论著

文章编号:1000-5404(2014)10-1040-05

HCMV PP65 抗原核酸适配子的筛选及活性鉴定

夏 宇[1],王永虎[1],秦莲花[2],韩 梅[1],姚 远[1],和昱辰[1],罗 娟[1],张 波[1] [400038 重庆,第三军医大学西南医院全军检验医学中心[1];200433 上海,同济大学附属上海市肺科医院、上海市结核病(肺)重点实验室[2]]

[摘要] **目的** 以人巨细胞病毒 HCMV PP65 抗原为靶分子,筛选与其有高亲和力、高特异性的适配子。**方法** 采用 SELEX 技术筛选 HCMV PP65 抗原特异的适配子,进行亲和性检测以及二级结构预测,以筛选获得的最优序列作为捕获适配子,建立基于"磁珠-适配子-抗原-荧光单克隆抗体"的夹心检测方法,实现对 PP65 抗原的初步检测。**结果** 本实验经过 8 轮筛选获得 6 条与靶物质高亲和性,高特异性结合的适配子。**结论** 适配子的成功筛选,为建立基于适配子检测 HCMV PP65 抗原的新方法奠定了基础。

[关键词] 人巨细胞病毒; PP65;抗原;SELEX;适配子
[中图法分类号] R372;R373.9;R392.2 [文献标志码] A

Screening and activity identification of ssDNA aptamer targeting human cytomegalovirus PP65

Xia Yu[1], Wang Yonghu[1], Qin Lianhua[2], Han Mei[1], Yao Yuan[1], He Yuchen[1], Luo Juan[1], Zhang Bo[1] ([1] Center of Laboratory Examination Medicine, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Shanghai Key Laboratory Pulmonary Tuberculosis, Shanghai Pulmonary Hospital, Tongji University, Shanghai, 200433, China)

[**Abstract**] **Objective** To screen ssDNA oligonucleotide aptamers targeting human cytomegalovirus (HCMV) PP65 antigen with high affinity and specificity. **Methods** The systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) method was used for screening specific aptamers targeting HCMV PP65 antigen. The affinity of the aptamers was detected by ELISA and their secondary structures were predicted by the DNAMAN software. Then, the sequence with the highest affinity to PP65 was used as the capture aptamer to establish a sandwich assay based on magnetic bead-aptamer-antigen-fluorescence labeled monoclonal antibodies for detecting PP65 antigen. **Results** A total of 6 aptamers with high affinity and specificity to PP65 molecule were obtained by 8 cycles of SELEX. **Conclusion** A good foundation for developing aptamer-based HCMV PP65 antigen detection method has been established.

[**Key words**] human cytomegalovirus; PP65; antigen; systematic evolution of ligands by exponential enrichment; aptamer

Supported by the Clinical Innovation Foundation Third Military Medical University (SWH2012LC12), the Achievement Transformation of Science and Technology of Third Military Medical University (2013XZH04), the Tackling Project of Sciene and Technology of Chongqing (CSTC2012ggyyjs10046) and the Starting Funds for Personnel Returning From Overseas of Third Military Medical University (SWH2011LC022). Corresponding author: Zhang Bo, E-mail: zhangbocq@aliyun.com

人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV),属疱疹病毒科乙组疱疹亚科,是一种机会性致病病毒。HCMV 在人群中广泛传播,多数人呈隐性感染,病毒长期潜伏于宿主细胞。HCMV 显性感染常发生在免疫功能低下者,易引起孕妇活动性感染进而造成胎儿宫内感染,导致妊娠失败及新生儿发育不良等;在免疫系统受到抑制或发育不成熟的个体,体内潜伏的病毒可被激活,引起严重的巨细胞病毒性间质性肺炎、肝炎或器官移植物损伤等,甚至导致死亡。至今,HCMV 尚无有效的预防疫苗,因而 HCMV 感染的早期诊断对及早进行抗病毒治疗具有重要临床意义。现有研究表明,

[基金项目] 第三军医大学临床创新基金(SWH2012LC12);第三军医大学科技成果转化基金(2013XZH04);重庆市攻关课题(CSTC2012ggyyjs10046);第三军医大学回国人员启动基金(SWH2011LC022)
[通信作者] 张 波,E-mail: zhangbocq@aliyun.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140328.0953.008.html(2014-3-28)

HCMV的一些外壳蛋白在病毒的基因表达,免疫逃逸,组装和排出中发挥重要作用, PP65抗原是其最丰富的外壳蛋白和细胞外病毒颗粒的重要组成部分,对其进行检测可实现巨细胞病毒感染的早期检测和指导治疗[1]。

寡核苷酸适配子是利用SELEX技术从大容量的单链寡核苷酸文库中筛选出来的单链核苷酸序列,依靠其折叠形成的特定二级或三级空间结构实现与靶物质高亲和性、高特异性的结合[2-3]。因此,适配子有望取代抗体成为新型的靶物质特异识别分子。本实验以HCMV PP65抗原为靶物质,利用SELEX技术筛选其特异性适配子,并鉴定其生物活性,为建立HCMV PP65抗原检测新方法奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

PCR仪(PTC-200,美国MJ Reseach公司);酶标仪(Σ960,台湾Metertech Inc公司)荧光显微镜(BX51,美国OLYMPUS公司);磁分离器(8孔磁性分离器,西安金磁纳米生物技术有限公司);恒温水浴箱(H. SWX-420BS,上海新苗医疗器械制造有限公司)。HCMV PP65,GST购自ProSpec-Tany公司;pMD18-T Simple Vectorx购自TaKaRa公司;Mag® 羧基末端磁性微粒购自西安金磁纳米生物技术有限公司; FITC标记HCMV PP65单克隆抗体购自Thermo公司;随机ssDNA文库,引物和适配子均由上海生工生物有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 适配子的筛选

1.2.1.1 随机ssDNA文库的构建 利用Primer 5.0和Olige 6.0软件,设计链长为78个碱基的ssDNA文库,由两端的固定序列和中间35个核苷酸的随机序列组成,具体序列为5′-GGGAGCTCAGAATAAACGCTCAA-N(35)-TTCGACATGAGGCCCGGATC-3′。其中, SELEX引物Ⅰ为5′-GGGAGCTCAGAATAAACGCTCAA-3′,SELEX引物Ⅱ为5′-(CH_2)-TTCGACATGAGGCCCGGATC-3′,生物素标记的SELEX引物Ⅲ为5′-biotin-GATCCGGGCCTCATGTCGAA-3′。构建库容量为10^{15} ~ 10^{16}的随机ssDNA文库,随机ssDNA文库和引物均由上海生工生物有限公司合成。

1.2.1.2 SELEX筛选 将PP65蛋白用0.05 mol/L(pH = 9.6)的碳酸盐缓冲液稀释至所需浓度,在96孔聚苯乙烯板的每个反应孔中分别加入100 μL,4 ℃包被过夜,同时设空白对照孔(或反筛对照孔)。次日,用清洗缓冲液(PBS + 0.05% Tween20,pH = 6.4,PBST)清洗3次,3%的BSA溶液4 ℃封闭过夜。而后加入SELEX binding buffer(20 mmol/L HEPES,pH = 7.35,120 mmol/L KCl,1 mmol/L $CaCl_2$,1 mmol/L $MgCl_2$)稀释的ssDNA文库100 μL,先与空白对照孔(或反筛对照孔)37 ℃孵育,反筛去除与PP65蛋白非特异性结合的ssDNA,然后将剩余文库全部转移到蛋白包被孔中37 ℃孵育,用SELEX washing buffer(SELEX binding buffer + 0.05% Tween20)洗涤5次。加入SELEX Eluting buffer(20 mmol/L Tris-HCl,4 mol/L异硫氰酸胍,1 mmol/L DTT,pH = 8.3),于80 ℃水浴作用10 min,洗脱与PP65蛋白结合的ssDNA,经酚:氯仿:异戊醇(25:24:1体积比)抽提,无水乙醇沉淀,获得纯化的ssDNA,将其作为模板进行PCR扩增(条件为94 ℃预变性5 min;94 ℃变性30 s,65 ℃退火30 s,72 ℃延伸30 s,总18个循环;72 ℃延伸5 min)。而后不对称PCR扩增富集分离ssDNA用于下一轮筛选。每一轮筛选的关键参数见表1。

表1 SELEX筛选的关键参数

轮次	PP65蛋白量(μg)	ssDNA文库量(μg)	GST标签蛋白量(μg)	与空白(反筛)孵育时间(min)	与PP65孵育时间(min)	备注
1	2	1	0	30	60	空白对照孔
2	2	0.5	0	30	40	空白对照孔
3	1	0.5	0	45	45	空白对照孔
4	1	0.5	1	30	60	反筛对照孔
5	0.5	0.2	1	30	60	反筛对照孔
6	0.5	0.2	1	45	45	反筛对照孔
7	0.2	0.1	1	45	45	反筛对照孔
8	0.2	0.1	1	45	45	反筛对照孔

注:蛋白和文库的量是每孔中加入的总量,每孔加样的体积为100 μL,浓度 = 总量/100 μL。

1.2.1.3 克隆和测序 参照TaKaRa公司pMD18-T Simple Vector产品说明,将筛选获得的饱和文库与T克隆载体连接,16 ℃连接过夜,转化*E. coli* DH5α感受态细胞,挑选单克隆扩大培养并提取重组质粒,以提取质粒为模板,进行PCR扩增,扩增产物电泳检测,确定阳性克隆,并送上海生工生物技术有限公司测序。

1.2.1.4 适配子的亲和性检测 挑选单克隆,进行不对称PCR扩增,得到ssDNA,将此ssDNA与包被好的蛋白结合,采用酶联法测定其亲和性。按每孔1 μg ssDNA加入2 μg蛋白包被的酶标板孔,加入100 μL SELEX binding buffer混匀,37 ℃孵育40 min;SELEX washing buffer洗涤5次,加入链霉亲和素标记辣根过氧化物酶100 μL,37 ℃孵育30 min;洗涤缓冲液洗涤5次,然后每孔加入底物显色液A、B各50 μL,37 ℃显色15 min;2 mol/L浓硫酸50 μL终止反应,酶标仪于450 nm处测定光密度值[D(450)]。

1.2.1.5 适配子的结构分析 测序所得序列,采用DNAMAN软件进行适配子二级结构预测和结构分析。

1.2.2 适配子的活性鉴定

1.2.2.1 适配子的固定 根据亲和性检测结果挑选优势序列A4作为目标适配子,将其两端进行修饰并在5′端采用HEX荧光标记,其修饰后序列如下:5′-HEX-TTTTTGGGAGCTCAGAATAAACGCTCAAGGCATGGTCCTCGATCGTATGGCTTTGCGGTCGTGTTCGACATGAGGCCCGGATCAAAAAAA-NH_2C_7-3′。取1 μL羧基末端修饰磁微粒,用0.1 mol/L的MES(pH6.0)缓冲液清洗3次,加入100 μL含EDC浓度为5 g/L的MES缓冲液室温下活化30 min。适配子预先在95 ℃变性5 min,然后迅速冰浴10 min。而后取5 μL(1 μmol/L)修饰、预处理后的适配子加入已活化的磁珠悬液中,室温轻微震荡孵育1 h。经磁分

离,清洗缓冲液(PBS +5 mmol/L $MgCl_2$ +0.1% Tween20)清洗3次后,用1% BSA溶液室温下封闭6 h,备用。

1.2.2.2 适配子功能化磁珠检测HCMV PP65抗原 磁分离封闭完成的适配子功能化磁珠,清洗缓冲液清洗3次后,加入90 μL结合缓冲液(PBS +5 mmol/L $MgCl_2$ +0.05% Tween20)重悬磁珠,分别设置对照组以及实验组。对照组加入10 μL结合缓冲液,实验组中加入10 μL PP65抗原溶液(10 ng/μL),室温下轻微震荡孵育4 h,再磁分离,清洗3次后,加入95 μL结合缓冲液重悬磁珠,而后加入5 μL FITC标记的HCMV PP65单抗(100 μg/mL),室温下轻微震荡孵育6 h。最后经磁分离,清洗3次后,加入100 μL结合缓冲液重悬磁珠,吸取适量磁珠悬液完成改良牛鲍氏计数板充池,荧光显微镜下观察结果。

2 结果

2.1 HCMV PP65特异性适配子的筛选

以HCMV PP65为靶标,通过8轮的SELEX筛选,获得饱和的文库。经过克隆和测序,最终获得了6条与靶标分子高特异性结合的适配子,并分别命名为A4、A5、A6、A7、A10、A19,其序列见表2。

表2 SELEX筛选获得的HCMV PP65特异性适配子序列

编号	序列(5′→3′)
A4	GGGAGCTCAGAATAAACGCTCAAGGCATGGTCCTCGATCGTATGGCTTTGCGGTCGTGTTCGACATGAGGCCCGGATC
A5	GGGAGCTCAGAATAAACGCTCAATATCCCTATTCCGCTCCATGTTGCGTACCCGTGCCTTCGACATGAGGCCCGGATC
A6	GGGAGCTCAGAATAAACGCTCAACGGATTAGTCAATAGACTGGTGGCTTTGTGTGGTGTTCGACATGAGGCCCGGATC
A7	GGGAGCTCAGAATAAACGCTCAATATCCCTATTCCGCTCCATGCTGCGTACCCGTGCCTTCGACATGAGGCCCGGATC
A10	GGGAGCTCAGAATAAACGCTCAATGTGTTCATTTTTGGGGCTTGCGG-GTGGTTCGCTGTTCGACATGAGGCCCGGATC
A19	GGGAGCTCAGAATAAACGCTCAACGTCCCTCTCGTGTTGCTGCTGCTTTTTCCTGTGGTTCGACATGAGGCCCGGATC

下划线部分表示随机核苷酸序列

2.2 适配子的二级结构预测结果

采用DNAMAN软件,依据DNA最低自由能的运算法则,预测筛选所得的6条PP65特异性适配子序列的理论二级结构,结果见图1。筛选获得的6条适配子均能分别形成多个不同的茎环结构,为适配子与PP65蛋白的特异结合提供了结构基础。其中A4的二级结构最为复杂,推测其与PP65蛋白结合的亲和性更高。

2.3 适配子的亲和性检测结果

采用酶联法进行适配子亲和性测定。结果显示,与对照组相比,筛选得到的6条适配子序列(A4、A5、A6、A7、A10、A19)与PP65结合的亲和性较高,其中,A4的亲和性最高(图2)。因此,选择A4作为目标适配子,用于后续实验。

2.4 适配子功能化磁珠检测PP65抗原

通过磁珠-适配子-抗原-荧光单抗夹心法检测PP65抗原,荧光显微镜观察结果如图3所示。对照组与实验组磁珠表面均具有较明显的红色荧光,表明适配子成功偶联在磁珠表面;对照组磁珠表面无绿色荧光,实验组有特异绿色荧光,其位置与红色荧光和磁珠具有良好的对应性。结果表明筛选得到的适配子能够捕获样品中的PP65抗原,对PP65蛋白具有良好的结合活性,并且与荧光单抗无非特异性结合,提示适配子具有较好的结合特异性,可应用于PP65抗原的特异检测。

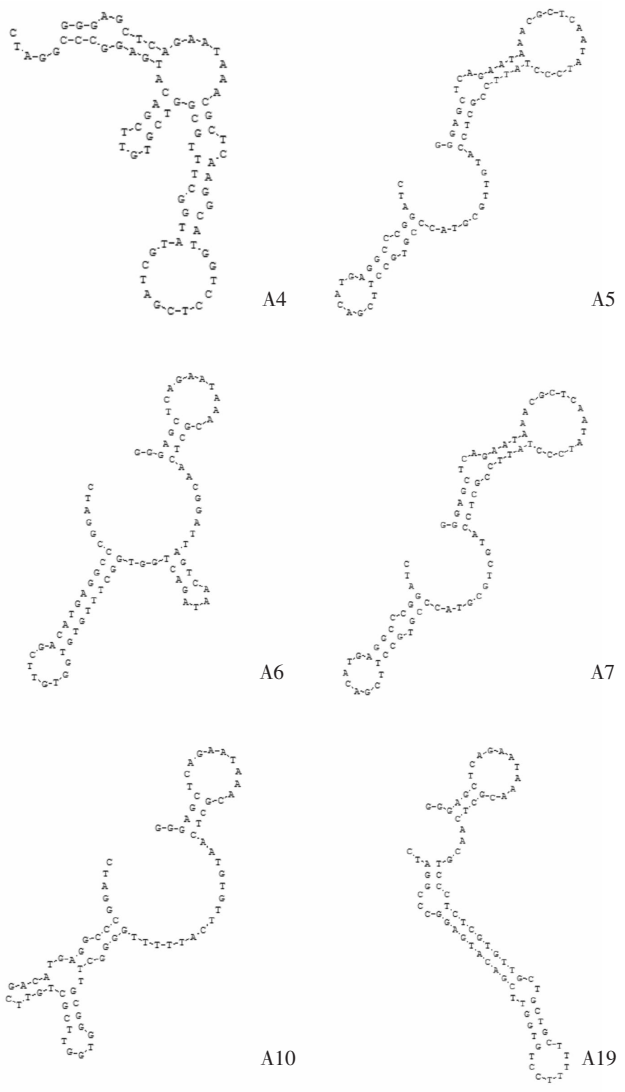
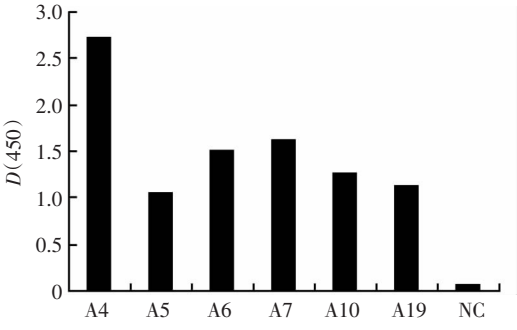


图1 适配子二级结构预测



A4、A5、A6、A7、A10、A19为适配子编号;NC:对照组

图2 适配子与HCMV PP65结合的亲和性

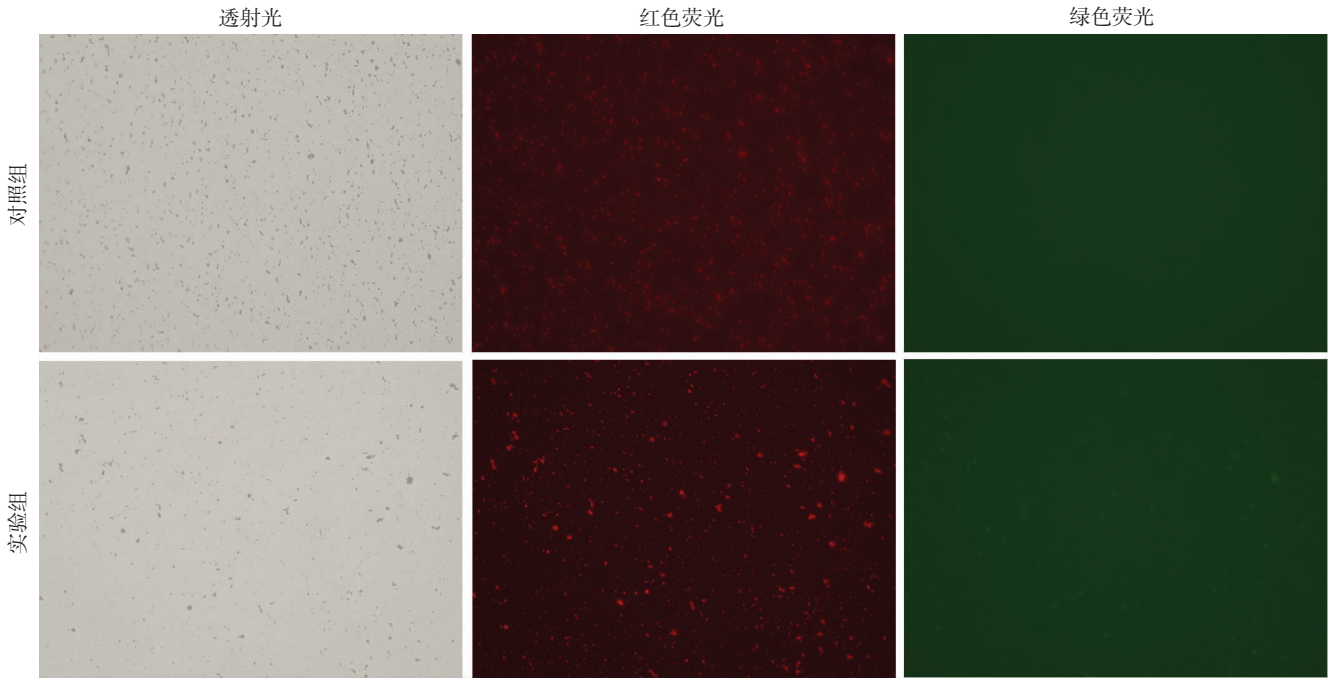


图 3　适配子功能化磁珠检测 PP65 抗原的荧光显微镜观察结果　（ ×400）

3　讨论

目前，HCMV PP65 抗原是 HCMV 活动性感染的早期病原学诊断标志物，其免疫学检测方法需要制备单克隆抗体，成本较昂贵。适配子也被称为“化学抗体”，作为一种能取代抗体的理想候选分子，除具有特异识别并结合靶分子的特性，还有自身显著的优点：如靶分子范围广，体外筛选易人工合成，易于标记和修饰等。目前，功能性寡核苷酸在基础研究、临床实验诊断、分子靶向治疗等生物医学领域已得到广泛应用[4-9]。

本研究以 HCMV PP65 抗原为靶标，采用 SELEX 技术进行筛选[10-11]，为了尽量减少非特异性结合，筛选的前 3 轮以空白孔作为反向筛选，后 5 轮以重组 HCMV PP65 抗原所带 GST 标签蛋白作为反向筛选，成功筛选出 6 条与 PP65 抗原特异结合的适配子序列。研究表明，适配子的二级结构是其与靶分子特异结合的结构基础[9,12]。因此，在适配子筛选过程中，预测其二级结构，可以推测其与靶分子的亲和性高低。本实验筛选所得 6 条适配子的二级结构预测结果显示，适配子与 PP65 蛋白结合的基础主要是茎环样结构及大口袋茎环样结构，如 A4 由复杂的茎环样结构组成，其与 PP65 的亲和性可能最高；A6 和 A7 具有相似的大口袋茎环样结构，其与 PP65 的亲和性相近；A10 只形成了一个大口袋结构，其茎环样结构不明显；而 A19 只形成了简单的茎环样结构，而口袋样结构不明显，故 A10 和 A19 与 PP65 的亲和性可能相对较低。亲和性实验结果证实，每条适配子与 PP65 抗原的亲和性检测 $D(450)$ 值均达到 1.0 以上，具有较高的亲和性。其中，适配子 A4 与 PP65 抗原结合的亲和性最高，与预测结果相同。因此，本实验选择 A4 作为筛选的目标适配子，用于后续研究。另外，A5 与 A7 序列上只存在一个碱基的差异，二级构象上也无显著差异，但两者与 PP65 的亲和性差异较大，可能由于大口袋上单个碱基的变化影响了适配子结构的稳定性。若要深入探讨适配子与 PP65 蛋白的结合机制，需进一步分析适配子的三级结构及四级结构。

目前，临床常以白细胞为 HCMV PP65 抗原检测载体，用免疫荧光技术进行检测，该法需要对新鲜样本进行处理，操作步骤繁琐，对白细胞形态和数量要求高，且不能检测尿液、脑脊液等样本中的游离 PP65 抗原，临床应用范围受限[13]。磁珠因其独特的电磁特性，可作为特殊的生物分子固定化载体，实现靶物质的有效捕获、富集和分离，已经广泛用于疾病的微量生物标志物的免疫测定、DNA 纯化和磁控抗癌药物的靶向输送等[14-16]。本研究应用 HCMV PP65 抗原适配子功能化的磁珠成功实现了对可溶性 PP65 抗原的免疫荧光检测，结果表明筛选的 A4 适配子能够捕获样品中的 PP65 抗原，对 PP65 蛋白具有良好的结合活性，并且与荧光单抗无非特异性结合，可应用于 PP65 抗原的特异检测，为进一步建立巨细胞病毒感染的检测新方法奠定了基础。

参考文献：

[1] Tomtishen J P 3rd. Human cytomegalovirus tegument proteins (pp65, pp71, pp150, pp28) [J]. Virol J, 2012, 9: 22.

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

[3] 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.

[4] Iliuk A B, Hu L, Tao W A. Aptamer in bioanalytical applications[J]. Anal Chem, 2011, 83(12): 4440 - 4452.

[5] Smuc T, Ahn I Y, Ulrich H. Nucleic acid aptamers as high affinity ligands in biotechnology and biosensorics[J]. J Pharm Biomed Anal, 2013, 81/82: 210 - 217.

[6] Dassie J P, Giangrande P H. Current progress on aptamer-targeted oligonucleotide therapeutics[J]. Ther Deliv, 2013, 4(12): 1527 - 1546.

[7] Radom F, Jurek P M, Mazurek M P, *et al*. Aptamers: molecules of great potential[J]. Biotechnol Adv, 2013, 31(8): 1260 - 1274.

[8] Syed M A, Pervaiz S. Advances in aptamers[J]. Oligonucleotides, 2010, 20(5): 215 - 224.

[9] Banerjee J, Nilsen-Hamilton M. Aptamers: multifunctional molecules for biomedical research [J]. J Mol Med (Berl), 2013, 91(12): 1333 - 1342.

[10] Qin L, Zheng R, Ma Z, *et al*. The selection and application of ssDNA aptamers against MPT64 protein in Mycobacterium tuberculosis [J]. Clin Chem Lab Med, 2009, 47(4): 405 - 411.

[11] Luo Y, Liu X, Jiang T, *et al*. Dual-aptamer-based biosensing of toxoplasma antibody [J]. Anal Chem, 2013, 85(17): 8354 - 8360.

[12] Chen B, Zuo X, Wang Y X, *et al*. Multiple conformations of SAM-II riboswitch detected with SAXS and NMR spectroscopy [J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40(7): 3117 - 3130.

[13] Cariani E, Pollara C P, Valloncini B, *et al*. Relationship between pp65 antigenemia levels and real-time quantitative DNA PCR for Human Cytomegalovirus (HCMV) management in immunocompromised patients [J]. BMC Infect Dis, 2007, 7: 138.

[14] Yan X, Cao Z, Kai M, *et al*. Label-free aptamer-based chemiluminescence detection of adenosine [J]. Talanta, 2009, 79(2): 383 - 387.

[15] Zhang Y, Zhou D. Magnetic particle-based ultrasensitive biosensors for diagnostics [J]. Expert Rev Mol Diagn, 2012, 12(6): 565 - 571.

[16] Karimi Z, Karimi L, Shokrollahi H. Nano-magnetic particles used in biomedicine: core and coating materials [J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2013, 33(5): 2465 - 2475.

(**收稿**:2014-01-06;**修回**:2014-02-20)

(编辑　邓强庭)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2014)10-1044-01

3D 腹腔镜肾盂切开取石术治疗复杂性感染性肾结石 1 例

王　强,王　军,陈宇东,刘同伟,李春吾　(071000 河北 保定,解放军第 252 医院泌尿外科)

[**关键词**] 3D 腹腔镜;肾盂切开取石术;肾盂输尿管交接部狭窄

[**中图法分类号**] R692.4　[**文献标志码**] B

1　临床资料

患者,男性,32 岁。因左侧腰部间断性胀痛 2 个月于 2013 年 12 月 15 日入院,无尿频、尿急、尿痛,无腹胀、腹泻、发热。查体无明显阳性体征。超声检查:左肾可见一强回声斑,约 2.2 cm × 1.1 cm 大小。IVU 检查:左肾结石伴左肾积水,考虑左肾盂、输尿管结合部狭窄,建议逆行造影检查。逆行 IVU 检查:拔出导管,左肾内造影剂缓慢流入膀胱,肾盂输尿管连接部引流不畅,肾盂输尿管交接部狭窄不除外(图 1)。CT 检查:左侧肾盂内结石,左侧肾盂扩张积水,壁增厚考虑感染(图 2A)。肾小球滤过率(GFR)值:左侧 44 mL/min。余实验室检查未见异常。临床诊断:左肾结石,左肾积水,左肾盂输尿管连接部狭窄不除外。全麻,右侧卧位,行 3D 腹腔镜下肾盂输尿管连接部探查 + 肾盂切开取石术。术中见:肾盂及肾盂输尿管连接部粘连严重,先游离出输尿管,沿输尿管向上小心分离肾盂输尿管交接部,充分游离分解粘连组织后解除连接部狭窄,遂自肾盂扩张处切开,将结石取出,术毕内置 D-J 管,4-0 号可吸收线间断缝合肾盂黏膜,放置腹膜后引流管 1 根,术后 3 d 拔出腹膜后引流管,术后 7 d 拆线出院。术后 1 个月经膀胱镜拔除输尿管支架管,术后 2 个月复查 GFR 值:左侧 54 mL/min,术后复查 CT 较术前比较积水明显减轻(图 2B)。



图 1　复杂性感染性肾结石患者逆行造影表现

[**通信作者**] 王　强, E-mail:09wangq@ sohu. com

[**优先出版**] http://www. cnki. net/kcms/detail/51. 1095. R. 20140522. 0916. 003. html(2014-5-22)

(下转 1049 页)