



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114058623 B

(45) 授权公告日 2023.12.12

(21) 申请号 202010783340.1

G01N 33/574 (2006.01)

(22) 申请日 2020.08.06

A61K 31/7125 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61P 35/00 (2006.01)

申请公布号 CN 114058623 A

A61P 35/02 (2006.01)

(43) 申请公布日 2022.02.18

(56) 对比文件

(73) 专利权人 中国科学院化学研究所

CN 104988154 A, 2015.10.21

地址 100190 北京市海淀区中关村北一街2号

EP 2069538 A1, 2009.06.17

黄常新, 余海, 杨关根, 王青青, 沈芬平, 李达. 膜表达热休克蛋白70真核表达载体的构建及其对肿瘤细胞的转染. 浙江医学. 2004, (第10期), 全文.

(72) 发明人 上官棣华 邴涛 甄笑笑 吕静

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

审查员 蒙洋

专利代理师 白艳

(51) Int. Cl.

C12N 15/115 (2010.01)

权利要求书1页 说明书14页

G01N 33/569 (2006.01)

序列表1页 附图4页

(54) 发明名称

一种核酸适体识别并结合整合素 $\alpha 3$ 亚基及其相关功能

(57) 摘要

本发明公开了一种核酸适体识别并结合整合素 $\alpha 3$ 亚基及其相关功能。本发明提供了核酸适体, 为序列4所示的单链DNA分子或其衍生物。本发明通过筛选得到的核酸适体具有高亲和力; 无免疫原性; 能够体外化学合成, 分子量小, 可以对不同部位进行修饰和取代, 且序列稳定, 易于保存; 便于标记(不需要标记的二抗)等。采用本发明的核酸适体检测整合素 $\alpha 3 \beta 1$ 蛋白时, 操作更为简单、迅速, 并且本发明核酸适体的合成成本较抗体制备成本低, 周期短, 重现性好。

1. 一种核酸适体,为如下任一种:
 - 1) 序列1所示的单链DNA分子;
 - 2) 序列2所示的单链DNA分子;
 - 3) 序列3所示的单链DNA分子;
 - 4) 序列4所示的单链DNA分子;
 - 5) 序列5所示的单链DNA分子
 - 6) 序列4所示的单链DNA分子,且序列4自5'末端起第1-4位和序列4自3'末端起第1-4位核苷酸均进行硫代修饰;
- 7) 1) -6) 任一所述核酸适体的一端或中间接上信号分子和/或活性分子和/或功能基团和/或放射性核素,得到与所述核酸适体具有相同功能的核酸适体的衍生物;
所述功能基团为荧光基团、生物素基团、放射性物质、治疗性物质、地高辛、纳米发光材料或酶标记。
2. 权利要求1所述的核酸适体在如下B1-B11至少一种中的应用:
 - (B1) 制备识别并结合或辅助识别并结合含有 $\alpha 3$ 亚基的整合素或整合素 $\alpha 3$ 亚基产品;
 - (B2) 制备识别并结合或辅助识别并结合表达含有 $\alpha 3$ 亚基的整合素或整合素 $\alpha 3$ 亚基的细胞产品;
 - (B3) 制备捕获或提取待测样品中的含有 $\alpha 3$ 亚基的整合素或整合素 $\alpha 3$ 亚基产品;
 - (B4) 制备识别或辅助识别含有 $\alpha 3$ 亚基的整合素或整合素 $\alpha 3$ 亚基产品;
 - (B5) 制备结合或辅助结合含有 $\alpha 3$ 亚基的整合素或整合素 $\alpha 3$ 亚基产品;
 - (B6) 制备检测或辅助检测待测样品中是否含有整合素 $\alpha 3$ 亚基的产品;
 - (B7) 制备检测或辅助检测待测样品中含有 $\alpha 3$ 亚基的整合素含量或整合素 $\alpha 3$ 亚基含量的产品;
 - (B8) 制备检测或辅助检测表达含有 $\alpha 3$ 亚基的整合素或整合素 $\alpha 3$ 亚基的待测样品的产品;
 - (B9) 制备识别或辅助识别肿瘤或肿瘤细胞的产品;
 - (B10) 制备结合或辅助结合肿瘤或肿瘤细胞的产品;
 - (B11) 用于制备靶向含有 $\alpha 3$ 亚基的整合素或整合素 $\alpha 3$ 亚基的药物。
3. 根据权利要求2所述的应用,其特征在于:所述含有 $\alpha 3$ 亚基的整合素为整合素 $\alpha 3\beta 1$ 。
4. 根据权利要求2或3所述的应用,其特征在于:
所述待测样品为细胞或其他组织;
或所述肿瘤为人唾液腺腺样囊性癌、人肺腺癌、乳头状复苏形式人甲状腺癌、人前列腺癌、人乳腺癌、人黑色素瘤、人膀胱癌、耐紫杉醇人乳腺癌、急性T细胞白血病、人子宫颈癌或人结直肠癌;
或,所述细胞为人唾液腺腺样囊性癌细胞、人肺腺癌细胞、乳头状复苏形式人甲状腺癌细胞、人前列腺癌细胞、人乳腺癌细胞、人黑色素瘤细胞、人膀胱癌细胞、急性T细胞白血病细胞、人子宫颈癌细胞或人结直肠癌细胞。
5. 根据权利要求2或3所述的应用,其特征在于:所述产品为试剂盒或探针或靶向物质。
6. 一种产品,其包括权利要求1所述的核酸适体。

一种核酸适体识别并结合整合素 $\alpha 3$ 亚基及其相关功能

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药技术领域,具体涉及一种核酸适体识别并结合整合素 $\alpha 3$ 亚基及其相关功能。

背景技术

[0002] 整合素是细胞表面受体的主要家族。对细胞和细胞外基质的粘附起介导作用。其特殊类型在白细胞粘附过程中还可诱导细胞与细胞间的相互作用。整合素为细胞黏附分子家族的重要成员之一,主要介导细胞与细胞、细胞与细胞外基质 (ECM) 之间的相互黏附,并介导细胞与ECM之间的双向信号传导。整合素是由 α (120-185kD) 和 β (90-110kD) 两个亚单位形成的异二聚体。迄今已发现18种 α 亚单位和9种 β 亚单位。它们按不同的组合构成20余种整合素。 α 亚单位的N端有结合二价阳离子的结构域,胞质区近膜处都有一个非常保守的KXGFFKR序列,与整合素活性的调节有关。含 $\beta 1$ 亚单位的整合素主要介导细胞与细胞外基质成分之间的粘附。整合素 $\alpha 3\beta 1$ 是纤维连接素、表皮整联配体蛋白、血小板反应蛋白和CSPG4的受体,它以胶原依赖的方式为FAP (seprase) 在原生质膜上提供了一个对接位点,因此可能参与了原生质的粘附、形成和基质降解过程,促进细胞的侵袭。整合素 $\alpha 3\beta 1$ 还可能与LGALS3介导CSPG4对内皮细胞迁移的刺激。

[0003] 核酸适体 (aptamer) 也叫适体、适配子、核酸适配体,是利用指数富集的配体系统进化技术 (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment, SELEX) 从特定的寡核苷酸库中筛选出的对靶标有特异性相互作用的单链DNA (ssDNA) 或RNA,长度一般为25-60个核苷酸。核酸适体具有高亲和力,通过形成茎环、发夹、G-四聚体等热力学上较稳定的三维结构,借助氢键、疏水键、范德华力、离子键等作用,能够特异性识别靶标分子并与之紧密地结合在一起。核酸适体能与其相应的目标分子 (靶标) 结合,其结合模式与抗体抗原结合方式十分相似,由于核酸适体在亲和力和特异性上都与单克隆抗体相当且可由体外化学合成制备,因此人们将核酸适体称之为可人工合成的“化学抗体 (chemical antibody)”。

[0004] 核酸适体作为一种新型的分子识别探针,其与抗体相比,具有与抗体相似的特性和独特的优势,具体如下:

[0005] (1) 分子量很小,约为6-30KDa,容易进行优化以提高亲和力;

[0006] (2) 水溶性好、无毒性,在体内没有或者具有低的免疫原性,具有快速的组织穿透能力,而且其也容易被细胞内化,可大剂量皮下静脉注射或病灶注射;

[0007] (3) 亲和力比较高,平衡解离常数在 10^{-8} mol/L- 10^{-12} mol/L之间;可进行大量化学合成制备,批间差异小;

[0008] (4) 具有高的热稳定性和化学稳定性,对湿度、酸碱度、离子强度等有很好的耐受程度,可以很方便的进行常温运输,也可以反复的变性复性不易受环境的影响;

[0009] (5) 易于修饰或者偶联功能集团;

[0010] (6) 采用固相合成技术,可以数小时快速方便的合成,并且生产的批间差异小,产

品的均一性高,生产的成本也很低;

[0011] (7)具有广泛的识别靶点,比如可以识别离子、多肽、小分子化合物、蛋白质、核酸、病毒、细菌、细胞和组织等。

[0012] 核酸适体基于自身的性质及优势,在很多方面都得到了应用,包括在亲和分离方面、生物传感方面、分子器件方面、成像方面、诊断方面、靶向运输治疗肿瘤、药物领域及生物标志物的发现等。

发明内容

[0013] 本发明的一个目的是提供一种核酸适体。

[0014] 本发明提供的核酸适体,为如下A1) -A7)中任一种:

[0015] A1) 序列4所示的单链DNA分子;

[0016] A2) 将A1)所示的核酸适体删除或增加一个或几个核苷酸,得到与所述核酸适体具有相同功能的核酸适体的衍生物;

[0017] A3) 将A1)或A2)所示的核酸适体进行核苷酸取代或修饰,得到与所述核酸适体具有相同功能的核酸适体的衍生物;

[0018] A4) 将A1)或A2)所示的核酸适体的骨架改造为硫代磷酸脂骨架,得到与所述核酸适体具有相同功能的核酸适体的衍生物;

[0019] A5) 由A1)或A2)所示的核酸适体编码的RNA分子,得到与所述核酸适体具有相同功能的核酸适体衍生物;

[0020] A6) 由A1)或A2)所示的核酸适体编码的肽核酸,得到与所述核酸适体具有相同功能的核酸适体的衍生物;

[0021] A7) 将A1) -A6)任一所示的核酸适体的一端或中间接上信号分子和/或活性分子和/或功能基团和/放射性核素,得到与所述核酸适体具有相同功能的核酸适体的衍生物。

[0022] 上述核酸适体中,A3)中的所述修饰为磷酸化、甲基化、氨基化、巯基化或同位素化。

[0023] 上述核酸适体中,A7)中的所述功能基团为荧光基团、生物素基团、放射性物质、治疗性物质、地高辛、纳米发光材料或酶标记。

[0024] 上述A2)所示的核酸适体为如下1) -4)中任一种:

[0025] 1) 序列1所示的单链DNA分子;

[0026] 2) 序列2所示的单链DNA分子;

[0027] 3) 序列3所示的单链DNA分子;

[0028] 4) 序列5所示的单链DNA分子;

[0029] 5) 序列4所示的单链DNA分子,且序列4自5'末端起第1-4位和序列4自3'末端起第1-4位核苷酸均进行硫代修饰。

[0030] 上述核酸适体在如下B1 -B21至少一种中的应用也是本发明保护的范围:

[0031] (B1) 识别并结合或辅助识别并结合含有 $\alpha 3$ 亚基的整合素或整合素 $\alpha 3$ 亚基;

[0032] (B2) 识别并结合或辅助识别并结合表达含有 $\alpha 3$ 亚基的整合素或整合素 $\alpha 3$ 亚基的细胞;

[0033] (B3) 制备识别并结合或辅助识别并结合含有 $\alpha 3$ 亚基的整合素或整合素 $\alpha 3$ 亚基产

品;

[0034] (B4) 制备识别并结合或辅助识别并结合表达含有 $\alpha 3$ 亚基的整合素或整合素 $\alpha 3$ 亚基的细胞产品;

[0035] (B5) 识别或辅助识别含有 $\alpha 3$ 亚基的整合素或整合素 $\alpha 3$ 亚基;

[0036] (B6) 结合或辅助结合含有 $\alpha 3$ 亚基的整合素或整合素 $\alpha 3$ 亚基;

[0037] (B7) 捕获或提取待测样品中的含有 $\alpha 3$ 亚基的整合素或整合素 $\alpha 3$ 亚基;

[0038] (B8) 制备捕获或提取待测样品中的含有 $\alpha 3$ 亚基的整合素或整合素 $\alpha 3$ 亚基产品;

[0039] (B9) 制备识别或辅助识别含有 $\alpha 3$ 亚基的整合素或整合素 $\alpha 3$ 亚基产品;

[0040] (B10) 制备结合或辅助结合含有 $\alpha 3$ 亚基的整合素或整合素 $\alpha 3$ 亚基产品;

[0041] (B11) 检测或辅助检测待测样品中是否含有整合素 $\alpha 3$ 亚基;

[0042] (B12) 制备检测或辅助检测待测样品中是否含有整合素 $\alpha 3$ 亚基的产品;

[0043] (B13) 检测或辅助检测待测样品中含有 $\alpha 3$ 亚基的整合素含量或整合素 $\alpha 3$ 亚基含量;

[0044] (B14) 制备检测或辅助检测待测样品中含有 $\alpha 3$ 亚基的整合素含量或整合素 $\alpha 3$ 亚基含量的产品;

[0045] (B15) 检测或辅助检测表达含有 $\alpha 3$ 亚基的整合素或整合素 $\alpha 3$ 亚基的待测样品;

[0046] (B16) 制备检测或辅助检测表达含有 $\alpha 3$ 亚基的整合素或整合素 $\alpha 3$ 亚基的待测样品的产品;

[0047] (B17) 识别或辅助识别肿瘤或肿瘤细胞;

[0048] (B18) 结合或辅助结合肿瘤或肿瘤细胞;

[0049] (B19) 制备识别或辅助识别肿瘤或肿瘤细胞的产品;

[0050] (B20) 制备结合或辅助结合肿瘤或肿瘤细胞的产品;

[0051] (B21) 用于制备靶向含有 $\alpha 3$ 亚基的整合素或整合素 $\alpha 3$ 亚基的药物。

[0052] 上述应用中,所述含有 $\alpha 3$ 亚基的整合素为由 $\alpha 3$ 亚基和其他亚基组成的异二聚体;在本发明的实施例中,含有 $\alpha 3$ 亚基的整合素具体为整合素 $\alpha 3\beta 1$ 。

[0053] 上述应用中,所述待测样品为细胞或其他组织,如肿瘤、外泌体、细胞外囊泡、细胞碎片或循环肿瘤相关物质;所述细胞具体可以为肿瘤细胞;

[0054] 或所述肿瘤为人唾液腺腺样囊性癌、人肺腺癌、乳头状复苏形式人甲状腺癌、人前列腺癌、人乳腺癌、人黑色素瘤、人膀胱癌、耐紫杉醇人乳腺癌、急性T细胞白血病、人子宫颈癌或人结直肠癌。

[0055] 上述应用中,所述细胞为人唾液腺腺样囊性癌细胞(如SACC-LM、SACC-83细胞)、人肺腺癌细胞(A549细胞)、乳头状复苏形式人甲状腺癌细胞(BCPAP细胞)、人前列腺癌细胞(如DU145、PC-3细胞)、人乳腺癌细胞(MCF-7细胞、MCF-7R)、人黑色素瘤细胞(A375细胞)、人膀胱癌细胞(T24细胞)、急性T细胞白血病细胞(Jurkat)、人子宫颈癌细胞(HeLa细胞)或人结直肠癌细胞(Colo205、LoVo)。

[0056] 上述应用中,所述产品为试剂盒或探针或靶向物质。

[0057] 本发明另一个目的是提供一种产品。

[0058] 本发明提供的产品,其包括上述的核酸适体。

[0059] 上述产品具有如下C1) -C11)中至少一种:

- [0060] (C1) 识别或辅助识别含有 $\alpha 3$ 亚基的整合素或整合素 $\alpha 3$ 亚基;
- [0061] (C2) 识别并结合或辅助识别并结合表达含有 $\alpha 3$ 亚基的整合素或整合素 $\alpha 3$ 亚基的细胞;
- [0062] (C3) 识别或辅助识别含有 $\alpha 3$ 亚基的整合素或整合素 $\alpha 3$ 亚基;
- [0063] (C4) 结合或辅助结合含有 $\alpha 3$ 亚基的整合素或整合素 $\alpha 3$ 亚基;
- [0064] (C5) 捕获或提取待测样品中的含有 $\alpha 3$ 亚基的整合素或整合素 $\alpha 3$ 亚基;
- [0065] (C6) 检测或辅助检测待测样品中是否含有整合素 $\alpha 3$ 亚基;
- [0066] (C7) 检测或辅助检测待测样品中含有 $\alpha 3$ 亚基的整合素含量或整合素 $\alpha 3$ 亚基含量;
- [0067] (C8) 检测或辅助检测表达含有 $\alpha 3$ 亚基的整合素或整合素 $\alpha 3$ 亚基的待测样品;
- [0068] (C9) 识别或辅助识别肿瘤或肿瘤细胞;
- [0069] (C10) 结合或辅助结合肿瘤或肿瘤细胞;
- [0070] (C11) 用于制备靶向含有 $\alpha 3$ 亚基的整合素或整合素 $\alpha 3$ 亚基的药物。
- [0071] 上述产品中,所述待测样品为细胞或其他组织,如肿瘤、外泌体、细胞外囊泡、细胞碎片或循环肿瘤相关物质;所述细胞具体可以为肿瘤细胞;
- [0072] 与现有技术相比,本发明的优点在于:本发明通过筛选得到的核酸适体具有高亲和力,无免疫原性,能够体外化学合成,分子量小,可以对不同部位进行修饰和取代,且序列稳定,易于保存,便于标记(不需要标记的二抗)等。采用本发明的核酸适体检测整合素 $\alpha 3\beta 1$ 蛋白时,操作更为简单、迅速,并且本发明核酸适体的合成成本较抗体制备成本低,周期短,重现性好。
- [0073] 通过以下的详细说明和所附权利要求书将更明确本发明的其它特征和实施方式。

附图说明

- [0074] 图1为随筛选轮数增加核酸适体的富集过程;其中,图1A峰形曲线表示SACC-LM细胞的细胞荧光分布情况;SACC-LM细胞分别与荧光素(FAM)标记的核酸文库,起始文库、第4轮、第6轮、第7轮、第8轮、第9轮和第10轮的结合情况;图1B-1C为核酸适体1分别于SACC-LM细胞、PC-3细胞和HEK293细胞的结合情况。
- [0075] 图2为核酸适体4衍生物与核酸适体4的竞争结果图。
- [0076] 图3为核酸适体4对干扰整合素 $\alpha 3$ 分子表达的PC-3细胞染色的流式细胞实验结果。
- [0077] 图4为核酸适体4与整合素 $\alpha 3$ 亚基的证实。
- [0078] 图5为核酸适体4用于流式细胞仪测定细胞中整合素 $\alpha 3$ 亚基的结合。
- [0079] 图6为PC-3细胞与核酸适体4的共聚焦结合荧光情况。
- [0080] 图7为核酸适体4用于整合素 $\alpha 3$ 蛋白阳性表达细胞的捕获及释放结果图。

具体实施方式

- [0081] 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。
- [0082] 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。
- [0083] 下述实施例中的核酸序列均由上海生工生物工程股份公司合成。
- [0084] 下述实施例中的整合素 $\alpha 3$ 抗体(anti-ITG $\alpha 3$)是赛默飞世尔公司的产品,产品目录号分别为MA5-28565。

[0085] 下述实施例中的整合素 $\beta 1$ 抗体(anti-ITG $\beta 1$)是Biolegend公司的产品,产品目录号分别为303002。

[0086] 下述实施例中的抗体同型对照(normal mouse IgG₁)是Santa Cruz公司的产品,产品目录号为sc-3877。

[0087] 下述实施例中的PE修饰的二抗(m-IgGk BP-PE)是Santa Cruz公司的产品,产品目录号为sc-516141。

[0088] 下述实施例中的siRNA是苏州吉玛基因股份有限公司的产品。

[0089] 下述实施例中的结合缓冲液(pH=7.4):含137mM NaCl、5mM MgCl₂、2.7mM KCl、2mM KH₂PO₄、10mM Na₂HPO₄、25mM葡萄糖,1mg/ml BSA,0.1mg/ml鲑鱼精DNA和0.01%(体积百分含量)吐温-80,余量为水。

[0090] 下述实施例中的洗涤缓冲液(pH=7.4):含137mM NaCl、5mM MgCl₂、2.7mM KCl、2mM KH₂PO₄、10mM Na₂HPO₄和25mM葡萄糖,余量为水。

[0091] 下述实施例中的siRNA溶解液:DEPC水。

[0092] A549(人肺腺癌细胞,资源编号:3111C0001CCC000002)、DU145(人前列腺癌脑转移细胞,资源编号:3111C0001CCC000006)、PC-3(人前列腺癌骨转移细胞,资源编号:3111C0001CCC000115)、Jurkat(急性T细胞白血病细胞,资源编号:3111C0001CCC000075)、T24(膀胱癌细胞,资源编号:3111C0001CCC000295)、LoVo(人结直肠癌细胞,资源编号:3111C0001CCC000164)、A375(人黑色素瘤细胞,资源编号:3111C0001CCC000126)、U87(人胶质瘤细胞,资源编号:3111C0001CCC000208)、HeLa(人子宫颈癌细胞,资源编号:3111C0001CCC000011)、SMMC7721(人肝癌细胞,资源编号:3111C0001CCC000087)、Colo205(人结直肠癌细胞,资源编号:3111C0001CCC000132)、HCT116(结肠癌细胞,资源编号:3111C0001CCC00015)和RAW264.7(小鼠单核巨噬细胞,资源编号:3111C0001CCC000146)购自中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心。MCF-7(人乳腺癌细胞,资源编号:3142C0001000001079)和HEK293细胞(人胚肾细胞,资源编号:3142C0001000001636)购自中国典型培养物保藏中心细胞库,MCF-7R(耐紫杉醇人乳腺癌细胞)购自上海艾研生物科技有限公司。A549T(人肺腺癌耐药细胞,货号:KG354)购自江苏凯基生物技术股份有限公司;A2780T(人卵巢癌细胞紫杉醇耐药株,货号:MZ-1999)购自宁波明舟生物科技有限公司。BCPAP(乳头状复苏形式人甲状腺癌细胞,资源编号:BNCC100390)购自北纳创联生物技术有限公司。

[0093] SACC-LM和SACC-83均记载在如下文献中:Dong,L.;Wang,Y.X.;Li,S.L.;Yu,G.Y.;Gan,Y.H.;Li,D.;Wang,Y.,TGF-beta 1Promotes Migration and Invasion of Salivary Adenoid Cystic Carcinoma.J Dent Res 2011,90(6),804-809。

[0094] 实施例1、核酸适体的筛选和制备

[0095] 一、唾液腺腺样囊性癌细胞的培养

[0096] 具有肺转移潜能的唾液腺腺样囊性癌细胞(SACC-LM)和唾液腺腺样囊性癌细胞(SACC-83)(均由北京大学口腔医院王衣祥老师惠赠)用RPMI 1640(含10%胎牛血清、1%青/链霉素)培养基,在培养箱中进行常规培养(37℃,5%CO₂),每两天传代一次。

[0097] 二、随机核酸文库的设计

[0098] 设计如下两端包括20个固定核苷酸、中间包括45个核苷酸的随机文库:5' -

EDTA的PBS消化成单分散细胞悬液后平均分成若干份,与核酸适体1-FAM溶液(200nM)或对照核酸序列L45-FAM溶液(200nM)孵育30min后,用洗涤缓冲液洗涤两遍,用BD公司的FACSCalibur流式细胞仪测定细胞表面的荧光强度。

[0119] 结果如图1B、C和D所示,说明序列1可以特异性的识别细胞SACC-LM细胞、PC-3细胞,而不结合HEK293细胞。

[0120] 四、核酸适体的优化和亲和力的测序

[0121] 1、核酸适体截短体

[0122] 上述三的步骤3得到的核酸适体较长,经结构分析后,设计并合成一系列经截短的核酸序列,通过荧光染料修饰,然后考察它们与PC-3细胞的结合能力,挑选结合能力最强的序列用于进一步的应用,优化后的序列长度只有39-85个核苷酸。

[0123] 最终得到的截短核酸适体序列如下:

[0124] 核酸适体2:

[0125] 5'-CATGACGTCACTCCAAGATCGTCCGTTTCGTCTTAGTCCGTCTCTTTAGGGTGTGTCGTCGTGGT-3' (序列2);核酸适体2是将核酸适体1序列去掉由5'端到3'端的第1-20个和其他碱基保持不变得到的核苷酸序列。

[0126] 核酸适体3:

[0127] 5'-ACGTCACCTCCAAGATCGTCCGTTTCGTCTTAGTCCGTCTCTTTAGGGAGTGACGT-3' (序列3);核酸适体3是将核酸适体2序列去掉由5'端到3'端的第1-4个和由3'端到5'端第1-6个碱基及将由3'端到5'端的第10个和第14个碱基突变为A,其他碱基保持不变得到的核苷酸序列。

[0128] 核酸适体4:

[0129] 5'-CACTCCAAGATCGTCCGTTTCGTCTTAGTCCGTCTCTTTAGGGAGTG-3' (序列4);核酸适体4是将核酸适体3序列去掉由5'端到3'端的第1-4个和由3'端到5'端第1-4个碱基,第14个碱基突变为A,其他碱基保持不变得到的核苷酸序列。

[0130] 核酸适体5:

[0131] 5'-CCAAGATCGTCCGTTTCGTCTTAGTCCGTCTCTTTAGGG-3' (序列5);

[0132] 核酸适体5是将核酸适体4序列去掉由5'端到3'端的第1-4个和由3'端到5'端第1-4个碱基,其他碱基保持不变得到的核苷酸序列。

[0133] 核酸适体6:

[0134] 5'-sCsAsCsTCCAAGATCGTCCGTTTCGTCTTAGTCCGTCTCTTTAGGGsAsGsTsG-3';核酸适体6是核酸适体4两端各4个碱基硫代修饰。

[0135] 2、核酸适体截短体亲和力检测

[0136] 取对数生长期的PC-3细胞,用含5mM EDTA的PBS消化成单分散细胞悬液后平均分成若干份,分别与标记荧光分子的核酸适体探针溶液孵育30min后,用洗涤缓冲液洗涤两遍,用BD公司的FACSCalibur流式细胞仪测定细胞表面的荧光强度。以细胞表面平均荧光强度和核酸适配体浓度作图,利用公式 $Y = \frac{B_{\max} X}{(K_d + X)}$ 计算核酸适体的平衡解离常数 K_d ,用来表示亲和力的大小。

[0137] 各个标记荧光分子的核酸适体探针为将上述各个核酸适体的5'末端标记FAM基团,得到各个标记荧光分子的核酸适体探针。

[0138] 上述标记荧光分子的核酸适体探针溶液按照如下方法制备:用结合缓冲液溶解各

[0157] (1) 生物素标记的核酸适体4

[0158] 生物素标记的核酸适体4为在核酸适体4的5'端偶联生物素基团得到,再用结合缓冲液溶解,依据紫外吸收标定浓度(100nM)后,95℃加热5min,冰上放置10min,室温放置15min,得到生物素标记的核酸适体4溶液。

[0159] (2) 生物素标记的对照核酸序列ZAJ-4b

[0160] 生物素标记的对照核酸序列ZAJ-4b为在核酸适体ZAJ-4b的5'端偶联生物素基团得到,再用结合缓冲液溶解,依据紫外吸收标定浓度(100nM)后,95℃加热5min,冰上放置10min,室温放置15min,得到生物素标记的对照核酸序列ZAJ-4b溶液。

[0161] 对照核酸序列ZAJ-4b的核苷酸序列:TGGATATAGGTTGGCTTAGGTGGCTTTGCGTTGGGTGTGGTGCATATCC。

[0162] 二、核酸适体4特异性识别并结合整合素 $\alpha 3\beta 1$ 的提取和质谱鉴定

[0163] 1、核酸适体4靶标蛋白的提取

[0164] (1) 分别取 1×10^8 个指数生长期的重型同位素标记的DU145细胞和轻型同位素标记的DU145细胞,PBS洗涤后,分别与生物素标记的核酸适体4(200nM)和生物素标记的对照核酸序列ZAJ-4b(200nM)孵育30分钟。

[0165] (2) PBS洗涤2遍,加入1mL的细胞裂解液,孵育1小时。

[0166] (3) 2000rpm离心去除沉淀,收集上清,加入链霉亲和素修饰的琼脂糖微球(GE公司,货号:17-5113-01),孵育1小时,收集微球,得到各种带有靶标蛋白的链霉亲和素修饰的琼脂糖微球。

[0167] (4) 用PBS洗涤上述步骤(3)孵育后的各种带有靶标蛋白的链霉亲和素修饰的琼脂糖微球,洗涤5次,然后用含5mM EDTA的PBS洗脱捕获的蛋白,分别得到生物素标记的核酸适体4提取的重型同位素标记的蛋白微球、生物素标记的对照核酸序列ZAJ-4b提取的轻型同位素标记的蛋白微球、生物素标记的核酸适体4提取的轻型同位素标记的蛋白微球和生物素标记的对照核酸序列ZAJ-4b提取的重型同位素标记的蛋白微球。

[0168] 2、正向和反向实验

[0169] (1) 正向实验:将生物素标记的核酸适体4提取的重型同位素标记的蛋白微球与生物素标记的对照核酸序列ZAJ-4b提取的轻型同位素标记的蛋白微球混合,得到生物素标记的核酸适体4提取的重型同位素标记的蛋白微球和生物素标记的对照核酸序列ZAJ-4b提取的轻型同位素标记蛋白微球的混合体系。

[0170] (2) 反向实验:将生物素标记的核酸适体4提取的轻型同位素标记的蛋白微球与生物素标记的对照核酸序列ZAJ-4b提取的重型同位素标记的蛋白微球混合,得到生物素标记的核酸适体4提取的轻型同位素标记的蛋白微球和生物素标记的对照核酸序列ZAJ-4b提取的重型同位素标记蛋白微球的混合体系。

[0171] 3、蛋白的PAGE电泳

[0172] 将上述正向实验的混合体系和反向实验的混合体系分别加入10 μ L SDS上样缓冲溶液(碧云天,货号:P0015),在95℃加热10min。然后上样,用10%SDS-PAGE胶在150V电压下,15min,蛋白电泳距离大概1cm左右。

[0173] 4、蛋白的胶内酶解和LC-MS鉴定

[0174] (1) DTT还原:将电泳后的各PAGE胶样品切成1mm左右的小块,用50%的乙腈/水溶

液脱色,然后加入200 μ L 20mM二硫苏糖醇(DTT),56 $^{\circ}$ C反应45min。

[0175] (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 μ L 55mM碘乙酰胺(IAA),在37 $^{\circ}$ C避光反应30min。

[0176] (3) 将步骤(2)的产物离心,弃上清(去除IAA),向沉淀中加入5 μ g质谱用胰蛋白酶(Promega公司,产品目录号:V5111),37 $^{\circ}$ C酶切过夜,得到酶切后的多肽。

[0177] (4) 酶切后的多肽经过真空浓缩后,加入100 μ L水,利用Ziptip C₁₈微柱脱盐。质谱分析前,放置-20 $^{\circ}$ C冰箱。

[0178] (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。

[0179] (6) 数据搜索分析

[0180] 利用MaxQuant搜索引擎(版本号:版本号:1.6.1.0)将步骤(5)获得的原始的质谱数据在Uniprot蛋白数据库中进行检索。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。候选蛋白需在正向实验和反向实验中同时被鉴定出。

[0181] 结果如表1所示,利用生物标记的核酸适体4可以特异性的捕获整合素 α 3 β 1蛋白分子。

[0182] 表1、利用核酸适体4捕获整合素 α 3 β 1

蛋白 ID	蛋白名称	基因	独特多肽	得分	核酸适体 4/ZAJ4b 比值	
					正向实验	反向实验
P05556	Integrin beta-1	ITGB1	11	104.92	>10	>10
P26006	Integrin alpha-3	ITGA3	11	145.01	>10	>10
P63261	Actin, cytoplasmic 2	ACTG1	8	323.31	0.16	4.19

[0184] 实施例3、核酸适体4和整合素 α 3结合的证实

[0185] 一、核酸适体4衍生物及siRNA干扰后的PC-3细胞的制备

[0186] 1、核酸适体的制备

[0187] 荧光素(FAM)标记的核酸适体4为在核酸适体4的5'端偶联荧光素FAM基团得到的,用结合缓冲液溶解,依据紫外吸收标定浓度(20 μ M)后,95 $^{\circ}$ C加热变性5min,冰上放置10min,室温放置15min,得到荧光素FAM标记的核酸适体4溶液。

[0188] 2、siRNA干扰后的DU145细胞的制备

[0189] (1) 转染试剂的制备

[0190] 整合素 α 3 β 1分子蛋白中的 α 3亚基的siRNA(siITGA3,正义链:5'-CCC GAUCCUGGUAGUGAATT;反义链:5'-UUCACUACCAGGAAUCGGGT-3')和siRNA阴性对照序列(NC,正义链:5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3';反义链:5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3')。

[0191] 上述均合成于苏州吉玛基因股份有限公司。

[0192] 将上述 α 3亚基的siITGA3和siRNA阴性对照序列NC均用DEPC水溶解配制成20 μ M的母液,再加入转染试剂,分别得到含有siITGA3的转染试剂和含有NC的转染试剂。

[0193] 上述转染试剂为脂质体转染试剂盒(Lipofectamin[®]RNAiMAX转染试剂)是Thermo

[0245] 捕获率=捕获数量/理论值

[0246] 释放率=捕获数量/释放后的数量

[0247] 结果如图7所示,核酸适体4为其对细胞PC-3细胞的捕获能力,核酸适体4-释放为其捕获PC-3细胞后释放的细胞数,L45为对照序列L45对细胞PC-3细胞的捕获能力。核酸适体4-Bio修饰的磁性微球可以捕获表达整合素 $\alpha 3\beta 1$ 蛋白的PC-3细胞,其捕获率达92.7%,并可释放大部分细胞;而对照序列修饰的磁球无法捕获PC-3细胞。

[0248] 这说明核酸适体4可以用于整合素 $\alpha 3\beta 1$ 蛋白阳性表达细胞的捕获及释放。

[0001]	SEQUENCE LISTING	
[0002]	<110>中国科学院化学研究所	
[0003]	<120>一种核酸适体识别并结合整合素 $\alpha 3$ 亚基及其相关功能	
[0004]	<160> 5	
[0005]	<170> PatentIn version 3.5	
[0006]	<210> 1	
[0007]	<211> 85	
[0008]	<212> DNA	
[0009]	<213> Artificial sequence	
[0010]	<400> 1	
[0011]	aaggagcagc gtggaggata catgacgtca ctccaagatc gtccgtttcg tcttagtccg	60
[0012]	tctcttttagg gtgtgtcgtc gtggt	85
[0013]	<210> 2	
[0014]	<211> 65	
[0015]	<212> DNA	
[0016]	<213> Artificial sequence	
[0017]	<400> 2	
[0018]	catgacgtca ctccaagatc gtccgtttcg tcttagtccg tctcttttagg gtgtgtcgtc	60
[0019]	gtggt	65
[0020]	<210> 3	
[0021]	<211> 55	
[0022]	<212> DNA	
[0023]	<213> Artificial sequence	
[0024]	<400> 3	
[0025]	acgtcactcc aagatcgtcc gtttcgtctt agtccgtctc ttagggagt gacgt	55
[0026]	<210> 4	
[0027]	<211> 47	
[0028]	<212> DNA	
[0029]	<213> Artificial sequence	
[0030]	<400> 4	
[0031]	cactccaaga tcgtccgttt cgtcttagtc cgtctcttta gggagtg	47
[0032]	<210> 5	
[0033]	<211> 39	
[0034]	<212> DNA	
[0035]	<213> Artificial sequence	
[0036]	<400> 5	
[0037]	ccaagatcgt ccgtttcgtc ttagtccgtc tcttttaggg	39

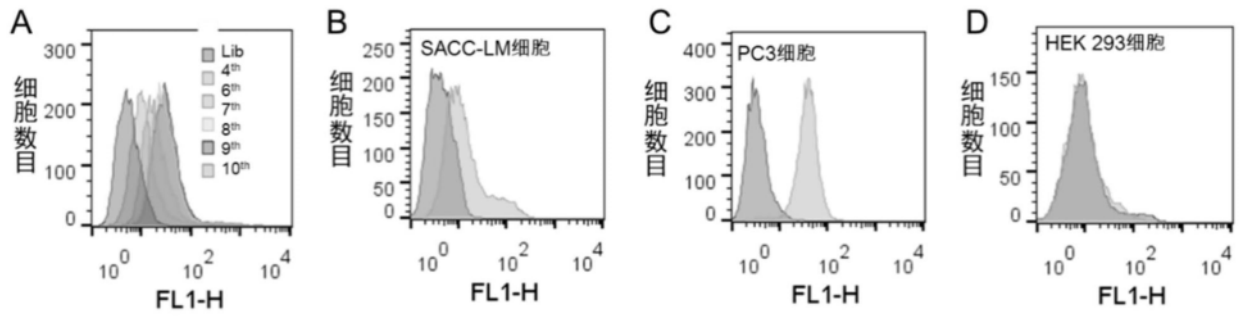


图1

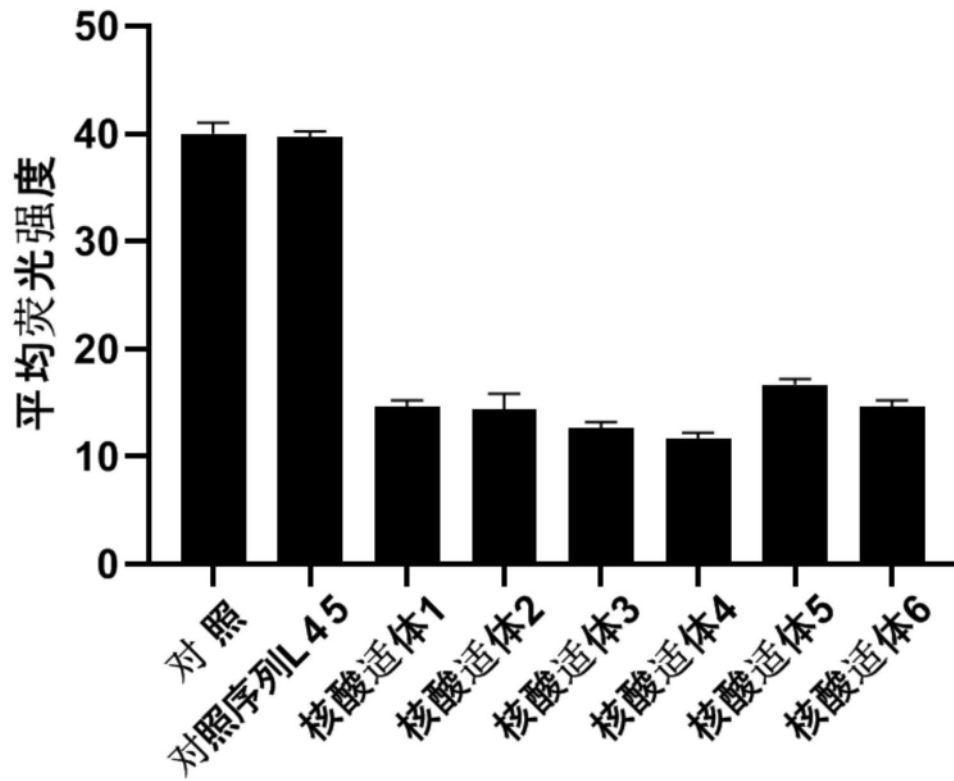


图2

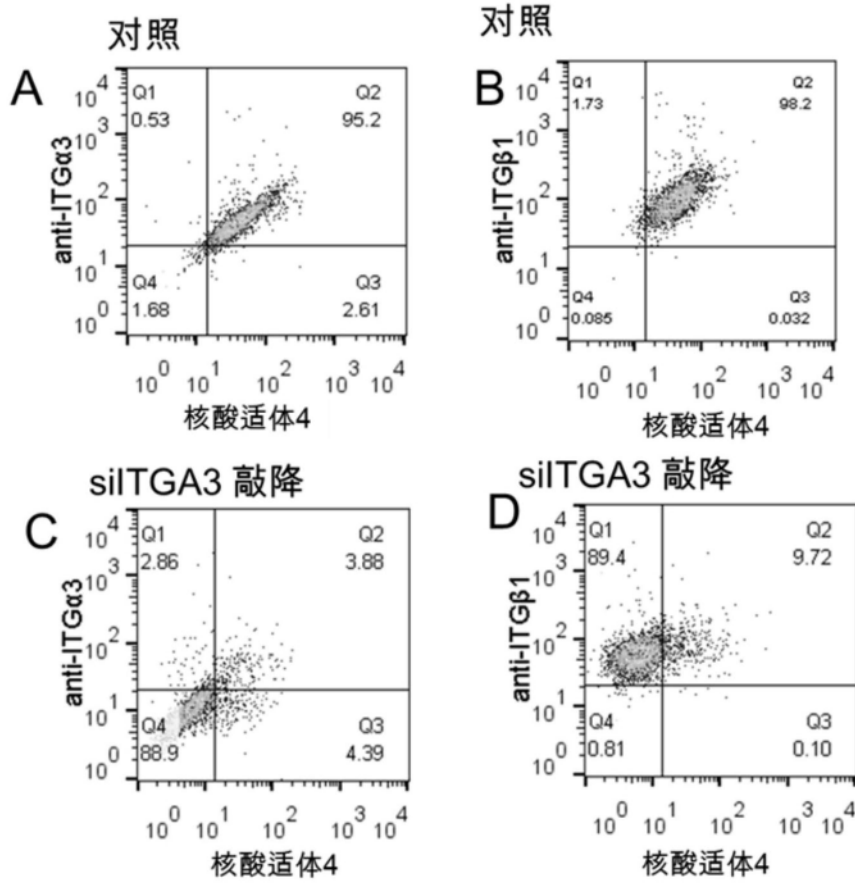


图3

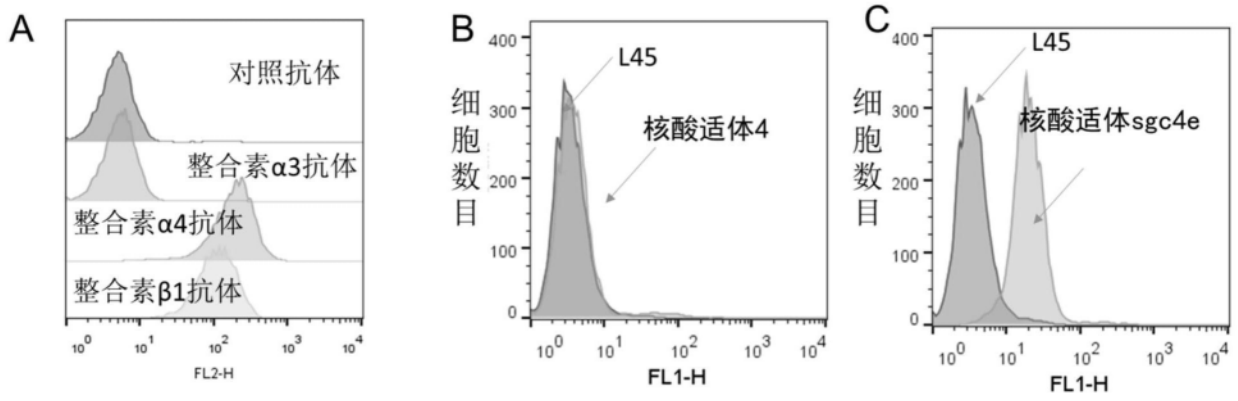


图4

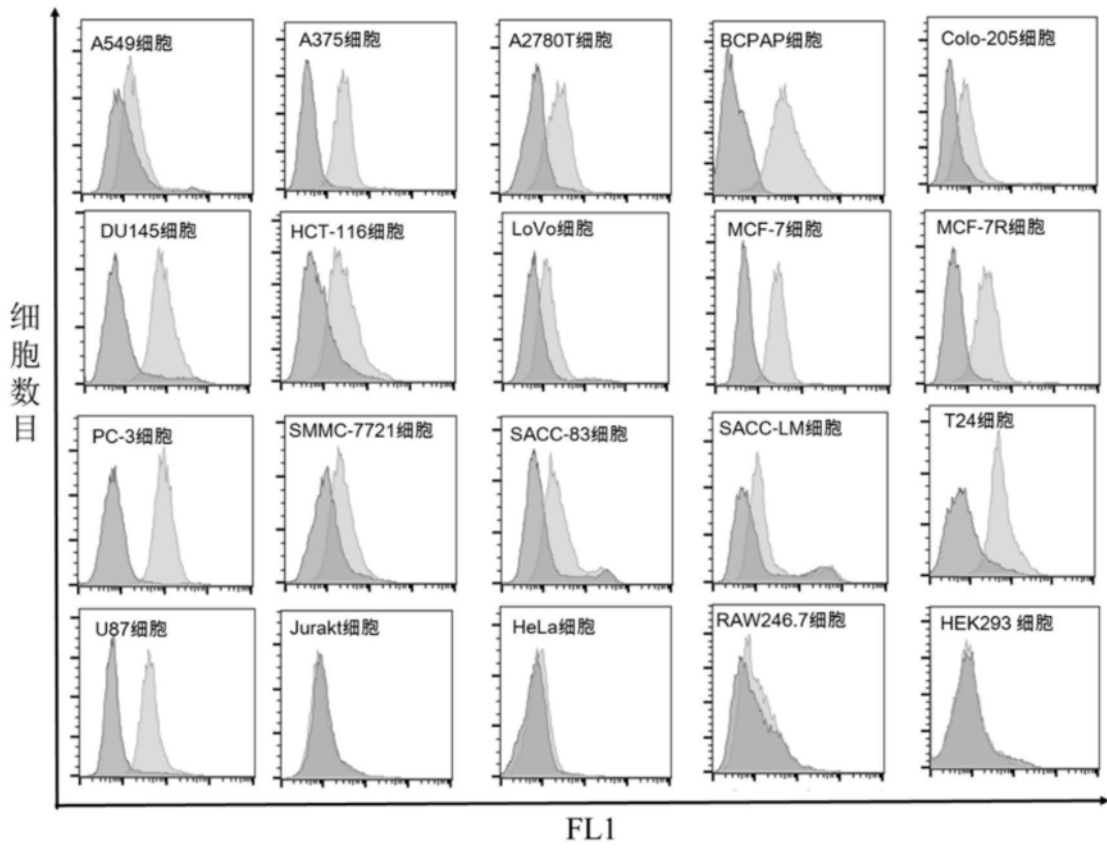


图5

对照序列L45

核酸适体4

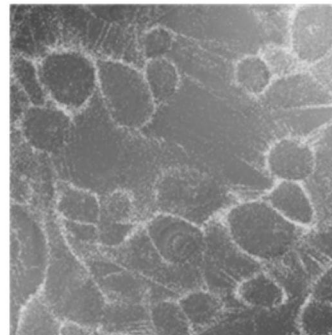
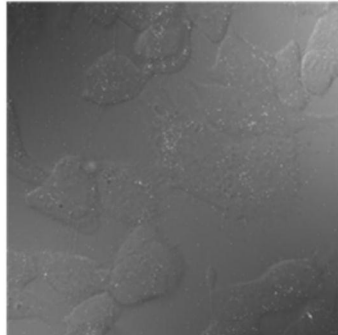


图6

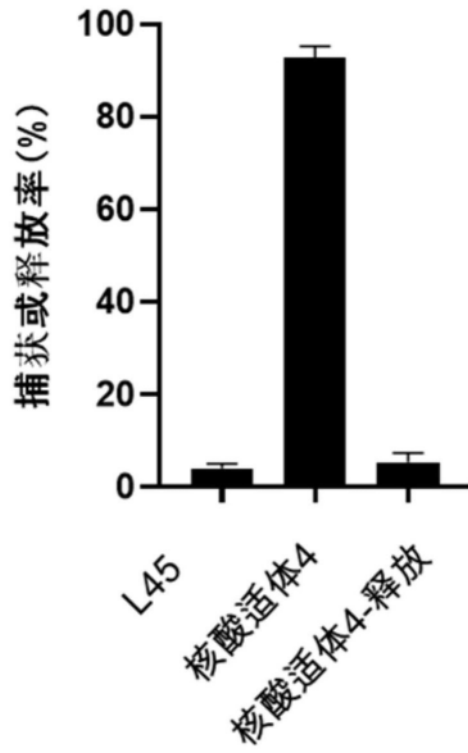


图7