

· 论 著 ·

鼻咽癌核酸适配子的筛选及鉴定

陈文学^{1,2}, 张焜和^{1△}, 邹学森², 陈岳青², 李金高²

(1. 南昌大学第一附属医院消化研究所, 南昌 330000; 2. 江西省肿瘤医院检验科, 南昌 330000)

摘要:目的 利用指数富集的配套系统进化技术(SELEX)筛选人类疱疹病毒(EB病毒)阳性鼻咽癌细胞核酸适配子。方法 体外合成长度为 78 个核苷酸的随机 DNA 文库,通过 SELEX 技术,以正常鼻咽上皮细胞为靶标进行消减筛选,以 EB 病毒阳性低分化鼻咽癌细胞为靶标进行 10 轮的筛选,克隆、测序,并对适配子进行鉴定。结果 流式细胞仪检测亚文库与靶细胞的结合能力随着筛选轮数的增加荧光强度增强。聚类分析显示,适配子可以分为 3 个家族,1、2 家族具有保守序列。结论 初步建立 EB 病毒阳性鼻咽癌细胞核酸适配子库,筛选到具有亲和力和特异性的核酸适配子。

关键词:鼻咽肿瘤;适配子;指数富集的配套系统进化技术

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.19.005

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)19-2198-03

The screening and identification of nucleic acid aptamers to nasopharyngeal carcinoma

Chen Wenxue^{1,2}, Zhang Kunhe^{1△}, Zou Xuesen², Chen Yueqing², Li Jingao²

(1. Department of Clinical Laboratory, the Jiangxi Tumor Hospital, Nanchang, Jiangxi 330000, China; 2. Institute of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330000, China)

Abstract: **Objective** To obtain nucleic acid aptamers which can specifically bind to nasopharyngeal carcinoma (NPC) with positive EB virus by system evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX). **Methods** A total of 78 nucleotide units were combined *in vitro* as random DNA library. By the SELEX, normal nasopharynx epithelial cells were as target to reduce and screen, low differentiative NPC cells with positive EB virus were as target to conduct 10 rounds of selection, cloning and sequencing. The aptamer sequences was analyzed. **Results** The fluorescence intensity increased with selection rounds, which showed the binding capacity of sub-library tested by flow cytometry and target cells. Aptamers could divided into three families by clustering analysis. Conserved sequence was identified in family 1 and 2. **Conclusion** Aptamer library of NPC with positive EB virus was initially established, and nucleic acid aptamers with high binding affinity and specificity were obtained.

Key words: nasopharyngeal neoplasms; aptamer; systematic evolution of ligands by exponential enrichment

1990 年 Tuerk 等^[1]报道了指数富集的配套系统进化技术(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX),它是一项新的组合化学技术,利用体外化学合成随机寡核苷酸文库与靶分子相互作用,从中筛选出与靶分子特异结合的寡核苷酸,即核酸适配子。适配子是近年来公认的在疾病诊断和分子治疗中非常有应用前景的分子探针。本研究采用消减 SELEX 技术和细胞 SELEX 技术对人类疱疹病毒(EB 病毒)阳性鼻咽癌细胞进行筛选,并对所筛选的适配子进行初步鉴定,为进一步实现以核酸适配子为基础的鼻咽癌分子诊断奠定基础。

1 材料与与方法

1.1 文库和引物 用于 SELEX 筛选的 DNA 随机文库由上海生物工程技术有限公司合成。文库两端为固定序列,中间为 40 个碱基的随机序列(5'-ACC GAC CGT GCT GGA CTC TC-40nt-)AGT ATG AGC GAG CGT TGC G-3')。PCR 扩增所用的引物由 primer 5.0 软件设计,上游引物 5' 标记 FITC 荧光标记。引物序列如下上游引物(B1)序列:5'-FITC-ACC GAC CGT GCT GGA CTC T-3',下游引物(B2)序列:5'-CGC AAC GCT CGC TCA TAC T-3'。

1.2 细胞株与试剂 正常鼻咽上皮细胞株(NP69),EB 病毒阳性低分化鼻咽癌细胞株(C666),由中山大学附属肿瘤防治中心曾木圣教授赠送。无血清培养基 keratinocyte-SFM,1640 培养基购自 GIBCO 公司,胎牛血清购自杭州四季青, Dulbecco, s 磷酸盐缓冲液,酵母 tRNA 购自 Sigma 公司。洗涤缓冲液(含有 4.5 g/L 葡萄糖 5 mmol/L MgCl₂ 的 Dulbecco, s 磷酸盐

缓冲液),结合缓冲液(含有 0.1 mg/mL 酵母 tRNA 和 1 mg/mL BSA 的洗涤缓冲液)。

1.3 方法

1.3.1 SELEX 筛选程序^[2] (1)文库预处理:单链 DNA 文库(1.25 nmol)溶解在 500 μL 结合缓冲液中,95 °C 热变性 5 min,冰浴 10 min。(2)细胞预处理:培养瓶中的细胞用洗涤缓冲液洗 3 次,用 0.53 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)液进行消化,收集细胞。(3)消减筛选:将预处理的文库液与 NP69 对照细胞(2×10⁶)4 °C 孵育 60 min,收集与 NP69 不结合的核酸。(4)不对称扩增获得亚文库:用消减筛选收集的核酸为模板, FITC 标记的引物进行不对称 PCR 扩增,回收单链作为第二轮筛选的亚文库。(5)筛选:第二轮亚文库溶解于结合缓冲液中,95 °C 热变性 5 min,冰浴 10 min,与 C666 细胞 4 °C 孵育 30 min,洗涤缓冲液洗涤,95 °C 热变性 5 min,获得与细胞结合核酸,通过不对称扩增获得下一轮文库。(6)筛选的严谨性:通过增加筛选条件的严谨性来获得高亲和力、高特异性适配子库。筛选时间从 60 min 降低到 30 min,洗涤液的体积从 0.5~1.5 mL,洗涤次数从 1 次逐渐增加到 5 次,核酸与细胞的比例从 100 到 400。此外在筛选的过程中加入 20% 磷酸盐缓冲液(FBS)和 50~300 倍的酵母 tRNA 降低文库的非特异性结合。经过 10 个循环后亚文库和靶细胞结合强度不再增加筛选终止。

1.3.2 不对称 PCR 方法获得亚文库 (1)以收获的结合 ssDNA 为模板进行不对称 PCR 扩增,反应条件为 94 °C 预变性 3 min,94 °C 45 s,68 °C 90 s,20 个循环。(2)制备变性胶,切胶回收 ssDNA 作为下一轮筛选的亚文库。(3)将亚文库进行系

列稀释, 荧光定量 PCR 定量亚文库的量。

1.3.3 流式细胞仪分析亚文库 亚文库的亲合力: 3×10^5 细胞 (C666) 与重悬于 200 μL 结合缓冲液中与 FITC 标记的各轮亚文库避光冰浴 30 min。用 0.7 mL 结合缓冲液洗 2 次, 重悬于 0.3 mL 结合缓冲液中。流式细胞仪检测荧光强度。FITC 标记的原始文库作为阴性对照。

1.3.4 克隆测序及一级结构的分析 经 10 轮筛选得到的 ssDNA, 用 PCR 扩增成 dsDNA, 目的条带单一且在 78 bp, 外送上海生工进行克隆测序, RNA Structure 软件分析序列二级结构, Clustal X 软件进行序列同源性比对。

1.3.5 适配子亲和力鉴定 3×10^5 细胞 (C666) 重悬于 400 μL 结合缓冲液中, 加入 100 μL 6 个浓度梯度 FITC 标记的适配子或文库, 避光冰浴 50 min, 用 0.7 mL 结合缓冲液洗涤 2 次, 重悬于 0.4 mL 结合缓冲液中, 30 min 内进行流式细胞仪检测。所有亲和力检测实验均重复 1 次, 取每个浓度适配子与靶细胞结合的荧光强度的平均数来计算适配子的亲和力。适配子与靶细胞结合的解离常数通过 Graphpad Prism 软件作图求得。

2 结 果

2.1 鼻咽癌细胞 SELEX 筛选 应用 C666 鼻咽癌细胞进行了 10 轮筛选, 用正常鼻咽上皮进行 1 轮消减筛选。筛选过程中, 在结合缓冲液中加入了一定比例的酵母 tRNA 以及 BSA 以封闭非特异性结合位点, 去除非特异结合, 提高筛选效率。随着筛选轮次的增加, 筛选条件的严格性不断增加, 即逐渐增加核酸与细胞的比例, 缩短孵育结合的时间, 增加冲洗次数、液量和时间。

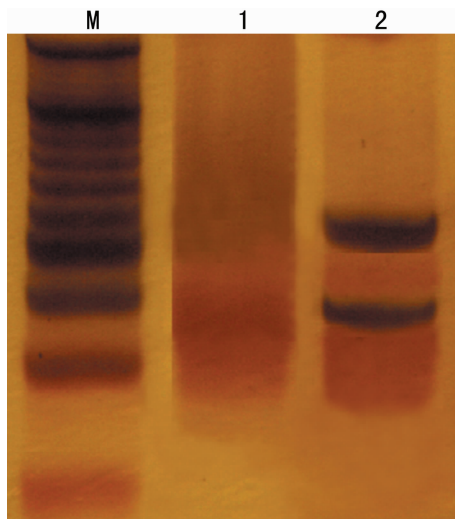
2.2 不对称 PCR 方法收获单链 DNA 文库 两步法不对称 PCR 扩增可以获得大量的 ssDNA, 同时变性胶可以有效地回收 ssDNA 作为下一轮筛选的文库, 见图 1。

2.3 适配子库富集过程的监测 在以细胞为靶进行 SELEX 筛选的方法中流式细胞仪以其速度快、分析细胞数量多、定量准确的特性成为监测文库富集的最好手段。采用流式细胞仪成功监测到适配子库富集, 各轮文库与鼻咽癌细胞 C666 结合流式检测荧光强度。见图 2。

2.4 核酸适配子克隆、测序及结构分析 第 10 轮筛选出的 ssDNA 适配子库用不带 FITC 标记的引物进行 PCR 扩增, 扩增所得 dsDNA 条带单一且在目的片段位置, 即可送生物公司进行克隆、测序。RNA Structure 对适配子进行二级结构的模拟, 发现适配子具有多种多样的二级结构, 二级结构模拟图 (图 3)。Clustal X 对适配子进行序列比对, 一级结构分析结果表明所有序列无共同的保守序列, 但可分为 3 个家族, 2 个家族

具有同源性序列, 一个家族没有同源性序列。序列比对结果见图 4。

2.5 适配子亲和力鉴定 在每个家族选 2 个适配子进行亲和力分析, 发现适配子对 C666 细胞均具有一定的亲和力, 通过 Graphpad Prism 拟合适配子饱和曲线图 (图 5), 测定适配子的 Kd 值。适配子 2、6、8、12、3、5 与鼻咽癌细胞 C666 结合的 Kd 值分别为 151.5、401.9、418.5、171.1、148.4 和 488.2 nmol/L。适配子的亲和力与 Kd 值成反比, Kd 值越大亲和力越低, 因此适配子 2 与 EB 病毒阳性鼻咽癌细胞 C666 的亲和力最高, Kd 值达到 151.5 nmol/L。



中性 PAGE 胶, M: 20 bp 标记物; 1: 回收的亚文库; 2: PCR 产物。

图 1 不对称 PCR 扩增获得亚文库

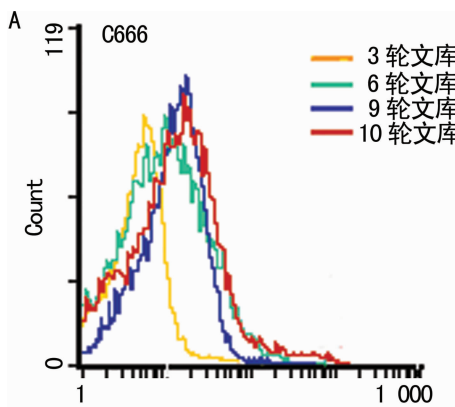


图 2 适配子库的富集

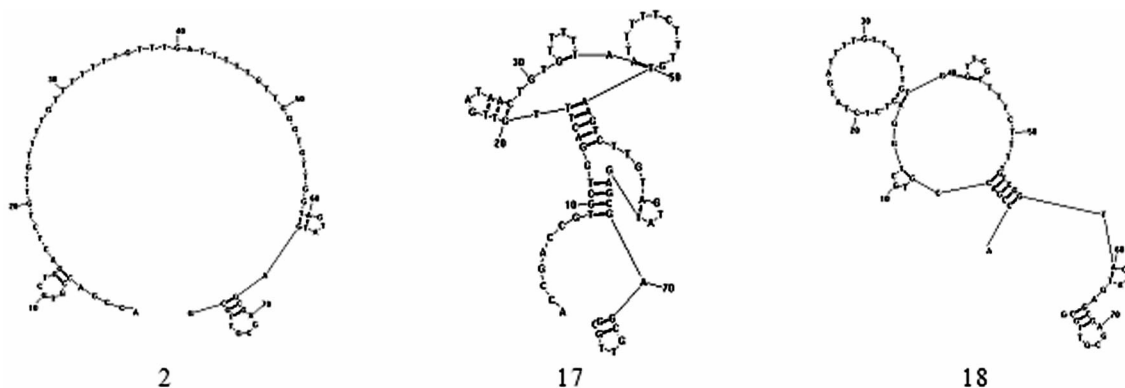


图 3 部分适配子的模拟二级结构

家族 1

18
26
12
15
1
3

```

CTATGATTTTGT---TTTGTGGTTCGTTTCTTTTGTGGT-----
GTTTGTTTTGT---TTTGTTTTTTGTGGTTTTTCGGT-----
GTTTGTTCGATTCGTTTGGGTTTGGTTT-TTTTGTGG-----
TTTTGTGGTTGTTATTTTTTTTGGTTGTTT-TTTTGTGT-----
-----CTGGGTTTCTTTTGGCTGTTTTTTTTTGTGTGCCCTGC
--GTAGATCTGAGTATGTTTTTGTCTTTTGTTTTTTTGGT-----
          *   * *   * **  **** *

```

保守序列 TTTT(G/T)T G(T/G)TT

家族 2

2
10
6
25
4
21

```

GTTGTTTTGTTTTTTTGTGTTGATTTTTGTTGG--GTGTTGGT----
-----TGTGTTTTTTTATTTTATCTTTTGTGCTGTGTTTGTGTT-
----GTGTGTTTTTCTTTTCTGTT-TCGGTGT-TGCCTTTGTTGCC
----GTGTGTTTATGCTGCGTTTATTTGTTT-CGTTTTGTTTT-
----ACTTCTCTTACATTGTGGCGTTTTTCTTGGTTTTGTT----
----TTTGCTTTTATATTGTTTC-TTTTATGAGATTTTTTTGTTGT-
          * *   *   *   *   ** **

```

保守序列 TT(T/G)GT

图 4 适配子的同源性比对结果

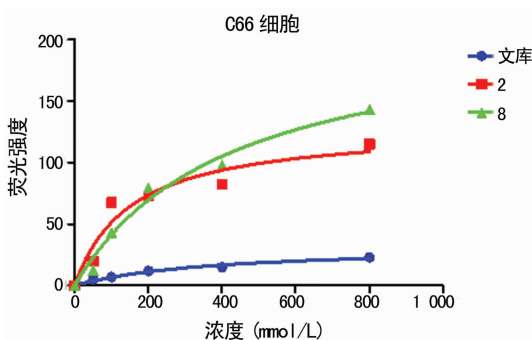


图 5 适配子饱和曲线

3 讨论

细胞 SELEX 是 SELEX 技术的一个衍生技术, 它的一个非常突出的优点是在未知细胞表面分子标志的情况下寻找出特异性识别细胞的适配子^[3-4]。适配子与抗体的功能有很多相似之处, 但是又优于抗体。适配子是体外化学合成的, 合成速度快, 储存和运输方便, 并且可以进行 5' 和 3' 端的核酸修饰^[5], 并且无毒性、免疫原型、在血液中存在时间短, 高的组织穿透性。因此适配子在肿瘤诊断和治疗等方面具有广泛的应用前景^[6-7]。细胞 SELEX 技术目前已有不少成功的报道。Shangguan 等^[8]用细胞 SELEX 技术筛选到小鼠肝癌细胞特异性的适配子; Chen 等^[9]筛选了小鼠细胞肺癌的核酸适配子, 此核酸适配子可以和靶细胞以外的其他小鼠细胞肺癌细胞系特异性结合, 不与非小鼠细胞肺癌腺癌、鳞癌、大细胞肺癌细胞系特异性结合。

NP69 细胞是来源于人鼻咽的正常上皮永生细胞系, C666 来源于鼻咽癌患者的鼻咽癌细胞系。NP69 与 C666 在形态学上非常相近, 都属于鼻咽上皮细胞, 而在生物学上又有显著的区别, 一种是正常细胞, 一种是肿瘤细胞。因此用 C666 作为筛选的靶细胞, 用 NP69 作为阴性对照进行消减筛选可以获得针对鼻咽癌细胞表面标志的适配子库。从适配子库中可以进一步获得用于鼻咽癌诊断和治疗的适配子。

DNA 适配子可以形成发夹、假节等多种二级空间结构, 进而与靶物质形成稳定的复合物^[9]。在随机 DNA 文库中存在各种结构的适配子, 能够识别自然界中的各种靶物质。本研究使用含有 40 个碱基的随机 DNA 文库, 实际库容量在 $1 \times 10^{15-16}$ ^[10-11], 通过细胞 SELEX 技术筛选到与鼻咽癌细胞 C666 高亲和力的适配子库。鼻咽癌细胞表面存在着复杂的蛋白结合位点, 每个结合位点可以通过氢键和范德华力与不同亲和力

的适配子相结合。在筛选的初始, 因为筛选条件不严谨, 各种亲和力的适配子均存在, 随着筛选轮数的增加, 适配子筛选的条件越来越严谨, 适配子之间通过竞争结合位点将亲和力高的适配子筛选出来。

从图 2 可以看出, 随着筛选轮数的增加亚文库与 C666 细胞结合荧光强度逐渐增加, 第 6 轮以后, 亚文库中高亲和力的适配子所占的比例增高, 结合到 C666 细胞表面的高亲和力的适配子群也随之增加, 第 10 轮亚文库与 C666 细胞结合的荧光强度不再增高, 说明亚文库 C666 细胞的结合达到饱和。

DNA 的保守序列又称基序 (motif), 作为结构域中的亚单元, 其功能是体现结构域的多种生物学作用。本研究经过 10 轮筛选, 随机 DNA 文库得到了明显的富集。克隆测序后进行序列分析表明, 所有适配子的随机区一级结构没有共同的保守序列, 但可以分为 3 个家族, 其中两个家族具有共同的保守序列, 第 1 家族基序为 TTTT(G/T)T G(T/G)TT, 第 2 家族基序为 TT(T/G)GT。基序在 DNA 适配子形成功能结构域中起了至关重要的作用, 每个基序代表 DNA 适配子不同的结构域, 同时决定了它结合不同的靶标位点。

EB 病毒阳性鼻咽癌细胞 C666 表面存在大量的鼻咽癌细胞特异性的抗原位点, 以其作为筛选的靶细胞可以筛选到针对不同抗原表位的适配子。本研究测序得到的适配子聚类分析后有一部分适配子不能聚类也说明了与适配子结合的靶分子的多样性。从每个家族选 2 个适配子进行亲和力鉴定, 发现适配子均对 C666 细胞具有一定的亲和力, 每个适配子的亲和力各不相同, 亲和力最高的适配子 Kd 值为 151.5 nmol/L。目前正在增加适配子的测序量, 扩大适配子的鉴定范围, 找出更多亲和力高的适配子, 为今后鼻咽癌的适配子诊断奠定基础。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] Fang X, Tan W. aptamers generated from cell-SELEX for molecular medicine: a chemical biology approach [J]. Acc Chem Res, 2010, 43(1): 48-57.
- [3] Hess GP, Ulrich H, Breiting HG, et al. Mechanism-based discovery of ligands that counteract inhibition of the nicotinic acetylcholine receptor by cocaine and MK-801 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(25): 13895-13900. (下转第 2203 页)

合并先天性心脏病的比例高于非重症患组($\chi^2=17.64>3.84$, $P<0.05$),合并先天性气道发育异常的比例也高于非重症组($\chi^2=26.44>3.84$, $P<0.05$),差异均有统计学意义。可见年龄大小、是否合并先天性心脏病或先天性气道发育异常也是影响病情轻重的因素。

2.5 预后 1 053 例治愈出院,60 例好转出院,12 例死亡,因病重放弃治疗出院 21 例。死亡患儿中 8 例出现在 2010 年 12 月至 2011 年 7 月;因病重放弃治疗患儿中 16 例出现在 2010 年 12 月至 2011 年 7 月。2010 年 12 月至 2011 年 7 月腺病毒肺炎预后不良率(包括死亡和病重放弃治疗)比较 2009 年 6 月至 2010 年 11 月显著增高($\chi^2=6.75>3.84$, $P<0.05$)。

3 讨论

腺病毒属于 DNA 病毒,可以引起一些轻微的感染如上下呼吸道、胃肠道感染或结膜炎。少见引起出血性膀胱炎、肝炎、出血性大肠炎、胰腺炎、肾炎、或脑炎。由于体液免疫不完善,腺病毒感染在儿童中更常见。在未经治疗的重症腺病毒肺炎患者中病死率可超过 50%。已经证实有 50 多种腺病毒亚型。不同的亚型引起的临床表现也不一样。不同国家或地区的流行型不同,且还会随时间改变。新的亚型在国家或洲际间传播使当地的流行型被新的亚型取代也时有发生^[5]。例如中国北京地区 1962~1985 年的流行型为 Adv-3 型,而从 1980~1990 年则转变为 Adv-7 型^[6]。

检测病毒的方法主要包括病毒分离培养、直接荧光抗体和 PCR 检测等。病毒分离培养能客观反映病毒感染的存在及其分型,常作为金标准,但耗时耗力,不能及时指导临床治疗,标本所含病毒数量少时会出现假阴性;PCR 检测具有高度灵敏性,但其特异性不足,对于没有临床表现的病毒携带者也可检出,流行病学研究时采用 PCR 检测结果会夸大结果。直接荧光抗体(DFA)检测的灵敏度不如 PCR,但对检测临床相关的病毒感染特异性更高,且比 PCR 检测更为快速、直观和廉价,故本文采用 DFA 作为病毒检测方法^[4,7]。

本研究结果显示,在 2010 年 12 月至 2011 年 7 月重庆儿童医院住院肺炎患儿中腺病毒抗原检出率更高,病情更重,病死率更高。由于本院患者来源覆盖重庆及周边地区,故此结果提示重庆及周边地区在 2010 年 12 月至 2011 年 7 月可能出现了腺病毒的流行,且腺病毒流行型可能较之前发生了转换,变得更具流行性,毒力更强,但此推论尚需流行病学调查结果佐证。在 2011 年 8 月后腺病毒的检出率与重症比例明显下降,

推测可能与病毒流行一段时间后人群免疫力逐步提高使发病率减少,病情减轻有关。此外,统计结果还显示年龄小、合并先天性心血管发育畸形或气道发育畸形是患儿发生重症感染的危险因素,与儿童呼吸道感染的危险因素一致^[8]。遗憾的是我院并未开展临床病毒分离培养检测,故未能对此次腺病毒流行的类型加以甄别。

参考文献:

- [1] Chen H. H5N1 avian influenza in China[J]. *Sci China C Life Sci*, 2009, 52(5): 419-427.
- [2] Girard MP, Tam JS, Assossou OM, et al. The 2009 A (H1N1) influenza virus pandemic: A review[J]. *Vaccine*, 2010, 28(31): 4895-4902.
- [3] Xu J, Qian Y, Wang S, et al. EV71: an emerging infectious disease vaccine target in the Far East[J]. *Vaccine*, 2010, 28(20): 3516-3521.
- [4] Rocholl C, Gerber K, Daly J, Pavia AT, et al. Adenoviral infections in children; the impact of rapid diagnosis[J]. *Pediatrics*, 2004, 113(1 Pt 1): e51.
- [5] Lynch JP 3rd, Fishbein M, Echavarría M, et al. Adenovirus [J]. *Semin Respir Crit Care Med*, 2011, 32(4): 494-511.
- [6] Li QG, Zheng QJ, Liu YH, et al. Molecular epidemiology of adenovirus types 3 and 7 isolated from children with pneumonia in Beijing[J]. *J Med Virol*, 1996, 49(3): 170-177.
- [7] Sadeghi CD, Aebi C, Gorgievski-Hrisoho M, et al. Twelve years' detection of respiratory viruses by immunofluorescence in hospitalised children; impact of the introduction of a new respiratory picornavirus assay[J]. *BMC Infect Dis*, 2011, 1(11): 41.
- [8] Ochoa Sangrador C, González de Dios J, Grupo de Revisión del Proyecto aBREVIADo, et al. Consensus conference on acute bronchiolitis(II): epidemiology of acute bronchiolitis. Review of the scientific evidence[J]. *An Pediatr(Barc)*, 2010, 72(3): 222. e1-222. e26.

(收稿日期:2012-12-08 修回日期:2013-03-15)

(上接第 2200 页)

- [4] Faria M, Ulrich H. The use of synthetic oligonucleotides as protein inhibitors and anticodon drugs in cancer therapy: Accomplishments and limitations [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2002, 2(4): 355-368.
- [5] Ulrich H, Martins AH, Pesquero JB. RNA and DNA aptamers in cytomics analysis [J]. *Cytometry Part A*, 2004, 59(2): 220-231.
- [6] Cerchia L, Giangrande PH, McNamara JO, et al. Cell-specific aptamers for targeted therapies [J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 535: 59-78.
- [7] Gold L. Oligonucleotides as research, diagnostic, and therapeutic agents [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(23): 13581-13584.

- [8] 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.
- [9] Chen HW, Medley CD, Sefah K, et al. Molecular Recognition of Small-Cell Lung Cancer Cells Using Aptamers [J]. *Chem Med Chem*, 2008, 3(6): 991-1001.
- [10] Fitzwater T, Polisky B. A SELEX primer [J]. *Methods Enzymol*, 1996, 267: 275-301.
- [11] Ayasena SD. Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics [J]. *Lin Chem*, 1999, 45(9): 1628-1650.

(收稿日期:2012-11-08 修回日期:2013-03-21)