



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110257382 A

(43)申请公布日 2019.09.20

(21)申请号 201910536200.1

G01N 33/53(2006.01)

(22)申请日 2019.06.20

A61K 31/711(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(71)申请人 燕山大学

地址 066004 河北省秦皇岛市海港区河北大街西段438号

(72)发明人 栗坤 齐力轻 石明 李健  
刘志伟

(74)专利代理机构 北京挺立专利事务所(普通合伙) 11265

代理人 刘阳

(51)Int.Cl.

C12N 15/115(2010.01)

C12Q 1/6806(2018.01)

C12Q 1/6869(2018.01)

G01N 33/574(2006.01)

权利要求书2页 说明书10页 附图4页

### (54)发明名称

识别肠癌血清标记物的核酸适配体及其筛选方法和用途

### (57)摘要

本发明涉及一种识别肠癌血清标记物的核酸适配体及其制备方法和应用,具体公开了四条核酸适配体的核苷酸序列及其筛选方法,首先收集首诊的肠癌患者及健康人血清样本,合成引物和初级文库ssDNA,以表面偶联羧基的磁性琼脂糖微球作为血清蛋白吸附载体,利用消减SELEX技术结合实时荧光PCR技术获取逐步富集的与肠癌血清蛋白特异性结合的核酸适配体序列。通过高通量测序、数据分析等方法筛选出四条特异性识别肠癌血清的核酸适配体。经验证本发明的四条核酸适配体对肠癌患者血清均具有亲和力高和特异性强的特点,在研究肠癌肿瘤标记物钓取、肠癌患者初筛和肠癌靶向性药物治疗方面有广阔的应用前景。

1. 一种识别肠癌血清标记物的核酸适配体, 其特征在于, 所述核酸适配体的核苷酸序列包括以下Seq1-Seq4中任意一种所示的DNA片段:

Seq-1:

5'-CTATAGCAATGGTACGGTACTTCCCCTTGTCGATTCATAATGTTTCGTGGAACTCGCTCTCGGGACAAAA  
GTGCACGCTACTTTGCTAA-3'

Seq-2:

5'-CTATAGCAATGGTACGGTACTTCCTAACTCGTCCCTACCGAGCCTCTCTCTGGTCCTTGCAACTCAAAA  
GTGCACGCTACTTTGCTAA-3'

Seq-3:

5'-CTATAGCAATGGTACGGTACTTCCTAGTTGAGCATTATACACATTGACTGGGCTGTTCTTCTGTCAAAA  
GTGCACGCTACTTTGCTAA-3'

Seq-4:

5'-CTATAGCAATGGTACGGTACTTCCTGCTGGTTCGGCATGGCTTGCGACTGTCCCTGCGCATTTCCAAAA  
GTGCACGCTACTTTGCTAA-3'。

2. 根据权利要求1所述的识别肠癌血清标记物的核酸适配体, 其特征在于, 所述核酸适配体的核苷酸序列上的某一位置通过磷酸骨架修饰、截断、延长、颠换、或对碱基进行化学修饰。

3. 根据权利要求1所述的识别肠癌血清标记物的核酸适配体, 其特征在于, 所述核酸适配体的核苷酸序列上结合有生物素、地高辛、荧光物质、纳米发光材料或酶标记。

4. 根据权利要求1~3任一项所述的识别肠癌血清标记物的核酸适配体, 其特征在于, 所述核酸适配体还包括以下三种序列中的任意一种:

(1) 与所述识别肠癌血清标记物的核酸适配体的核苷酸序列的同源性在80%以上;

(2) 与所述识别肠癌血清标记物的核酸适配体的核苷酸序列进行杂交的序列;

(3) 与所述识别肠癌血清标记物的核酸适配体的核苷酸序列转录的RNA序列。

5. 根据权利要求1~4任一项所述的识别肠癌血清标记物的核酸适配体, 其特征在于, 所述核酸适配体的检测引物序列为:

上游引物:P6:5'-CTATAGCAATGGTACGGTACTTCC-3'

下游引物:P9:5'-TTAGCAAAGTAGCGTGCACTTTTG-3'。

6. 根据权利要求5所述的识别肠癌血清标记物的核酸适配体, 其特征在于, 在所述核酸适配体的检测下游引物P9的5'标记有生物素。

7. 一种如权利要求1~6任一项所述的识别肠癌血清标记物的核酸适配体的筛选方法, 其特征在于, 所述核酸适配体的筛选步骤为:

(1) 第1轮正筛: 使用随机文库ssDNA与磁珠-肠癌血清蛋白复合物孵育, 经过洗脱重悬, 得到第1轮正筛模板;

(2) PCR检测: 将步骤(1)得到的正筛模板加入到PCR扩增体系中进行扩增, 记录Ct值;

(3) 第2轮次级库制备: 对步骤(1)得到的正筛模板进行PCR扩增, 经过单链制备获得第2轮使用的次级文库;

(4) 第2轮反筛: 使用步骤(3)得到的次级文库与磁珠-健康人血清蛋白复合物孵育, 得到第2轮正筛文库, 通过洗脱磁珠-血清复合物, 得到第2轮反筛模板;

(5) 第2轮正筛:使用步骤(4)得到的正筛文库与磁珠-肠癌血清蛋白复合物孵育、洗脱得到第2轮正筛模板ssDNA;

(6) PCR检测:将反筛模板和正筛模板加入到PCR扩增体系中进行扩增,记录Ct值;

(7) 重复步骤(3)~(6),分别收集多轮结合到磁珠-肠癌血清复合物和磁珠-健康人血清复合物上的ssDNA,检测得到多轮的回收率和正、反筛的Ct值,至第10轮时检测出阳性的Ct值小于阴性的Ct值且 $\Delta Ct=3-4$ ,且电泳检测没有杂带说明筛选成功;

(8) 高通量测序及序列分析:将富集筛选出的第10轮次级ssDNA文库的PCR扩增产物进行高通量测序。

8. 一种如权利要求1~6任一项所述的识别肠癌血清标记物的核酸适配体在制备药物及其他制品中的用途。

9. 根据权利要求8所述的识别肠癌血清标记物的核酸适配体在制备药物及其他制品中的用途,其特征在于,所述药物及其他制品用于诊断或治疗肠癌。

## 识别肠癌血清标记物的核酸适配体及其筛选方法和用途

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,特别是涉及一种识别肠癌血清标记物的核酸适配体及其筛选方法和用途。

### 背景技术

[0002] 肠癌是常见的恶性肿瘤,严重威胁着人类健康,其发病率仅次于肺癌、胃癌居第三位,给人们的生命和财产带来了巨大的威胁。对于肠癌疾病,威胁人类健康主要原因是发现较晚,缺乏对于高危人群的有效早期检测方法。如果能像常规体检一样以一种无痛方式确定出高危人群,就可以早期提供治疗的方法,提高其生存率。目前,肿瘤标志物的检测是实现肠癌早期诊断的重要手段,但现在仍然缺少有效特异的肠癌标志物。

[0003] 核酸适配体是在体外通过指数富集的配基系统进化技术(SELEX)从人工合成的DNA或RNA文库中筛选出来的一小段寡核苷酸,具有高亲和力强特异性结合靶分子的优点,并且适配体分子量小,免疫原性低,化学修饰性强,应用领域广等。早期适配体的筛选多以单一蛋白为靶标进行筛选,但是以单一蛋白筛选在血清诊断及筛查的应用价值不高,因此,近年来运用复合靶标筛选适配体受到了广泛关注。复合靶筛选与常规的筛选不同之处是靶标不再是单一蛋白,而是复杂的多种蛋白,这就造成整个适配体筛选的过程更为复杂化。消减筛选是通过去除与非目标靶蛋白识别的一系列寡核苷酸,筛选出与非目标靶蛋白不结合但与目标靶蛋白特异性结合的核苷酸,然后再将其应用到后面来的实验中。这样将消减筛选应用到复合靶标筛选中会大大降低筛选的难度,从而提高成功率。另外筛选出来的适配体有非常广泛的应用前景,可以用来发现新的肿瘤标志物,还可以构建新型传感器等实现可视化检测。

### 发明内容

[0004] 基于此,有必要针对现有技术中的不足,提供一种识别肠癌血清标记物的核酸适配体及其筛选方法和用途。

[0005] 一种识别肠癌血清标记物的核酸适配体,所述核酸适配体的核苷酸序列包括以下Seq 1-Seq 4中任意一种所示的DNA片段:

[0006] Seq-1:

[0007] 5'-CTATAGCAATGGTACGGTACTTCCCCTTGTCGATTCATAATGTTTCGTGGAACCTCGCTCTCGGGACAAAAGTGCACGCTACTTTGCTAA-3'

[0008] Seq-2:

[0009] 5'-CTATAGCAATGGTACGGTACTTCCTAACTCGTCCCTACCGAGCCTCTCTCTGGTCCTTGCAACTCAAAAGTGCACGCTACTTTGCTAA-3'

[0010] Seq-3:

[0011] 5'-CTATAGCAATGGTACGGTACTTCCTAGTTGAGCATTATACACATTGACTGGGCTGTTCTTCTGTCAAAAAGTGCACGCTACTTTGCTAA-3'

[0012] Seq-4:

[0013] 5'-CTATAGCAATGGTACGGTACTTCCTGCTGGTTCGGCATGGCTTGC GACTGTCCCTGCGCATTTC AAAAGTGCACGCTACTTTGCTAA-3'。

[0014] 在其中一个实施例中,所述核酸适配体的核苷酸序列上的某一位置通过磷酸骨架修饰、截断、延长、颠换、或对碱基进行化学修饰。

[0015] 在其中一个实施例中,所述核酸适配体的核苷酸序列上结合有生物素、地高辛、荧光物质、纳米发光材料或酶标记。

[0016] 在其中一个实施例中,所述核酸适配体还包括以下三种序列中的任意一种:

[0017] (1) 与所述识别肠癌血清标记物的核酸适配体的核苷酸序列的同源性在80%以上;

[0018] (2) 与所述识别肠癌血清标记物的核酸适配体的核苷酸序列进行杂交的序列;

[0019] (3) 与所述识别肠癌血清标记物的核酸适配体的核苷酸序列转录的RNA序列。

[0020] 在其中一个实施例中,所述核酸适配体的检测引物序列为:

[0021] 上游引物:P6:5'-CTATAGCAATGGTACGGTACTTCC-3'

[0022] 下游引物:P9:5'-TTAGCAAAGTAGCGTGCACTTTTG-3'。

[0023] 在其中一个实施例中,在所述核酸适配体的检测下游引物P9的5'标记有生物素。

[0024] 本发明还涉及一种所述的识别肠癌血清标记物的核酸适配体的筛选方法,所述核酸适配体的筛选步骤为:

[0025] (1) 第1轮正筛:使用随机文库ssDNA与磁珠-肠癌血清蛋白复合物孵育,经过洗脱重悬,得到第1轮正筛模板;

[0026] (2) PCR检测:将步骤(1)得到的正筛模板加入到PCR扩增体系中进行扩增,记录Ct值;

[0027] (3) 第2轮次级库制备:对步骤(1)得到的正筛模板进行PCR扩增,经过单链制备获得第2轮使用的次级文库;

[0028] (4) 第2轮反筛:使用步骤(3)得到的次级文库与磁珠-健康人血清蛋白复合物孵育,得到第2轮正筛文库,通过洗脱磁珠-血清复合物,得到第2轮反筛模板;

[0029] (5) 第2轮正筛:使用步骤(4)得到的正筛文库与磁珠-肠癌血清蛋白复合物孵育、洗脱得到第2轮正筛模板ssDNA;

[0030] (6) PCR检测:将反筛模板和正筛模板加入到PCR扩增体系中进行扩增,记录Ct值;

[0031] (7) 重复步骤(3)~(6),分别收集多轮结合到磁珠-肠癌血清复合物和磁珠-健康人血清复合物上的ssDNA,检测得到多轮的回收率和正、反筛的Ct值。至第10轮时检测出阳性的Ct值小于阴性的Ct值且 $\Delta Ct=3-4$ ,且电泳检测没有杂带说明筛选成功;

[0032] (8) 高通量测序及序列分析:将富集筛选出的第10轮次级ssDNA文库的PCR扩增产物进行高通量测序。

[0033] 本发明还涉及所述的识别肠癌血清标记物的核酸适配体在制备药物及其他制品中的用途。

[0034] 在其中一个实施例中,所述药物及其他制品用于诊断或治疗肠癌。

## 附图说明

- [0035] 图1为实时荧光PCR 10轮ssDNA回收率统计图；
- [0036] 图2为第10轮PCR检测图(10-代表正常人血清,10+代表肠癌患者血清)；
- [0037] 图3为第10轮正反筛模板PCR扩增产物琼脂糖电泳图；
- [0038] 图4为四条特异肠癌血清核酸适配体用RNAstructure预测的二级结构附图；
- [0039] 图5为四条核酸适配体的解离曲线与相应的Kd值图；
- [0040] 图6为四条核酸适配体分别与正常血清和肠癌患者血清孵育后实时荧光PCR平均循环数差值( $\Delta C_t$ )比较图；
- [0041] 图7为四条特异肠癌血清核酸适配体对肠癌患者血清阳性检测率比较图；
- [0042] 图8为利用FAM-Seq-2核酸适配体作为探针对肠癌初步筛选结果统计图(\*\* $p < 0.001$ )。

## 具体实施方式

[0043] 为使本发明的上述目的、特征和优点能够更加明显易懂,下面结合附图对本发明的具体实施方式做详细的说明。在下面的描述中阐述了很多具体细节以便于充分理解本发明。但是本发明能够以很多不同于在此描述的其它方式来实施,本领域技术人员可以在不违背本发明内涵的情况下做类似改进,因此本发明不受下面公开的具体实施例的限制。

[0044] 本发明的目的通过如下方案实现:利用热循环消减SELEX技术,以首诊(首次诊断且未经治疗)肠癌患者血清为正筛靶标,以健康人血清为反筛靶标,经过多轮反复孵育,洗脱,扩增,从随机文库(5'-CTATAGCAATGGTACGGTACTTCC-(40N)-CAAAGTGCACGCTACTTTGCTAA-3')中筛出一组特异性结合肠癌病人血清蛋白的核酸适配体。进一步表征与靶标特异结合的核酸适配体的亲和力,选择出亲和力较高的适配体。依据与筛选同一技术构思,用50例肠癌患者血清和50例正常人血清进一步对其特异性进行验证。经统计学分析,并计算对肠癌患者血清蛋白检测的阳性率,从而确定出肠癌血清蛋白阳性率较高的核酸适配体序列,再进行下一步初步应用。

[0045] 一种识别肠癌血清标记物的核酸适配体,所述核酸适配体的核苷酸序列包括以下Seq 1-Seq 4中任意一种所示的DNA片段:

[0046] Seq-1:

[0047] 5'-CTATAGCAATGGTACGGTACTTCCCCTTGTCGATTCATAATGTTCGTGGAACCTCGCTCTCGGGACAAAAGTGCACGCTACTTTGCTAA-3'

[0048] Seq-2:

[0049] 5'-CTATAGCAATGGTACGGTACTTCCTAACTCGTCCCTACCGAGCCTCTCTCTGGTCCTTGCAACTC AAAAGTGCACGCTACTTTGCTAA-3'

[0050] Seq-3:

[0051] 5'-CTATAGCAATGGTACGGTACTTCCTAGTTGAGCATTATACACATTGACTGGGCTGTTCTTCTGTG AAAAGTGCACGCTACTTTGCTAA-3'

[0052] Seq-4:

[0053] 5'-CTATAGCAATGGTACGGTACTTCCTGCTGGTTTCGGCATGGCTTGCGACTGTCCCTGCGCATTTCC AAAAGTGCACGCTACTTTGCTAA-3'。

[0054] 在其中一个实施例中,所述核酸适配体的核苷酸序列上的某一位置通过磷酸骨架修饰、截断、延长、颠换、或对碱基进行化学修饰。

[0055] 在其中一个实施例中,所述核酸适配体的核苷酸序列上结合有生物素、地高辛、荧光物质、纳米发光材料或酶标记。

[0056] 在其中一个实施例中,所述核酸适配体还包括以下三种序列中的任意一种:

[0057] (1) 与所述识别肠癌血清标记物的核酸适配体的核苷酸序列的同源性在80%以上;

[0058] (2) 与所述识别肠癌血清标记物的核酸适配体的核苷酸序列进行杂交的序列;

[0059] (3) 与所述识别肠癌血清标记物的核酸适配体的核苷酸序列转录的RNA序列。

[0060] 所述“同源性”指与天然核酸序列的序列相似性。“同源性”包括与本发明的核酸适配体或其核心序列具有80%或更高,85%或更高,90%或更高,95%或更高同源性的核苷酸序列。同源性可以用肉眼或计算机软件进行评价。使用计算机软件,两个或多个序列之间的同源性可以用百分比(%)表示,其可以用来评价相关序列之间的同源性。

[0061] 在其中一个实施例中,所述核酸适配体的检测引物序列为:

[0062] 上游引物:P6:5'-CTATAGCAATGGTACGGTACTTCC-3'

[0063] 下游引物:P9:5'-TTAGCAAAGTAGCGTGCACTTTTG-3'。

[0064] 在其中一个实施例中,在所述核酸适配体的检测下游引物P9的5'标记有生物素。

[0065] 本发明还涉及一种所述的识别肠癌血清标记物的核酸适配体的筛选方法,所述核酸适配体的筛选步骤为:

[0066] (1) 第1轮正筛:使用随机文库ssDNA与磁珠-肠癌血清蛋白复合物孵育,经过洗脱重悬,得到第1轮正筛模板;

[0067] (2) PCR检测:将步骤(1)得到的正筛模板加入到PCR扩增体系中进行扩增,记录Ct值;

[0068] (3) 第2轮次级库制备:对步骤(1)得到的正筛模板进行PCR扩增,经过单链制备获得第2轮使用的次级文库;

[0069] (4) 第2轮反筛:使用步骤(3)得到的次级文库与磁珠-健康人血清蛋白复合物孵育,得到第2轮正筛文库,通过洗脱磁珠-血清复合物,得到第2轮反筛模板;

[0070] (5) 第2轮正筛:使用步骤(4)得到的正筛文库与磁珠-肠癌血清蛋白复合物孵育、洗脱得到第2轮正筛模板ssDNA;

[0071] (6) PCR检测:将反筛模板和正筛模板加入到PCR扩增体系中进行扩增,记录Ct值;

[0072] (7) 重复步骤(3)~(6),分别收集多轮结合到磁珠-肠癌血清复合物和磁珠-健康人血清复合物上的ssDNA,检测得到多轮的回收率和正、反筛的Ct值。至第10轮时检测出阳性的Ct值小于阴性的Ct值且 $\Delta Ct=3-4$ ,且电泳检测没有杂带说明筛选成功;

[0073] (8) 高通量测序及序列分析:将富集筛选出的第10轮次级ssDNA文库的PCR扩增产物进行高通量测序。

[0074] 本发明还涉及所述的识别肠癌血清标记物的核酸适配体在制备药物及其他制品中的用途。

[0075] 在其中一个实施例中,所述药物及其他制品用于诊断或治疗肠癌。

[0076] 本发明与现有技术相比具有如下优点:

[0077] 1.发现了一组与肠癌血清蛋白特异性结合的核酸适配体,可以作为特异性识别肠癌的探针,为肠癌的早期诊断和治疗提供新的思路。

[0078] 2.将核酸适配体带上荧光标记,在血清样本验证中,荧光值显示肠癌患者血清组和健康人血清组有显著统计学差异,该核酸适配体可以用于构建初筛诊断试剂盒。

[0079] 3.以核酸适配体为探针对肠癌血清进行探测初筛,受筛者痛苦小、出结果快、灵敏度和准确率高,具有较高的临床开发价值,在研究肠癌肿瘤标记物钓取、肠癌患者初筛和肠癌靶向性药物治疗方面有广阔的应用前景。

[0080] 实施例1核酸适配体序列的筛选:

[0081] 1.血样处理

[0082] 收集20例首诊患者(未接受治疗)血样,在室温下3000rpm离心10min去除血细胞,收集血清;然后在4℃条件下,15000×g,离心30min,去除沉淀和表面油脂,收集中层清液,置-80℃保存待用。20例健康人的血样处理同上。

[0083] 2.乙腈沉淀法去除血清高丰度蛋白

[0084] 取上述20例肠癌病人血清充分混匀,按血清:水:乙腈=1:2:0.5配制,水浴超声5min,15000×g,离心30min,收集上清,弃去沉淀。健康人血清处理同上。

[0085] 3.合成初级ssDNA文库:序列为

[0086] 5'-CTATAGCAATGGTACGGTACTTCC-(40N)-CAAAAGTGCACGCTACTTTGCTAA-3',

[0087] 其中N代表A,T,C,G中任意碱基。

[0088] 上游引物:P6:5'-CTATAGCAATGGTACGGTACTTCC-3'

[0089] 下游引物:P9:5'-TTAGCAAAGTAGCGTGCACTTTTG-3'

[0090] 生物素标记下游引物:

[0091] Bio-P9:5'-Biotin-TTAGCAAAGTAGCGTGCACTTTTG-3'

[0092] 4.配制PCR扩增体系:

[0093] 2×SG Fast qPCR Master Mix (2400μL), DNF Buffer (480μL), ddH<sub>2</sub>O (816μL); P6引物 (10μM) 96μL; Bio-P9引物 (10μM) 96μL; 充分震荡混合, 16μL/管进行分装。

[0094] 5.缓冲液配制:

[0095] PBS (0.01M): NaCl 8.0g; KCl 0.2g; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.44g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24g; 加蒸馏水至1000mL, 调节pH到7.4 (用Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>或KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>调节)。

[0096] TPBS (1%): 2mL Tween 20加入到上述配制好的200mL PBS溶液中, 分装后120℃高压灭菌20min。

[0097] 封闭液: 蔗糖0.2g; 酪蛋白0.025g; BSA 0.025g; 加灭菌后的0.01M的PBS缓冲液至20mL, 震荡超声。

[0098] 封闭液: 0.1mg/mL酵母tRNA。

[0099] 封闭液: 0.1mg/mL鲑鱼精DNA。

[0100] 6.特异性识别肠癌血清蛋白的核酸适配体筛选:

[0101] (1) 第1轮正筛: 羧基琼脂糖磁珠和去除了高丰度蛋白的首诊肠癌的患者血清37℃下孵育过夜, PBS洗3次, 加入封闭液孵育1h。PBS洗3次, 用磁珠-肠癌血清复合物和随机ssDNA文库于37℃下孵育4h, 向磁珠-肠癌血清复合物中加入200μL DEPC水, 95℃高温加热后迅速冰浴收集变性下来的ssDNA溶液, 标记为1+。



[0102] (2) PCR检测:取出2个放有扩增体系的PCR小管,并依次从1+和DEPC水中取出4 $\mu$ L加入到2个PCR管中,记住管子上的顺序及加入的样品,然后实时荧光PCR仪进行扩增,记录Ct值。

[0103] (3) 次级库制备:步骤(1) 1+中的ssDNA进行PCR扩增,到达S型曲线的平台期停止。用扩增的双链和包被链霉亲和素的琼脂糖羧基磁珠于37℃下孵育2h,PBS洗3次,然后于95℃高温下变性,迅速冰浴收集变性下来的ssDNA,即为下一轮使用的次级库。

[0104] (4) 第2轮反筛:羧基琼脂糖磁珠与去除了高丰度蛋白的健康人血清在37℃下孵育过夜,PBS洗3次,加入封闭液孵育1h,PBS洗3次,将随机文库ssDNA加入到磁珠-正常人血清蛋白复合物中,37℃孵育2h。将上清中的不与磁珠-血清复合物结合的ssDNA收集下来,用于下一步正筛。向磁珠-正常血清蛋白复合物中加入200 $\mu$ L DEPC水,95℃高温加热后迅速冰浴收集变性下来的ssDNA溶液,标记为2-。

[0105] (5) 第2轮正筛:羧基琼脂糖磁珠和去除了高丰度蛋白的首诊肠癌的患者血清37℃下孵育过夜,PBS洗3次,加入封闭液孵育1h。PBS洗3次,用磁珠-肠癌血清复合物和步骤(4)中收集的上清中ssDNA溶液于37℃下孵育2h,同步骤(4)中的方法把磁珠-肠癌血清复合物上强结合的ssDNA变性并收集下来,标记为2+。

[0106] (6) PCR检测:取出3个放有扩增体系的PCR小管,并依次从2-、2+和DEPC水中取出4 $\mu$ L加入到3个PCR管中,记住管子上的顺序及加入的样品,然后实时荧光PCR仪进行扩增,记录对应Ct值。

[0107] (7) 重复步骤(3)~(6),收集结合到磁珠-肠癌血清复合物和磁珠-健康人血清复合物上的ssDNA,检测得到多轮第二轮的回收率和正、反筛的Ct值。第10轮时检测出阳性的Ct值小于阴性的Ct值且 $\Delta$ Ct=3-4,且电泳检测没有杂带说明筛选成功。如图1-3所示,分别为实时荧光PCR 10轮ssDNA回收率统计图、第10轮PCR检测图、第10轮正反筛模板PCR扩增产物琼脂糖电泳图。

[0108] (8) 高通量测序及序列分析:将富集筛选出的第10轮次级ssDNA文库的PCR扩增产物送上海生工进行高通量测序。测序结果通过序列分析比对挑选出4条候选核酸适配体,序列见表1。

[0109] 表1

[0110]

适配体名称	适配体序列
Seq-1	5'-CTATAGCAATGGTACGGTACTTCCCCTTGTCGATTCATAATGTTTCGTG GAACTCGCTCTCGGGACAAAAGTGCACGCTACTTTGCTAA-3'
Seq-2	5'-CTATAGCAATGGTACGGTACTTCCTAACTCGTCCCTACCGAGCCTCT CTCTGGTCCTTGCAACTCAAAAAGTGCACGCTACTTTGCTAA-3'

[0111]

Seq-3	5'-CTATAGCAATGGTACGGTACTTCCTAGTTGAGCATTATACACATTGACTGGGCTGTTCTTCTGTCAAAAGTGCACGCTACTTTGCTAA-3'
Seq-4	5'-CTATAGCAATGGTACGGTACTTCCTGCTGGTTCGGCATGGCTTGCGACTGTCCCTGCGCATTTCCTCAAAAGTGCACGCTACTTTGCTAA-3'

[0112] 实施例2核酸适配体二级结构预测：

[0113] 使用RNA structure 5.7软件对上述筛选获得的四条核酸适配体进行二级结构预测。四条核酸适配体的二级结构预测结果如图4所示。

[0114] 实施例3四条核酸适配体和靶标之间亲和力测定：

[0115] 使用8mL处理后的肠癌血清和2mL羧基琼脂糖磁珠孵育过夜，用PBS洗3遍，离心等分成40份磁珠-血清蛋白复合物。将合成好的FAM标记的4条核酸适配体分别稀释为0nM、1nM、2nM、5nM、10nM、20nM、50nM、100nM、200nM和500nM，然后分别和磁珠-血清复合物进行孵育，做好标记。1×TPBS洗5遍，超纯水洗1遍，去上清。加入200μL超纯水重悬磁珠，流式细胞仪测定其荧光值。以荧光强度为纵坐标，适配体浓度为横坐标，依据公式 $Y = (B_{max} \times X) / (K_d + X)$ 拟合曲线，得到四条核酸适配体的解离曲线并计算Kd值。结果如图5所示。

[0116] 实施例4四条核酸适配体与靶标结合特异性验证：

[0117] 将4条候选适配体稀释为浓度400ng/mL，取500μL分别与50例羧基琼脂糖磁珠-肠癌血清蛋白复合物、50例羧基琼脂糖磁珠-正常人血清蛋白复合物结合，37℃孵育2h。TPBS洗5遍，超纯水洗1遍。各加10μL纯水，95℃加热5min，分别收集上清，实时定量PCR进行检测。该验证实验中，羧基琼脂糖磁珠用量为50μL，肠癌患者及健康人血清用量均为50μL，处理方法同实施例1中特异性识别肠癌血清蛋白的核酸适配体筛选步骤(1)-步骤(2)。

[0118] 统计出肠癌组与正常组循环数差值 $\Delta C_t$ 值，如图6所示。经计算，得到四条核酸适配体肠癌阳性检出率均在80%以上，如图7所示。

[0119] 实施例5肠癌初筛试剂盒构建初步应用：

[0120] 根据二级结构预测、亲和力实验和特异性验证实验，对比得出Seq-2对于肠癌血清表现出更好的识别，所以用Seq-2核酸适配体加FAM荧光修饰进行肠癌初筛试剂盒构建。30例羧基琼脂糖磁珠-肠癌患者血清复合物、15例羧基琼脂糖磁珠-健康人血清复合物，15例羧基琼脂糖磁珠-超纯水复合物对照分别与500μL 400ng/mL的FAM-Seq-2在37℃下孵育2h，TPBS洗5遍，超纯水洗1遍，200μL超纯水重悬磁珠，515nm处测定荧光值。图8结果显示，肠癌组与健康组和空白组相比，均具有显著差异。说明Seq-2核酸适配体有望用做肠癌检测探针，用于构建肠癌初筛试剂盒。

[0121] 以上所述实施例的各技术特征可以进行任意的组合，为使描述简洁，未对上述实施例中的各个技术特征所有可能的组合都进行描述，然而，只要这些技术特征的组合不存在矛盾，都应当认为是本说明书记载的范围。

[0122] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式，其描述较为具体和详细，但并不能因此而理解为对发明专利范围的限制。应当指出的是，对于本领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明构思的前提下，还可以做出若干变形和改进，这些都属于本发明的保护范围。因此，发明专利的保护范围应以所附权利要求为准。

[0123]

序 列 表

序列表

<110> 燕山大学  
<120> 识别肠癌血清标记物的核酸适配体及其筛选方法和用途  
  
<160> 6

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1  
<211> 88  
<212> DNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1  
ctatagcaat ggtacggtac ttcccttgt cgattcataa tgttcgtgga actcgctctc 60  
gggacaaaag tgcacgctac ttgctaa 88

<210> 2  
<211> 88  
<212> DNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2  
ctatagcaat ggtacggtac ttctaactc gtcctaccg agcctctctc tggctcttgc 60  
aactcaaaag tgcacgctac ttgctaa 88

<210> 3

<211> 88

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 3

ctatagcaat ggtacggtac ttctagttg agcattatac acattgactg ggctgttctt 60

ctgtcaaaag tgcacgctac ttgctaa 88

<210> 4

<211> 88

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 4

[0124]

ctatagcaat ggtacggtac ttctgctgg ttggcatgg cttgcgactg tccctgcgca 60

ttccaaaag tgcacgctac ttgctaa 88

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 5

ctatagcaat ggtacggtac ttcc 24

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0125]

<400> 6

ttagcaaagt agcgtgcact ttg

24

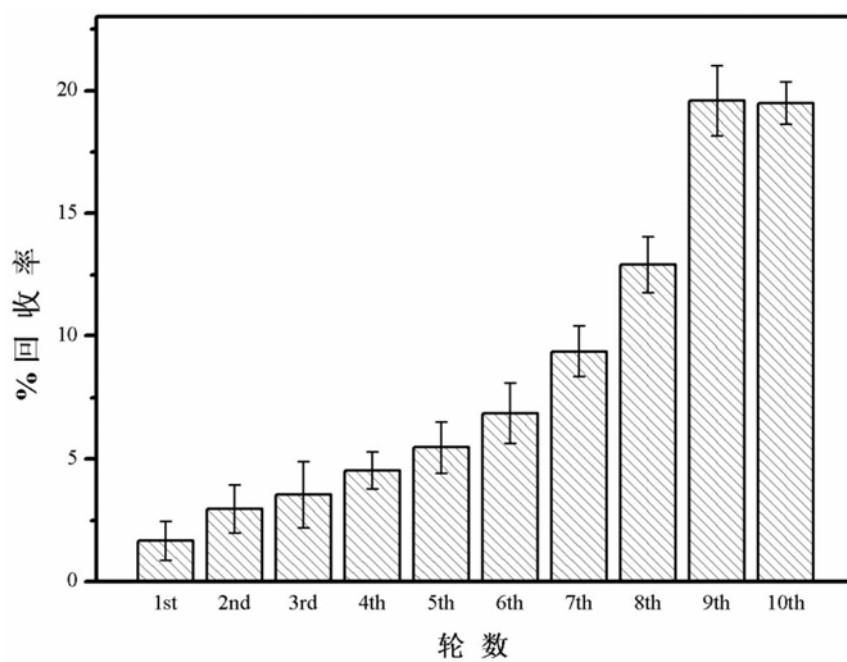


图1

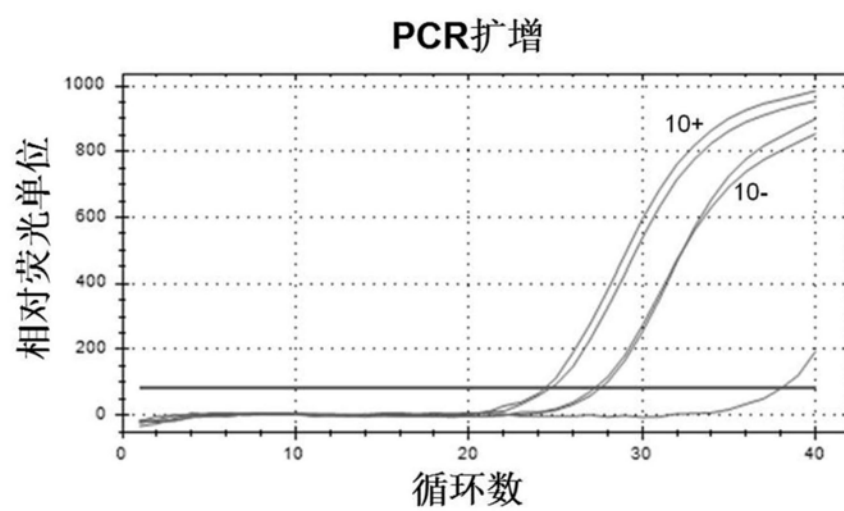


图2

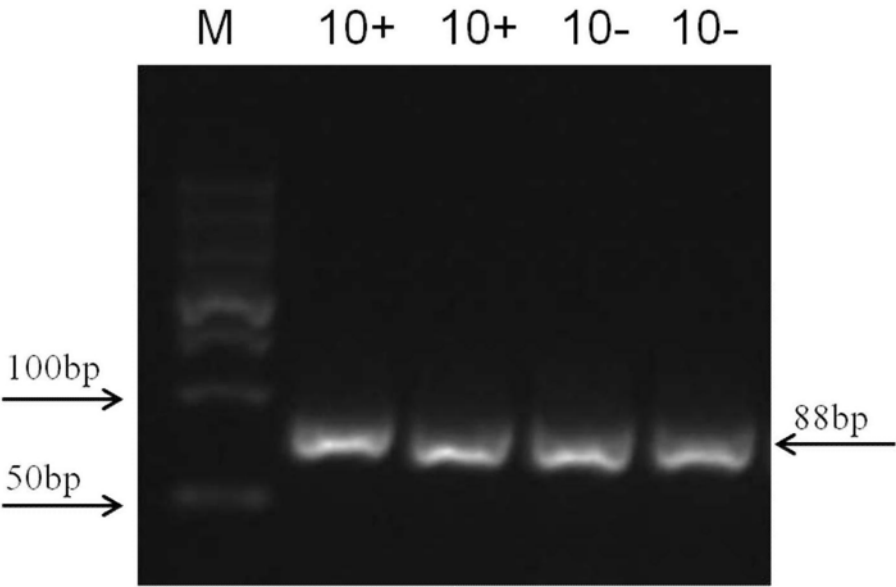


图3

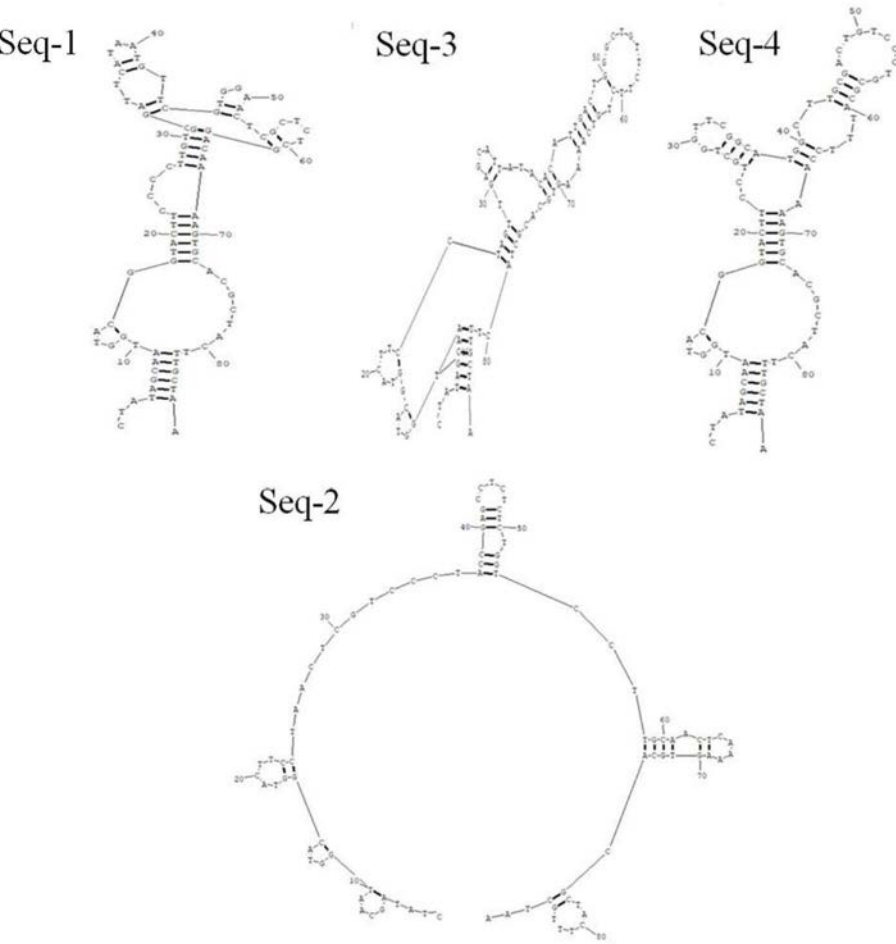


图4

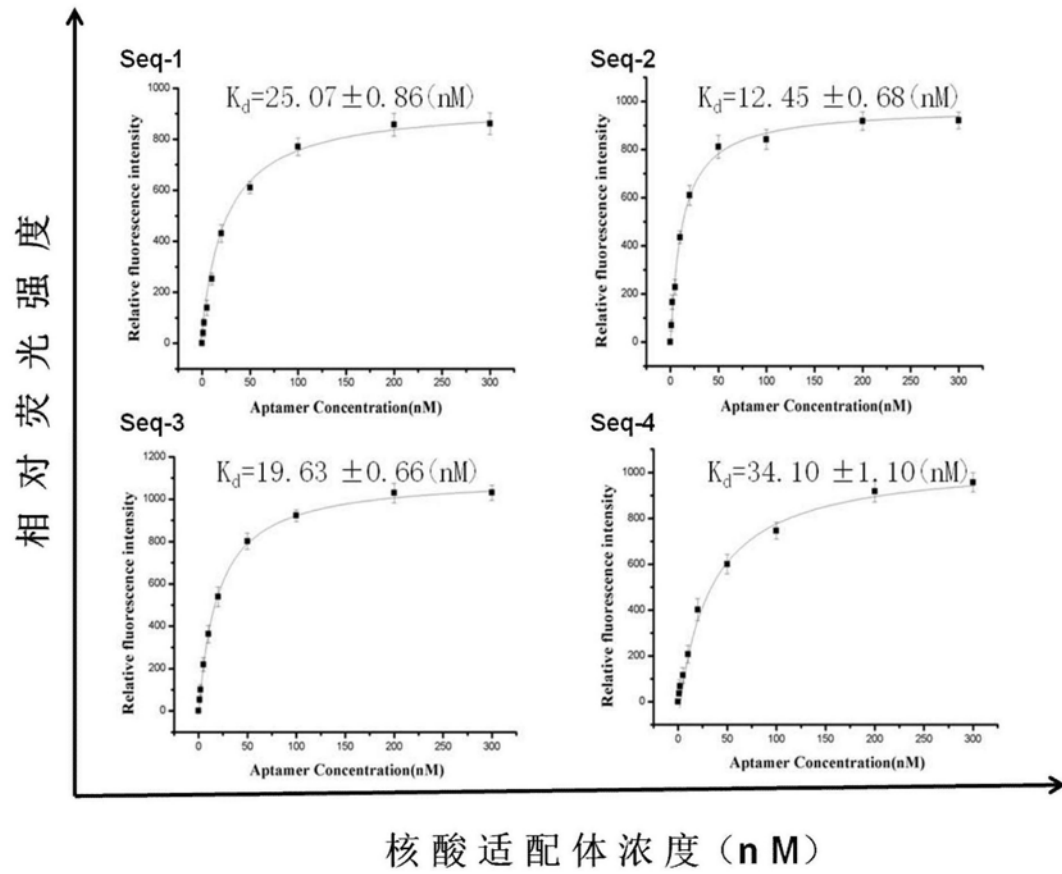


图5

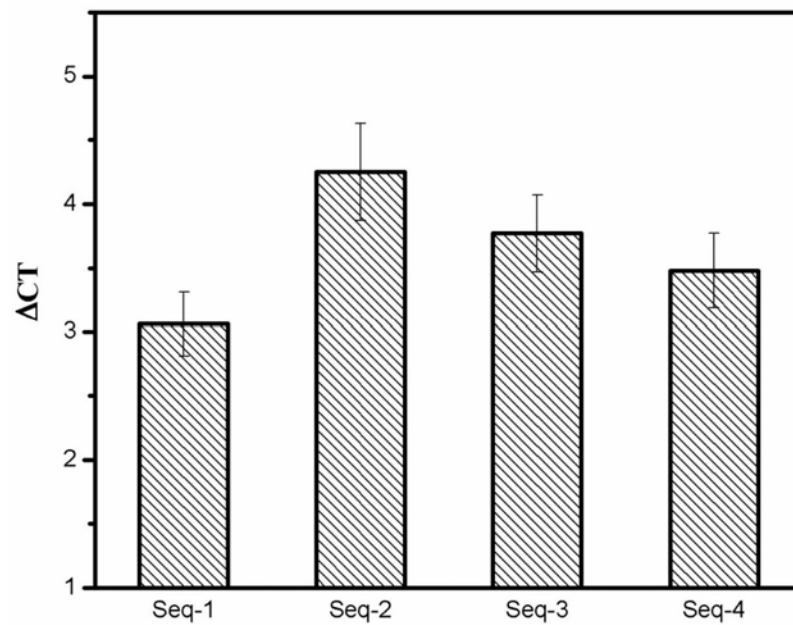


图6



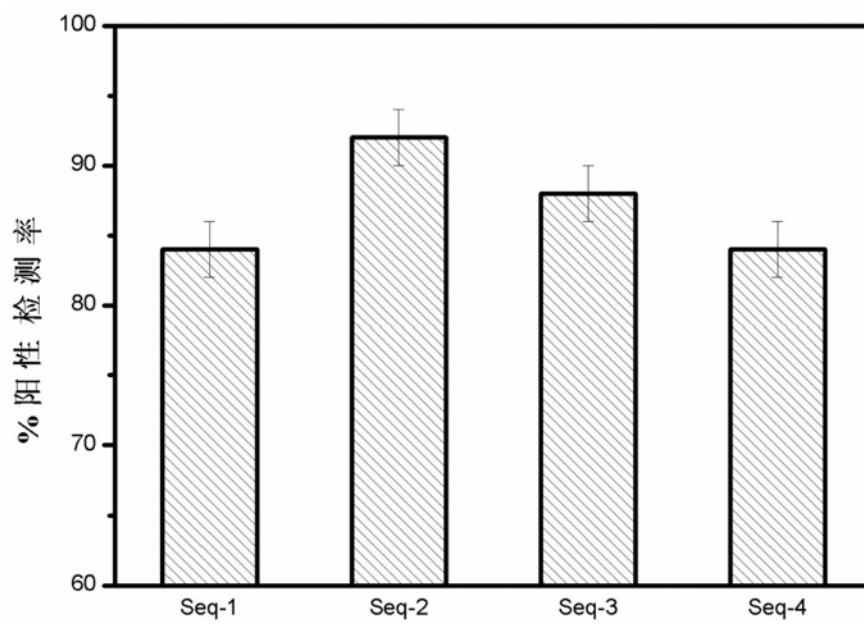


图7

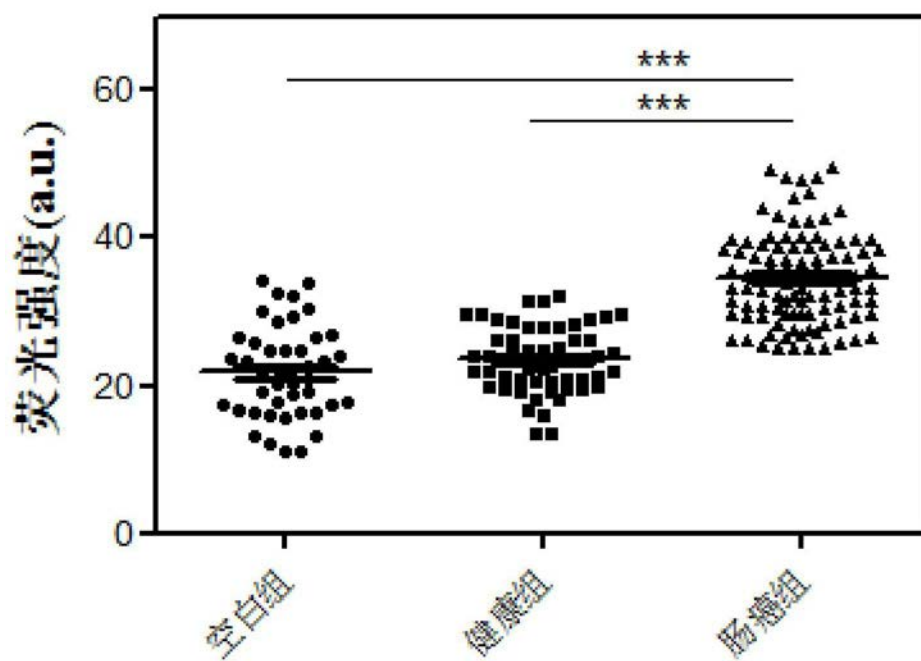


图8

专利名称(译)	识别肠癌血清标记物的核酸适配体及其筛选方法和用途		
公开(公告)号	<a href="#">CN110257382A</a>	公开(公告)日	2019-09-20
申请号	CN201910536200.1	申请日	2019-06-20
[标]申请(专利权)人(译)	燕山大学		
申请(专利权)人(译)	燕山大学		
当前申请(专利权)人(译)	燕山大学		
[标]发明人	栗坤 石明 李健 刘志伟		
发明人	栗坤 齐力轻 石明 李健 刘志伟		
IPC分类号	C12N15/115 C12Q1/6806 C12Q1/6869 G01N33/574 G01N33/53 A61K31/711 A61P35/00		
CPC分类号	A61K31/711 A61P35/00 C12N15/115 C12N2310/16 C12Q1/6806 C12Q1/6869 G01N33/5308 G01N33/57446 C12Q2531/113 C12Q2535/122		
代理人(译)	刘阳		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及一种识别肠癌血清标记物的核酸适配体及其制备方法和应用，具体公开了四条核酸适配体的核苷酸序列及其筛选方法，首先收集首诊的肠癌患者及健康人血清样本，合成引物和初级文库ssDNA，以表面偶联羧基的磁性琼脂糖微球作为血清蛋白吸附载体，利用消减SELEX技术结合实时荧光PCR技术获取逐步富集的与肠癌血清蛋白特异性结合的核酸适配体序列。通过高通量测序、数据分析等方法筛选出四条特异性识别肠癌血清的核酸适配体。经验证本发明的四条核酸适配体对肠癌患者血清均具有亲和力高和特异性强的特点，在研究肠癌肿瘤标记物钓取、肠癌患者初筛和肠癌靶向性药物治疗方面有广阔的应用前景。

适配体名称	适配体序列
Seq-1	5'-CTATAGCAATGGTACGGTACTTCCCCTTGTGATTGTTGCTG GAACTCGCTCTCGGGACAAAAGTGCACGCTACTTTGCTAA-3'
Seq-2	5'-CTATAGCAATGGTACGGTACTTCTAACTCGTCCCTACCGAGCCTCT CTCTGGTCCTTGCAACTCAAAAGTGCACGCTACTTTGCTAA-3'