

· 技术与方法 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.17.027

重组 PBP2a 转肽酶区蛋白核酸适配体的筛选及鉴定*

唐晓华¹, 杨卫琴¹, 黄结贞¹, 黄建琼²

(1. 广州医科大学附属第三医院检验科 510150; 2. 广州医科大学金城检验学院 510182)

[摘要] **目的** 筛选和鉴定重组青霉素结合蛋白 2a(PBP2a)转肽酶区蛋白的核酸适配体。**方法** 利用指数富集的配体系统进化技术(SELEX),以重组 PBP2a 转肽酶区蛋白为靶标,从单链 DNA 文库中筛选能与之特异性结合的核酸适配体。筛选产物克隆测序后,对其进行结构分析和特性鉴定。**结果** 经过 11 轮筛选,单链 DNA 文库与靶标蛋白的亲合力趋向稳定,将第 8、10 轮筛选产物克隆测序,对获得的 40 个适配体进行分析,一级结构分析显示 40 个适配体并无共同的保守序列,二级结构预测分析表明,其可分为 3 个家族。其中 13 号适配体与重组 PBP2a 蛋白亲和力最高,并能与之特异性结合。**结论** 利用 SELEX 技术成功筛选出特异性结合重组 PBP2a 转肽酶区蛋白的核酸适配体,为探索耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染的诊疗新途径奠定基础。

[关键词] 适配体;青霉素结合蛋白 2a;耐甲氧西林金黄色葡萄球菌**[中图分类号]** R378.1**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)17-2385-04

Screening and identification of aptamers against the recombinant transpeptidase domain of PBP2a*

Tang Xiaohua¹, Yang Weiqin¹, Huang Jiezheng¹, Huang Jianqiong²

(1. Department of Clinical Laboratory, the Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510150, China; 2. Department of Clinical Laboratory Medicine, Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510182, China)

[Abstract] **Objective** To screen and identify the aptamers of the recombinant transpeptidase domain of PBP2a (penicillin binding protein 2a, PBP2a). **Methods** By using the recombinant transpeptidase domain of PBP2a as the screening target, oligonucleotides which were capable of specifically binding to the protein were screened by a random oligonucleotide library through the stematic evolution of ligand by exponential enrichment (SELEX) technique. The ssDNA was cloned and sequenced, and the secondary structure of aptamer clones was predicted with mfold program. **Results** After 11 cycles of the selection, the aptamers which were capable of binding to PBP2a with high affinity have been selected, 40 clones from the 8 and 10 cycles were selected randomly and sequenced. The aptamers obtained had no obvious homology according to their sequences by the sequence alignments, and the 40 aptamers were classified to three groups according to their secondary structures. The aptamer 13 was found to be specific for the target protein with the highest affinity. **Conclusion** Aptamers for the recombinant transpeptidase domain of PBP2a with high affinity and specificity were successfully screened by SELEX, which lays a foundation for exploring new ways of diagnosis and treatment of MRSA infection.

[Key words] aptamers; penicillin binding protein 2a; MRSA

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的耐药机制是 MecA 基因编码产生了对 β-内酰胺类抗生素亲和力极低的膜蛋白—青霉素结合蛋白 2a (penicillin binding protein 2a, PBP2a)所致。目前,MRSA 院内外感染均严重,有效药物不多,院内感染病死率极高,探索有效控制 MRSA 感染的新策略迫在眉睫。近年出现的核酸适配体为根本改变目前的抗菌治疗窘境展示了一个全新的研究领域,课题组前期制备的重组 PBP2a 转肽酶区蛋白^[1-2]为本实验提供了一个极佳的抗菌靶点和研究优势。本研究以此重组蛋白为靶分子,利用指数富集的配体系统进化技术(SELEX)筛选针对 MRSA PBP2a 的核酸适配体,为探索 MRSA 感染的诊疗新途径奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料 重组 PBP2a 转肽酶区蛋白为本课题组制备及保存。ssDNA 文库及引物^[3];随机单链 DNA 文库 5'-ACG CTC

GGA TGC CAC TAC AG-45n-CTC ATG GAC GTG CTG GTG AC-3',上游引物(P1):5'-ACG CTC GGA TGC CAC TAC AG-3',下游引物(P2):5'-GTC ACC AGC ACG TCC ATG AG-3';上游标记引物(P3):5'-Dig(地高辛)-ACG CTC GGA TGC CAC TAC AG-3',下游标记引物(P4):5'-Biotin(生物素)-GTC ACC AGC ACG TCC ATG AG-3'(上述文库和引物皆为上海英骏公司合成)。DNA Marker 购自广州捷倍斯公司。抗地高辛抗体购自 Jackson 公司。链霉亲和素磁珠,双排磁力架购自 Invitrogen 公司。MRSA PBP2a 乳胶凝集试剂盒为 Biomerieux 公司产品。酶标反应板购自 Corning 公司。硝酸纤维素膜(NC)购自 BIO-RAD 公司。氯金酸为 Sigma 公司产品。其余试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 PBP2a 核酸适配体的筛选^[3-4] (1)将纯化的重组

* 基金项目:广州市医药卫生科技项目(20151A010102)。 作者简介:唐晓华(1982—),主管技师,硕士,主要从事临床检验工作。

PBP2a 蛋白包被于 96 孔板上(包被液为 0.05 mol/L NaHCO₃, pH 9.6 的缓冲液), 4 °C 包被过夜, 同时设立空白对照孔; 次日洗板后, 用 3% 牛血清白蛋白(BSA)封闭 2 h。(2) 随机单链 DNA 文库用结合缓冲液(SHCKM 液: 20 mmol/L Hepes pH 7.35, 5 mmol/L KCl, 120 mmol/L NaCl, 1 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L CaCl₂)调至合适浓度, 在 95 °C 条件下变性 5 min, 4 °C 冷却 5 min, 室温 5 min 备用。(3) 将 ssDNA 同结合缓冲液与经 3% BSA 封闭的空白对照孔 37 °C 结合 40 min, 反筛去除与 BSA 结合的 ssDNA。(4) 将上清液转移到重组 PBP2a 蛋白包被孔中 37 °C 结合 40 min; 然后用洗涤缓冲液(SHCKM 液+0.05% Tween 20)洗 6 次, 洗去未结合的 ssDNA; (5) 再加洗脱缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, 4 mol/L 异硫氰酸胍, 1 mmol/L DTT, pH 8.3)于 80 °C 作用 10 min, 洗脱下与重组 PBP2a 蛋白结合的 ssDNA, 经 DNA 纯化试剂盒回收后, 去除杂质溶解于 50 μL TE 缓冲液中。

1.2.2 PCR 条件优化和单链 DNA 的制备 以溶于 TE 中的 ssDNA 为模板, 用上游引物和生物素下游引物进行 PCR 扩增, 在第 7、10、15、20、23、25 个循环处分别取样, 3% 琼脂糖凝胶电泳找出最适循环数。以 ssDNA 为模板, 用上游引物(P1)和生物素下游引物(P2)按最适合条件扩增, 扩增的 dsDNA 产物经纯化后, 与链酶亲和素磁珠结合, 后用 0.15 mol/L 的 NaOH 使 dsDNA 变性解链, 生物素标记的链与链酶亲和素结合留在磁珠上, 不带生物素的链解离下来, 经乙醇沉淀后, 溶于 TE 中, 测定吸光度(A)值, 作为次级 ssDNA 文库。重复上述步骤, 经过 6~11 轮筛选后, 测定每轮所得文库与 PBP2a 的亲合力, 当亲合力趋于饱和时, 停止筛选。

1.2.3 文库与 PBP2a 亲和力测定^[3-4] (1) 将各轮筛选所得的次级 ssDNA 用地高辛标记的上游引物(P3)和生物素标记的下游引物(P4)进行 PCR 扩增, 扩增出的 dsDNA 除非文库链标记生物素以外, 文库链也标记上了地高辛, dsDNA 经 DNA 纯化试剂盒纯化后, 利用亲和素磁珠级磁力架分离出地高辛标记的文库链。为提高目的 DNA 的产量, 减少非特异性条带产生, 每轮筛选后均需优化由 ssDNA 扩增产生 dsDNA 的循环数。(2) 以重组 PBP2a 蛋白包被 96 孔板上, 同时设置空白对照孔包被孔, 3% BSA 封闭洗板后, 加入地高辛标记的文库链孵育洗板, 再加入碱性磷酸酶标记的地高辛抗体(经滴定后的稀释度为 1:10 000)200 μL, 37 °C 孵育 40 min, PBS-T 洗板 3 次, 最后 1 遍用 ddH₂O 洗, 二乙醇胺(DEA)缓冲液平衡 5 min, 弃去孔内液体排干后, 加入 200 μL 1 mg/mL 的 PNPP, 30 °C 45 min 显色, 终止反应后于酶标仪内测定 A₄₅₀。

1.2.4 克隆与测序及适配体结构分析 经 8、10 轮筛选得到的 ssDNA, 经 PCR 扩增成 dsDNA, 回收纯化后连 pMD19-T 载体, 转化后各挑选 20 个克隆进行菌落 PCR 的鉴定, 将鉴定成功的菌落送北京鼎国生物有限公司测序。根据测序结果, 运用 DNAMAN 和 mfold (<http://mfold.rna.albany.edu/q=mfold/DNA-Folding-Form>), (150 mmol/L Na⁺, 1 mmol/L Mg²⁺)对测序结果进行结构分析^[5]。

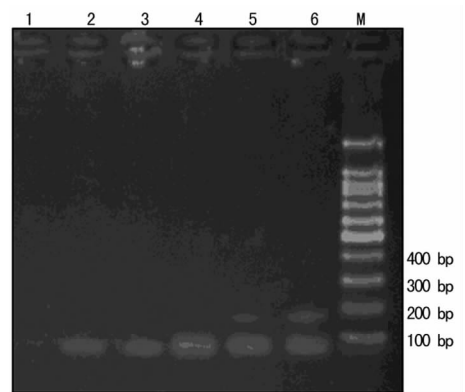
1.2.5 适配体亲和力测定 抽取适配体中能级较低及结构稳定的 6 个含有相应适配体序列的质粒, 以此为模板, 按 1.2.3 的方法扩增及分离出地高辛标记的文库链后, 并测定其亲

和力。

1.2.6 斑点胶体金渗滤法检测适配体与 PBP2a 结合特异性^[6-7] 将亲和力最高的适配体送公司合成, 按文献的方法标记于胶体金上: (1) 超纯水溶解氯化金使其浓度为 0.01%, 加热煮沸 3 min, 后每 100 毫升加入 1 mL 1% 枸橼酸钠溶液, 迅速混匀, 继续煮沸 6 min, 冷却, 过滤备用; (2) 取 5 mL 胶体金颗粒加入 800 nmol 适配子混匀, 静置后用 2% BSA 封闭多余的位点, 并稳定体系, 4 °C 冰箱放置过夜。第 2 天取出, 15 000 r/min 离心 1 h, 吸弃上清液, 以 500 μL PBST 重悬, 4 °C 贮存至使用; (3) NC 用蒸馏水浸泡 20 min, 室温自然晾干。将重组 PBP2a、大肠杆菌菌体蛋白提取液、MRSA 菌体蛋白提取液及甲氧西林金黄色葡萄球菌(MSSA)菌体蛋白提取液(用 PBP2a 乳胶凝集商品试剂盒提取)及 BSA 分别点在 NC 膜上, 同时设置空白对照, 室温自然晾干, 用 1% BSA 封闭, 再用 PBS 洗涤干燥后密闭保存于 4 °C。将制备好的抗原膜片置于滤板内, 渗干液体后, 每孔加入 50 μL 步骤(2)制备的金标适配体, 再用 100 μL PBST 洗涤 3 遍, 观察有无红色斑点出现。

2 结果

2.1 PCR 扩增条件优化 以第 1 轮筛选纯化的 ssDNA 为模板, 用上游引物和生物素标记的下游引物进行 PCR 扩增, 不同循环数下产生 dsDNA 电泳结果(图 1), 在 PCR 循环数为 10 时可见 85 bp 文库条带, 随着 PCR 循环数增加, 产物量逐渐增加(泳道 3、4), 但是到循环数为 23 时, 在文库条带上方出现了非特异条带(泳道 5、6), 即在循环数为 20(泳道 4)时的 PCR 产物为后续实验所用。



M: DNA Marker; 1: 7 循环; 2: 10 循环; 3: 15 循环; 4: 20 循环; 5: 23 循环; 6: 25 循环。

图 1 ssDNA 到 dsDNA PCR 循环数的摸索

2.2 PBP2a 核酸适配体的筛选及亲和力测定 为了获得亲和力较高的核酸适配体, 在筛选过程中逐步减少 BP2a 蛋白量和 ssDNA 文库量, 并逐渐增加 tRNA 的浓度, 整个筛选过程中 ssDNA 文库及 PBP2a 投入量, 一共进行了 11 轮筛选(表 1)。前 8 轮中, 文库的亲合力随着筛选轮数依次升高, 表明文库在慢慢富集。第 9 轮筛选, PBP2a 的投入量减少时文库亲和力有所降低, 而第 10 轮文库的亲合力升高但是与第 8 轮的差别不大, 第 11 轮文库的亲合力又下降, 表明文库的富集已完成。选取亲合力最高且相差不大的第 8 轮和第 10 轮的文库进行了克隆和测序。各轮筛选文库与重组 PBP2a 亲和力, 见图 2。

2.3 适配体结构分析 取 8、10 轮筛选产物进行克隆测序, 并

用 DNAMAN 软件对测序结果进行比对分析,40 个适配体序列中并无共同保守序列。用 mfold 分析适配体的二级结构,多为含 1 个或多个茎环结构,可分为 3 个家族,其预测的二级结构见图 3。

表 1 各轮筛选的 ssDNA 用量及 PBP2a 包被量

筛选轮数	PBP2a 包被量 (ng)	文库含量 (pmol)	tRNA 浓度 (mg/L)
1	500	1 000	0.00
2	400	800	0.15
3	300	800	0.20
4	200	600	0.50
5	160	500	0.80
6	100	300	1.00
7	80	200	1.00
8	80	200	1.00
9	50	100	1.00
10	50	100	1.00
11	50	100	1.00

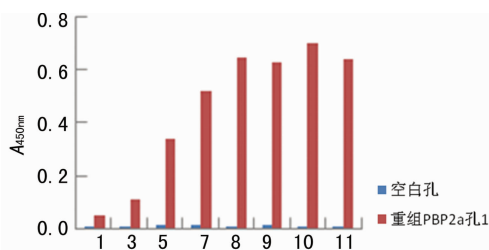
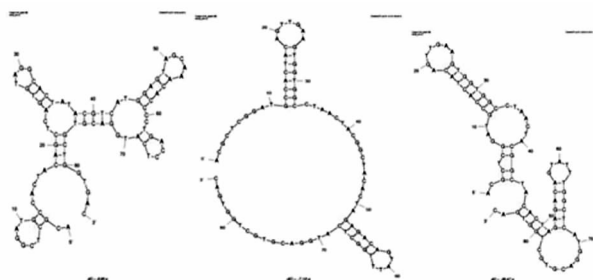


图 2 各轮筛选文库与重组 PBP2a 亲和力



A: 适配体 1~6; B: 适配体 2~13; C: 适配体 3~4。

图 3 适配体二级结构预测图

2.4 适配体亲和力测定 从 3 个家族中选取能级较低结构较稳定的 6 个适配体进行亲和力测定,发现家族 2 中的 13 号适配体与 PBP2a 亲和力最高,见图 4。

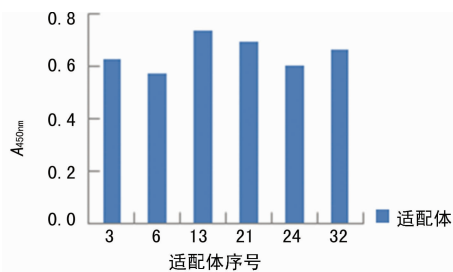
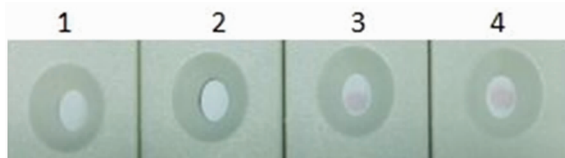


图 4 不同适配体亲和力直方图

2.5 适配体特异性测定 分别将 BSA、MSSA 菌体蛋白裂解液、重组 PBP2a 蛋白、MRSA 菌体蛋白裂解液点在 NC 膜上,BSA 封闭后滴加金标记的适配体,可以快速清晰地看见重组 PBP2a 及 MRSA 菌体蛋白裂解液点样的膜上出现红色斑点,而其 MSSA 菌体蛋白提取液膜上没有红色斑点出现,表明 13 号适配体不仅能特异性的与重组 PBP2a 相结合,还能与 MRSA 菌体中的天然 PBP2a 蛋白特异性结合,见图 5。



1:BSA;2:MSSA 菌体蛋白裂解液;3:重组 PBP2a 蛋白;4:MRSA 菌体蛋白裂解液。

图 5 适配体的特异性分析

3 讨论

SELEX 是近十几年兴起并迅速得到发展的高通量生物文库筛选技术^[8]。应用大容量的随机寡核苷酸文库,结合 PCR 体外扩增技术,以指数级富集与靶分子特异结合的寡核苷酸配基,被称为适配体^[9]。适配体不仅可取代抗体用于临床诊断和检测,而且由于核酸适配体与蛋白特异性结合后往往能抑制蛋白的功能,可用于直接干扰疾病的发生、发展过程,而且它缺乏免疫原性,体内渗透力强,因此又可作为一种很有发展前途的药物分子用于疾病的治疗。迄今筛选到的 HIV、HCV、多种肿瘤及肿瘤相关因子、凝血酶、弹性蛋白酶、茶碱的适配体已在临床检测和治疗中展示了良好的应用前景^[10-12]。

MRSA 的主要耐药机制是 MecA 基因编码低亲和力蛋白 PBP2a 所致,PBP2a 对 β-内酰胺类抗生素亲和力很低因而很少或不被该类抗生素结合,当 β-内酰胺类抗生素破坏高亲和力 PBPs 时,PBP2a 的存在仍能维持细菌的生长和繁殖,表现出耐药性。PBP2a 约含有 668 个氨基酸,相对分子质量为 78×10³,由 N-末端跨膜区、非青霉素结合区和转肽酶区 3 个部分组成,其中转肽酶区内含低亲和力的 β-内酰胺类抗生素作用位点,是 PBP2a 行使其主要功能即转肽酶功能的区域^[1]。

本研究以重组 PBP2a 转肽酶区蛋白为靶蛋白,筛选与之特异性结合的适配体。由于整个文库链较短,只有 85 bp,PCR 循环数过多很容易产生非特异性条带,为提高筛选的有效性,本文在每一轮的筛选过程中,都对 PCR 循环数进行优化,在 PCR 过程中,进行一定的循环后就要取出部分 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,以确定正确的 PCR 循环数。

利用 mfold 模拟适配体的二级结构显示,适配体的结构以茎环和口袋为主,提示二者可能是适配体与 PBP2a 蛋白结合的结构基础。本研究按照其结构,将 40 个适配体分为 3 个组,每组具有共同的结构特征,它们可能与靶蛋白的不同表位相结合。对 6 个代表性的适配体进行亲和力测试,结果显示第 2 组的 13 号适配体与靶蛋白的亲和力最高,提示大口袋小茎环结构的适配体与 PBP2a 蛋白的结合最紧密。

笔者采用了斑点渗滤法检测适配体的特异性,不需特殊的仪器设备,而且操作简便、快速。MRSA、MSSA 细胞膜含有 PBP1、PBP2、PBP3 和 PBP4,以及其他一些杂蛋白,经 PBP2a

乳胶凝集商品试剂盒提取液提取后点样与 NC 膜上, 胶体金标记的适配体能与 MRSA 菌体蛋白提取液发生反应而不与 MSSA 菌体蛋白反应, 表明 13 号适配体不仅能特异性识别重组 PBP2a 蛋白, 还可以识别 MRSA 菌体中的天然 PBP2a 蛋白。

综上所述, 本实验获得了高亲和力、高特异性的重组 PBP2a 转肽酶区蛋白核酸适配体, 为探索 MRSA 感染的诊疗新途径奠定基础。

参考文献

- [1] 徐霞, 谢闰娥, 杜晶春. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 PBP2a 转肽酶区的克隆表达及纯化鉴定[J]. 生物技术通讯, 2006, 17(4): 543-545.
- [2] 徐霞, 唐晓华, 谢闰娥. 抗 MRSA-PBP2a 转肽酶区蛋白单克隆抗体的制备、鉴定及初步应用[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2007, 23(6): 552-555.
- [3] 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.
- [4] 陈孜, 徐又佳, 李光飞, 等. SELEX 筛选骨肉瘤 HER2 适配体方法的建立[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2014, 35(5): 703-706, 709.
- [5] 彭磊, 张欣, 孟焕新. 人重组 S100A8 蛋白适配体的筛选和结构分析[J]. 北京大学学报(医学版), 2012, 44(1): 11-16.
- [6] 解瑶, 刘中成, 张艳芬, 等. 适于标记核酸适配子胶体金的

制备及性能[J]. 河北大学学报(自然科学版), 2014, 34(3): 284-289.

- [7] Dorraj GS, Rassae MJ, Latifi AM, et al. Selection of DNA aptamers against Human Cardiac Troponin I for colorimetric sensor based dot blot application[J]. J Biotechnol, 2015, 208(20): 80-86.
- [8] Sun H, Zu Y. A highlight of recent advances in aptamer technology and its application[J]. Molecules, 2015, 20(7): 11959-11980.
- [9] Darmostuk M, Rimpelova S, Gbelcova H, et al. Current approaches in SELEX: An update to aptamer selection technology[J]. Biotechnol Adv, 2015, 33(6): 1141-1161.
- [10] 孙卫国, 胡永亮, 李邦印, 等. SELEX 技术与临床应用[J]. 中华检验医学杂志, 2013, 36(2): 188-190.
- [11] Li WB, Wang KY, Zhao M, et al. Development of aptamer oligonucleotides as anticoagulants and antithrombotics for cardiovascular diseases; current status[J]. Thromb Res, 2014, 134(4): 769-773.
- [12] Ara MN, Matsuda T, Hyodo M, et al. An aptamer ligand based liposomal nanocarrier system that targets tumor endothelial cells[J]. Biomaterials, 2014, 35(25): 7110-7120.

(收稿日期: 2015-12-13 修回日期: 2016-02-23)

(上接第 2384 页)

- [9] Purhonen S, Kauko M, Koski EM, et al. Comparison of tropisetron, droperidol, and saline in the prevention of postoperative nausea and vomiting after gynecologic surgery[J]. Anesth Analg, 1997, 84(3): 662-667.
- [10] Zhou H, Xu H, Zhang J, et al. Combination of dexamethasone and tropisetron before thyroidectomy to alleviate postoperative nausea, vomiting, and pain; randomized controlled trial[J]. World J Surg, 2012, 36(6): 1217-1224.
- [11] 廖晓力, 朱宏飞, 刘友光, 等. 托烷司琼预防颅脑外科手术后恶心呕吐的临床观察[J]. 数理医药学杂志, 2007, 20(4): 521-522.
- [12] 姚悦, 邵雪泉. 托烷司琼联合氟哌利多预防腹腔镜胆囊切除术后恶心呕吐的临床观察[J]. 实用医学杂志, 2011, 27(16): 3090-3091.
- [13] Xu KQ, Wang B, Huang WQ, et al. Effects of Tropisetron on PONV after upper abdominal surgery[J]. F Med Sci Anesth Resus, 2005, 26(1): 1-3.
- [14] 周东民, 幸芳, 冯艳平. 托烷司琼复合甲泼尼龙对乳腺癌患者术后恶心呕吐的防治作用[J]. 山西医药杂志, 2010, 39(7): 641-642.
- [15] Papadima A, Gourgiotis S, Lagoudianakis E, et al. Granisetron versus tropisetron in the prevention of postoperative nausea and vomiting after total thyroidectomy[J]. Saudi J

Anaesth, 2013, 7(1): 68-74.

- [16] Contreras-Dominguez V, Carbonell-Bellolio P. Prophylactic antiemetic therapy for acute abdominal surgery. A comparative study of droperidol, metoclopramide, tropisetron, granisetron and dexamethasone[J]. Rev Bras Anesthesiol, 2008, 58(1): 35-44.
- [17] Alon E, Kocian R, Nett PC, et al. Tropisetron for the prevention of postoperative nausea and vomiting in women undergoing gynecologic surgery[J]. Anesth Analg, 1996, 82(2): 338-341.
- [18] Capouet V, De Pauw C, Vernet B, et al. Single dose i. v. tropisetron in the prevention of postoperative nausea and vomiting after gynaecological surgery[J]. Br J Anaesthesia, 1996(76): 54-60.
- [19] Mei W, Li M, Yu Y, et al. Tropisetron alleviate early post-operative pain after gynecological laparoscopy in sevoflurane based general anaesthesia: a randomized, parallel-group, factorial study[J]. Eur J Pain, 2014, 18(2): 238-248.
- [20] Tsui SL, Ng KF, Wong LC, et al. Prevention of postoperative nausea and vomiting in gynaecological laparotomies: a comparison of tropisetron and ondansetron[J]. Anaesth Intensive Care, 1999, 27(5): 471-476.

(收稿日期: 2015-12-28 修回日期: 2016-02-26)