

特异性识别可溶性 ST2 蛋白的核酸适配体及其应用

技术领域

5 本发明涉及变异或遗传工程领域中特异性识别可溶性 ST2 蛋白的核酸适配体及其应用。

背景技术

核酸适配体 (Aptamer) 是一种经体外筛选技术——指数富集的配体系统进化 (Systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX) 技术, 从随机脱氧寡核苷酸文库中筛选获得的能够和靶标分子特异性结合的单链 DNA(ssDNA) 或 RNA。传统的抗原-抗体反应灵敏度和特异性均较好, 酶联免疫反应在各种生物分子的探测中发挥着举足轻重的作用, 但蛋白质作为探针分子, 易受 pH、温度等环境因素影响而变性、且合成价格昂贵。核酸适配体本质是一段单链 DNA 或者 RNA 分子折叠形成特定三维结构而与生物靶标高亲和力和高特异性结合, 由于其具有分子量较小、可化学合成、结构改造以及标记、稳定性好、能可逆的变性与复性, 可在常温下保存和运输、没有免疫原性和毒性等优点, 在许多方面体现了传统的免疫学与化学分子识别无可比拟的优势。在生物医学技术领域, 核酸适配体可被用于临床诊断、药物递送、疾病治疗药物等众多方面: 如核酸适配体具备作为导向剂所需的所有特性, 其分子可结合放射性核素等, 并递送到靶组织, 同时还具有直接抑制靶蛋白的功能, 是非常有潜力的体内显像和治疗药物; 在新药研发方面, 核酸适配体还可以用于鉴定药物靶标、作为药物分子或先导分子, 以及作为生物导弹指导靶向治疗; 此外, 核酸适配体能与多种目标物质高特异性、高选择性地结合, 与目标分子结合时往往引起构象的变化, 有利于构建传感分析方法, 并且标记后的核酸适配体一般与目标分子的结合力不会改变, 这些特性使得核酸适配体的生化检测技术受到极大的关注; 目前核酸适配体已被广泛应用在各类传感器中, 比如电化学传感器、光学传感器以及声学传感器等。

生长刺激表达基因 2 蛋白 (growth STimulation expressed gene2, ST2) 是白细胞介素 1 受体/Toll-样受体超家族的成员。ST2 蛋白具有两种形态, 可溶性形式 (sST2) 和膜结合受体形式 (ST2L), ST2 的功能性配体为白细胞介素-33 (IL-33)。近年来研究表明, ST2 除了参与炎症反应外, 还与心血管疾病密切相关, 可溶性 ST2 (sST2) 是 IL-33 的诱骗受体, 通过竞争性结合 IL-33, 从而阻断 IL-33 与 ST2L 结合, 继而削弱 IL-33/ST2 信号通路的心血管保护作用。一系列的实验及临床研究发现, sST2 水平的升高和心衰严重程度相关并能预测心脏猝死的发生, 是评估心衰危险分层的良好标记物。sST2 是目前心衰检测最具特异性的指标之一, 几乎不受年龄、性别、BMI、心衰病因、房颤、贫血、肾功能的影响, 生物变异性低而稳定性高, 可应用在心衰诊断、预测心衰预后情况、细化心衰临床分层、预测患者死亡几率等临床应用方面。此外, 新近的研究也

发现 sST2 能够鉴别诊断主动脉瘤/夹层患者，可作为急性主动脉夹层的诊断标志物。然而，目前临床上 sST2 的检测是基于抗原抗体的检测，且检测试剂盒昂贵，临床上应用受限。因此，仍需要更为精确、稳定、便捷且价格适宜的 sST2 的检测方案。核酸适配体能与靶标特异性结合，有望用于 sST2 的临床检测和疾病治疗。

5 发明公开

本发明的目的是提供一组特异性高、稳定性高、合成方便和/或易标记功能基团的特异性识别 sST2 蛋白的核酸适配体，和/或所述核酸适配体在 sST2 蛋白检测中的应用。所要解决的技术问题不限于所描述的技术主题，本领域技术人员通过以下描述可以清楚地理解本文未提及的其它技术主题。

为实现上述目的，本发明首先提供了特异性识别 sST2 蛋白的核酸适配体，所述核酸适配体可为下述任一种：

A1) 核苷酸序列是 SEQ ID No. 4、6、5、1、2、3、7、8、9 或 10 的任一单链 DNA；

15 A2) 与 A1) 限定的核苷酸序列具有 75% 或 75% 以上同一性，且特异性识别 sST2 蛋白的任一单链 DNA；

A3) 由 A1) 所示的单链 DNA 转录且特异性识别 sST2 蛋白的任一单链 RNA；

A4) 在严格条件下与 A1) 或 A3) 限定的核苷酸序列杂交，且特异性识别 sST2 蛋白的任一单链 DNA 或单链 RNA。

20 所述 sST2 蛋白为可溶性生长刺激表达基因 2 蛋白 (soluble growth Stimulation expressed gene 2)。

上述 75% 或 75% 以上同一性，可为 80%、85%、90% 或 95% 以上的同一性。

本文中，所述 80% 以上的同一性可为至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、
25 86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的同一性。

进一步地，所述核酸适配体可连接有功能基团或分子。

进一步地，所述核酸适配体的 5' 端或 3' 端修饰有功能基团或分子。

进一步地，所述功能基团或分子可为同位素、荧光标记物、化学发光标记
30 物、生物发光标记物、酶标记物、磁性物质、生物素、亲和配基、巯基和/或治疗性物质。

所述功能基团或分子用于提高所述核酸适配体的稳定性、提供检测信号，或用于连接所述核酸适配体与其他物质形成组合物。

本发明还提供了探针，所述探针可为所述任一核酸适配体被标记物标记得
35 到的物质。

所述标记物指可用于提供可检测的 (优选可定量的) 效果且可以连接至核酸的任何原子或分子。标记物包括但不限于染料；放射性标记，诸如 ³²P；共轭偶连基团，

诸如生物素 (biotin); 半抗原, 诸如地高辛 (DIG); 化学发光、发磷光或发荧光部分; 和单独的荧光染料或与可以通过荧光共振能量转移 (FRET) 抑制或移动发射光谱的部分组合的荧光染料。标记可以提供可通过荧光、放射性、比色、重量测定、量子点, 电化学, X 射线衍射或吸收、磁性、免疫酶标反应, 基于滤纸的免疫测定, 亲和沉淀, 亲和色谱法, 酶活性, 显微投射或扫描成像, 超分辨力成像, 细胞示踪, 动物或人体的活体纳米颗粒追踪示踪成像, 纳米流式, 可调电阻脉冲感应, 荧光相关光谱表面等离子体共振, 荧光偏振, 表面增强拉曼光谱, 电化学感应, 微流体或微流控, 芯片分析, 蛋白质组学, 基因组学, 代谢组学, 微生物组学, RNA (mRNA, lncRNA, snRNA), miRNA 等检测的信号。标记可以是带电荷的部分 (正电荷或负电荷) 或可按需选定, 可以是电荷中性的。标记可以包括核酸或蛋白序列或由其组合, 只要包含标记的序列是可检测的。在一些实施方案中, 核酸在没有标记的情况下直接检测 (例如, 直接读取序列)。所述标记物还可用于靶向给药。

在一些实施方式中, 所述标记是荧光团、比色标记、量子点、生物素以及其他可以用于探测的标签分子 (如用于拉曼衍射成像的炔烃基团, 用于 click 反应的环烯烃, 用于聚合物标记的引发基团), 也可以选自多肽/蛋白分子, LNA/PNA, 非天然氨基酸及其类似物 (比如拟肽), 非天然核酸及其类似物 (拟核苷酸) 和纳米结构 (包括无机纳米颗粒, NV-center, 聚集/组装诱导发光分子, 稀土离子配体分子, 多金属氧簇等)。

在一些实施方式中, 所述荧光团可选自荧光素类染料、罗丹明类染料以及菁染料。

在一些实施方式中, 所述荧光素类染料包括标准荧光素及其衍生物, 如异硫氰酸荧光素 (FITC)、羟基荧光素 (FAM)、四氯荧光素 (TET)、cy5、cy3、Quasar 670、Alexa Fluor 488/647 等。

在一些实施方式中, 所述罗丹明类染料包括 R101、四乙基罗丹明 (RB200) 和羧基四甲基罗丹明 (TAMRA) 等。

在一些实施方式中, 所述菁染料主要选自两类, 一类是噻唑橙 (thiazole orange, TO)、噁唑橙 (oxazole orange, YO) 系列及其二聚体染料, 另一类是多甲川系列菁染料。

在一些实施方式中, 荧光团还可以选自下述染料: 二苯乙烯、萘酰亚胺、香豆素类、吡啶类、茈类等。

荧光团通常标记在探针序列的 5' 端, 但通过改变修饰键 (例如 -OH 或 -NH 键) 也可以将其置于 3' 端。

在本发明的一个实施方案中, SEQ ID No. 1-10 所述的单链 DNA (ssDNA) 适配体的 5' 端用生物素 (Biotin) 标记。

本发明还提供了传感器, 所述传感器含有任一所述核酸适配体或任一所述探针。

本发明还提供了用于检测 sST2 蛋白的试剂或试剂盒, 所述试剂或试剂盒含

有本文任一所述的核酸适配体或任一所述探针。

所述试剂盒还包括 PCR 扩增所需要的 Taq DNA 聚合酶、dNTP、PCR 缓冲液、 Mg^{2+} 中的一种或多种。

所述试剂盒的各种试剂组分可以存在于分开的容器中，或者可以全部或部分预组合成试剂混合物。

本发明还提供了用于预防、改善或治疗 sST2 相关疾病的药物，所述药物含有本文任一所述的核酸适配体或任一所述探针。

进一步地，所述药物还含有一种或多种药学上可接受的载体。

所述药学上可接受的载体可为稀释剂、赋形剂、填充剂、粘合剂、湿润剂、崩解剂、吸收促进剂、吸附载体、表面活性剂或润滑剂。

本发明还提供了特异性靶向 sST2 蛋白的载药系统，所述载药系统含有本文任一所述的核酸适配体或任一所述探针。

所述载药系统可为脂质体递药系统、聚合物胶束递药系统、聚合物圆盘递药系统或纳米粒递药系统。

所述载药系统用于药物的靶向运输和/或定点释放。

本发明还提供了本文任一所述核酸适配体或任一所述探针的下述任一种应用：

B1) 在制备预防、改善或治疗 sST2 相关疾病的药物或产品中的应用；

B2) 在检测 sST2 蛋白或制备检测 sST2 蛋白的产品中的应用；

B3) 在制备用于结合 sST2 蛋白的产品中的应用；

B4) 在制备用于 sST2 蛋白的体内显像的产品中的应用；

B5) 在制备筛查、诊断或辅助诊断 sST2 相关疾病中的应用；

B6) 在制备 sST2 相关疾病的预后评估的产品中的应用；

B7) 在制备预测 sST2 相关疾病的患者死亡几率的产品中的应用；

B8) 在制备评估心力衰竭危险分层的产品中的应用。

上述应用中，所述 sST2 相关疾病可为心血管疾病。

上述应用中，所述心血管疾病包括心力衰竭、动脉粥样硬化、高血压、心肌梗死、冠心病、急性冠脉综合征、主动脉瘤或主动脉夹层但不限于此。

本发明还提供了一种检测 sST2 蛋白的方法，所述方法包括将报告基团标记在 SEQ ID No. 1-10 所示的任一核酸适配体上，使标记了报告基团的核酸适配体与待测样品相互作用，通过对报告基团的信号检测实现对 sST2 蛋白的检测。

进一步地，所述报告基团可为生物素或荧光基团，所述荧光基团可为 Rhodamine、FAM、FITC、BODIPY、Cy3、Cy5、VIC、HEX、TRT、ROX、JOE、TAMRA 但不限于此。

上述应用和方法的目的可以是疾病诊断目的、疾病预后目的和/或疾病治疗目的，它们的目的也可以是非疾病诊断目的、非疾病预后目的和非疾病治疗目的；它们的直接目的可以是获取疾病诊断结果、疾病预后结果和/或疾病治疗结

果的中间结果的信息，它们的直接目的可以是非疾病诊断目的、非疾病预后目的和/或非疾病治疗目的。

本文所述核酸适配体可为单链 DNA (ssDNA) 适配体或单链 RNA (ssRNA) 适配体。

5 本文所述 sST2 相关疾病可为由 IL-33/ST2 信号通路异常所引起的疾病。

本文所述产品可为试剂盒、试纸或生物传感器。

本发明还提供了本文任一所述核酸适配体或所述探针的下述任一种应用：

C1) 在预防、改善或治疗 sST2 相关疾病中的应用；

C2) 在 sST2 蛋白的体内显像中的应用；

10 C3) 在筛查、诊断或辅助诊断 sST2 相关疾病中的应用；

C4) 在 sST2 相关疾病的预后评估中的应用；

C5) 在预测 sST2 相关疾病的患者死亡几率中的应用；

C6) 在评估心力衰竭危险分层中的应用；

C7) 在 sST2 相关疾病的治疗监测中的应用；

15 C8) 在纯化 sST2 蛋白中的应用。

上述应用中，所述 sST2 相关疾病可为心血管疾病。

上述应用中，所述心血管疾病可包括心力衰竭、动脉粥样硬化、高血压、心肌梗死、冠心病、急性冠脉综合征、主动脉瘤或主动脉夹层但不限于此。

20 本发明还提供了筛查、诊断或辅助诊断 sST2 相关疾病的方法，所述方法可包括：从受试者获得包含血清、血液或血浆的样品，然后利用本文所述核酸适配体检测所述样品中 sST2 蛋白的含量，根据所述 sST2 蛋白的含量进行 sST2 相关疾病的筛查、诊断或辅助诊断。

25 本发明还提供了治疗 sST2 相关疾病的方法，所述方法包括向已被诊断患有 sST2 相关疾病的受试者施用所述核酸适配体或与所述核酸适配体偶联的 sST2 抑制剂。

上述方法中，所述 sST2 抑制剂可为抑制 ST2L/IL-33 信号通路的试剂。

上述方法中，所述 sST2 相关疾病可为心血管疾病。

上述方法中，所述心血管疾病可包括心力衰竭、动脉粥样硬化、高血压、心肌梗死、冠心病、急性冠脉综合征、主动脉瘤或主动脉夹层但不限于此。

30 本发明采用 MCP-SELEX 技术，结合高通量测序技术及生物信息学分析，降低筛选的轮次并获得候选核酸适配体。进一步分析其亲和性和特异性，得到特异性识别 sST2 蛋白的 ssDNA 适配体。本发明的 ssDNA 适配体具有特异性高、稳定性高、合成方便、易标记功能基团等特点，可特异性识别和结合 sST2 蛋白，用于 sST2 蛋白的检测及生物传感器的制备；同时本发明的 ssDNA 适配体也是
35 sST2 参与相关疾病的潜在治疗药物，可制备用于临床诊断的试剂或疾病治疗的药物。

本发明为 sST2 的检测提供了可在体外筛选、可高通量获得、筛选周期短、

合成方便且稳定性良好、亲和力高、易修饰和标记的高特异性核酸适配体。同时，本发明的核酸适配体可单独使用或携带相关药物，对 sST2 参与的疾病的治疗具有开发前景。

附图说明

5 图 1 为人 sST2 蛋白的纯化电泳结果图。

图 2 为第 1、2、3、4、5、6、7 轮筛选后洗脱比（左一）、结合比（左二）、信噪比的百分比（左三）。

图 3 为实施例 2 中的 EMSA 实验结果。

10 图 4 为实施例 3 中核酸适配体 Apt4 (SEQ ID No. 4)、Apt5 (SEQ ID No. 5) 和 Apt6 (SEQ ID No. 6) 与 sST2 蛋白亲和力检测实验结果。

实施发明的最佳方式

下面结合具体实施方式对本发明进行进一步的详细描述，给出的实施例仅为了阐明本发明，而不是为了限制本发明的范围。以下提供的实施例可作为本技术领域普通技术人员进行进一步改进的指南，并不以任何方式构成对本发明的限制。

下述实施例中的实验方法，如无特殊说明，均为常规方法，按照本领域内的文献所描述的技术或条件或者按照产品说明书进行。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。

20 下述实施例中的 sST2 蛋白购自北京义翘神州科技股份有限公司 (Cat: 10105-H08H)。其纯化电泳 (SDS-PAGE) 结果如图 1 所示。

实施例 1、筛选靶向人 sST2 蛋白的单链 DNA 核酸适配体

使用指数富集配体系统进化技术 (SELEX) 及高通量测序技术，应用生物信息学分析，得到靶向人 sST2 蛋白的单链 DNA (ssDNA) 核酸适配体。

具体步骤如下：

25 1、构建随机 ssDNA 文库

随机 ssDNA 文库包含两个引物区域和一个 35 个碱基的随机区域，其核苷酸序列如 SEQ ID No. 11 所示，其中 SEQ ID No. 11 的第 1-20 位为正向引物区域，SEQ ID No. 11 的第 56-75 位为反向引物区域，SEQ ID No. 11 的第 21-55 位为 35 个核苷酸 N，N 代表 A、G、C 或 T。

30 其中正向引物区域对应的正向引物序列为：

5' -GACAGGCAGGACACCGTAAC-3' (SEQ ID No. 12)；

反向引物区域对应的反向引物序列为：

5' -GAAGAGGAGGGAGGTAGCAG-3' (SEQ ID No. 13)。

2、磁珠负筛

35 2-1、将 10 ul 100 mM 随机的 ssDNA 文库溶解在 480 ml 的 Binding buffer 中 (137 mM NaCl; 2.7 mM KCl; 4.3 mM Na₂HPO₄; 1.4 mM KH₂PO₄) 95 °C 水浴加热 10 min，冰浴猝冷 10 min，放置室温 10 min，制备形成二级结构的 ssDNA 核

酸适配体文库。

2-2、活化磁珠，磁珠经 50 mg/mL 的 EDC 和 50 mg/mL NHS 处理，形成羧基化的磁珠，用 25 mM 的 MES 溶液(pH=5.0)清洗 2 次，加入 10 μL Binding Buffer，使磁珠分散在 Binding Buffer 中，待用。

5 2-3、将活化后的磁珠全部加入到 ssDNA 文库溶液中，总体积为 500 μL，室温下孵育 30 min，孵育结束后弃磁珠（磁性分离），留上清液。

3、磁珠筛选与靶标分子（sST2）结合的 ssDNA

3-1、将 10 μL 10 μM 的 sST2 蛋白加入到上清液中，25° C 室温中旋转 1 h。

3-2、活化磁珠，步骤同 2-2。

10 3-3、将活化后的磁珠加入到孵育 sST2 的 ssDNA 溶液中，室温下孵育 30 min，孵育结束后弃上清，留磁珠。

3-4、向磁珠中加入 500 μL Binding Buffer 后，置于振荡器上充分混合 5 min，置于强力磁铁上 1 min，取出上清液，重复清洗 4 次（每次 5 min），收集每次的上清液（W1-W4）。

15 3-5、向清洗后的磁珠中加入 1.8 μL Proteinase K(20 mg/mL)，用 Binding Buffer 定容至 120 μL，放置于 52 °C 恒温箱中 2 h，反应结束后在 95 °C 下震荡加热 20 min，使 Proteinase K（蛋白酶 K）失活，取出 120 μL 上清液，即为第一轮筛选的洗脱液（R1）。

4、制备下一轮筛选用的 ssDNA 文库

20 4-1、以洗脱液（R1）为模板制备 PCR 小样本，设置不同的扩增轮数，通过凝胶电泳评判哪个循环的扩增浓度及扩增杂带最少。通常设置的轮数为：5、9、12、15、18、21，PCR 时需加上空白对照；小样本 PCR 体系如表 1 所示。

表 1 小样本 PCR 体系（20 ul）

组分	体积
Taq 酶	10 ul
水	4 ul
正向引物	2 ul（使用带 Biotin 的引物）
反向引物	2 ul（使用带 Biotin 的引物）
模板	2 ul
总体积	20 ul

在 72 度延伸时将完成轮数的样本取出。

25 4-2、大样本 PCR

小样本 PCR 后通过凝胶电泳实验评判最优的循环数，并依据该循环数进行大样本 PCR，每管 100 ul 的体积，需 6-8 管。大样本 PCR 体系如表 2 所示。

表 2 大样本 PCR 体系（100 ul）

组分	体积
Taq 酶	50 ul

水	20 u1
正向引物	10 u1(使用带 Biotin 的引物)
反向引物	10 u1(使用带 Biotin 的引物)
模板	10 u1
总体积	100 u1

4-3、单链 DNA 制备（次级文库）

- ① 将大样本 PCR 后的产物，依次缓慢通过链霉素包被的琼脂糖珠子，样本全部通过柱子后，用 200 u1 PBS 清洗 2 次。
- ② 加入 NaOH 100 u1，收集过柱后的液体即为目标单链 DNA，加入 2 u1 15 M 的 HCL（盐酸）中和，混匀。
- ③ 检测收集的单链 DNA（ssDNA）溶液的浓度，作为下一轮筛选的文库。
- 5、荧光定量 PCR 检测筛选文库的富集程度
- 5-1、以步骤 3-4 中收集的上清液 W1-W4 和第一轮的洗脱液 R1 为模板，进行荧光定量 PCR。
- 10 5-2、通过荧光定量 PCR 的循环数和标准曲线可以得到每轮筛选的洗脱比、结合比和信噪比，依据这些参考评估文库的富集程度。
- 6、多轮筛选及高通量测序
- 6-1、重复 1-5 的筛选步骤，每次筛选均以上一轮得到的次级文库作为初始文库。在筛选过程中通过降低文库投入量、加入负筛蛋白等来增加筛选压力，以增加 ssDNA 文库的富集程度。
- 15 6-2、经过 7 轮筛选，荧光定量 PCR 结果显示 ssDNA 文库已经富集显著，远高于第 6 轮（结果如图 2 所示），因此将第 6 轮和第 7 轮的 ssDNA 进行 PCR 扩增，扩增纯化后的产物进行高通量测序，通过对比测序结果的丰度，确定了前 10 条 DNA 序列，其核苷酸序列如表 3 所示。

20 表 3 丰度排名前 10 的核酸适配体序列信息

名称	序列号	长度	序列（5’ -3’ ）
Apt1	SEQ ID No. 1	35	TCCATCCACTCGGGGCTAGAAGCCGTGAGAATCTG
Apt2	SEQ ID No. 2	35	TCCATCCACTCGGGCCCTAGGGCGTGTATGTCCAT
Apt3	SEQ ID No. 3	35	TCCATCCACTCGGCCTACTAAGGGTTTCGTTCCACC
Apt4	SEQ ID No. 4	36	TCCATCCACTCGGGGCGGGGCTCGTGCTCTATTTC
Apt5	SEQ ID No. 5	35	CCTCCATCCACTCGGCGCAACGCCGGGCTCGGCC
Apt6	SEQ ID No. 6	35	TCCATTCACTCGACCGCTGACGCGGGTGTGCTTTT
Apt7	SEQ ID No. 7	35	TCCATGCACTCGCCCTTGAAAGGGTTCCTCCGTT
Apt8	SEQ ID No. 8	35	TCCATCCACTCGGCGCCACGCGGTTTCTCCAGATT
Apt9	SEQ ID No. 9	35	TCCATGCACTCGCGCTACCGGCGTGCCCGTAGATC
Apt10	SEQ ID No. 10	35	TCCATTCACTCGCAGCGGGTTCGCGTGAGGCGCAA

实施例 2、凝胶电泳迁移率实验（EMSA）检测核酸适配体与 sST2 蛋白的结合

情况

EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) 是一种检测蛋白质和 DNA 序列 (或 RNA 序列) 相互结合的体外技术, 可用于定性和定量分析。通常将纯化的蛋白和 DNA 序列 (或 RNA 序列) 在均相环境中孵育, 然后在非变性聚丙烯胺 (PAGE) 凝胶电泳上分离蛋白-DNA 复合物和非结合序列。分离的原理是蛋白-DNA 复合物由于 DNA 上结合了蛋白这类大分子物质, 从而导致其移动速率较非结合序列慢。

实验步骤如下:

1、DNA 热处理

按照表 4 所示的实验配方, 将核酸适配体加入到缓冲溶液和无核酶水中, 于 95 ℃加热 10 分钟, 冰上猝冷 10 分钟, 室温 10 分钟。

表 4 DNA 热处理实验配方

样品编号	适配体 (20 μ M)	sST2(10 μ M)	缓冲溶液 (2×binding buffer)	无核酶水	总体积
阴性对照	2 μ L	—	10 μ L	8 μ L	20 μ L
实验组	2 μ L	8 μ L	10 μ L	—	20 μ L

2、DNA 和靶标孵育

将上述 DNA 溶液与 sST2 蛋白缓慢混匀, 终体积为 20 μ L, 且用仅含适配体、不含蛋白的样品作为阴性对照, 室温下旋转孵育 30 分钟。

3、凝胶电泳

取阴性对照和样本进行非变性 PAGE 凝胶电泳, 染料染色后进行凝胶成像, 并用成像软件进行分析。结果如图 3 所示, SEQ ID No. 1-10 所示的核酸适配体 Apt1-10 与 sST2 均具有较强的结合性, 其中 SEQ ID No. 4 所示的 Apt4、SEQ ID No. 5 所示的 Apt5 和 SEQ ID No. 6 所示的 Apt6 结合较为显著。

实施例 3、核酸适配体 Apt4、Apt5 和 Apt6 与 sST2 蛋白亲和力的测定

1、将检测靶标 sST2 蛋白与经过硅烷化和双官能团化处理的光纤进行孵育, 室温 6 h。

2、Apt4、Apt5 和 Apt6 的 DNA 经过 CY5.5 标记, 并配制不同浓度的 Apt4、Apt5 和 Apt6 的 DNA: 0 nM、10 nM、50 nM、100 nM、200 nM、500 nM、1000 nM。

3、将光纤装入检测的仪器, 每个核酸适配体的浓度依次按照进样设定的步骤 (如表 5 所示) 通过检测仪。

表 5 进样设定步骤

进样的步骤	进样时间	等待时间
缓冲液	20 s	5 s
样品 (A48-cy5)	20 s	180 s (结合)
缓冲液	20 s	180 s (解离)
再生液	30 s	5 s

缓冲液	30 s	0 s
-----	------	-----

表 5 中缓冲液组成为 137 mM NaCl; 2.7 mM KCl; 4.3 mM Na₂HPO₄; 1.4 mM KH₂PO₄; 再生液为 2 M NaCl。

4、记录每个浓度梯度 DNA 进入检测仪的荧光光度值，依据测定的荧光光度值，通过 GraphPad Prism 软件进行曲线拟合，用公式 $Y=B_{max} \cdot X / (K_d + X)$ 进行 Kd 值的计算。结果如图 4 所示，SEQ ID No. 4 所示的 Apt4 与 sST2 蛋白的结合值 Kd 为 127 nM，SEQ ID No. 5 所示的 Apt5 与 sST2 蛋白的结合值 Kd 为 188 nM，SEQ ID No. 6 所示的 Apt6 与 sST2 蛋白的结合值 Kd 为 173 nM。

以上对本发明进行了详述。对于本领域技术人员来说，在不脱离本发明的宗旨和范围，以及无需进行不必要的实验情况下，可在等同参数、浓度和条件下，在较宽范围内实施本发明。虽然本发明给出了特殊的实施例，应该理解为，可以对本发明作进一步的改进。总之，按本发明的原理，本申请欲包括任何变更、用途或对本发明的改进，包括脱离了本申请中已公开范围，而用本领域已知的常规技术进行的改变。按以下附带的权利要求的范围，可以进行一些基本特征的应用。

工业应用

本发明采用 MCP-SELEX 技术，结合高通量测序技术及生物信息学分析，降低筛选的轮次并获得候选核酸适配体。进一步分析其亲和性和特异性，得到特异性识别 sST2 蛋白的 ssDNA 适配体。本发明的 ssDNA 适配体具有特异性高、稳定性高、合成方便、易标记功能基团等特点，可特异性识别和结合 sST2 蛋白，用于 sST2 蛋白的检测及生物传感器的制备；同时本发明的 ssDNA 适配体也是 sST2 参与相关疾病的潜在治疗药物，可制备用于临床诊断的试剂或疾病治疗的药物。

本发明为sST2的检测提供了可在体外筛选、可高通量获得、筛选周期短、合成方便且稳定性良好、亲和力高、易修饰和标记的高特异性核酸适配体，所述核酸适配体可化学合成，不依靠生物，价格便宜；且易于保存。同时，本发明的核酸适配体可单独使用或携带相关药物，对sST2参与的疾病的治疗具有开发前景。

权利要求

1. 核酸适配体，其特征在于，所述核酸适配体为下述任一种：
 - A1) 核苷酸序列是 SEQ ID No. 4、6、5、1、2、3、7、8、9 和 10 中的任一单链 DNA；
 - 5 A2) 与 A1) 限定的核苷酸序列具有 75% 或 75% 以上同一性，且特异性识别 sST2 蛋白的任一单链 DNA；
 - A3) 由 A1) 所示的单链 DNA 转录且特异性识别 sST2 蛋白的任一单链 RNA；
 - A4) 在严格条件下与 A1) 或 A3) 限定的核苷酸序列杂交，且特异性识别 sST2 蛋白的任一单链 DNA 或单链 RNA。
- 10 2. 探针，其特征在于，所述探针为权利要求 1 所述的任一核酸适配体被标记物标记得到的物质。
3. 传感器，其特征在于，所述传感器含有权利要求 1 所述的任一核酸适配体或权利要求 2 所述探针。
4. 用于检测 sST2 蛋白的试剂或试剂盒，其特征在于，所述试剂或试剂盒含
15 有权利要求 1 所述的任一核酸适配体或权利要求 2 所述探针。
5. 用于预防、改善或治疗 sST2 相关疾病的药物，其特征在于，所述药物含有权利要求 1 所述的任一核酸适配体或权利要求 2 所述探针。
6. 特异性靶向 sST2 蛋白的载药系统，其特征在于，所述载药系统含有权利要求 1 所述的任一核酸适配体或权利要求 2 所述探针。
- 20 7. 权利要求 1 所述的任一核酸适配体或权利要求 2 所述探针的下述任一种应用：
 - B1) 在制备预防、改善或治疗 sST2 相关疾病的药物或产品中的应用；
 - B2) 在检测 sST2 蛋白或制备检测 sST2 蛋白的产品中的应用；
 - B3) 在制备用于结合 sST2 蛋白的产品中的应用；
 - 25 B4) 在制备用于 sST2 蛋白的体内显像的产品中的应用；
 - B5) 在制备筛查、诊断或辅助诊断 sST2 相关疾病中的应用；
 - B6) 在制备 sST2 相关疾病的预后评估的产品中的应用；
 - B7) 在制备预测 sST2 相关疾病的患者死亡几率的产品中的应用；
 - B8) 在制备评估心力衰竭危险分层的产品中的应用。
- 30 8. 根据权利要求 7 所述的应用，其特征在于，所述 sST2 相关疾病为心血管疾病。
9. 根据权利要求 8 所述的应用，其特征在于，所述心血管疾病包括心力衰竭、动脉粥样硬化、高血压、心肌梗死、冠心病、急性冠脉综合征、主动脉瘤或主动脉夹层。
- 35 10. 一种检测 sST2 蛋白的方法，其特征在于，所述方法包括将报告基团标记在权利要求 1 所述的任一核酸适配体上，使标记了报告基团的核酸适配体与待测样品相互作用，通过对报告基团的信号检测实现对 sST2 蛋白的检测。