论著

文章编号:1000-5404(2008)23-2168-04

人重组 TGF-β RⅡ亲和核酸筛选方法的建立

谢 琳[1],刘 韧[2],朱旭东[3],贺翔鸽[1],陈彩宇[3] (第三军医大学大坪医院野战外科研究所:[1]眼科,[2]第二研究室,[3]第一研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

摘 要:目的 通过筛选转化生长因子-β受体Ⅱ(TGF-β RⅡ)亲和核酸,探寻拮抗 TGF-β 活性的新方法。**方法** 以 ssDNA 5′-TAATACGACTCACTATAGGGAGGACGATGCGG-N60-CAGACGACTCGCCCGA-3′为模板,体外转录获取初始 RNA 随机库;以人体外重组 TGF-β RⅡ为靶目标蛋白行 SELEX 实验,共进行 8 轮循环筛选。通过膜结合实验监测筛选所得 RNA 富集库对 TGF-β RⅡ亲和性的进化状态,凝胶阻滞实验检测亲和核酸序列与 TGF-β RⅡ的结合强度。**结果** 随着筛选进行,RNA 富集库沿着与靶蛋白 TGF-β RⅡ亲和性加强的方向进化;从第 8 轮富集库中分离出两类优势序列,序列 A 和序列 B。膜结合实验显示序列 A、B 对 TGF-β RⅡ有明显的亲和性,但凝胶阻滞实验显示序列 A、B 均无与蛋白结合的阻滞带出现。**结论** 筛选所得序列 A 及 B 与靶蛋白 TGF-β RⅡ的亲和性及特异性还不理想,但先导序列 A 及 B 的获得为通过后 SELEX 技术进一步寻找最佳结合序列奠定了基础。

关键词: SELEX;人重组 TGF-β RⅡ;先导序列

中图法分类号: R341; R394-33; R394.3 **文献标识码:** A

Screening of nucleic acids affinity to recombinant human TGF-β RⅡ

XIE Lin[1], LIU Ren[2], ZHU Xu-dong[3], HE Xiang-ge[1], CHEN Cai-yu[3] ([1]Department of Ophthalmology, [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 2, [3]Department 1, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To select the aptamer to an extracellular soluble fragment of recombinant human TGF-β receptor Ⅱ (TGF-β RⅡ) in order to antagonize TGF-β effectively by using systematic evolution of ligants by exponential enrichment (SELEX). **Methods** Initial random RNA library was transcripted *in vitro* from ssDNA 5′-TAATACGACTCACTATAGGGAGGACGATGCGG-N60-CAGACGACTCCCCGA-3′; rhTGF-β RⅡ was used as target protein. Totally, selection of 8 times was carried out in SELEX experiment. Membrane binding assay was performed to detect the evolution of enriched RNA library; Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) was done to determine the affinity between the selected nucleic acid sequence and TGF-β RⅡ. **Results** Evolution of the enriched RNA library along the increased affinity to TGF-β RⅡ was observed with the development of selection. Two types of dominant sequences were isolated and named as sequence A and sequence B. In membrane binding assay, both sequences A and B showed obvious affinity to TGF-β RⅡ. However, no retarded bands were seen in EMSA. **Conclusion** The affinity of sequences A and B to TGF-β RⅡ is beyond satisfaction. However, possible sequences with improved affinity to TGF-β RⅡ can be selected by post-SELEX on the basis of candidate sequences A and B.

Key words: systematic evolution of ligants by exponential enrichment; recombined human TGF-β RⅡ; candidate sequence

细胞因子 TGF-β 是迄今为止发现的最强的致纤维化因子,其过度激活与组织修复中瘢痕形成及器官纤维化病变的发生密切相关[1]。TGF-β 与其Ⅱ型受体细胞外球蛋白片段结合,激活靶细胞内相应的信号通路,故阻抑 TGF-β RⅡ活性是缓减 TGF-β 发挥致纤维化病变作用的策略之一[2]。

基金项目: 国家自然科学基金(30572008)
Supported by the National Science Foundation of China(30572008)

作者简介: 谢 琳,女,重庆市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事白内障、青光眼的基础和临床方面的研究,发表论文 25 篇。电话:(023)68757831,E-mail:xielin_zhou@hotmail.com

通信作者: 刘 韧, E-mail:liu0916@gmail.com

收稿日期: 2008-07-31;**修回日期:** 2008-09-05

近年的研究表明,DNA 和 RNA 可以通过自身特有的结构与其他类型分子相互作用,建立人工设计的随机寡核苷酸库,淘选出与靶分子高度特异结合片段,此过程称为配体系统进化的指数富集过程(systematic evolution of ligands by exponential enrichment,SELEX),筛选出的分子被称为核酸适体(aptamer)。核酸适体可发挥类似单克隆抗体的作用,代表着一类新型的诊断及治疗分子[3,4]。本实验以人重组 TGF-β Ⅱ型受体细胞外可溶性片段(rhTGF-β RⅡ)为靶目标,初步探讨利用 SELEX 技术从 RNA 随机库中富集 rhTGF-β RⅡ亲和核酸方法的可能性,为后续分离 rhTGF-β RⅡ单一核酸适体奠定基础。

1　材料与方法

1.1　材料和主要试剂

重组人 TGF-β Ⅱ型受体细胞外可溶性片段(rhTGF-β RⅡ)(R&D 公司,美国);总长 108 nt ssDNA 随机库 5′-TAATACGACTCACTATAGGGAGGACGATGCGG-N60-CAGACGACTCGCCCGA-3′(ESPEC OLIGO SERVICE CORP,日本),划线部分为 T_7 RNA 多聚酶启动子序列;First Strand cDNA Sythensis Kit(Amersham,美国);QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen,美国);MAXIscript T_7 Kit (Ambion,美国);T_4 Polynucleotide Kinase (Promega,美国);SUPERase. IN (Ambion, 美国);[γ-^{32}P]ATP (北京瑞福生物公司,中国);pGEM-T Easy Vector System Kit (Promega,美国);硝酸纤维素膜(0.45 μmol,Millipore,美国)。引物 1:5′-TAATACGACTCACTATAGGGAGGACGATGC-GG-3′,引物 2:5′-TCGGGCGAGTCGTCTG-3′(上海生工公司,中国)。引物 1 与随机库 5′固定序列相同,引物 2 与 3′固定序列互补,以便在 1 轮筛选完成后能通过 RT-PCR 反应富集与靶蛋白结合的亲和序列。

1.2　初始 RNA 随机库的建立

取 ssDNA 随机库 20 μg,平行做 40 管 PCR 反应,每管反应体积 100 μl,退火温度 55 ℃,循环数 5 次。混匀 40 管反应产物,经异丙醇沉淀后,按 QIAquick PCR Purification Kit 操作程序纯化出 PCR 反应产物 dsDNA。全部 dsDNA 用于体外转录,操作程序按 MAXIscript T_7 Kit 说明书进行。转录产物用于 8 mol/L 尿素/8% 聚丙烯酰胺变性凝胶电泳,电泳完毕切下含全长 RNA 的凝胶片段,碾碎凝胶,加入 RNA 回收液(0.5 mol/L 醋酸铵/1 mmol/L EDTA/ 0.2% SDS),37 ℃振摇过夜,膜过滤去除凝胶,异丙醇沉淀 RNA, -70 ℃过夜,15 000 × g 离心 20 min 回收 RNA。用无核酸酶的 ddH_2O 溶解 RNA,260 nmol/L 检测光吸收值定量 RNA。

1.3　SELEX 过程

第 1 轮筛选:2 000 pmol/L RNA 随机库溶于筛洗缓冲液中(20 mmol/L Tris-HCl pH 7.4,137 mmol/L NaCl,5 mmol/L KCl,2 mmol/L $CaCl_2$,1 mmol/L $MgCl_2$),65 ℃加热 10 min,0 ℃放置 10 min。1 000 pmol/L rhTGF-β RⅡ溶于筛选液中,再与热变性处理后的初始 RNA 库混合,终体积 1 ml(含核酸酶抑制剂 SUPERase. IN 800 U/ml),37 ℃孵育 4 h。双蒸水浸润过的硝酸纤维膜(直径 2.5 cm,孔径 0.45 μm)置放到 Millipore 不锈钢真空抽滤器上,筛选反应混合液经真空滤过后,用 PBS 缓冲液洗涤滤膜 3 次,每次 5 ml。剪碎滤膜,用 7 mol/L 尿素/酚/氯仿从滤膜中回收膜结合 RNA,第 1 轮筛选完毕。

富集 RNA 库的建立:取第 1 轮筛选所得 RNA,按 First Strand cDNA Sythensis Kit 操作说明逆转录获得 cDNA。cDNA 做常规 PCR 反应,循环 25 次。以后操作与初始 RNA 随机库建立的步骤完全相同,由此获得富集 RNA 库,开始新一轮筛选。

第 2 轮至第 8 轮筛选:热变性处理的富集 RNA 库 200 pmol/L 预先与硝酸纤维膜碎片在 37 ℃孵育 30 min,除去膜碎片,再与 100 pmol/L 靶目标蛋白孵育 1 h,总反应体积 200 μl,同时筛选体系中含 5 mmol/L 酵母 tRNA。此后,按同样方法获取新一轮富集 RNA 库。在随后几轮的筛选过程中,反应体积 200 μl 保持不变,但是 RNA 及靶蛋白投入量、孵育时间、冲膜缓冲液体积不断调整变化,每轮具体筛选条件见表 1。同时,通过膜结合实验监测筛选过程中富集 RNA 库的进化状态。

表 1　每轮筛选的具体条件

轮次	RNA(pmol/L)	TGF-β RⅢ(pmol/L)	孵育时间(min)	洗脱体积(ml)
1	2 000	1 000	2 400	15
2	200	100	60	30
3	200	50	60	30
4	200	50	60	30
5	200	50	60	30
6	200	20	30	45
7	200	20	30	45
8	200	20	30	45

1.4　第 8 轮 RNA 富集库序列克隆及测序

经逆转录、PCR 反应从第 8 轮富集 RNA 库获得 dsDNA-8。按 pGEM-T Easy Vector System Kit 操作说明将 dsDNA-8 连接到载体质粒 pGEM-T 中,生成质粒 dsDNA-pGEM。感受态大肠杆菌 JM109 经 dsDNA-pGEM 转化后,涂布到含 IPTG/X-Gal/Amp 琼脂糖凝胶平板上,37 ℃培育 16 ~ 18 h。随机挑取 50 个白斑菌落,分别培养,提取质粒 DNA,测序。

1.5　膜结合实验

用 T_4 多聚核苷酸激酶和 [γ-^{32}P]ATP 放射标记相应待测定的 RNA,8 mol/L 尿素/8% 聚丙烯酰胺变性凝胶电泳纯化放射标记 RNA。在 100 μl 筛选液中混匀热变性处理过的放射标记 RNA 与 TGF-β RⅡ(两者终浓度分别为 10 nmol/L 及 5 nmol/L),37 ℃孵育 1 h。反应液真空过滤,30 ml PBS 冲洗滤膜,干燥滤膜,液闪计数仪测定滤膜上残留的放射量,同一样品平行做 3 次测定。以未与蛋白孵育的放射标记 RNA 及 BSA 作为对照。

1.6　凝胶阻滞测定

热变性放射标记 RNA 50 fmol 与 1 pmol/L TGF-β RⅡ在 10 μl 结合缓冲液(筛选缓冲液 +4% 甘油 +5 ng/μl tRNA)中混匀,室温放置 30 min。反应液上样到 4% 聚丙烯酰胺凝胶中,4 ℃、350 V 电泳 40 ~ 50 min,取出凝胶,行放射自显影。

1.7　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,行 t 检验分析。

2　结果

2.1　膜结合测定结果

已证实核酸-蛋白复合物在通过硝酸纤维膜时可被定量截留

在膜上,未结合的自由核酸则能通过膜而与复合物分离。故在膜结合测定实验中,通过膜上残留的放射性高低,即可判断核酸对蛋白的亲和状态。本实验以核酸-蛋白复合物放射残留量/总 RNA 放射量×100% 比较不同 RNA 库对 TGF-β RⅡ的亲和性。

我们首先对初始 RNA 库(RNA-0)、第 4 轮富集 RNA 库(RNA-4)进行膜结合测定。RNA-0 对硝酸纤维素膜、BSA 及 TGF-β RⅡ无亲和力,膜上放射残留量百分比不足 1%。经过 4 轮筛选后,RNA-4 对硝酸纤维素膜、BSA 及 TGF-β RⅡ 亲和力均有明显改善,膜放射残留量百分比分别提高到 3.0%、4.9% 和 9.2%;同时,实验结果显示富集库 RNA-4 对 TGF-β RⅡ及 BSA 的亲和性有明显差异($P<0.01$),说明 RNA 富集库正沿着与靶蛋白 TGF-β RⅡ亲和性加强的方向进化,实验结果符合预期设想。

随着筛选的进行,我们又测定了富集库 RNA-7、RNA-8 对 TGF-β RⅡ的亲和性,两者间无明显差异,故我们停止了进一步循环筛选过程。虽然 RNA-8 对硝酸纤维素膜、BSA 及 TGF-β RⅡ亲和力较 RNA-4 又有进一步提高,膜放射残留量百分比分别为 4.9%、10.3%、35.9%,但 RNA-8 对 TGF-β RⅡ亲和性的进化速度远远高于其对硝酸纤维素膜及 BSA 的亲和性($P<0.01$)。

2.2 测序结果

从送检的 50 个质粒测出 48 条序列,ClustalW 分析结果,发现两大优势序列。A 类序列占 38%,共 18 条;B 类序列占 16%,共 8 条。

A **类序列** 5′-3′

ACATT-GCTGCGTGATCGCCTCACATGG-TTTGTCTGGTC-GATTTGGAGGTGGTGGGTGGC
ACATT-GCTGCGTGATCGCCTCACATGGGTTTGTCTGGTC-GATTTGGAGGTGGTGGGTGGC
ACATT-GCTGCGTGATCGCCTCACATGGGTTTGTCTGGTCAGATTTGGAGGTGGTGGGTGGC
ACATT-GCTGCGTGATCGCCTCACATGGGTTTGTCTGGTC-AATTTGGAGGTGGTGGGTGGC
ATATT-GCTGCGTGATCGCCTCACATGGGTTTGTCTGGTC-AATTTGGAGGTGGTGGGTGGC
ACATC-GCTGCGTGATCGCCTCACATGGGTTTGTCTGGTC-AATTTGGAGGTGGTGTTTGGC
ACATC-GCTGCGTGATCGTCTCACATGGGTTTGTCTTGGTCAATTTGGAGGTGGTGGGTGGC
ACATCCGCTGCGTGATCGCCTCACATGGGTTTGTCTTGGTCAATTTGGAGGTGGTGGGTGGC

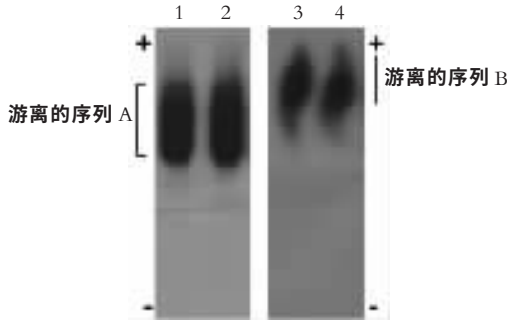
B **类序列** 5′-3′

TGGATTACTCCCATCCGTCGTTTGGAGATACACAGGTAGGTGGTGGAGGAATTGTGTGCC
TGGATTACTCCCATCCGTCATTTGGAGATACACAGGTAGGTGGTGGAGGAATTGTGTGCC
TGCATTACTCCCATCCGTCGTTTGGAGATACACAGGTAGGTGGTGGAGGAATTGTGTGCC
TGGCTTACTCCCATCCGTCGTTTGGAGATACACAGGTAGGTGGTGGAGGAATTGTGTGCC
TGGCTTACTCCCATCCGTCGTTGGGAGATACACAGGTAGGTGGTGGAGGAATTGTGTGCC

2.3 A、B 类序列对 TGF-β RⅡ的亲和性

A 类序列以 5′-ACATT-GCTGCGTGATCGCCTCACATGGG-TTTGTCTGGTCGATTTGGAGGTGGTGGGTGGC-3′为代表,B 类序列以 5′-TGGATTACTCCCATCCGTCGTTTGGAGATACACAGGTA-GGTGGTGGAGGAATTGTGTGCC-3′为代表,行膜结合测定及凝胶阻滞实验,结果见图 1。

膜结合实验显示序列 A、B 对 TGF-β RⅡ亲和性明显高于对 BSA 的亲和性($P<0.01$),具体为序列 A 及 BSA 对 TGF-β RⅡ的膜放射残留量百分比分别为 33.70%、6.96%,序列 B 及 BSA 对 TGF-β RⅡ的膜放射残留量百分比分别为 21.28%、5.52%。凝胶阻滞实验显示序列 A、B 均无与蛋白结合的阻滞带出现,提示候选序列 A 及 B 与靶蛋白 TGF-β RⅡ的亲和性及特异性还不理想。



1:序列 A;2:序列 A/TGF-β RⅡ;3:序列 B;4:序列 B/TGF-β RⅡ
未观察到与 TGF-β RⅡ结合而迁移滞后的 RNA 条带

图 1 凝胶阻滞实验结果

3 讨论

TGF-β Ⅱ受体是阻抑 TGF-β 活性的良好靶点,本研究通过 SELEX 技术筛选 TGF-β RⅡ亲和核酸,旨在探寻拮抗 TGF-β 活性的新方法。

SELEX 技术是 20 世纪 90 年代发展起来的一项组合化学技术,由此产生的核酸适体代表着一类功能与单克隆抗体类似的新型分子。核酸适体的靶分子广、亲和力高、特异性强,可化学合成、易改造修饰等特点使其在基础研究、临床诊断、新药研发领域受到越来越多的重视。

ssDNA 及 RNA 通过适应性折叠,形成发夹(hairpin)、假结(pseudoknot)、突环(bulge)、G-四联体等多种特殊空间结构,是其与靶分子特异高效结合的基础。与 ssDNA 比较,RNA 分子通过折叠形成各种特殊空间结构的能力更强,故同等容量的初始库,RNA 库分子结构的多样性远远高于 ssDNA 库[5],因此,我们采用从 RNA 库中筛选 TGF-β RⅡ亲和核酸。在设计随机库时,我们将 T7 RNA 多聚酶启动子 5′-TAATAC-GACTCACTATAGGG-3′引入到右翼固定序列中,便于体外转录合成 RNA。在转录初始 RNA 随机库时,PCR 反应只循环 5 次,系为了防止偏差 PCR 产物生成,以保证 RNA 随机库的均等性。20 μg 初始 ssDNA 库大约为 600 pmol,含 3.6×10^{14} 个分子,保证了库容量的

多样性。当然,RNA的稳定性比DNA差,所以在用于体内实验时,一般采用修饰碱基以提高RNA的稳定性[6]。

根据文献报道,SELEX实验的最初1~2轮筛选,靶蛋白过量可捕获到尽可能多的配基,是最为理想的筛选条件,由于靶蛋白价格昂贵,我们在1~2筛选中采用了核酸/蛋白2∶1的条件。后面的循环逐步降低核酸/蛋白,缩短孵育时间,增加洗膜缓冲液用量均是为了加强筛选的严谨性。通常筛选到第4或第5轮时,需要对富集库的亲和性进行鉴定。RNA-4膜结合实验结果提示RNA-4富集库正沿着与靶蛋白TGF-β RⅡ亲和性加强的方向进化,实验结果符合预期设想,为进一步筛选奠定了基础。

第8轮筛选到的两类同源序列A、B共占总测序序列的54%,具明显的优势性。虽然膜结合实验结果显示序列A、B对靶目标蛋白TGF-β RⅡ有显著的特异性和亲和性,但凝胶阻滞实验中却未能观察到因与TGF-βⅡ结合而迁移滞后的序列A及序列B。只有蛋白与核酸结合到一定紧密程度,即解离常数低于10^{-8}时,才不被电场的作用力解离,提示序列A、B与TGF-β RⅡ亲和程度还不理想。但在先导序列A、B的基础上,可通过随机或定点突变,即后SELEX(post-SELEX)技术进一步寻找与TGF-β RⅡ亲和性更强的序列。

参考文献:

[1] Verrecchia F, Mauviel A. Transforming growth factor-beta and fibrosis[J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(22): 3056-3062.
[2] Nakamura H, Siddiqui S S, Shen X, *et al*. RNA interference targeting transforming growth factor-beta type II receptor suppresses ocular inflammation and fibrosis[J]. Mol Vis, 2004, 10: 703-711.
[3] Ulrich H, Trujillo C A, Nery A A, *et al*. DNA and RNA aptamers: from tools for basic research towards therapeutic applications[J]. Comb Chem High Throughput Screen, 2006, 9(8): 619-632.
[4] Pendergrast P S, Marsh H N, Grate D, *et al*. Nucleic acid aptamers for target validation and therapeutic applications[J]. J Biomol Tech, 2005, 16(3): 224-234.
[5] Sullenger B A, Gilboa E. Emerging clinical applications of RNA[J]. Nature, 2002, 418(6894): 252-258.
[6] 李海剑, 刘章锁, 刘书真,等. 罗格列酮对高糖条件下大鼠肾脏成纤维细胞TGF-β1和PAI-1 mRNA表达的影响[J]. 郑州大学学报:医学版, 2007, 42(1): 47-49.

(编辑 王 红)

文章编号:1000-5404(2008)23-2171-01

个案与短篇

持续冲洗在注射隆乳剂取出术后的应用与护理

黄红梅, 陈显春, 姜 军 (第三军医大学西南医院乳腺中心,重庆 400038)

注射性隆乳术是乳房整形的一种常用方法,假体材料是医用聚丙烯酰胺水凝胶,凝胶被注射至乳腺后间隙内使乳房隆起,以达到外形丰满的目的。注射性隆乳术后并发症多有报道[1],而关于术后并发感染的处理报道较少。我科自2007年1月至2008年7月,共收治22例注射性隆乳术后患乳腺炎的患者,行隆乳剂取出后均采取了持续冲洗,取得了良好的效果,现报告如下。

1 临床资料

1.1 一般资料

2007年1月至2008年7月,我科共收治22例双乳注射性隆乳术后患乳腺炎的患者,年龄最小20岁,最大45岁,平均年龄36.5岁,入院前均有乳腺形态改变,局部均有红、肿、热、痛。

1.2 方法

1.2.1 隆乳剂取出术 患者在全麻腔镜下,先用超声探查双乳并行体表定位后,皮下注射溶脂液250 ml,于乳腺外下皱襞处作长约0.5 cm切口共3个,自3切口置入并戳卡。充入CO_2,形成操作空间,以大量生理盐水冲洗稀释,再以吸引器吸引,将多量隆乳剂清除。由内、外两切口分别置入并固定硅胶管(直径0.4 cm)及血浆管各1根。

1.2.2 隆乳剂取出后术腔冲洗 患者术后返回病房,即开始持续冲洗术腔,自双侧硅胶管各滴入无菌生理盐水500 ml,并从血浆引流管排出,冲洗完毕接一次性负压引流袋持续引流。每日冲洗1次,直到引流液清亮后为止。

2 护理

2.1 严格无菌操作,预防感染

冲洗时,患者取半卧位或平卧位,滴入管应高于床面60 cm,负压引流袋低于患处50 cm。每日更换负压引流袋1次,若负压引流袋中引流液满2/3时应及时倾倒。

2.2 保持引流管固定、通畅

妥善固定引流管,避免扭曲、受压,防止移位或滑落,造成引流不畅。每小时挤捏引流管1~2次,避免血块和坏死组织

(下转2175页)

作者简介:黄红梅,女,四川省达州市人,护师,主要从事乳腺疾病临床护理方面研究。电话:(023)68773075

收稿日期:2008-07-21;修回日期:2008-09-01