

学校编码: 10384
学号: 24520131153490

分类号 _____ 密级 _____
UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

**SELEX 技术筛选金黄色葡萄球菌毒性休克
综合征毒素-1 适配体及其功能研究**

Screening and application of aptamers to *Staphylococcus aureus* Toxic Shock Syndrome Toxin-1

陈弘炜

指导教师姓名: 兰小鹏 教授
专 业 名 称: 临床检验诊断学
论文提交日期: 2016 年 5 月
论文答辩时间: 2016 年 5 月
学位授予日期: 2016 年 6 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2016 年 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为()课题(组)的研究成果，获得()课题(组)经费或实验室的资助，在()实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

目的: 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)分泌的毒性休克综合征毒素-1(Toxic Shock Syndrome Toxin-1, TSST-1)引发中毒性休克综合征(Toxic Shock Syndrome, TSS), 通过激活T淋巴细胞使其活化、增殖, 引起强烈的免疫应答。目前针对TSST-1本身的治疗手段不多, 合成寡核苷酸文库和亲和力筛选作为获得高亲和力、高特异性适配体(Aptamer)的一种方便、快捷、有效的方法。本研究利用指数富集的配体系统进化技术(Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment, SELEX)筛选具有高亲和力并特异性识别TSST-1的DNA适配体, 并评估适配体对TSST-1功能的抑制作用, 为探索金黄色葡萄球菌TSST-1诱导TSS新的治疗方法奠定实验基础。

方法: 我们选取 TSST-1 作为靶标, 体外合成中间含有 25 个随机序列全长为 63 个碱基的单链 DNA(ssDNA)文库。利用指数富集的配体系统进化技术, 以羧基磁珠作为固相介质, 从 ssDNA 文库中筛选 TSST-1 适配体, 利用生物信息学方法对适配体进行序列同源性和二级结构预测, 通过凝胶阻滞实验验证适配体结合性质, 运用荧光定量法分析候选适配体的亲和力及特异性, CCK-8 法检测候选适配体对 TSST-1 刺激 PBMCs 增殖抑制反应。

结果: 经过8轮的反复筛选, 监测ssDNA文库的亲和力不断升高, 获得了特异性识别TSST-1的DNA适配体T-7, 其全长为63nt。它可选择性的与TSST-1结合, 而与BSA, 裸磁珠的交叉结合力较弱, 并测定其与TSST-1的解离常数为103.8nM。当适配体为10 μ M时, 可有效抑制TSST-1介导的PBMCs增殖作用 ($P < 0.05$), 其抑制率达63.6%。

结论: 本研究利用bead-SELEX技术筛选出新型适配体T-7, 它能选择性识别TSST-1。在体外实验中, 该适配体能使TSST-1刺激PBMCs的增殖水平明显降低 ($P < 0.05$)。因此, 在金黄色葡萄球菌TSST-1诱导TSS的治疗和诊断方面具有潜在应用前景。

关键词: 适配体; SELEX; TSST-1

Abstract

Objective: Toxic Shock Syndrome Toxin-1(TSST-1) that can lead to toxic shock syndrome(TSS) is a toxin secreted by *Staphylococcus aureus*(*S.aureus*).TSST-1 is a superantigen for T-lymphocytes and activates production of immune signaling molecules. Explorations for new drugs, methods and regimens against TSST-1 have not stop yet and will continue. The synthesis of oligonucleotide library and affinity screening is a convenient, fast and effective method to obtain aptamers with high affinity and high specificity. The aptamers against TSST-1 with high affinity and high specificity were selected from the ssDNA library using systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX).We assess the function of aptamers against TSST-1 as inhibitors, thus lay the experimental foundation of the treatment of *S. aureus* infection and TSST-1-mediated TSS.

Methods: We selected TSST-1 as target, and synthesized *in vitro* a 63 mer single strand DNA (ssDNA) library containing 25 mer random sequences.The aptamers against TSST-1 were selected by SELEX using carboxyl terminated magnetic beads as solid phase medium. The sequence homology analysis and secondary structure prediction of aptamer candidates were analyzed using bioinformatics method. Electrophoretic Mobility Shift Assay was used to verify the binding properties of the aptamer. Fluorescence quantitative assays tested the affinity and specificity of the aptamers.CCK-8 assay was used to evaluate the aptamers' function as inhibitors on TSST-1 induced PBMCs proliferation.

Results: After 8 rounds of repeated screening, the libraries showed a dramatic increase in affinity for TSST-1.Among all aptamer candidates, T-7 could bind to TSST-1 with high specificity.T-7 could selectively bind to TSST-1, with minimal cross-reactivity to BSA or beads.We tested its Kd value was 103.8nM.At the concentration of 10 μ M, T7 could cause 63.6% inhibition of TSST-1 induced PBMCs proliferation.

Conclusion: In this study, a novel aptamer T-7 was selected by bead-SELEX,

which can recognize selectively against TSST-1. The novel aptamer can significantly reduce the level of PBMCs proliferation caused by TSST-1 *in vitro* ($P < 0.05$). Therefore, it has potential applications in the therapy and diagnosis of *S. aureus* infection and TSST-1-mediated TSS.

Key words: Aptamer; SELEX; TSST-1

厦门大学博硕士论文摘要库

英文缩略词表

缩略语	英文名称	中文名称
SELEX	systematic evolution of ligands by exponential enrichment	指数富集配基的系统进化
TSST-1	Toxic Shock Syndrome Toxin-1	毒性休克综合征毒素-1
TSS	Toxic Shock Syndrome	中毒性休克综合征
TEMED	tetramethylethylenediamine	四甲基乙二胺
BSA	bovine serum albumin	牛血清白蛋白
MHC	major histocompatibility complex	主要组织相容性复合体
TCR	T cell receptor	T 细胞抗原受体
dNTP	deoxyribonucleoside triphosphate	脱氧核苷三磷酸
EDC	Ethylidimethy carbodiimide	乙基碳二亚胺盐酸盐
MES	2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid	2-(N-吗啉代)乙磺酸
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
IPTG	Isopropylthio- β -galactoside	异丙基硫代- β -D-半乳糖苷
SPR	Surface Plasmon Resonance	表面等离子体共振
K _d	the dissociation constant	解离常数
nM	nanomole	纳摩尔
LB	Lurib-Bertani medium	LB 培养基
PBMCs	peripheral blood mononuclear cells	人外周血单个核细胞
CCK-8	Cell Counting Kit-8	细胞增殖检测试剂盒
OD	optical density	光密度
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
ssDNA	single strand DNA	单链 DNA
dsDNA	double strand DNA	双链 DNA
EMSA	electrophoretic mobility shift assay	凝胶迁移实验
PHA	phytohaemagglutinin	植物血凝素
PBS	phosphate buffered solution	磷酸盐缓冲液
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane	三羟甲基氨基甲烷
X-gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-D- galactoside	5-溴-4-氯-3-吲哚-1- β - D-半乳糖

目 录

中文摘要.....	I
英文摘要.....	II
英文缩略词表.....	IV
第一章 绪论.....	1
1. 中毒性休克综合征与临床.....	1
2. 毒性休克综合征毒素-1 及其作用机制.....	1
3. 适配体技术的应用与发展.....	2
4. 新型核酸类生物药及其研究进展.....	3
5. 功能化适配体在抗感染方面应用探索.....	7
6. 选题的基本构思及研究内容.....	9
第二章 材料和方法.....	10
1. 实验材料.....	10
2. 实验仪器及设备.....	12
3. 实验方法.....	13
第三章 结果和分析.....	23
1. 监测 TSST-1 特异性适配体筛选进程.....	23
2. PCR 检测筛选进程.....	23
3. 荧光定量仪监测文库的亲合力.....	24
4. 克隆测序及序列分析.....	25
5. 候选适配体的结合性质.....	40
6. 适配体对 TSST-1 的功能研究.....	43

第四章 讨论.....	46
第五章 结论.....	52
参考文献.....	53
致 谢.....	62
附 录.....	63

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	II
Abbreviation	IV
Chapter 1 Introduction	1
1. Toxic Shock Syndrome in clinic.....	1
2. Toxic Shock Syndrome Toxin - 1 and its mechanism of action.....	1
3. The application and development of aptamer.....	2
4. The new type of nucleic acid biological medicine and its research progress....	3
5. The exploration of functional aptamer in anti-infection.....	7
6. The basic idea of the topic and research content.....	9
Chapter 2 Materials and Methods	10
1. The experimental materials.....	10
2. The experimental apparatus and equipment.....	12
3. The experimental methods.....	13
Chapter 3 Results	23
1. Monitoring process of screening TSST-1 specific aptamer.....	23
2. PCR detect process of screening	23
3. The fluorescence quantitative assay for monitoring the affinity of the library	24
4. Cloning sequencing and sequence analysis.....	25

5. Candidate aptamer binding properties.....	40
6. Aptamer function study of TSST-1.....	43
Chapter 4 Discussion.....	46
Chapter 5 Conclusion.....	52
Reference.....	53
Acknowledgement.....	62
Appendix.....	63

厦门大学博硕士学位论文摘要

第一章 绪论

1.中毒性休克综合征与临床

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)可以通过分泌各种外毒素,包括金黄色葡萄球菌毒性休克综合征毒素 1(Toxic Shock Syndrome Toxin-1, TSST-1)、肠毒素(SEs)、溶血素等,导致中毒性休克综合征(Toxic Shock Syndrome, TSS)和自身免疫病等严重疾病。其中 TSST-1 诱导的 TSS 的临床表现:(1)发热:高于 38.9℃。(2)皮疹:弥漫性黄斑、剥脱性皮炎。(3)脱皮:发病后 1-2 周。(4)低血压:成年人收缩压 ≤ 90 mmHg。(5)多系统病变:胃肠道——呕吐或腹泻,肌肉——严重的肌痛,粘膜——阴道、口咽充血,中枢神经系统——迷失方向或改变意识等^[1-4]。

对于其治疗方法包括用于治疗感染的抗生素治疗急性感染、减少复发率,并降低抗原产生。通过支持性疗法,进行大量静脉输液、升压、维持肾功能稳定,使之清除体内细菌并经过肾脏消除超抗原。通过被动免疫和主动免疫进行免疫疗法,静脉注射免疫球蛋白(丙种球蛋白)通常包含所有葡萄球菌和链球菌超抗原的抗体^[5,6],这已经被许多研究者所证实^[7-9]。由 Kaul 等^[7]研究表明了用丙种球蛋白能够显著降低 TSS 导致的病死率。但因为丙种球蛋白的短缺及其费用昂贵,需要开发更多的抗体和基于 T 细胞受体疗法。研究已经开始开发某些超抗原的单克隆抗体^[10,11],但这些研究还在起步阶段。

2.毒性休克综合征毒素-1 及其作用机制

毒性休克综合征毒素-1 是通过 I 群金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* Group I)分泌的外毒素,属于一种多肽蛋白质。TSST-1 是通过 *tstH* 编码而来,翻译为 234 个氨基酸的前体蛋白,然后经过末端 40 个氨基酸组成的信号肽分泌出来。成熟的蛋白质是一个多肽链,分子量很小,为 22 kDa,等电点为 7.2^[12]。TSST-1 含有较高比例的疏水氨基酸,但它是极易溶于水。TSST-1 毒素具有耐热和抗蛋白水解作用。如图 1 是超抗原 TSST-1 的三维结构。TSST-1 由两个相邻结构域组成,结构域 A 含有一个很长的 α 螺旋,结构域 B 是由 5 个 β 折叠结构组成。结构域 A 作为 TSST-1 毒素的活性中心,它对 TSST-1 毒素的作用方式与致病性起决定性作用,该结构域具有多聚酶的活性,通过结合细胞内的靶点发挥细胞毒效应。结构域 B 能特异性与靶细胞,如 T 细胞上的受体结合,通过该结构域决

定毒素对宿主细胞的选择亲合性^[13]。

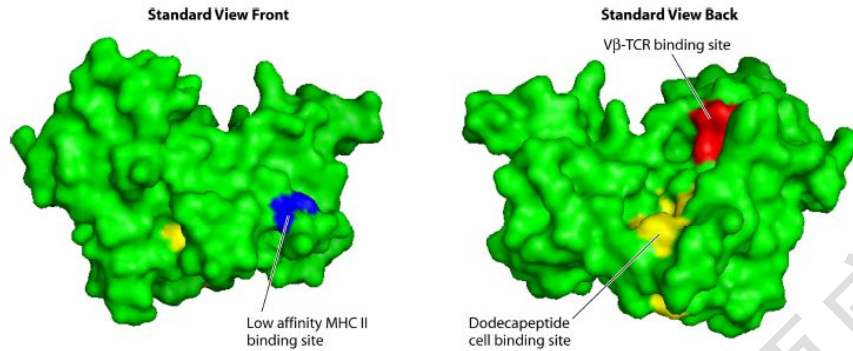


图1 超抗原 TSST-1 的三维结构^[14]

TSST-1 是一种具有超抗原活性的毒素，它主要作用于 T 淋巴细胞^[15]。如图 2 为 TSST-1 的作用机制。TSST-1 可直接结合到 APC 表面的主要组织相容性复合物 II 类分子(MHC II)的抗原结合槽的外侧，形成 TSST-1-MHC II 复合物^[16]，然后通过直接激活 T 淋巴细胞抗原受体(TCR)的特异性β链 V 区^[17,18]，形成的 TSST-1-MHC II-TCR 复合物引起强烈的免疫应答，导致 T 淋巴细胞大量增殖，从而导致 IFN- γ 、TNF- α 、IL-2、IL-6 等细胞因子和炎症介质的大量释放^[19]。

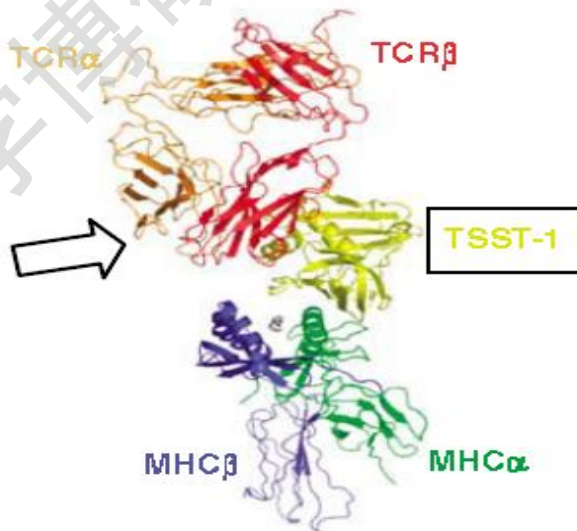


图2 TSST-1 的作用机制^[17]

3.适配体技术的应用与发展

SELEX(Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment)过程^[20]就是通过体外人工合成 10^{14} - 10^{15} 个单链寡核苷酸序列的随机 ssDNA 文库，并结

合利用 PCR 体外扩增技术进行 8-15 个循环反复的筛选并进行 PCR 扩增放大，从而获得指数级富集与靶分子特异性结合的寡核苷酸序列，该序列称之为适配体 (Aptamer)。适配体又被称为“合成抗体”、“化学抗体”，其化学本质是一条单链寡核苷酸分子 (ssDNA 或 RNA)，并通过折叠成灵活多变的三维结构与靶物质高亲和力和高特异性结合。适配体可分为 RNA 适配体^[21]、DNA 适配体^[22]、肽适配体^[23]。通过 counter-SELEX 等策略，适配体不仅能区分核苷酸、氨基酸的突变体、L-镜像体，而且能够精确分辨出靶分子结构上 1 个甲基或 1 个羟基的差别。

DNA/RNA 适配体可用于很多方面，如图 3 所示。除了临床治疗，寡核苷酸适配体有许多其他应用，如急性病毒性和细菌性感染的检测^[24,25]，检测癌症生物标记^[26]，免疫印迹法检测蛋白^[27]，活体显像剂^[28]，色谱法捕获配体^[29]，表面等离子体共振 (SPR)^[30]，微阵列芯片^[31,32]，生物传感器^[33]等。

目前发展新型 SELEX 技术方法种类繁多，对于新靶标的需求研究出多种改善方法，包括 Crossover-SELEX^[34]，SPR-SELEX^[35]，Sol-gel SELEX^[36]，FACS-SELEX^[37]，MAI-SELEX^[38]，RAPID-SELEX^[39]，AEGIS-SELEX^[40]，ES-SELEX^[41]，MARAS^[42]，MSD-SELEX^[43]等。

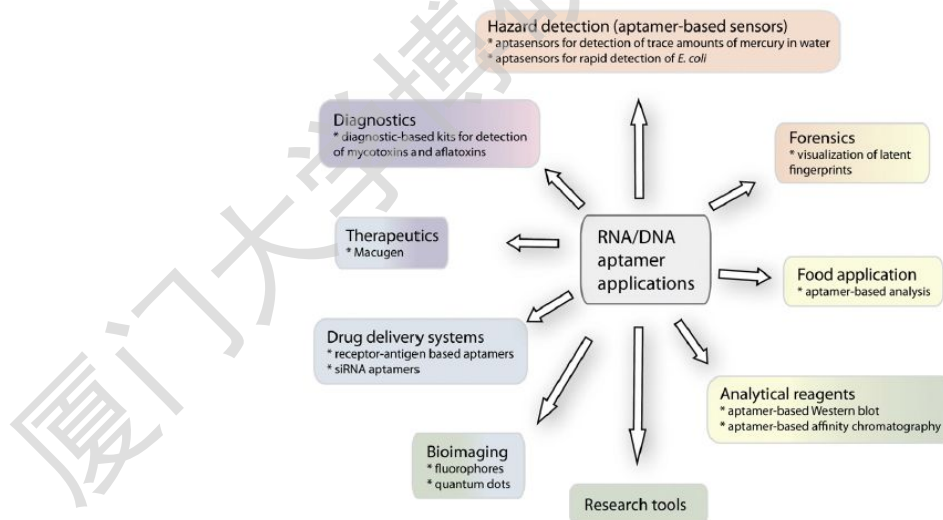


图 3 DNA/RNA 适配体应用^[44]

4. 新型核酸类生物药及其研究进展

抗生素是对微生物感染最常用的方法，因其能非常有效地控制病原体感染。但是，由于过重和频繁使用抗生素容易使微生物产生耐药机制。药物研发者试图

通过微生物适应性改变发现新的抗生素。然而，抗菌药物的来源是有限的，而且发展过程从研发到上市费用很高。抗生素的发现和耐药性的发生速度差距越来越大。适配体药物为新型核酸类生物药，其本质是 RNA 或 DNA 的小分子，核酸适配体在与其对应的靶标特异性结合时，能直接干扰治病过程，因此核酸适配体可直接作为药物来治疗疾病。一旦药物动力学和生物分布性能得到优化，治疗用适配体临床前开发的下一阶段是将药物动力学测定与观察到的用于分析化学物体内外活性的药效动力学测定相关联。表 1 比较新型核酸类生物药与传统抗生素的优劣势。寡核苷酸适配体能在广泛的 pH 值和温度中稳定存在，可以通过修饰调整生物学性质，改善组织渗透，具有低免疫原性。

表 1 新型核酸类生物药与传统抗生素比较

	新型核酸类生物药	抗生素
稳定性	可耐高温、溶剂	易失效
制备方法	简单，人工合成	复杂，分离、纯化
副作用	相对安全	毒副作用多
制备纯度	高	易污染
重复性	好，批间差异小	相对较差
渗透性	分子质量小，易渗透	有的部位难到达
耐药性	小，可反复给药	易耐药
清除率	易清除	半衰期长

由于缺乏免疫原性，寡核苷酸适配体具有优于抗体的属性并作为新兴的候选药物^[45]。直到现在，几十种适配体候选药物正进行临床实验研究，如表 2 所示。第一个通过美国食品和药品监督管理局(FDA)批准上市的核酸适配体药物派加他尼钠(商品名 Macugen)^[46]。Macugen 是抗血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的核酸适配体，可以用于治疗老年性黄斑变性(AMD)。接受多次玻璃体内注射患者对药物有很好的耐受性，结果是 87.5%患者的视力稳定或改善，25%患者阅读眼科测试图的能力达到前三或更大的改善。恒河猴上进行的药物动力学评价表明，每只眼睛的剂量达 2mg 时，Macugen 完全

从眼部消除的半衰期为 94h。此外，Vitravene 是一种 21mer 全硫代磷酸反义脱氧寡核苷酸，它与巨细胞病毒的一个主要的直觉早期区域蛋白的 mRNA 互补，用来治疗巨细胞病毒性视网膜炎，特别是 AIDS 患者。

适配体的给药途径包括：储库给药、局部给药、口服给药、肺部给药、眼部给药等。绝大多数适配体研究依赖简单制剂的非肠道给药。适配体药物具有显著的靶标特异性，多种多样的药物动力学性质，合成的便利和相对较低的生产成本，这使其成为有前景的一类新药。为了进行体内的临床前开发程序的评估，适配体可通过各种化学和成分的修饰，使其保持稳定，免于肾脏过滤，最终进入临床。

适配体作为候选药物具有很多优势：小分子靶点可作为抑制剂；几乎无限的靶标空间，包括孤立受体和基因组靶标；小分子可能展示出新的作用模式；靶向功能结构域，活性位点，特异的构象，变构位点；筛选分析的快速建立；小规模生产时，保证产品批次间的高质量和低试剂成本；可集成在所有常规分析形式中。

表 2 进行临床试验的适配体药物

适配体药物名称	描述
REG1 抗凝系统 (NCT00113997)	用于经皮冠状动脉介入治疗和急性冠脉综合征治疗。REG1 目前进行 II 期临床试验。
NOX-H94(Lexaptid pegol) (NCT02079896)	它结合和中和铁调素，是一种人类肽激素。铁调素是调节铁代谢关键因素，用于治疗慢性贫血。目前进行 I 期临床试验。
ARC1779 抗凝系统 (NCT00632242 NCT00694785)	ARC1779 是聚乙二醇修饰 DNA 适配体，能阻断与血小板 GPIb 受体的相互作用。ARC1779 用于治疗血栓性血小板功能障碍和防止血栓性血小板减少性紫癜 (TTP)。II 期临床试验已经完成。
NU172 抗凝系统 (NCT00808964)	NU172 DNA 适配体筛选用于结合和抑制凝血酶，用于治疗心脏病。目前进行 II 期临床试验。

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.