



靶向 Nectin1 的 DNA 适配体筛选及其对伪狂犬病病毒体外感染细胞的吸附阻断效应

乔 岩, 赵家富, 常潇天, 陈 征, 韩莹倩, 张 超*

(河南农业大学动物医学院, 农业农村部动物生化与营养重点开放实验室, 郑州 450046)

摘 要: 本研究旨在可溶性原核表达伪狂犬病病毒(PRV)受体 Nectin1 蛋白的 N 端胞外结构域, 并以此为靶标, 筛选出高亲和力、高特异性的 DNA 适配体, 为阻断伪狂犬病病毒吸附宿主细胞提供新的分子工具。将猪源 Nectin1 基因克隆至带有麦芽糖结合蛋白(MBP)促溶标签的原核表达载体 pET28a 中, 构建重组质粒 pET28a-MBP-Nectin1, 将双酶切鉴定和测序正确的重组质粒转入大肠杆菌 BL21(DE3)进行诱导表达, 使用 Western blot 和 Pull-down 试验验证重组蛋白。采用基于磁珠偶联的系统进化适配体筛选技术(SELEX)筛选特异性靶向 rMBP-Nectin1 的 DNA 适配体, 并利用磁珠 ELASA 检测筛选所得适配体 Apt-Nectin1-6 的亲和力与特异性。以敲减 Nectin1 蛋白的细胞系(sh-Nectin1-1、sh-Nectin1-2)为对照, 应用流式细胞术验证 Apt-Nectin1-6 对细胞表面 Nectin1 蛋白的结合能力, 同时通过流式细胞术和基因组拷贝数试验评估其对 PRV 吸附细胞的抑制作用。Western blot 和 Pull-down 结果表明重组 MBP-Nectin1 蛋白正确表达且具有生物学活性。通过 SELEX 技术筛选获得的适配体 Apt-Nectin1-6 对 rMBP-Nectin1 具有高亲和力, 平衡解离常数(Kd)为 (0.11 ± 0.02) nmol, 且不与 rMBP-gD、rMBP-S1、rMBP-CD163 及 rMBP 蛋白发生交叉反应。分子对接结果显示, Apt-Nectin1-6 通过氢键与 Nectin1 结合。进一步流式细胞术、基因组拷贝数检测和病毒滴度测定结果显示, Apt-Nectin1-6 可剂量依赖性地抑制 PRV 对细胞的吸附($P < 0.05$)。本研究成功筛选得到可高特异性、高亲和力结合 Nectin1 蛋白的 DNA 适配体 Apt-Nectin1-6, 并证实其可有效阻断 PRV 对细胞的吸附, 为开发新的抗 PRV 策略奠定基础。

关键词: 伪狂犬病病毒; Nectin1; SELEX; DNA 适配体; 病毒吸附阻断

中图分类号: S852.659.1

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2026)02-0979-15

Selection of DNA Aptamers Targeting Nectin1 and Their Inhibitory Effect on Adsorption of Pseudorabies Virus to Host Cells *in vitro*

QIAO Yan, ZHAO Jiafu, CHANG Xiaotian, CHEN Zheng, HAN Yingqian, ZHANG Chao*

(Key Laboratory of Animal Biochemistry and Nutrition, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, College of Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450046, China)

Abstract: This study aimed to achieve soluble prokaryotic expression of the N-terminal extracellular domain of the pseudorabies virus (PRV) receptor Nectin1 protein, and to screen high-affinity, high-specificity DNA aptamers targeting it, thereby providing a novel molecular tool for blocking PRV adsorption. The porcine Nectin1 gene was cloned into the prokaryotic expression vector pET28a containing a maltose-binding protein (MBP) solubility-enhancing tag to construct the recombinant plasmid pET28a-MBP-Nectin1. The correctly digested and sequenced recombinant plasmid was

收稿日期: 2025-05-07

基金项目: 河南省自然科学基金(252300420197); 国家自然科学基金(31972672)

作者简介: 乔 岩, 主要从事动物生物技术研究, E-mail: 18860361915@163.com

* 通信作者: 张 超, 主要从事动物生物技术研究, E-mail: chaozhang@henau.edu.cn

transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3) for induced expression. The recombinant protein was validated by Western blot and pull-down assays. A DNA aptamer specifically targeting rMBP-Nectin1 was selected using magnetic bead-coupled Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment (SELEX). The affinity and specificity of the selected aptamer Apt-Nectin1-6 were evaluated by magnetic bead-based ELISA. Nectin1 knockdown cell lines (sh-Nectin1-1 and sh-Nectin1-2) were used as controls to verify the binding ability of Apt-Nectin1-6 to cell surface Nectin1 by flow cytometry. Additionally, the inhibitory effect of the aptamer on adsorption of pseudorabies virus to host cells was assessed by flow cytometry and viral genome copy number analysis. Western blot and pull-down assays confirmed the correct expression and biological activity of the recombinant MBP-Nectin1 protein. Through SELEX, the DNA aptamer Apt-Nectin1-6, exhibiting high affinity to rMBP-Nectin1 with an equilibrium dissociation constant (K_d) of (0.11 ± 0.02) nmol and no cross-reactivity with rMBP-gD, rMBP-S1, rMBP-CD163, or rMBP alone, was successfully screened. Molecular docking analysis indicated that Apt-Nectin1-6 binds to Nectin1 via hydrogen bonds. Further flow cytometry, viral genome copy number quantification, and virus titration collectively demonstrated that Apt-Nectin1-6 inhibits PRV adsorption to host cells in a dose-dependent manner. ($P < 0.05$). In this study, a DNA aptamer Apt-Nectin1-6 with high specificity and affinity for the Nectin1 protein was successfully screened and verified to effectively block PRV adsorption, providing a foundation for developing novel anti-PRV strategies.

Keywords: pseudorabies virus; Nectin1; SELEX; DNA aptamer; viral adsorption blocking

* **Corresponding author:** ZHANG Chao, E-mail: chaozhang@henau.edu.cn

伪狂犬病(pseudorabies, PR)是由伪狂犬病病毒(pseudorabies virus, PRV)引起的一种急性、高度接触性传染病,最早于1813年被发现^[1]。PRV宿主范围广,可感染猪、牛、犬、猫、羊、鼠等多种哺乳动物,其中以猪为天然宿主和主要传播宿主^[2]。在猪群中,PRV感染可引起妊娠母猪流产、种猪不育以及仔猪神经系统紊乱、呕吐、腹泻、兴奋不安等严重症状,给养猪业造成了重大经济损失^[3-5]。近年来,PRV的跨种传播问题日益受到关注。2017年,我国首次报道PRV感染引发的人眼内炎病例^[6]。2019年,又有研究发现其可导致病毒性脑炎^[7],提示PRV具有潜在的人畜共患风险,对公共卫生安全构成潜在威胁。

PRV属于疱疹病毒科(*Herpesviridae*), α 疱疹病毒亚科(*Alphaherpesvirinae*),病毒粒子结构由核心DNA、衣壳、包膜及外膜组成,具有较强的环境抵抗能力^[8-10]。其基因组约编码70~100种蛋白质,其中至少10种糖蛋白被证实参与病毒复制、免疫逃逸及致病性调控^[11]。其中,糖蛋白gD是PRV感染过程中介导病毒与宿主细胞膜融合的关键因子,能够与宿主细胞表面的受体分子如3-O-硫乙酰肝素、Nectin1和Nectin2等结合,促进病毒侵入细胞^[12-14]。

Nectin1是一种广泛分布于多种哺乳动物细胞表面的免疫球蛋白样细胞黏附分子,最初被认为是脊髓灰质炎病毒的辅助受体,亦被称为脊髓灰质炎病毒受体相关蛋白1^[15]。目前已证实其为PRV和HSV(单纯疱疹病毒)的共同受体,参与病毒吸附和进入过程。研究表明,Nectin1中F129位点的突变几乎可完全阻断PRV对该蛋白的识别^[16],而Nectin1的点突变或基因敲除均能显著提高宿主对PRV的抵抗力^[17-19]。因此,Nectin1被认为是阻断PRV吸附宿主细胞的重要靶标。

核酸适配体(aptamer)是利用SELEX(systematic evolution of ligands by exponential enrichment)技术从随机单链DNA或RNA文库中筛选获得的一类高亲和力、高特异性的小分子寡核苷酸,其空间三维结构可与目标蛋白形成特异结合^[20-22]。相比抗体,核酸适配体具有合成周期短、免疫原性低、修饰灵活、热稳定性强等优势,已广泛应用于病毒检测、靶向递送及抗病毒治疗等研究中,展现出良好的应用前景^[23]。

本研究通过构建融合MBP标签的Nectin1胞外结构域重组蛋白,实现其在原核系统中的可溶性表达和纯化,并以其为靶标,通过磁珠-SELEX技术筛

选获得能够高亲和力、高特异性识别 Nectin1 的 DNA 适配体 Apt-Nectin1-6。通过流式细胞术、病毒基因组拷贝数和病毒滴度分析,证实该适配体可结合细胞表面的 Nectin1 蛋白并有效抑制 PRV 吸附宿主细胞,为后续开发新型抗 PRV 分子工具和靶向抗病毒策略提供了实验依据和理论支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

猪肾细胞(PK15)、非洲绿猴肾细胞(Vero)、人胚肾细胞(293T)、仓鼠肾成纤维细胞(BHK21)、PRV-*gH* 基因的标准质粒(pT-PRV-*gH*,以 pMD-18T 为骨架构建)由河南农业大学农业农村部动物生化与营养重点实验室保存;PRV 毒株 QXX (PRV-QXX)和重组 PRV 毒株 PRV-GFP 毒株由河南农业大学动物医学院李永涛教授惠赠;BL21 (DE3)感受态细胞购自 TOLOBIO;Ni 磁珠购自金斯瑞公司;Ni-NTA 亲和层析填料购自 GenScript 公司;HRP 标记的链霉亲和素购自生工生物公司;T4 连接酶购自 TaKaRa 公司;限制性核酸内切酶 *Xho* I 和 *Bam*H I 购自 Thermo Fisher Scientific;初始寡核苷酸随机文库、适配体筛选引物由金斯瑞公司合成;针对 Nectin1 的 shRNA 干扰序列和 PRV-*gH* 基因引物由生工生物公司合成。

1.2 试验方法

1.2.1 载体构建 参考 NCBI 上 *Nectin1* 基因 (NC_010451.4),将 *Nectin1* N 端胞外域的密码子进行优化,并在序列两端引入 *Xho* I 和 *Bam*H I 酶切位点,该序列由金斯瑞公司合成,得到 pET21b-*Nectin1* 质粒。使用 *Xho* I 和 *Bam*H I 分别酶切 pET21b-*Nectin1* 质粒和 pET28a-MBP 载体质粒,对目的条带进行胶回收。将回收得到的目的基因与载体通过 T4 DNA 连接酶连接,得到 pET28a-MBP-*Nectin1* 重组质粒,将连接产物转化至 TOP10 感受态细胞中,采用双酶切分析及基因测序鉴定重组质粒构建的正确性。

1.2.2 *Nectin1* 蛋白的原核表达、纯化及验证 将构建好的质粒转入到 BL21(DE3)感受态细胞中,在 18 °C 下用 1 mmol·L⁻¹ IPTG 诱导蛋白表达过夜。并通过 Ni-NTA 亲和层析纯化 rMBP-*Nectin1* 重组蛋白。使用 BCA 蛋白定量试剂盒测定重组 *Nectin1* 蛋白的浓度,并采用 SDS-PAGE 和 Western blot 方法对表达产物进行鉴定和纯度分析。

1.2.3 *Nectin1* 蛋白活性验证 将纯化后的 *Nectin1* 蛋白与磁珠混合,在 4 °C 下孵育 9 h。随后,加入伪狂犬病病毒 (PRV) 溶液,并继续在 4 °C 下孵育过夜。通过 Pull-down 试验捕获 PRV,设置 rMBP 蛋白为阴性对照。最终采用 Western blot 方法检测 PRV 的 gB 蛋白表达情况,以验证重组 *Nectin1* 蛋白是否具备结合 PRV 的生物学活性。

1.2.4 核酸适配体的筛选 随机单链 DNA 文库由一段 40 个碱基的随机序列 (N40) 和两侧各 20 个碱基的固定序列组成,其序列为 5'-AGTT-GACGCTGGTGTGGGAC-N40-TCAATCTGCG-TGCGTCCAGT-3',其中 N 代表任意碱基 (A、T、C 或 G),文库理论复杂度约为 10¹⁴。筛选过程中使用 5'-FAM 标记的正向引物 (5'-FAM-AGTTGACG-CTGGTGTGGGAC-3') 与 5'-磷酸化的反向引物 (5'-Phosphate-ACTGGACGCACGCAGATTGA-3') 进行 PCR 扩增。

将 ssDNA 文库溶解于 500 μL 结合缓冲液 (PBS 中含 3 mmol·L⁻¹ MgCl₂),于 95 °C 变性 5 min,立即置于冰上冷却 10 min,室温静置 10 min 形成合适的空间结构。将 rMBP-*Nectin1* 融合蛋白与 Ni 磁珠在 4 °C 孵育过夜以形成靶蛋白复合物。随后将处理后的文库与 *Nectin1*-磁珠复合物在室温下孵育,孵育后使用洗涤缓冲液清洗磁珠,加入 200 μL 1×TE 缓冲液,95 °C 加热 5 min 使结合序列解链,收集上清,获得与靶蛋白特异结合的适配体序列。

为剔除非特异性结合 rMBP 蛋白的序列,在每轮筛选前加入 MBP-磁珠作为负筛选靶标,去除可能识别 rMBP 的序列,提升适配体的特异性。

1.2.5 适配体筛选过程的监测 为监测筛选过程中适配体库的富集程度与特异性变化,分别采用 qPCR 与流式细胞术进行评估。利用文库复杂性降低导致熔解温度升高的特性,选择第 4、8、12 和 13 轮筛选文库作为模板,采用 qPCR 检测其熔解曲线,并以初始随机文库为对照,间接评估文库复杂性的变化。

同时,采用流式细胞术检测适配体富集程度。取第 4、8、12 和 13 轮的 FAM 标记 ssDNA 文库,溶解于 500 μL 结合缓冲液 (含 3 mmol·L⁻¹ MgCl₂ 的 PBS) 中,95 °C 加热 5 min 后立即冰浴 10 min,再于室温静置 5 min。随后与 *Nectin1*-磁珠在室温孵育 1 h,弃去未结合的文库并用结合缓冲液洗涤 3 次,重悬于 500 μL 结合缓冲液中,利用流式细胞仪采集

1 000个事件并测定荧光强度。以FAM标记的初始随机文库作为阴性对照。

1.2.6 测序 将第12轮和第13轮筛选获得的ssDNA文库作为模板,进行PCR扩增,产物经2.5%琼脂糖凝胶电泳(80 V,40 min)分离,回收约80 bp的目标条带。回收产物连接至pMD18-T载体,并转化至TOP10感受态大肠杆菌中,转化产物接种于含氨苄青霉素的LB固体培养基上,37℃恒温培养过夜(16 h)。挑取单克隆菌落进行培养,并通过菌液PCR进行初步鉴定。鉴定阳性的克隆送往擎科生物公司进行测序。

1.2.7 适配体的亲和力测定与特异性分析 将Ni磁珠与重组rMBP-Nectin1蛋白按2 μg蛋白/1 μL磁珠的比例,在4℃下孵育过夜进行包被。用于荧光显微观察时,加入处理后的FAM标记候选适配体(终浓度10 nmol·L⁻¹),25℃孵育1 h,设空白磁珠作为对照,通过荧光显微镜观察其结合情况。

亲和力检测采用磁珠ELISA法。将包被好的磁珠混匀并分装至ELISA板中(100 μL·孔⁻¹),每组设置3个重复。分别加入不同浓度的生物素标记适配体(10、5、1、0.5、0.1、0.05、0.01、0 nmol·L⁻¹),作为一抗,室温孵育1 h;随后加入稀释比例为1:10 000的HRP标记链霉亲和素作为二抗,显色并测定OD值,根据信号强度绘制结合曲线计算亲和力(K_d值)。

特异性分析中,将rMBP-Nectin1、rMBP-gD、rMBP-S1、rMBP-CD163以及标签蛋白rMBP分别与Ni磁珠在4℃孵育过夜,洗涤后加入10 nmol·L⁻¹生物素标记候选适配体,继而加入HRP标记的链霉亲和素(1:10 000),通过ELISA法检测不同蛋白对适配体的结合能力,评估其特异性识别能力。

1.2.8 适配体二级结构预测与分子对接分析 利用在线预测工具Mfold(<http://www.unafold.org/>)对筛选获得的Apt-Nectin1-6适配体进行二级结构预测,分析其可能形成的发夹和茎环结构。随

后使用3dRNA/DNA在线平台对其三维空间结构进行建模。将该适配体三维结构与经SWISS-MODEL同源建模获得的Nectin1蛋白结构进行分子对接,模拟二者形成稳定复合物的过程,并分析其可能的氢键作用位点与结合区域。

1.2.9 流式细胞术验证适配体与细胞结合能力 将Vero、PK15、BHK21及293T细胞接种于24孔板中,待细胞生长至约80%融合度时,使用无酶细胞消化液收集细胞。随后加入1 μmol·L⁻¹ FAM标记的Apt-Nectin1-6适配体,在25℃孵育1 h,以FAM标记的随机寡核苷酸文库作为阴性对照。孵育结束后,使用流式细胞术检测细胞表面的荧光强度,以评估适配体的结合能力。

1.2.10 Nectin1敲减细胞系的构建与验证 为验证Apt-Nectin1-6是否可特异性识别细胞表面Nectin1蛋白,通过参考NCBI数据库中猪Nectin1基因CDS区序列,设计两条shRNA干扰序列(sh-Nectin1-1与sh-Nectin1-2,见表1),并克隆至pLKO.1-TRC慢病毒载体中。采用Xho I和EcoR I进行双酶切并连接重组质粒,在第二代慢病毒包装系统(psPAX2/pMD2. G)辅助下,转染293T细胞实现病毒包装。收集病毒液感染PK15细胞,构建稳定敲减细胞株。

待细胞生长至90%融合度后,使用Trizol法提取总RNA,反转录为cDNA后进行qRT-PCR检测敲减效率,GAPDH为内参基因。以未感染慢病毒的PK15细胞作为对照。

进一步将sh-Nectin1-1和sh-Nectin1-2细胞接种于24孔板,感染MOI=0.2的PRV-GFP病毒,4℃孵育1 h完成病毒吸附后更换含1% FBS的DMEM维持液,于37℃培养8 h,使用流式细胞仪检测荧光强度,分析敲减是否影响PRV吸附细胞。

1.2.11 流式细胞术验证适配体与细胞表面Nectin1蛋白特异性结合 将PK15细胞接种于24孔板中,待细胞生长至约80%融合度后,分别加

表1 shRNA干扰序列
Table 1 shRNA interference sequence

名称 Name	序列(5'→3') Sequence
Nectin1-1F	CCGGAGCATCCTGCTGGTGCTATTTCTCGAGAAATAGCACCAGCAGGATGCTTTTTTG
Nectin1-1R	AATTCAAAAAAGCATCCTGCTGGTGCTATTTCTCGAGAAATAGCACCAGCAGGATGCT
Nectin1-2F	CCGGAGAACGACGGGTCTTTCATTTCTCGAGAAATGAAAGACCCGTCGTTCTTTTTTG
Nectin1-2R	AATTCAAAAAAGAACGACGGGTCTTTCATTTCTCGAGAAATGAAAGACCCGTCGTTCT

入 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ FAM 标记的 Apt-Nectin1-6 适配体孵育 1 h, 以 sh-Nectin1-1、sh-Nectin1-2 细胞以及 FAM 标记的随机文库为对照组。孵育结束后使用流式细胞术检测荧光强度, 以验证 Apt-Nectin1-6 是否特异性结合细胞表面的 Nectin1 蛋白。

1.2.12 适配体细胞毒性检测 为评估适配体对细胞的毒性作用, 将 PK15 和 Vero 细胞接种于 96 孔板中, 待细胞生长至 60% 融合度时, 分别加入 0、3、5、7、10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Apt-Nectin1-6 适配体, 先后在 25 和 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下各孵育 1 h, 随后更换为含 1% FBS 的 DMEM 维持液, 继续培养 16 h。按照 CCK-8 检测试剂盒说明书操作 (Beyotime Biotech, Beijing, China), 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 3 h 后, 用酶标仪在 450 nm 波长下读取吸光值, 评估细胞活力。

1.2.13 验证适配体对病毒吸附宿主细胞的影响 将 PK15 和 Vero 细胞分别接种于 24 孔板中培养过夜, 次日计数后, 加入 0、3、5、7 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ FAM 标记的 Apt-Nectin1-6 适配体, 并设置 FAM 标记的随机文库为阴性对照。25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 后, 加入 $\text{MOI}=0.2$ 的 PRV-GFP 病毒, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 完成病毒吸附。随后更换为含 1% FBS 的 DMEM 维持液, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下继续培养 8 h。使用流式细胞术检测荧光强度, 评估适配体对病毒吸附细胞的影响。

接着通过病毒基因组拷贝数检测适配体的阻断作用。将 PK15 和 Vero 细胞接种于 12 孔板中, 培养过夜并计数后, 加入 0、3、5、7 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Apt-Nectin1-6 适配体, 设置随机文库为阴性对照。适配体预处理后, 加入 $\text{MOI}=0.2$ 的 PRV-QXX 病毒于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 提取病毒 DNA 基因组。利用 PRV-gH 基因的标准质粒和特异引物 (表 2) 进行荧光定量 PCR, 采用绝对定量法测定样品中病毒基因组拷贝数, 从而评价适配体对病毒吸附过程的抑制能力。

为进一步检测适配体对子代病毒产生的影响, 将 PK15 和 Vero 细胞接种于 24 孔板, 培养过夜并计数后, 按上述浓度添加 Apt-Nectin1-6 适配体, 随机文库为阴性对照。适配体预处理 1 h 后, 加入 MOI 为 0.2 的 PRV-QXX 毒株, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 吸附 1 h, 随后更换为含 1% FBS 的 DMEM 维持液, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养 24 h。经三次冻融循环裂解细胞, $5\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 收集上清液作为病毒样品。将 Vero 细胞接种于 96 孔板, 培养过夜。将病毒样品按 10^{-1} 至 10^{-12} 梯度以 DMEM 稀释, 每个稀释度设 8 个重复孔。弃去旧培养基, 加入 100 μL 稀释病毒液, 37 $^{\circ}\text{C}$

吸附 1 h 后弃去病毒液, 补加含 1% FBS 的维持液。继续培养约 5 d, 观察细胞病变 (CPE) 情况, 记录各稀释度下 CPE 阳性孔数, 并按 Reed-Muench 法计算病毒 TCID_{50} 。

表 2 绝对定量引物序列

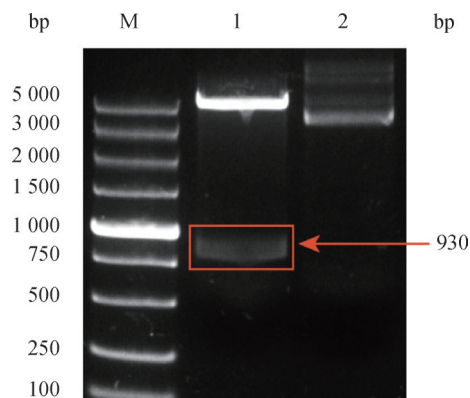
Table 2 Absolute quantification primer sequences

名称 Name	序列 (5'→3') Sequence
PRV-gH-F	CTCGCCATCGTCAGCAA
PRV-gH-R	GCTGCTCCTCCATGTCCTT

2 结 果

2.1 重组质粒酶切鉴定

为验证 pET28a-MBP-Nectin1 是否构建成功, 采用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切体系进行限制性酶切验证, 结果如图 1, 酶切获得 930 bp 的目的条带, 与预期大小一致。



取 pET28a-MBP-Nectin1 重组质粒, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 酶切 3 h; M. DL5000 DNA 相对分子质量标准; 1. *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切; 2. 未酶切对照组

The pET28a-MBP-Nectin1 recombinant plasmid was digested at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 3 h; M. DL5000 DNA marker; 1. Double digestion with *Bam*H I and *Xho* I; 2. Uncut control

图 1 pET28a-MBP-Nectin1 重组质粒酶切验证

Fig. 1 Verification of the pET28a-MBP-Nectin1 recombinant plasmid

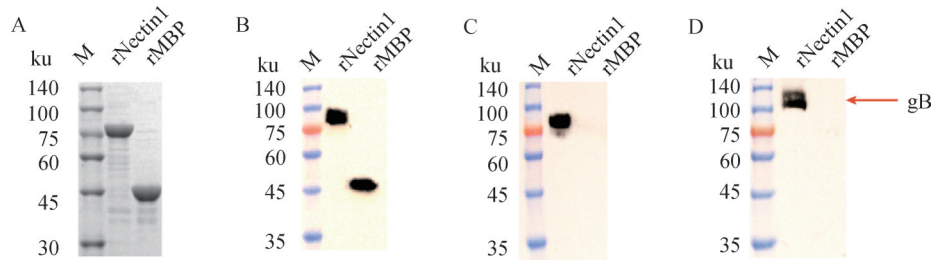
2.2 rMBP-Nectin1 蛋白及标签蛋白 MBP 的纯化及鉴定

采用 Ni-NTA 亲和层析法纯化原核表达的 rMBP-Nectin1 重组蛋白。SDS-PAGE 检测结果显示, 在 80 ku 位置处出现单一清晰的目的条带 (图 2A)。随后, 采用 MBP 抗体对 rMBP-Nectin1 蛋白及 rMBP 蛋白进行 Western blot 鉴定, 结果在预期

分子量位置均检测到目的条带(图2B)。进一步使用 Nectin1 抗体对纯化的 rMBP-Nectin1 及 rMBP 蛋白进行鉴定,与负对照 MBP 蛋白相比,Nectin1 抗体能特异性识别 rMBP-Nectin1 蛋白(图2C)。

为验证 rMBP-Nectin1 蛋白的生物学活性,采用

Pull-down 试验评估其与 PRV 病毒的结合能力。Western blot 结果显示,rMBP-Nectin1 蛋白能够特异性结合 PRV 病毒颗粒(图2D),表明所纯化的 rMBP-Nectin1 蛋白具有良好的生物学活性。



A. 纯化后的 rMBP-Nectin1 (80 ku) 和 rMBP (45 ku) 蛋白的 SDS-PAGE 分析; B. 使用 MBP 单抗对 rMBP-Nectin1 和 rMBP 蛋白进行 Western blot 鉴定; C. 使用 Nectin1 多抗对 rMBP-Nectin1 和 rMBP 蛋白进行 Western blot 鉴定; D. 将纯化的 rMBP-Nectin1 蛋白与磁珠在 4 °C 孵育后,加入 PRV 病毒液过夜孵育,利用 Pull-down 方法捕获 PRV 病毒,rMBP 蛋白作为对照,使用 gB 单抗进行 Western blot 鉴定

A. SDS-PAGE analysis of the purified rMBP-Nectin1 (80 ku) and rMBP (45 ku) proteins; B. Western blot identification of rMBP-Nectin1 and rMBP proteins using an anti-MBP monoclonal antibody; C. Western blot identification of rMBP-Nectin1 and rMBP proteins using an anti-Nectin1 polyclonal antibody; D. Purified rMBP-Nectin1 protein was incubated with magnetic beads at 4 °C, followed by incubation with PRV overnight for Pull-down assays. rMBP protein was used as a control. Detection was performed by Western blot using an anti-gB monoclonal antibody

图2 rMBP-Nectin1 和 rMBP 蛋白的纯化及鉴定

Fig. 2 Purification and identification of rMBP-Nectin1 and rMBP proteins

2.3 适配体筛选进程的监测

使用 qPCR 和流式细胞术对第 4、8、12、13 轮文库进行分析,qPCR 结果显示,随着筛选轮数的增加,熔链温度逐渐增加(图3A),表明文库复杂度下降。流式结果显示,随着筛选的进行,荧光强度增加(图3B),表明文库中能与 Nectin1 蛋白特异性结合的适配体得到富集。

2.4 核酸适配体测序分析结果

将第 12、13 轮筛选的 ssDNA 经 PCR 扩增后与 T 载体(pMD-18T)连接,连接产物转化至 Top 10 感受态细胞中,涂板培养后,各挑取 60 个单菌落培养,并进行菌液 PCR 鉴定。将鉴定正确的菌液进行测序,测序结果显示,共得到 96 个测序大小正确的结果,整理后得到 20 条核酸适配体,选择其中重复率高的前 6 条为候选核酸适配体,其中 Apt-Nectin1-1 与 Apt-Nectin1-5 仅在 5'到 3'第 34 位碱基不同。详细序列见表 3。

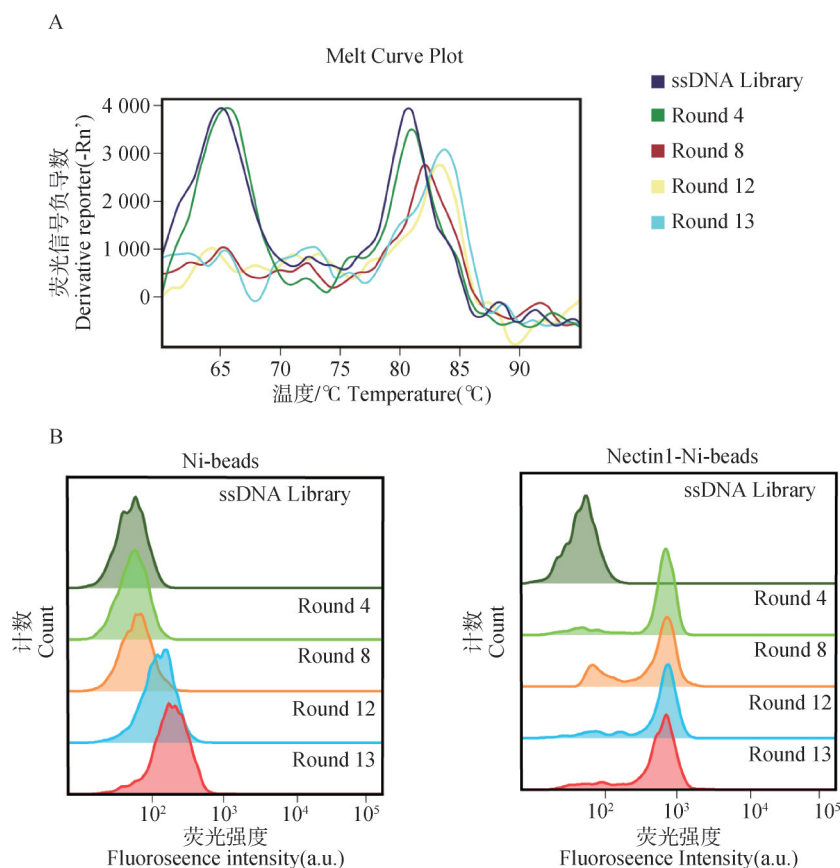
2.5 候选核酸适配体与 Nectin1 结合效果分析

为验证候选核酸适配体与靶标蛋白 Nectin1 的结合能力,将 FAM 标记的候选适配体与 Nectin1 偶

联的磁珠孵育,并以空白磁珠作为阴性对照,通过荧光显微镜观察结合情况。结果如图 4 所示,Apt-Nectin1-1、Apt-Nectin1-5 和 Apt-Nectin1-6 能够明显结合 Nectin1 磁珠,而在空白磁珠上无明显荧光信号,表明其具有良好的特异性。相比之下,Apt-Nectin1-2 在空白磁珠上亦观察到荧光信号,提示其存在非特异性结合;Apt-Nectin1-3 和 Apt-Nectin1-4 则未能与 Nectin1 磁珠结合。综上,选择 Apt-Nectin1-1、Apt-Nectin1-5 和 Apt-Nectin1-6 作为后续研究对象。

2.6 核酸适配体特异性和亲和力检测

采用磁珠 ELISA 法检测候选核酸适配体与 Nectin1 蛋白的特异性。将 FAM 标记的适配体分别与 rMBP-Nectin1、rMBP-gD、rMBP-S1、rMBP-CD163 及 rMBP 蛋白孵育,通过检测荧光信号评估其结合能力。结果显示,与 Apt-Nectin1-1 和 Apt-Nectin1-5 相比,Apt-Nectin1-6 能够特异性结合 rMBP-Nectin1,而与其他重组蛋白无明显结合(图 5A)。进一步采用磁珠 ELISA 法测定 Apt-Nectin1-6 与 rMBP-Nectin1 的亲和力,结果显示其



A. qPCR检测富集结果。选取第4轮文库(绿色)、第8轮文库(褐色)、第12轮文库(黄色)、第13轮文库(浅蓝色)作为模板,进行qPCR,随机文库(深蓝色)为对照,分析其熔炼温度曲线,熔链温度越高,文库复杂性越低;B. 流式细胞术检测富集结果。用FAM标记的引物扩增第4轮文库(浅绿色)、第8轮文库(橙色)、第12轮文库(蓝色)、第13轮文库(红色)文库和随机文库(深绿色),将扩增产物制备成单链后,分别与Nectin1-磁珠孵育,使用空白磁珠作为对照

A. qPCR analysis of library enrichment. The 4th-round library (green), 8th-round library (brown), 12th-round library (yellow), and 13th-round library (light blue) were selected as templates for qPCR, with the random library (dark blue) as the control. Melting temperature curves were analyzed, where higher melting temperatures indicated lower library complexity. B. Flow cytometry analysis of library enrichment. Libraries from the 4th round (light green), 8th round (orange), 12th round (blue), 13th round (red), and random library (dark green) were amplified using FAM-labeled primers. The amplified products were prepared as single-stranded DNA and incubated with Nectin1-conjugated magnetic beads, with blank magnetic beads serving as the control

图3 qPCR及流式细胞术检测筛选适配体富集情况

Fig. 3 Analysis of enrichment efficiency by qPCR and flow cytometry

平衡解离常数(Kd)为0.11 nmol±0.02 nmol(图5B),表明Apt-Nectin1-6具有较高的亲和力。

2.7 核酸适配体二级结构预测及分子对接分析

利用在线核酸结构预测软件Mfold对Apt-Nectin1-6适配体的二级结构进行预测。结果显示,Apt-Nectin1-6具有稳定的发夹结构和茎环结构,为其与Nectin1蛋白结合提供了结构基础(图6A)。进一步通过分子对接分析发现,Apt-Nectin1-6能够与Nectin1蛋白形成氢键相互作用,例如适配体的

DG-18位点与Nectin1蛋白的氨基酸残基GLY-123之间形成氢键(图6B),表明Apt-Nectin1-6在分子水平上具有良好的结合能力。

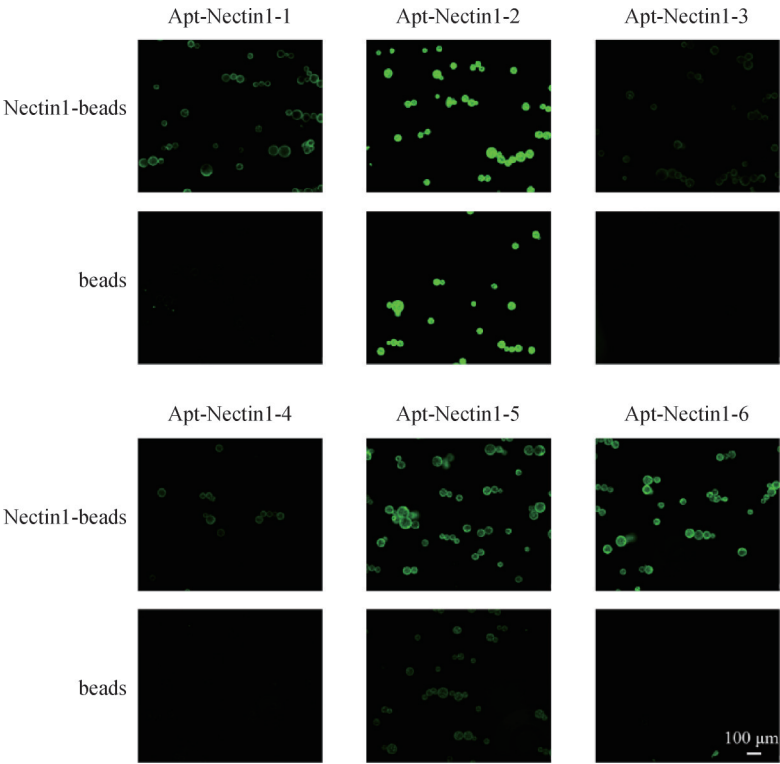
2.8 Apt-Nectin1-6适配体在多种细胞系中对细胞表面Nectin1的识别能力验证

为系统评估Apt-Nectin1-6适配体对细胞表面Nectin1蛋白的识别能力,选择了PRV易感的Vero、PK15、BHK21和293T四种细胞系进行流式细胞术分析。试验结果显示,在上述四种细胞系中,Apt-

表 3 候选核酸适配体序列

Table 3 Candidate aptamer sequences

名称 Name	序列(5'→3') Sequence	占比/% Percent
Apt-Nectin1-1	AGTTGACGCTGGTGTGGGACCATCGTGACAGCTATGACTGCCTTGAGTTAATA-TCCGTGGTCAATCTGCGTGCGTCCAGT	38.54
Apt-Nectin1-2	AGTTGACGCTGGTGTGGGACGTCTACACCCCAGGGAATGCAGACCCCAGGTGG-CACAGTATCAATCTGCGTGCGTCCAGT	17.70
Apt-Nectin1-3	AGTTGACGCTGGTGTGGGACATGATTGTCGCCGTCTGAGGCCCATAGATCCGC-AGGATGATCAATCTGCGTGCGTCCAGT	9.37
Apt-Nectin1-4	AGTTGACGCTGGTGTGGGACGACGACGATAACCCCAGGAATGCAGCCCCAGAG-TTACCGTTCAATCTGCGTGCGTCCAGT	9.37
Apt-Nectin1-5	AGTTGACGCTGGTGTGGGACCATCGTGACAGCTGTGACTGCCTTGAGTTAATA-TCCGTGGTCAATCTGCGTGCGTCCAGT	8.33
Apt-Nectin1-6	AGTTGACGCTGGTGTGGGACCGACAAAATACAAGGTTATTTTTGCATCCGTCT-GAGGATCTCAATCTGCGTGCGTCCAGT	7.29



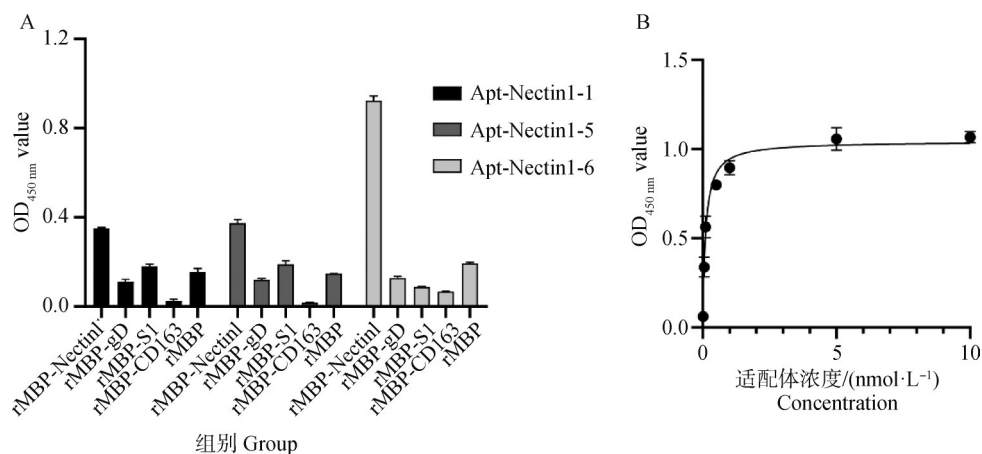
取 FAM 标记的候选适配体与 Nectin1 偶联磁珠孵育 1 h, 以未结合 Nectin1 的磁珠作为对照, 通过荧光显微镜观察各组磁珠表面的荧光信号

FAM-labeled candidate aptamers were incubated with Nectin1-conjugated magnetic beads for 1 h, with magnetic beads without Nectin1 serving as the control. Fluorescence signals on the surfaces of magnetic beads were observed under a fluorescence microscope

图 4 候选核酸适配体与 Nectin1 结合效果分析

Fig. 4 Detection of binding between candidate aptamers and Nectin1-conjugated magnetic beads

Nectin1-6 组的荧光强度均显著高于随机文库阴性对照组 (图 7A), 提示 Apt-Nectin1-6 能够有效识别并结合细胞表面的 Nectin1 蛋白。进一步对这四种细胞来源的 Nectin1 氨基酸序列进行同源性比对分

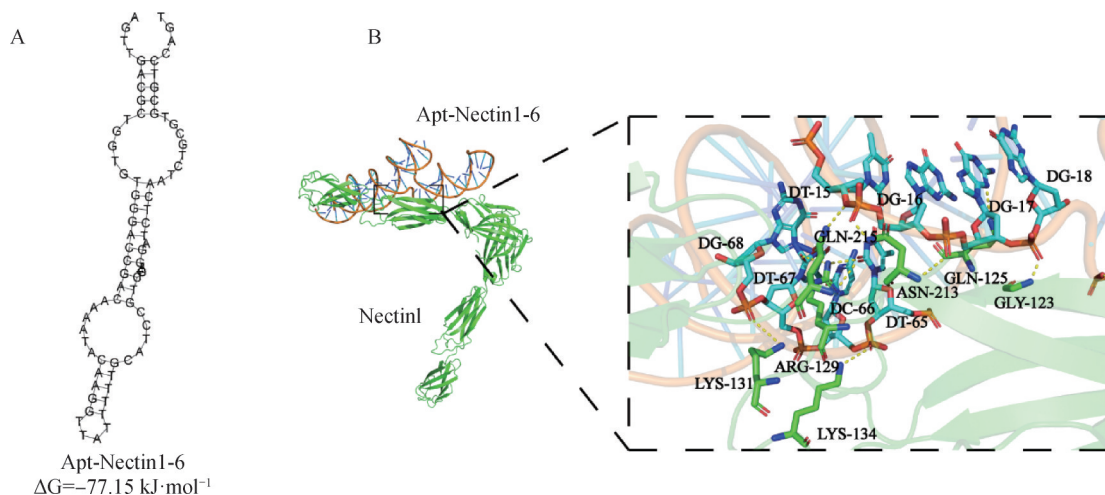


A. 采用磁珠 ELISA 法检测 Apt-Nectin1-1、Apt-Nectin1-5 和 Apt-Nectin1-6 与 rMBP-Nectin1、rMBP-gD、rMBP-S1、rMBP-CD163 及 rMBP 蛋白的结合特异性; B. 采用磁珠 ELISA 法测定 Apt-Nectin1-6 与 rMBP-Nectin1 的亲合力, 计算平衡解离常数 (Kd)

A. The binding specificity of Apt-Nectin1-1, Apt-Nectin1-5, and Apt-Nectin1-6 to rMBP-Nectin1, rMBP-gD, rMBP-S1, rMBP-CD163, and rMBP proteins was evaluated by magnetic bead-based ELISA; B. The affinity of Apt-Nectin1-6 for rMBP-Nectin1 was determined by magnetic bead-based ELISA, and the equilibrium dissociation constant (Kd) was calculated

图 5 候选核酸适配体与 Nectin1 蛋白的特异性及亲和力检测

Fig. 5 Specificity and affinity analysis of candidate aptamers for Nectin1 protein



A. Apt-Nectin1-6 适配体的二级结构预测结果; B. Apt-Nectin1-6 适配体 (绿色) 与 Nectin1 蛋白 (橙色) 的分子对接结果, 黄色虚线表示形成的氢键

A. Predicted secondary structure of the Apt-Nectin1-6 aptamer; B. Molecular docking result showing the interaction between the Apt-Nectin1-6 aptamer (green) and the Nectin1 protein (orange), with yellow dashed lines representing hydrogen bonds

图 6 Apt-Nectin1-6 适配体的二级结构预测及与 Nectin1 蛋白的分子对接分析

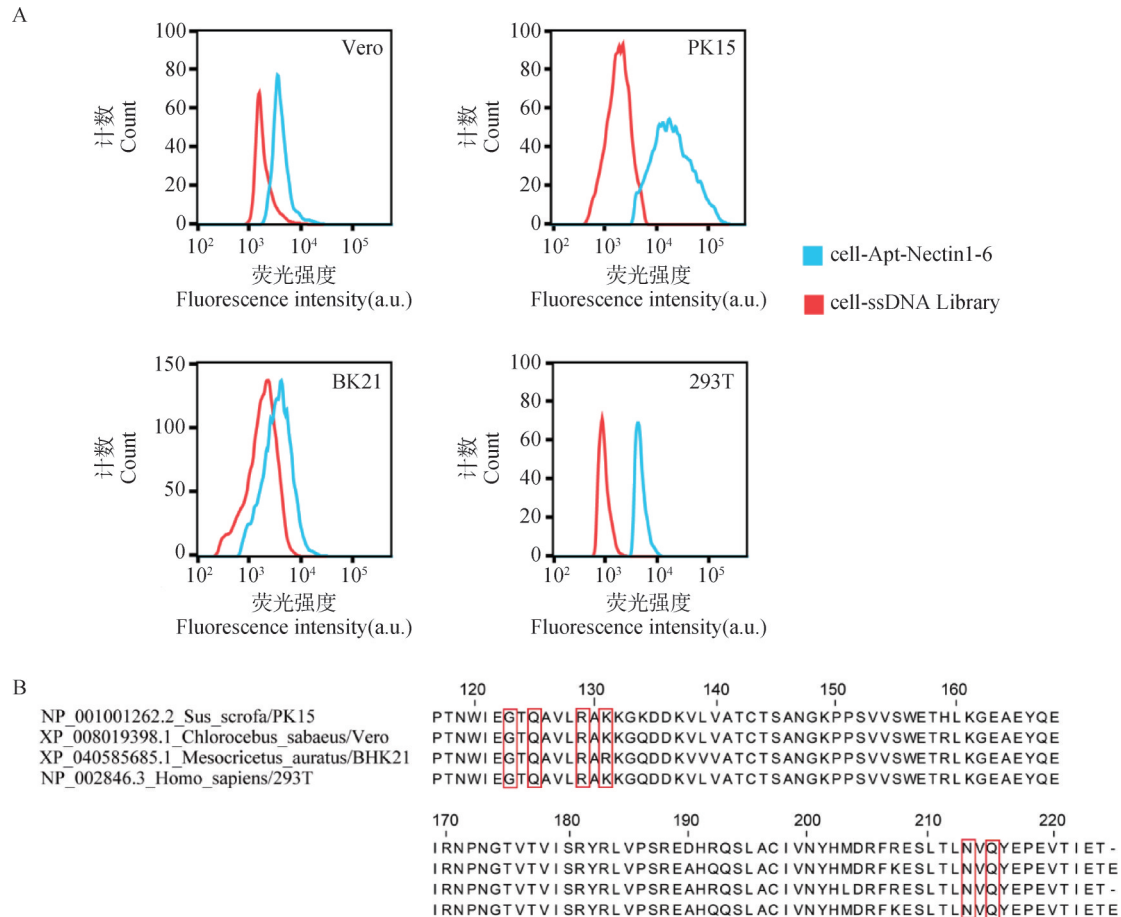
Fig. 6 Secondary structure prediction of Apt-Nectin1-6 aptamer and molecular docking analysis with Nectin1 protein

析,发现各来源间 Nectin1 序列高度保守,尤其是与 Apt-Nectin1-6 相互作用的关键氨基酸位点也呈现良好保守性(图 7B)。

为了进一步验证 Apt-Nectin1-6 适配体与细胞表面 Nectin1 蛋白结合的特异性,进行了后续的敲减试验。

2.9 流式细胞术验证 Apt-Nectin1-6 适配体对细胞表面 Nectin1 的特异性识别

通过 shRNA 干扰技术,分别构建了 Nectin1 基因稳定敲减的 PK15 细胞系 (sh-Nectin1-1 和 sh-Nectin1-2)。qRT-PCR 检测结果表明,与正常 PK15 细胞相比,sh-Nectin1-1 和 sh-Nectin1-2 细胞



A. 采用FAM荧光标记的Apt-Nectin1-6分别与Vero、PK15、BHK21和293T细胞共孵育,以随机文库作为阴性对照组,流式细胞术检测荧光强度,评估适配体对细胞表面Nectin1的识别能力;B. 对来源于猪、非洲绿猴、仓鼠和人的Nectin1片段利用MEGA6软件进行同源性分析,与Apt-Nectin1-6结合的保守氨基酸位点用红色方框标示

A. FAM-labeled Apt-Nectin1-6 was incubated with Vero, PK15, BHK21, and 293T cells. A random library was used as a negative control. Fluorescence intensity was analyzed by flow cytometry to evaluate the recognition ability of the aptamer for cell surface Nectin1. B. Sequence fragments of Nectin1 derived from pig, African green monkey, hamster, and human were analyzed for homology using MEGA6 software. Conserved amino acid residues potentially involved in binding with Apt-Nectin1-6 were highlighted with red boxes

图7 Apt-Nectin1-6适配体对多种细胞表面Nectin1蛋白的识别能力验证

Fig. 7 Validation of Apt-Nectin1-6 aptamer recognition of cell surface Nectin1 in multiple cell lines

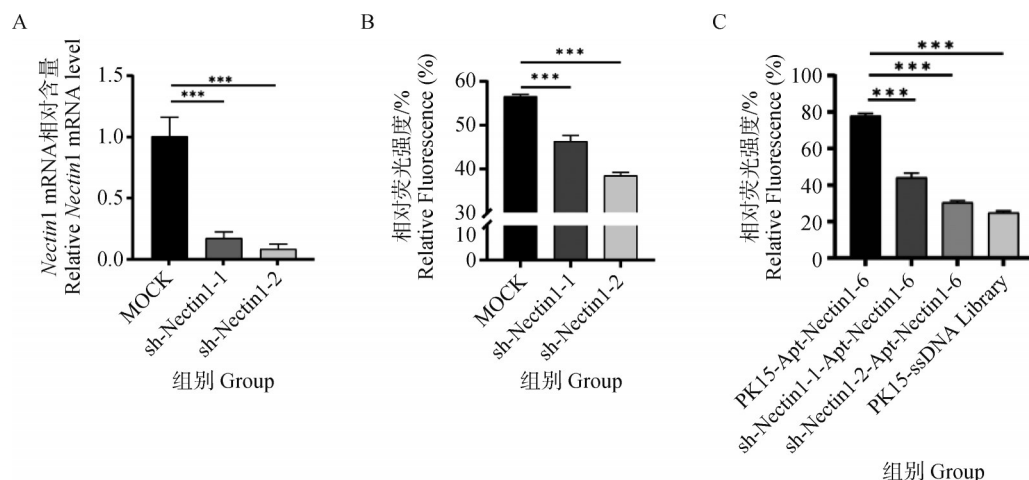
中Nectin1 mRNA转录水平显著下降(图8A)。进一步通过流式细胞术检测PRV-GFP复制效率,发现敲减细胞中病毒复制能力明显降低(图8B),说明Nectin1基因敲减细胞系构建成功。

随后,利用流式细胞术检测适配体与细胞的结合能力。结果显示,Nectin1表达量降低后,Apt-Nectin1-6与细胞表面的结合能力亦显著下降(图8C),而随机文库对照组无明显变化。上述结果表明,Apt-Nectin1-6能够特异性识别细胞表面的Nectin1蛋白。

2.10 Apt-Nectin1-6适配体的细胞毒性与体外感染细胞的吸附阻断效应

为系统评估Apt-Nectin1-6适配体在细胞水平的生物安全性及其对伪狂犬病病毒(PRV)细胞吸附的抑制能力,分别对其细胞毒性和抗病毒活性进行验证。首先,采用CCK-8试剂检测不同浓度适配体(终浓度为0、3、5、7、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对PK15和Vero细胞活性的影响。结果显示,Apt-Nectin1-6在上述浓度范围内对两种细胞系的存活率无显著影响,提示其具有良好的生物相容性(图9A)。

进一步评估Apt-Nectin1-6对PRV体外感染细

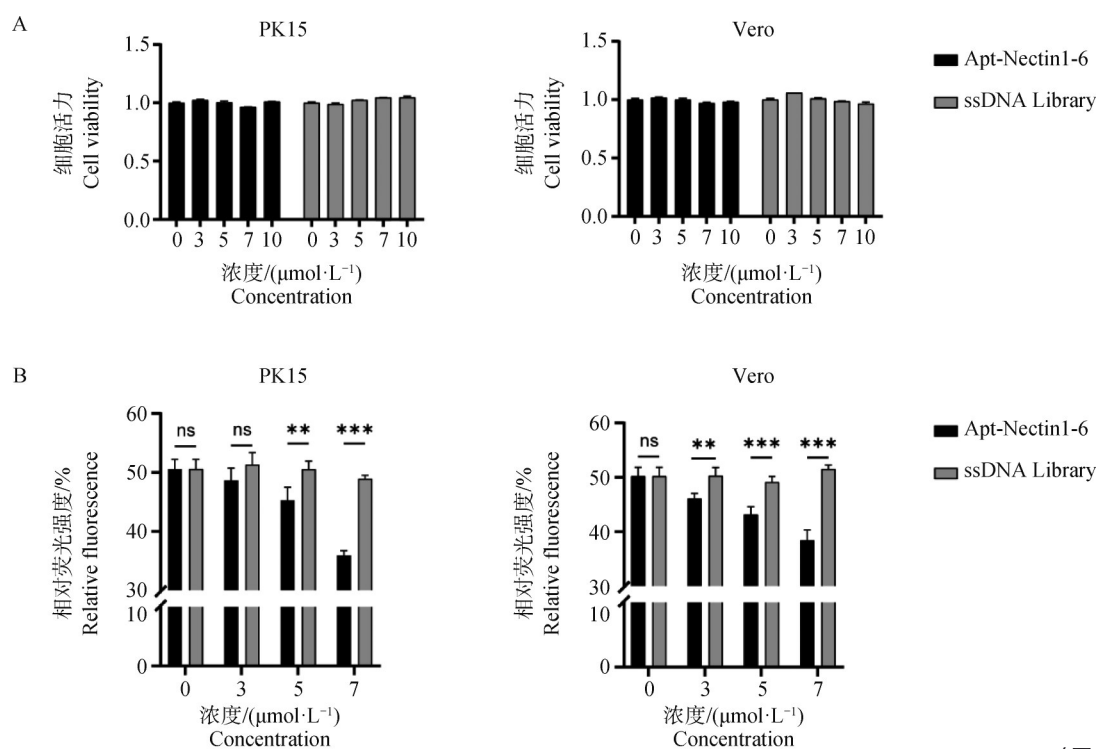


A. 通过慢病毒包装系统转染 PK15 细胞并经嘌呤霉素筛选 24 h, 构建 *Nectin1* 基因特异性 shRNA 稳定敲减细胞系 (sh-Nectin1-1 和 sh-Nectin1-2), 以 *GAPDH* 为内参基因, 使用 qRT-PCR 检测 *Nectin1* mRNA 表达水平, 未转染细胞作为空白对照; B. 将敲减细胞与 PRV-GFP 在 4 °C 条件下孵育 1 h 完成病毒吸附, 随后更换含 1% FBS 的 DMEM 维持液, 在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 8 h, 使用流式细胞术检测荧光强度, 正常 PK15 细胞作为对照; C. FAM 标记的 Apt-Nectin1-6 分别与正常 PK15 及敲减细胞 (sh-Nectin1-1/2) 共孵育, 随机文库与 PK15 细胞孵育作为阴性对照, 流式细胞术检测结合能力。***. $P < 0.001$

A. Construction of Nectin1-specific shRNA stable knockdown PK15 cell lines (sh-Nectin1-1 and sh-Nectin1-2) by lentiviral transduction and puromycin selection for 24 h. *Nectin1* mRNA expression was detected by qRT-PCR, using *GAPDH* as the internal control. Untransfected PK15 cells were used as the blank control; B. Cells were incubated with PRV-GFP at 4 °C for 1 h for viral adsorption, then cultured in DMEM containing 1% FBS at 37 °C with 5% CO₂ for 8 h. Fluorescence intensity was analyzed by flow cytometry. Normal PK15 cells served as control; C. FAM-labeled Apt-Nectin1-6 was incubated with PK15 and shRNA-Nectin1-1/2 cells. The random library incubated with PK15 cells was used as a negative control. Binding ability was assessed by flow cytometry. ***. $P < 0.001$

图 8 *Nectin1* 敲减 PK15 细胞的构建及 Apt-Nectin1-6 适配体识别能力的特异性验证

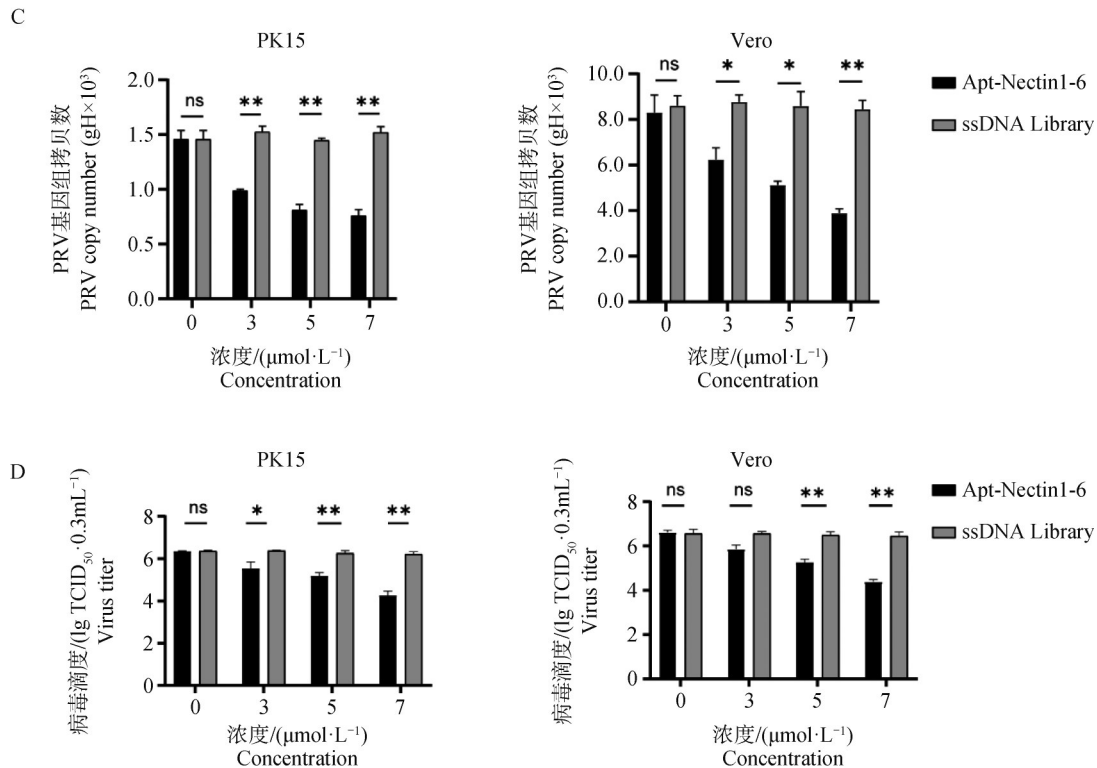
Fig. 8 Construction of *Nectin1*-knockdown PK15 cells and specificity validation of Apt-Nectin1-6 aptamer recognition



(图 9 Fig.9)

(转下页 Carried forward)

(续图9 Continued)



A. 不同浓度(0、3、5、7、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的Apt-Nectin1-6处理PK15和Vero细胞后,采用CCK-8法检测细胞活力,评估适配体的细胞毒性;B. 用流式细胞术检测适配体处理对PRV感染PK15和Vero细胞的影响,分析其抑制病毒感染的能力;C. 采用qPCR方法检测细胞吸附病毒后的基因组拷贝数,评价适配体阻断PRV吸附的效果;D. 感染后24 h收集细胞上清,采用TCID₅₀法检测病毒滴度,进一步分析适配体对病毒复制的抑制作用。ns. 差异不显著;*. $P < 0.05$; **. $P < 0.01$; ***. $P < 0.001$

A. PK15 and Vero cells were treated with varying concentrations (0, 3, 5, 7, and 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) of Apt-Nectin1-6, and cell viability was assessed using the CCK-8 assay to evaluate cytotoxicity; B. The antiviral effect of Apt-Nectin1-6 was analyzed by flow cytometry, detecting PRV infection in treated PK15 and Vero cells; C. Quantitative PCR was performed to detect viral genome copy numbers after PRV adsorption, evaluating the aptamer's ability to block virus attachment; D. Culture supernatants were collected at 24 hours post-infection, and viral titers were determined using the TCID₅₀ method to further evaluate the inhibitory effect of the aptamer on PRV replication. ns. Not significant; *. $P < 0.05$; **. $P < 0.01$; ***. $P < 0.001$

图9 Apt-Nectin1-6适配体的细胞毒性与体外感染细胞的吸附阻断效应

Fig. 9 Cytotoxicity of Apt-Nectin1-6 and its blocking effect on the adsorption of virus to cells

细胞的吸附阻断效应,采用PK15和Vero两种PRV易感细胞建立感染模型,并进行适配体干预。流式细胞术检测结果表明,Apt-Nectin1-6处理后细胞中PRV-GFP的荧光信号明显减弱,且抑制效果随适配体浓度升高而增强,呈现明确的剂量依赖关系(图9B)。同时,通过荧光定量PCR检测病毒基因组拷贝数,结果显示Apt-Nectin1-6在3~7 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度范围内可有效阻断PRV-QXX的吸附过程,并显著降低病毒基因组在细胞内的水平(图9C)。此基础上,进一步采用病毒滴度(TCID₅₀)检测技术评估Apt-Nectin1-6对PRV复制产物的影响。结果表

明,Apt-Nectin1-6处理组的病毒滴度较对照组显著降低,提示其能够有效抑制子代病毒粒子的产生(图9D)。综上所述表明,Apt-Nectin1-6适配体在无明显细胞毒性的前提下,能够有效抑制PRV吸附细胞,具有良好的抗病毒潜力。

3 讨论

伪狂犬病病毒(PRV)是一种 α 疱疹病毒,具有广泛的宿主范围,以猪为天然宿主,感染后可造成繁殖障碍、神经系统症状及高致死率,给全球养猪业带来严重经济损失。PRV还具有潜伏感染能力,

且近年来逐渐被证实具有人畜共患的潜力。此外,自 2011 年起我国出现的 PRV 变异毒株使得传统的 Bartha K61 疫苗保护力下降,难以实现有效免疫^[24]。因此,亟需开发新型、安全、有效的抗病毒策略。

PRV 的糖蛋白 gD 是介导病毒侵入的关键因子,能够与宿主细胞表面的 3-O-硫乙酰肝素、Nectin1、Nectin2 等受体结合,诱导膜融合和病毒进入^[25]。其中,Nectin1 作为一种免疫球蛋白样细胞黏附分子,被证实是 PRV 及单纯疱疹病毒(HSV)gD 蛋白的重要受体,广泛表达于多种细胞表面^[26-28]。已有研究表明,Nectin1 功能缺失(如基因敲除或关键氨基酸突变)可显著降低 PRV 感染能力^[29]。因此,靶向 Nectin1 受体成为抑制 PRV 感染的潜在策略。

核酸适配体是一类能够通过空间结构与靶标蛋白高特异性、高亲和力结合的小分子 DNA 或 RNA 片段,被誉为“化学抗体”^[30]。其稳定性强、合成简便、修饰灵活、无免疫原性,在病毒检测和治疗中展现出广阔应用前景^[31]。

本研究以原核表达的 rMBP-Nectin1 融合蛋白为靶标,采用磁珠-SELEX 技术成功筛选得到具有高亲和力和高特异性的 DNA 适配体 Apt-Nectin1-6,其 Kd 值为 $0.11 \text{ nmol} \pm 0.02 \text{ nmol}$ 。Mfold 分析显示该适配体具有稳定的发夹和茎环结构,为与靶蛋白结合提供了构象基础^[32]。分子对接进一步揭示了 Apt-Nectin1-6 可通过多个氢键位点与 Nectin1 特异性结合,验证了其结构基础上的结合机制。本研究中筛选得到的核酸适配体 Apt-Nectin1-3 与 Apt-Nectin1-4 并未表现出与 Nectin-1 的明显结合能力,推测其主要原因可能包括:1)适配体自身的二级结构不稳定,不能形成稳定的茎环结构,导致其空间构象无法维持关键结合区域的呈现;2)其结合区未能覆盖 Nectin-1 的功能性结构域,尤其是 Ig-like V 型结构域中与 PRV gD 相互作用的关键残基位点。因此,虽然 Apt-Nectin1-3 和 Apt-Nectin1-4 在 SELEX 筛选中富集,但可能因构象或结合位点原因未具备有效的生物学功能。后续可考虑对其进行结构优化或延伸序列以增强其稳定性和靶向性。

功能验证试验发现,Apt-Nectin1-6 能够与 Vero、PK15、BHK21、293T 等多种细胞系表面的 Nectin1 结合,提示其不仅具有跨细胞类型识别能力,也间接证明这些细胞系中存在 Nectin1 表达,可作为适配体识别的靶标。更重要的是,利用 Nectin1

基因敲减的 PK15 细胞进一步证实了 Apt-Nectin1-6 对 Nectin1 的结合具有良好的特异性。细胞水平的功能评估也表明,Apt-Nectin1-6 在无细胞毒性的前提下,可剂量依赖性地抑制 PRV 吸附细胞。需要指出的是,Nectin1 虽然是 PRV gD 的高亲和力受体,但并非唯一的受体,靶向其可能存在特异性有限的问题。然而,本研究的意义不仅在于阻断感染本身,更在于解析 Nectin1 介导 PRV 感染过程中的作用机制。未来可以尝试以 PRV gD 为直接靶点筛选 DNA 适配体,有望获得更高效的抗病毒工具。此外,我们对不同细胞来源的 Nectin1 蛋白序列进行了比对,发现 Apt-Nectin1-6 结合的预测区域在多个物种中具有高度保守性(图 7B),支持其具有广谱结合潜力。

综上所述,本研究筛选获得了可特异结合 PRV 受体 Nectin1 的 DNA 适配体 Apt-Nectin1-6,证实其可用于识别细胞表面 Nectin1 并有效阻断病毒吸附宿主细胞。该研究为适配体在病毒识别、吸附阻断等方面的应用提供了思路,未来可进一步拓展其在诊断试剂、抗病毒递送体系等领域的应用。

4 结 论

本研究以 PRV 主要受体蛋白 Nectin1 为靶标,采用磁珠-SELEX 技术成功筛选获得了高亲和力、高特异性的核酸适配体 Apt-Nectin1-6。该适配体与 Nectin1 蛋白的结合解离常数为 $0.11 \text{ nmol} \pm 0.02 \text{ nmol}$,具备稳定的二级结构,并可通过氢键与 Nectin1 实现特异性结合。体外试验表明,Apt-Nectin1-6 能够识别多种细胞表面表达的 Nectin1 蛋白,并在无明显细胞毒性的前提下显著抑制 PRV 的细胞吸附能力,具有良好的抗病毒潜力。该研究为开发靶向 Nectin1 的抗 PRV 新型分子工具提供了理论依据和实验基础。

参考文献:

- [1] HANSON R P. The history of pseudorabies in the United States [J]. *J Am Vet Med Assoc*, 1954, 124 (925):259-261.
- [2] CHEN Y, GAO J, HUA R, ZHANG G. Pseudorabies virus as a zoonosis: scientific and public health implications [J]. *Virus Genes*, 2025, 61(1):9-25.
- [3] ZHENG H H, FU P F, CHEN H Y, et al. Pseudorabies virus: From pathogenesis to prevention

- strategies[J]. *Viruses*, 2022, 14(8):1638.
- [4] CHENG X J, CHENG N, YANG C, et al. Emergence and etiological characteristics of novel genotype II pseudorabies virus variant with high pathogenicity in Tianjin, China[J]. *Microb Pathog*, 2024, 197:107061.
- [5] SALOGNI C, LAZZARO M, GIACOMINI E, et al. Infectious agents identified in aborted swine fetuses in a high-density breeding area: a three-year study[J]. *J Vet Diagn Invest*, 2016, 28(5):550-554.
- [6] AI J W, WENG S S, CHENG Q, et al. Human endophthalmitis caused by pseudorabies virus infection, China, 2017[J]. *Emerg Infect Dis*, 2018, 24(6):1087-1090.
- [7] YANG H, HAN H, WANG H, et al. A case of human viral encephalitis caused by pseudorabies virus infection in China[J]. *Front Neurol*, 2019, 10:534.
- [8] MÜLLER T, HAHN E C, TOTTEWITZ F, et al. Pseudorabies virus in wild swine: a global perspective [J]. *Arch Virol*, 2011, 156(10):1691-1705.
- [9] YE G, LIU H, ZHOU Q, et al. A tug of war: pseudorabies virus and host antiviral innate immunity [J]. *Viruses*, 2022, 14(3):547.
- [10] GONG L, DENG Q, XU R, et al. Effects of physical and chemical factors on pseudorabies virus activity *in vitro*[J]. *BMC Vet Res*, 2020, 16(1):358.
- [11] 朱志坚, 崔梦丽, 李金锋, 等. 伪狂犬病毒免疫逃逸机制研究进展[J]. 中国兽医杂志, 2024, 60(8):87-96.
- ZHU Z J, CUI M L, LI J F, et al. Research progress on immune evasion mechanisms of pseudorabies virus [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2024, 60(8):87-96. (in Chinese)
- [12] ZHANG T, LIU Y, CHEN Y, et al. A monoclonal antibody neutralizes pseudorabies virus by blocking gD binding to the receptor nectin-1 [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 188:359-368.
- [13] PAN Y, GUO L, MIAO Q, et al. Association of THBS3 with glycoprotein D promotes pseudorabies virus attachment, fusion, and entry[J]. *J Virol*, 2023, 97(2):e0187122.
- [14] LI X, CHEN S, ZHANG L, et al. Mutation and interaction analysis of the glycoprotein D and L and thymidine kinase of pseudorabies virus [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(19):11597.
- [15] GERAGHTY R J, KRUMMENACHER C, COHEN G H, et al. Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor[J]. *Science*, 1998, 280(5369):1618-1620.
- [16] LI A, LU G, QI J, et al. Structural basis of nectin-1 recognition by pseudorabies virus glycoprotein D [J]. *PLoS Pathog*, 2017, 13(5):e1006314.
- [17] CONNOLLY S A, WHITBECK J J, RUX A H, et al. Glycoprotein D homologs in herpes simplex virus type 1, pseudorabies virus, and bovine herpes virus type 1 bind directly to human HveC (nectin-1) with different affinities[J]. *Virology*, 2001, 280(1):7-18.
- [18] TOMIOKA Y, TAKEDA K, OZAKI K, et al. Single amino acid mutation of nectin-1 provides remarkable resistance against lethal pseudorabies virus infection in mice[J]. *J Vet Med Sci*, 2024, 86(1):120-127.
- [19] HUANG Y, LI Z, SONG C, et al. Resistance to pseudorabies virus by knockout of nectin1/2 in pig cells [J]. *Arch Virol*, 2020, 165(12):2837-2846.
- [20] KOHLBERGER M, GADERMAIER G. SELEX: Critical factors and optimization strategies for successful aptamer selection [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2022, 69(5):1771-1792.
- [21] ELLINGTON A D, SZOSTAK J W. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands [J]. *Nature*, 1990, 346(6287):818-822.
- [22] TUERK C, GOLD L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase [J]. *Science*, 1990, 249(4968):505-510.
- [23] LIU S, LI X, GAO H, et al. Progress in Aptamer Research and Future Applications[J]. *ChemistryOpen*, 2025:e202400463.
- [24] 郭镇洋, 田志军, 彭金美. 中国猪伪狂犬病的流行及防控[J]. 中国科学:生命科学, 2023, 53(12):1780-1793.
- GUO Z Y, TIAN Z J, PENG J M. Epidemic and prevention and control of pseudorabies in pigs in China [J]. *Science China:Life Sciences*, 2023, 53(12):1780-1793. (in Chinese)
- [25] 齐新永, 鞠厚斌, 葛菲菲, 等. 绵羊伪狂犬病病毒的分离鉴定及其gD基因序列分析[J]. 中国动物传染病学报, 2018, 26(4):11-17.
- QI X Y, JU H B, GE F F, et al. Isolation and identification of pseudorabies virus from sheep and

- sequence analysis of its gD gene [J]. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, 2018, 26(4): 11-17. (in Chinese)
- [26] WANG X, XING Z, CHEN H, et al. High expression of nectin-1 indicates a poor prognosis and promotes metastasis in hepatocellular carcinoma [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 953529.
- [27] COCCHI F, LOPEZ M, DUBREUIL P, et al. Chimeric nectin1-poliovirus receptor molecules identify a nectin1 region functional in herpes simplex virus entry[J]. *J Virol*, 2001, 75(17): 7987-7994.
- [28] KITE J, HILL M, PRESTON N, et al. Downregulation of endogenous nectin1 in human keratinocytes by herpes simplex virus 1 glycoprotein D excludes superinfection but does not affect NK cell function[J]. *J Gen Virol*, 2024, 105(3).
- [29] YANG X, YU C, ZHANG Q, et al. A nectin1 mutant mouse model is resistant to pseudorabies virus infection [J]. *Viruses*, 2022, 14(5): 874.
- [30] 王 巍, 贾凌云. 适配体筛选方法研究进展[J]. *分析化学*, 2009, 37(3): 454-460.
- WANG W, JIA L Y. Research progress on aptamer selection methods [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2009, 37(3): 454-460. (in Chinese)
- [31] 张冬萱, 王智豪, 乔岩, 等. 猪流行性腹泻病毒 S1 蛋白的原核表达及其核酸适配体的筛选[J]. *畜牧兽医学报*, 2025, 56(2): 839-850.
- ZHANG D X, WANG Z H, QIAO Y, et al. Prokaryotic expression of porcine epidemic diarrhea virus S1 protein and selection of its nucleic acid aptamers [J]. *Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2025, 56(2): 839-850. (in Chinese)
- [32] GELINAS A D, DAVIES D R, JANJIC N. Embracing proteins: structural themes in aptamer-protein complexes [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2016, 36: 122-132.

(编辑 白永平)