

丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS2 核酸适配子的功能鉴定

许少英, 刘凯媚, 张婷, 李仲平

(广州血液中心, 广州市医学重点实验室(血液安全重点实验室), 广东 广州 510095)

摘要:目的 对丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS2 核酸适配子功能进行鉴定。方法 应用 ELISA 方法检测适配子与 HCV-NS2 蛋白的亲合力, 检测适配子与 HCV 阳性血清的结合能力和适配子与不同比例稀释的 HCV 阳性血清的结合能力, 并与 HCV 阴性血清比较。结果 筛选得到 4 条适配子序列 A1、A2、A3、A4。4 条适配子与 HCV-NS2 蛋白的亲合力检测吸光度值分别为: A1:0.263、A2:0.515、A3:0.427、A4:0.339, 均高于阴性对照吸光度值 0.001, 差异有统计学意义 ($P \leq 0.001$); 4 条适配子均与 HCV-NS2 蛋白有较高的亲合力, 其中, 适配子 A2 与 HCV-NS2 蛋白的亲合力最高。适配子 A2 与 10 人份不同人来源的 HCV 阳性献血者血清 (P1-P10) 的结合吸光度分别为 0.157、0.145、0.165、0.140、0.241、0.129、0.137、0.222、0.138、0.136, 高于其与阴性血清结合吸光度 0.006, 差异有统计学意义 ($P \leq 0.001$)。HCV-NS2 与 1:0、1:1、1:2 稀释的 HCV 阳性血清结合吸光度分别为 0.223、0.151、0.093, 均高于其与阴性血清结合吸光度 0.005, 差异有统计学意义 ($P \leq 0.001$); HCV-NS2 适配子与不同比例稀释的 HCV 阳性血清的结合呈剂量依赖性。结论 筛选得到的 HCV-NS2 适配子功能鉴定表明其具有较强的应用价值。

关键词:丙型肝炎病毒; NS2 蛋白; 适配子; 功能

中图分类号: R512.63

文献标识码: A

文章编号: 1672-3619(2020)07-0903-04

Functional identification of hepatitis C virus non-structural protein NS2 aptamers

XU Shao-ying, LIU Kai-mei, ZHANG Ting, LI Zhong-ping

(Guangzhou Blood Center, Guangzhou Key Medical Laboratory (Blood Safety Key Laboratory), Guangzhou, Guangdong 510095, China)

Corresponding author: XU Shao-ying, E-mail: 2637214300@qq.com

Abstract: Objective To identify the aptamer of the non-structural protein NS2 of hepatitis C virus. **Methods** ELISA methods was used to detect the affinity between the aptamer and HCV-NS2 protein. The binding capacity of aptamers to HCV positive sera and the binding capacity of aptamers to HCV positive sera diluted in different proportions were detected and compared with HCV negative sera. **Results** Four aptamer sequences A1, A2, A3 and A4 were obtained. The absorbance values of four aptamers with HCV-NS2 protein were A1:0.263, A2:0.515, A3:0.427, and A4:0.339, which were significantly higher than those of negative control ($P \leq 0.001$). All of the four aptamers had high affinity with HCV-NS2 protein; among which, A2 had the highest affinity with HCV-NS2 protein. The binding absorbances of aptamer A2 with sera of 10 HCV positive donors (P1-P10) from different sources were 0.157, 0.145, 0.165, 0.140, 0.241, 0.129, 0.137, 0.222, 0.138 and 0.136, respectively, which were higher than those of negative sera ($P < 0.001$). The binding absorbances of aptamer A2 with 1:0, 1:1 and 1:2 diluted HCV positive sera were 0.223, 0.151 and 0.093, respectively, which were significantly higher than those with negative serum ($P \leq 0.001$), and showing a dose-dependent manner. **Conclusion** According to the results of functional identification, aptamer of HCV-NS2 had application value.

Key words: HCV; NS2 protein; Aptamer; Function

丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 是经输血传播引起的肝炎的重要病原体^[1]。HCV 感染引起的丙型肝炎会导致肝硬化, 严重者发展为肝癌^[2-3]。

HCV 非结构蛋白 NS2 是 HCV 基因组编码的跨膜蛋白, 在病毒复制周期、病毒装配过程、病毒粒子的装配和释放过程中均具有重要作用^[4]。HCV-NS2 蛋白抑制剂可以成功阻断 HCV 复制和装备等过程, 成为抗 HCV 治疗的一种可行的途径^[5]。在此前的研究中, 本课题组通过指数富集的配基系统进化 (systematic evolution of ligands by exponential

基金项目: 广州市医学重点学科建设项目 (血液安全重点实验室)

作者简介: 许少英 (1980-), 女, 本科, 主管护师, 从事输血相关工作, E-mail: 2637214300@qq.com

enrichment, SELEX) 技术筛选出 HCV-NS2 蛋白的 DNA 适配子^[6], 并且对其一级序列和空间结构进行了研究, 在本研究中, 对筛选得到的 HCV-NS2 适配子的功能进行进一步的鉴定和研究。

1 材料与方 法

1.1 材料 寡核苷酸适配子由艾基生物公司合成; ELISA 板购自加拿大 JET BIOFIL 公司; 显色试剂盒购自 Pierce 公司; HCV-NS2 重组纯化蛋白购自上海抚生实业公司; HCV-NS2 兔源多克隆抗体为本实验室自制; HRP-标记羊抗兔 IgG 购自 Promega 公司; 胎牛血清购自 Gibco 公司; PBST 洗涤液本实验室自配。

1.2 HCV-NS2 兔源多克隆抗体制备和鉴定 将 1 mL HCV-NS2 蛋白(含 400 μ g NS2 蛋白)与 1 mL 佛氏完全佐剂混匀, 制备成完全抗原; 注射免疫新西兰大白兔, 每只兔子免疫 4 个部位; 免疫完后 10 d 取血测血清中抗体效价, 共免疫 4~5 次, 每次免疫 20 d, 抗体效价达到 1:20 000 以上后对兔子进行最终放血, 收集的血液置于 37 $^{\circ}$ C 灭活 30 min 后置于 4 $^{\circ}$ C 过夜使其凝集释放血清, 离心收集血清; 通过亲和柱纯化 NS2 蛋白抗体, 使用 ELISA 方法对抗体进行鉴定, 并用紫外分光光度计检测抗体浓度。

1.3 适配子与 HCV-NS2 蛋白的亲合力检测 将 HCV-NS2 蛋白包被 ELISA 板, 100 μ L/孔, 4 $^{\circ}$ C 过夜; PBST 洗涤孔板 3 次, 用 1% 牛血清白蛋白封闭, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h; PBST 洗涤孔板 3 次, 加入生物素标记的 ssDNA 适配子, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h; PBST 洗涤孔板 3 次, 每孔加入链霉亲和素-辣根过氧化物酶, 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h; PBST 洗涤孔板 3 次, 加入 100 μ L 邻

苯二胺避光显色 20 min; 使用 2 mol/L 硫酸终止反应; 使用酶标仪读板, 检测 450 nm 波长的吸光度值。

1.4 HCV-NS2 适配子与 HCV 病人血清的结合能力检测 收集无偿献血者中 HCV 检测阳性的血清, 通过 ELISA 试剂盒再次确定为阳性后用于实验; 将 HCV-NS2 多克隆一抗(1:500, 兔源)包被 ELISA 板, 100 μ L/孔, 4 $^{\circ}$ C 过夜; PBST 洗涤孔板 3 次, 用 2% 牛血清白蛋白封闭, 4 $^{\circ}$ C 过夜; 洗板 3 次, 将 10 个不同来源的 HCV 阳性血清分别加入到已经包被了 NS2 一抗的孔板中, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h; 洗板 3 次, 将适配子 A2 加入到孔板中, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h; 洗板 3 次, 加入链霉亲和素-辣根过氧化物酶, 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h; 加入 100 μ L 邻苯二胺避光显色 20 min; 使用 2 mol/L 硫酸终止反应; 使用酶标仪读板, 检测 450 nm 波长的吸光度值。

1.5 HCV-NS2 适配子与不同比例稀释的 HCV 病人血清的结合能力检测 检测方法同 1.3, HCV 阳性血清按不同比例稀释(0:1、1:1、1:2)。

1.6 统计学分析 采用 SPSS13.0 软件进行统计分析, 采用 one-way ANOVA 单因素方差分析, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 适配子的筛选与合成 在之前的实验中, 本课题组已经通过 SELEX 技术筛选到与 NS2 蛋白特异结合指数富集的适配子 ssDNA 文库, 并通过测序, 获得了 4 条适配子序列的测序结果, 在本次实验中, 通过艾基公司合成这 4 条适配子序列, 命名为 A1、A2、A3、A4。其一级序列见表 1。

表 1 适配子 A1-A4 一级序列
Tab.1 The sequence of adaptors A1-A4

适配子名称	一级序列
A1	GGGAGACAAGAATAAACGCTCAAGTGCCTCCCATGCTGCTGACTTAAATGGGTGGAGGGCAGTTCGACAGGAGGCTCACAAACAGG
A2	GGGAGACAAGAATAAACGCTCAACGTGAAATTGTTGACCACTCATGGAATCTGATCTCGTTTTTCGACAGGAGGCTCACAAACAGG
A3	GGGAGACAAGAATAAACGCTCAAGAAAGGGGATAATCACTTAGGCCTCTCGAATAGTTTATCTTCGACAGGAGGCTCACAAACAGG
A4	GGGAGACAAGAATAAACGCTCAAAGAAAGTTGAGAACTGCTGTTATTTTGTTAACGTACATGTTTCGACAGGAGGCTCACAAACAGG

2.2 适配子与 HCV-NS2 蛋白的亲合力检测 通过 ELISA 方法检测适配子 A1、A2、A3、A4 与 HCV-NS2 蛋白的亲合力, 结果显示, 4 条适配子均与 HCV-NS2 蛋白有较高的亲合力。4 条适配子与 HCV-NS2 蛋白的亲合力检测吸光度值分别为: A1:0.263、A2:0.515、A3:0.427、A4:0.339, 均高于阴性对照吸光度值 0.001, 差异有统计学意义($P \leq 0.001$)。其中, 适配子 A2 与 HCV-NS2 蛋白的亲合力最高, 见图 1。

2.3 适配子 A2 与 HCV 阳性献血者血清的结合能力检测 收集了 10 人份不同来源的 HCV 阳性献血者血清(P1-P10), 通过 ELISA 方法检测适配子 A2 与 HCV 阳性献血者血清的结合能力。结果显示, 适配子 A2 与这 10 份 HCV 阳性血清的结合吸光度分别为 0.157、0.145、0.165、0.140、0.241、0.129、0.137、0.222、0.138、0.136, 高于其与阴性血清结合吸光度 0.006, 差异有统计学意义($P \leq 0.001$), 见图 2。

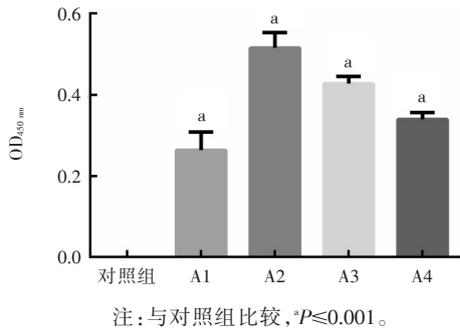


图1 适配子 A1-A4 与 HCV-NS2 蛋白的亲合力检测
 Fig.1 Affinity detection of adapters A1-A4 and HCV-NS2 protein

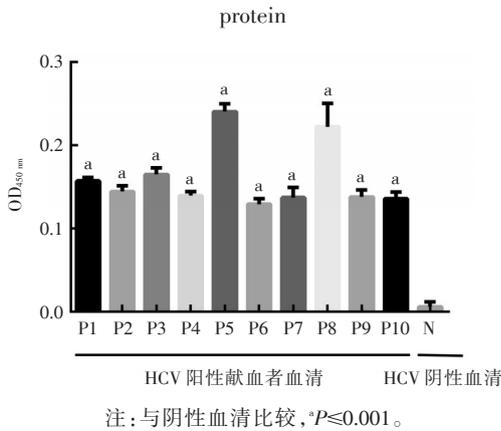


图2 适配子 A2 与 HCV 阳性献血者血清的结合能力检测
 Fig.2 Detection of binding ability of aptamer A2 to serum of HCV positive donors

2.4 HCV-NS2 适配子与不同比例稀释的 HCV 阳性血清的结合能力检测 通过 ELISA 方法检测适配子 A2 与不同程度稀释的 HCV 阳性血清的结合能力,结果显示,相同浓度的适配子与不同比例稀释的 HCV 阳性血清的结合力随稀释比例的增加而递减,呈剂量依赖性。适配子 A2 与 1:0、1:1、1:2 稀释 HCV 阳性血清的结合吸光度分别为 0.223、0.151、0.093,高于其与阴性对照吸光度 0.005,差异有统计学意义 ($P \leq 0.001$),见图 3。

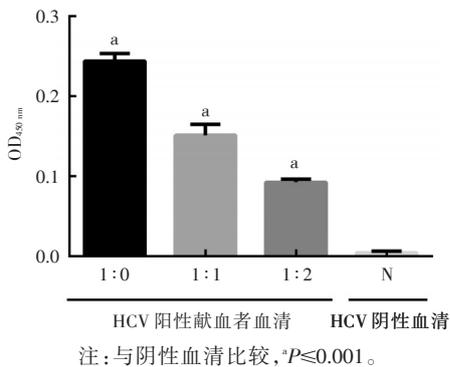


图3 HCV-NS2 适配子与不同比例稀释的 HCV 病人血清的结合能力检测
 Fig.3 Detection of binding ability of HCV-NS2 adapter to serum of patients with different dilutions of HCV

3 讨论

HCV 感染导致的丙型肝炎作为全球慢性肝脏疾病的主要病因,严重威胁着人类健康,已经成为全球性的公共健康问题^[7]。HCV 感染后,由于其症状不典型,容易出现漏诊。丙型肝炎发展为慢性肝病的比率较高^[8]。HCV 检测可以在早期检查出丙型肝炎病毒的感染,同时对指导临床治疗也具有较大的意义。目前血站对于 HCV 的检测主要有 ELISA 方法和核酸检测法^[9]。ELISA 方法检测血清中抗-HCV 抗体,核酸检测法检测丙型肝炎病毒 RNA^[10-11]。前者存在“窗口期”漏检问题^[12],后者存在操作复杂,易出现假阳性等问题^[13]。因此,能够检出“窗口期”感染丙型肝炎病毒感染献血者的 HCV,对于输血安全和丙型肝炎防治均具有重要意义。本研究对此前筛选得到的 HCV-NS2 蛋白 DNA 适配子的功能进行研究,通过亲和力检测发现,筛选得到的 4 条适配子序列均与 HCV-NS2 蛋白具有较高的亲和力,其中 A2 适配子的亲和力最高。这表明适配子与靶蛋白的结合是高亲和力的。寡核苷酸适配子形成的空间结构包括发夹、口袋、凸环等,与靶分子通过氢键、范德华力等形成稳定的复合物^[14],这是寡核苷酸适配子与靶分子高亲和力结合的基础。单适配子间的亲和力有差异,表明筛选到的不同的适配子序列通过不同的空间结构可能与 HCV 的不同位点结合。通过与 HCV 阳性献血者血清的结合能力检测发现,适配子 A2 能够与 HCV 阳性血清特异结合,并且结合能力呈剂量依赖性。结果表明,适配子应用于丙型肝炎病毒的检测是可行的。适配子与抗体是两种不同的物质,但适配子可作为与抗体类似的作用而应用到各类疾病的诊断上^[15]。而且,与抗体相比,适配子与靶分子的结合具有更强的特异性和更高的稳定性。

本研究采用的是单链 DNA 适配子,方便制备而且比较稳定。由于单链 DNA 比双链 DNA 具有更为复杂的空间结构,所以单链寡核苷酸比双链寡核苷酸具有更加广阔的靶标,其应用也更为广泛。

综上所述,本研究筛选得到的 HCV-NS2 适配子功能鉴定表明其具有较强的应用价值。

参考文献

[1] 冯博,陈立,邱艳. 病毒宏基因组学与输血安全[J]. 中国输血杂志,2018,31(3):302-305.
 [2] 郭磊. 肝硬化病因及临床特点分析[J]. 中国继续医学教育,2017,9(17):93-94.
 [3] Dandachi D, Hassan M, Kaseb A, et al. Hepatitis C virus -

- associated hepatocellular carcinoma as a second primary malignancy: exposing an overlooked presentation of liver cancer [J]. *J Hepatocell Carcinoma*, 2018, 5: 81-86.
- [4] Boyer A, Dreneau J, Dumans A, et al. Endoplasmic Reticulum Detergent-Resistant Membranes Accommodate Hepatitis C Virus Proteins for Viral Assembly [J]. *Cells*, 2019, 8(5): pii: 487.
- [5] Hamada Y, Kiso Y. New Directions for Protease Inhibitors Directed Drug Discovery [J]. *Biopolymers*, 2016, 106(4): 563-579.
- [6] 徐国胜, 黄斯瑜, 戎霞, 等. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS2 核酸适配子的筛选 [J]. *热带医学杂志*, 2017, 17(7): 880-883, 962.
- [7] 李红霞, 魏泉德, 周毅. 丙型肝炎病毒感染病毒清除机制研究进展 [J]. *热带医学杂志*, 2017, 17(9): 1275-1278.
- [8] 万千, 赵希畅, 肖绍坦, 等. 浦东新区慢性丙型肝炎患者预后及影响因素 [J]. *热带医学杂志*, 2017, 17(11): 1517-1519, 1531.
- [9] 林诗雅, 王湜, 李仲平, 等. 2015年广州地区无偿献血者核酸和 ELISA 检测结果分析 [J]. *临床输血与检验*, 2017, 19(2): 137-141.
- [10] 彭亚柏, 彭雅兰, 管吉鹏, 等. 两种 HCV RNA 定量检测方法的临床对比研究 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2019, 11(5): 383-386, 400.
- [11] 黄成军, 程书权. 高灵敏度 HCV RNA 检测在慢性丙型肝炎患者中的诊断及治疗检测应用 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2019, 11(5): 379-382.
- [12] 孙波, 刘术臻, 程聪. 临床输血中输血感染控制技术的发展 [J]. *临床输血与检验*, 2015, 17(6): 572-574.
- [13] 李俊英, 王艺芳, 葛文超, 等. 2种核酸筛查系统应用于病毒核酸检测的比较 [J]. *中国输血杂志*, 2015, 28(6): 720-723.
- [14] 梁志满, 彭立, 陈悦, 等. 适配子靶向治疗药物的研究进展 [J]. *医学研究生学报*, 2018, 31(6): 644-648.
- [15] 张攀, 张焜和. 核酸适配子在疾病诊断研究中的应用 [J]. *中南大学学报: 医学版*, 2014, 39(3): 320-324.

收稿日期: 2019-09-19

(上接第 886 页)

- 影响 [J]. *西部中医药*, 2019, 32(1): 19-23.
- [7] Binder S, Luciano M, Horejs-Hoeck J. The cytokine network in acute myeloid leukemia (AML): A focus on pro- and anti-inflammatory mediators [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2018, 43(12): 8-15.
- [8] Huang LW, Olin RL. Inflammatory biomarkers and patient-reported outcomes in acute myeloid leukemia: Refocusing on older adults [J]. *J Geriatr Oncol*, 2019, 1879(19): 30328-30335.
- [9] Mouzakiti A, Nastos C, Vlachodimitropoulos D, et al. Prognostic significance of EGFR and COX-2 expression in colorectal cancer and their association. A study in Greek population [J]. *J BUON*, 2018, 23(1): 23-28.
- [10] Zhang T, Liu H, Li Y, et al. A pH-sensitive nanotherapeutic system based on a marine sulfated polysaccharide for the treatment of metastatic breast cancer through combining chemotherapy and COX-2 inhibition [J]. *Acta Biomater*, 2019, 99: 412-425.
- [11] Sappayatosok K, Maneerat Y, Swasdison S, et al. Expression of pro-inflammatory protein iNOS, VEGF and COX-2 in oral squamous cell carcinoma (OSCC), relationship with angiogenesis and their clinicopathological correlation [J]. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 2009, 14(7): E319-E324.
- [12] Liu Y, Li H, Zhao C, et al. MicroRNA-101 inhibits angiogenesis via COX-2 in endometrial carcinoma [J]. *Mol Cell Biochem*, 2018, 448(1-2): 61-69.
- [13] 肖忠盛, 龙泓, 丁成明, 等. 大肠癌组织中存活素、环氧化酶-2、T 细胞因子 4 的表达及三者相关性 [J]. *东南大学学报: 医学版*, 2019, 12(4): 600-606.
- [14] 罗祖强, 庄志泉, 涂晓萌. 胆囊癌组织中 p57KIP2、cyclin D1 和 cyclin E 的表达及临床意义 [J]. *中国癌症杂志*, 2018, 28(11): 6-11.
- [15] Vasilikos L, Spilgies LM, Knop J, et al. Regulating the balance between necroptosis, apoptosis and inflammation by inhibitors of apoptosis proteins [J]. *Immunol Cell Biol*, 2017, 95(2): 160-165.
- [16] Prokocimer M, Molchadsky A, Rotter V. Dysfunctional diversity of p53 proteins in adult acute myeloid leukemia: projections on diagnostic workup and therapy [J]. *Blood*, 2017, 130(6): 699-712.
- [17] Roy P, George J, Srivastava S, et al. Correction to: Inhibitory effects of tea polyphenols by targeting cyclooxygenase-2 through regulation of nuclear factor kappa B, Akt and p53 in rat mammary tumors [J]. *Invest New Drugs*, 2019, 36(4): 424-434.
- [18] Gharghabi M, Rezaei F, Mir Mohammadrezaei F, et al. Celecoxib Treatment Alters p53 and MDM2 Expression via COX-2 Crosstalk in A549 Cells [J]. *Iran J Pharm Res*, 2018, 15(2): 483-489.
- [19] Nursal AF, Pehlivan M, Sahin HH, et al. The Associations of IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-10, and TGF- β 1 Functional Variants with Acute Myeloid Leukemia in Turkish Patients [J]. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2018, 20(9): 544-551.
- [20] Claxton L, Taylor M, Soonasra A, et al. An Economic Evaluation of Tofacitinib Treatment in Rheumatoid Arthritis After Methotrexate or After 1 or 2 TNF Inhibitors from a U.S. Payer Perspective [J]. *Eur J Med Chem*, 2018, 138(8): 170-181.

收稿日期: 2019-11-04