

指数富集的配体系统进化技术筛选大肠杆菌表达的人 CD20 胞外蛋白特异性适配体

陈凡¹, 杨凡¹, 高蕾², 胡月¹, 薛云², 周菁^{3*}, 康建华⁴, 王伟^{4*}

1 湖北大学生命科学学院, 湖北 武汉 430062

2 河南科技大学 医学技术与工程学院, 河南 洛阳 471003

3 武汉市肺科医院, 湖北 武汉 430030

4 东莞市长安医院 检验科, 广东 东莞 523843

陈凡, 杨凡, 高蕾, 胡月, 薛云, 周菁, 康建华, 王伟. 指数富集的配体系统进化技术筛选大肠杆菌表达的人 CD20 胞外蛋白特异性适配体[J]. 生物工程学报, 2025, 41(4): 1467-1477.

CHEN Fan, YANG Fan, GAO Lei, HU Yue, XUE Yun, ZHOU Jing, KANG Jianhua, WANG Wei. Screening of the specific aptamer of human CD20 extracellular protein expressed in *Escherichia coli* by systematic evolution of ligands by exponential enrichment[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(4): 1467-1477.

摘 要: CD20 是 B 细胞淋巴瘤表面标志蛋白, 其膜外区是特异性抗体和药物的作用靶点。为了获得靶向 CD20 的特异性适配体, 首先根据密码子简并性对 CD20 胞外区基因进行优化, 使之易于在大肠杆菌中表达; 然后将优化后的基因克隆到 pGEX-4T-1 载体中, 转化到大肠杆菌 BL21(DE3) 中表达; 蛋白纯化后用 SDS-PAGE 和 Western blotting 进行鉴定; 通过指数富集的配体系统进化技术(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)筛选出与融合蛋白特异性结合的 ssDNA 适配体, 并用流式细胞术检测适配体与 CD20 的亲和力; 再通过细胞毒性试验检测适配体抑制 B 淋巴瘤细胞的效果。本研究建立了 CD20 的原核表达方法, 获得了特异性结合 CD20 胞外区蛋白的适配体, 为靶向 CD20 的治疗药物的开发奠定了基础。

关键词: CD20; 基因优化; 原核表达; 指数富集的配体系统进化技术; 适配体

资助项目: 国家自然科学基金(32072899); 武汉市卫健委科研项目(WX23A82)

This work supported by the National Natural Science Foundation of China (32072899), and the Funding for Scientific Research Project from Wuhan Municipal Health Commission (WX23A82).

*Corresponding authors. E-mail: ZHOU Jing, 18627849812@163.com; WANG Wei, wwangsz78@sina.com

Received: 2024-08-07; Accepted: 2024-10-24; Published online: 2024-10-25

Screening of the specific aptamer of human CD20 extracellular protein expressed in *Escherichia coli* by systematic evolution of ligands by exponential enrichment

CHEN Fan¹, YANG Fan¹, GAO Lei², HU Yue¹, XUE Yun², ZHOU Jing^{3*}, KANG Jianhua⁴, WANG Wei^{4*}

¹ Life Science School of Hubei University, Wuhan 430062, Hubei, China

² School of Medical Technology and Engineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, Henan, China

³ Wuhan Pulmonary Hospital, Wuhan 430030, Hubei, China

⁴ Department of Laboratory Medicine, Hospital of Chang'an Dongguan, Dongguan 523843, Guangdong, China

Abstract: CD20 is a surface marker protein of B-cell lymphoma, and its extracellular region is the target of specific antibodies and drugs. To obtain a cheap and easily modified specific preparation targeting CD20, we optimized the gene of CD20 extracellular region according to codon degeneracy to facilitate its expression in *Escherichia coli*. The optimized gene was cloned into pGEX-4T-1 vector, and the recombinant vector was transformed into *E. coli* BL21(DE3) for expression. The purified protein was identified by SDS-PAGE and Western blotting. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) was employed to screen the ssDNA aptamer that specifically binds to the fusion protein, and the affinity of the aptamer to CD20 was detected by flow cytometry. Then, the cytotoxicity test was carried out to examine the inhibitory effect of the aptamer on B lymphoma cells. In this study, we established the prokaryotic expression method of CD20 and obtained the aptamer specifically binding to the extracellular region of CD20, which laid a foundation for the development of therapeutic drugs targeting CD20.

Keywords: CD20; gene optimization; prokaryotic expression; systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX); aptamer

CD20 是 B 细胞特异性膜蛋白, 人 CD20 基因为单拷贝基因, 位于染色体 11q12.13.1 区域^[1]。CD20 分子在细胞外的裸露部分较短, 所以胞外区的抗原表位相对较少^[2], 胞外区是包括利妥昔单抗在内的所有 CD20 单克隆抗体的结合位点^[3]。CD20 在早期 B 淋巴细胞和成熟的 B 淋巴细胞中都有所表达, 但当这 2 种细胞分化为浆细胞时, 便不再继续表达 CD20^[4-6]。已有研究证实在小鼠体内 CD20 分子是治疗 B 细胞淋巴瘤的有效靶点^[7-8]。CD20 抗体具有多种效应功能, 其中包括促进靶细胞中的补体依赖性细胞毒性(complement dependent cytotoxicity,

CDC), CD20 与相应的抗体结合后, 可激活 CDC 反应, 最终形成膜攻击复合物, 导致细胞死亡和清除^[9-10]。为了减少副作用和耐药性, CD20 单克隆抗体已从鼠源优化为人源化单克隆抗体, 并对 Fc 片段进行了糖基化修饰^[3,11-12]。但是, 目前 CD20 单克隆抗体价格仍然昂贵, 患者经济负担重, 限制了其使用, 因此开发廉价的替代物对 CD20 为靶点的治疗具有重要意义。

指数富集配体的系统进化技术(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)是基于进化过程的机制变异、选择以及复制的多学科技术, 涉及不同领域, 如分子生

物学、核酸化学、材料科学和针对各种目标的亲和配体的生物信息学^[13]。筛选得到的适配体 (aptamer) 是一种单链寡核苷酸, 可以折叠成特定的三维结构以识别靶分子, 可特异性结合相应的蛋白, 具有一定的抗体效应, 并且容易大量制备, 易于修饰^[14]。CD20 蛋白通常通过真核细胞表达获得, 耗时且成本高。本研究首先建立了原核表达人 CD20 膜外区蛋白的方法, 然后利用 SELEX 技术从随机 ssDNA 库中分离出高亲和力的 CD20 膜外区蛋白适配体, 并证实了其抑制 B 细胞瘤的效应, 以期为后续以 CD20 为靶点的 B 细胞恶性肿瘤的治疗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株与试剂

pGEX-4T-1 载体、大肠杆菌菌种 DH5 α 及 BL21(DE3) 均为本实验室保存; Taq 酶和其他工具酶均购自北京全式金生物技术股份有限公司; Marker 均购自 MBI 公司; PCR 引物、FITC-引物和 Bio-引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成; Glutathione-Sepharose 4FF 亲和层析树脂购自 Amersham Biosciences 公司; QIAEX II Gel Extraction Kit 购自 Qiaex 公司; 超纯质粒快速小量提取试剂盒购自 BioDev-Tech 公司; PVDF 滤膜购自 Meck Millipore 公司; 兔抗 GST 抗体购自武汉爱博泰克生物科技有限公司; 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 和 SABC 试剂均购自武汉博士德生物工程有限公司; Daudi 和 Hela 细胞株均购自 Procell 公司; RPMI 1640 细胞基础培养基、胎牛血清均购自 Gbico 公司。

1.2 CD20 膜外区基因密码子偏好性改造

分别在网站 <http://www.kazusa.or.jp/codon/> 和 <http://www.gcua.schoedl.de/> 上对 CD20 膜外区原基因序列(471 bp)在大肠杆菌 BL21(DE3) 中的表达情况进行预测和分析, 并根据密码子

兼并性和偏好性, 对密码子进行优化, 使改造后的密码子在保持翻译后氨基酸序列不变的情况下, 能在大肠杆菌中正常翻译。优化前后的序列由通用生物(安徽)股份有限公司合成。

1.3 人源 CD20 膜外区基因优化前后的表达

优化前后 CD20 膜外区扩增引物见表 1, 扩增改造后的 CD20 膜外区基因, 连接至 pGEX-4T-1 载体。将上述载体转化至大肠杆菌 BL21(DE3) 中, 挑取单菌落送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。含有重组融合蛋白原核表达载体的大肠杆菌于 5 mL 含有氨苄青霉素(100 μ g/mL) 的 LB 培养基中[空载对照接种含有 pGEX-4T-1 的 BL21(DE3)], 37 $^{\circ}$ C 培养 12–16 h。将菌液以 1:100 比例转移到 200 mL 含有氨苄青霉素(100 μ g/mL) 的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 培养至 OD₆₀₀ 为 0.6–0.8, 加入 IPTG 诱导表达。

1.4 CD20 融合蛋白的纯化

将重组质粒与质粒载体 pGEX-4T-1 分别转化至 BL21(DE3) 细菌, 培养至对数期, 回收菌体。沉淀用 pH7.4 PBS 洗涤 3 次后, 将菌液放置在冰上, 超声碎菌。离心取上清, 加入 50% Glutathione-Sepharose 4 Fast Flow, 室温轻混。离心弃上清。加入 PBS 洗涤 3 次。再加入 Glutathione Elution Buffer 室温作用 15 min 后离心, 收集的上清中含有所需蛋白, 用 12% SDS-PAGE 进行检测分析。

表 1 本研究所用的引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')
Before optimization	
F1	CGCGGATCCATTAAATTTCCCAT
R1	CCCCTCG AGAGGAGAGCTGTCATT
Post optimality	
F1	CGCGGATCCATCAAGATCAGCCAT
R1	CCCCTCGAGCGGGCTGCTATCATT

1.5 表达产物的 Western blotting 鉴定

纯化后的表达产物经过聚丙烯酰胺凝胶电泳后,通过湿转法转移到聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上。5%脱脂牛奶封闭 2 h,洗涤后加入兔抗 GST 抗体孵育 1 h,洗去非特异性结合后,加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗孵育 1 h。洗涤后用 DAB 显色,观察显色结果。

1.6 适配体的筛选

SELEX 筛选流程参考本课题组前期的工作^[15]。简而言之,先合成随机 80-mer 的 ssDNA,其序列如下: 5'-TACCGGTCCGAGTCACTG-N40-CCGTGTGAGCTCTAGACGTTGA-3',其中 N40 代表基于 A、G、C 和 T 在每个位置均等掺入的随机寡核苷酸。利用 DNA 聚合酶 I Klenow 片段与引物 1 (5'-TACCGGTCCGAGTCACTG-3') 合成互补链。使用引物 1 和引物 2 (5'-TCAACGTCTAGAGCTCACACGG-3') 进行 PCR 扩增 dsDNA 分子。采用不对称 PCR (asymmetric PCR) 获得 ssDNA 随机文库,用 QIAEX II Gel Extraction Kit 收集扩增的 DNA 片段。体外筛选以 GST-CD20-Sepharose 4FF 为阳性靶点, GST-Sepharose 4FF 为非特异性靶点。纯化的 10 μ g ssDNA 库在 85 $^{\circ}$ C 加热 15 min,冰上快速冷却 3 min,在 37 $^{\circ}$ C 结合缓冲液[25 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L KCl, 200 mmol/L NaCl, 0.2 mmol/L EDTA, 5% (体积比)甘油, 0.5 mmol/L DTT]中与 200 μ L GST-Sepharose 4FF 一起孵育 30 min。离心后取上清液与 200 μ L GST-CD20-Sepharose 4FF 在 37 $^{\circ}$ C 混合作用 30 min, 2 000 r/min 离心 3 min,弃上清,沉淀加入 50 μ L 无菌 ddH₂O 稀释,煮沸 5 min,冰冻 3 min,苯酚/氯仿(25:24)提取,上清液作为 PCR 模板,获得 ssDNA 进行下一轮筛选。经过 10 轮筛选后,将适配体库克隆至 pMD-18T 并

测序。筛选期间,用 FITC 标记第 2、4、6、8 和 10 轮适配体库,并用流式细胞仪(Beckman Coulter EPICS ALTRA II)检测各适配体库与 Daudi 细胞的结合能力。

1.7 ELISA

合成 Bio 标记引物,以提取的单克隆质粒为模板扩增适配体。将 2 g/mL GST-CD20 蛋白加入 96 孔板中,每孔加入 100 μ L 0.1 mol/L NaCO₃ (pH 9.6)在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。PBS 洗涤 3 次后,每孔加入 150 μ L 的封闭缓冲液,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h,用 PBS 洗涤 3 次。将 2 μ g 不同克隆适配体和 100 μ L PBS 分别加入孔中,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, PBS 洗涤后,加入 100 μ L Streptavidin-HRP (1:1 000, Innova Biosciences 公司), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,再加入 100 μ L TMB 作用 10 min,在酶联免疫监测仪(山东天研仪器有限公司) 450 nm 下测定每孔吸光度值,设空白对照和试剂对照。每个适配体做 3 个复孔。

1.8 亲和力分析

合成 FITC 标记引物,通过 PCR 获得 FITC 标记的适配体。为了检测适配体与 CD20 的结合力,将 FITC 标记的适配体(10 μ g)与 1×10^6 个 Daudi 细胞在 37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min,然后 2 000 r/min 离心 5 min,弃上清,用流式细胞仪中分析染色的细胞。结合平衡解离常数 K_d 用公式(1)计算:

$$Y = B_{\max} X / (K_d + X) \quad (1)$$

其中: $B_{\max}$ 为最大荧光百分比, Y 为平均荧光百分比, X 为分子 mol 浓度。

1.9 适配体功能分析

用含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养液培养 Daudi 细胞和 HeLa 细胞,分别制成单个细胞悬液,将 Daudi 细胞和 HeLa 细胞按 1×10^4 个/孔接种 96 孔培养板,每孔体积 180 μ L;然后分别加入不同浓度的适配体 SW11,每个浓度设 3 个平行孔,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养 72 h;每孔加二甲基噻唑二苯基四唑溴盐 (methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium

bromide, MTT)溶液(5 mg/mL,用 PBS 缓冲液 pH 7.4 配制) 20 μ L。继续孵育 4 h 后, 3 000 r/min 离心 10 min 后弃上清液, 每孔加 200 μ L DMSO, 振荡 10 min, 应用酶联免疫监测仪在 490 nm 波长测定各孔光吸收值, 记录结果。

1.10 数据分析

统计分析采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行多组间单因素方差分析或两组间 Student's *t* 检验。 $P<0.05$ 为有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 CD20 膜外区在大肠杆菌中的表达及检测

扩增未优化的 CD20 膜外区基因(图 1A), 两端引入了 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点, 连接到

pGEX-4T-1 后转染 BL21(DE3), 之后扩大培养, $OD_{600}=0.6$ 时, 按照正交实验方案, 加入不同浓度 IPTG 诱导不同时间, 并且设置梯度培养温度。收集菌体, 超声破菌后离心收集上清, 12% SDS-PAGE 检测分析其表达状态。结果发现在 44 kDa 处没有出现目的蛋白条带, 与空载表达的蛋白相比, 也没有出现 GST 蛋白条带(图 1B)。说明人源 CD20 膜外区基因不能在大肠杆菌中正常表达。为了进一步了解 CD20 膜外区基因的表达情况, 对上述表达物用亲和层析纯化, 再用 SDS-PAGE 检测。结果发现, 空载蛋白纯化后在 29 kDa 处有 GST 蛋白条带; 重组质粒表达产物在 44 kDa 未出现 GST-CD20 膜外区融合蛋白, 也未出现 GST 蛋白条带, 证明 CD20 蛋白膜外区没有表达(图 1C)。

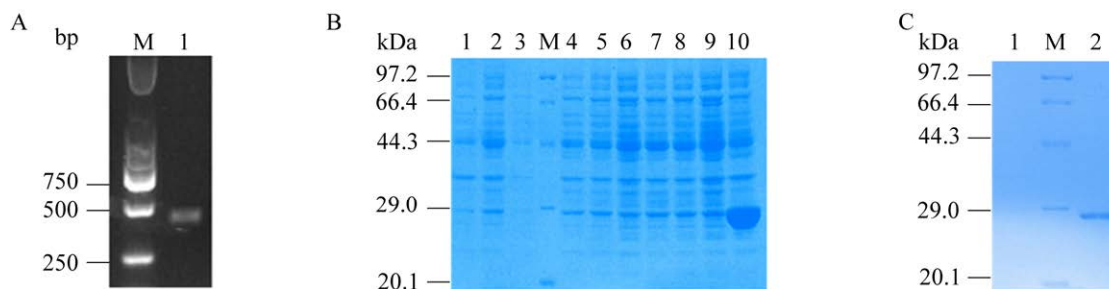


图1 基因优化前CD20膜外区蛋白的表达 A:PCR扩增CD20膜外区基因471 bp片段。B:SDS-PAGE检测包涵体中CD20蛋白膜外区的表达。1、2和3分别是在37℃用0.2、0.5和1.0 mmol/L IPTG诱导4、5和12 h的蛋白表达; 4、5和6分别是在26℃用0.2、0.5和1.0 mmol/L IPTG诱导4、5和12 h的蛋白表达; 7、8与9分别是在16℃用0.2、0.5和1.0 mmol/L IPTG诱导4、5和12 h的蛋白表达; 10为空载pGEX-4T-1的表达产物。C:蛋白纯化后SDS-PAGE分析。1为26℃用0.5 mmol/L IPTG诱导5 h后的包涵体用Glutathione-Sepharose 4FF亲和层析纯化后样品; 2为空载pGEX-4T-1的表达产物纯化后样品。M:蛋白marker。

Figure 1 CD20 membrane protein expression before gene optimization. A: A 471 bp fragment of CD20 outer membrane region gene was amplified by PCR. B: SDS-PAGE detection of CD20 membrane protein expression. 1, 2 and 3 were the sample obtained by 0.2, 0.5 and 1.0 mmol/L IPTG induction 4, 5 and 12 h at 37 $^{\circ}$ C, respectively; 4, 5 and 6 were induced with 0.2, 0.5 and 1.0 mmol/L IPTG for 4, 5 and 12 h at 26 $^{\circ}$ C, respectively; 7, 8 and 9 were induced with 0.2, 0.5 and 1.0 mmol/L IPTG for 4, 5 and 12 h at 16 $^{\circ}$ C, respectively; 10 was the expression sample of pGEX-4T-1. C: SDS-PAGE analysis after protein purification. 1 was purified sample with 0.5 mmol/L IPTG induction for 5 h at 26 $^{\circ}$ C; 2 was purified sample of pGEX-4T-1. M: Protein marker.

2.2 CD20 膜外区基因密码子偏好性优化改造

经过密码子偏好性分析,发现 CD20 蛋白膜外区密码子在大肠杆菌原核表达系统中不能正常翻译,红色标记的碱基所在的密码子在大

肠杆菌中使用频率很低,被翻译的可能性极小。为了确保 CD20 膜外区密码子在大肠杆菌表达系统中能顺利识别,对膜外区核酸序列进行了优化改造,改造前后氨基酸序列(N₁₄₁-N₂₉₇, 471 bp)没有改变(表 2)。

表 2 CD20 蛋白膜外区核酸序列优化前后对比

Table 2 Comparison of CD20 protein extracellular domain nucleic acid sequence before and after optimization

	Nucleic acid sequence (N ₁₄₁ -N ₂₉₇)
Before optimization	ATTAAATTTCCCATTTTTTAAAAATGGAGAGICTGAATTTTATTAGAGCTCACACACCA
After optimization	ATCAAGATCAGCCATTTTCTGAAAATGGAAAGTCTGAATTCATCCGCGCACATACCCCG
Amino acid	I K I S H F L K M E S L N F I R A H T P
Before optimization	TATATTAACATATACAACGTGTGAACAGCTAATCCCTCTGAGAAAACTCCCCATCTACC
After optimization	TATATTAATACTATAATTGCGAACCAGGCCAATCCGAGCGAAAAGAATAGTCCGAGTACC
Amino acid	Y I N I Y N C E P A N P S E K N S P S T
Before optimization	CAATACTGTTACAGCATAACAATCTCTGTTCTTGGGCATTTTGTGAGTATGCTGATCTTTGCCTCTTC
After optimization	CAGTATTGCTATAGCATTCAGAGTCTGTTCTTGGGCATTTCTGAGTGTATGCTGATTTTGCATTTTC
Amino acid	Q Y C Y S I Q S L F L G I L S V M L I F A F F
Before optimization	CAGGAACCTGTAATAGCTGGCATCGTTGAGAATGAATGGAAAAGAACGTGCTCCAGACCCAAA
After optimization	CAGGAACCTGGTATTGCGGCCATTGTTGAAAATGAATGGAAACGCACCTGTAGTCCGCCGAAA
Amino acid	Q E L V I A G I V E N E W K R T C S R P K
Before optimization	TCTAACATAGTTCTCCTGTCAGCAGAAGAAAAAAGAACAGACTATTGAAATAAAAGAA
After optimization	AGTAATATTGTGCTGCTGAGTGCCGAAGAAAAGAAAGAACAGACCATTTGAAATTAAGGAA
Amino acid	S N I V L L S A E E K K E Q T I E I K E
Before optimization	GAAGTGGTTGGGCTAACTGAAACATCTTCCCAACCAAAGAAATGAAGAAGACATTGAAATTATT
After optimization	GAAGTTGTTGGCCTGACCGAAACCAGTAGTCAGCCGAAAAATGAAGAAGATATTGAAATTATC
Amino acid	E V V G L T E T S S Q P K N E E D I E I I
Before optimization	CCAATCCAAGAAGAGGAAGAAGAAGAAACAGAGACGAACCTTCCAGAACCTCCCCAAGAT
After optimization	CCTATCCAGGAAGAAGAAGAAGAGGAAACCGAAACCAATTTTCCGGAACCGCCGCGAGGAT
Amino acid	P I Q E E E E E E T E T N F P E P P Q D
Before optimization	CAGGAATCCTCACCAATAGAAAATGACAGCTCTCCT
After optimization	CAGGAAAGCAGTCCGATTGAAAATGATAGCAGCCCG
Amino acid	Q E S S P I E N D S S P

2.3 CD20 膜外区基因优化后的克隆表达及鉴定

合成改造后的 CD20 蛋白膜外区序列,设计引物扩增优化后基因,两端引入了 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点。将目的基因连接到 pGEX-4T-1 载体中,转化到感受态大肠杆菌 BL21(DE3)中表达。结果发现 16 °C 培养,用 1.0 mmol/L IPTG 诱导 20 h,细菌裂解上清和沉淀包涵体中均有 CD20 膜外区蛋白表达(图 2A)。用亲和层析方法纯化目的蛋白,纯化之后的蛋白溶液用 SDS-PAGE 检测,可在 44 kDa 处可看到 GST-CD20 膜外区融合蛋白,29 kDa 处可看到 GST 蛋白的表达(图 2B)。纯化蛋白电泳后转膜,进行 Western blotting 检测,发现在 29 kDa 和 44 kDa 处均有目的条带,进一步证实融合蛋白得到了表达,表明了 CD20 膜外区经基因优化改造后,可以在原核中顺利表达(图 2C)。

2.4 SELEX

SELEX 筛选流程图如图 3A 所示。在筛选中以 GST-CD20/471 融合蛋白为正向筛选靶标,GST 作为非特异性靶标进行反筛。每轮筛选后,

用富集的 ssDNA 扩增 dsDNA,以利于保存,并以 dsDNA 为模板扩增下一轮筛选的 ssDNA 随机文库(图 3B)。为验证特异性适配体的富集和进化效果,经过 10 轮筛选后,用 FITC 标记的引物扩增第 2、4、6、8、10 轮适配体库,采用流式细胞术检测适配体库与 Daudi 细胞的结合能力。结果显示,随着筛选轮数的增加,ssDNA 库与 Daudi 细胞的结合能力也会增加(图 3C)。这表明随着筛选的进行,非特异性 ssDNA 逐渐减少,而特异性 ssDNA 逐渐得到富集。重复试验统计分析也证实随着筛选轮数的增加,特异性适配体得到了富集(图 3D)。

2.5 适配体序列分析及 ELISA 测定

将第 10 轮筛选得到的 dsDNA 库克隆到 T 载体中,之后转入 DH5 α 中,挑取 50 个克隆进行测序,测序成功的有 33 个。用 DNAMAN 软件分析 33 个测序结果,结果发现可将 33 个克隆分为 3 个群。第 1 群中包括适配体 SW3、SW6、SW7、SW8、SW11、SW12、SW13、SW15、SW20 和 SW21,同源性达到 67%,共有的碱基序列为 C·AG·AG·G·G·····A,提示这些位点可

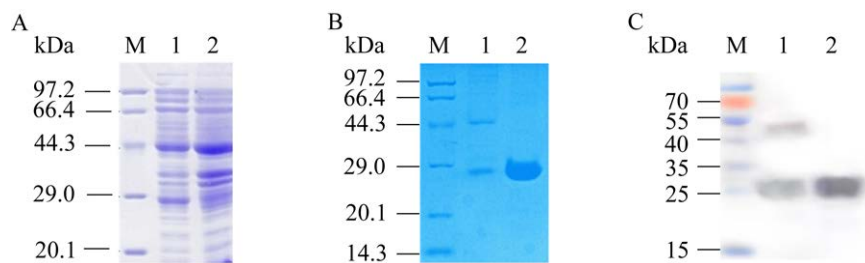


图 2 基因优化后 CD20 膜外区蛋白的表达与鉴定 A: SDS-PAGE 检测细菌裂解上清液和包涵体中 CD20 膜外区蛋白。1: 上清液; 2: 包涵体。B: 纯化后 GST-CD20 融合蛋白与 GST 蛋白的电泳检测。1: 融合蛋白; 2: GST 蛋白。C: GST-CD20 融合蛋白与 GST 蛋白的 Western blotting 分析。1: 融合蛋白; 2: GST 蛋白。M: 蛋白 marker。

Figure 2 CD20 membrane outer protein expression and identification after genetic optimization. A: CD20 membrane protein in bacterial lysate supernatant and inclusion bodies was detected by SDS-PAGE. 1: Supernatant; 2: Inclusion body. B: GST-CD20 fusion protein after purification and GST protein after purification served as the negative control. 1: Fusion protein; 2: GST protein. C: Western blotting analysis of GST-CD20 fusion protein and GST protein after purification. 1: Fusion protein; 2: GST protein. M: Protein marker.

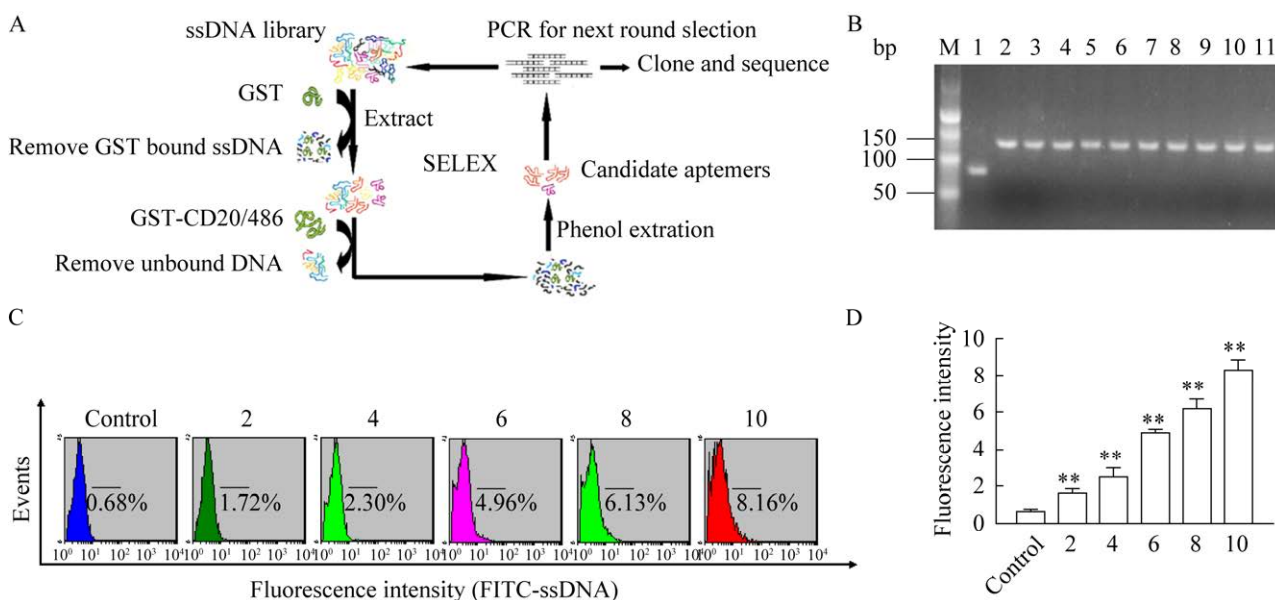


图 3 适配体的筛选 A: SELEX 筛选流程图; B: dsDNA 和 ssDNA 的 PCR 扩增; C: 流式细胞仪检测第 2、4、6、8 和 10 轮适配体库与 Daudi 细胞的结合; D: 适配体库的结合能力统计分析。每组实验重复 6 次, 实验数据用 Prism 9.0 软件进行单一性方差分析。**代表 $P < 0.01$ 。

Figure 3 Aptamer screening. A: Screening flow chart of SELEX; B: dsDNA and ssDNA PCR amplification; C: Comparison of binding ability between the second, fourth, sixth, eighth and tenth rounds of screening adaptor libraries and Daudi cells; D: Statistical analysis of binding ability of different selection round libraries. Each group of experiments was repeated six times and Prism 9.0 software was used to analyze the experimental data. ** represents $P < 0.01$.

能与其特异性结合有关, 其中 SW11 出现频率最高, 达到 4 次。第二群适配体包括 SW2、SW9、SW14、SW16、SW19 和 SW23, 共有的碱基序列为 AG·····C·····A·····T (每个点代表 1 个碱基), 其中 SW9 出现 3 次。第 2 群适配体与第 1 群适配体的差别较大, 提示第 2 群适配体与第 1 群适配体与 CD20 膜外区结合的是不同的位点, 推测 CD20 膜外区不只有 1 个表位。第 3 群适配体同源性较低, 可能是一些尚未进化充分的非特异性适配体(图 4A)。对 SW9 和 SW11 进行结构预测, 并对保守性位点进行标记(图 4B)。通过 ELISA 检测了单适配体与 CD20 膜外蛋白的结合能力, 结果显示, 经过筛选后的单适配体均与 CD20/471 蛋白有一定的结合能力,

但是不同适配体的结合能力不同, 其中 SW11 的结合能力最高, 这一结果与 SW11 出现频率最高一致, 进一步证明了 SELEX 筛选是成功的, SW11 是特异性最高的单适配体(图 4C)。

2.6 适配体的解离常数

解离常数 K_d 测定可以表明适配体与 Daudi 细胞的结合能力。选取单适配体 SW1、SW5、SW9、SW11、SW12 和 SW19 分别测定解离常数。结果显示, SW11 与 Daudi 细胞的结合能力最强, 与 SW11 同源性较高的 SW12 的解离常数也较低。此外, SW9 和 SW19 也与 Daudi 细胞的解离常数也较低。而 SW1 和 SW5 的解离常数较高(表 3)。上述数据进一步说明 CD20 膜外蛋白可能存在 2 个表位。

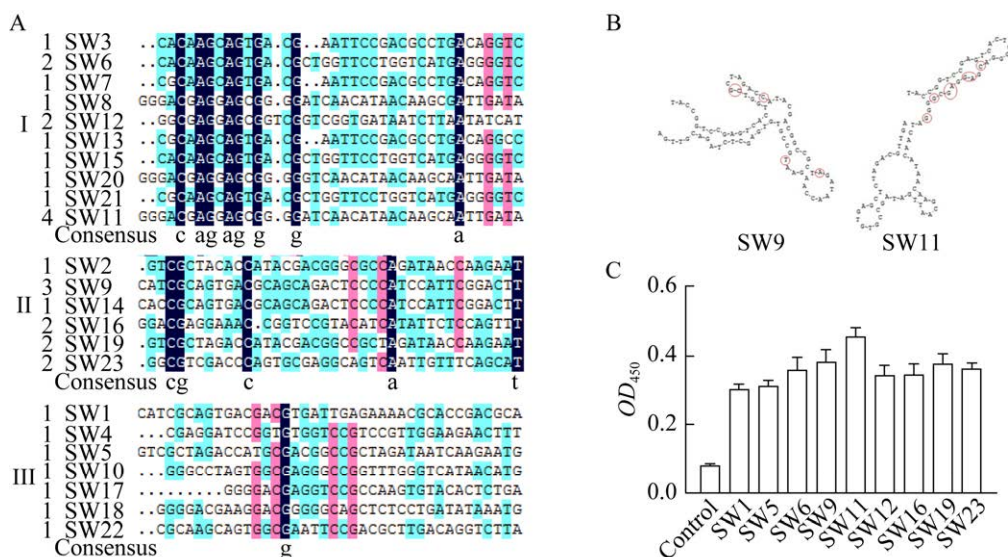


图 4 适配体分析 A: 适配体序列同源性分析; B: 适配体 SW9 与 SW11 的二级结构及保守序列分析; C: 单适配体与 CD20 膜外蛋白结合能力检测。

Figure 4 Analysis of the aptamer. A: Comparative analysis of the homology of aptamers; B: Secondary structure and conserved sequence analysis of aptamers SW9 and SW11; C: ELISA detection results of the interaction between single aptamer and CD20 extracellular protein.

表 3 适配体解离常数测定

Table 3 Binding affinity of the selected aptamer

Aptamer	K _d (nmol/L)
SW1	118±37
SW5	105±31
SW9	35±17
SW11	28±6
SW12	38±21
SW19	45±18

2.7 MTT 法测定适配体对 Daudi 细胞的抑制作用

为了检验适配体是否对 Daudi 细胞有抑制作用,以 PBS 为阴性对照,同时以 HeLa 细胞作对照,用 MTT 法测定了 SW11 对 Daudi 细胞的细胞毒性。结果显示,SW11 对 Daudi 细胞生长有抑制作用,而 SW11 对 HeLa 细胞的生长影响较弱,并且随着 SW11 的浓度升高,对 Daudi 细胞生长的抑制作用也越强,说明 SW11 对 Daudi 细胞生长抑制呈剂量依赖性(图 5)。

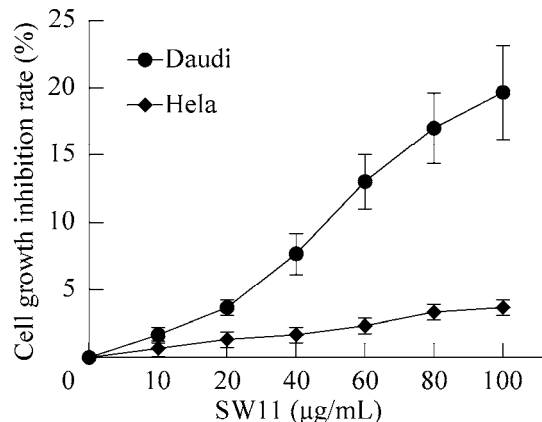


图 5 MTT 检测适配体对 Daudi 细胞的抑制作用
Figure 5 Inhibitory effect of the aptamer on Daudi cells analyzed by MTT assay.

3 讨论与结论

由于 CD20 在恶性 B 细胞表面的表达特点及与抗体结合不发生内吞作用,研究人员已经将其作为免疫治疗非何杰金氏淋巴瘤的靶点。

石梅等^[16]通过构建真核表达载体,在 HEK293T 细胞中成功表达了 CD20 蛋白,但操作繁琐、经济成本高。为了更加省时便利地获得 CD20 蛋白,急需寻找一种高效便捷的表达方法。洪海燕等^[17]尝试通过构建原核表达载体,在大肠杆菌中表达 CD20 蛋白,但是 CD20 蛋白以不可溶形式存在于包涵体中,难以纯化。大肠杆菌蛋白表达系统是最常用的蛋白表达系统,但 CD20 膜外区蛋白不能在大肠杆菌中正常表达(图 1)。为了使 CD20 膜外区基因能适应原核表达系统,本研究根据密码子的偏好性,对 CD20 蛋白膜外区基因密码子进行改造,保证最终编码的氨基酸序列不发生改变(表 2),改造后的 CD20 膜外区基因可在大肠杆菌中正常表达(图 2)。

淋巴瘤目前通常采用单抗联合化疗的方式进行治疗,但 B 细胞可能对这些治疗药物产生耐药性或治疗药物可能存在脱靶效应^[18]。而且单抗药物目前普遍比较昂贵,患者经济负担重。适配体因其良好的亲和力和靶向性,已成为药物递送系统领域的重要靶分子,并逐渐成为基础研究向临床应用的重要环节。本研究以 GST-CD20/471 融合蛋白为正向筛选靶标, GST 作为非特异性靶标,成功筛选出了特异性结合 CD20 膜外蛋白的适配体(图 3 和图 4),并对单适配体的亲和能力进行了测定(表 3),证实了 SW11 对 Daudi 细胞的生长具有一定的抑制作用(图 5)。虽然适配体具有与单抗类似的靶向性,但不能像单抗一样能诱导补体依赖的细胞毒效应。不过适配体具有易于制备、价格低廉、易于修饰等优点。金纳米粒链接的适配体探针具有灵敏度高、速度快、选择性好等优点,在食品中检测金黄色葡萄球菌具有巨大的潜力^[19]。而核酸适配体介导的光动力疗法、光热疗法和免疫治疗策略在肿瘤治疗中也展示了诱人的前景^[20-21]。

本研究成功对人源的 CD20 膜外区基因进行了优化改造,使之能在大肠杆菌中顺利表达,从而建立了一种快速表达纯化 CD20 膜外区蛋白的方法。同时,筛选到了特异性结合 CD20 膜外区蛋白的适配体,为基于 CD20 为靶点的机制研究,药物制备和药物筛选等奠定了基础。

作者贡献声明

陈凡:方案设计、初稿写作;杨凡:实验操作;高蕾:数据管理;胡月:实验操作;薛云:稿件润色修改;周菁:数据管理、提供材料;康健华与王伟:监督指导。

作者利益冲突公开声明

作者声明没有任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] LIANG Y, BUCKLEY TR, TU L, LANGDON SD, TEDDER TF. Structural organization of the human MS4A gene cluster on Chromosome 11q12[J]. *Immunogenetics*, 2001, 53(5): 357-368.
- [2] 刘银星, 杨纯正. CD20 分子与靶向治疗[J]. *生命的化学*, 2003, 23(1): 60-62.
- [3] LIU YX, YANG CZ. CD20 and targeting therapy[J]. *Chemistry of Life*, 2003, 23(1): 60-62 (in Chinese).
- [4] PEROSA F, FAVOINO E, CARAGNANO MA, PRETE M, DAMMACCO F. CD20: a target antigen for immunotherapy of autoimmune diseases[J]. *Autoimmunity Reviews*, 2005, 4(8): 526-531.
- [5] CLARK EA, SHU G. Activation of human B cell proliferation through surface Bp35 (CD20) polypeptides or immunoglobulin receptors[J]. *Journal of Immunology*, 1987, 138(3): 720-725.
- [6] CLARK EA, LEDBETTER JA. Activation of human B cells mediated through two distinct cell surface differentiation antigens, Bp35 and Bp50[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1986, 83(12): 4494-4498.
- [7] CLARK EA, SHU G, LEDBETTER JA. Role of the Bp35 cell surface polypeptide in human B-cell activation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1985, 82(6): 1766-1770.
- [8] GONG Q, OU QL, YE SM, LEE WP, CORNELIUS J, DIEHL L, LIN WY, HU ZL, LU YM, CHEN YM, WU Y, MENG YG, GRIBLING P, LIN ZH, NGUYEN K, TRAN T, ZHANG YF, ROSEN H, MARTIN F, CHAN

- AC. Importance of cellular microenvironment and circulatory dynamics in B cell immunotherapy[J]. *Journal of Immunology*, 2005, 174(2): 817-826.
- [8] HAMAGUCHI Y, UCHIDA J, CAIN DW, VENTURI GM, POE JC, HAAS KM, TEDDER TF. The peritoneal cavity provides a protective niche for B1 and conventional B lymphocytes during anti-CD20 immunotherapy in mice[J]. *Journal of Immunology*, 2005, 174(7): 4389-4399.
- [9] GOLAY J, MANGANINI M, RAMBALDI A, INTRONA M. Effect of alemtuzumab on neoplastic B cells[J]. *Haematologica*, 2004, 89(12): 1476-1483.
- [10] RICKLIN D, HAJISHENGALLIS G, YANG K, LAMBRIS JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis[J]. *Nature Immunology*, 2010, 11(9): 785-797.
- [11] WIERDA WG, KIPPS TJ, MAYER J, STILGENBAUER S, WILLIAMS CD, HELLMANN A, ROBAK T, FURMAN RR, HILLMEN P, TRNENY M, DYER MJS, PADMANABHAN S, PIOTROWSKA M, KOZAK T, CHAN G, DAVIS R, LOSIC N, WILMS J, RUSSELL CA, OSTERBORG A, et al. Ofatumumab as single-agent CD20 immunotherapy in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia[J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2010, 28(10): 1749-1755.
- [12] LIM SH, BEERS SA, FRENCH RR, JOHNSON PWM, GLENNIE MJ, CRAGG MS. Anti-CD20 monoclonal antibodies: historical and future perspectives[J]. *Haematologica*, 2010, 95(1): 135-143.
- [13] KOHLBERGER M, GADERMAIER G. SELEX: Critical factors and optimization strategies for successful aptamer selection[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2022, 69(5): 1771-1792.
- [14] JI CL, WEI JY, ZHANG L, HOU XR, TAN J, YUAN Q, TAN WH. Aptamer-protein interactions: from regulation to biomolecular detection[J]. *Chemical Reviews*, 2023, 123(22): 12471-12506.
- [15] CHEN F, ZHOU J, LUO FL, MOHAMMED AB, ZHANG XL. Aptamer from whole-bacterium SELEX as new therapeutic reagent against virulent *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, 357(3): 743-748.
- [16] 石梅, 年四季, 高燕, 鄢于川, 宋章永, 王明雪, 袁青. 可溶性 CD20 在 HEK293T 细胞中的高效表达[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2018, 34(10): 870-875.
- SHI M, NIAN SJ, GAO Y, WU YC, SONG ZY, WANG MX, YUAN Q. The efficiently expression of soluble CD20 in HEK293T cells[J]. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2018, 34(10): 870-875 (in Chinese).
- [17] 洪海燕, 舒翠玲, 郭燕翔, 王建安, 沈倍奋. 人 CD20 胞外区基因在原核系统中的表达[J]. *免疫学杂志*, 2000, 16(3): 172-174.
- HONG HY, SHU CL, GUO YX, WANG JA, SHEN BF. Cloning and fusion expression of human CD20 in *Escherichia coli*[J]. *Immunological Journal*, 2000, 16(3): 172-174 (in Chinese).
- [18] ADEM J, ERAY M, EEVA J, NUUTINEN U, PELKONEN J. Advantages of targeting B cell receptor complex to treat B-cell derived autoimmune diseases and lymphomas[J]. *Molecular Immunology*, 2017, 88: 135-137.
- [19] CHENG JJ, WEI XR, WANG L, CHEN HQ. Construction of UCNPs-aptamer-AuNPs luminescence energy transfer probe for ratio detection of *Staphylococcus aureus*[J]. *Luminescence*, 2024, 39(7): e4829.
- [20] YAN BS, LI YT, HE SM. Aptamer-mediated therapeutic strategies provide a potential approach for cancer[J]. *International Immunopharmacology*, 2024, 136: 112356.
- [21] YANG YB, ZHANG J, LIU SH, ZHANG X, BAI ZM, WANG S, LI K, SHI M, LIU ZW, WANG JD, LI J. Nanoparticles loaded with β -Lapachone and Fe^{3+} exhibit enhanced chemodynamic therapy by producing H_2O_2 through cascaded amplification[J]. *Biomedical Materials*, 2024, 19(2): 025024.