

哈维氏弧菌适配子的 SELEX 筛选及其亲和和特异性研究*

郑江^{1, 2)**} 郝聚敏¹⁾ 宋林生^{2)**} 刘瑞²⁾

¹⁾集美大学水产学院, 农业部东海海水养殖重点实验室, 厦门 361021; ²⁾中国科学院海洋研究所, 青岛 266071

摘要 哈维氏弧菌是水产养殖中的重要条件致病菌, 对其进行快速、准确地检测和鉴定是相关病害防治的基础和关键。适配子具有亲和力高、特异性强、稳定性好等优点, 在微生物的检测和鉴定方面呈现出广泛的应用前景。本研究以哈维氏弧菌为靶目标, 采用 SELEX 技术, 即指数级富集配体的系统进化技术, 筛选其特异性适配子。经 15 轮筛选后, 随机 ssDNA 文库的亲和力从 3.51 上升到 58.95, 提高了 15.8 倍。筛选出的适配子富集库经克隆、测序后得到 52 条不同序列, 根据同源性将这些序列分成 8 个家族, 其中第 1 和第 2 家族的适配子数量最多, 超过总数的 50%。通过深入分析, 筛选出 6 个对哈维氏弧菌有显著亲和和特异性($P < 0.01$)的高频适配子, 其中 5 个高频适配子(S1、S25、S26、S27、S35)对哈维氏弧菌有较高的亲和力, 相应的亲和常数 K_d 值分别为(32.6±7.1)、(45.3±10.1)、(24.7±5.8)、(34.8±5.6)、(12.9±4.0) nmol/L。本文还对高频适配子的产生机制及其应用价值进行了探讨。本文首次筛选出了对哈维氏弧菌具有较高亲和和特异性的适配子, 为后续利用适配子进行哈维氏弧菌的检测和鉴定奠定了基础。

关键词 哈维氏弧菌, 适配子, 亲和力, 亲和常数, SELEX

学科分类号 Q939, S917.1

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00413

哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)是水产养殖中的重要条件致病菌, 能引发多种水产动物发病死亡, 给水产养殖业造成巨大的经济损失^[1], 还能通过食物链引起食物中毒, 威胁人类的健康^[2]。因此, 预防和控制其病害的爆发和流行具有重要的现实意义, 对哈维氏弧菌进行准确、快速地检测和鉴定是其病害防治的前提和基础。然而, 水产病原弧菌的种类多、遗传变异快, 引发的早期临床症状非常相似, 因此, 使用传统的生理生化方法来鉴定哈维氏弧菌, 不仅操作繁琐、工作量大, 其结果往往还存在一定偏差^[3]。而 ELISA 等血清学方法由于交叉反应以及抗体质量、保存等问题, 在实际应用中也受到不少限制^[4-5]。即使采用具有较高分辨率的分子生物学技术, 由于弧菌基因组有较高的相似性与可变性, 在某些情况下也难以做到准确识别^[6-8]。

SELEX 技术, 即指数级富集配体的系统进化技术(systematic evolution of ligands by exponential enrichment), 起源于 20 世纪 90 年代。它利用寡核苷酸分子可在空间形成多种多样的三维结构, 通过

化学合成的随机寡核苷酸库, 从中筛选出与靶目标有特异性识别作用的寡核苷酸分子——适配子^[9-10]。由于适配子具有靶分子范围广、亲和力高、特异性强、稳定性好等众多优点^[11], 使其在微生物的识别检测等方面呈现出广阔的应用前景^[12-14], 但有关其在水产领域的研究报道还不多见。

本文以哈维氏弧菌为靶目标, 首次运用 SELEX 技术筛选其特异性适配子, 并对其中出现的高频适配子进行了亲和和特异性验证和亲和常数的测定, 为水产动物病原微生物的检测和鉴定提供了参考。

* 国家贝类技术产业体系项目(nycytx-47), 福建省科技计划重点项目(2013N0025), 福建省教育厅科技计划项目(JB10096), 集美大学科研启动金资助项目(ZQ2011002)。

** 通讯联系人。Tel: 0532-82898552

宋林生。E-mail: lshsong@ms.qdio.ac.cn

郑江。E-mail: zhengjiang618@163.com

收稿日期: 2013-09-18, 接受日期: 2014-02-26

1 材料与方法

1.1 材料

溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)、哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、迟钝爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)由集美大学病原生物实验室提供; TaqDNA 聚合酶、PCR 缓冲液、MgCl₂ 购自 Fermentas 公司; dNTP, 购自 Generay Biotech 公司; 辣根过氧化物酶标记兔抗地高辛抗体 IgG, 购自北京博奥森生物技术有限公司; 50 bp DNA Ladder, 购自天根生化科技有限公司; 琼脂糖, 购自厦门太阳马生物工程有限公司; 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

构建长度为 82nt 的随机 ssDNA 文库: 5' TCA GTC GCT TCG CCG TCT CCT TC(N35)GCA CAA GAG GGA GAC CCC AGA GGG 3', 两端为固定序列, 中间 N35 为含 35 个碱基的随机序列。引物 I (P1): 5' TCA GTC GCT TCG CCG TCT CCT TC 3'; 引物 II (P2): 5' CCC TCT GGG GTC TCC CTC TTG TGC 3'; 引物 III (P3): 5' 地高辛 - TCA GTC GCT TCG CCG TCT CCT TC 3', 为 5' 端标记地高辛的引物 P1。随机 ssDNA 文库和引物均由上海生工生物工程有限公司合成, 用 TE 缓冲液配成浓度为 10 μmol/L 贮液, -20℃ 保存备用。

1.3 SELEX 筛选

实验流程见图 1, 具体如下: 取室温恢复的哈维氏弧菌菌液(含菌量约 4×10⁸ 个), 6 000 r/min 离心 5 min 后弃上清, 沉淀用 2×结合缓冲液(100 mmol/L NaCl、5 mmol/L KCl、50 mmol/L Tris-HCl、1 mmol/L MgCl₂、pH 7.4)洗涤 1 次, 离心弃上清后用 100 μl 2×结合缓冲液悬浮菌沉淀; 取化学合成的 10 μmol/L ssDNA 30 μl(300 pmol), 用 2×结合缓冲液稀释至 100 μl, 经过 95℃ 变性 5 min、冰浴 10 min 后, 加入到上述菌悬液中, 于 30℃ 100 r/min 条件下摇床结合 0.5~2 h, 6 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 沉淀用 1×结合缓冲液(用双蒸水将 2×结合缓冲液稀释 2 倍体积得到)洗涤 1~3 次, 以此洗去未与哈维氏弧菌结合或结合较弱的 ssDNA; 再在沉淀中加入 1×结合缓冲液 100 μl, 96℃ 加热 5 min, 使与哈维氏弧菌结合的 ssDNA 变性, 从而与弧菌分离, 然后 15 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 则可分离到与哈维氏弧菌结合的 ssDNA。以筛选得到的 ssDNA 为模板进行

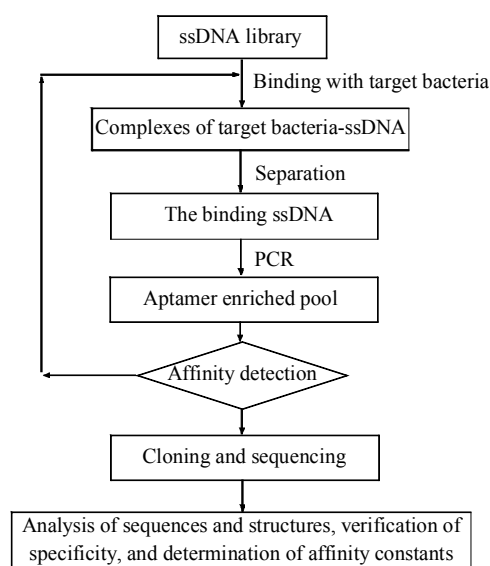


Fig. 1 Flow chart of experiment

不对称 PCR 扩增, PCR 反应体系为: 模板 2 μl, 10×PCR 缓冲液 2 μl, 25 mmol/L MgCl₂ 1.2 μl, 10 mmol/L dNTP 0.4 μl, Taq 酶 1 U, 引物 P1 10 pmol, 引物 P2 0.2 pmol, 加双蒸水至 25 μl; PCR 扩增条件为: 94℃ 预变性 4 min, 然后进行 40 个循环(94℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 20 s), 最后 72℃ 延伸 7 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测确认后, 直接作为下一轮的筛选文库用于下一轮的 SELEX 筛选。如此反复进行 15 个循环的筛选, 并且每隔 3 轮分别用溶藻弧菌、嗜水气单胞菌、迟钝爱德华氏菌进行反向筛选, 以提高筛选的特异性, 反筛方式与前面的筛选过程类似, 但保留的是不与上述三种反筛菌结合的 ssDNA, 而弃去与反筛菌结合的 ssDNA。

1.4 亲和力的测定

参照文献[15], 利用地高辛 - 抗地高辛抗体 - 过氧化物酶显色系统来检测筛选产物与哈维氏弧菌的亲和力。

1.5 适配子的克隆、测序及分析

将第 15 轮筛选产物用引物 P1 和 P2 进行扩增, 扩增产物送上海美吉生物医药科技有限公司进行克隆、测序, 获得的序列及其结构用 DNAMAN 软件进行比对分析。

1.6 适配子的亲和特异性验证

测序所得到的适配子经一级结构分析后, 选择出现频率较高的适配子序列, 进行亲和特异性验证。具体如下: 合成这些出现频率较高的候选适配子序列, 并对其 5' 端进行地高辛标记(由上海生工

生物工程有限公司合成、标记), 然后用 1×TE 缓冲液配成终浓度为 10 μmol/L. 分别取标有地高辛的这些序列各 10 pmol, 与相同量且过量的哈维氏弧菌、溶藻弧菌、嗜水气单胞菌、迟钝爱德华氏菌(各约 4×10⁸ 个)结合, 测定适配子与这些菌的亲合力, 亲合力测定方法同 1.4, 最后得到相应的吸光度值 A₄₅₀, 相应亲合力为: 亲合力=A₄₅₀(实验组)-A₄₅₀(对照组).

1.7 适配子亲和常数的测定及二级结构模拟

通过 1.6 的亲亲和特异性验证, 筛选出与哈维氏弧菌有较好亲和特异性的适配子, 对其进行亲和常数测定. 具体方法如下: 将 5'端标记地高辛的适配子经过梯度稀释, 使其浓度范围为 0~140 nmol/L, 然后分别与相同数量的哈维氏弧菌(约 4×10⁸ 个)结合, 按 1.4 的方法测定相应浓度下的亲合力, 然后以适配子浓度为横坐标, 亲合力为纵坐标作图, 并用 Origin 8.0 软件进行拟合, 可获得各适配子的饱和结合曲线, 通过非线性回归分析可获得相应适配子的亲和常数 K_d 值. 适配子的二级结构采用软件 RNAstructure4.6 进行模拟.

1.8 统计分析

实验数据采用 t- 检验函数进行组间差异分析, P<0.05 为显著差异, P<0.01 为极显著差异.

2 结 果

2.1 SELEX 筛选过程亲和力的变化

如图 2 所示, 随着筛选的进行, ssDNA 富集库与哈维氏弧菌的亲合力逐渐增加, 到第 13 轮时, 其亲合力增加已不明显, 第 13 轮的亲合力与第 15 轮无显著差异(P>0.05), 说明此时哈维氏弧菌上的结合位点已基本达到饱和状态, 结合到哈维氏弧菌上的 ssDNA 不再增加. 与第 1 轮的亲合力(3.51)相比, 经过 15 轮 SELEX 筛选, 最终 ssDNA 富集文库的亲合力达到 58.95, 是第 1 轮亲和力的 16.8 倍, 体现了较好的筛选效果.

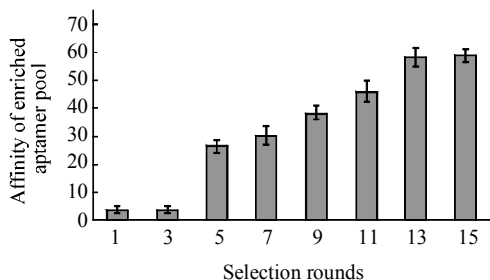


Fig. 2 Affinities between *V. harveyi* and ssDNA of different SELEX rounds

2.2 克隆、测序及其一级结构分析

第 15 轮的筛选产物经扩增、克隆后, 随机挑选 60 个克隆进行测序分析, 共得到 59 条有效序列, 其中有 6 个适配子的序列(S1、S11、S25、S26、S27、S35)在测序结果中出现 2 次以上或者有 2 个以上的拷贝, 我们称之为高频适配子, 因此, 总共获得了 52 条不同序列. 利用 DNAMAN 软件对这 52 条序列进行多序列比对和同源性分析, 可得到相应的同源树(图 3), 依据该同源树对这 52 条

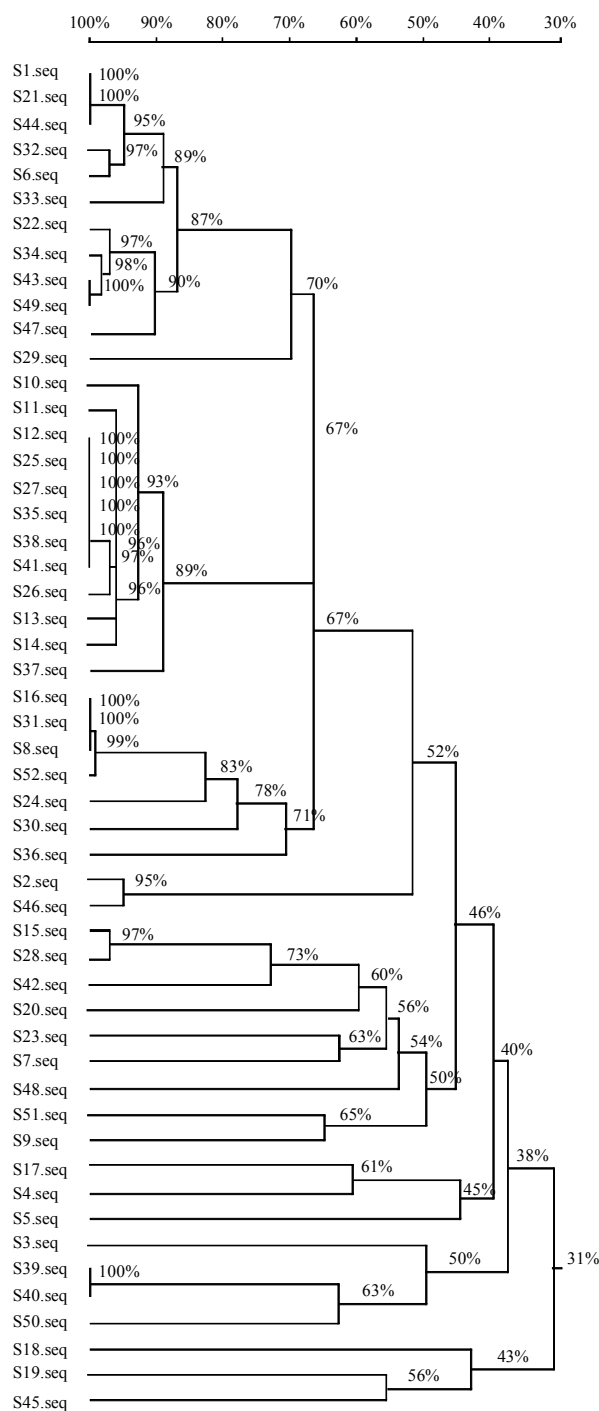


Fig. 3 Homology tree of aptamers against *V. harveyi*

序列进行分类, 可将这 52 条序列分成 8 个家族 (表 1)。从表 1 可看出, 同源性较高的第 1 和第 2 家族集中了 50% 以上适配子, 高频适配子也出现在这两个家族, 尤其是第 2 家族, 不仅适配子的同源性较高、数量较多, 而且 6 个高频适配子中的 5

个都来自这个家族。从第 2 家族的序列比对图 (图 4) 中, 也可看出该家族的适配子序列有较高的相似性 (其他家族的序列比对图与图 4 类似, 不再一一列出), 这些都表明前期的 SELEX 筛选具有较好的收敛性或选择富集性。

Table 1 Classification of aptamers against *V. harveryi* based on the homology tree

Family	Aptamers	Homology/%	Percentage/%
1	<u>S1(2)*</u> , S6, S21, S22, S29, S32, S33, S34, S43, S44, S47, S49	70~100	22.0
2	S10, <u>S11(2)</u> , S12, S13, S14, <u>S25(2)</u> , <u>S26(2)</u> , <u>S27(2)</u> , <u>S35(3)</u> , S37, S38, S41	89~100	30.5
3	S8, S16, S24, S30, S31, S36, S52	71~100	11.9
4	S2, S46	95	3.4
5	S7, S9, S15, S20, S23, S28, S42, S48, S51	50~95	15.2
6	S4, S5, S17	45~61	5.1
7	S3, S39, S40, S50	63~100	6.8
8	S18, S19, S45	43~56	5.1

* The high-frequency aptamers that appeared multiple times (numbers in parentheses) in the sequencing result are shown underlined.

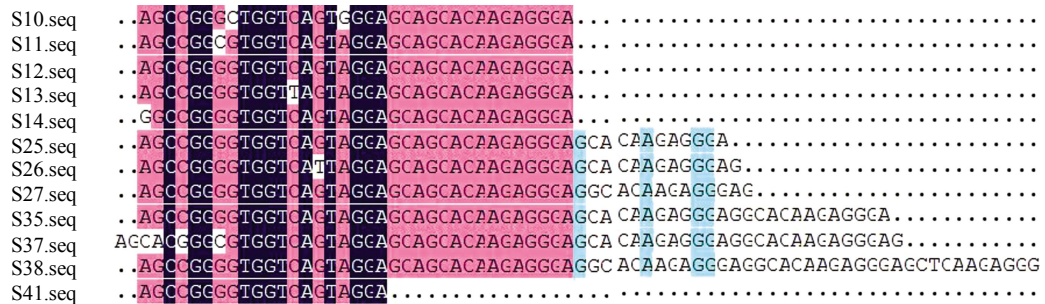


Fig. 4 Alignment of the aptamer sequences from the second family

2.3 适配子的亲和特异性验证

测序过程是随机挑取克隆进行的, 因此在测序结果中适配子出现的频率越高, 则意味着其在富集库中的占比也可能较高, 对哈维氏弧菌的亲和力也很可能较高, 因此, 我们选取 6 个高频适配子进行特异性分析。由图 5 可知, 6 个高频适配子对哈维

氏弧菌的亲和力均显著高于其他 3 种菌 ($P < 0.01$), 呈现较好的亲和特异性。但比较而言, 适配子 S11 的亲和力要远低于其他 5 个适配子, 其亲和力只有其他 5 个适配子的 20%~30%, 因此后续只选择另外 5 个亲和特异性较高的适配子进行亲和常数的测定。

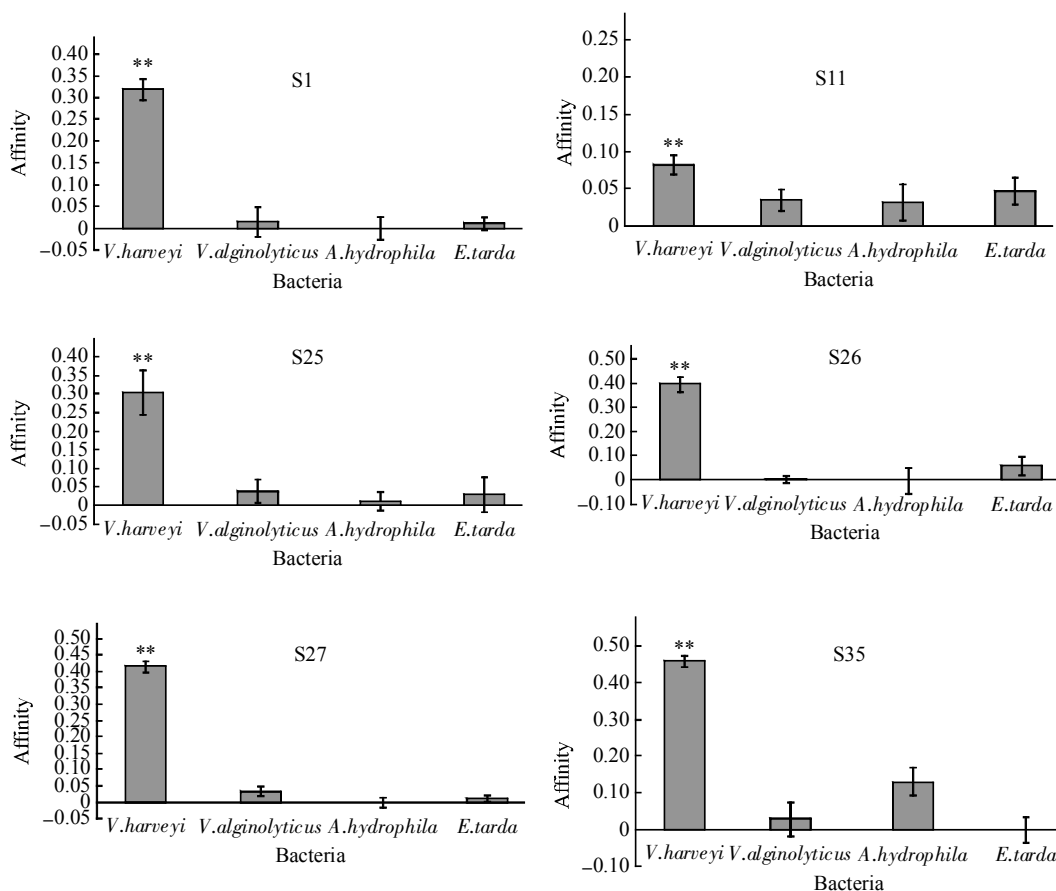


Fig. 5 Verifications of affinities and specificities of the six high-frequency aptamers

2.4 适配子的亲和常数及其二级结构

对亲和和特异性较好的 5 个适配子(S1、S25、S26、S27、S35)进行亲和常数的测定，其中适配子 S1 的亲和常数饱和曲线如图 6，拟合系数 $r^2=0.979$ ，呈较好的拟合效果，其他 4 个适配子的饱和曲线与此相类似，不再一一列出。5 个高频适配子的亲和常数及其模拟二级结构如图 7 所示，根据亲和常数越小相应适配子的亲和力越大的原则，可知各适配子的亲和力大小顺序为：S35 > S26 > (S1、S27、S25)，其中 S1、S27、S25 3 个适配子的亲和常数无显著差异($P > 0.05$)。另外，从适配子的二级结构图中还可发现，亲和常数相近的 3 个适配子(S1、S27、S25)，其二级结构也有一定的相似性，而亲和力较高的适配子 S35 和 S26，其二级结构的中部(图中箭头标记处)都有一突出的颈环，这一结构特点可能与其较高的亲和力有一定关系。

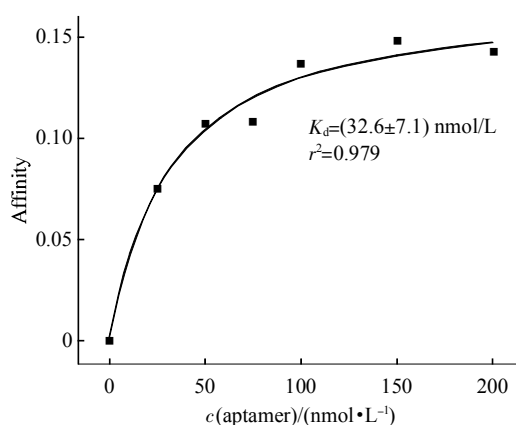


Fig. 6 Saturation curves of dissociation constant (K_d) of the aptamer S1

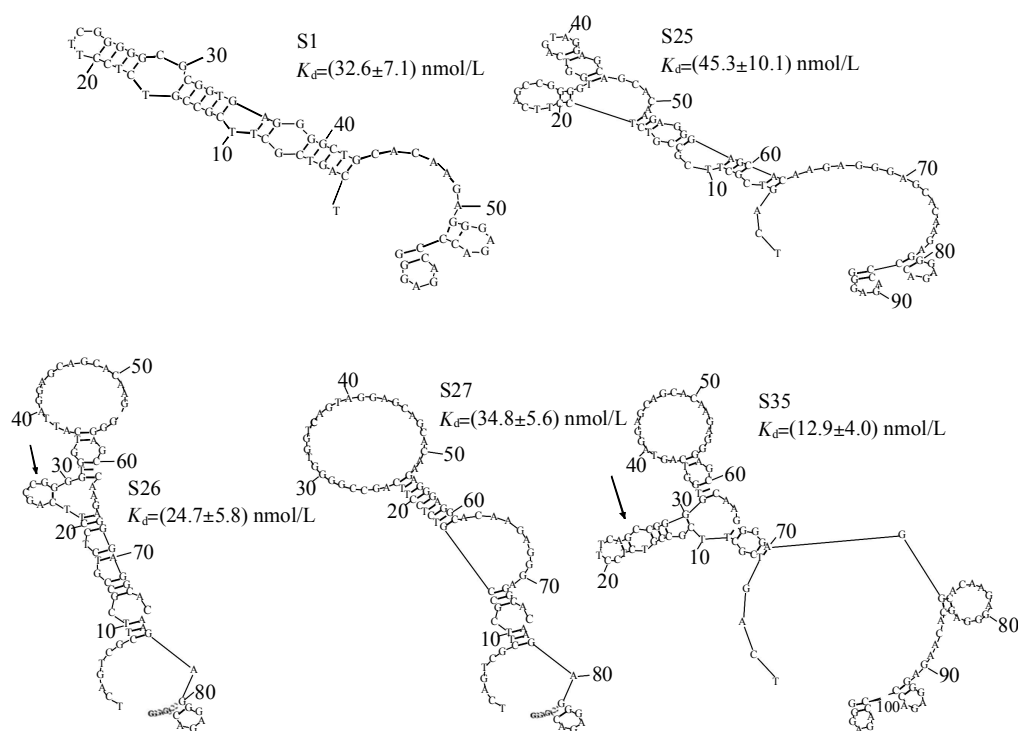


Fig. 7 Affinity constants (K_d) and mimetic secondary structure of 5 aptamers

3 讨 论

弧菌是海洋环境中最常见的致病性细菌种群之一,能够引起海水养殖动物的感染和发病,对海水养殖业造成巨大的经济损失,其中能同时感染人类引起疾病的弧菌有 10 多种^[6].哈维氏弧菌是其中具有代表性的一种人畜共患病的致病菌,对其进行快速有效的检测和鉴定一直是国内外的研究重点.目前,有关哈维氏弧菌的检测鉴定已有不少报道.Oakey 等^[7]报道了利用 16SrDNA 技术对哈维氏弧菌进行了特异性鉴定;Pang 等^[8]根据哈维氏弧菌 *toxR* 基因的特点,设计了特异性引物,利用 PCR 方法实现了对哈维氏弧菌的检测;张晓华等^[9]则用 ELISA 技术对育苗池水中的哈维氏弧菌进行了检测,证实了育苗场爆发的流行病与水体中的哈维氏弧菌有关.但有研究显示,由于水产病原弧菌的基因组有较高相似性和可变性,部分弧菌的种间差异较小,因此对同源性较高的一些弧菌,16SrDNA 技术的鉴定效果并不理想^[20],而基于 *toxR* 基因的 PCR 技术在检测哈维氏弧菌时也会出现假阴性^[21].适配子,因其具有较好的亲和特异性而在微生物的检测鉴定中体现了较好的应用前景.本研究采用 SELEX 技术首次筛选出了哈维氏弧菌的适配子,

亲和特异性研究显示,这些适配子不仅能用于区分哈维氏弧菌与非弧菌属的迟钝爱德华氏菌和嗜水气单胞菌,而且还可用于区分同为弧菌属的哈维氏弧菌和溶藻弧菌,这为后续应用适配子对哈维氏弧菌进行检测鉴定奠定了较好的基础.

亲和常数(K_d)是衡量适配子结合效果和灵敏度的主要指标.亲和常数越低,对靶目标的亲和力越高,检测的灵敏度也越高.已有的研究显示,对于细胞、细菌等复杂靶目标,大部分适配子的亲和常数都在 nmol/L 数量级^[11].对于不同的水产病原弧菌的适配子,其亲和常数虽有差别,但基本都在 10~100 nmol/L 范围内,如副溶血弧菌的适配子,其 K_d 大都介于 10~30 nmol/L,其中亲和力最高的 K_d 为 16.88 nmol/L^[22],而对于灭活溶藻弧菌,其适配子富集库的 K_d 为 27.5 nmol/L^[23].本研究获得的哈维氏弧菌的适配子,其亲和常数也都介于 10~50 nmol/L 之间,其中亲和力最高的适配子 S35 的 K_d 达到了 12.9 nmol/L,与上述文献报道相类似,也显示了较高的亲和力和灵敏度.

SELEX 筛选中,经常会发现某些适配子在克隆测序的结果中出现次数较多或出现频率较高^[23-25],我们称之为高频适配子^[23].高频适配子的出现,很

可能是因为这类适配子具有较高的亲和力、或较好的扩增性、或二者兼而有之,从而使这类适配子在筛选进化过程中具有较强的竞争优势,最终通过多轮的筛选,逐渐成为富集文库中数量较多、比例较高的优势群体。因此,高频适配子通常都具有较高的亲和力,它们的出现也反映了整个 SELEX 筛选有较好的收敛性。本文的研究结果也证实,测序中出现的 6 个高频适配子中有 5 个都具有较高的亲和力,另一个亲和力虽然不算很高,但也达到了极显著差异($P < 0.01$)。

高频适配子的出现,也为后续适配子的挑选、验证提供了一个新的思路。在 SELEX 筛选后期,必须要对测序结果中的适配子序列进行验证,但这个验证过程在不同的研究中却存在很大差异:有的是对测序获得的全部序列都进行验证^[24],有的则是根据其一、二级结构选择部分可能具有较高亲和力的适配子序列进行验证^[25-27]。前者虽然可行,但成本高、工作量大,后者虽然合理,但有关高亲和适配子的选择依据却存在较大的主观性和随意性,缺乏一个统一可操作的标准。从我们的研究结果看,高频适配子在文库中的数量是较少的(本文 52 个测序结果中只有 6 个高频适配子),而亲和力则有可能是较高的,因此优先选择高频适配子进行验证,不仅成功率高,而且工作量小、成本低,具有较高的验证效率。

参 考 文 献

- [1] Austin B, Zhang X H. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Let Appl Microbiol*, 2006, **43**(2): 119-124
- [2] Austin B. Vibrios as causal agents of zoonoses. *Vet Microbiol*, 2010, **140**(3-4): 310-317
- [3] Austin B, Austin D A. *Bacterial Fish Pathogens: Diseases of Farmed and Wild Fish*. 4th edn. Chichester: Springer-Praxis, 2007
- [4] Ana Cano-Gomez, David G Bourne, Michael R Hall, *et al.* Molecular identification, typing and tracking of *Vibrio harveyi* in aquaculture systems: current methods and future prospects. *Aquaculture*, 2009, **287**(1-2): 1-10
- [5] Robertson P A W, Xu H-S, Austin B. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of *Vibrio harveyi* in penaeid shrimp and water. *J Microbiol Methods*, 1998, **34**(1): 31-39
- [6] Thompson F L, Swings J. Taxonomy of vibrios // Thompson F L, Austin B, Swings J. *The Biology of Vibrios*. Washington DC: ASM Press, 2006: 29-43
- [7] Zhao J J, Chen C, Luo P, *et al.* SYBR Green I-based real-time PCR targeting the rpoX gene for sensitive and rapid detection of *Vibrio alginolyticus*. *Mol Cell Probes*, 2011, **25**(2-3): 137-141
- [8] Sawabe T, Kita-Tsukamoto K, Thompson F L. Inferring the evolutionary history of vibrios by means of multilocus sequence analysis. *J Bacteriol*, 2007, **189**(21): 7932-7936
- [9] Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 1990, **249**(4968): 505-510
- [10] Ellington A D, Szostak J W. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 1990, **346**(6287): 818-822
- [11] Regina S, Christine R, Beate S. Selex-A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomolecular Engineering*, 2007, **24**(4): 381-403
- [12] 马占忠, 王玉炯, 秦莲花, 等. 筛选结核分枝杆菌 CFP-10 抗原适配体的研究. *中国病原生物学杂志*, 2008, **3**(2): 86-89
Ma Z Z, Wang Y J, Qin L H, *et al.* *Journal of Pathogen Biology*, 2008, **3**(2): 86-89
- [13] 甄 蓓, 宋亚军, 郭兆彪, 等. 体外筛选炭疽芽孢适配子. *生物化学与生物物理学报*, 2002, **34**(5): 635-642
Zhen B, Song Y J, Guo Z B, *et al.* *Acta Biochim Biophys Sin*, 2002, **34**(5): 635-642
- [14] 詹林盛, 卓海龙, 王会中, 等. 丙型肝炎病毒 NS3 螺旋酶寡核苷酸适配子的筛选与鉴定. *生物化学与生物物理进展*, 2005, **32**(3): 245-250
Zhan L S, Zhuo H L, Wang H Z, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2005, **32**(3): 245-250
- [15] Hao J M, Zheng J, Tang X M, *et al.* A simplified system without purification for selection of aptamers against *Vibrio alginolyticus*. *Afri J Microbiol Res*, 2011, **5**(21): 3564-3568
- [16] 张晓华. *海洋微生物学*. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 2007
Zhang X H. *Marine Microbiology*. Qingdao: Press of Ocean University of Qingdao, 2007
- [17] Oakey H J, Levy N, Bourne D G, *et al.* The use of PCR to aid in the rapid identification of *Vibrio harveyi* isolates. *J Appl Microbiol*, 2003, **95**(6): 1293-1303
- [18] Pang L, Zhang X H, Zhong Y, *et al.* Identification of *Vibrio harveyi* using PCR amplification of the toxR gene. *Let Appl Microbiol*, 2006, **43**(3): 249-255
- [19] 张晓华, Robertson P, 冯 娟, 等. 中国对虾育苗池水中哈维氏弧菌的检测. *青岛海洋大学学报*, 1998, **28**(1): 70-74
Zhang X H, Robertson P, Feng J, *et al.* *Journal of Ocean University of Qingdao*, 1998, **28**(1): 70-74
- [20] Gomez-Gil B, Thompson F L, Thompson C C, *et al.* *Vibrio rotiferianus* sp. nov., isolated from cultures of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2003, **53**(Pt 1): 239-243
- [21] Conejero M J U, Hedreyda C T. Isolation of partial toxR gene of *Vibrio harveyi* and design of toxR-targeted PCR primers for species detection. *J Appl Microbiol*, 2003, **95**(3): 602-611
- [22] Duan N, Wu S J, Chen X J, *et al.* Selection and identification of a DNA aptamer targeted to *Vibrio parahaemolyticus*. *J Agric Food Chem*, 2012, **60**(16): 4034-4038
- [23] Tang X M, Zheng J, Yan Q P, *et al.* Selection of aptamers against inactive *Vibrio alginolyticus* and application in a qualitative

- detection assay. *Biotech Lett*, 2013, **35**(6): 909–914
- [24] Lee Y J, Han S R, Maeng J S, *et al.* *In vitro* selection of *Escherichia coli* O157:H7-specific RNA aptamer. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, **417**(1): 414–420
- [25] He J, Liu Y, Fan M T, *et al.* Isolation and identification of the DNA aptamer target to acetamiprid. *J Agric Food Chem*, 2011, **59**(5): 1582–1586
- [26] Cruz-Aguado J A, Penner G. Determination of ochratoxin A with a DNA aptamer. *J Agric Food Chem*, 2008, **56**(22): 10456–10461
- [27] Chang T W, Blank M, Janardhanan P, *et al.* *In vitro* selection of RNA aptamers that inhibit the activity of type A botulinum neurotoxin. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, **396**(4): 854–860

Selection and Characterization of Aptamers Against *Vibrio harveyi* by SELEX*

ZHENG Jiang^{1,2**}, HAO Ju-Min¹, SONG Lin-Sheng^{2**}, LIU Rui²

¹ Fisheries College of Jimei University, Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea,
Ministry of Agriculture, Xiamen 361021, China;

² Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract The disease caused by the opportunistic pathogen *Vibrio harveyi* is a serious infection which brings a heavy damage to aquaculture. Accurate and rapid detection of the microorganism is the first and necessary step to control the disease. Aptamers have a good potential application in the detection and identification of microorganisms because of their strong affinity, high specificity and good stability. In the present paper, aptamers targeting to *V. harveyi* were selected by the technique of systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX), and their affinities and specificities to *V. harveyi* were also evaluated. After 15 rounds of selection, the affinity of the aptamers in the enriched pool increased to 58.95, which was 16.8 times of that (3.51) in the original pool. After cloning and sequencing, 52 supposed aptamers were obtained from the enriched pool. These aptamers were divided into 8 families based on the homology analysis. Over 50% of these aptamers in the first and the second families shared higher homology, suggesting the selection was convergent and efficient. Six high-frequency aptamers were also found to have significant affinities and specificities to *V. harveyi* ($P < 0.01$). Five of them (S1, S25, S26, S27, S35) were proved to have higher affinities, and their affinity constants (K_d) were as followed: (32.6 ± 7.1), (45.3 ± 10.1), (24.7 ± 5.8), (34.8 ± 5.6) and (12.9 ± 4.0) nmol/L, respectively. The production mechanism and the application values of high-frequency aptamers were also discussed. The present paper was the first report of aptamers with high affinity and specificity to the target *V. harveyi*, which would lay the foundation for the detection of the pathogenic microorganism based on aptamers.

Key words *Vibrio harveyi*, aptamer, affinity, affinity constant (K_d), SELEX

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00413

*This work was supported by grants from The China Agriculture Research System (nycytx-47), The Key Scientific and Technological Project of Fujian Province (2013N0025), The Scientific and Technological Project from the Education Department of Fujian Province (JB10096), and The Science Foundation of Jimei University (ZQ2011002).

**Corresponding author. Tel: 86-532-82898552

SONG Lin-Sheng. E-mail: lshsong@ms.qdio.ac.cn

ZHANG Jiang. E-mail: zhengjiang618@163.com

Received: September 18, 2013 Accepted: February 26, 2014