基于接近效应聚合反应与核酸适体的蛋白质检测新方法

羊小海 王 蕾 王柯敏 * 谭蔚泓 唐红星
孟祥贤 郭秋平

(湖南大学 化学生物传感与计量学国家重点实验室; 生物医学工程中心; 化学化工学院; 生物纳米与分子工程
湖南省重点实验室, 长沙 410082. * 联系人, E-mail: kmwang@hnu.cn)

摘要 以核酸适体作为识别分子, 建立了一种简单、灵敏特异的蛋白质检测新方法. 该方法以凝血酶为目标蛋白, 针对其两个结合位点, 分别设计了两条具有 3'末端互补碱基序列的核酸适体探针. 当两条探针同时与凝血酶结合时, 末端借助接近效应形成稳定的杂交并在聚合酶的作用下发生聚合反应, 双链 DNA 产物的量通过 Sybr Green 的荧光信号指示出来. 实验结果表明, 聚合反应初速度与凝血酶的浓度正相关. 本方法中核酸适体探针设计简单灵活, 对目标蛋白选择性和灵敏度高, 检测下限可达到 6.9 pmol/L.

关键词 核酸适体 凝血酶 聚合反应 蛋白质检测

人类基因组计划的实施与完成, 促进了生命科学深入到蛋白质组学的研究^[1,2]. 然而, 与基因组研究中起关键作用的自动化DNA测序与聚合酶链反应(PCR)技术相比, 蛋白质组学的研究方法和分析技术则相对滞后, 成为制约蛋白质组学进一步发展的瓶颈^[3]. 核酸适体(Aptamer)是寡核苷酸体外筛选、扩增技术的产物(即指数富集配体系进化技术, SELEX)^[4,5], 作为一种新型的分子识别元件, 与传统的蛋白质抗体相比, 不仅对目标蛋白质具有高度的亲和力与特异性, 还具有易合成、易修饰、稳定性好等优点, 在蛋白质研究中显示出了良好的应用潜力^[6-9]. 近年来, 结合核酸适体的分子特性, 将对蛋白质的检测转换为对其特异识别核酸的检测, 不仅避免了传统蛋白质检测方法中操作复杂、常需对蛋白质进行标记、不易保持活性等缺点, 还有效地提高了蛋白质检测的效率与灵敏度^[10-15].

为了进一步提高检测的特异性与灵敏度, Fredriksson等人^[16]首次利用蛋白质二聚体形成了两个结合位点, 使得同时结合的核酸适体探针末端在蛋白质介导的接近效应下通过连接酶进行连接, 结合PCR技术扩增连接产物, 可以检测zeptomole (40×10^{-21} mol)量的蛋白质. Heyduk等人^[17]则分别在凝血酶的两个识别位点的核酸适体的末端修饰了荧光基团与熄灭基团, 利用二者结合蛋白质后空间上的接近而发生

荧光共振能量转移(FRET), 实现了对凝血酶的特异性检测, 检测下限为 50 pmol/L; di Giusto等人^[18]同样基于接近效应, 将环形核酸适体探针结合滚环复制(RCA)的方法实现了对蛋白质的特异性检测, 检测下限达 30 pmol/L.

以上方法基于蛋白质介导下的接近效应, 虽然显示出较高的特异性与灵敏度, 但存在着反应体系复杂、探针设计合成难度高或需要结合PCR技术放大信号等局限性. 本文以凝血酶作为目标蛋白, 发展了一种更为简单、灵敏的基于接近效应的蛋白质检测新方法. 该方法简化了核酸适体探针的设计, 直接将凝血酶的两个核酸适体^[19,20]设计成具有 3'末端互补碱基序列的线性探针. 当二者同时结合到凝血酶的两个识别位点时, 探针末端互补部分借助蛋白质介导下的接近效应形成稳定的杂交, 从而可以在聚合酶作用下引发聚合反应. 产生的双链DNA以嵌入型荧光染料Sybr Green 作为荧光信号指示, 检测到的聚合反应初速度与凝血酶的浓度正相关, 检测下限达到 6.9 pmol/L.

1 实验

() 仪器与试剂. 核酸适体探针(表 1)由大连宝生物公司(Takara)合成; 人凝血酶(thrombin)、胰蛋白酶(trypsin)购于美国 Sigma 公司; 抗凝血酶抗体(AT)

2007-05-29 收稿, 2007-08-15 接受

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2002CB513110)、国家科技攻关计划(批准号: 2003BA310A16、2005EP090026)、科技部国际合作重点项目(批准号: 2003DF000039)、国家自然科学基金(批准号: 90606003, 20475015, 20620120107)资助

表1 核酸适体探针^{a)}

序号	探针序列
A	5' <u>GCACTGGTTGGTGAGGTTGGGTGCT</u> ₄₂ TCCTGGGCTGCAC3'
B1	5' <u>CGAGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGA</u> <u>CTCGT₁₉GTGCAGCC3'</u>
B2	5' <u>CGAGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGA</u> <u>CTCGT₁₉GTGCAGC3'</u>
B3	5' <u>CGAGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGA</u> <u>CTCGT₁₉GTGCAG3'</u>
B4	5' <u>CGAGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGA</u> <u>CTCGT₁₉GTGCA3'</u>
B5	5' <u>CGAGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGA</u> <u>CTCGT₁₉GTGC3'</u>

a) T字母后面的数字代表胸腺嘧啶的数目

购于晶美生物工程有限公司; 牛血清白蛋白(BSA)购于北京鼎国生物公司; 荧光染料 Sybr Green 购于美国 Invitrogen 公司; Bst DNA 聚合酶大片段及 10 × ThermoPol 反应缓冲液(100 mmol/L KCl, 200 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L (NH₄)₂SO₄, 20 mmol/L MgSO₄, 1% Triton X-100, pH 8.8, 25 °C)购于纽英伦生物技术公司(NEB). 实验所用水均为过滤除菌的高纯水, 实验器皿均经过高温灭菌.

使用日本 Hitachi F-2500 荧光分光光度计, 美国 Thermo Neslab 恒温水浴.

() 方法与步骤. 聚合反应的荧光检测: 将核酸适体探针对(A 分别与 B1~B5, 各为 200 nmol/L)与不同浓度的凝血酶(0~5 nmol/L, 筛选探针时的凝血酶浓度为 0.5 nmol/L) 混合于温育液中, 总体积为 100 μL. 温育液成分为: 1 × ThermoPol 反应缓冲液(10 mmol/L KCl, 20 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L (NH₄)₂SO₄, 2 mmol/L MgSO₄, 0.1% Triton X-100), 300 μmol/L dNTPs 和 0.5 mg/mL BSA. 混合液在 37 °C 温育 45 min 后, 加入终浓度为 1 × Sybr Green 荧光染料. 将该混合液置于微量比色皿中, 在荧光分光光度计($\lambda_{\text{ex/em}}$ = 497 nm/524 nm, 激发与发射狭缝分别为 2.5 和 5.0 nm)中进行扫描. 待荧光稳定后, 加入 8U Bst DNA 聚合酶进行荧光检测, 测得的聚合反应初速度为单位时间内的荧光强度变化值.

方法特异性的检测: 将核酸适体探针对(各 200 nmol/L)分别与 0.1 nmol/L 凝血酶, 750 μmol/L (50 mg/mL) BSA, 100 nmol/L AT 和 100 nmol/L 胰蛋白酶 37 °C 进行温育. 温育液成分与聚合反应的荧光检测同上.

2 结果与讨论

2.1 检测原理

通过 SELEX 技术, 已筛选出凝血酶两个独立结

合位点的核酸适体 [19,20], 对其结构与功能也有着较为透彻的了解, 故用来作为基于接近效应原理检测方法的研究对象. 如图 1 所示, 分别在核酸适体的 3' 末端设计了一段较短的互补碱基序列, 在 37 °C 时互补末端不能形成稳定的杂交, 因而在聚合酶的作用下无法进行聚合反应. 而当两个核酸适体探针同时与凝血酶的两个位点结合时, 互补末端在凝血酶介导下相互接近, 从而形成稳定的杂交, 通过聚合酶的作用分别向 5' 端进行聚合反应. 两条探针所结合的凝血酶量越多, 则形成稳定杂交的探针对越多, 聚合反应的初速度也就越大, 反之则越慢. 凝血酶的量决定了形成稳定杂交的探针对的数目, 后者与聚合反应的初速度成正比. 随着凝血酶浓度的增加, 聚合反应的初速度不断增加, 表现为单位时间内双链 DNA 产物中嵌入的荧光染料所产生的荧光信号增强. 利用双链嵌入型荧光染料 Sybr Green 指示聚合产物双链 DNA 的量, 可以对聚合反应初速度进行检测, 从而得到凝血酶的浓度.

图1 接近效应聚合反应检测凝血酶的原理图

1, 凝血酶; 2, 聚合酶; 3, Sybr Green. A, 凝血酶纤维蛋白原结合位点的核酸适体探针; B, 凝血酶肝素结合位点的核酸适体探针

2.2 探针的设计与筛选

核酸适体探针(表 1)由 4 个部分组成: 凝血酶核酸适体序列(下划线部分)、形成分子内发夹结构的互补序列(斜体部分)、一定长度的聚胸腺嘧啶及 3' 末端可形成两条链间互补的碱基序列(黑体). 在核酸适体探针“头部”设计形成的发夹结构, 为探针结合在凝血酶上并进行聚合反应提供了更为稳定的结构基础 [18,21]. 聚胸腺嘧啶的增加可减少凝血酶对聚合反应可能形成的空间位阻 [17,18]. 在凝血酶肝素位点结合的核酸适体探针(B1~B5) 3' 末端分别设计了 4~8 个互补碱基与凝血酶纤维蛋白原位点结合的核酸适体探

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb2007-52-20-2363>

针(A)3'末端互补. 从筛选结果来看(如图 2), 两条探针末端有 7 或 8 个碱基互补的时候, 聚合反应可以在 37 °C 下以一定的速度进行, 凝血酶的加入可加快聚合反应的速度, 但检测时本底过高. 当互补碱基为 4 或 5 个时, 无论是否存在凝血酶, 均观察不到聚合反应的进行^[22]. 两条探针末端的互补碱基对数目为 6 时, 在 37 °C 时不能形成稳定的结合, 聚合反应也很慢; 而当加入凝血酶后, 核酸适体探针同时与凝血酶的两个位点结合, 使得互补末端形成的杂交稳定性提高, 在聚合酶的作用下以一定的速度发生聚合. 所以选择末端为 6 个碱基互补的探针对用于凝血酶的定量检测.

图 2 核酸适体探针筛选结果图

2.3 凝血酶的定量检测

考察了凝血酶浓度与聚合反应初速度的定量关系(图 3). 结果表明, 凝血酶浓度在 10 pmol/L~1 nmol/L 范围时, 与聚合反应初速度之间有良好的线性关系 ($R^2 = 0.996$), 检测下限达到 6.9 pmol/L. 但随着凝血酶浓度的继续提高, 聚合反应初速度的上升减缓. 而当凝血酶浓度超过 5 nmol/L 以后, 聚合反应初速度反而呈下降趋势. 这主要是因为当凝血酶的浓度较高时, 探针对同时结合到同一个凝血酶分子上的几率减小, 借助接近效应形成的稳定互补末端的量也会减少, 表现为聚合反应初速度的降低.

2.4 检测方法特异性的考察

分别选择 3 种对照蛋白考察了方法的特异性: BSA、AT 和胰蛋白酶. 其中, BSA 常作为保护蛋白加入到检测体系中以保持凝血酶的活性; 胰蛋白酶与

图 3 定量检测凝血酶的结果图

(a) 不同浓度凝血酶存在时的荧光强度时间扫描曲线; (b) 凝血酶浓度与聚合反应初速度的关系. 插图为低浓度区间数据

凝血酶同属丝氨酸蛋白酶家族, 它们的氨基酸序列表现出足够的同源性(约为 40%)^[23~25], 活性部位都含 Ser, His, Asp, 并具有相同的催化机制; AT 是血液中与凝血酶共同存在的蛋白质, 凝血酶在被激活后与之形成复合物. 结果表明, 除目标蛋白外, 其他 3 种蛋白质存在时聚合反应初速度均无明显变化(如图 4). 这说明只有两个核酸适体均与目标蛋白准确结合时, 才能够“启动”聚合反应.

3 结论

随着 SELEX 技术的进一步发展, 将会有更多的与蛋白质不同位点结合的核酸适体被筛选出来. 如 Heyduk 等人^[17]发展了二步法 SELEX 技术, 即第一步筛选出一个结合位点的核酸适体后, 在已筛选出的

图4 方法特异性考察结果

蛋白质浓度分别为: 0.1 nmol/L 凝血酶, 750 μ mol/L BSA, 100 nmol/L AT, 100 nmol/L 胰蛋白酶

核酸适体的饱和浓度下进行第二步筛选, 得到另一个结合位点的核酸适体, 并以凝血酶为目标蛋白质验证了该技术的可行性。

基于双位点结合核酸适体的蛋白质检测方法, 不但显示出了更高的选择性, 还有效地将检测下限降低至 pmol/L 水平。本文以凝血酶作为研究对象, 进一步探讨了与蛋白质双位点结合的核酸适体在蛋白质检测中的应用。本方法将蛋白质的检测转换为核酸探针恒温聚合反应的考察, 使得核酸适体探针的设计灵活、简单、无需进行化学修饰, 实验步骤简便, 易于拓展至其他具有双结合位点的蛋白质的检测中。

参 考 文 献

- Nowak R. Entering the postgenome era. *Science*, 1995, 270(5235): 368—371 [DOI]
- Alberts B. The cell as collection of protein machines: Preparing the next generation of molecular biologists. *Cell*, 1998, 92(3): 291—294 [DOI]
- Tyers M, Mann M. From genomics to proteomics. *Nature*, 2003, 422(6928): 193—197 [DOI]
- Ellington A, Szostak J. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 1990, 346(6287): 818—822 [DOI]
- Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 1990, 249(4968): 505—510 [DOI]
- Kirby R, Cho E, Gehrke B, et al. Aptamer-based sensor arrays for the detection and quantitation of proteins. *Anal Chem*, 2004, 76(14): 4066—4075 [DOI]
- Xiao Y, Lubin A, Heeger A, et al. Label-free electronic detection of thrombin in blood serum by using an aptamer-based sensor. *Angew Chem Int Ed*, 2005, 44(34): 5456—5459 [DOI]
- Porschewski P, Grättinger M, Klenzke K, et al. Using aptamers as capture reagents in bead-based assay systems for diagnostics and hit identification. *J Biomol Screen*, 2006, 11(7): 773—781 [DOI]
- Li Y, Lee H, Corn R. Detection of protein biomarkers using RNA aptamer microarrays and enzymatically amplified surface plasmon resonance imaging. *Anal Chem*, 2007, 79(3): 1082—1088 [DOI]
- Hamaguchi N, Ellington A, Stanton M. Aptamer beacons for the direct detection of proteins. *Anal Biochem*, 2001, 294(2): 126—131 [DOI]
- Li J, Fang X, Tan W. Molecular aptamer beacons for real-time protein recognition. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 292(1): 31—40 [DOI]
- Fang X, Sen A, Vicens M, et al. Synthetic DNA aptamers to detect protein molecular variants in a high-throughput fluorescence quenching assay. *ChemBioChem*, 2003, 4(9): 829—834 [DOI]
- Wang X, Li F, Su Y, et al. Ultrasensitive detection of protein using an aptamer-based exonuclease protection assay. *Anal Chem*, 2004, 76(19): 5605—5610 [DOI]
- Cao Z, Tan W. Molecular aptamers for real-time protein-protein interaction study. *Chem Eur J*, 2005, 11(15): 4502—4508 [DOI]
- Li W, Wang K, Tan W, et al. Aptamer-based analysis of angiogenin by fluorescence anisotropy. *Analyst*, 2007, 132(2): 107—113 [DOI]
- Fredriksson S, Gullberg M, Jarvius J, et al. Protein detection using proximity-dependent DNA ligation assays. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(5): 473—477 [DOI]
- Heyduk E, Heyduk T. Nucleic acid-based fluorescence sensors for detecting proteins. *Anal Chem*, 2005, 77(4): 1147—1156 [DOI]
- di Giusto D, Wlassoff W, Gooding J, et al. Proximity extension of circular DNA aptamers with real-time protein detection. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(6): e64 [DOI]
- Padmanabhan K, Padmanabhan K, Ferrara J, et al. The structure of alpha-thrombin inhibited by a 15-mer single-stranded DNA aptamer. *J Biol Chem*, 1993, 268(24): 17651—17654
- Tasset D, Kubik M, Steiner W. Oligonucleotide inhibitors of human thrombin that bind distinct epitopes. *J Mol Biol*, 1997, 272(5): 688—698 [DOI]
- Macaya R, Waldron J, Beutel B, et al. Structural and functional characterization of potent antithrombotic oligonucleotides possessing both quadruples and duplex motifs. *Biochemistry*, 1995, 34(13): 4478—4492 [DOI]
- Kiefer J, Mao C, Braman J, et al. Visualizing DNA replication in a catalytically active bacillus DNA polymerase crystal. *Nature*, 1998, 391(6664): 304—307 [DOI]
- 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学(第3版). 北京: 高等教育出版社, 2002. 181—185
- Bode W, Turk D, Karshikov A. The refined 1.9-Å X-ray crystal structure of D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone-inhibited human alpha-thrombin: Structure analysis, overall structure, electrostatic properties, detailed active-site geometry, and structure-function relationships. *Protein Sci*, 1992, 1(4): 426—471
- 孙之荣, 贺福初. 丝氨酸蛋白酶超家族分子结构进化研究. *生物物理学报*, 1999, 15(3): 530—535