



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105044322 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 11

(21) 申请号 201510354158. 3

(22) 申请日 2015. 06. 24

(71) 申请人 中国科学院化学研究所

地址 100190 北京市海淀区中关村北一街 2 号

(72) 发明人 上官棣华 邴涛 汪寅生 刘祥军

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅 白艳

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

权利要求书2页 说明书11页  
序列表1页 附图4页

(54) 发明名称

核酸适配体在识别并结合 L 选择素中的应用

(57) 摘要

本发明公开了核酸适配体在识别并结合 L 选择素中的应用。本发明首次发现核酸适配体 Sgc-3b 可以特异性识别并结合 L 选择素, 并利用核酸适配体 Sgc-3b 与 L 选择素的特异性结合作用建立了检测 L 选择素的方法。通过实验证明: 本发明的核酸适配体 Sgc-3b 具有亲和力高、特异性强、无免疫原性和无毒性等特点, 基于核酸适配体 Sgc-3b 建立的检测 L 选择素的方法可用于 L 选择素表达的检测和相关疾病的诊断。

1. 核酸适配体或其衍生物在识别并结合或辅助识别并结合 L 选择素中的应用；  
或核酸适配体或其衍生物在制备识别并结合或辅助识别并结合 L 选择素的产品中的应用；

所述核酸适配体为序列 1 所示的单链 DNA 分子。

2. 核酸适配体或其衍生物在检测或辅助检测待测样品中是否含有 L 选择素中的应用；  
或核酸适配体或其衍生物在制备检测或辅助检测待测样品中是否含有 L 选择素的产品中的应用；

所述核酸适配体为序列 1 所示的单链 DNA 分子。

3. 核酸适配体或其衍生物在检测或辅助检测待测样品中 L 选择素含量中的应用；  
或核酸适配体或其衍生物在制备检测或辅助检测待测样品中 L 选择素含量的产品中的应用；

所述核酸适配体为序列 1 所示的单链 DNA 分子。

4. 核酸适配体或其衍生物在检测与抗 L 选择素的抗体结合的物质中的应用；  
或核酸适配体或其衍生物在制备检测与抗 L 选择素的抗体结合的物质产品中的应用；

所述核酸适配体为序列 1 所示的单链 DNA 分子。

5. 核酸适配体或其衍生物在制备诊断和 / 或治疗炎性疾病或免疫性疾病的产品中的应用；

所述核酸适配体为序列 1 所示的单链 DNA 分子。

6. 根据权利要求 1-5 中任一所述的应用,其特征在於:所述衍生物为如下 (1)-(6) 任一所述的核酸适配体的衍生物:

(1) 将序列 1 所示的核酸适配体删除或增加一个或几个核苷酸,得到与所述核酸适配体具有相同功能的核酸适配体的衍生物;

(2) 将序列 1 所示的核酸适配体进行核苷酸取代或修饰,得到与所述核酸适配体具有相同功能的核酸适配体的衍生物;

(3) 将序列 1 所示的核酸适配体的骨架改造为硫代磷酸脂骨架,得到与所述核酸适配体具有相同功能的核酸适配体的衍生物;

(4) 由序列 1 所示的核酸适配体编码的 RNA 分子,得到与所述核酸适配体具有相同功能的核酸适配体衍生物;

(5) 由序列 1 所示的核酸适配体编码的肽核酸,得到与所述核酸适配体具有相同功能的核酸适配体的衍生物;

(6) 将序列 1 所示的核酸适配体的一端或中间接上信号分子和 / 或活性分子和 / 或功能基团,得到与所述核酸适配体具有相同功能的核酸适配体的衍生物;

所述 (6) 中的功能基团为生物素基团或荧光基团。

7. 根据权利要求 1-6 中任一所述的应用,其特征在於:所述待测样品为细胞;所述细胞具体为大鼠肺泡上皮细胞 RAEC、人胚胎肺纤维细胞 MRC-5、人肺泡上皮细胞 A549、人宫颈癌细胞 HeLa、人肝癌细胞 Huh-7、人膀胱癌细胞 T24、人肝细胞癌细胞 SK-Hep-1、人乳腺癌细胞 MCF-7、人乳腺癌细胞 MCF-7R、人卵巢癌细胞 SKOV-3、人白血病细胞 K562、人乳腺癌细胞 MDA-MB-231、人类上皮癌细胞 A431、人类 T 细胞白血病细胞 Jurkat E6-1、人回盲肠腺癌细

胞 HCT-8、人胚胎肾细胞 HEK-293、人前列腺癌细胞 PC-3、人类 T 细胞淋巴瘤 Hut-78、人结肠癌细胞 LoVo、急性淋巴母细胞白血病细胞 Mol-4、人 T 淋巴瘤细胞 Sup-T1 或人 B 细胞淋巴瘤细胞 Mo2058。

8. 一种产品,其活性成分为序列 1 所示的核酸适配体或其衍生物;所述产品的用途为如下 1)-5) 中的至少一种:

- 1) 识别并结合或辅助识别并结合 L 选择素;
- 2) 检测或辅助检测与抗 L 选择素的抗体结合的物质;
- 3) 检测或辅助检测待测样品中 L 选择素的含量;
- 4) 检测或辅助检测待测样品中是否含有 L 选择素;
- 5) 诊断和 / 或治疗炎性疾病或免疫性疾病。

9. 根据权利要求 8 所述的产品,其特征在于:所述衍生物为如下 (1)-(6) 任一所述的核酸适配体的衍生物:

(1) 将序列 1 所示的核酸适配体删除或增加一个或几个核苷酸,得到与所述核酸适配体具有相同功能的核酸适配体的衍生物;

(2) 将序列 1 所示的核酸适配体进行核苷酸取代或修饰,得到与所述核酸适配体具有相同功能的核酸适配体的衍生物;

(3) 将序列 1 所示的核酸适配体的骨架改造为硫代磷酸脂骨架,得到与所述核酸适配体具有相同功能的核酸适配体的衍生物;

(4) 由序列 1 所示的核酸适配体编码的 RNA 分子,得到与所述核酸适配体具有相同功能的核酸适配体衍生物;

(5) 由序列 1 所示的核酸适配体编码的肽核酸,得到与所述核酸适配体具有相同功能的核酸适配体的衍生物;

(6) 将序列 1 所示的核酸适配体的一端或中间接上信号分子和 / 或活性分子和 / 或功能基团,得到与所述核酸适配体具有相同功能的核酸适配体的衍生物;

所述功能基团为生物素基团或荧光基团。

10. 根据权利要求 8 或 9 所述的产品,其特征在于:所述待测样品为细胞;所述细胞具体为大鼠肺泡上皮细胞 RAEC、人胚胎肺纤维细胞 MRC-5、人肺泡上皮细胞 A549、人宫颈癌细胞 HeLa、人肝癌细胞 Huh-7、人膀胱癌细胞 T24、人肝细胞癌细胞 SK-Hep-1、人乳腺癌细胞 MCF-7、人乳腺癌细胞 MCF-7R、人卵巢癌细胞 SKOV-3、人白血病细胞 K562、人乳腺癌细胞 MDA-MB-231、人类上皮癌细胞 A431、人类 T 细胞白血病细胞 Jurkat E6-1、人回盲肠腺癌细胞 HCT-8、人胚胎肾细胞 HEK-293、人前列腺癌细胞 PC-3、人类 T 细胞淋巴瘤 Hut-78、人结肠癌细胞 LoVo、急性淋巴母细胞白血病细胞 Mol-4、人 T 淋巴瘤细胞 Sup-T1 或人 B 细胞淋巴瘤细胞 Mo2058。

## 核酸适配体在识别并结合 L 选择素中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物技术与临床医学技术领域,具体涉及核酸适配体在识别并结合 L 选择素中的应用。

### 背景技术

[0002] 核酸适配体 (aptamer) 是一类能与靶标物质特异性相互作用的单链 DNA、RNA、肽核酸或化学修饰的核酸序列,通常由 15-80 个核苷酸组成。核酸适配体可以形成特定的三维结构与靶标分子高亲和力结合,如发卡、假结、G- 四链体等结构,高特异性地结合作用是通过范德华力、氢键、静电作用和疏水作用等分子间相互作用实现的。由于核酸适配体具有亲和力高、特异性好、无免疫原性、易合成、改造与修饰、生物化学稳定性好、能可逆变性与复性等特性,所以被称之为“化学抗体”。

[0003] 核酸适配体可被应用在一些疾病的诊断和检测、药物靶点定位、新药研发和运输相关药物分子等领域,目前,用于治疗癌症、艾滋病等疾病的核酸适配体也不断涌现。例如,由 Eyetch/Pfizer 开发的靶向 VEGF 的核酸适配体 (商品名 Macugen) 2004 年已获得 FDA 的批准,成功地用于治疗年龄相关的黄斑变性。近年提出的利用细胞 -SELEX 技术筛选特异性核酸适配体,进而发现肿瘤标志物的方法具有好的应用前景。但目前只有极少数成功的例子,其中的瓶颈问题就在于位于细胞膜上的核酸适配体靶分子的纯化 / 鉴定。

[0004] L 选择素又称 CD62L、白细胞内皮细胞黏附分子 -1 (LECAM-1)、淋巴结归巢受体和 MEL-14。L 选择素胞膜外区 N 端有 1 个 C 型凝集素样结构域、1 个 EGF 样结构域和 2 个 CCP 结构域。L 选择素表达于造血细胞某些分化阶段,包括大多数 B 细胞和未致敏 T 细胞以及大多数单核细胞、中性粒细胞和嗜酸粒细胞。PMA、细胞因子或趋化剂刺激淋巴细胞和中性粒细胞后,由于蛋白酶的酶解作用使 L 选择素迅速消失,而使血浆中有很高水平的可溶型 L 选择素。L 选择素是体内一种重要的免疫调节因子,可参与细胞的伸展与移动、细胞的信号传导与活化,是炎症反应、免疫应答、血栓形成、肿瘤转移、创伤愈合等多种生理、病理过程,通过测定细胞表面 L 选择素的含量及血清、血浆或其他体液中 sL 选择素的浓度可以判断疾病的程度和分析发生机制,对于监测一些炎性或免疫性疾病的发生、发展及治疗效果可能是一个潜在的实用指标。

### 发明内容

[0005] 本发明的一个目的是提供核酸适配体或其衍生物的新用途。

[0006] 本发明提供了核酸适配体或其衍生物在识别并结合或辅助识别并结合 L 选择素中的应用;

[0007] 或核酸适配体或其衍生物在制备识别并结合或辅助识别并结合 L 选择素的产品中的应用;

[0008] 所述核酸适配体为序列 1 所示的单链 DNA 分子。

[0009] 本发明还提供了核酸适配体或其衍生物在检测或辅助检测待测样品中是否含有 L

选择素中的应用；

[0010] 或核酸适配体或其衍生物在检测或辅助检测待测样品中 L 选择素含量中的应用；

[0011] 或核酸适配体或其衍生物在制备检测或辅助检测待测样品中是否含有 L 选择素的产品中的应用；

[0012] 或核酸适配体或其衍生物在制备检测或辅助检测待测样品中 L 选择素含量的产品中的应用；

[0013] 所述核酸适配体为序列 1 所示的单链 DNA 分子。

[0014] 本发明还提供了核酸适配体或其衍生物在检测与抗 L 选择素的抗体结合的物质中的应用；

[0015] 或核酸适配体或其衍生物在制备检测与抗 L 选择素的抗体结合的物质中的应用；

[0016] 所述核酸适配体为序列 1 所示的单链 DNA 分子。

[0017] 本发明还提供了核酸适配体或其衍生物在制备诊断和 / 或治疗炎性疾病或免疫性疾病的产品中的应用；

[0018] 所述核酸适配体为序列 1 所示的单链 DNA 分子。

[0019] 上述应用中,所述衍生物为如下 (1)-(6) 任一所述的核酸适配体的衍生物：

[0020] (1) 将序列 1 所示的核酸适配体删除或增加一个或几个核苷酸,得到与所述核酸适配体具有相同功能的核酸适配体的衍生物；

[0021] (2) 将序列 1 所示的核酸适配体进行核苷酸取代或修饰,得到与所述核酸适配体具有相同功能的核酸适配体的衍生物；

[0022] (3) 将序列 1 所示的核酸适配体的骨架改造为硫代磷酸脂骨架,得到与所述核酸适配体具有相同功能的核酸适配体的衍生物；

[0023] (4) 由序列 1 所示的核酸适配体编码的 RNA 分子,得到与所述核酸适配体具有相同功能的核酸适配体衍生物；

[0024] (5) 由序列 1 所示的核酸适配体编码的肽核酸,得到与所述核酸适配体具有相同功能的核酸适配体的衍生物；

[0025] (6) 将序列 1 所示的核酸适配体的一端或中间接上信号分子和 / 或活性分子和 / 或功能基团,得到与所述核酸适配体具有相同功能的核酸适配体的衍生物；

[0026] 所述 (6) 中的功能基团为生物素基团或荧光基团。

[0027] 上述应用中,所述核酸适配体的衍生物为在上述核酸适配体的 5' 端或 3' 端标记荧光基团或生物素基团。

[0028] 上述应用中,所述核酸适配体的衍生物为在上述核酸适配体的 5' 端标记荧光基团或生物素基团。

[0029] 上述应用中,所述待测样品为细胞；所述细胞具体为大鼠肺泡上皮细胞 RAEC、人胚胎肺纤维细胞 MRC-5、人肺泡上皮细胞 A549、人宫颈癌细胞 HeLa、人肝癌细胞 Huh-7、人膀胱癌细胞 T24、人肝细胞癌细胞 SK-Hep-1、人乳腺癌细胞 MCF-7、人乳腺癌细胞 MCF-7R、人卵巢癌细胞 SKOV-3、人白血病细胞 K562、人乳腺癌细胞 MDA-MB-231、人类上皮癌细胞 A431、人类 T 细胞白血病细胞 Jurkat E6-1、人回盲肠腺癌细胞 HCT-8、人胚胎肾细胞 HEK-293、人前列腺癌细胞 PC-3、人类 T 细胞淋巴瘤 Hut-78、人结肠癌细胞 LoVo、急性淋巴母细胞白血病细

胞 Mo1t-4、人 T 淋巴瘤细胞 Sup-T1 或人 B 细胞淋巴瘤细胞 Mo2058。

[0030] 本发明的另一个目的是提供一种产品。

[0031] 本发明提供的产品的活性成分为序列 1 所示的核酸适配体或其衍生物；所述产品的用途为如下 1)-5) 中的至少一种：

[0032] 1) 识别并结合或辅助识别并结合 L 选择素；

[0033] 2) 检测或辅助检测与抗 L 选择素的抗体结合的物质；

[0034] 3) 检测或辅助检测待测样品中 L 选择素的含量；

[0035] 4) 检测或辅助检测待测样品中是否含有 L 选择素；

[0036] 5) 诊断和 / 或治疗炎性疾病或免疫性疾病。

[0037] 上述产品中,所述衍生物为如下 (1)-(6) 任一所述的核酸适配体的衍生物：

[0038] (1) 将序列 1 所示的核酸适配体删除或增加一个或几个核苷酸,得到与所述核酸适配体具有相同功能的核酸适配体的衍生物；

[0039] (2) 将序列 1 所示的核酸适配体进行核苷酸取代或修饰,得到与所述核酸适配体具有相同功能的核酸适配体的衍生物；

[0040] (3) 将序列 1 所示的核酸适配体的骨架改造为硫代磷酸脂骨架,得到与所述核酸适配体具有相同功能的核酸适配体的衍生物；

[0041] (4) 由序列 1 所示的核酸适配体编码的 RNA 分子,得到与所述核酸适配体具有相同功能的核酸适配体衍生物；

[0042] (5) 由序列 1 所示的核酸适配体编码的肽核酸,得到与所述核酸适配体具有相同功能的核酸适配体的衍生物；

[0043] (6) 将序列 1 所示的核酸适配体的一端或中间接上信号分子和 / 或活性分子和 / 或功能基团,得到与所述核酸适配体具有相同功能的核酸适配体的衍生物；

[0044] 所述功能基团为生物素基团或荧光基团。

[0045] 上述产品中,所述核酸适配体的衍生物为在上述核酸适配体的 5' 端或 3' 端标记荧光基团或生物素基团。

[0046] 上述产品中,所述核酸适配体的衍生物为在上述核酸适配体的 5' 端标记荧光基团或生物素基团。

[0047] 上述产品中,所述待测样品为细胞；所述细胞具体为大鼠肺泡上皮细胞 RAEC、人胚胎肺纤维细胞 MRC-5、人肺泡上皮细胞 A549、人宫颈癌细胞 He1a、人肝癌细胞 Huh-7、人膀胱癌细胞 T24、人肝细胞癌细胞 SK-Hep-1、人乳腺癌细胞 MCF-7、人乳腺癌细胞 MCF-7R、人卵巢癌细胞 SKOV-3、人白血病细胞 K562、人乳腺癌细胞 MDA-MB-231、人类上皮癌细胞 A431、人类 T 细胞白血病细胞 Jurkat E6-1、人回盲肠腺癌细胞 HCT-8、人胚胎肾细胞 HEK-293、人前列腺癌细胞 PC-3、人类 T 细胞淋巴瘤 Hut-78、人结肠癌细胞 LoVo、急性淋巴母细胞白血病细胞 Mo1t-4、人 T 淋巴瘤细胞 Sup-T1 或人 B 细胞淋巴瘤细胞 Mo2058。

[0048] 本发明首次发现核酸适配体 Sgc-3b 可以特异性识别并结合 L 选择素,并利用核酸适配体 Sgc-3b 与 L 选择素的特异性结合作用建立了检测 L 选择素的方法。通过实验证明：本发明的核酸适配体 Sgc-3b 具有亲和力高、特异性强、无免疫原性和无毒性等特点,基于核酸适配体 Sgc-3b 建立的检测 L 选择素的方法可用于 L 选择素表达的检测和相关疾病的诊断。

## 附图说明

[0049] 图 1 为 Sgc-3b-Bio 提取的 L 选择素代表性的多肽的 ESI-MS 和 MS/MS 图谱。图 1A 为重型同位素标记的  $[M+2H]^{2+}$  离子 ESI-MS 谱图；图 1B 为轻型同位素标记的  $[M+2H]^{2+}$  离子 ESI-MS 谱图。图 1C 为重型同位素标记的  $[M+2H]^{2+}$  离子 MS/MS 谱图；图 1D 为轻型同位素标记的  $[M+2H]^{2+}$  离子 MS/MS 谱图。其中，半胱氨酸残基被烷基化；K\* 表示重型同位素标记的赖氨酸。

[0050] 图 2 为 Sgc-3b-FAM 或 anti-CD62L-PE 共染色的 Jurkat E6-1 细胞的流式细胞仪检测结果。其中，L45-FAM 是荧光素标记的随机序列；IgG-PE 是对照抗体。

[0051] 图 3 为不同浓度 Sgc-3b-FAM 与 0.625  $\mu\text{g}/\text{mL}$  anti-CD62L-PE 抗体竞争性结合流式细胞仪测定结果。

[0052] 图 4 为 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  anti-CD62L-PE 抗体与 100nM Sgc-3b-FAM 竞争性结合流式细胞仪测定结果。

[0053] 图 5 为利用 CD62L 抗体或核酸适配体 Sgc-3b 的 siRNA 干扰 CD62L 蛋白表达后的 Jurkat E6-1 细胞的流式细胞仪检测结果。

## 具体实施方式

[0054] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明，均为常规方法。

[0055] 下述实施例中所用的材料、试剂等，如无特殊说明，均可从商业途径得到。

[0056] Jurkat E6-1 细胞来源于 ATCC，产品目录号为 TIB-152™。

[0057] 结合缓冲液 (pH = 7.4) 是由溶剂和溶质组成，溶剂为水，溶质及其在溶剂中的浓度为：137mM NaCl、2.7mM KCl、2mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、10mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、5mM  $\text{MgCl}_2$ 、1mM  $\text{CaCl}_2$ 。

[0058] 细胞裂解液为含有 2% (体积分数) Triton X-100、0.5% (体积分数) SDS、5mM EDTA、0.1mM PMSF 和 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  蛋白酶抑制剂混合物 (pepstatin、leupeptin 和 aprotinin) 的结合缓冲液。

[0059] 实施例 1、核酸适配体 Sgc-3b 特异性识别并结合 L 选择素的鉴定

[0060] 一、核酸适配体 Sgc-3b 及其衍生物的制备

[0061] 1、核酸适配体 Sgc-3b 的合成

[0062] 通过 DNA 合成仪合成核酸适配体 Sgc-3b，核酸适配体 Sgc-3b 的核苷酸序列如下：5'-CTTATTCAATTCCCGTGGGAAGGCTATAGAGGGGCCAGTCTATGAATAAG-3' (序列 1)，根据试验需要可以在核酸适配体 Sgc-3b 上标记不同的分子，得到核酸适配体 Sgc-3b 的衍生物。其中，下述实施例 1 的选择了生物素标记核酸适配体 Sgc-3b；其他实施例中选择了荧光素 (FAM) 标记核酸适配体 Sgc-3b。

[0063] 2、DNA 脱保护：用冷氨水脱保护后，然后把 DNA 溶解在 TEAA 溶液当中；

[0064] 3、DNA 纯化：通过 PAGE 或高效液相色谱仪纯化；

[0065] 4、DNA 干燥：通过离心浓缩干燥；

[0066] 5、溶解测定浓度备用。

[0067] 二、核酸适配体 Sgc-3b 特异性识别并结合 L 选择素的鉴定

[0068] 1、Jurkat E6-1 细胞的同位素标记



## [0084] 5、蛋白的酶解和 LC-MS 鉴定

[0085] (1) DTT 还原 : 分别向生物素标记的核酸适配体 Sgc-3b 提取的重型同位素标记的蛋白和对照核酸序列 L45 提取的轻型同位素标记的混合体系、生物素标记的核酸适配体 Sgc-3b 提取的轻型同位素标记的蛋白和对照核酸序列 L45 提取的重型同位素标记的混合体系中加入 200  $\mu$  L 20mM 二硫苏糖醇 (DTT), 56°C 反应 45min。

[0086] (2) IAA 烷基化 : 将步骤 (1) 的产物离心, 弃上清 (去除 DTT), 向沉淀中分别加入 200  $\mu$  L 55mM 碘乙酰胺 (IAA), 在 37°C 避光反应 30min。

[0087] (3) 将步骤 (2) 的产物离心, 弃上清 (去除 IAA), 向沉淀中加入 5  $\mu$  g 质谱用胰蛋白酶 (Promega 公司, 产品目录号 : V5111), 37°C 酶切过夜, 得到酶切后的多肽。

[0088] (4) 酶切后的多肽经过真空浓缩后, 加入 100ul 水, 利用 Ziptip C<sub>18</sub> 微柱脱盐。质谱分析前, 放置 -20°C 冰箱。

[0089] (5) 利用 LTQ-Orbitrap Velos 质谱仪 (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) 对步骤 (4) 的产物进行分析鉴定, 得到原始的质谱数据。

## [0090] (6) 数据搜索分析

[0091] 利用 MaxQuant 搜索引擎 (版本号 : 1.3.0.5) 将步骤 (5) 获得的原始的质谱数据在 IPI 蛋白数据库 (版本号 : 3.68) 中进行检索。数据库搜索的一些参数如下 : 固定化修饰为半胱氨酸上的烷基化修饰, 可变修饰为甲硫氨酸上的氧化修饰和蛋白质 N 端的乙酰化修饰。允许 2 个漏切位点, 母离子容错量为 20ppm, MS/MS 碎片离子质量误差为 0.5Da。对于鉴定候选的蛋白, 有 2 个或多于 2 个的独特的多肽鉴定出, 且后验标准误差 (PEP) 小于 10<sup>-5</sup>。候选蛋白需在正向实验和反向实验中同时被鉴定出。

[0092] 表 1、利用 SILAC 鉴定出的结合核酸适配体 Sgc-3b 或对照核酸序列 L45 的蛋白质  
[0093]

NCBI 的参考 序列号	基因 名称	蛋白名称	独特 多肽	序列覆盖 率 [%]	PEP[a]	蛋白丰度比值 (Sgc-3b/L45) [b]
核酸适配体 Sgc-3b 特异性结合的蛋白质						
NP_000646	SELL	L 选择素	4	11.7	4.75E-47	13.00±3.61
内源性生物素化蛋白						
NP_000402	HLCS	生物素-蛋白连接酶	6	7.9	1.47E-13	1.13±0.14
NP_000911	PC	丙酮酸羧化酶	42	43.5	0	1.08±0.05
NP_000273	PCCA	丙酰辅酶 A 羧化酶 $\alpha$ 链	32	48.6	0	1.04±0.05
NP_071415	MCCC2	3-甲基巴豆酰辅酶 A 羧化酶 $\beta$ 链	12	28.6	3.30E-84	1.02±0.08
NP_064551	MCCC1	3-甲基巴豆酰辅酶 A 羧化酶 $\alpha$ 链	19	35.2	6.91E-214	0.99±0.06
NP_000523	PCCB	丙酰辅酶 A 羧化酶 $\beta$ 链	19	43.6	0	0.97±0.11
NP_942131	ACACA	乙酰辅酶 A 羧化酶	64	28.2	0	0.93±0.07
非特异性结合蛋白						
NP_001460	XRCC6	X 射线损伤修复交叉互补 6	33	49.3	1.34E-251	1.58±0.76
NP_066964	XRCC5	ATP 依赖的 DNA 解旋酶 2	25	34.7	2.90E-191	1.57±0.81
NP_006089	GNB2L1	鸟苷酸结合蛋白	4	13.2	1.3904E-09	1.42±0.52
NP_031381	HSP90AB1	热休克蛋白 90- $\beta$	5	14.8	4.14E-66	1.15±0.40
NP_003134	SSBP1	单链 DNA 结合蛋白	4	33.1	4.71E-123	1.11±0.92



培养基中,37℃、5%的二氧化碳的条件下细胞培养箱中培养;取指数生长期的人白血病细胞 Jurkat E6-1,直接吹散后用洗涤缓冲液洗涤,平均分为若干份,每份细胞数为 $5 \times 10^4$ 个。

[0111] 二、流式分析法检测核酸适配体 Sgc-3b 与 L 选择素的结合能力

[0112] 1、将上述 Jurkat E6-1 细胞分别进行如下四组进行处理:

[0113] 第一组:在含有 IgG-PE(1.25  $\mu$ g/mL)与 L45-FAM(100nM)的 100  $\mu$ L 结合缓冲液中孵育 Jurkat E6-1 细胞;

[0114] 第二组:在含有 anti-CD62L-PE(1.25  $\mu$ g/mL)与 L45-FAM(100nM)的 100  $\mu$ L 结合缓冲液中孵育 Jurkat E6-1 细胞;

[0115] 第三组:在含有 IgG-PE(1.25  $\mu$ g/mL)与 Sgc-3b-FAM(100nM)的 100  $\mu$ L 结合缓冲液中孵育 Jurkat E6-1 细胞;

[0116] 第四组:在含有 anti-CD62L-PE(1.25  $\mu$ g/mL)与 Sgc-3b-FAM(100nM)的 100  $\mu$ L 结合缓冲液中孵育 Jurkat E6-1 细胞。

[0117] 2、流式细胞仪进行分析

[0118] 用流式细胞仪分别对上述四组处理后的细胞进行分析。上述每组实验设置三个独立重复实验。

[0119] 流式细胞仪的检测结果如图 2 所示:第一组为对照抗体(IgG-PE)和对照核酸序列(L45-FAM)与细胞结合的情况;第二组为在对照核酸序列(L45-FAM)存在的情况下,抗 L 选择素抗体(anti-CD62L-PE)与细胞结合的情况;第三组为在对照抗体(IgG-PE)存在的情况下,核酸适配体 Sgc-3b-FAM 与细胞结合的情况;第四组为抗 L 选择素抗体 anti-CD62L-PE 和核酸适配体 Sgc-3b-FAM 同时存在的情况下与细胞结合的情况。通过上述四组结果说明核酸适配体 Sgc-3b 可以与 L 选择素结合,核酸适配体 Sgc-3b 可以替代抗 L 选择素抗体使用。

[0120] 三、流式分析法检测不同浓度的核酸适配体 Sgc-3b 与抗 L 选择素抗体的竞争

[0121] 1、将上述 Jurkat E6-1 细胞分别进行如下三组进行处理:

[0122] 第一组:在含有 anti-CD62L-PE(1.25  $\mu$ g/mL)与 L45-FAM(100nM)的 100  $\mu$ L 结合缓冲液中孵育 Jurkat E6-1 细胞;

[0123] 第二组:在含有 anti-CD62L-PE(1.25  $\mu$ g/mL)与 Sgc-3b-FAM(100nM)的 100  $\mu$ L 结合缓冲液中孵育 Jurkat E6-1 细胞;

[0124] 第三组:在含有 anti-CD62L-PE(1.25  $\mu$ g/mL)与 Sgc-3b-FAM(1000nM)的 100  $\mu$ L 结合缓冲液中孵育 Jurkat E6-1 细胞。

[0125] 2、流式细胞仪进行分析

[0126] 用流式细胞仪分别对上述三组处理后的细胞进行分析。上述每组实验设置三个独立重复实验。

[0127] 流式细胞仪的检测结果如图 3 所示:第一组为在随机对照核酸序列(L45-FAM)存在时,抗 L 选择素抗体(anti-CD62L-PE)与细胞结合情况;第二组为相同浓度的核酸适配体 Sgc-3b-FAM 存在的条件下,抗 L 选择素抗体(anti-CD62L-PE)与细胞结合情况,其 FL2 荧光强度较第一组明显向左位移;第三组为核酸适配体 Sgc-3b-FAM 的浓度为 1000nM 时,抗 L 选择素抗体(anti-CD62L-PE)已完全不与细胞结合。这说明核酸适配体 Sgc-3b 可以竞争 anti-CD62L-PE 抗体与细胞的结合,而随机对照核酸序列 L-45 无影响。

[0128] 四、流式分析法检测抗 L 选择素抗体与核酸适配体 Sgc-3b 的竞争

[0129] 1、将上述 Jurkat E6-1 细胞分别进行如下两组进行处理：

[0130] 第一组：在含有 Sgc-3b-FAM(100nM) 的 100  $\mu$  L 细胞结合液中孵育 Jurkat E6-1 细胞；

[0131] 第二组：在含有 anti-CD62L-PE(5  $\mu$  g/mL) 与 Sgc-3b-FAM(100nM) 的 100  $\mu$  L 细胞结合液中孵育 Jurkat E6-1 细胞。

[0132] 2、流式细胞仪进行分析

[0133] 用流式细胞仪分别对上述两组处理后的细胞进行分析。上述每组实验设置三个独立重复实验。

[0134] 流式细胞仪的检测结果如图 4 所示：当结合缓冲液中只含有核酸适配体 Sgc-3b-FAM 时，FL1 通道荧光较强；而加入 5  $\mu$  g/mL 的抗 L 选择素抗体时，其 FL1 通道荧光向左位移；这说明抗体 anti-CD62L 可以竞争核酸适配体 Sgc-3b 与细胞的结合。

[0135] 以上实验说明核酸适配体 Sgc-3b 与 L 选择素的结合部位可能与抗体 anti-CD62L-PE 的一致，或者其结合互相干扰，核酸适配体 Sgc-3b 可以替代抗体 anti-CD62L-PE 使用。

[0136] 五、流式分析法检测降低 L 选择素表达后的荧光变化

[0137] 1、利用 siRNA 技术降低 Jurkat E6-1 细胞的 L 选择素 (NP\_000646, 提交日：2015 年 4 月 28 日) 在细胞表面的表达，得到 L 选择素表达降低的 Jurkat E6-1 细胞。

[0138] L 选择素表达降低的 Jurkat E6-1 细胞是用 siRNA 试剂盒制备，具体步骤如下：

[0139] SELL siRNA 用于降低 L 选择素的表达，无靶标的随机 siRNA 序列作为对照，均是美国 GE Dharmacon 公司合成的产品。

[0140] siRNA 电转染的具体步骤如下：选择指数生长期的 Jurkat E6-1 细胞约  $2 \times 10^5$  个细胞，分别加入 80pmol 的 SELL siRNA 和对照 siRNA，利用 Amaxa® Cell Line Nucleofector® Kit V 试剂盒和提供的 X-001 程序 (Amaxa, Lonza) 完成电转染，得到 L 选择素表达降低的 Jurkat E6-1 细胞。

[0141] 将上述处理的细胞在 37°C 含 5% 的二氧化碳细胞培养箱中培养细胞 72 小时后用流式细胞仪检测。

[0142] 2、将上述 L 选择素表达降低的 Jurkat E6-1 细胞 (SiSELL) 和 Jurkat E6-1 细胞 (SiControl, 对照细胞) 分别进行如下六组进行处理：

[0143] 第一组：在含有 anti-CD62L-PE(1.25  $\mu$  g/mL) 的 100  $\mu$  L 结合缓冲液中孵育 L 选择素表达降低的 Jurkat E6-1 细胞；

[0144] 第二组：在含有 anti-CD62L-PE(1.25  $\mu$  g/mL) 的 100  $\mu$  L 结合缓冲液中孵育 Jurkat E6-1 细胞。

[0145] 第三组：在含有 Sgc-3b-FAM(100nM) 的 100  $\mu$  L 结合缓冲液中孵育 L 选择素表达降低的 Jurkat E6-1 细胞；

[0146] 第四组：在含有 Sgc-3b-FAM(100nM) 的 100  $\mu$  L 结合缓冲液中孵育 Jurkat E6-1 细胞；

[0147] 第五组：在含有 Sgc-4e-FAM(100nM) 的 100  $\mu$  L 结合缓冲液中孵育 L 选择素表达降低的 Jurkat E6-1 细胞；

[0148] 第六组：在含有 Sgc-4e-FAM(100nM) 的 100  $\mu$ L 结合缓冲液中孵育 Jurkat E6-1 细胞。

[0149] 3、流式细胞仪进行分析

[0150] 用流式细胞仪分别对上述六组处理后的细胞进行分析。上述每组实验设置三个独立重复实验。

[0151] 结果如图 5 所示：从图中可以看出，含有 anti-CD62L-PE 或 Sgc-3b-FAM 的细胞培养液在 siRNA 处理前的细胞荧光强度均大于处理后的荧光强度，而阳性对照核酸适配体 Sgc-4e-FAM 在 siRNA 处理前后无明显变化。说明 Jurkat 6E-6 细胞经过 siRNA 处理后，其 L 选择素的表达降低，用 Sgc-3b-FAM 测定结果与抗体测定结果一致。

[0152] 实施例 3、核酸适配体 Sgc-3b 在测定不同类型细胞的 L 选择素表达情况中的应用

[0153] 一、荧光素标记的核酸适配体 Sgc-3b 溶液 (Sgc-3b-FAM) 的制备

[0154] 用结合缓冲液溶解 Sgc-3b-FAM，依据紫外吸收标定浓度 (100nM) 后，95  $^{\circ}$ C 加热 5min，冰上放置 5min，室温放置 15min。

[0155] 二、细胞株的预处理

[0156] 分别取如下 16 种生长对数期的细胞株各一皿：生长大鼠肺泡上皮细胞 (RAEC)、人胚胎肺纤维细胞 (MRC-5)、人肺泡上皮细胞 (A549)、人宫颈癌细胞 (HeLa)、人肝癌细胞 (Huh-7)、人膀胱癌细胞 (T24)、人肝细胞癌细胞 (SK-Hep-1)、人乳腺癌细胞 (MCF-7)、耐药人乳腺癌细胞 (MCF-7R)、人卵巢癌细胞 (SKOV-3)、人乳腺癌细胞 (MDA-MB-231)、人类上皮癌细胞 (A431)、人回盲肠腺癌细胞 (HCT-8)、人胚胎肾细胞 (HEK-293)、人前列腺癌细胞 (PC-3) 和人结肠癌细胞 (LoVo)，用 0.2% EDTA 消化成单分散细胞悬液后，用洗涤缓冲液洗涤 2 遍，分为若干份，每份细胞数为  $5 \times 10^4$  个；分别将悬浮生长的人白血病细胞 (Jurkat E6-1)、人白血病细胞 (K562)、人类 T 细胞淋巴瘤 (Hut-78)、急性淋巴母细胞白血病细胞 (Molt-4)、人 T 淋巴瘤细胞 (Sup-T1)、人 B 细胞淋巴瘤细胞 (Mo2058) 直接吹散后用洗涤缓冲液洗涤 2 遍，平均分为若干份，每份细胞数为  $5 \times 10^4$  个。

[0157] 三、将实施例 2 的步骤一制备的荧光素标记的核酸适配体 Sgc-3b (Sgc-3b-FAM)、荧光素标记的对照核酸序列 L-45 (L45-FAM)、对照抗体 (IgG-PE) 和抗 L 选择素抗体 (购自：eBioscience 公司，产品目录号：12-0629) 分别与 22 种不同来源的细胞系混合，分别得到混合液，将混合液在冰上孵育 30min，用洗涤缓冲液洗涤两遍，过 400 目筛网后，上流式细胞仪进行检测。

[0158] 用 BD 公司的 FACSCalibur 流式细胞仪收集第一通道的荧光强度数据，作为细胞表面的荧光强度。每个样品的仪器测得荧光强度扣除细胞自发荧光，得到每个样品结合在细胞表面的核酸适配体的荧光强度。设定一个阈值，使得细胞百分数有大于 95% 的对照核酸序列 L-45 处理的细胞荧光强度值低于该阈值。细胞荧光强度值大于该阈值的视为核酸适配体与细胞能特异性结合。以细胞与核酸适配体结合后荧光强度超过这一阈值的细胞百分数作为衡量核酸适配体与细胞结合能力强弱。其中，无：待测细胞与核酸适配体结合后的荧光强度超过这一阈值的细胞百分数小于 15%；中等：待测细胞与核酸适配体结合后的荧光强度超过这一阈值的细胞百分数为 15-60%；强：待测细胞与核酸适配体结合后的荧光强度超过这一阈值的细胞百分数大于 60%。

[0159] 结果如表 2 所示：核酸适配体 Sgc-3b 测定结果与抗 L 选择素抗体测定结果完全一

致。说明核酸适配体 Sgc-3b 可以替代抗 L 选择素抗体测定 L 选择素。

[0160] 表 2、抗 L 选择素抗体和核酸适配体 Sgc-3b 测定不同类型细胞 L 选择素的表达

[0161]

细胞系	来源	L 选择素测定	
		抗 L 选择素抗体	核酸适配体 Sgc-3b
RAEC	大鼠肺泡上皮细胞	无	无
MRC-5	人胚胎肺纤维细胞	无	无
A549	人肺泡上皮细胞	无	无

[0162]

HeLa	人宫颈癌细胞	无	无
Huh-7	人肝癌细胞	无	无
T24	人膀胱癌细胞	无	无
SK-Hep-1	人肝细胞癌细胞	无	无
MCF-7	人乳腺癌细胞	无	无
MCF-7R	人乳腺癌细胞	无	无
SKOV-3	人卵巢癌细胞	无	无
K562	人白血病细胞	无	无
MDA-MB-231	人乳腺癌细胞	无	无
A431	人类上皮癌细胞	无	无
Jurkat E6-1	人类 T 细胞白血病细胞	强	强
HCT-8	人回盲肠腺癌细胞	无	无
HEK-293	人胚胎肾细胞	无	无
PC-3	人前列腺癌细胞	无	无
Hut-78	人类 T 细胞淋巴瘤	无	无
LoVo	人结肠癌细胞	无	无
Molt-4	急性淋巴细胞白血病细胞	强	强
Sup-T1	人 T 淋巴瘤细胞	弱	弱
Mo2058	人 B 细胞淋巴瘤细胞	中等	中等

[0001]

序列表

<110> 中国科学院化学研究所

<120> 核酸适配体在识别 L 选择素中的应用

<160> 1

<210> 1

<211> 50bp

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 1

cittattcaat tcecgtagga aggctataga ggggccagtc tatgaataag

50

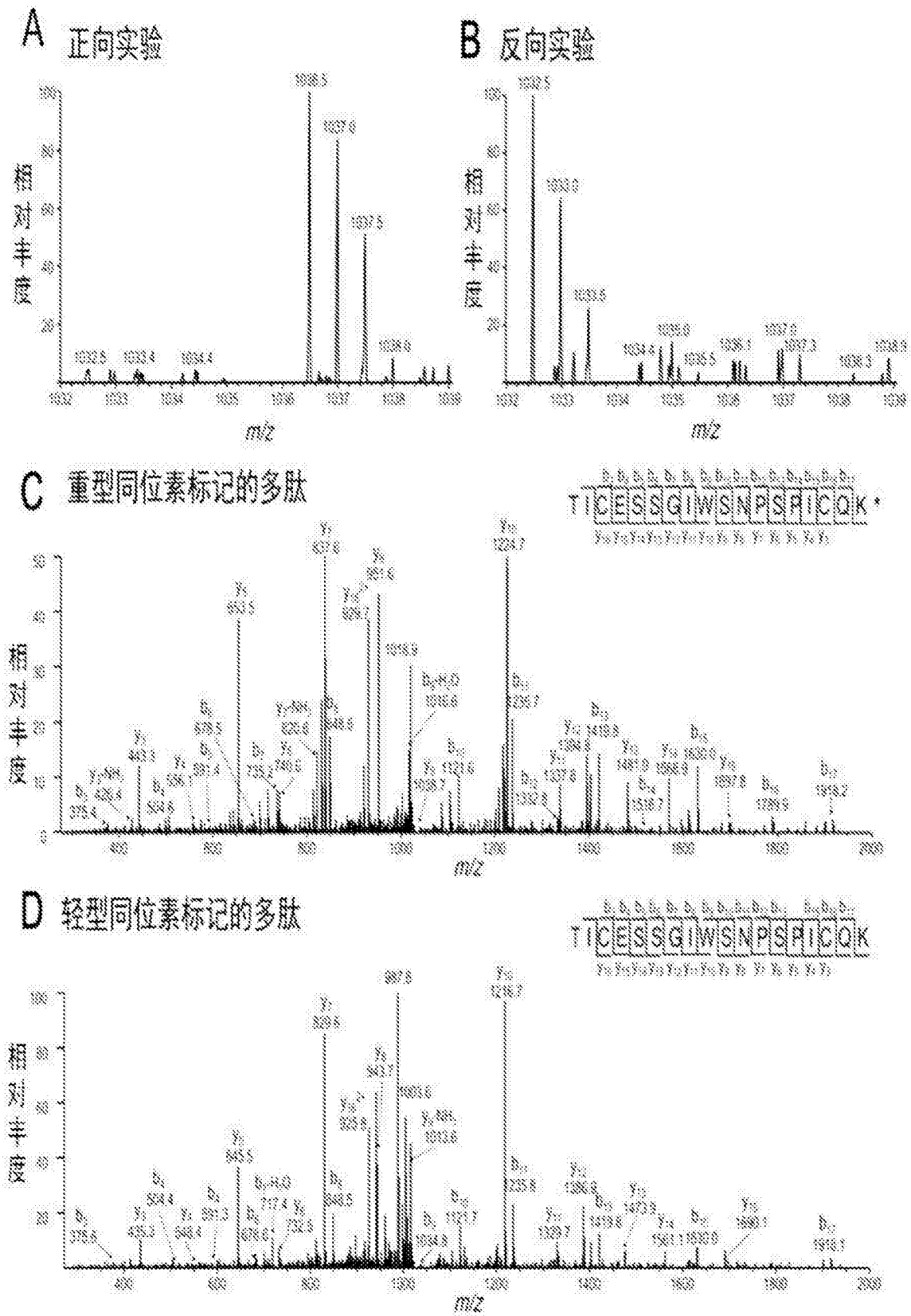


图 1

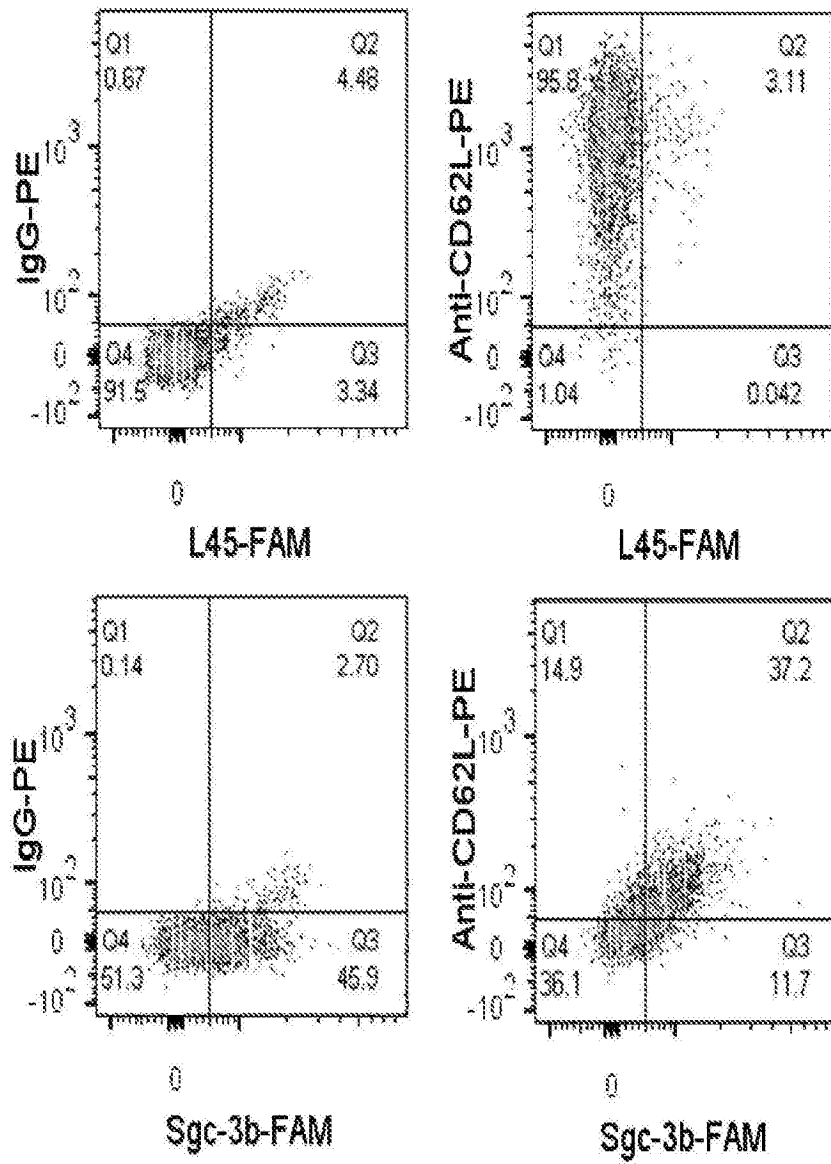


图 2

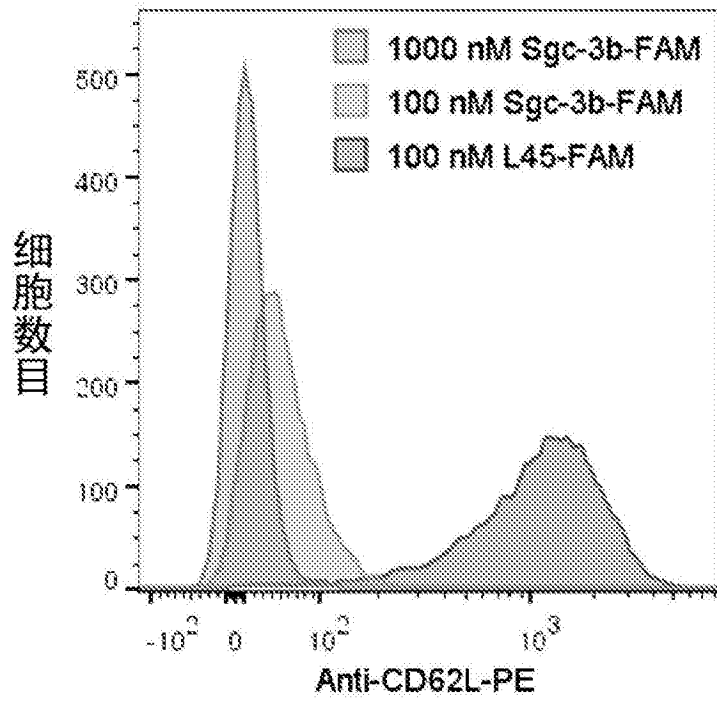


图 3

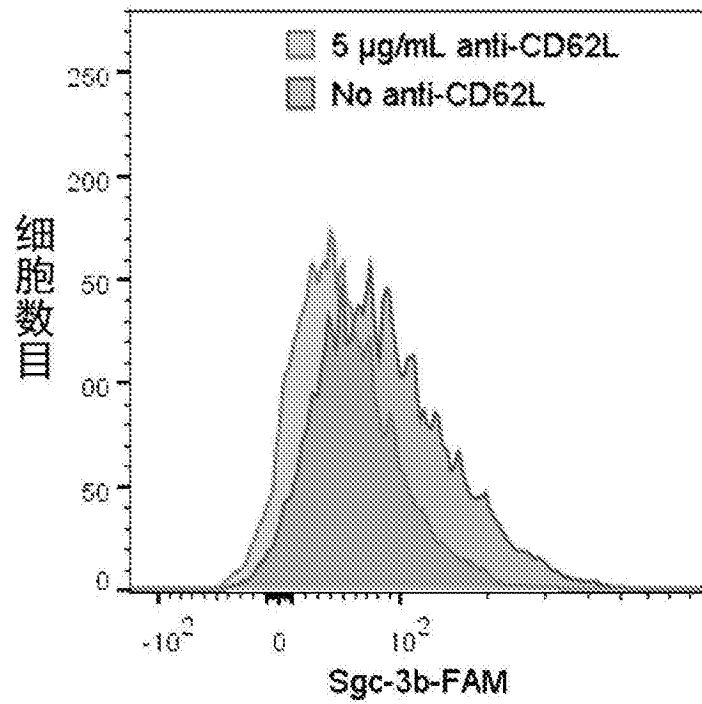


图 4

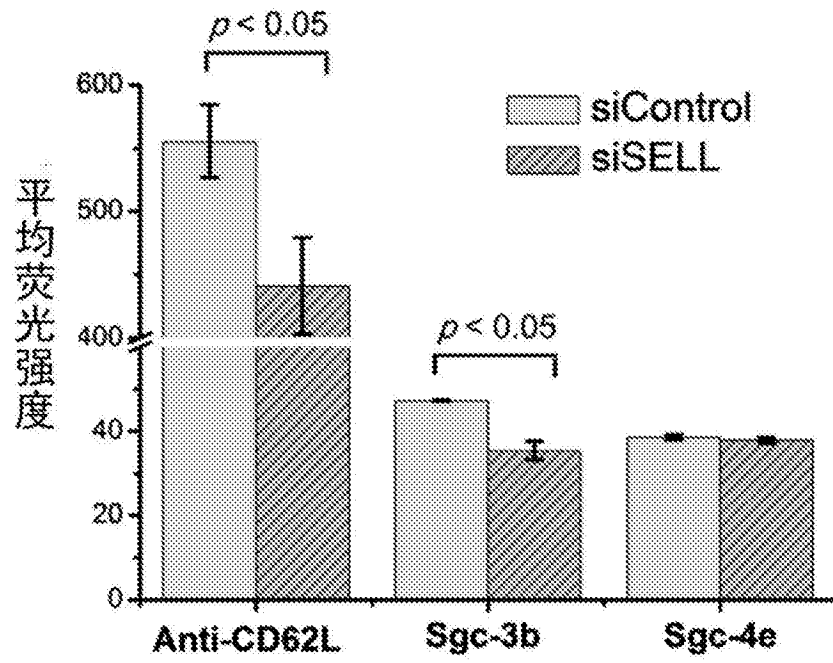


图 5

专利名称(译)	核酸适配体在识别并结合L选择素中的应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN105044322A</a>	公开(公告)日	2015-11-11
申请号	CN201510354158.3	申请日	2015-06-24
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院化学研究所		
申请(专利权)人(译)	中国科学院化学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院化学研究所		
[标]发明人	上官棣华 邴涛 汪寅生 刘祥军		
发明人	上官棣华 邴涛 汪寅生 刘祥军		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/53		
代理人(译)	关畅 白艳		
其他公开文献	CN105044322B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

### 摘要(译)

本发明公开了核酸适配体在识别并结合L选择素中的应用。本发明首次发现核酸适配体Sgc-3b可以特异性识别并结合L选择素，并利用核酸适配体Sgc-3b与L选择素的特异性结合作用建立了检测L选择素的方法。通过实验证明：本发明的核酸适配体Sgc-3b具有亲和力高、特异性强、无免疫原性和无毒性等特点，基于核酸适配体Sgc-3b建立的检测L选择素的方法可用于L选择素表达的检测和相关疾病的诊断。

NCBI的参考序列号	基因名称	蛋白名称	独特多肽	序列覆盖率 [%]	PEP[a]	蛋白丰度比值 (Sgc-3b/L45) [b]
核酸适配体 Sgc-3b 特异性结合的蛋白质						
NP_000646	SELL	L选择素	4	11.7	4.75E-47	13.00±3.61
内源性生物素化蛋白						
NP_000402	HILCS	生物素-蛋白连接酶	6	7.9	1.47E-13	1.13±0.14
NP_000911	PC	丙酮酸羧化酶	42	43.5	0	1.08±0.05
NP_000273	PCCA	丙酮辅酶A羧化酶α链	32	48.6	0	1.04±0.05
NP_071415	MCCC2	3-甲基巴豆酮辅酶A羧化酶β链	12	28.6	3.30E-84	1.02±0.08
NP_064551	MCCC1	3-甲基巴豆酮辅酶A羧化酶α链	19	35.2	6.91E-214	0.99±0.06
NP_000523	PCCB	丙酮辅酶A羧化酶β链	19	43.6	0	0.97±0.11
NP_942131	ACACA	乙酰辅酶A羧化酶	64	28.2	0	0.93±0.07
非特异性结合蛋白						
NP_001460	XRCC6	X射线损伤修复交叉互补6	33	49.3	1.34E-251	1.58±0.76
NP_066964	XRCC5	ATP依赖的DNA解旋酶2	25	34.7	2.90E-191	1.57±0.81
NP_006089	GNB2L1	鸟苷酸结合蛋白	4	13.2	1.3904E-09	1.42±0.52
NP_031381	HSP90AB1	热休克蛋白90-β	5	14.8	4.14E-66	1.15±0.40
NP_003134	SSBP1	单链DNA结合蛋白	4	33.1	4.71E-123	1.11±0.92