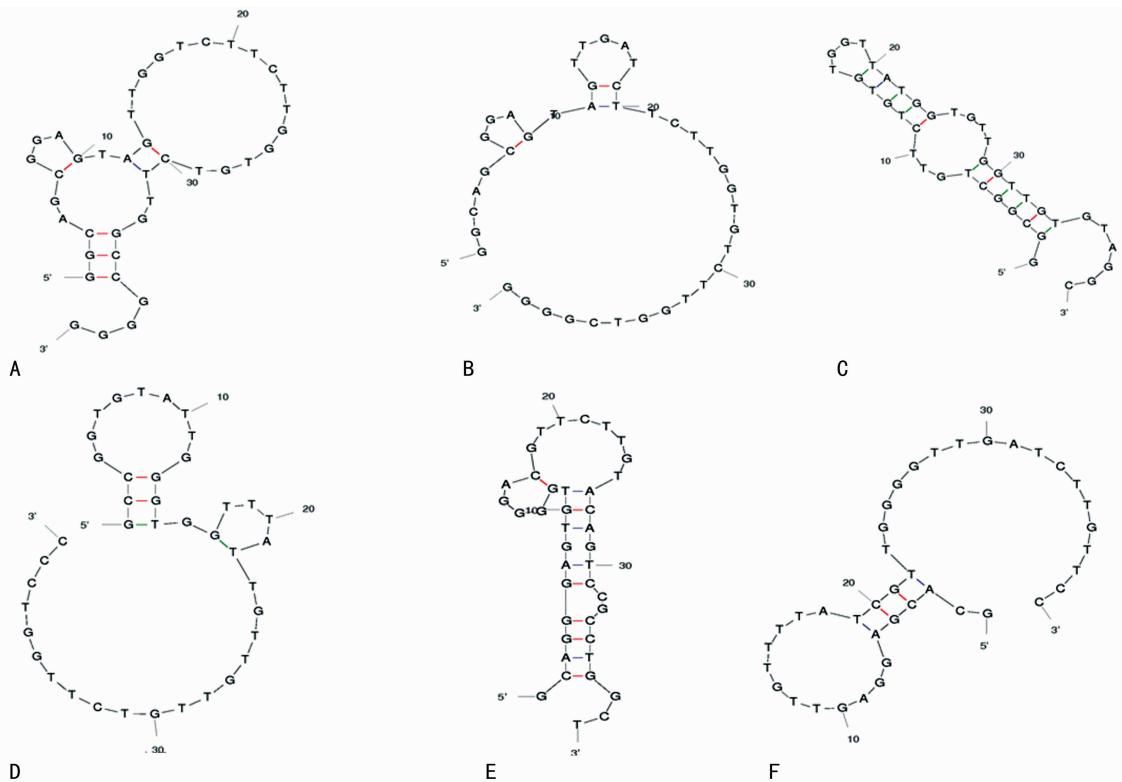
2.6 适配子序列同源性和二级结构分析 测序的51条有效的适配子进行多序列比对,总体的同源性为39.8%。将具有90%以上同源性的序列归为一组,可分为5组:第1组包括Apt-B₁、Apt-B₆、Apt-B₃₆、Apt-B₃₈、Apt-B₅₆和Apt-B₁₀,其中前5个适配子序列完全相同,而Apt-B₁₀序列中只有两个碱基与上述序列不同;第2组包括Apt-B₁₂、Apt-B₁₆和Apt-B₉,前两个序列完全相同,Apt-B₉只有一个碱基与其不同;第3组包括Apt-B₂₈和Apt-B₂₉,两条序列只有一个碱基不同;第4组的Apt-B₂₀与Apt-B₅₄序列完全相同;第5组Apt-B₅₁、Apt-B₅₅序列完全相同;具体见表3。剩余序列同源性均较低。二级结构分析最稳定结构的适配子是Apt-B₂₀,其自由能 $dG = -2.30$ kcal/mol。具体见图6。

2.7 适配子亲和常数 K_A 的测定

2.7.1 重组蛋白tcdB包被浓度的确定 当倍比系列浓度(2、1、0.5、0.25、0.125、0.0625、0.03125 μg/mL)重组蛋白tcdB包被时,其OD₄₅₀值分别为1.084、0.059、0.416、0.194、0.147、0.083、0.058,在蛋白浓度为2、1、0.5 μg/mL时,OD₄₅₀均在0.15~2.50之间,说明在此范围内OD值与包被板的重组蛋白浓度有一定的线性关系。选定重组蛋白浓度为2、1、0.5 μg/mL测定其与二级结构最稳定的适配子Apt-B₂₀的反应曲线。

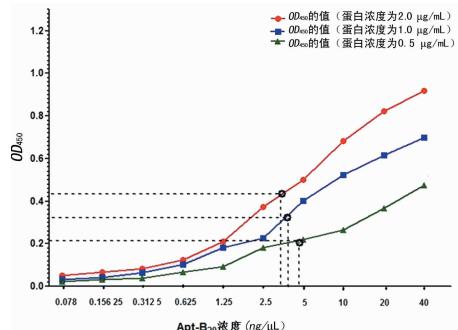
表 3 重组蛋白毒素 B 经 12 轮 SELEX 筛选后的同源性适配子序列

序号	序列(5'→3')	长度(bp)	条数
Apt-B ₁	GGCAGCGGAGTAGTTGG <u>T</u> CTTCTTGGTGCTTGG <u>C</u> GGGG	40	5
Apt-B ₁₀	GGCAGCGGAGTAGTT <u>G</u> ATCTTCTTGGTGCTTGG <u>T</u> CGGGG	40	1
Apt-B ₉	GGCGGCTGTTCTGTGTGGTTATGGTGGTT <u>G</u> TAGGC	40	1
Apt-B ₁₂	GGCGGCTGTTCTGTGTGGTTATGGTGGTT <u>G</u> TAGGC	40	2
Apt-B ₂₈	GCCGGTGTATTGGGTGGTTATTGGTGTCTTGG <u>T</u> CCC	40	1
Apt-B ₂₉	GCCGGTGTATTGGGTGGTTATTGGTGTCTTGG <u>C</u> CCC	40	1
Apt-B ₂₀	GCAGGGAGTGTGGGGACGTTCTGTACAGTCGCCCTGGCT	40	2
Apt-B ₅₁	GCACGAGGAGTTGTTTATCGTTGGGGTCGATCTGTTCC	40	2



注: A. Apt-B_{1/6/36/38/56}; B. Apt-B₁₀; C. Apt-B_{9/12/16}; D. Apt-B_{28/29}; E. Apt-B_{20/54}; F. Apt-B_{51/55}

图 6 各组适配子二级结构图

图 7 Apt-B₂₀ 与 tcdB 重组蛋白的亲和曲线

2.7.2 Apt-B₂₀ 与重组蛋白 tcdB 的亲和常数 K_A 的测定 蛋白浓度为 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $OD_{450}(50\%)$ 时, Apt-B₂₀ 的浓度约为 3.375 $\text{ng}/\mu\text{L}$; 蛋白浓度为 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $OD_{450}(50\%)$ 时, Apt-B₂₀ 的浓度约为 4.02

$\text{ng}/\mu\text{L}$; 蛋白浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $OD_{450}(50\%)$ 时, Apt-B₂₀ 的浓度约为 4.685 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 。将上述值代入公式计算相应亲和常数, $K_1 = 3.80 \times 10^{-7}$; $K_2 = 3.70 \times 10^{-7}$; $K_3 = 3.79 \times 10^{-7}$; 因此适配子 Apt-B₂₀ 与重组蛋白 tcdB 的亲和常数 $K_A = 3.76 \times 10^{-7}$, 见图 7。

3 讨论

艰难梭菌毒素 B 属于大型的梭状芽孢杆菌家族。其氨基末端可以通过糖基化灭活宿主 Rho 家族的 GTP 酶。而 Rho 家族的 GTP 酶是许多细胞活动的重要参与者, 包括调节细胞周期、细胞间黏附、胞质分裂、细胞分泌和维持细胞骨架^[14-15]。实验室通过检测毒素 B 的存在可以辅助临床诊断艰难梭菌感染。本课题组通过系列实验在成功构建了 pET-28b-tcdB 氨基末端表达载体的基础上, 将其转化入大肠埃希菌表

达菌 BL21(DE3)中，并对其进行诱导表达及获得纯化目的蛋白，为相应适配子的筛选提供了研究基础。

体外合成的ssDNA文库随机序列由40个碱基组成，初始文库量为1 200 pmol，对应的文库容量总量达到 10^{15} ，可满足SELEX筛选量的需要。文库的浓度与靶蛋白浓度的比例是SELEX筛选过程中重要的环节之一，在初始阶段由于文库中高亲和力适配子的含量低，因此在初始的几轮筛选中，需使用较高浓度的靶蛋白进行筛选。随着筛选轮数的增加，结合力更高、特异性更强的适配子相对富集，其亲和力低的适配子逐渐淘汰，靶蛋白及ssDNA随机文库的用量均减少，但文库量与靶蛋白含量的相对比例升高，使结合力更强的ssDNA竞争结合到相应的靶蛋白的结合靶点，以获得特异性更强的适配子。同时从第2轮开始加入tRNA，与ssDNA非特异性竞争结合靶蛋白，也有利于从随机文库淘汰低亲和力的适配子。当筛选到第10~12轮时，结合率不再增加，说明目标适配子已经得到了富集。单链核苷酸可以通过 $\pi-\pi$ 键的堆积和氢键相互作用使其具有很强的折叠成二级结构^[8]，因此随机单链核酸文库代表大量不同构象的子集，通过不同的构象与官能团互补进行识别，这个构象就是单链核苷酸形成的二级结构甚至更高的三维空间结构，而其二级结构是靶分子与适配子特异性结合的结构基础，适配子主要是靠氢键和电荷与电荷之间的相互作用识别蛋白质^[16-17]。本实验利用适配子文库的此特性，筛选出51条重组蛋白毒素B的有效适配子，且进行序列的同源性和二级结构分析。通过同源树图进行分组，将同源性达到90%的分为一组，重组蛋白毒素B筛选的适配子可分为5组，说明特异性的适配子得到了富集。二级结构分析显示，每个适配子序列相差一个碱基，其二级结构相差较大，适配子的二级结构主要以茎环为主，茎环结构可由序列的各个区域组成。适配子二级结构中的茎环越小，茎越长则其结合力越好^[18]，因此，根据二级结构的分析，选择结合力较好的适配子Apt-B₂₀进行后续实验的亲和力计算。

BEATTY等^[13]建立的测定抗原-抗体亲和常数测定方法已经被广泛应用，适合测定抗体和包被抗原之间的亲和常数，且随后LOOMANS等^[19]从理论到实践均进行了验证严格控制ELISA反应条件时，其质量作用定律仍然适用。本研究在利用非竞争ELISA法进行重组蛋白素B与适配子亲和常数测定和计算，Apt-B₂₀的亲和常数均值为 3.76×10^{-7} ，对应的解离常数 K_d 值为26.57纳摩尔，亲和常数均到达了 10^7 级，解离常数达到了纳摩尔。与OCHSNER等^[20]筛选出的毒素B适配子和目前唯一被美国FDA批准用于临床治疗的适配子^[21]相比，其亲和常数和解

离常数相当，说明本实验所筛选的适配子有一定的应用前景。

4 结 论

本研究成功利用SELEX技术筛选获得了特异结合艰难梭菌毒素B的高亲和力的ssDNA适配子，有利于进一步研究各适配子与毒素B蛋白的亲和力和结合位点，为后续适配子的应用研究奠定了基础。

参考文献

- [1] SURAWICZ C M, BRANDT L J, BINION D G, et al. Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of Clostridium difficile infections[J]. Am J Gastroenterol, 2013, 108(4): 478-498.
- [2] SULLIVAN N M, PELLETT S, WILKINS T D. Purification and characterization of toxins A and B of Clostridium difficile[J]. Infect Immun, 1982, 35(3): 1032-1040.
- [3] PLANCHE T, WILCOX M. Reference assays for Clostridium difficile infection: one or two Gold standards? [J]. J Clin Pathol, 2011, 64(1): 1-5.
- [4] CROBACH M J, DEKKERS O M, WILCOX M H, et al. European society of clinical microbiology and infectious diseases (ESCMID): data review and recommendations for diagnosing clostridium difficile-infection (CDI) [J]. Clin Microbiol Infect, 2009, 15(12): 1053-1066.
- [5] RENE P, FRENETTE C P, SCHILLER I, et al. Comparison of eight commercial enzyme immunoassays for the detection of Clostridium difficile from stool samples and effect of strain type[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2012, 73(1): 94-96.
- [6] MONTEIRO A A, PIRES R N, BAETHGEN L F, et al. Discrepancies among three laboratory methods for Clostridium difficile detection and a proposal for their optimal use[J]. FEMS microbiology letters, 2014, 350(2): 133-137.
- [7] BUNKA D H, STOCKLEY P G. Aptamers come of age at last[J]. Nat Rev Microbiol, 2006, 4(8): 588-596.
- [8] GELINAS A D, DAVIES D R, JANJIC N. Embracing proteins: structural themes in aptamer-protein complexes [J]. Curr Opin Struct Biol, 2016, 36: 122-132.
- [9] MAYER G. The chemical biology of aptamers[J]. Angew Chem, 2009, 48(15): 2672-2689.
- [10] PARK K S. Nucleic acid aptamer-based methods for diagnosis of infections[J]. Biosen Bioelectron, 2017, 102: 179-188.
- [11] 吴爱武, 唐海先, 王丽斯, 等. 广州地区艰难梭菌耐药检测与耐药机制分析[J]. 广东医学, 2015, 36(12): 1859-1863.
- [12] 蔡媛媛. 高尔基体蛋白73的原核表达及其适配子的筛选与鉴定[D]. 广州: 广州医学院, 2012.
- [13] BEATTY J D, BEATTY B G, VLAHOS W G. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay[J]. J Immunol Methods, 1987, 100(1/2): 173-179.

(下转第2474页)

平衡,最终导致白血病的发生^[15]。本研究结果中显示HHT处理后HL60细胞内c-myc蛋白表达量下调,表明HHT能够通过抑制c-myc蛋白表达抑制白血病细胞增殖。

4 结 论

HHT作为高效抗肿瘤药物,具有有效、不良反应小、经济实惠等特点,对HL60细胞有显著的凋亡作用,且通过上调caspase-3、Bax蛋白及下调Bcl-2、c-myc蛋白表达来实现对细胞的诱导凋亡作用,为白血病治疗提供一定的药理基础,关于HHT耐药性方面有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] 李萍,梁爱斌.成人急性淋巴细胞白血病的诊疗进展[J].中国癌症杂志,2014,24(10):738-744.
- [2] 赵雨辰,杨明珍.高三尖杉酯碱对急性单核细胞白血病SHI-1细胞株诱导凋亡机制的研究[J].安徽医科大学学报,2014,49(8):1080-1084.
- [3] 许晓峰,程汝滨,杨波,等.茅莓总皂苷和高三尖杉酯碱、阿糖胞苷体外协同诱导白血病细胞凋亡的机制研究[J].中华中医药学刊,2015,13(7):1659-1663.
- [4] 周欢欢.BCL-2抑制剂ABT-737对AML细胞Kasumi-1的抗白血病效应及联合高三尖杉酯碱的化疗增效作用的机制探讨[D].南昌:南昌大学,2014.
- [5] 王迎,刘兵城,魏辉,等.高三尖杉酯碱在初诊中低危急性早幼粒细胞白血病中应用的前瞻性随机对照研究[J].中华血液学杂志,2016,37(3):55-57.
- [6] 封蔚莹,宋春娇,张志坚,等.喜树碱衍生物SN-38对人白血病细胞系HL60增殖及凋亡作用的实验研究[J].中华中医药学刊,2014,10(6):1406-1408.
- [7] 陈菲莉,柳约坚,李蓉蔚,等.雷公藤内酯与多柔比星诱导耐药白血病细胞凋亡协同作用及其机制的探讨[J].中华

(上接第2470页)

- [14] BISHOP A L, HALL A. Rho GTPases and their effector proteins[J]. Biochem J, 2000, 348(2):241-255.
- [15] JANK T, GIESEMANN T, AKTORIES K. Rho-glucosylating Clostridium difficile toxins A and B: new insights into structure and function [J]. Glycobiology, 2007, 17(4):15-22.
- [16] DAVIES D R, GELINAS A D, ZHANG C, et al. Unique motifs and hydrophobic interactions shape the binding of modified DNA ligands to protein targets[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(49):19971-19976.
- [17] ROHLOFF J C, GELINAS A D, JARVIS T C, et al. Nucleic acid ligands with protein-like side chains: modified aptamers and their use as diagnostic and therapeutic agents[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2014, 3:e201.
- [18] WANG Z W, WU H B, MAO Z F, et al. In vitro selection

肿瘤防治杂志,2014,21(10):66-70.

- [8] GAUTAM S, KIRSCHNE S, WIESMEIER M, et al. Roscovitine-induced apoptosis in neutrophils and neutrophil progenitors is regulated by the Bcl-2-family members Bim, Puma, Noxa and Mcl-1[J]. Plos One, 2014, 8(11):70-77.
- [9] 李秀军,罗心一,姚宇红,等.扶正祛邪含药血清对白血病耐药细胞株HL60/VCR细胞凋亡率的影响[J].中华中医药杂志,2014,12(8):2645-2647.
- [10] 姜熙,唐育梅,黄慧芳.高三尖杉酯碱抗急性粒细胞白血病效应及其机制研究进展[J].医学综述,2014,20(18):3345-3347.
- [11] 陈谨,周敏然,孙婷,等.抑制白血病K562细胞FoxM1表达可增强细胞对高三尖杉酯碱的敏感性[J].中国病理生理杂志,2015,31(11):1928-1932.
- [12] 袁龙,陈益,刘泽洪,等.吴茱萸碱抑制HDAC6促进人白血病K562细胞周期阻滞和凋亡的机制研究[J].中草药,2016,13(17):126-130.
- [13] DEEB D, GAO X, LIU Y B, et al. Pristimerin, a quinon-emethide triterpenoid, induces apoptosis in pancreatic cancer cells through the inhibition of pro-survival Akt/NF-κB/mTOR signaling proteins and anti-apoptotic Bcl-2[J]. Inter J Oncol, 2014, 44(5):1707-1715.
- [14] 平娟,赵娜,王保全,等.人慢性粒细胞白血病bcr-abl基因反义寡核苷酸对K562细胞株的凋亡诱导作用研究[J].中国癌症杂志,2015,22(3):167-172.
- [15] JIANG H, ZHAO P J, SU D, et al. Paris saponin I induces apoptosis via increasing the Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3 expression in gefitinib-resistant non-small cell lung cancer in vitro and in vivo[J]. Mol Med Rep, 2014, 9(6):2265-2272.

(收稿日期:2018-01-22 修回日期:2018-03-17)

and identification of ssDNA aptamers recognizing the Ras protein[J]. Mol Med Rep, 2014, 10(3):1481-1488.

- [19] LOOMANS E E, ROELEN A J, VAN DAMME H S, et al. Assessment of the functional affinity constant of monoclonal antibodies using an improved enzyme-linked immunosorbent assay[J]. J Immunol Methods, 1995, 184(2):207-217.
- [20] OCHSNER U A, KATILIUS E, JANJIC N. Detection of clostridium difficile toxins a,B and binary toxin with slow off-rate modified aptamers[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2013, 76(3):278-285.
- [21] NG E W, SHIMA D T, CALIAS P, et al. Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease [J]. Nat Rev Drug Discov, 2006, 5(2):123-132.

(收稿日期:2018-02-26 修回日期:2018-05-28)