

技术与方法

随机单链 DNA 文库 SELEX 筛选
寡核苷酸适配子方法的建立*詹林盛¹⁾ 邵宁生²⁾ 彭剑淳¹⁾ 孙红琰¹⁾ 王全立^{1)**}⁽¹⁾军事医学科学院输血医学研究所, 北京 100850; ⁽²⁾军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850

摘要 指数富集配基的系统进化 (SELEX) 技术是一种新的组合化学技术。体外构建了一个长度为 81 nt、含有 35 个随机序列的单链 DNA (ssDNA) 文库, 优化了 ssDNA 文库扩增为双链 DNA (dsDNA) 文库的 PCR 反应条件。通过对比不对称 PCR 和生物素-链亲和素磁珠分离方法制备 ssDNA 文库的效果, 确定了以生物素-链亲和素磁珠分离方法制备 ssDNA。由于脱氧核糖核酸的疏水性导致 ssDNA 文库与硝酸纤维素滤膜的结合背景过高, 因此选择以微孔板为介质, 分离与靶蛋白结合的适配子。经过 9 轮循环筛选, 随机 ssDNA 文库与丙型肝炎病毒 (HCV) 核心蛋白 (C 蛋白) 的结合率从 0.5% 上升到 32.5%。

关键词 随机 ssDNA 文库, 指数富集配基的系统进化 (SELEX), 寡核苷酸适配子, 丙型肝炎病毒核心蛋白

学科分类号 R392.11

指数富集配基的系统进化 (systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX) 技术是 20 世纪 90 年代初研制的一种新的组合化学技术^[1,2]。它应用大容量的随机寡核苷酸文库, 并结合体外 PCR 扩增技术, 以指数级富集与靶分子特异结合的寡核苷酸, 经过多轮筛选, 获得高亲和力、特异性强的寡核苷酸适配子 (aptamers), 具有库容量大、靶分子范围广、亲和力高、特异性强等优点, 已成功应用于许多靶分子的筛选, 包括金属离子、有机染料、药物、氨基酸、细胞因子、辅因子、氨基糖苷、抗生素、碱基类似物、核苷酸和多肽等。其中蛋白质类靶分子最多, 包括酶、生长因子、抗体、转录因子、细胞粘附分子和选择素等^[3,4]。完整的病毒颗粒和细菌病原体也可以通过复合靶子 SELEX 技术筛选出高亲和力的寡核苷酸适配子。因此 SELEX 技术在基础研究、临床诊断和疾病治疗等方面具有广泛的应用前景。其中特异拮抗 HIV-1 逆转录酶和抗 VEGF 的适配子目前已进入临床试验。本文建立了从随机单链 DNA (ssDNA) 文库中筛选寡核苷酸适配子的 SELEX 技术平台, 为进一步开展以寡核苷酸适配子为基础的药物研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验试剂

HCV C 蛋白为大肠杆菌表达的重组纯化蛋白, 纯度在 95% 以上 (孙红琰博士制备)。Taq DNA 聚合酶、T4 多核苷酸激酶、DNA 提取试剂盒、链亲

和素磁珠购自 Promega 公司; [γ -³²P] ATP 购自北京亚辉公司; 硝酸纤维素膜 (0.45 μ m, HAWP, Millipore); tRNA、BSA 购自华美生物有限公司; 异硫氰酸胍购自 GIBCO 公司; DL-2000 DNA Marker 为 TaKaRa 公司产品。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

构建了长度为 81 nt 的随机 ssDNA 文库, 两端为固定序列, 中间 35 个核苷酸为随机序列, 库容量大约为 $10^{15} \sim 10^{16}$ 。P81 库: 5'-CCCCTGCAGG-TGATTTTGCTCAAGT-(N35)-AGTATCGCTAA-TCAGCGGAT-3'。上游引物: 5'-CCCCTGCAG-GTGATTTT GCTCAAG T-3', 下游 5' 端标记生物素引物: 5'-biotin-ATCCGCCTGATTAGCGATA-CT-3'。随机 ssDNA 文库和引物由上海生工生物有限公司合成。

1.3 文库 PCR 扩增条件的优化

PCR 反应体系为: 模板 0.1 μ g, $10 \times$ PCR 缓冲液 10 μ l, MgCl₂ 6 μ l, dNTPs 100 μ mol/L, Taq 酶 2 U, 上游引物、下游 5' 端生物素标记引物各 50 pmol, 加去离子水至 100 μ l。PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 3 min, 然后 94℃ 变性 40 s, 65℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 最后 72℃ 延伸 7 min。

*国家自然科学基金 (30200352) 和全军医药卫生科研基金 (01MB061) 资助项目。

**通讯联系人。

Tel: 010-66931292, E-mail: wangql@amms.ac.cn

收稿日期: 2002-08-12, 接受日期: 2002-09-12

1.4 ssDNA 文库的制备方法

1.4.1 不对称 PCR: 在 PCR 扩增循环中引入不同浓度的引物, 可以制备 ssDNA. 一般采用 50:1~100:1 比例的引物浓度, 在最初 10~15 个循环中主要产物还是双链 DNA (dsDNA), 但当低浓度引物被消耗尽后, 高浓度引物介导的 PCR 反应就会产生大量的 ssDNA. PCR 反应体系: dsDNA 模板 2 μ l, 10 $\times$ PCR 缓冲液 10 μ l, MgCl₂ 6 μ l, dNTPs 100 μ mol/L, Taq 酶 2 U, 上游引物 50 pmol, 下游引物 1 pmol, 加去离子水至 100 μ l. PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 然后进行 40 个循环 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 65 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min^[5].

1.4.2 生物素-链亲和素磁珠分离法: 在 PCR 体系中, 下游引物的 5' 端标记有生物素. 以 ssDNA 文库为模板, 进行 PCR 扩增得到 3' 端带有生物素的 dsDNA 文库. dsDNA 产物经分离纯化后, 与链亲和素磁珠结合. 此时 dsDNA 通过生物素与磁珠上的链亲和素结合, 然后用 0.15 mol/L 的 NaOH 使 dsDNA 变性解链, 带有生物素的一条链与链亲和素结合留在磁珠上, 而不带生物素的一条链解离出来, 经乙醇沉淀, 溶于 TE 缓冲液中, 测定吸光度 (A) 值, 作为下一轮筛选的 ssDNA 文库^[6].

1.5 SELEX 筛选方法

1.5.1 微孔板为介质的筛选方法: 丙型肝炎病毒 (HCV) C 蛋白包被于 Nunc96 孔酶联板上, 4 $^{\circ}$ C 过夜, 包被液为 0.05 mol/L NaHCO₃, pH 9.6 的缓冲液, 同时设空白对照孔. C 蛋白包被孔和空白对照孔均以 3% BSA 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h. 随机 ssDNA 文库和一定量的 tRNA 先在结合缓冲液 SHCMK 液 (20 mmol/L Hepes pH 7.35, 120 mmol/L NaCl, 5 mmol/L KCl, 1 mmol/L CaCl₂, 1 mmol/L MgCl₂) 中与经 3% BSA 封闭的空白对照孔 37 $^{\circ}$ C 结合 40 min, 反筛去除与 BSA 结合的 ssDNA, 然后转移到 HCV C 蛋白包被孔与 C 蛋白 37 $^{\circ}$ C 结合 40 min. 用冲洗缓冲液 (SHCMK 液 + 0.05% Tween 20) 洗 6 次, 洗去未结合的 ssDNA, 再加洗脱缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, 4 mol/L 异硫氰酸胍, 1 mmol/L DTT, pH 8.3) 于 80 $^{\circ}$ C 作用 10 min, 洗脱下与 C 蛋白结合的 ssDNA, 经酚-氯仿抽提、乙醇沉淀, 将 ssDNA 溶解于 20 μ l TE 缓冲液中. 将 ssDNA 用标记生物素的引物经 PCR 扩增成一端带生物素的 dsDNA. 经生物素-链亲和素磁珠分离 ssDNA, 用作下一轮筛选的 ssDNA 文

库^[7].

1.5.2 硝酸纤维素膜为介质的筛选方法: ssDNA 文库与 HCV C 蛋白在结合缓冲液 (200 mmol/L KAc, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 6 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L DTT) 中 37 $^{\circ}$ C 作用 40 min, 使 ssDNA 与靶分子充分结合. 然后将反应混合物过预先用结合缓冲液湿润的硝酸纤维素膜, 与靶分子结合的 ssDNA 留在滤膜上, 而未结合的 ssDNA 则可通过滤膜. 经过 5 ml 结合缓冲液的洗涤后, 将滤膜放入 1.5 ml 离心管中, 剪碎, 加 200 μ l 滤膜洗脱液 (7 mol/L 尿素, 0.5 mol/L NH₄Ac, 0.2% SDS, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0), 100 $^{\circ}$ C 加热 5 min. 把洗脱液吸入另一离心管中, 加 2.5 倍体积的无水乙醇, 1/10 体积的 3 mol/L NaAc (pH 5.2), 在 -70 $^{\circ}$ C 沉淀 ssDNA. 将 ssDNA 溶解于 20 μ l TE 缓冲液中, 用标记生物素的引物经 PCR 扩增成一端带生物素的 dsDNA. 生物素-链亲和素磁珠分离 ssDNA, 测定 A 值作为下一轮筛选库^[8].

1.6 ssDNA 文库结合百分率测定

10 pmol 5' 端标记 [γ -³²P] ATP 的 ssDNA 文库与 1 μ mol/L HCV C 蛋白在结合缓冲液中 37 $^{\circ}$ C 作用 40 min 后, 将样品抽滤于硝酸纤维素滤膜上, 用 5 ml 结合缓冲液冲洗后, 将滤膜烤干, 取下置于闪烁杯中, 加入 PPO-POPOP-二甲苯液 3 ml, 用 Beckman LS 5000CE 型液体闪烁仪测定其放射性, 计算 ssDNA 结合百分率.

2 结 果

2.1 随机 ssDNA 文库 PCR 扩增条件的优化

随机 ssDNA 文库的 PCR 扩增条件与常规 PCR 扩增条件有所不同, 退火温度的选择将直接影响目的 DNA 的纯度和产量. 当退火温度常规设定为 55 $^{\circ}$ C 时, 分别进行 5、8、12、16、20 和 30 个循环的 PCR 扩增, 产物经 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE), 结果发现经 8 个循环扩增可以得到相对特异的片段, 但从 12 个循环起扩增产物明显呈弥散状 (图 1). 而同等条件下把退火温度提高到 65 $^{\circ}$ C 可以改善扩增 dsDNA 产物的特异性, 12 个甚至 16 个循环还可以获得大小正确的 dsDNA 产物 (图 2). 试验还发现降低模板 ssDNA 的用量, 经过 20 个循环扩增仍然可得到较高纯度的目的 dsDNA 片段. 因此每一轮的筛选过程都必须控制从 ssDNA 扩增为 dsDNA 的 PCR 循环数.

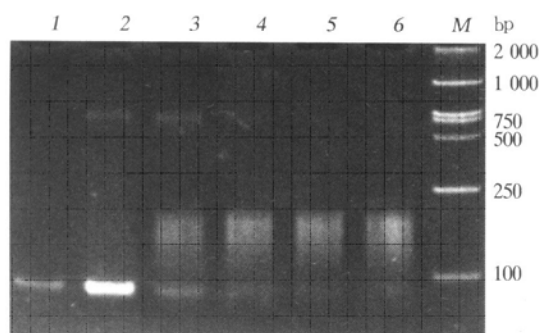


Fig.1 The dsDNA products by PCR annealing at 55°C

1~6: 5, 8, 12, 16, 20 and 30 cycles by PCR, respectively; M: DL-2000 DNA marker.

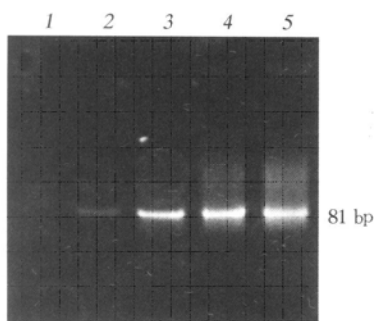


Fig.2 The dsDNA products by PCR annealing at 65°C

1~5: 3, 6, 9, 12 and 16 cycles by PCR, respectively.

2.2 ssDNA 文库的制备

ssDNA 经优化 PCR 条件扩增成 dsDNA 后, 比较不对称 PCR 和生物素-链亲和素磁珠分离方法制备 ssDNA 的效果. 结果表明以起始库为模板进行不对称 PCR 可以获得比较特异的 ssDNA 目的片段, 但随着筛选轮次的增加, 不对称 PCR 方法扩

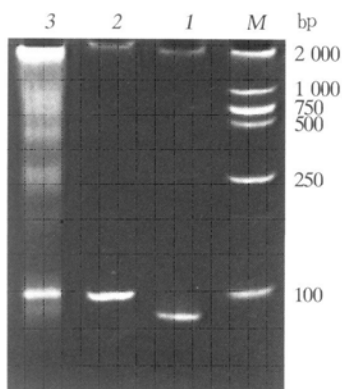


Fig.3 ssDNA pool produced by asymmetric PCR

M: DL-2000 DNA marker; 1: dsDNA pool; 2: ssDNA pool produced by asymmetric PCR at round 1 SELEX; 3: ssDNA pool produced by asymmetric PCR at round 6 SELEX.

增得到的产物非特异性明显增加, 10% 变性 PAGE 出现弥散的杂带 (图 3). 因此不对称 PCR 方法制备 ssDNA 不够稳定. 而生物素-链亲和素磁珠分离 ssDNA 方法更为稳定, 只要能保证 dsDNA 文库的总量和纯度, 9 轮筛选均可以得到高纯度和足量的 ssDNA 文库 (图 4).

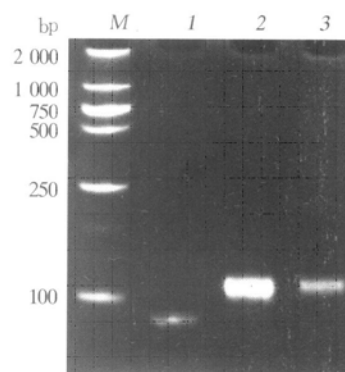


Fig.4 Generation of ssDNA pool from dsDNA pool based on biotin-streptavidin-magnetism bead

M: DL-2000 DNA marker; 1: dsDNA pool; 2: generation of ssDNA pool based on biotin-streptavidin-magnetism at rounds 1 SELEX; 3: generation of ssDNA pool based on biotin-streptavidin-magnetism at rounds 6 SELEX.

2.3 SELEX 筛选介质的选择

以同位素标记 ssDNA 文库, 测定硝酸纤维素滤膜对 ssDNA 文库背景吸附率, 结果发现硝酸纤维素滤膜对起始 ssDNA 文库具有 15% 的背景吸附率, 而且经过多轮反筛后依然有较高的背景吸附.

而以微孔板为介质, 经过 3% BSA 封闭, 可以克服微孔板对 ssDNA 的背景吸附, 经过几轮 BSA 包被孔的反筛后, 与 BSA 结合的 ssDNA 逐渐减少, 而与靶蛋白结合的特异序列得到富集. 因此对于随机 ssDNA 文库, 以微孔板为介质的分离方法更为适合.

2.4 HCV C 蛋白寡核苷酸适配子的筛选

以 HCV C 蛋白为靶标, 进行了 9 轮 SELEX 筛选. 9 轮筛选所加 HCV C 蛋白、ssDNA 文库及 tRNA 量, 每一轮 PCR 扩增的最适循环数和 ssDNA 与 C 蛋白的结合百分率见表 1. 经过 9 轮 SELEX 筛选后, 分别测定了第 1、3、6、9 轮 ssDNA 文库与 HCV C 蛋白结合的比例, 结果显示随着筛选轮数的增加, ssDNA 群体与 HCV C 蛋白结合的比例不断增加, 第 3 轮达到 4.5%, 第 6 轮为 15.5%, 第 9 轮达到 32.5%. 表明与 HCV C 蛋白特异结合的 ssDNA 序列得到明显的富集.

Table 1 Selection parameters for HCV core protein

SELEX rounds	<i>m</i> (HCV core protein) / μ g	<i>n</i> (ssDNA pool) /pmol	ρ (tRNA) /mg $\cdot$ L ⁻¹	PCR cycles	ssDNA binding /%
1	5	800	0.0	8	0.45
2	4	200	0.25	10	
3	1	100	0.25	15	4.5
4	1	50	0.5	12	
5	0.5	50	0.5	18	
6	0.5	25	0.5	12	15.5
7	0.1	25	1	10	
8	0.1	10	1	8	
9	0.05	10	1	12	32.5

3 讨 论

SELEX 技术是一项新的组合化学技术,也是一种研究核酸结构和功能的有效方法.其基本思想是体外合成一个大容量的随机单链寡核苷酸文库,当文库与特定的靶分子作用时,文库中存在的能与靶分子特异结合的序列,就和靶分子结合形成复合物,洗掉未与靶分子结合的序列,再使用一定的方法分离出与靶分子结合的序列,以这些序列为模板进行 PCR 扩增,然后转录成 RNA 或制备成单链 DNA,再进行下一轮的筛选过程.通过重复的筛选和 PCR 扩增,与靶分子不结合或结合亲和力弱的 DNA 或 RNA 分子被“淘洗”掉,而与靶分子具有高亲和力的 RNA 或 DNA 分子,称为“适配子”得到富集,最后通过克隆和测序,得到具有高亲和力、高特异性的适配子序列.

这种方法具有简便、快速、经济等特点,与其他组合化学库如随机肽库、抗体库及噬菌体表面展示文库相比,从寡核苷酸文库中筛选出的适配子具有更高的亲和力和特异性,具有良好的应用前景.

随机寡核苷酸文库主要有三类:随机 RNA 文库、经修饰的随机 RNA 文库以及随机 ssDNA 文库.由于 DNA 相对于 RNA 分子更加稳定,且相对生产成本低廉,更加适用于体外诊断和体内治疗.因此我们构建了一个含 35 个碱基的随机序列、总长 81 nt 的 ssDNA 文库,理论上有 $10^{15} \sim 10^{16}$ 的库容量,足以满足实际需要.由于设计的引物是与固定序列互补的,在设计文库的固定序列时要尽量避免形成引物二聚体或使引物自身折叠,否则会在 PCR 反应中降低反应的特异性,也有可能造成扩增序列与原文库有差异.在固定序列的设计上往往加入较多的 G/C 碱基,以提高今后 PCR 反应的退

火温度和反应的特异性.

PCR 扩增条件对 SELEX 筛选过程具有明显的影响.由随机寡核苷酸文库中的随机序列区与引物可能进行部分杂交,从而形成大分子质量、电泳呈弥散状的产物,而得不到目的 DNA 片段.因此 PCR 条件的优化、退火温度的选择将直接影响目的 DNA 的纯度和产量,本实验退火温度设为 65℃,得到纯度较高的 dsDNA.在每一轮的筛选过程中,必须寻找从 ssDNA 扩增为 dsDNA 的最适 PCR 循环数,既要保证目的 DNA 的纯度,又要得到较高产量的目的 DNA.因此每一轮筛选所使用的 PCR 循环数都可能不一样,在大量扩增前,需要取少量前一轮筛选得到的 ssDNA 为模板,在优化的 PCR 条件下进行扩增,每进行 3~5 个循环,取少量产物在 10% PAGE 胶上电泳观察结果,确定产物 dsDNA 条带单一,没有出现弥散的最佳循环数,然后再大量扩增.

起始 dsDNA 文库的纯度高,以其为模板进行不对称 PCR 可以获得比较特异的 ssDNA 目的片段,但随着筛选轮次的增加,即使在优化的 PCR 条件下扩增得到的 dsDNA 模板,也可能存在少量的非特异产物,再经不对称 PCR 扩增,产物的非特异性明显增加,出现弥散的杂带.而生物素-链亲和素磁珠分离方法比较稳定,只要能保证 dsDNA 的总量和纯度,就可以得到高纯度和足够量的 ssDNA.

寡核苷酸文库与靶分子浓度的比值也影响筛选效率.由于高亲和力适配子的含量在文库中很低,在最初几轮的筛选中应使用较高浓度的靶分子,以保证尽可能多地捕捉到相应的适配子.随后的筛选轮次中,由于高亲和力适配子经过 PCR 扩增得到富集,其浓度已足以与高含量的低亲和力适配子竞争,此时可以降低靶分子的浓度,以加强筛选的严谨性.如果整个 SELEX 筛选过程都使用高浓度的靶分子,就会减少寡核苷酸序列之间的竞争,导致每一轮富集效率降低,并增加筛选轮次.

在进行 SELEX 筛选时,文库中通常也含有与分离介质结合的寡核苷酸序列,有时其丰度可能比与靶分子特异结合的序列还高.过高的背景将增加筛选的轮次,甚至导致筛选失败.因此在开始第一轮筛选前,需要进行一步反筛操作,即将未结合靶分子的寡核苷酸文库先与分离介质结合一遍,以去除与分离介质结合的部分,降低筛选背景.从随机 RNA 文库中筛选靶蛋白的核酸适配子大多使用硝

酸纤维素膜分离结合的 RNA 适配子, 但对于本研究所用的随机 ssDNA 文库, 由于脱氧核糖核酸具有很强的疏水性, 与硝酸纤维素膜的结合力较强, 带来过高的背景吸附. 因此本实验选用在多孔聚丙烯酶联板上筛选分离适配子, 操作简便, 易于自动化. HCV C 蛋白包被于微孔酶联板后, 用 3% BSA 封闭微孔, 但随机 ssDNA 文库中可能有与 BSA 特异结合的序列. 为此特设立空白对照孔, 同样用 3% BSA 封闭, 随机 ssDNA 文库先经 3% BSA 封闭的空白对照孔反筛, 这样可以去除与 BSA 结合的序列, 然后再转移到 HCV C 蛋白包被孔中与 C 蛋白结合, 经过多轮的反筛, 与 BSA 结合的序列越来越少, 而与 HCV C 蛋白特异结合的序列得到不断富集, 提高 SELEX 筛选的特异性. 另外, 在筛选过程中还加入非特异竞争剂 tRNA, 与寡核苷酸适配子竞争结合靶分子, 有利于从随机文库中筛选出高亲和力的适配子. 我们的研究表明经过 9 轮循环筛选, 随机 ssDNA 文库与 HCV C 蛋白的结合率从 0.5% 上升到 32.5%, 说明与 HCV C 蛋白特异结合的序列得到明显富集. 本研究建立了

SELEX 技术平台, 为进一步开展以寡核苷酸适配子为基础的药物研究奠定了基础.

参 考 文 献

- 1 Robertson D L, Joyce G F. Selection *in vitro* of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA. *Nature*, 1990, **344** (6265): 467~468
- 2 Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 1990, **249** (4968): 505~510
- 3 Brody E N, Gold L. Aptamers as therapeutic and diagnostic agents. *J Biotechnol*, 2000, **74** (1): 5~13
- 4 White R R, Sullenger B A, Rusconi C P. Developing aptamers into therapeutics. *J Clin Invest*, 2000, **106** (8): 929~934
- 5 Gyllenstein U B, Erlich H A. Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, **85** (20): 7652~7656
- 6 Bock L C, Griffin L C, Latham J A, *et al.* Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature*, 1992, **355** (6360): 564~566
- 7 Drolet D W, Jenison R D, Smith D E. A high throughput platform for systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX). *Comb Chem High Throughput Screen*, 1999, **2** (5): 271~278
- 8 Moine H, Cachia C, Westhof E, *et al.* The RNA binding site of S8 ribosomal protein of *Escherichia coli*: Selex and hydroxyl radical probing studies. *RNA*, 1997, **3** (3): 255~268

A Procedure for SELEX Screening Aptamers From ssDNA Random Library*

ZHAN Lin- Sheng, SHAO Ning- Sheng, PENG Jian- Chun, SUN Hong- Yan, WANG Quan- Li* *

(¹) *Institute of Transfusion Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China;*

(²) *Institute of Basic Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)*

Abstract SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) is a new combinatorial chemistry technology. An 81 nucleotides ssDNA pool containing 35 random nucleotides flanked by invariant primer was designed. The PCR amplification conditions were optimized for converting the ssDNA pool into dsDNA pool. Compared to asymmetry PCR, the technique based on biotin- streptavidin- magnetism bead was suitable for generation of ssDNA from dsDNA. Since the hydrophobicity of deoxyribose leads to an inherently higher degree of background binding to nitrocellulose filters, panning procedures on microtiter plates were employed. After 9 rounds selection, the percentage of the ssDNA pool bound to HCV core protein increased from 0.5% to 32.5%.

Key words ssDNA pool, SELEX, aptamers, HCV core protein

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30200352) and The Foundation for Medicine Research in PLA (01MB061).

** Corresponding author. Tel: 86-10-66931292, E-mail: wangql@amms.ac.cn

Received: August 12, 2002 Accepted: September 12, 2002