

应用 SELEX 技术筛选沙门氏菌抗原的适配子

郎春燕^{1,2}, 江树勋^{1,*}, 邵碧英¹, 陈文炳¹, 傅碧忠¹, 缪婷玉¹, 陈融斌³, 黄晓蓉¹

(1. 福建出入境检验检疫局, 福建省检验检疫技术研究重点实验室, 福建 福州 350001; 2. 福建农林大学食品科学学院, 福建 福州 350002; 3. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021)

摘要: 目的: 应用指数富集配体系统进化(SELEX)技术筛选沙门氏菌抗原的高亲和性适配子。方法: 首先合成一个全长 78 个核苷酸中间含 35 个随机序列的随机单链寡核苷酸序列(ssDNA)文库, 再以环氧乙烷丙烯酸珠子作为筛选介质, 利用生物素-抗地高辛碱性磷酸酶显色系统检测 DNA 适配子与沙门氏菌抗原的亲和力, 以获得沙门氏菌抗原的高亲和性适配子。结果: 随着筛选轮数的增加, DNA 适配子与沙门氏菌抗原结合后显色, 吸光度逐渐增加, 初步获得了沙门氏菌抗原的高亲和性适配子。结论: 实验所用的筛选流程是适当的, 可以考虑推广用于类似靶目标的筛选。

关键词: 指数富集配体系统进化技术; 沙门氏菌; 抗原; 适配子

Screening of High-affinity DNA Aptamers to *Salmonella* Antigen by SELEX Technique

LANG Chun-yan^{1,2}, JIANG Shu-xun^{1,*}, SHAO Bi-ying¹, CHEN Wen-bing¹, FU Bi-zhong¹, MIAO Ting-yu¹,
CHEN Rong-bin³, HUANG Xiao-rong¹

(1. Fujian Key Laboratory for Technology Research of Inspection and Quarantine, Fujian Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Fuzhou 350001, China; 2. College of Food Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 3. Fisheries College of Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: Objective: To screen high-affinity aptamers to *Salmonella* antigen by applying SELEX (system evolution of ligands by exponential enrichment) method and establish a rapid detection method for *Salmonella* in food. Methods: First, a single stranded DNA (ssDNA) random library with 78 nucleotides in length containing 35 random sequences was constructed. Subsequently, Eupergit C was used as the screening medium in the SELEX method. The binding of aptamers to *Salmonella* antigen was visualized by Biotin-Streptavidin-Anti-Digoxigenin-AP system to screen high-affinity aptamers out. Results: The binding assay demonstrated a gradual decrease in the absorbance at 405 nm as the number of screening rounds increased. High-affinity aptamers binding to *Salmonella* antigen were successfully obtained from the initial random ssDNA library. Conclusion: The screening process is simple and can be used for similar targets.

Key words: system evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX); *Salmonella*; antigen; aptamer

中图分类号: Q789

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)13-0194-04

沙门氏菌(*Salmonella*)是重要食源性致病菌之一, 在世界各地的食物中毒案例中, 沙门氏菌占第 1 位或第 2 位^[1]。一般的肉类食品和奶蛋类食品都可以被沙门氏菌污染, 其中鼠伤寒沙门氏菌、猪霍乱沙门氏菌、肠炎沙门氏菌等是常见的污染菌, 它们是引起人类沙门氏菌食物中毒的主要致病菌, 已对食品安全构成了严重威胁。目前, 我国食品检测部门大多仍采用传统的培养方法来检测致病菌, 操作繁琐, 检测周期长, 一般为

4~5d, 已不能满足当今食品检测的需要。随着指数富集配体系统进化(system evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)技术^[2-3]的兴起, 一种新的、能特异性检测靶目标的技术的应用已成为可能。

适配子(aptamer)一词源于拉丁语 *aptus* 即 to fit, 意为“适合”。它是从一个体外合成的随机寡核苷酸文库中通过 SELEX 过程筛选到的与靶分子特异性结合的小分子 DNA 或 RNA 片段。它具有库容量大、靶分子范

收稿日期: 2010-06-24

基金项目: 国家质检总局科技计划项目(2008IK164); 福建省科技攻关计划重点项目(2008Y0001)

作者简介: 郎春燕(1984—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品生物技术。E-mail: langchunyan2004@163.com

* 通信作者: 江树勋(1969—), 男, 高级工程师, 博士研究生, 研究方向为食品检验。E-mail: jiangshuxun@163.com

围广、亲和力高、特异性强等优点。目前,该技术已成功应用于许多靶分子的筛选,如:蛋白质^[4]、肽^[5]、病毒^[6]、细菌^[7]、有机物,甚至金属离子^[8]。已有很多应用 SELEX 技术筛选致病菌的适体的报道^[9-12],本实验以沙门氏菌的抗原为靶目标,应用 SELEX 技术筛选其特异性、高亲和力的适配子,并通过其后续研究,以期建立一种检测食品中该致病菌的新方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 ssDNA 文库、引物

参考文献[13]中的文库与引物设计,委托上海生工生物工程技术有限公司合成以下 ssDNA 文库和引物。ssDNA 文库: 5'-GGG AGC TCA GAA TAA ACG CTC AA-N35-TT CGA CAT GAG GCC CGG ATC-3'; 引物 I: 5'-GGG AGC TCA GAA TAA ACG CTC AA-3', 引物 II: 5'-GAT CCG GGC CTC ATG TCG AA-3', 引物 III: 5'-地高辛-GGG AGC TCA GAA TAA ACG CTC AA-3', 引物 IV: 5'-生物素-GAT CCG GGC CTC ATG TCG AA-3'。

1.1.2 沙门氏菌抗原

沙门氏菌抗原取自福建省检验检疫局检验检疫技术中心微生物实验室 VIDAS 试剂盒,为纯化、灭活的沙门氏菌抗原。

1.1.3 试剂

环氧乙烷丙烯酸珠子(Eupergit C) 美国 Sigma 公司; Dynabeads 链酶亲和素磁珠 M-280 试剂盒 北京思尔成生物技术有限公司; 2 × Taq PCR MasterMix、50bp DNA Ladder Marker 北京天根生化科技有限公司; PCR 产物纯化试剂盒 美国 Promega 公司; 抗地高辛碱性磷酸酶 瑞士 Roche 公司; 牛血清白蛋白(BSA) 上海生工生物工程技术服务有限公司。

1.1.4 缓冲液

结合缓冲液(pH7.5): 250mmol/L NaCl、1mmol/L MgCl₂、0.1mmol/L EDTA、20mmol/L Tris-HCl; TE 缓冲液(pH8.0): 10mmol/L Tris、1mmol/L EDTA; 3mol/L 乙酸钠(pH5.2); 2 × 结合-洗涤缓冲液(pH7.5): 10mmol/L Tris-HCl、1mmol/L EDTA、2.0mol/L NaCl; 1 × 结合-洗涤缓冲液: 由 2 × 结合-洗涤缓冲液稀释 1 倍所得; PBS 缓冲液(pH7.4): NaCl 8.0g、KCl 0.2g、KH₂PO₄ 0.24g、Na₂HPO₄ · 12H₂O 2.9g, 用蒸馏水定容至 1000mL; 洗涤缓冲液(pH7.4, 0.1% PBST): 将 1mL Tween-20 溶液加入 1000mL 灭菌的 pH7.4 PBS 缓冲液中; 封闭液(pH7.4, 3% BSA-PBS): 将 3g BSA 加入 100mL 灭菌的 pH7.4 PBS 缓冲液中; 对硝基苯磷酸盐溶液(p-NPP, pH9.8): 在 1L 0.01% MgCl₂ 溶液中加入 97mL

二乙醇胺,配成 10% 的二乙醇胺缓冲液,临用前,用二乙醇胺缓冲液配成质量浓度为 1mg/mL 的 p-NPP 溶液,作为酶反应底物。

1.2 方法

1.2.1 沙门氏菌抗原的固定

将沙门氏菌抗原固定在环氧乙烷丙烯酸珠子上,质量浓度分别为 5.6、2.8、1.4mg/mL,方法参照环氧乙烷丙烯酸珠子使用说明书,同时用水合巯基乙醇包被环氧乙烷丙烯酸珠子,制备成 5.6mg/mL 空白珠子用作反筛。

1.2.2 SELEX 筛选过程

取 30μL(600pmol) ssDNA 文库(从第 2 轮开始,用上一轮洗脱下来的 50μL ssDNA),用结合缓冲液稀释至 300μL; 95℃ 变性 5min 并快速冷却至室温,转移至 200μL 5.6mg/mL 空白珠子中作反筛(前 5 轮),摇床室温结合 30min,取上清液转移至 200μL 靶目标环氧乙烷丙烯酸珠子(前 5 轮 5.6mg/mL, 5~10 轮 2.8mg/mL, 后面 5 轮 1.4mg/mL)中,置摇床上室温结合 30min(后面 5 轮改为 20min); 瞬间离心弃上清液,用 500μL 结合缓冲液洗涤 8 次(最后一次测定洗涤液 DNA 浓度,显示无 DNA 则结束洗涤); 加 400μL TE 缓冲液(pH8.0),室温放置 30min,洗脱 DNA(后面 5 轮用 400μL 由结合缓冲液稀释的 0.8mmol/L 的靶目标溶液亲和洗脱); 加 40μL 预冷的乙酸钠和 1mL 无水乙醇颠倒混匀,13400r/min 离心 30min; 弃清液,加 200μL 70% 乙醇清洗 2 次; 真空干燥,加 50μL TE 缓冲液(pH8.0)溶解; 优化 PCR 反应退火温度,用引物 I 和引物 IV 扩增,扩增后的双链 DNA 经解链后用作下一轮筛选的富集文库。重复上述步骤进行反复筛选。

1.2.3 PCR 反应条件优化

PCR 优化反应体系为: 2 × Taq PCR MasterMix 10μL、引物 I 0.4μL、引物 II 0.4μL、模板(即每轮的洗脱上清液)1μL、去离子水 8.2μL。PCR 反应条件为: 95℃ 预变性 3min; 94℃ 变性 30s, 66~74℃ 退火 30s (其中退火温度梯度为 66.0、66.6、67.7、69.2、71.0、72.5、73.5、74.0℃), 72℃ 延伸 20s, 25 个循环; 72℃ 延伸 3min。

1.2.4 ssDNA 富集文库的制备

轻摇试剂瓶重悬磁珠,取 40μL 于 1.5mL 离心管中,置磁力架 1~2min,吸弃上清液; 从磁力架上拿下离心管,加入 80μL 2 × 结合-洗涤缓冲液重悬磁珠,置磁力架 1~2min,吸弃洗涤液,从磁力架上拿下离心管; 加入 80μL 2 × 结合-洗涤缓冲液,使磁珠的终质量浓度为 5μg/μL; 加入扩增的生物素化的 dsDNA,置摇床室温结合 15min; 置磁力架 1~2min,吸弃上清液;

用1×结合-洗涤缓冲液冲洗2~3次;加入50μL 100mmol/L NaOH,于37℃孵育15min,使dsDNA解链;置磁力架,含生物素的一条ssDNA仍留在链亲和素磁珠上并吸附于管壁,而另一条不带生物素的ssDNA存在于上清液中,分离出上清液中ssDNA并用核酸蛋白分析仪测定其光密度,此即为下一轮筛选的富集文库。

1.2.5 筛选的ssDNA与沙门氏菌抗原亲和力的测定

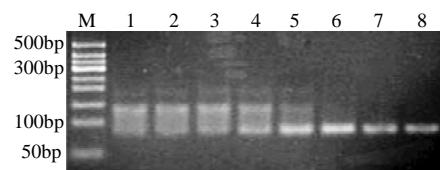
将第1、3、5、7、9、11、13、14、15轮SELEX筛选的产物,以引物III和引物IV进行PCR扩增,纯化的PCR产物与链亲和素标记的磁珠充分反应并用100mmol/L NaOH解链,地高辛标记的ssDNA游离在上清液中,测定含量;结合实验所用的离心管先用3% BSA-PBS 37℃封闭4h,然后用0.1% PBST洗涤一次,干燥后备用;取相同含量的ssDNA经结合缓冲液稀释至300μL,95℃变性5min并快速冷却至室温,转移至靶目标环氧乙烷丙烯酸珠子中(注:先取200μL 5.6mg/mL珠子于已封闭的离心管中,离心后吸弃上清液只留珠子)室温结合30min,瞬间离心,弃上清液,300μL结合缓冲液洗涤3次,离心,弃上清液,加入200μL 1:15000稀释的抗地高辛抗体标记的碱性磷酸酶,反应20min;离心,弃上清液,用300μL结合缓冲液洗涤5次,洗去未与靶珠上ssDNA-地高辛结合的抗地高辛抗体标记的碱性磷酸酶,以底物(二乙醇胺缓冲液配制的质量浓度为1mg/mL的p-NPP溶液)显色,加入2mol/L NaOH溶液终止反应,用酶联仪于波长405nm处测定吸光度。为了提高数据的准确性,以上步骤设3个相同的平行,最后取其平均值。

2 结果与分析

2.1 PCR扩增条件的优化结果

PCR扩增条件的优化对于ssDNA次级文库的生成和筛选的成功与否至关重要。首先退火温度对PCR反应结果的影响极大,以第一轮为例,如图1所示,前5个退火温度处有明显的杂带和拖尾,后面3个退火温度的拖尾现象有逐渐消失的趋势,从图上看最后一个退火温度是最优的,即得到了明亮单一的目的条带,所以实验中选最后一个退火温度即74.0℃进行PCR扩增。实验表明,第1、2轮最适退火温度为74.0℃,从第3轮开始均低于70.0℃,并随着筛选轮数的增加最适退火温度有逐渐降低的趋势(表1)。其次模板浓度对PCR反应得到单一明亮的目的条带也有明显影响,以第15轮为例,

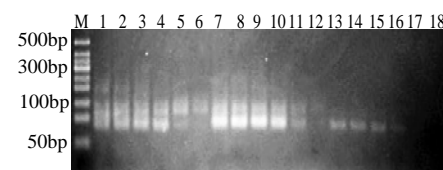
如图2所示,1~6、7~12、13~18 3个实验组在其他条件均相同的情况下,模板浓度较大的前两组均没有得到单一的目的条带,第3组的前3个温度都出现了单一的目的条带。由于较高的退火温度可以减少非特异性扩增,所以本实验选择第3组的退火温度67.7℃进行接下来的PCR扩增;又由于目的条带不是很亮,所以实验中的模板的量在原来1μL的基础上增加为2μL。通过实验发现,以上两个因素的优化已基本能够满足筛选的需要,其他因素如引物浓度等没有明显的影响效果。



M.50bp DNA Ladder Marker; 1~8.退火温度分别为66.0、66.6、67.7、69.2、71.0、72.5、73.5、74.0℃。

图1 PCR扩增第1轮退火温度优化的结果

Fig.1 Results of first-round PCR for optimization of annealing temperature

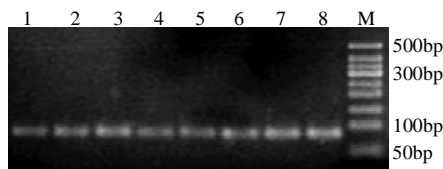


M.50bp DNA Ladder Marker; 1~6.模板稀释100倍; 7~12.模板稀释1000倍; 13~18.模板稀释5000倍; 1~6、7~12、13~18.各组退火温度分别为66.0、66.6、67.7、69.2、71.0、72.5℃。

图2 PCR扩增模板浓度的优化结果

Fig.2 Results of PCR for optimization of template concentration

2.2 15轮筛选的PCR产物电泳结果



M.50bp DNA Ladder Marker; 1~8.第1、3、5、7、9、11、13、15轮筛选的PCR产物。

图3 不同筛选轮数PCR产物的电泳结果

Fig.3 Agarose gel electrophoresis analysis of PCR products from different rounds

表1 各筛选轮数的PCR扩增退火温度

Table 1 Annealing temperatures of PCR for different rounds

扩增轮数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
退火温度/℃	74	74	69.2	69.2	69.2	69.2	69.2	69.2	67.7	67.7	67.7	66.6	66.6	66.0	66.0

为了提高筛选的严谨性,所用的 ssDNA 含量不总是相同,前面 5 轮用作下一轮筛选的 ssDNA 由 16 管 (320 μ L)PCR 扩增产物解链得到,5~10 轮为 12 管,后面 5 轮为 8 管。如图 3 所示,各轮 PCR 产物的电泳条带都符合预期大小且为单一条带。

2.3 筛选的 ssDNA 与沙门氏菌抗原亲和力的测定结果

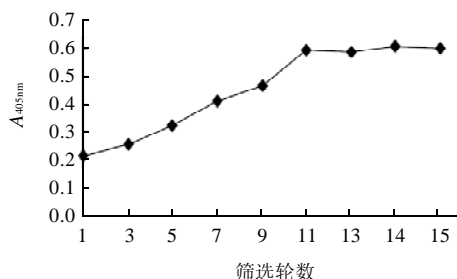


图4 筛选的 ssDNA 与沙门氏菌抗原结合的吸光度

Fig.4 Absorbance of ssDNA bound-Salmonella antigen at different screening rounds

如图 4 所示,1~11 轮的吸光度随着筛选轮数的增加呈上升趋势,而后面 3 轮的吸光度没有明显变化。说明随着筛选轮数的增加,吸附到靶目标上的适配子的量也在增加,当 ssDNA 与靶目标上的结合位点达到饱和状态时,吸附的 ssDNA 就不再增加。第 15 轮的结合率是第 1 轮的 2.8 倍。

3 讨论

在一个随机单链 DNA 文库中,潜在地存在着能识别各种靶分子的适配子^[3,14]。本实验合成的含有 35 个随机序列的单链 DNA 文库,理论上存在 435 种不同的序列,实际库容量低于 1014。通过 SELEX 技术,筛选到与沙门氏菌抗原有较高亲和力的适配子,并对其亲和力进行了初步分析。

实验发现 PCR 反应条件的优化对成功富集目标寡核苷酸片段极其重要。首先是每轮退火温度的优化,虽然本实验中退火温度有一定的降低趋势,但每轮在进行 PCR 富集前尽量准确的寻找到最合适的退火温度对筛选的成功与否是至关重要的。其次是模板浓度的优化,从第 4 轮开始在预设的温度梯度内都出现了不同程度的拖尾、杂带现象,在这种情况下循环数、引物浓度、温度梯度的优化调整都没能很好的改善,最后实验发现对模板进行不同程度的稀释可以很好的解决这一问题。这

是由于引物可能与随机 ssDNA 文库中的随机序列存在部分杂交或是文库中模板随机序列部分之间发生杂交,致使电泳时难以得到单一的目的条带。

为了提高筛选的严谨性,实验中前 5 轮使用空白珠子作反筛,除去文库中存在的与空白珠子表面结合的 ssDNA,快速、特异性富集与靶目标结合的 ssDNA。实验中,每轮投入筛选的 ssDNA 富集文库的量、靶目标的量、ssDNA 富集文库与靶目标的结合时间都进行了初步的设计,以增大筛选压,进一步提高筛选的严谨性、特异性、目的性。结合实验显示,随着筛选轮数的增加,筛选到的 ssDNA 与沙门氏菌抗原的结合呈上升趋势,从第 11 轮开始结合率基本保持不变,说明适配子与靶目标的结合达到饱和。

后续的克隆和测序工作将寻找与沙门氏菌抗原表面稳定结合的适配子,并对其进行进一步研究,为其在食品检测方面的初步应用奠定基础。

参考文献:

- [1] MANZANO M, COCOLIN L, ASTORI G, et al. Development of a PCR microplate-capture hybridization method for simple, fast and sensitive detection of *Salmonella* serovars in food[J]. *Molecular and cellular Probes*, 1998, 12(4): 227-234.
- [2] ELLINGTON A D, SZOSTAK J W. *in vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands[J]. *Nature*, 1990, 346: 818-822.
- [3] TUERK C, GOLD L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase[J]. *Science*, 1990, 249: 505-510.
- [4] 詹林盛,孙红琰,彭剑淳,等.丙型肝炎病毒核心蛋白寡核苷酸适配子的筛选与鉴定[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2002, 22(5): 578-581.
- [5] 郭克泰,严馨蕊,黄国锦,等.抑制肿瘤坏死因子- α 的 DNA 适配子的筛选与鉴定[J]. *生物工程学报*, 2003, 19(6): 730-733.
- [6] 李卫滨,兰小鹏,杨湘越,等.筛选环孢霉素 A 适体的 SELEX 技术的建立[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2007, 23(10): 829-834.
- [7] 沈桦,童朝阳,刘冰,等.苏云金芽孢杆菌适配子的筛选与结构分析[J]. *防化研究*, 2008(1): 17-20; 30.
- [8] GOLD L. Oligonucleotides as research, diagnostic, and therapeutic agents [J]. *Mol Biol*, 1995, 270(23): 13581-13584.
- [9] 陈敏.单核增生李斯特氏菌适体的筛选、结构分析与特异性的研究[D].福州:福建师范大学,2010.
- [10] 马占忠,秦莲花,王玉炯,等.结核分枝杆菌 ESAT-6 抗原适体的筛选与亲和性分析[J]. *中华临床医师杂志*, 2007, 1(5): 45-48.
- [11] 许少涵,兰小鹏.体外 SELEX 法筛选淋病奈瑟菌适体方法的建立[J]. *中华皮肤科杂志*, 2008, 41(10): 699-700.
- [12] 刘丰伟.体外筛选铜绿假单胞菌适体的研究及初步应用[D].福州:福建医科大学,2007.
- [13] 甄蓓,宋亚军,郭兆彪,等.体外筛选炭疽芽孢适配子[J]. *生物化学与生物物理学报*, 2002, 34(5): 635-642.
- [14] VANT-HULL B, PAYANO-BAEZ A, DAVIS R H, et al. The mathematics of SELEX against complex targets[J]. *J Mol Biol*, 1998, 278(3): 579-597.