

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.24.016

艰难梭菌毒素 A 适配子的筛选和鉴定*

刘红菊, 苏 恒, 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(Cd)毒素 A(TcdA)适配子(Apt)。方法 体外合成 80 bp 的单链 DNA(ssDNA)随机文库,采用指数富集配体系统进化(SELEX)技术筛选 TcdA 的核酸适配子。使用 DNA MAN5.2.2.0 软件和 mfold 软件对筛选出的适配子序列的同源性和二级结构进行分析,并采用非竞争酶联免疫吸附试验测定其亲和常数。结果 经过 12 轮筛选,文库中随机 ssDNA 与 TcdA 的结合率从 1.4% 增加到 44.6%,筛选出来 50 条适配子,二级结构最稳定的是 Apt-A22,其亲和常数为 $2.25 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ 。结论 采用 SELEX 技术成功筛选出高亲和力的 TcdA 适配子,为临床 Cd 感染的诊断和治疗提供参考依据。

关键词:艰难梭菌毒素 A; 指数富集配体系统进化; 适配子; 亲和常数

中图分类号:R446

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)24-3702-05

Selection and identification of ssDNA aptamers to Clostridium difficile toxin A*

LIU Hongju, SU Heng, 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 A. **Methods** By using the recombinant Cd toxin A protein for the screening target, 80 bp single stranded DNA (ssDNA) library that was synthesised in vitro was used to select and screen the aptamers of Cd toxin A 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 software, and the affinity constant (KA) of toxin A aptamer was measured by non-competitive ELISA method. **Results** After 12 cycles of selection, the binding affinity of toxin A and ssDNA of library increased to 44.6% from 1.4% at first. 50 aptamers were selected randomly and sequenced, and the aptamer with the most stable secondary structure was the Apt-A22, whose affinity constant was $2.25 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$. **Conclusion** The aptamers against Cd toxin A was successfully obtained by SELEX method, which may provide a certain reference tool for the laboratory diagnosis of Clostridium difficile infection.

Key words: Clostridium difficile toxin A; SELEX; aptamer; affinity constant

艰难梭菌(Cd)在临床上可引起抗生素相关性腹泻等诸多感染性疾病,统称为艰难梭菌感染(CDI),其引起感染的主要毒力因子是产生毒素 A(TcdA)和毒素 B(TcdB),TcdA 为肠毒素,可引起肠壁分泌大量液体和出血性坏死,临床通过检测 Cd 是否产生上述毒素而辅助诊断 CDI。TcdA 的羧基末端(C 端)为重复的寡肽结合区(CROP),CROP 既是 TcdA 与易感宿主细胞受体结合的区域,同时也是相应抗体阻断 TcdA 结合宿主细胞表面的位点^[1]。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,其本质为单链 DNA(ssDNA)或 RNA 片段,它们可以形成各种二级结构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结合,与特异性抗体识别相应

抗原表位过程类似,具有库容量大、靶分子范围广、亲和力高、特异性强等优点,已成为实验室诊断最热门的研究领域之一^[2-3]。本研究以重组 TcdA 蛋白为靶分子,采用 SELEX 技术,拟筛选与重组 TcdA 特异性结合的寡核苷酸适配子,以期临床实验室快速诊断和治疗 CDI 提供一定参考依据,现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 材料 艰难梭菌产毒素 A 菌株为纯化分离自临床并保存于广州医科大学检验系实验室的菌株^[4],pET-28b 为广州医科大学检验系实验室保存质粒;E. coli-DH5 α 和 E. coli-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 A 抗体购自 Ab-com 公司;UNIQ-10 寡核苷酸纯化试剂盒购自上海生

* 基金项目:广东省广州市科技计划资助项目(201510010241)。

作者简介:刘红菊,女,在读硕士,主要从事临床微生物检验诊断学研究。 [△] 通信作者,E-mail:aiwuwu66@163.com。

工科技有限公司; T4 DNA 连接酶、DNA Ladder、Premix Taq 聚合酶均购自 Takara 公司; 羊抗鼠 IgG-辣根过氧化物酶(HRP)购自 Thermo Scientific 公司; 双排磁力架、链霉亲和素磁珠购自 Invitrogen 公司; tRNA 购自 Sigma 公司; HRP 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, 文库中所有 ssDNA 碱基序列从 5'→3'的构成如下: 5'-AGT CAG TAG TTC AGG CAG CG-40N-CAC AGC ACA CTC ACA CGC AC-3', 若中间为 n 个碱基的随机序列, 则 ssDNA 文库量可达 4ⁿ, 本研究文库中所有 ssDNA 序列中间为 40 个随机碱基序列, 意味着本研究的 DNA 随机文库容量可达 4⁴⁰。用于链霉亲和素磁珠筛选的生物素标记物放在下游引物和中间的 40 个随机碱基序列之间, 即 5'-AGT CAG TAG TTC AGG CAG CG-40N-biotin-CAC AGC ACA CTC ACA CGC AC-3'。

1.4 方法

1.4.1 艰难梭菌毒素 A 羧基末端序列的克隆、表达与纯化 对纯化获得的重组 TcdA 蛋白采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行分析, 并进行蛋白免疫印迹法(Western blot)鉴定^[5]。

1.4.2 聚合酶链反应(PCR)扩增优化反应条件摸索 以合成的 ssDNA 随机文库作为模板, 采用上下游引物进行 PCR 扩增获得双链 DNA(dsDNA), 以 ddH₂O 作为模板设立阴性对照。根据引物的解链温度设置不同退火温度, 分别进行经 5、8、12、16、20、24、28 个循环数的 PCR。经 4% 琼脂糖凝胶电泳分析, 观察试验结果, 确定对称 PCR 的最优退火温度和循环次数。

1.4.3 SELEX 筛选 根据文献[6]操作流程进行 TcdA 适配子的 SELEX 筛选, 取预定量纯化重组蛋白 TcdA 包被于 96 孔板, 同时用 ddH₂O 设空白对照, 4 °C 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)封闭 2 h。用 10 pmol/μL 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 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 °C 下加热 15 min, 洗脱下与 TcdA 结合的 ssDNA, 回收 ssDNA 并测定其浓度, 每轮筛选所用量见表 1。采用下游引物 5' 端标记生物素引物, PCR 扩增 ssDNA 成 dsDNA 后, 用 0.1 mol/L 的 NaOH 解离 dsDNA 成 ssDNA, 再采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 TcdA 结合率不再增加为止。

1.4.4 ssDNA 文库与 TcdA 结合率测定 筛选纯化后所得 ssDNA 文库的总量与反筛后 ssDNA 文库总

量比值, 即每轮文库与蛋白的结合率。

表 1 不同筛选轮数重组蛋白 TcdA 及 ssDNA 用量

轮数	ssDNA(pmole)	TcdA(ng)	tRNA(mg/L)	ssDNA/TcdA
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

1.4.5 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 DH5α 感受态细胞于 LB/氨苄青霉素/X-Gal/异丙基硫代 β-D-半乳糖苷(IPTG)平板培养基 37 °C 培养 24 h。挑取 60 个转化阳性菌落进行测序。

1.4.6 适配子同源性和二级结构分析 根据测序结果, 分别选择 DNA MAN 软件和 mfold 软件进行序列同源性和二级结构分析。

1.4.7 适配子-A22(Apt-A22)亲和常数(KA)测定

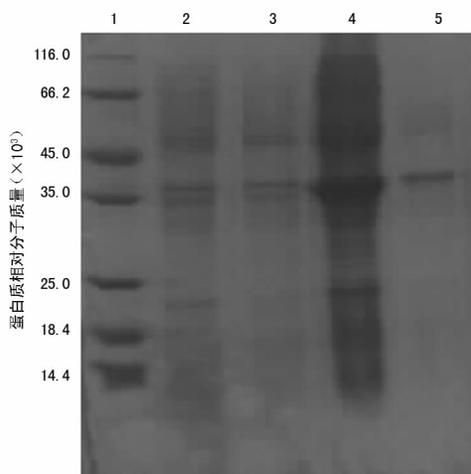
1.4.7.1 重组 TcdA 包被浓度确定 96 微孔板每孔加入 200 μL 浓度分别为 2、1、0.5、0.25、0.125、0.062 5、0.031 25 μg/mL TcdA 重组蛋白, 同时设立空白对照孔, 4 °C 包被过夜, 洗涤 3 次后, 空白对照孔和蛋白包被孔均加入 200 μL 封闭液, 37 °C 封闭 2 h。去除封闭液, 洗涤缓冲液洗涤 4 次。在各蛋白孔中分别加入 200 μL 的 40 ng/μL 的 Apt-A22 溶液, 37 °C 孵育 2 h, 洗涤缓冲液洗涤 4 次, 向各反应孔中加入 200 μL HRP 标记的地高辛抗体稀释液(稀释度为 1:10 000), 37 °C 孵育 45 min, 磷酸盐缓冲液洗涤 5 次, 加入 100 μL 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)显色剂后 37 °C 孵育 30 min, 后加入 100 μL 终止液终止反应, 测定其光密度(OD)450 值。

1.4.7.2 采用非竞争酶联免疫吸附试验(ELISA)测定 Apt-A22 KA^[7] 每孔加入 200 μL 浓度分别为 2、1、0.5 μg/mL 重组蛋白毒素 A, 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 °C 包被过夜。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 °C 封闭 2 h。去除封闭液后, Apt-A22 依次稀释为 40、20、10、5、2.5、1.25、0.625、0.312 5、0.156 25、0.078 125 ng/μL, 每孔 200 μL 的梯度浓度溶液分别加入蛋白包被孔中, 37 °C 温育 2 h, 洗涤缓冲液洗涤 4 次, 向各反应孔中加入 200 μL HRP 标记的地高辛

抗体稀释液(稀释度为 1 : 10 000), 37 °C 孵育 45 min, 洗涤 5 次, 加入 100 μL TMB 显色剂后 37 °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^[7] 建立的方法, $KA = (n - 1) / [n(Apt')_{总} - (Apt)_{总}]$, 其中 $Apt_{总}$ 和 $(Apt')_{总}$ 分别表示当重组蛋白浓度为 $(Ag_{重})$ 和 $(Ag_{重}')$ 时, OD₄₅₀ (50%) 时适配子浓度 (ng/μL), $n = (Ag_{重})_{总} / (Ag_{重}')_{总}$, 将结果导入公式中 $KA = (n - 1) / [n(Apt')_{总} - (Apt)_{总}]$, Apt-A22 分别可得到 3 个 KA 值, 计算其平均值。

2 结果

2.1 TcdA 在大肠埃希菌中的表达与鉴定 pET-28b-TcdA 重组表达质粒的最佳表达条件为菌液 600 nm 波长 OD 值选择 0.6, 诱导温度为 25 °C, IPTG 诱导终浓度取 1.0 mmol/L, 诱导时间取 10 h, 在 35 × 10³ 处出现了目的蛋白(泳道 4)。按照此条件诱导重组质粒, 收集细菌裂解液上清液和沉淀进行 SDS-PAGE, 目的蛋白表达量高, 见图 1。Western blot 结果显示, TcdA 抗体可识别目的蛋白, 不能识别 pET-28b 菌株蛋白, 见图 2。



注: 1 表示蛋白 Marker 条带; 2 表示 pET-28b 经 IPTG 诱导的上清液; 3 表示 pET-28b 经 IPTG 诱导的沉淀; 4 表示 pET-28b-TcdA 经 IPTG 诱导的上清液; 5 表示 pET-28b-TcdA 经 IPTG 诱导的沉淀

图 1 pET-28b-TcdA 重组质粒在最佳诱导表达条件下菌液裂解液 SDS-PAGE 电泳分析

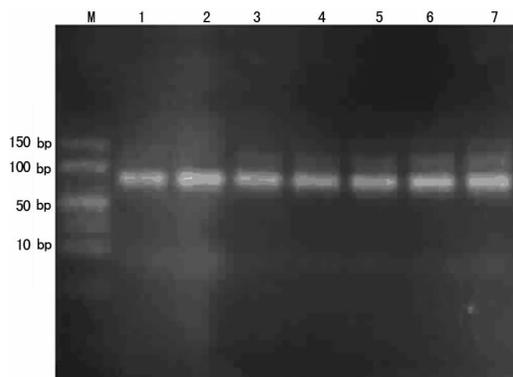


注: 1 表示 PET-28b 菌株蛋白; 2 表示目的蛋白

图 2 目的蛋白的 Western blot 鉴定

2.2 PCR 扩增优化反应条件 采用 ssDNA 文库作为模板时, 在 PCR 扩增过程中对其循环数与引物特异性退火温度进行摸索, 结果显示, 在退火温度为 55 °C、循环数为 8 时, 目的条带显示为单一条带, 且无

非特异性条带出现, 见图 3。



注: M 表示 10 bp DNA Ladder; 1 表示 PCR 循环数为 5; 2 表示 PCR 循环数为 8; 3 表示 PCR 循环数为 12; 4 表示 PCR 循环数为 16; 5 表示 PCR 循环数为 20; 6 表示 PCR 循环数为 24; 7 表示 PCR 循环数为 28

图 3 采用 ssDNA 文库作为模板进行 PCR 时不同循环数下扩增结果

2.3 各轮 ssDNA 随机文库与 TcdA 结合率 经过 12 轮筛选, 至第 10、11、12 轮筛选后适配子结合率变化不明显, 说明结合率峰值趋于饱和, 达到 44.6%, 见图 4。

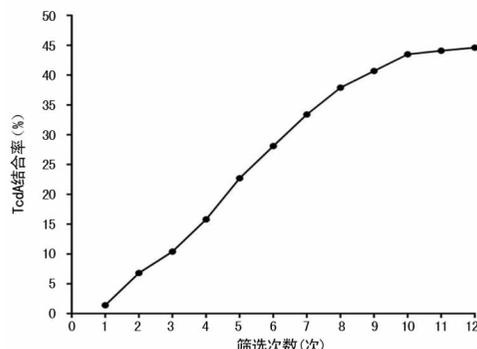


图 4 各轮随机文库与 TcdA 结合率

2.4 克隆测序结果 TcdA 筛选后克隆测序的有效适配子为 50 条。

2.5 适配子序列同源性和二级结构分析 测序的 50 条有效适配子进行多序列比对, 总体同源性为 45.27%。将具有 90% 以上同源性的序列归为一组, 可分为 6 组: 第 1 组包括 Apt-A1、Apt-A3、Apt-A13、Apt-A23、Apt-A25、Apt-A37、Apt-A40、Apt-A57, 其中前 5 个适配子序列完全相同, 而 Apt-A37、Apt-A57 序列中均只有 1 个碱基与上述序列不同; 第 2 组包括 Apt-A5、Apt-A55, 二者序列完全相同; 第 3 组包括 Apt-A17、Apt-A36, 二者序列完全相同; 第 4 组包括 Apt-A14、Apt-A27、Apt-A58、Apt-A60、Apt-A43, 其中前 4 个适配子序列完全相同, Apt-A43 与前 4 条序列只有 1 个碱基不同; 第 5 组包括 Apt-A44、Apt-A59, 二者序列完全相同; 第 6 组包括 Apt-A22、Apt-A29, 二者序列完全相同。见表 2。其余序列同源性均较低。二级结构分析结构最稳定的 TcdA 适配子是 Apt-A22, 其自由能为 $dG = -1.30$ kcal/mol。

2.6 适配子 KA 测定

2.6.1 重组蛋白 TcdA 包被浓度确定 当倍比系列浓度 (2、1、0.5、0.25、0.125、0.062 5、0.031 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 重组蛋白 TcdA 包被时, 其 OD_{450} 值分别为 1.145、0.623、0.417、0.234、0.175、0.096、0.065, 在

蛋白浓度为 2、1、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, OD_{450} 值均在 0.15~2.50, 说明在此范围内 OD 值与包被板的重组蛋白浓度有一定线性关系。选定重组蛋白浓度分别为 2、1、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 测定其与二级结构最稳定的适配子 Apt-A22 的反应曲线。

表 2 重组蛋白 TcdA 经 12 轮 SELEX 筛选后获得的同源性适配子序列

序号	序列(5'→3')	长度(bp)	条数(n)
Apt-A1	GGCTGCGGAGTAGTAGGCTTCTTGGTCTCTTGGCCGGGG	40	6
Apt-A37	GGCGGCGGAGTAGTAGGCTTCTTGGTGTCTTGGCCGGGG	40	1
Apt-A57	GGCTGCGGAGTAGTAGGCTTCTTGGTGTCTTGGCTGGGG	40	1
Apt-A5	GGGCGTTATGTTTGTTCGCGGGTTGTCGCTGCCTGGGCCG	40	2
Apt-A17	GCAGCATGTGTGTTCTTGGCCCTCCGTGTTGTTTCGTTGTC	40	2
Apt-A14	GGCGGCTGTTTACAGTGTGGTTATGGTCTTGGTTGTGTAGGG	40	4
Apt-A43	GGCGGCTGTTTACAGTGTGGTTATGGTCTTGGTTGTGTAGGC	40	1
Apt-A44	GGTTGGGCAGTTTTGGTGTGTTGTTTGTATGTTGGTGGCCC	40	2
Apt-A22	GGGGACGCAGTGCATGGCCTGGTTGATGTTTGGGGCGGCG	40	2

2.6.2 Apt-A22 与重组蛋白 TcdA 的 KA 测定 蛋白浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 OD_{450} 为 50% 时, Apt-A22 浓度约为 1.373 $\text{ng}/\mu\text{L}$; 蛋白浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 OD_{450} 为 50% 时, Apt-A22 浓度约为 2.194 $\text{ng}/\mu\text{L}$; 蛋白浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 OD_{450} 为 50% 时, Apt-A22 浓度约为 3.76 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 。将上述值代入公式计算相应 KA, $KA_1 = 3.06 \times 10^7 \text{M}^{-1}$; $KA_2 = 1.60 \times 10^7 \text{M}^{-1}$; $KA_3 = 2.08 \times 10^7 \text{M}^{-1}$ 。因此适配子 Apt-A22 与重组蛋白 TcdA 的 $KA = 2.25 \times 10^7 \text{M}^{-1}$, 见图 5。

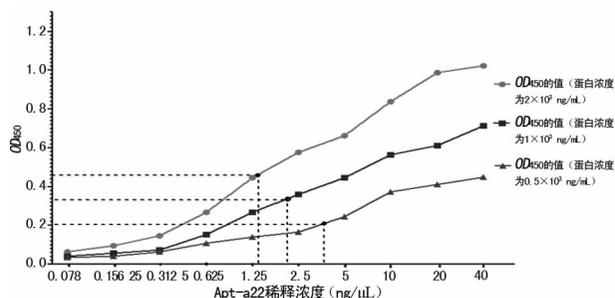


图 5 Apt-A22 与 TcdA 重组蛋白亲和曲线

3 讨 论

TcdA 的羧基末端可结合易感靶细胞表面的受体, 介导 TcdA 进入细胞内, 从而破坏细胞结构^[1]。实验室通过检测 TcdA 羧基末端的存在, 可辅助临床诊断和阻断 CDI。本课题组前期工作已通过系列试验在成功构建 pET-28b-TcdA 羧基末端表达载体的基础上, 将其转化入大肠杆菌表达菌株 BL21 中, 并对其诱导表达及获得纯化目的蛋白, 为相应适配子的筛选提供研究基础。

在适配子筛选过程中, 随机文库的构建、每轮 PCR 扩增条件的优化、靶蛋白与文库结合浓度的调整、次级文库的制备等都是影响筛选的重要因素, 需要进行反复摸索与验证。本研究体外合成的 ssDNA 文库随机序列由 40 个碱基组成, 理论上具有 4^{40} 个随机

碱基序列文库容量, 可满足 SELEX 筛选量的需要。在整个 SELEX 技术筛选过程中要多次重复进行对称 PCR 扩增, 以 ssDNA 随机文库作为模板, 通过对称 PCR, 可获得大量 dsDNA, 这些 dsDNA 通过链霉亲和素-生物素系统分离随机文库, 可获得大量 ssDNA, 作为下一轮的筛选文库。PCR 扩增条件对 PCR 结果影响较大, 为了获得大量且特异性强的 dsDNA 产物, 必须对 PCR 扩增循环条件进行优化。本研究通过优化 PCR 循环条件, 结果显示, 在退火温度为 55.0 $^{\circ}\text{C}$ 、8 个循环的条件下, 于 80 bp Ladder 处成功检测到单一而清晰的条带, 说明文库构建成功。

文库浓度与靶蛋白浓度比例是 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浓度低, 因此, 在初始的几轮筛选中, 需使用较高浓度靶蛋白进行筛选。随着筛选轮数增加, 结合力更高、特异性更强的适配子相对富集, 而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, 但文库量与靶蛋白浓度相对比例升高, 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。本研究从第 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, 说明目标适配子已得到富集。ssDNA 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^[8-9]。本试验采用适配子文库的此特性, 筛选出 50 条重组蛋白毒素 A 的有效适配子, 通过同源树图进行分组, 将同源性达到 90% 的分为一组, 共分为 6 组。每个适配子序列相差 1 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^[10]。因此, 根据二级结构分析, 选择结合

力较好的适配子 Apt-A22 进行后续试验的亲合力计算。

BEATTY 等^[7]建立的测定抗原-抗体 KA 测定方法已被广泛应用,适合测定抗体和包被抗原之间的 KA,且随后他们从理论到实践均进行了验证,严格控制 ELISA 时,其质量作用定律仍然适用。本研究利用非竞争 ELISA 进行 TcdA 与适配子 KA 测定和计算,Apt-A22 的 KA 均值为 $2.25 \times 10^7 \text{M}^{-1}$,对应的解离常数值为 44.5 nM,KA 均到达 10^7 级,解离常数达到了 nM 级别。与 OCHSNER 等^[11]筛选出的 TcdA 适配子和目前唯一被美国食品药品监督管理局批准用于临床治疗的适配子比较,KA 和解离常数相当^[12],由此说明本试验所筛选的适配子有一定应用前景。

综上所述,本研究成功利用 SELEX 技术筛选获得了特异结合 TcdA 的高亲和力的 ssDNA 适配子,有利于进一步研究各适配子与 TcdA 的亲合力和结合位点,为后续适配子的应用研究奠定了基础。

参考文献

- HERNANDEZ L D, KROH H K, HSIEH E, et al. Epitopes and mechanism of action of the clostridium difficile toxin a-neutralizing antibody actoxumab[J]. J Mol Biol, 2017, 429(7): 1030-1044.
- GELINAS A D, DAVIES D R, JANJIC N. Embracing proteins: structural themes in aptamer- protein complexes [J]. Curr Opin Struct Biol, 2016, 36(1): 122-132.
- Park K S. Nucleic acid aptamer-based methods for diagnosis of infections[J]. Biosens Bioelectron, 2017, 102(1): 179-188.
- 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.
- 刘红菊,吴爱武. 艰难梭菌毒素 A 原核表达及重组蛋白纯化[J]. 中国微生态学杂志, 2016, 28(4): 400-404.
- LI H, DING X, PENG Z, et al. Aptamer selection for the detection of Escherichia coli K88 [J]. Can J Microbiol, 2011, 57(6): 453-459.
- 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.
- 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.
- 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(7): e201.
- WANG Z W, WU H B, MAO Z F, et al. In vitro selection and identification of ssDNA aptamers recognizing the Ras protein[J]. Mol Med Rep, 2014, 10(3): 1481-1488.
- 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.
- 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.
- HERNANDEZ L D, KROH H K, HSIEH E, et al. Epitopes and mechanism of action of the clostridium difficile toxin a-neutralizing antibody actoxumab[J]. J Mol Biol, 2017, 429(7): 1030-1044.
- GELINAS A D, DAVIES D R, JANJIC N. Embracing proteins: structural themes in aptamer- protein complexes [J]. Curr Opin Struct Biol, 2016, 36(1): 122-132.
- Park K S. Nucleic acid aptamer-based methods for diagnosis of infections[J]. Biosens Bioelectron, 2017, 102(1): 179-188.
- with colorectal cancer: a meta-analysis [J]. PLoS One, 2017, 12(11): e0188139.
- 张丽华,顾思萌,叶丁,等. 结直肠癌患者临床分期与 CEA 和 CA19-9 的相关性分析[J]. 预防医学, 2018, 30(1): 22-25.
- GAO Y F, WANG J P, ZHOU Y, et al. Evaluation of serum CEA, CA19-9, CA72-4, CA125 and ferritin as diagnostic markers and factors of clinical parameters for colorectal cancer[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 2732-2736.
- 周旭军,关秀军,包艳春. 联合检测血清 CEA、CA125、CA19-9 和 CA72-4 对大肠癌临床价值的探讨[J]. 现代肿瘤医学, 2014, 22(12): 2938-2940.
- 朱磊,赵阳,韩仕峰,等. 术前血清 CEA 和 CA19-9 水平检测对结肠癌术后早期复发转移的预测价值[J]. 中国普通外科杂志, 2015, 24(8): 1170-1174.
- 陈蕾,姜北海,邸佳柏,等. 术前检测癌胚抗原和糖链抗原 199 对结直肠癌 II ~ III 期患者预后的判断价值[J]. 中华胃肠外科杂志, 2015, 18(9): 914-919.

(收稿日期:2018-06-04 修回日期:2018-09-10)

(上接第 3701 页)

结直肠癌患者中的诊断及预后价值[J]. 中国现代普通外科进展, 2017, 20(7): 518-521.

- 乔峰妮,曹暂剑,杨向东. 结直肠癌血清癌胚抗原、糖类抗原 19-9 表达水平及其临床价值探讨[J]. 现代肿瘤医学, 2015, 23(9): 1255-1258.
- 许昕,常金,张国庆,等. Kaplan-Meier 生存曲线分析 CEA、CA19-9 在结直肠癌中的临床价值[J]. 泰山医学院学报, 2017, 38(8): 865-867.
- TSAI P L, SU W J, LEUNG W H, et al. Neutrophil-lymphocyte ratio and CEA level as prognostic and predictive factors in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. J Cancer Res Ther, 2016, 12(2): 582-589.
- WANG J, WANG X, YU F, et al. Combined detection of preoperative serum CEA, CA19-9 and CA242 improve prognostic prediction of surgically treated colorectal cancer patients[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(11): 14853-14863.
- YU Z, CHEN Z, WU J, et al. Prognostic value of pretreatment serum carbohydrate antigen 19-9 level in patients

(收稿日期:2018-06-18 修回日期:2018-09-24)