

丙型肝炎病毒 NS3 螺旋酶寡核苷酸 适配子的筛选与鉴定*

詹林盛 卓海龙 王会中 彭剑淳 王全立**

(军事医学科学院输血医学研究所, 北京 100850)

摘要 为筛选和鉴定抗丙型肝炎病毒 (HCV) NS3 螺旋酶 (NS3h) 的寡核苷酸适配子 (aptamers). 利用 SELEX 技术, 以 HCV NS3h 为靶分子, 从体外合成的 81 bp 随机单链 DNA 文库中筛选与 HCV NS3h 特异结合的寡核苷酸适配子. 克隆测序后, 进行解离常数 (K_d) 测定和 Clustal W 软件包分析适配子一级结构. 经过 8 轮循环筛选, 随机 ssDNA 库与 HCV NS3h 的结合率从 0.45% 上升到 29.5%. 所有的一级结构没有共同的同源序列, 但可分 5 个家族, 其中 4 个家族具有共同的保守序列. 解离常数测定表明, 寡核苷酸适配子 H2 与 HCV NS3h 特异结合的亲和力最高, K_d 值为 140 nmol/L. 适配子 H2 (10 μ mol/L) 在体外对 HCV NS3h 的活性具有一定的抑制作用, 抑制率达 44%. 利用随机寡核苷酸文库获得了抗 HCV NS3h 的寡核苷酸适配子.

关键词 丙型肝炎病毒, NS3 螺旋酶, SELEX, 寡核苷酸适配子

学科分类号 Q782

丙型肝炎病毒 (HCV) 非结构蛋白 NS3, 是 HCV 基因组编码的一种最为重要的具有多种生物学活性的非结构蛋白质, 含有 631 个氨基酸. NS3 N 端 1/3 具有丝氨酸蛋白酶活性, 负责 NS3/NS4A/NS4B/NS5A/NS5B 等位点的切割, 在 HCV 蛋白的成熟过程中具有重要作用. NS3 C 端 2/3 (181~631 个氨基酸) 具有 RNA 螺旋酶和 NTP 酶活性, NTP 酶水解 NTP, 为 RNA 螺旋酶解旋过程提供能量. RNA 螺旋酶对 RNA-RNA 链、DNA-DNA 链、DNA-RNA 链具有相同的解旋能力, 可使 HCV RNA 的二级结构打开以利于正、负链 RNA 的复制和翻译过程, 与 HCV 的复制和翻译过程密切相关, 是抗 HCV 药物设计的潜在靶位点^[1,2].

本文以 HCV NS3h 蛋白为靶分子, 利用 SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) 技术从随机 ssDNA 文库筛选 HCV NS3h 特异结合的寡核苷酸适配子 (aptamers), 并对所筛选出的适配子结构和功能进行了初步分析, 为进一步筛选以寡核苷酸适配子为基础的 HCV 治疗药物奠定基础.

1 材料和方法

1.1 实验试剂

HCV NS3h 蛋白为重组纯化蛋白, 纯度在

90% 以上 (本室制备). Taq DNA 聚合酶、T 载体、T4 多核苷酸激酶、DNA 提取试剂盒、链亲和素磁珠购自 Promega 公司; [γ -³²P] ATP 购自北京亚辉公司; 硝酸纤维素膜 (0.45 μ m, HAWP, Millipore); 大肠杆菌 JM109 为本室保存; tRNA、BSA 购自华美生物有限公司. 其他试剂为国产分析纯.

1.2 随机 ssDNA 文库的构建和引物合成

构建了长度为 81 nt 的随机 ssDNA 文库, 两端为固定序列, 中间 35 个核苷酸为随机序列, 库容量大约为 10^{15-16} , 5' CCCCTGCAGGTGATTTTGC TCAAGT- (N35)-AGTATCGCTAATCAGCGGAT 3'. 上游引物为 5' CCCCTGCAGGTGATTTTGTCT AAGT 3', 下游引物的 5' 端标记生物素为 5' biotin-ATCCGCCTGATTAGCGATACT 3', 下游测序引物为 5' ATCCGCCTGATTAG CGATACT 3'. 随机 ssDNA 文库和引物由上海生工生物公司合成.

1.3 SELEX 筛选

HCV NS3h 蛋白包被于 Nunc96 孔酶联微孔板上, 4℃ 过夜, 包被液为 0.05 mol/L NaHCO₃, pH 9.6 的缓冲液, 同时设空白对照孔. NS3h 蛋白包

*国家自然科学基金资助项目 (30200352).

** 通讯联系人.

Tel: 010-66931292, E-mail: wangql77@hotmail.com

收稿日期: 2004-09-21, 接受日期: 2004-11-28

被孔和空白对照孔均以 3% BSA 37℃ 封闭 2 h. 随机 ssDNA 库和一定量的 tRNA 先在结合缓冲液 (SHCMK 液: 20 mmol/L Hepes pH 7.35, 120 mmol/L NaCl, 5 mmol/L KCl, 1 mmol/L CaCl₂, 1 mmol/L MgCl₂) 中, 与经 3% BSA 封闭的空白对照孔 37℃ 结合 40 min, 反筛去除与 BSA 结合的 ssDNA, 然后转移到 HCV NS3h 蛋白包被孔与 NS3h 蛋白 37℃ 结合 40 min; 用冲洗缓冲液 (SHCMK 液, 0.05% Tween 20) 洗 6 次, 洗去未结合的 ssDNA; 再加洗脱缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, 4 mol/L 异硫氰酸胍, 1 mmol/L DTT, pH 8.3) 于 80℃ 作用 10 min, 洗脱下与 NS3h 蛋白结合的 ssDNA, 经酚: 氯仿抽提、乙醇沉淀, 将 ssDNA 溶解于 20 μl TE 缓冲液中. 将 ssDNA 用标记生物素的引物经 PCR 扩增成一端带生物素的 dsDNA, PCR 反应体系为: 模板 5 μl, 10×PCR 缓冲液 10 μl, MgCl₂ 6 μl, dNTPs 100 μmol/L, Taq 酶 2 U, 上游引物、下游 5' 端生物素标记引物各 50 pmol, 加去离子水至 100 μl; PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 3 min, 然后进行循环 94℃ 变性 30 s, 65℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 最后 72℃ 延伸 7 min. 一端带生物素的 dsDNA 通过生物素 - 链亲和素之间的作用与链亲和素磁珠结合, 经结合缓冲液洗 3 次后, 用 0.15 mol/L 的 NaOH 37℃ 变性 15 min, 使不带生物素的一条 ssDNA 从链亲和素磁珠上洗脱下来, 经无水乙醇沉淀, TE 缓冲液溶解, 测定 A 值, 用作下一轮筛选的 ssDNA 库. 当以微孔板为介质筛选至第 6 轮时, 使用凝胶阻滞方法分离与靶蛋白结合的适配子. 而第 7、8 轮继续使用微孔板为介质进行筛选^[9].

1.4 凝胶阻滞试验

在微量离心管中加入 [γ-³²P] ATP 末端标记的 ssDNA 文库 25 pmol, 10×结合缓冲液 (100 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 0.5 mol/L NaCl, 10 mmol/L DTT, 10 mmol/L EDTA, 50% 甘油) 2 μl, HCV NS3h 蛋白 0.5 μg, 加水至 20 μl, 轻轻混合, 置室温 30 min. 在上述反应体系中加入 4 μl 载样缓冲液, 混匀后上样于聚丙烯酰胺凝胶样品孔中, 恒压 120 V 电泳, 电泳缓冲液为 0.25×TBE. 电泳结束后取下凝胶, 用一张保鲜膜覆盖上, 将凝胶置暗盒中, 置 -70℃ 放射自显影.

1.5 克隆与测序

经 8 轮筛选得到的 ssDNA, 用上游引物 and 下游测序引物经 PCR 扩增成 dsDNA, 回收纯化后连

T 载体, 经蓝白斑筛选, 随机挑选 25 个克隆进行序列测定, 序列测定由上海博亚生物公司进行. 并用 Clustal W 软件分析寡核苷酸适配子一级结构.

1.6 寡核苷酸适配子与 HCV NS3h 蛋白结合亲和力测定

5' 端标记 [γ-³²P] ATP 的寡核苷酸适配子 10 pmol 与不同浓度的 HCV NS3h 蛋白在结合缓冲液中, 37℃ 作用 40 min 后, 将样品抽滤于硝酸纤维素滤膜上, 用 5 ml 结合缓冲液冲洗后, 将滤膜烤干, 取下置于闪烁杯中, 加入 PPO-POPOP-二甲苯液 3 ml, 用 Beckman LS 5000CE 型液体闪烁仪测定其放射性. Scatchard 作图分析测定解离常数 (K_d) 值.

1.7 HCV NS3 螺旋酶活性测定

dsDNA 底物的制备: 合成两条寡核苷酸链, A 链 39 nt 为 5' GCTGACCCTGCTCCCAATCGT AATCTATAGTGTACCTA 3', B 链 20 nt 为 5' CGATTGGGAGCAGGGTCAGC 3'. 在 B 链的 5' 端以 [γ-³²P]ATP 进行同位素标记, 并经 Sephadex G-25 凝胶柱纯化. 将 A 链与 B 链以 3:1 的比例于含有 2 mmol/L HEPES, 0.05 mol/L NaCl, 0.1 mmol/L EDTA, 0.01% SDS 的缓冲液中混合, 100℃ 加热 5 min, 使之充分变性, 接着于 65℃ 孵育 30 min, 然后在 22℃ 复性 4 h. 已配对好的 dsDNA 底物置 -20℃ 保存.

NS3 螺旋酶活性测定^[4]: 在 20 μl 反应体系中加 5 nmol/L dsDNA 底物, 800 nmol/L 的 HCV NS3h 蛋白, 在反应缓冲液 (25 mmol/L pH 7.0, 5 mmol/L ATP, 4 mmol/L MnCl₂, 2 mmol/L DTT, 0.1 mg/ml BSA) 中 37℃ 作用一定时间, 然后加入 5 μl 5×上样缓冲液使反应终止, 上样于 12% 聚丙烯酰胺凝胶样品孔中, 恒压 120 V 电泳, 电泳缓冲液为 0.5×TBE. 电泳结束后取下凝胶, 用一张保鲜膜覆盖上, 将凝胶置暗盒中, 放射自显影. 通过使用 ImageQuant 软件 PhosphorImage 定量分析解链率.

2 结 果

2.1 HCV NS3h 特异结合寡核苷酸适配子的 SELEX 筛选

8 轮 SELEX 筛选所加 HCV NS3h 蛋白、ssDNA 文库、tRNA 量见表 1.

Table 1 HCV NS3h protein, ssDNA pool and tRNA input in 8 rounds selection

SELEX rounds	m(HCV NS3h) / μg	n(ssDNA pool) / pmol	$\rho(\text{tRNA}) / (\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1})$
1	8	800	0.0
2	6	100	0.25
3	2	100	0.25
4	1	50	0.5
5	0.5	50	0.5
6	0.5	25	0.5
7	0.1	25	1
8	0.1	10	1

在以微孔板为介质进行了 5 轮筛选后, 第 6 轮应用凝胶阻滞方法分离与靶蛋白结合的 ssDNA. 当蛋白质与相应寡核苷酸结合而形成 DNA- 蛋白质复合物后, 使 DNA 片段的分子质量及电荷发生改变, 因而在聚丙烯酰胺凝胶电泳体系中其电泳迁移率发生改变, 较游离寡核苷酸片段的泳动速率慢得多, 在放射自显影 X 光胶片上形成一较游离 DNA 片段滞后的带型 (图 1). 切胶回收与 HCV NS3h 结合的 ssDNA. 通过改变分离介质可以降低 ssDNA 文库与微孔板或 BSA 的背景结合, 提高筛选适配子的特异性.

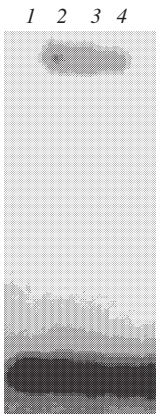


Fig.1 Gel retardation experiment for the interaction of HCV NS3h and ssDNA pool at rounds 6 SELEX
1: ssDNA pool labeled with $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$; 2~4: the interaction of HCV NS3h and ssDNA pool labeled with $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$.

2.2 ssDNA 文库与 HCV NS3h 结合百分率
随机 ssDNA 文库经 8 轮筛选, 分别测定了第 1、4、8 轮 ssDNA 文库与 HCV NS3h 蛋白的结合比例, 结果显示随着筛选轮数的增加, ssDNA 文

库与 HCV NS3h 蛋白结合的比例不断增加, 第 4 轮明显提高到 12.5%, 第 8 轮达到 29.5%, 继续筛选一轮结合比例没有明显提高.

2.3 寡核苷酸适配子的克隆、测序以及一级结构分析

第 8 轮筛选出的 ssDNA 适配子群体用不带生物素的引物通过 PCR 扩增为 dsDNA, PCR 产物回收纯化后进行克隆, 随机挑选 25 个克隆进行测序. 随机区序列结果见图 2. 一级结构分析结果表明, 所有序列无共同的保守序列. 但可以分成 5 个家族 (family): 家族 1 含有保守序列: GGTGGGT、TTGGGTC (2、4、8、16、18、22), 家族 2 有保守序列 CGCCGG (1、13、14、15), 家族 3 的保守序列为 GGXT、GGGGTAT (6、9、17、19), 家族 4 的保守序列为 GCGGGT、GGTXG (5、7、21、24), 家族 5 共 7 个序列没有保守序列.

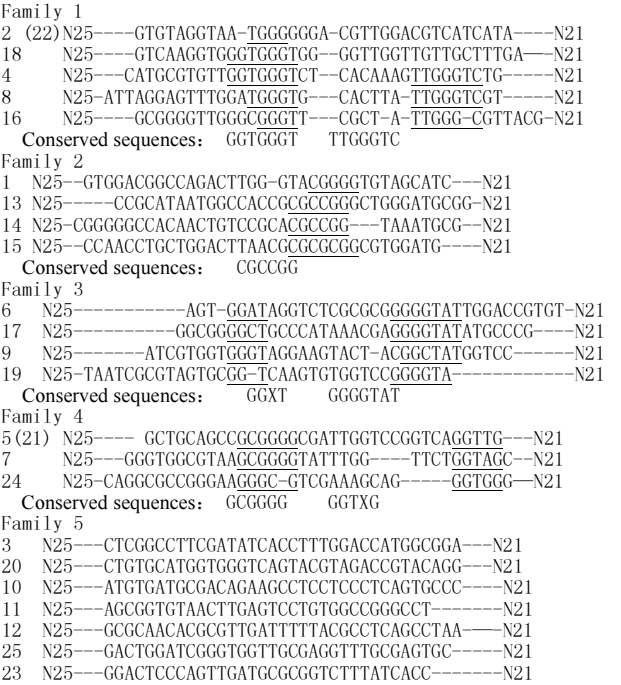


Fig. 2 Sequences of the random nucleotide region of aptamers

2.4 寡核苷酸适配子与 HCV NS3h 结合的 K_d 值测定
根据结构特点, 测定了 6 个寡核苷酸适配子与 HCV NS3h 蛋白结合的亲和力, 通过 Scatchard 作图分析测定寡核苷酸适配子的 K_d 值, 适配子 H2、H5、H8、H12、H14 和 H20 与 HCV NS3h 蛋白结合的 K_d 值分别为 140、480、840、180、160 和 210 nmol/L. 由于亲和力与 K_d 值成反比, K_d 值越小亲和力越高, 因此适配子 H2 与 HCV NS3h 蛋白结

合的亲和力最高, K_d 值为 140 nmol/L.

2.5 寡核苷酸适配子 H2 对 HCV NS3h 活性的抑制作用

HCV NS3h 对 dsDNA 和 dsRNA 具有相同的解螺旋作用, 以 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 标记的 dsDNA 为底物, 体外观察寡核苷酸适配子 H2 对 HCV NS3h 活性的影响. 结果显示, HCV NS3h 具有较好的活性, dsDNA 底物的解旋率为 70%. 当寡核苷酸适配子 H2 为 0.1、1、10 $\mu\text{mol/L}$ 时, dsDNA 底物的解旋率分别降低为 63%、46.2%、39.2%, 对 HCV NS3h 活性的抑制率分别为 10%、34%、44% (图 3), 表明适配子 H2 对 HCV NS3h 活性具有一定的抑制作用.

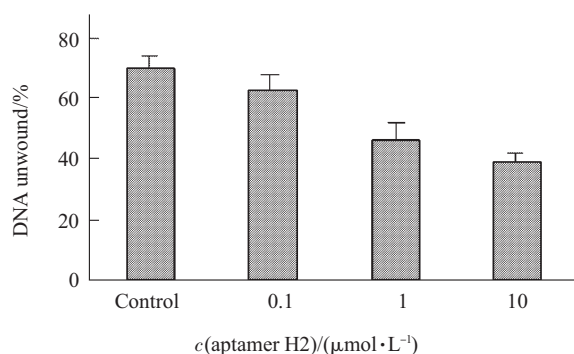


Fig.3 Effect of aptamer H2 on HCV NS3 helicase activity

3 讨 论

目前 HCV 基因组的结构、功能、分型以及检测等方面研究进展较快, 而抗病毒药物和疫苗的研究进展缓慢. 近年来病毒基因组编码的蛋白质阻断在抑制 HIV-1 复制和表达, 以及抗 HIV 感染治疗中具有重要的作用和地位, 并在抗 HIV 药物研究中取得显著的进展, 因此人们推测通过寻找丙型肝炎病毒 NS3 丝氨酸蛋白酶、NS3 螺旋酶以及 NS5B RNA 依赖的 RNA 多聚酶等, 在 HCV 复制、翻译以及蛋白质加工成熟过程中起关键作用的几种蛋白酶抑制剂, 可能是探索抗丙型肝炎病毒治疗方法的重要途径.

HCV NS3 C 端 2/3 (181~631 个氨基酸) 具有 RNA 螺旋酶和 NTP 酶活性, 其最小活性功能区长约 400 个氨基酸, 定位于开放阅读框 (ORF) 的 1 209~1 609 个氨基酸处. RNA 螺旋酶属于 DEAD-box 蛋白质家族, 对 DNA-DNA 链、DNA-RNA 链具有同 RNA-RNA 链相同的解旋能力, 具有从 3'端到 5'端的方向性, 可使 HCV RNA

的二级结构打开以利于正、负链 RNA 的复制和翻译过程, 在 HCV 的复制和翻译过程中具有重要作用^[2]. 因此, 靶向 NS3h 拮抗剂的研究具有十分重要的意义.

目前有关 HCV NS3 螺旋酶抑制剂的研究报道较少, ViroPharma 公司研制出两类含有氨基比林苯并咪唑化合物和苯并咪唑样化合物, IC_{50} 为 μmol 级, 对螺旋酶有抑制作用, 但作用较弱^[9]. Zhang 等^[10]构建了一个识别 NS3 NTPase/Helicase 功能区不连续表位的鼠单克隆抗体 ZX10, 并对其编码重链和轻链可变区的 cDNA 进行克隆, 测序, 组装成 NS3/SCFV 进行表达, 表达的蛋白质具有结合 NS3 的活性. Tessmann 等^[7]从噬菌体抗体库中筛选出的 HCV NS3 螺旋酶人源单链可变区抗体, 具有较强的结合活性. 但目前还未发现有实用价值的 NS3 螺旋酶抑制剂.

SELEX 技术是一种新的组合化学技术^[8]. 它应用大容量的随机寡核苷酸文库, 并结合体外 PCR 扩增技术, 以指数级富集与靶分子特异结合的寡核苷酸, 经过多轮筛选, 获得高亲和力、特异性强的寡核苷酸适配子, 具有库容量大、靶分子范围广、亲和力高、特异性强等优点; 在基础研究、临床诊断和疾病治疗等方面具有广泛的应用前景. 从随机寡核苷酸文库中筛选蛋白酶抑制剂, 已有许多成功的报道. Tuerk 和 Schneider 等^[9,10]分别用随机 RNA 文库和随机单链 DNA 文库中筛选出 HIV-1 逆转录酶抑制剂, 已进入临床试验. Fukuda 等^[11]用 SELEX 技术从一个随机 RNA 文库中筛选到与 HCV NS3 丝氨酸蛋白酶特异结合的寡核苷酸适配子, K_d 值达 10 nmol/L, 体外对 NS3 丝氨酸蛋白酶具有很强的抑制作用. 最近 Biroccio 等^[12]筛选出针对 HCV NS5B RdRp 具有高亲和力和特异性的 RNA 适配子, 体外对 HCV NS5B RdRp 的活性具有明显的抑制作用. 但目前尚未见利用随机寡核苷酸文库筛选 HCV NS3 螺旋酶抑制剂的报道.

本研究构建了一个含 35 个碱基的随机序列、总长 81 nt 的 ssDNA 文库, 利用 SELEX 技术成功地从随机 ssDNA 文库中筛选出抗 HCV NS3h 的寡核苷酸适配子. 在以微孔板为介质进行了 5 轮筛选后, 第 6 轮使用凝胶阻滞方法分离与靶分子结合的 ssDNA, 这样可以更有效地去除与微孔板或 BSA 的背景结合, 提高所筛选出适配子的特异性. 由于高亲和力适配子在原始文库中的含量很低, 在最初几轮的筛选中应使用较高浓度的靶分子, 以保证尽

可能多地捕捉到相应的适配子, 随后的筛选轮次中降低靶分子的浓度, 以加强筛选的严谨性. 在筛选过程中还加入非特异竞争剂 tRNA, 与寡核苷酸适配子竞争结合靶分子, 有利于从随机文库中筛选出高亲和力的适配子.

经过 8 轮筛选, 随机 ssDNA 文库与 HCV NS3h 的结合率从 0.45% 上升为 29.5%, 表明与 HCV NS3h 特异结合的适配子序列已得到明显富集. 序列分析表明, 所有适配子随机区的一级结构没有共同的保守序列, 但可以分成 5 个家族, 其中 4 个家族具有保守序列. 适配子 H2 与 HCV NS3h 具有较高的亲和力, K_d 值为 140 nmol/L. 体外试验证实适配子 H2 对 HCV NS3h 活性具有一定的抑制作用, 10 μ mol/L 时适配子 H2 对 HCV NS3h 活性的抑制率为 44%, 但抑制活性还不够理想, 可能的原因是: 虽然与 HCV NS3h 具有较高的亲和力, 但适配子 H2 结合部位不在 HCV NS3 螺旋酶的活性中心处, 因此对螺旋酶的抑制活性不够高. 为得到更高活性的适配子, 还需对适配子与 HCV NS3h 相互作用的精确结构特征进行进一步的深入研究. 本研究为探讨以寡核苷酸适配子为基础的 HCV 治疗药物筛选奠定了一定的基础.

参 考 文 献

- 1 Kim D W, Gwack Y, Han J H, *et al.* C-terminal domain of the hepatitis C virus NS3 protein contains an RNA helicase activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, **215** (1): 160~166
- 2 Yao N, Weber P C. Helicase, a target for novel inhibitors of hepatitis C virus. *Antivir Ther*, 1998, **3** (Suppl 3): 93~97
- 3 詹林盛, 邵宁生, 彭剑淳, 等. 随机单链 DNA 文库 SELEX 筛选寡核苷酸适配子方法的建立. *生物化学与生物物理进展*, 2003, **30** (1): 151~155
- 4 Zhan L S, Shao N S, Peng J C, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2003, **30** (1): 151~155
- 4 Kim D W, Gwack Y, Han J H, *et al.* Towards defining a minimal functional domain for NTPase and RNA helicase activities of the hepatitis C virus NS3 protein. *Virus Res*, 1997, **49** (1): 17~25
- 5 Phoon C W, Ng P Y, Ting A E, *et al.* Biological evaluation of hepatitis C virus helicase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*, 2001, **11** (13): 1647~1650
- 6 Zhang Z X, Lazdina U, Chen M, *et al.* Characterization of a monoclonal antibody and its single-chain antibody fragment recognizing the nucleoside triphosphatase/helicase domain of the hepatitis C virus nonstructural 3 protein. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2000, **7** (1): 58~63
- 7 Tessmann K, Erhardt A, Haussinger D, *et al.* Cloning and molecular characterization of human high affinity antibody fragments against hepatitis C virus NS3 helicase. *J Virol Methods*, 2002, **103**(1): 75~88
- 8 Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 1990, **249** (4968): 505~510
- 9 Kensh O, Connolly B A, Steinhoff H J, *et al.* HIV-1 reverse transcriptase- pseudoknot RNA aptamer interaction has a binding affinity in the low picomolar range coupled with high specificity. *J Biol Chem*, 2000, **275** (24): 18271~18278
- 10 Schneider D J, Feigon J, Hostomsky Z, *et al.* High-affinity ssDNA inhibitors of the reverse transcriptase of type 1 human immunodeficiency virus. *Biochemistry*, 1995, **34** (29): 9599~9610
- 11 Fukuda K, Vishnuvardhan D, Sekiya S, *et al.* Isolation and characterization of RNA aptamers specific for the hepatitis C virus nonstructural protein 3 protease. *Eur J Biochem*, 2000, **267** (12): 3685~3694
- 12 Biroccio A, Hamm J, Incitti I, *et al.* Selection of RNA aptamers that are specific and high-affinity ligands of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol*, 2002, **76** (8): 3688~3696

Screening and Characterization of Aptamers of Hepatitis C Virus NS3 Helicase*

ZHAN Lin-Sheng, ZHUO Hai-Long, WANG Hui-Zhong, PENG Jian-Chun, WANG Quan-Li**

(Institute of Transfusion Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract In order to screen and characterize aptamers against hepatitis C virus(HCV) NS3 helicase, a 81bp single stranded DNA (ssDNA) random library was subjected to 8 rounds of selection against HCV NS3 helicase by SELEX method. The selected aptamers were cloned and sequenced. The primary sequences of the aptamers were analyzed by Clustal W, and the affinities of aptamers to HCV NS3 helicase were determined. After 8 rounds selection, the percentage of the ssDNA pool bound to HCV NS3 helicase from 0.45% increased to 29.5%. The primary sequences of the aptamers were divided into 5 families with 4 conserved sequences. The affinity of aptamer H2 to HCV NS3 helicase was highest, with K_d values as low as 140 nmol/L. Aptamer H2 (10 μ mol/L) inhibited approximately 44% of the helicase activity of HCV NS3 *in vitro*. The results suggest that aptamer against HCV NS3 helicase have been identified by means of SELEX methods from a 81bp single stranded DNA random library.

Key words hepatitis C virus, NS3 helicase, SELEX, aptamers

*This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (30200352).

**Corresponding author . Tel: 86-10-66931292, E-mail: wangql77@hotmail.com

Received: September 27, 2004 Accepted: November 28, 2004