DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.08.012

论著

文章编号:1000-5404(2003)08-0680-03

SELEX实验中核酸-蛋白复合物分离方法对富集库亲和力的影响

胡承香,顾长国,朱旭东,李 磊 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第一研究室,重庆 400042)

提 要:目的 比较SELEX实验中,核酸-蛋白复合物分离技术的差异对筛选富集库亲和力的影响。方法 以β-转化生长因子Ⅱ型受体为靶目标,采用不同技术路线从ssDNA随机库中获取亲和富集库:技术路线1,靶目标预先被吸附到96孔微量滴定板后,再进行筛选,从滴定板上洗脱结合核酸;技术路线2,溶液中筛选、硝酸纤维膜截留核酸-蛋白复合物,从膜上回收结合核酸;通过膜结合测定、凝胶阻滞测定实验检测筛选富集库对靶目标的亲和力。结果 经4轮筛选后,技术路线1来源的富集库与初始随机库相似,对靶目标无亲和力;而技术路线2来源富集库对靶目标的亲和力较初始随机库有显著提高。结论 SELEX实验中,溶液中筛选、膜截留结合核酸的技术路线与固-液相筛选、固相中直接获取结合核酸的途径相比较,前一种方法更容易富集到与靶目标结合的目的序列。

关键词:SELEX;Aptamer;富集库;亲和力

中图法分类号:R394-33;R394.3 文献标识码:A

Effect of different isolations for nucleic acid and protein complex on affinity of enriched library in SELEX experiment

HU Cheng-xiang, GU Chang-guo, ZHU Xu-dong, LI Lei (Research Institute of Field Surgery, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To compare the effect of different partition of nucleic acid-protein complex on the affinity of enriched library in systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX). Methods Two protocols were adopted to select the enriched library to transforming growth factor-β receptor Ⅱ (TGF-β RⅡ). Protocol 1: protein was absorbed on the surface of 96-well plate; then, selection was carried out; the binding nucleotide acids were eluted from the supporter directly. Protocol 2: selection was done in solution; nucleotide acid-protein complex was captured in nitrocellulose membrane; the binding nucleotide acids were obtained from membrane. Filter biding assay and gel shift assay were performed to detect the affinity of the enriched ssDNA library from different protocols. Results After 4 rounds of selection, the affinity to TGF-β RⅡ was obviously improved in the enriched library from protocol 2 compared with the initial library, while no such improvement was found in the enriched library from protocol 1. Conclusion In the SELEX experiment, the way of selection in solution, then partition of the binding nucleotide acids in filter is easier to enrich the binding fragment from initial ssDNA random library, compared with the way of fixation of target protein to solid supporter, then selection between the solid phase and liquid phase and elution of the binding nucleotide acids from supporter.

Key words: systematic evolution of ligands by exponential enrichment; aptamer; enriched library; affinity

近年的研究表明,DNA和RNA不仅仅起遗传信息储存和传递的作用,而且可以通过自身特有的结构与其它类型分子相互作用,以此为基础可以建立人工设计的随机寡核苷酸库,从这类随机序列库中淘选出与靶分子高度特异结合片段的过程,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"适应配体"(Aptamer)。筛选之前与靶目标结合的分子数目很少,经过多次筛选和扩增后与靶目标高度特异结合的DNA或RNA分子即呈指数级增长,自1990年Tuerk等[1]利用该项技术成功筛选出噬菌体T_4 DNA聚合酶的RNA型适应配体以来,SELEX技术在基础研究、临床诊断及药物设计中得到了广泛应用。

我们在实践中发现采用不同技术分离核酸-蛋白复合物,对富集核酸库亲和力有非常显著的影响,本研

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)

作者简介:胡承香(1965-),女,重庆市石柱县人,实验师,主要从事创伤感染与免疫方面的研究。电话:(023)68757471

通信作者:朱旭东,电话:(023)68757471,E-mail:hanyy@MSN.com

收稿日期:2002-11-01;修回日期:2003-01-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

究以液相筛选和固相-液相筛选法为例, 对影响筛选的可能因素进行了讨论。

1　材料和方法

1.1　材料

ssDNA 随机库:

ssDNA 随机模板库 5′-TAGGGAATTCGTCGACGGATCC-N59-CTGCAGGTCGACGC ATGCGCCG-3′ 由日本大阪大学 Fukosaki 教授惠赠, 引物 1: 5′-TAGGGAATTCGTCGACG GAT-3′, 引物 2: 5′-CGGCGCATGCGTCGACCTG-3′。取 20 μg ssDNA 平行做 20 管 PCR 反应, 反应体积 100 μl, 变性温度 55 ℃, 循环数 10 次。混匀 20 管反应产物, 取 100 μl 平行做 20 管非对称 PCR 反应, 此步 PCR 反应只加入引物 1, 循环数 45 次。QIAquick PCR Purification Kit (QIAgen, 德国)精制非对称 PCR 产物, 260 nm 测吸光度 A 值, ssDNA 定量。

人 TGF-β Ⅱ型受体胞外可溶片段与 Fc 融合蛋白(TGF-β RⅡ)购自日本 Funakoshi 公司。

1.2　方法

1.2.1　平板吸附 SELEX　　缓冲液 A(20 mmol/L Tris-HCl, 137 mmol/L NaCl, 5 mmol/L KCl, 2 mmol/L $CaCl_2$, 1 mmol/L $MgCl_2$, pH 7.4)溶解靶蛋白, 按 2 μg/100 μl 量加入到 96 孔培养皿中, 平行做 2 孔反应, 37 ℃孵育 2 h, 弃去溶液, 缓冲液 A 洗涤 3 次; 随后加入 200 μl 含 0.01% 酪蛋白的缓冲液 A(缓冲液 B), 37 ℃孵育 1 h, 弃去溶液, 换成 200 μl 含 200 pmol/L ssDNA、1 000 pmol/L tRNA 的缓冲液 B, 37 ℃孵育 2 h, 弃去溶液, 用缓冲液 C(缓冲液 A +0.05% A 吐温 20)洗涤 3 次, 双蒸水洗涤 2 次; 加入 100 μl 双蒸水, 95 ℃加热 10 min, 取加热液做常规 PCR 反应, 循环数 25 次, 而后再行非对称 PCR 反应, 获得富集 ssDNA 随机库, 开始新一轮筛选。ssDNA 在与蛋白温育前, 需经 80 ℃加热 10 min、0 ℃冷却 10 min 的变性、及与缓冲液 B 包被过的空白孔皿孵育处理。共行 4 轮筛选, 以后 3 轮筛选条件同上, 但只做一孔皿反应。

1.2.2　液相 SELEX　　第一轮筛选时, 热变性处理后的 400 pmol/L ssDNA 与 4 μg 靶目标蛋白在 400 μl 缓冲液 A 中混匀, 反应体系中同时加有 5 倍 ssDNA 摩尔量的 tRNA 与牛血清白蛋白(BSA), 37 ℃孵育 1 h; 双蒸水浸润过的硝酸纤维膜(直径 2.5 cm, 孔径 0.45 μm)置放到真空抽滤器上, 筛选反应混合液经真空滤过后, 用缓冲液 A 洗涤滤膜 3 次, 剪碎滤膜, 用 7 mol/L 尿素/酚/氯仿从滤膜中回收 ssDNA。取回收 ssDNA 做常规 PCR 反应, 循环数 25 次, 而后再行非对称 PCR 反应, 获得富集 ssDNA 随机库, 开始新一轮筛选。共做 4 轮筛选, 在以后 3 轮筛选中, 反应体积 200 μl, ssDNA 与蛋白用量各为 200 pmol/L 和 2 μg。

1.2.3　膜结合测定　　用 T_4 多聚核苷酸激酶和[γ-^{32}P] ATP 放射标记原始 ssDNA 随机库和第 4 轮筛选到的 ssDNA 富集库随机库。热变性放标 ssDNA(终浓度 5 nmol/L)分别与 TGF-β RⅡ、BSA(终浓度 0.3 μmol/L)在 100 μl 缓冲液 A 中混匀, 37 ℃孵育 1 h, 反应液经真空过滤后, 用缓冲液 A 洗涤滤膜, 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标 ssDNA 作为对照。

1.2.4　凝胶阻滞测定　　热变性放标 ssDNA 50 fmol/L 分别与 1 pmol/L TGF-β 受体、BSA 在 10 μl 结合缓冲液(缓冲液 A+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, 真空干燥凝胶后, 行放射自显影。

1.3　统计学处理方法

所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 SPSS 10.0 统计学分析软件进行相应的 t 检验。

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。本实验测定结果见表 1。从表中的数据可知, 初始随机库、固-液相筛选富集库对 BSA 和 TGF-β RⅡ均无亲和力, 液相筛选富集库显示出对 TGF-β RⅡ的亲和力, 对 BSA 无亲和力, 说明液相筛选富集库中能与靶蛋白结合的核酸序列较初始随机库明显增多。

表 1　硝酸纤维膜上截留放射标记核酸的 CPM 值($\bar{x} \pm s$)

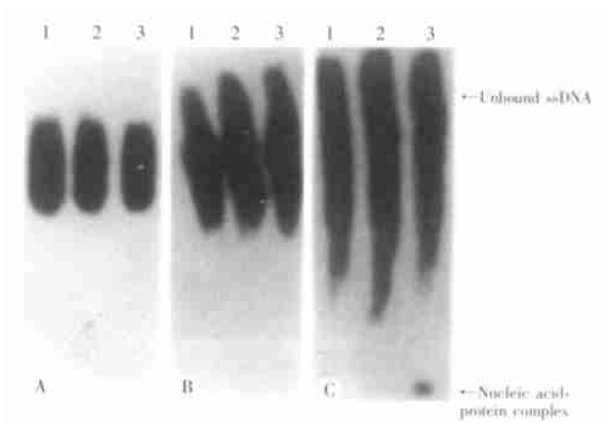
Tab 1　CPM values of different groups on nitrocellulose membrane($\bar{x} \pm s$)

	Initial library	Liquid phase isolation	Solid-liquid phase isolation
Blank control	2 850±324	3 218±432	2 210±453
BSA	3 290±611	3 054±276	2 374±279
TGF-β RⅡ	3 417±552	9 581±687 #	2 008±321

#: $P < 0.05$ *vs* blank control

2.2　凝胶阻滞测定结果

能与蛋白结合的核酸, 与蛋白结合后其分子量增加, 电泳时在凝胶中的迁移速度变慢, 滞后于未结合的核酸, 通过凝胶阻滞测定实验可检测 ssDNA 库中有无与靶蛋白结合的序列。测定结果见图 1。仅液相筛选富集库 TGF-β RⅡ组出现滞后带, 说明该 DNA 库已富集到能与 TGF-β RⅡ结合的核酸序列, 而初始随机库、固-液相筛选富集库对 TGF-β RⅡ无亲和力。



A: Solid-liquid phase; B: Initial library; C: Liquid phase; 1: DNA control; 2: ssDNA+BSA; 3: ssDNA+TGF-RⅡ

图 1　凝胶阻滞测定放射自显影图谱

Fig 1　Autoradiogram of different groups with gel shift assay

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

3 讨论

利用SELEX技术筛选到TGF-β RⅡ适应配体的研究结果将在另文中报道，本研究择重于筛选过程中核酸-蛋白复合物分离方法的差异，对筛选富集库亲和力的影响。

经典SELEX实验系采用液相结合、滤膜分离、酚/氯仿回收方法从随机库中捕获亲和核酸序列[1]，由于酚/氯仿回收过程较为繁琐，以后又出现了多种改良方法，将靶目标预先吸附到固相支持物上再进行筛选，即是其中之一[2]，固相支持物可以是磁珠、凝胶、干燥的硝酸纤维膜、尼龙膜、微量滴定板、带荷纸等，利用改良方法已筛选到多种靶蛋白的适应配体。但我们在实践中发现，经典方法更容易富集到目的序列，除用微量滴定板作为支持物外，我们也曾采用过干燥的硝酸纤维膜和尼龙膜，在最初4轮筛选中均未能富集到TGF-β RⅡ亲和序列；Kimoto[3]在分离*Raf*-1 RNA适应配体时也发现，硝酸纤维膜分离法较Sepharose 4B基质吸附分离法更容易富集到亲和序列，而且饱和富集库中亲和序列的多样性优于吸附分离法来源的富集库；Carey[4]报道吸附到硝酸纤维膜上的R17蛋白不再具有与其核酸配体结合的特性。

综上所述，在行SELEX实验时，采用经典方法获取某种靶蛋白适应配体的成功几率高于固-液相筛选改良法。总体而论，经典方法中核酸与蛋白结合过程在溶液中进行，这样保证了蛋白、核酸分子的天然构象，同时溶液中核酸与蛋白分子间的运动、接触、碰撞可全方位进行；而蛋白预先吸附到固相支持物上，这一过程可能改变蛋白的天然构象或遮蔽蛋白分子中与核酸结合表位，另一方面蛋白分子不能自由运动，减少了核酸分子与蛋白分子接触、碰撞的几率，其次仅有被吸附的蛋白分子参与结合反应，蛋白投入量与实际反应量有一定差异，这些因素都不利于从核酸随机库中富集到目的序列。当然，不是所有的蛋白都会受到上述不利因素的影响，我们建议在最初几轮筛选中采用经典方法更能保证快速富集到相关目的序列。

参考文献：

[1] 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.

[2] Drolet D W, Jenison R D, Smith D E, *et al*. A high throughput platform for systematic evolution of ligands by exponential enrichment(SELEX)[J]. Comb Chem High Throughput Screen, 1999, 2(5): 271-278.

[3] Kimoto M, Shirouzu M, Mizutani S, *et al*. Anti-(Raf-1) RNA aptamers that inhibit Ras-induced Raf-1 activation[J]. Eur J Biochem, 2002, 269(2): 697-704.

[4] Carey J, Lowary P T, Uhlenbeck O C. Interaction of R17 coat protein with synthetic variants of its ribonucleic acid binding site[J]. Biochemistry, 1983, 22(20): 4723-4730.

（编辑 张 宁）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2003)08-0682-02

乳腺导管内乳头状瘤漏诊3年后致癌变1例

One case of canceration of breast intraductal papilloma misdiagnosed for 3 years

张 帆，姜 军 （第三军医大学附属西南医院普通外科，重庆 400038）

患者，女，45岁。因左乳头溢血1年余入院。查体：一般情况良好，双乳腺形态正常，未触及包块，挤压左乳晕区左乳头有血性溢液，双腋窝无肿大淋巴结。溢液细胞学检查未见癌细胞。乳腺钼靶摄片未见异常。溢液乳腺导管造影发现主导管扩张，其下方近分支处管型有破坏，见不规则充盈缺损约0.5 cm。术前考虑为导管内乳头状瘤，在局麻下行扩张导管切除术。术中冰冻及术后石蜡切片均报告：左乳腺腺病。术后顺利出院，溢血停止。3年后，患者左乳腺原切口旁出现一包块，再次就诊并入院。查体：左乳内上象限原切口疤痕旁一2 cm×1.5 cm×1.5 cm包块，质中，轻压痛，可推动，无乳头回缩及局部皮肤改变，挤压乳晕区无乳头溢液，双腋窝无肿大淋巴结。超声检查发现左乳内上象限2 cm×1 cm×1 cm包块，边界不清，无包膜，回声减弱不均质。于局麻下行乳腺包块切除并送冰冻，报告为乳腺导管内乳头状瘤，局部疑有癌变。遂改为全麻，行左乳单纯切除。术后石蜡切片见：导管上皮细胞增生活跃，呈乳头状增生，部分区域细胞异型，排列极向紊乱，并见浸润，

（下转686页）

作者简介：张 帆(1977-)，男，贵州省瓮安县人，硕士，医师，主要从事乳腺甲状腺外科方面的研究。电话：(023)68754000-73075

收稿日期：2002-05-14；修回日期：2002-12-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net