DOI:10.15972/j.cnki.43-1509/r.2021.04.002

·基础医学·

# 高特异性心肌肌钙蛋白 I 适配体的 ePCR 技术筛选及其表征

岑 怡[1]，王仲萍[2]，柯培雄[3]，袁中文[1]，刘晓敏[1]，严鹏科[1]

(1.广州医科大学附属第三医院药学部,广东省广州市 510150;2.广州同鹏中旭医药科技有限公司,广东省广州市 510000;3.广州医科大学药理学系,广东省广州市 511436)

[关键词] 适配体; SELEX 筛选; 乳液 PCR; 急性心肌梗死; 心肌肌钙蛋白 I

[摘 要] **目的** 筛选出与心肌肌钙蛋白 I(cTnI)具有高亲和力和高特异性的核酸适配体,为诊断急性心肌梗死(AMI)提供实验基础。**方法** 采用基于乳液 PCR(ePCR)的 SELEX 技术筛选出能与 cTnI 特异性结合的 3 个适配体,并对 ePCR 条件进行优化,对适配体进行亲和力(Kd 值)测定并与市售 cTnI 抗体进行比较,选出 Kd 值最小的适配体,进行特异性鉴定。**结果** SELEX 过程中通过优化得到 ePCR 最佳条件,筛选得到的 3 个适配体均对 cTnI 具有较强的亲和力,其 Kd 值范围为 2.04~16.85 nmol/L,其中适配体 Apt-1 的亲和力最强[Kd 为(2.04±0.11) nmol/L]且优于市售抗体,特异性高,敏感性强,不与其他相关蛋白有非特异性结合。**结论** 筛选出的适配体 Apt-1 能与 cTnI 产生高亲和力的特异性结合,可进一步用于临床样本中 cTnI 的检测。

[中图分类号] R966 [文献标识码] A

## Screening and characterization of high specificity cardiac troponin I aptamers by ePCR technique

CEN Yi[1], WANG Zhongping[2], KE Peixiong[3], YUAN Zhongwen[1], LIU Xiaomin[1], YAN Pengke[1]

(1. *Department of Medicine, the Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong* 510150, *China*; 2. *Guangzhou Tongpeng Zhongxu Medical Technology Co. Ltd., Guangzhou, Guangdong* 510000, *China*; 3. *Department of Pharmacology, Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong* 511436, *China*)

[**KEY WORDS**] aptamers; SELEX technology; ePCR; acute myocardial infarction; cardiac troponin I

[**ABSTRACT**] **Aim** Nucleic acid aptamers with high affinity and specificity for cardiac troponin I (cTnI) were screened to provide experimental basis for the diagnosis of acute myocardial infarction (AMI). **Methods** Three aptamers specifically binding to cTnI were screened by SELEX technology and the ePCR conditions were optimized. The affinity (Kd value) of the aptamer was detected and compared with the existing antibody. The aptamer with the lowest Kd value was selected for specificity identification. **Results** The conditions of ePCR were optimized during SELEX. Three aptamersall had strong affinity for cTnI, with Kd value in the range of 2.04-16.85 nmol/L. Apt-1 had the strongest affinity (Kd=(2.04±0.11) nmol/L) and was superior to the existing antibody, with high specificity and strong sensitivity, and no non-specific binding with other related proteins. **Conclusion** Apt-1 can specifically bind to cTnI with high affinity, which can be further used for the detection of cTnI in clinical samples.

急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)是在冠状动脉粥样硬化的基础上因斑块破裂阻塞引起局部缺血而导致的心肌坏死,是全世界范围内死亡率最高的疾病之一[1]。目前,心肌肌钙蛋白 I(cardiac troponin I,cTnI)因仅在心肌中产生,并且对心脏损伤显示出高度特异性而成为了诊断 AMI 的金标准[2]。

适配体是一种单链 DNA 或 RNA,因与靶标物

[收稿日期] 2021-02-02 [修回日期] 2021-04-14

[基金项目] 国家自然科学基金青年项目(81803689);广州市科技计划项目(201903010014);广州市科技重大项目(201604020166);广州医科大学附属第三医院 2018 年度青年科研项目(2018Q12)

[作者简介] 岑怡,硕士研究生,研究方向为动脉粥样硬化,E-mail 为 568736701@qq.com。通信作者严鹏科,博士,教授,博士研究生导师,研究方向为动脉粥样硬化,E-mail 为 gysyypk@126.com。

质的亲和力高且特异性强的优点，正被广泛用于疾病的诊断和治疗研究中[3]。PCR 作为一种体外扩增 DNA 技术，已广泛用于多种研究领域[4]。但普通 PCR 易使 DNA 模板污染且容易产生非特异性片段，因此需要建立一种乳液 PCR（emulsion PCR，ePCR）以改善普通 PCR 的不足。目前临床上检测 cTnI 多依赖于抗体技术，但床旁检测对时效性和精密度要求较高，而抗体在制备过程中容易产生批间差异导致检测精密度降低。多克隆抗体容易产生非特异性，单克隆抗体又容易丢失结合靶位，因此希望通过适配体技术以弥补抗体在临床检测上的不足并提高检测水平。

本实验通过基于 ePCR 的指数富集配体系统进化技术（systematic evolution of ligands by exponential enrichment，SELEX），从随机寡核苷酸文库中筛选出与 cTnI 特异性结合的核酸适配体。对筛选得到的适配体进行亲和力检测并与市售的 cTnI 抗体进行比较，以期取代传统的抗体检测技术，为 AMI 的早期诊断提供一种新的手段。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂和仪器

96 bp 核酸序列及其引物均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成；cTnI、心肌肌钙蛋白 C（cTnC）、心肌肌钙蛋白 T（cTnT）、人血清蛋白（HSA）（武汉云克隆公司）；链酶亲和素磁珠（美国 Promega 公司）；DNA 纯化试剂盒（Plus DNA Clean/Extraction Kit DP034P）；96 孔酶标板（美国康宁公司）；肌钙蛋白 I 抗体（重庆探生科技有限公司）；辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素（北京博奥森生物技术有限公司）；TMB 显色液、ELISA 终止液（北京索莱宝公司）；其他化学试剂均为国产分析纯产品。恒温水浴箱（上海一恒科技有限公司）；PCR 仪（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；垂直凝胶电泳仪、凝胶成像系统、多功能酶标仪（美国 Biotek 公司）。

### 1.2 SELEX 筛选过程

以 cTnI 为正筛蛋白，HSA 为反筛蛋白，采用生物素-亲和素系统将长度为 96 bp 的随机 ssDNA（700 pmol）固定在磁珠上，然后加入 250 μg cTnI 与磁珠混合后于 37 ℃恒温水浴箱中振荡孵育 1 h；能与蛋白结合的 DNA 会被拖拽至溶液中，不与蛋白结合的 DNA 仍吸附在磁珠上。将正筛（或反筛）后留下的 DNA 用酚氯仿法提取后进行 ePCR 扩增，纯化后 ePCR 产物与链酶亲和素磁珠在 37 ℃中孵育 30 min，PBS 洗涤 3 次后加入 300 μL 100 mmol/L NaCl 和 50 mmol/L NaOH 混合溶液，使双链 DNA 变性解链获得单链 DNA 后再进行下一轮筛选，直到第 9 轮正/反筛后得到了与 cTnI 特异性结合的富集 ssDNA[5]。SELEX 筛选过程如图 1 所示。

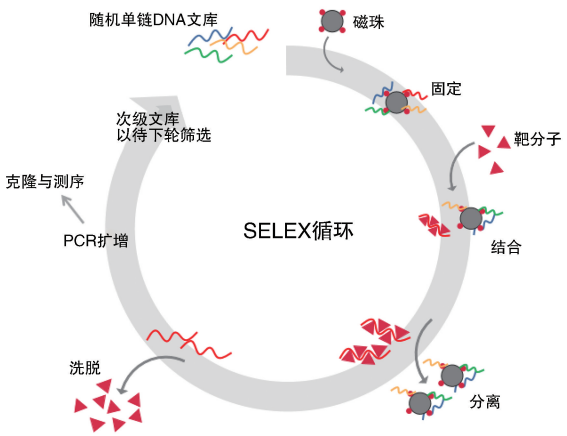


**图 1 SELEX 筛选过程流程图**

### 1.3 ePCR 条件优化

油相部分：矿物油 5 mL，Span80 450 μL，Tween80 40 μL，TritonX-100 5 μL 后加矿物油至 10 mL，旋涡混匀。水相部分：2×TaqMix 500 μL，上游引物（5′-CGT ACG GTC GAC GCT AGC-3′）和下游引物（5′-Biotin-GGA TCC GAG CTC CAC GTG-3′）各 20 μL，加纯化水 440 μL。取 20 μL 1 μmol/L 模板 DNA 加到水相中后缓慢滴入油相（水相：油相为 1∶2），直至油相和水相混合成白色乳液状后再进行扩增。普通 PCR 则无油相，仅将上述水相部分配制成反应混合液后进行扩增。PCR 扩增条件：在变性 94 ℃，退火 70/72 ℃，延伸 70 ℃，总延伸时间为 15 min 的条件下，做 25/30 个循环。每轮对退火温度和循环轮数进行优化，用 10% 变性聚丙烯酰胺凝胶检测扩增产物，直至扩增条带清晰单一，无非特异性扩增为止。

### 1.4 ePCR 产物的纯化和克隆测序

将 ePCR 扩增得到的产物 9 000 r/min 离心 10 min，除去上层油相；加入 2 倍体积的乙醚混匀后 9 000 r/min 离心 1 min（重复 3 次），然后用 2.5 倍体积的无水乙醇和 1/10 体积的 3 mol/L 醋酸钠沉淀 DNA。使用 DNA 纯化回收试剂盒沉淀得到的 DNA 进行纯化后测定其含量，短期内 4 ℃保存。

由深圳华大基因科技有限公司进行克隆与

测序。

### 1.5　ELONA 法测定适配体亲和力

以市售抗体为阳性对照，包被液（pH9.6 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液）稀释 cTnI 至 5 mg/L，于 96 孔酶标板 100 μL/孔 4 ℃孵育过夜；次日弃去孔内液体，用封闭液（3% BSA）室温封闭 1 h，然后弃封闭液，用洗涤液（0.01% TBST）洗板 3 次；加入梯度浓度生物素标记的适配体 100 μL，37 ℃温育 1 h 后洗涤 3 次；每孔加 100 μL 辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素（1∶10 000）37 ℃温育 30 min 后洗板 5 次；每孔加 100 μL TMB 显色液避光反应 15 min 后加入 50 μL 终止液终止反应，在 10 min 内采用全波长荧光酶标仪测定 450 nm 处光密度值。

### 1.6　ELONA 法测定适配体特异性和敏感性

以市售抗体为阳性对照，分别于 96 孔板中加入低（1 mg/L）、中（2 mg/L）、高（4 mg/L）3 种质量浓度的 cTnI/cTnC/cTnT/HSA 各 100 μL，4 ℃孵育过夜；于 96 孔板中加入等量低（1 mg/L）、高（4 mg/L）质量浓度的 cTnI+cTnC/cTnT/HSA 100 μL 混合溶液，4 ℃孵育过夜。第 2 天加 100 μL 50 nmol/L 适配体进行结合孵育，其余操作步骤同 1.5 方法。

### 1.7　统计学方法

用 SPSS12.0 进行统计处理，数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SigmaPlot 14.0 软件对回归曲线作图并求出曲线方程，Graphpad Prism8.0 进行单因素方差分析，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2　结　果

### 2.1　SELEX 筛选及 ePCR 条件的优化

采用磁珠 SELEX 法将修饰生物素的 DNA 序列固定在链霉亲和素磁珠上，加入的蛋白可将与之结合的 DNA 从磁珠上拉至溶液中，然后将 DNA 从溶液中分离出来进行 PCR 扩增。PCR 扩增获得特异性产物是适配体筛选成功的关键，本实验采用的 ePCR 是 PCR 的一种新型变体，将每个寡核苷酸序列封装到由疏水有机相包围的单个 PCR 微滴中，可显著降低 PCR 偏差并减少非特异性。实验中对每轮 PCR 扩增的退火温度、循环次数、模板量都进行优化，并用 10% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳验证。如图 2 所示，采用 ePCR 进行扩增时，当变性温度 94 ℃，退火温度 70 ℃，延伸温度 70 ℃，总延伸时间为 15 min 时，做 25 个循环，条带单一且无非特异性条带；而普通 PCR 在同等条件下均出现了不同程度非特异性条带。将 PCR 产物与标记链霉亲和素的磁珠结合后用 NaOH 裂解能得到稳定的单链 DNA 次级文库。随着筛选轮数的增加，得到具有高特异性且有较强亲和力的 cTnI 适配体。

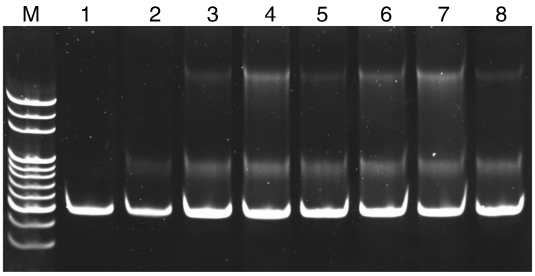


**图 2　PAGE 观察 PCR 扩增条件的优化**

1～4 为 ePCR；5～8 为普通 PCR。M 为 Marker；其他条带的退火温度和循环次数分别 1 为 70 ℃25 次；2 为 72 ℃25 次；3 为 70 ℃30 次；4 为 72 ℃30 次；5 为 70 ℃25 次；6 为 72 ℃25 次；7 为 70 ℃30 次；8 为 72 ℃30 次。

### 2.2　适配体亲和力检测

经 9 轮 SELEX 筛选后再测序得到的适配体序列和对应解离平衡常数见表 1。解离常数 Kd 值越小，则代表亲和力越高。结果显示，筛选得到的 3 个适配体均对 cTnI 的亲和力强度达到纳摩尔级别。其中，Apt-1 与其他适配体相比亲和力最高［Kd 为（2.04±0.11）nmol/L］，且优于市售的抗体［Kd 为（3.19±0.53）nmol/L］。Apt-1 的量效曲线见图 3，用 Mfold 软件对其进行二级结构模拟分析结果见图 4。

**表 1　适配体序列及其与 cTnI 亲和力**

| 名称 | 摇摆序列（5′-3′） | Kd/（nmol/L） | *P* |
|---|---|---|---|
| Apt-1 | CGACAACGGAGTCCGCACACAGAAGTCGCTCTGTGCGTGTTTGACCTACATCTTTGGGCC | 2.04±0.11 | 0.02 |
| Apt-2 | CCGGGCGAAGGACAGTCAGCCTCCATGGGAAAGCACTCCACACGTGCTCCTGTTGGCGGC | 16.85±1.58 | 0.04 |
| Apt-3 | CCACTACAGGCAGGGCGACACACTCTGCGGTGAAGGGCACTGTCTGTCCCCTGCGGTCGC | 3.89±0.88 | 0.02 |

注：$P<0.05$ 表示量效曲线拟合成功。

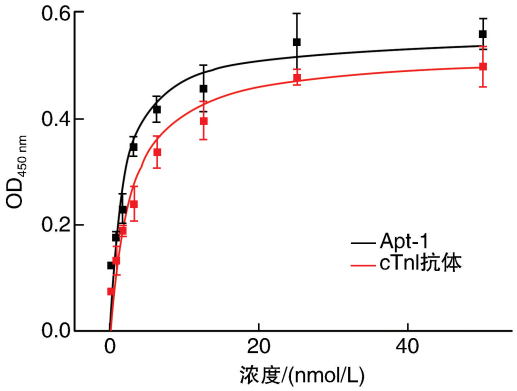


**图 3　适配体 Apt-1 的量效曲线图**

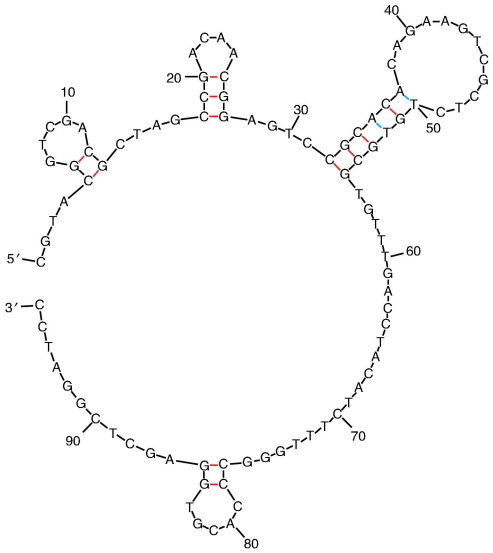

**图 4　适配体 Apt-1 二级结构模拟图**

### 2.3　适配体特异性和敏感性检测

在特异性考察中，以市售 cTnI 抗体（Ab）为阳性对照，分别检测适配体对低、中、高 3 种质量浓度 cTnI/cTnC/cTnT/HSA 的结合能力，通过方差分析发现 Apt-1 仅对 cTnI 有特异性，与其他相关蛋白没有结合（$P<0.05$；图 5A）。于低、高两种质量浓度的 cTnI 中加入等量的 cTnC/cTnT/HSA 制备混合溶液进行检测干扰，同样发现相关物质的加入并不影响 Apt-1 对 cTnI 的特异性识别（图 5B）。在相同质量浓度下，Apt-1 检测 cTnI 的光密度值较市售抗体高，说明本实验室筛选得到的适配体敏感性更高（图 5）。

## 3　讨　论

通过 SELEX 筛选技术得到的几乎所有适配体均显示对目标分子的高亲和力，其解离常数（Kd）在

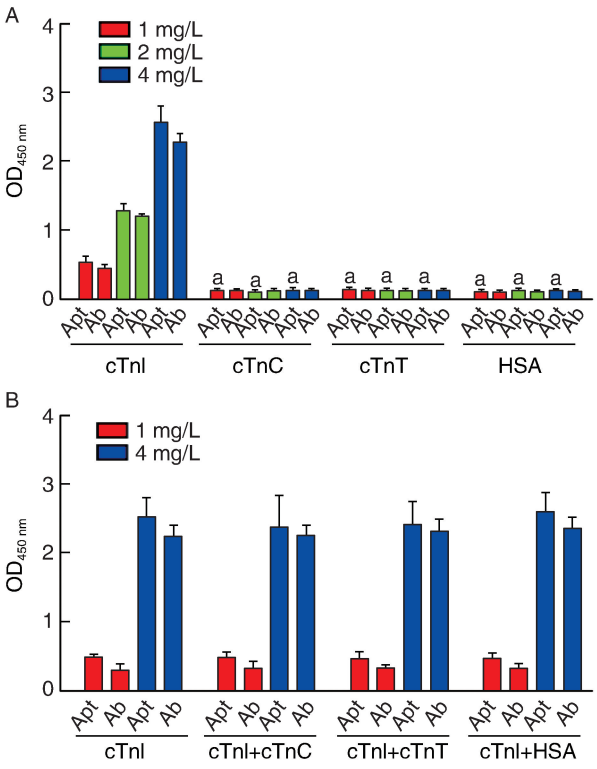


**图 5　适配体 Apt-1 与不同质量浓度 cTnI 的特异性和敏感性比较**

A 为适配体分别与不同蛋白的结合能力；B 为适配体测定混合溶液中 cTnI 的能力。

a 为 $P<0.05$，与同质量浓度 Apt-cTnI 组比较。

微摩尔至纳摩尔范围内，因此适配体也有“化学抗体”之称。到目前为止，已有数个适配体正参与临床试验。辉瑞公司的哌加他尼钠注射液（商品名 Macugen）作为抗血管内皮生长因子的 RNA 适配体已被美国 FDA 批准用于治疗年龄相关的黄斑退化病，从而预防新血管生成[6]。除临床治疗外，适配体还用于许多其他应用，例如检测 COVID-19 病毒和细菌感染，检测癌症生物标志物，检测环境污染检测和在生物传感器上应用[7-11]。SELEX 筛选技术首次应用以来至今已经历了无数的变化和改进，其中改进对每轮筛选得到的 DNA 序列进行扩增的方法也是一个重要环节[3]。由于初始文库中的每个序列具有不同的结构特性，因此它们对 DNA 聚合酶、引物和 PCR 条件的适应性可能会大不相同[12]。这导致了 PCR 副产物的产生并倾向于筛选出适应该 PCR 条件的适配体而不是与靶分子最具高亲和力的适配体。本实验采用的 ePCR 将 DNA 序列包裹在有机相中形成一个个乳滴，构成了数目庞大的独立 PCR 反应空间，使得 DNA 在扩增过程中相对独立而不被干扰。该方法的优势在于减少了非特异性产物的生成，产物量比普通 PCR 多，同时解决

了普通 PCR 优先扩增短链 DNA 片段的问题。这为筛选出高亲和力和高特异性的适配体提供了极大优势。

目前临床上多采用基于抗原抗体反应设计的检测试剂盒进行 cTnI 的测定,但抗体在生产过程中难免产生批间差异,从而导致检测结果不一致[13]。此外,抗原在不同个体中的免疫原性不同,导致在临床检测中拥有同样表达水平的病人检测结果不同。适配体作为一小段核苷酸序列,可以稳定合成且不产生免疫原性。同时,适配体生产周期短,可在两个月甚至两周内就可筛选出针对不同分子的特异性适配体;其制备原材料成本也比抗体更低,在经济学上更具时间成本效益。在本实验中,通过 ELONA 法测定了适配体的亲和力,最终得到了 Kd 值最小的适配体 Apt-1。Kd 值越小证明其亲和力越高,代表着当适配体质量浓度较低时也能与靶分子形成稳定复合物。将 Apt-1 与市售抗体相比,发现该适配体的亲和力更强。进一步测定适配体 Apt-1 的特异性和敏感性,结果发现该适配体对 cTnI 具有极高的特异性,未发现与其他相关蛋白有非特异性结合;在检测相同质量浓度 cTnI 时,适配体的光密度值较抗体大,可认为该适配体对靶蛋白的敏感性更强。故本实验中筛选出来的适配体能有效应用于样本中 cTnI 的检测。以上结果均表明适配体在取代传统抗体成为一种新的诊断 AMI 技术中具有极大优势。

如今,适配体作为传统抗体的核酸类似物,在生物医学领域中扮演着重要的角色。适配体的潜在价值不可忽视,随着相关研究的不断深入,将会有更多的适配体问世,未来必定在基础研究和临床诊断治疗中拥有广泛的应用。

**[参考文献]**

[1] 中国心血管健康与疾病报告编写组, 中国心血管健康与疾病报告 2019[J]. 心肺血管病杂志, 2020, 39(10): 1157-1162.

[2] BOECKEL J N, PALAPIES L, KLOTSCHE J, et al. Adjusted troponin I for improved evaluation of patients with chest pain[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 8087.

[3] WANG T, CHEN C, LARCHER L M, et al. Three decades of nucleic acid aptamer technologies: lessons learned, progress and opportunities on aptamer development[J]. Biotechnol Adv, 2019, 37(1): 28-50.

[4] ZHU H, ZHANG H, XU Y, et al. PCR past, present and future[J]. Biotechniques, 2020, 69(4): 317-325.

[5] KOSHY L, ANJU A L, HARIKRISHNAN S, et al. Evaluating genomic DNA extraction methods from human whole blood using endpoint and real-time PCR assays[J]. Mol Biol Rep, 2017, 44(1): 97-108.

[6] NIMJEE S M, WHITE R R, BECKER R C, et al. Aptamers as therapeutics[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2017, 57: 61-79.

[7] ZHANG L, FANG X, LIU X, et al. Scovery of sandwich type COVID-19 nucleocapsid protein DNA aptamers[J]. Chem Commun (Camb), 2020, 56(70): 10235-10238.

[8] AFRASIABI S, POURHAJIBAGHER M, RAOOFIAN R, et al. Therapeutic applications of nucleic acid aptamers in microbial infections[J]. J Biomed Sci, 2020, 27(1): 6.

[9] CHINNAPPAN R, AL F A, ABDEL RAHMAN A M, et al. Anti-VCAM-1 and anti-IL4Rα aptamer-conjugated super paramagnetic iron oxide nanoparticles for enhanced breast cancer diagnosis and therapy[J]. Molecules, 2020, 25(15): 3437.

[10] ZHANG Y, HU Y, DENG S, et al. Engineering multivalence aptamer probes for amplified and label-free detection of antibiotics in aquatic products[J]. J Agric Food Chem, 2020, 68(8): 2554-2561.

[11] WANG J, HOU J, ZHANG H, et al. Single nanochannel-aptamer-based biosensor for ultrasensitive and selective cocaine detection[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2018, 10(2): 2033-2039.

[12] NAKANO S, TOMARU Y, KUBOTA T, et al. Evaluation of a multiplex strip PCR test for infectious uveitis: a prospective multicenter study[J]. Am J Ophthalmol, 2020, 213: 252-259.

[13] LAU G, KOH M, KAVSAK P A, et al. Clinical outcomes for chest pain patients discharged home from emergency departments using high-sensitivity versus conventional cardiac troponin assays[J]. Am Heart J, 2020, 221: 84-94.

(此文编辑　朱雯霞)