

幽门螺杆菌 ssDNA 适配子的筛选及其应用*

黄震¹, 迟秀文², 蒲荣³, 束振华¹, 孙俊生¹, 王前^{1△} (1. 广东省深圳市龙岗中心医院 518116; 2. 广东医学院护理学院, 广东东莞 523808; 3. 广东省东莞市第三人民医院 523326; 4. 南方医科大学南方医院, 广州 510515)

【摘要】目的 通过富集的配基系统进化技术(SELEX)筛选出与幽门螺杆菌(HP)菌体具有高亲和性适配子, 并且利用其检测组织和活体内 HP 的感染。**方法** 培养 HP 细菌, 利用 SELEX 筛选获得 HP 菌体的适配子。在 HP 感染患者活检组织验证其结合。**结果** 从第 6 轮筛选所得 ssDNA 中筛选出一条高结合力的适配子命名为 HP1, 将适配子 HP1 区别于其他筛选出的适配子, 并检测其与幽门螺旋杆菌的亲合力。**结论** 初步获得了针对 HP 菌体筛选出高亲和性适配子, 为开发 HP 诊断试剂奠定了基础。

【关键词】 幽门螺杆菌; 配基系统进化技术; 适配子; 诊断

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.14.012 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)14-2006-03

Screening and application of ssDNA aptamers of Helicobacter pylori* HUANG Zhen¹, CHI Xiu-wen², PU Rong³, SHU Zhen-hua¹, SUN Jun-sheng¹, WANG Qian^{1△} (1. Longgang Central Hospital, Shenzhen, Guangdong 518116, China; 2. Nursing College, Guangdong Medical College, Dongguan, Guangdong 523808, China; 3. Dongguan Municipal Third People's Hospital, Dongguan, Guangdong 523326, China; 4. Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China)

【Abstract】Objective To screen the high-affinity aptamers of Helicobacter pylori (HP) by systematic evolution of ligands by exponential enrichment(SELEX) and to apply this technique to detect HP infection in tissue and in vivo. **Methods** HP was cultured. SELEX was applied to conduct screening for obtaining the aptamers of HP. The aptamers were used to detect the HP infection in biopsies. **Results** The high affinity aptamer was screened from the 6th rounds selection, named HP1. The aptamer HP1 was used to distinguish the HP from non-HP and its binding force with HP was detected. **Conclusion** The high-affinity aptamers binding to HP is successfully selected from the initial ssDNA library, which lays a foundation for the development of HP infection diagnostic reagents.

【Key words】 helicobacter pylori; SELEX; aptamer; diagnosis

目前幽门螺杆菌(HP)全球范围内感染率高达 50% 以上, 而在我国平均感染率约为 59%, 且存在着地域差异^[1-2]。因此, 对其早期快速诊断是治疗的关键。传统的方法主要分为侵入型和非侵入型诊断。鉴于传统检测方法灵敏度、特异度不高、误诊率高等缺点, 亟待开发一种能够快速、简便、特异性较高的诊断方法, 从而对 HP 感染进行诊断。本试验选用 SELEX 是一种成熟的应用到各种靶标筛选的技术, 包括金属离子、药物、氨基酸、细胞因子、抗菌药物、全菌体、多肽等, 其中蛋白质类靶分子最多^[3]。有学者曾报道, 以结核分枝杆菌 H37Rv 的菌体为靶标, 筛选获得能够与之特异性结合的 ssDNA, 该适配子能够用于诊断并阻断 H37Rv 感染^[4]。此外经 SELEX 筛选获得的特异性结合靶分子的适配子与传统意义上抗体相比, 具有相对分子质量小, 无抗原性, 能够稳定合成, 同时便于荧光、生物素等多种修饰等特点, 是极具应用前景的新型生物制剂^[5]。

1 材料与方 法

1.1 材料来源

1.1.1 菌株 HP 标准菌株 NCTC11637 由中国疾病控制中

心传染病预防控制所提供。

1.1.2 试剂及仪器 引物由上海生物有限公司合成; 用于克隆构建的主要试剂 BamHI、EcoRI、T4 DNA 连接酶等分子生物学试剂购自 Fermentas 公司; 核酸蛋白检测仪(德国 Eppendorf 公司); 紫外透射仪(Bioimaging System 美国 UVP 公司); pUC19 质粒、DH5a 菌由本实验室保存。

1.1.3 随机单链 DNA(ssDNA)文库的构建和引物合成 随机(ssDNA 文库的构建和引物合成构建了长度为 78 nt 的 ssDNA 文库, 两端为固定序列, 中间 40 个核苷酸为随机序列, 库容量约为 $10^{14} \sim 10^{15}$ 。两个引物中分别含有 EcoR I 和 BamH I 的酶切位点, 随机 ssDNA 5'-GCG GAA TTC AAC AGT CCG AGC C-N40-GGG TCA ATG CGT CAT A-3'。引物 1: 5'-GCG GAA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA ACA GTC CGA GCC-3' (划线部分为 EcoR I 酶切位点); 引物 2: 5'-GCG GGA TCC TAT GAC GCA TTG ACC C-3' (划线部分为 BamH I 酶切位点)。随机 ssDNA 文库和引物由上海生物有限公司合成。

1.1.4 标本来源 由深圳市龙岗中心医院消化科内窥镜室提

* 基金项目: 广东省深圳市科技计划非资助项目(201203315)。

作者简介: 黄震, 男, 在职博士, 副主任检验师, 主要从事临床免疫检验研究。△ 通讯作者, E-mail: nfywangqian@163.com。

供。其中 HP 诊断标准为:(1)患者有典型的临床症状;(2)H-E 染色检出弯曲螺旋状杆菌;(3)HP 培养阳性;(4)快速尿素酶法检测阳性。其中任意两项为阳性均判为阳性。

1.2 方法

1.2.1 HP 的培养 布氏培养基加入去离子水 800 mL, NaOH 调节 pH 值至 7.7 后补充去离子水至 1 L, 121 °C 高压灭菌 20 min。使用时按照体积比 5 : 1 加入胎牛血清和终浓度为 20% 的葡萄糖。在密闭的生化培养箱中 38 °C 培养, 氧气 : 氮气 : 二氧化碳 = 5 : 85 : 10。

1.2.2 ssDNA 文库及双链 DNA (dsDNA) 的扩增 将合成的 ssDNA 文库扩增为 dsDNA 文库: 10 × Taq DNA 聚合酶 buffer、单链寡核苷酸文库 (0.165 μg/μL)、引物 Primer1 (25 μmol/L)、引物 Primer2 (25 μmol/L)、dNTP mix (2.5 mmol/L)、Taq 酶、ddH₂O 95 °C 预变性 5 min, 再进行 95 °C 36 s, 60 °C 36 s, 72 °C 84 s, 共 15 个循环, 72 °C 延伸 5 min, 行 3% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。并以扩增所得 dsDNA 文库为模板, 下游引物 P2 不对称扩增出下一轮筛选的 ssDNA 文库。反应条件同上, 向 PCR 产物中加入 1/10 体积预冷的 3 mol/L 的 NaAc, 混匀后, 再向体系中加入 2 倍体积的冰预冷的无水乙醇, 充分混匀后, 置于 -80 °C 沉淀 4 h。

1.2.3 SELEX 筛选 取 10⁶ cfu HP, 加入洁净的 EP 管中再加入 200 μL 筛选缓冲液 (20 mmol/L HEPES, pH = 7.4), 37 °C 孵育 2 h。5 000 g 离心 5 min 弃去上清液, 筛选缓冲液洗涤 5 次后加入 200 L 灭菌双蒸水, 于 95 °C 加热 10 min; 吸取孔中加热后的双蒸水做常规聚合酶链式反应 (PCR)。为了提高筛选适配子的亲和力, 采用梯度筛选的方式进行, 即前 3 轮投入 10⁶ cfu HP, 第 4~6 轮投入 10⁴ cfu HP; 为了提高筛选的特异性, 从第 2 轮筛选开始通过胃黏膜细胞和其他细菌 (大肠杆菌、链球菌、肠球菌、乳酸杆菌) 进行反向筛选, 将第 6 轮 dsDNA 库, 割胶回收。将 dsDNA 和空载 pUC19 用 EcoR I 和 BamH I 进行双酶切, 用割胶回收 DNA 片段的方法, 纯化回收酶切产物, 测定浓度后, 进行连接反应置于 16 °C, 作用 16 h。将连接产物转化至 DH5 中, 挑取单克隆, 提取质粒并进行酶切鉴定。

1.2.4 相对亲合力的检测 (1) 不同适配子库与 HP 的亲和力测定: 以每轮的 dsDNA 库为模板, 加入以生物素标记的 P1 引物扩增出生物素标记的 ssDNA 适配子库, 用筛选缓冲液分散 HP 10⁶ cfu/mL, 37 °C 孵育 2 h, 按每管 20 pmoL。每轮适配子库做 3 个复孔。筛选缓冲液洗涤 ssDNA-HP 3 次, 每次 5 min, 加入 HRP 标记的链酶亲和素 (1 : 2 000 稀释), 每孔 100 μL, 37 °C 作用 45 min, PBST 洗涤微孔板 3 次, 每次 5 min。加入 TMB 底物, 37 °C 下作用 1~3 min, 观察颜色变化, 然后用 2 mol/L 浓硫酸终止。用酶标仪读出 450 nm 波长时的吸光度值。(2) 单克隆适配子库与 HP 的亲和力测定: 以测序鉴定正确的质粒为模板, 以生物素标记的 P1 引物扩增出生物素标记的单个适配子, 方法同 (1), 不同适配子库与 HP 的亲和力测定。

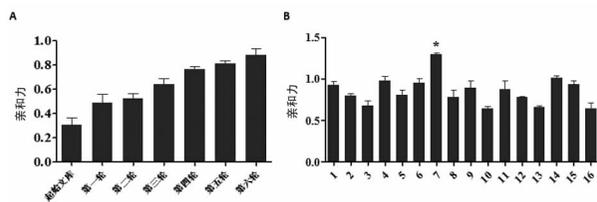
1.2.5 对临床标本的检测 (1) 适配子 HP1 检测活检组织中的 HP: 收集活检组织经临床现有方法诊断为 HP 感染。共计选择确诊阳性患者 27 例, 反复多次抗菌药物治疗患者 18 例, 男 16 例, 女 11 例, 年龄 26~67 岁, 每例标本分成两份, 一份进行临床检测, 一份进行适配子免疫组织化学检测。将活检组织

标本涂布于洁净的载玻片, 固定后, 使用 FITC 标记的适配子 HP1 与之孵育, 37 °C 2 h, PBS 洗涤除去未结合的 FITC 标记的适配子 3 次, 每次 5 min, 在荧光显微镜下观察视野。

2 结果

2.1 DNA 文库及筛选产物的 PCR 扩增 化学合成的起始 ssDNA 随机文库, 经 Klenow 片段扩增为 dsDNA 文库, 然后经不对称 PCR 扩增得到的 ssDNA 随机文库, 结果显示 dsDNA 库片段大小在 DNA marker 分子 100 bp 附近, 与预期片段大小 (78 bp) 相符。通过 SELEX 筛选技术筛选获得特异性结合 HP 的 6 轮 ssDNA 适配子库, 将各轮单链适配子库行 3% 的 DNA 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 结果显示, 随着筛选轮数的增高, 其条带逐渐集中, 说明其起始 ssDNA 文库中的复杂多样的二级结构, 经 SELEX 筛选后, 特异性结合 HP 靶标的 ssDNA 二级结构趋于一致的适配子被保留。

2.2 不同轮数适配子库及不同克隆单适配子相对亲合力的检测 将起始文库和筛选的 6 轮适配子与 HP 的亲合力进行比较, 结果显示第六轮具有最高亲和力 (图 1A), 考虑到适配子文库的丰富性随第 6 轮文库扩增的 dsDNA 文库克隆至 pUC19 质粒, 转化入 DH5 α 后在经过氨苄青霉素抗性筛选后, 挑取单克隆菌落, 提取质粒, 经酶切鉴定和测序鉴定正确的 16 个不同序列的单克隆适配子与 HP 的亲合力比较, 结果显示 7 号适配子具有最高亲和力, 将结合力最高的 7 号适配子命名为 HP1 (图 1B)。



注: A 为不同轮数的适配子文库的亲合力的比较; B 为不同单克隆适配子的亲合力的比较。

图 1 不同轮数适配子文库亲和力及不同单克隆适配子亲和力的比较

2.3 对临床标本的检测 FITC 标记的适配子 HP1 与活检组织中 HP 特异性结合, 在患者活检组织中能够清晰可见短杆状的黄绿色荧光, 而在正常组织对照组无荧光。经过对 27 例患者的活检组织的检出阳性率与 HE 染色、培养、尿素酶法的比较, 结果显示, 适配子法有较高的特异性 (表 1)。

表 1 3 种方法对 HP 感染患者的诊断

方法	阳性 (+)	阴性 (-)
HP1 法	25 (92.5)	2 (7.5)
快速尿素酶法	23 (85.0)	4 (15.0)
血清学方法	22 (80.0)	5 (20.0)

3 讨论

HP 是一种消化道致病菌, 其与胃部疾病密切相关。而目前临床诊断技术存在各种不足 [6]。因此, 本课题采用 SELEX 技术筛选与 HP 具有高亲和力、高特异性结合的 ssDNA 适配子。核酸适配子是一类新型的识别分子。与单克隆抗体相比, 其相对分子质量较低, 没有免疫源性, 可通过化学合成制备及

结构改造以及荧光、生物素等多种功能标记,化学稳定性好,能可逆的变性与复性,可在常温下保存和运输,这些优点使适配子在临床诊断及治疗中具有良好的应用前景^[7]。

本研究采用 SELEX 技术经过 6 轮筛选后,利用 ELONA 方法比较了各轮适配子库与 HP 的结合能力,并从亲和力最高的第 6 轮适配子扩增为双链库并构建到 pUC19 的载体质粒中筛选出适配子 HP1,将其应用于患者活检组织的 HP 检测中,结果显示适配子 HP1 能够在复杂的组织标本中特异性的识别结合 HP,从而为临床诊断提供依据。而本次研究仍是基于活检组织开展,虽然适配子 HP1 表现出较高的灵敏度和特异度,但是仍有悖于本研究的初衷,即口服修饰的荧光标记的核酸适配子与 HP 在体内结合后,提供体外红外荧光检测其是否有 HP 感染,以及根据荧光强度评判感染的严重程度从而预测 HP 导致胃部疾病的风险。同时,也有研究表明适配子与靶标菌体的结合能够阻断细菌对宿主细胞的感染。因此,本研究筛选出的适配子 HP1 对 HP 侵袭胃黏膜细胞是否发挥作用,也值得进一步探讨。

综上所述,运用 SELEX 技术成功地筛选到高亲和力及高特异性结合 HP 的 ssDNA 适配子,为 HP 感染所致疾病的鉴别诊断开辟了一条新的途径,具有良好的应用前景。

参考文献

- [1] Pan Q, Wang Q, Sun X, et al. Aptamer against mannose-capped lipoarabinomannan inhibits virulent Mycobacterium tuberculosis infection in mice and rhesus monkeys[J].

Mol Ther, 2014, 22(5): 940-951.

- [2] Lee YY, Mahendra RS, Graham DY. Helicobacter pylori infection—a boon or a bane: lessons from studies in a low-prevalence population[J]. Helicobacter, 2013, 18(5): 338-346.
- [3] Ellington AD, Szostak JW. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands[J]. Nature, 1990, 346(6287): 818-822.
- [4] Chen F, Zhou J, Lou F, et al. Aptamer from whole-bacterium SELEX as new therapeutic reagent against virulent Mycobacterium tuberculosis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 357(3): 743-748.
- [5] Stoltenburg R, Reinemann C, Strehlitz B. SELEX—a (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands[J]. Biomol Eng, 2007, 24(4): 381-403.
- [6] Kim D, Jeong YY, Jon S. A drug-loaded aptamer-gold nanoparticle bioconjugate for combined CT imaging and therapy of prostate cancer[J]. ACS Nano, 2010, 4(7): 3689-3896.
- [7] Miyakawa S, Fujiwara M, Nakamura Y. Aptamer therapeutics[J]. Tanpakushitsu Kakusan Koso, 2006, 51(16): 2521-2527.

(收稿日期:2015-02-20 修回日期:2015-03-20)

(上接第 2005 页)

用于血糖的日常监测。部分血糖仪达不到 ISO15197:2003 最低准确限要求,其检测结果不但无助于诊断和监测,反而会误导医生和患者。因此,是否可以由血糖仪按照准确性进行适当分级和说明,以帮助用户(尤其是对仪器缺乏对比和评价的患者)选择适合使用目的的血糖仪,也能方便用户根据准确性说明读懂血糖结果。

血糖仪间差异较大,需要在临床使用前进行评价或验证,并结合不同医院患者人群的特点和临床需求选择合适的血糖仪,如重症医学科、急诊科、呼吸科、血液科、儿科等科室可能对抗干扰能力、危机值检测结果的准确性更为敏感,需要选择抗干扰能力强、准确性高的血糖仪。在评价过程中,若按照 ISO15197 的要求进行系统评价对部分医院有难度,需要建立临床实用的验证方案。

ISO15189 医学实验室认可和卫生行政部门均要求医院内血糖结果具有可比性,但是缺乏相应的标准或实施方案。仪器间的差异增加了医院内血糖仪比对的难度,因此建议选择同一型号的血糖仪以保证院内血糖检测结果的可比性。

从 HCT 对系统准确性影响的试验结果可以看出,多数便携式血糖仪受 HCT 影响较大。对于 HCT 异常的患者,StatStrip 的检测方法与生化分析仪接近,能达到 ISO15197 的准确限要求。Accu-Check 对于 HCT 降低的标本检测结果处于允许范围的边缘。对于中、高值血糖标本,除 StatStrip 外,其他几款血糖仪在 HCT 异常时都有检测结果超过允许限,不能有效排除 HCT 的影响,不适用于中度、重度贫血或红细胞增多的患者。

参考文献

- [1] 张伟民,单志明,宋超.浙江省 POCT 质量管理探索[J].中华检验医学杂志,2008,31(3):336-337.
- [2] Guido F, Christina S, Annette B, et al. System accuracy evaluation of 43 blood glucose monitoring systems for self-monitoring of blood glucose according to DIN EN ISO 15197[J]. J Diabetes Sci Technol, 2012, 6(5): 1060-1075.
- [3] Chen E, Duh S, Hortin G. Performance evaluation of blood glucose monitoring devices[J]. Diabetes Technol Ther, 2003, 5(15): 749-768.
- [4] Halldorsdottir S, Warchal-Windham ME, Wallace JF, et al. Accuracy evaluation of five blood glucose monitoring systems; the North American comparator trial[J]. J Diabetes Sci Technol, 2013, 7(5): 1294-1304.
- [5] Brad SK, Laurie G, Renee S, et al. Evaluation of the impact of hematocrit and other interference on the accuracy of hospital-based glucose meters[J]. Diabetes Technol Ther, 2008, 10(2): 111-120.
- [6] Tang Z, Lee J, Louie R, et al. Effects of different hematocrit levels on glucose measurements with handheld meters for point-of-care testing[J]. Arch Pathol Lab Med, 2000, 124(16): 1135-1140.
- [7] Vander BG, Wouters P, Weekers F, et al. Intensive insulin therapy in critically ill patients[J]. N Engl J Med, 2001, 345(16): 1359-1367.

(收稿日期:2015-02-25 修回日期:2015-04-15)