

· 基础研究 ·

SELEX 技术筛选变形链球菌 UA159 适配子可行性的研究 *

黄 博 彭 磊 王 帅 刘筱娣 郭丽宏[△]

(北京大学口腔医院生物教研室 北京 100081)

摘要 目的 研究 SELEX 技术用于筛选口腔致龋菌适配子的可行性。方法 化学合成长度为 35mer 的随机 ssDNA 文库,利用 SELEX 技术,分别以变形链球菌 UA159(以下简称变链 UA159)、乳杆菌和离心管作为靶物质,筛选适配子,不对称 PCR 扩增筛选产物,所得适配子进行克隆、测序,分析其二级结构,并对其二级结构进行了初步分析。结果 显示各个靶物质的筛选产物在第二轮筛选时就已经表现出具有特征性的二级结构。结论 SELEX 技术可以用于口腔致龋菌适配子的筛选。

关键词 SELEX; 变形链球菌 UA159; 乳杆菌; 适配子; 二级结构

中图分类号 R780.1 文献标识码 A 文章编号:1673-6273(2012)21-4001-05

Feasible Study of Vitro Selection of DNA Aptamers against *Streptococcus Mutans* UA159 by SELEX*

HUANG Bo, PENG Lei, WANG Shuai, LIU Xiao-di, GUO Li-hong[△]

(Department of Oral Biology, Peking University and Hospital of Stomatology, Beijing, 100081, China)

ABSTRACT Objective: To verify the feasibility of vitro selection of DNA aptamers against *Streptococcus mutans* UA159 by SELEX. **Methods:** *Streptococcus Mutans* UA159, *Lactobacilli* and 1.5mL centrifuge Tube are chosen to be target materials. And *in vitro* synthesized 35 mer random DNA library (10^{12-13} types of different DNAs) is subjected to selection using SELEX method against *Streptococcus Mutans* UA159, *Lactobacilli* and 1.5mL centrifuge Tube. The selected aptamers are amplified by asymmetric PCR, then cloned and sequenced. Finally, the structures of selected aptamers are analyzed. **Results:** The structure showed specific secondary structure shape characterized by their loops, bulges and hairpins in the second round. **Conclusion:** This study shows the SELEX has the potential to be used as a selection tool to acquire aptamers with high affinity and specificity against oral bacteria.

Key words: SELEX; *Streptococcus Mutans*; *Lactobacilli*; Aptamer; Secondary structure structure

Chinese Library Classification(CLC): R780.1 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2012)21-4001-05

单链 DNA 或 RNA 可以藉自身形成的三维空间结构与其他各种分子(蛋白质、核酸等)相互作用。以此为基础体外构建随机寡核苷酸文库,然后利用指数级富集的配体系统进化技术(SELEX),经过数轮的筛选和扩增,所得到的具有高亲和力和高特异的寡聚核苷酸,称为核酸适配子(aptamer)^[1,2]。理论上,只要核苷酸库中的序列有足够的多样性,我们可以通过 SELEX 技术筛选出针对任何靶分子的适配子^[3]。核酸适配子的作用机制不同于核酶和反义核酸,而与单克隆抗体类似。通过与靶分子特异结合,核酸适配子可起到识别或抑制靶分子生物学活性的作用^[4]。适配子具有靶分子范围广、与靶分子结合亲和力高、特异性强、精确识别、易体外合成与修饰等特点。它已在基础研究、临床诊断与治疗以及新药研发等诸多领域展示了广阔的应用前景^[6,7]。特别是近几年基于适配子的生物芯片、生物传感器、分子信标等检测新技术已初步显示出良好的敏感性和特异性,在人类疾病诊断中具有良好的应用前景^[8-10]。

龋病是一种由多种因素复合作用所导致的牙齿硬组织进行性病损,是口腔主要的常见病,也是人类最普遍的疾病之一,世界卫生组织已将其与肿瘤和心血管疾病并列为人类三大重点防治疾病。变形链球菌已被公认为是龋病的主要致病菌^[11]。目前的大量研究是将细胞或蛋白作为靶物质进行筛选^[12-14],然而将细菌作为靶物质,除了炭疽芽孢和结核分枝杆菌外^[5,15],此方面的报道很少。此文利用 SELEX 技术,分别以变链 UA159、乳杆菌和离心管作为靶物质,从随机文库中筛选出分别与靶物质结合的寡核苷酸适配子,并对其结构进行了初步分析,比较不同靶物质适配子所具有的特征性二级结构,不但为口腔致龋菌作为靶物质,筛选获得高特异性及高亲和力的适配子奠定了基础,也为适配子应用于龋病易感性检测及预防提供了可能。

1 材料与方法

1.1 材料

* 基金项目 国家自然科学基金(30672322)

作者简介 黄博(1983-),女,硕士研究生,主要研究方向 龋病方面的研究。

电话:15810596016 E-mail: huangbo_1023@yahoo.cn

[△]通讯作者 郭丽宏

(收稿日期 2012-02-27 接受日期 2012-03-22)

1.1.1 DNA 随机文库的构建 用于 SELEX 筛选的 DNA 随机文库, 两端为固定序列, 中间 35 个碱基为随机序列, 其库容为 10^{12-13} 。序列为 5'-GGGAGCTCAGAATAAACGCTCAA-random35mer region-TTCGACATGAGGCCCGGAT-3'。

1.1.2 引物 PCR 过程中所用的引物由 Primer Design 软件设计, 筛选出两条引物, 无任何二级结构形成, 序列如下: 引物 5'-GGGAGCTCAGAATAAACGCTCAA-3'; 引物 5'-GATC-CGGGCCTCATGTGCGAA-3', 引物 和引物 分别对应于随机 DNA 库的两端固定序列, 引物 3' 端标记生物素, 所有引物均由上海英骏公司合成。

1.1.3 实验材料 PCR 所需 dNTP、TaqDNA 聚合酶购自北京美莱博公司, 筛选缓冲液: 1mol/L NaCl、40mmol/L Tris·HCl、2mmol/L MgCl₂ pH 7.5。

1.1.4 菌株及载体 变链 UA159(UCLA 赠送), 乳杆菌为本实验室 -80℃ 贮存, 1.5mL PS 离心管购于 Axygen 公司, pEGM-T 购于北京天根生物有限公司。

1.2 方法

1.2.1 SELEX 过程 1) 100μM 的随机 ssDNA 文库分别与变链 UA159(10^8 个/ml)、乳杆菌(10^8 个/ml) 和离心管 37℃ 孵育 1h 2) 10000 rpm 离心 10min, 弃上清, 加入筛选缓冲液 1mL 重悬细菌, 10000 rpm 离心 10min, 反复此过程 3 遍, 洗去未与细菌结合的 DNA 4) 去离子水 50μL, 99℃ 加热 3min, 离心分别取上清为模板, 进行 PCR 扩增。

1.2.2 PCR 反应条件 先将筛选产物进行 10 轮的对称 PCR。PCR 反应体系组成: 去离子水从靶物质上洗脱下的 DNA 混合液 3~5μL, 10 × 缓冲液 5μL, 10μM 引物 1μL、10mM dNTP 2μL, 去离子水补齐 50μL 反应体系; 循环参数为: 95℃ 预变性 5min, 然后进入 PCR 循环: 95℃ 变性 30s, 65℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 30s, 共 10 个循环, 72℃ 再延伸 5min。

之后, 再将对称 PCR 的产物进行不对称 PCR。PCR 反应体系组成: 对称 PCR 产物 3~5μL, 10 × 缓冲液 5μL, 10μM 上游引物 3μL、1μM 下游引物 0.6μL、10mM dNTP 2μL, 去离子水补齐 50μL 反应体系, 循环参数为: 95℃ 预变性 5min, 然后进入 PCR 循环: 95℃ 变性 30s, 65℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 30s, 共 30 个循环, 72℃ 再延伸 7min。

变链 UA159 筛选结果:

5#10# 序列 5'-GGGAGCTCAGAATAAACGCTCAA- GTCACGTGGGATCAACACCACAATACTAGCAACAA-TTCGACAT-GAGGCCCGGATC-3'

11# 序列 5'-GGGAGCTCAGAATAAACGCTCAA-GT- AGTGAGGA TGGTCGATTA ATAGGTGCCG TGCCCTTCGACAT-GAGGCCCGGATC-3'

13# 序列 5'-GGGAGCTCAGAATAAACGCTCAA- TTTGAACCTCG CTCGTACCTG CTTTGTATTG TGTTA -TTCGACAT-GAGGCCCGGATC-3'

17# 序列 5'-GGGAGCTCAGAATAAACGCTCAA- TTTATTTTGT TCTGTAAACGG GCTGCTGTT CTTGG -TTCGACAT-GAGGCCCGGATC-3'

25# 序列 5'-GGGAGCTCAGAATAAACGCTCAA- TGTTGGTCTT AGTTATCATG GTATGCAGGC ACTAG-TTCGACAT-GAGGCCCGGATC-3'

8# 序列 5'-GGGAGCTCAGAATAAACGCTCAA- GTTGGCTGTT ATTGCTTGTT GAGAGTTTCA CGTTC-TTCGACAT-GAGGCCCGGATC-3'

12# 序列 5'-GGGAGCTCAGAATAAACGCTCAA- AGGGCGGACT TGTTAGTTCA GGATTCCGTGATTG-TTCGACAT-

1.2.3 克隆、测序及序列分析 将所得产物回收 / 纯化后分别连入 pEGM-T 载体, 经蓝白斑筛选后, 分别随机挑取变链 UA159 和离心管筛选产物的 8 个阳性克隆, 以及乳杆菌筛选产物的 4 个阳性克隆, 送测序 (上海英骏公司)。将获得的序列利用 RNAstructure 3.7 软件进行分析。

2 结果

2.1 不对称 PCR

如下图, 电泳第 2 和第 3 道由于不对称 PCR 模板量过高, 条带较弥散, 第 4 道和第 5 道为模板量分别为 1μL 和 0.5μL 的不对称 PCR 产物, 条带集中, 位置正确。可见在模板量适合的情况下不对称 PCR 可获得较好的 ssDNA 产物, 如图:

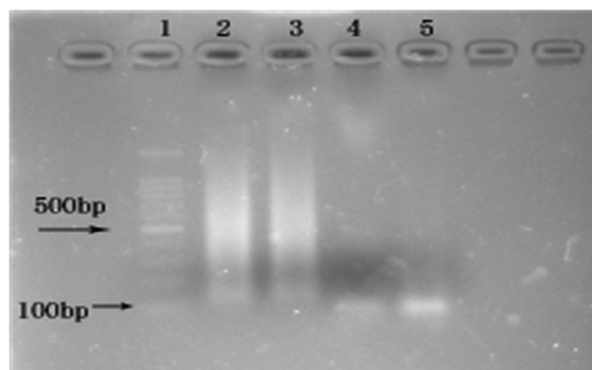


图 1 第二轮筛选 PCR 产物的 2% 琼脂糖电泳结果

第 1 道: 100bp marker; 第 2、3、4、5 道分别为第二轮筛选产物, 不同模板量进行 PCR 扩增的产物
电泳条件: 80V 40min

Fig.1 The results of agarose electrophoresis that screening 2% PCR products in the second round

2.2 SELEX 筛选产物的克隆和测序

分别对筛选出的 DNA 适配子进行了克隆, 在以变链 UA159 作为靶物质筛选出的 25 个克隆子中随机选出了 8 个测序; 在以乳杆菌为靶物质筛选出的 11 个克隆子中随机选出了 4 个测序; 在以离心管为靶物质筛选出的 17 个克隆子中随机选出了 8 个测序。测序结果如下 (划线部分表示随机核苷酸序列):

GAGGCCCGGATC- 3'

乳杆菌筛选结果：

3# 序列 5'-GGGAGCTCAGAATAAACGCTCAA- GTCAACCACA AGATGGACAC GTCACAACA TCCGA-TTCGACAT- GAGGCCCGGATC- 3'

4# 序列 5'-GGGAGCTCAGAATAAACGCTCAA- GCACTATAAC GAACGACCAC TTACGGCCCC AATCC-TTCGACAT- GAGGCCCGGATC- 3'

5# 序列：5'-GGGAGCTCAGAATAAACGCTCAA- ACCACATATA GGCGTAAAGA CCCGTACACG CATAA-TTCGACAT- GAGGCCCGGATC- 3'

2# 序列 5'-GGGAGCTCAGAATAAACGCTCAA- GCAGTAACCT GCATGCGCGC ACTCTGCTCC AAAAC-TTCGACAT- GAGGCCCGGATC- 3'

离心管筛选结果：

54# 序列：5'-GGGAGCTCAGAATAAACGCTCAA-CGCACATACTATTTCGTAGAGTGTAGAAGAA AGAAA-TTCGACAT- GAGGCCCGGATC- 3'

7#52# 序列 5'-GGGAGCTCAGAATAAACGCTCAA- CCGACCCACGCCACCTATACTGAATCCTAA ATGGA-TTCGACAT- GAGGCCCGGATC- 3'

10#、51# 序列 5'-GGGAGCTCAGAATAAACGCTCAA-GAAATGCATTTCGTAGATAACAAGGCCACC TGACA-TTCGA- CATGAGGCCCGGATC- 3'

9#56# 序列：5'-GGGAGCTCAGAATAAACGCTCAA- TTGCCTTGTGCACAGAATTCGGTGTGTAA TCTGT-TTCGACAT- GAGGCCCGGATC- 3'

19# 序列：5'-GGGAGCTCAGAATAAACGCTCAA-AGGGCGGACTTGTTAGTTCA GGATTCCGTGATTG-TTCGACAT- GAGGCCCGGATC- 3'

2.3 适配子二级结构分析

变链 UA159 适配子以双茎环结构为主，占测序总数的 75%，具有特征性的双茎环结构(如图 2) 双茎环大小差异十分明显(5#、10#、11#、13#、17#、25#)，大环至少由 20 个以上的核

苷酸组成，组成小环的核苷酸数目为 5 至 9 个，这些结构占双茎环结构的 100%，8# 和 12# 具有三茎环的二级结构，与离心管的适配子 52# 和 54# 结构相似，占测序总数 25%。

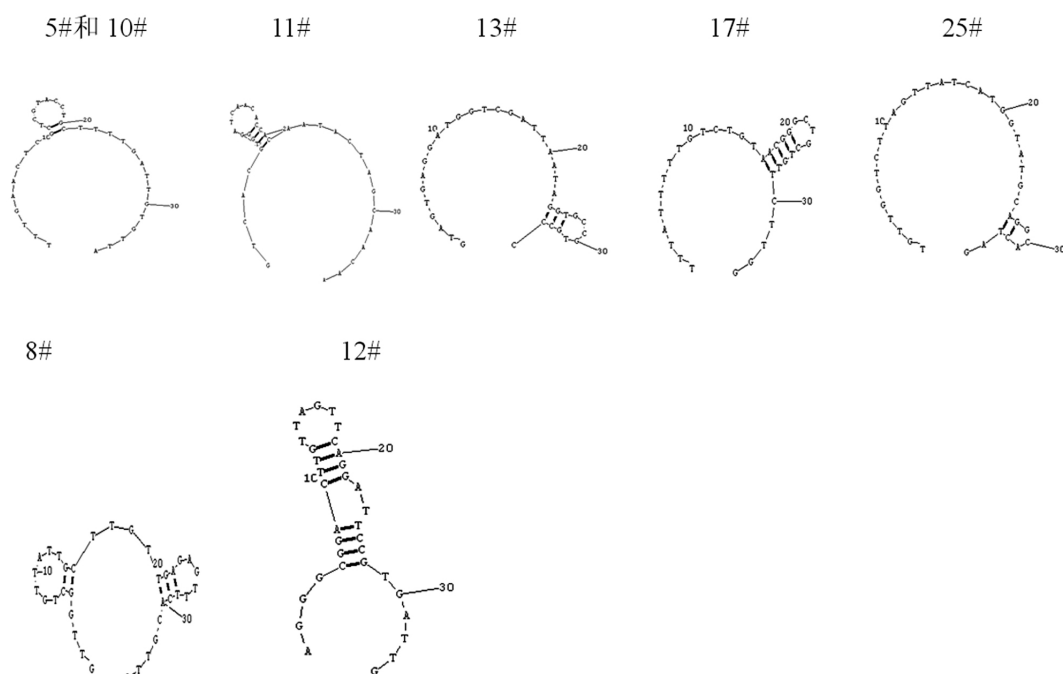


图 2 变链 UA159 适配子二级结构

Fig.2 The secondary structure of streptococcus mutans UA159 aptamer

乳杆菌适配子以双茎环结构为主，占总测序结果的 75%，具有其特征性的双茎环结构(3#、5#)，与变链 UA159 适配子相比，两茎环的大小相当，大环由 16 或 17 个核苷酸组成，组成小环的核苷酸数目最少为 14 或 15 个(3#、5#)，此特征性结构占

双茎环结构的 66.7%，4# 适配子的二级结构与变链 UA159 适配子相似，占测序总数的 25%，2# 适配子具有三茎环的二级结构，与 1.5mL 离心管的适配子 52# 结构相似，占测序总数 25%。

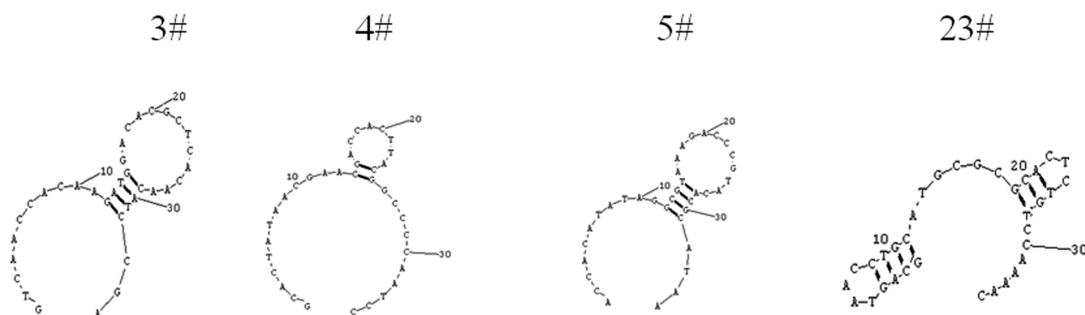


图 3 乳杆菌适配子的二级结构

Fig. 3 The second structure of Lactobacilli aptamer

离心管适配子则同时具有双茎环和三茎环的二级结构(图 4),各占 50%。这些结构中,有两种结构在变链 UA159 适配子和乳杆菌适配子中从未见过,第一种双茎环结构(9#,56#,10#,51#)占测序总数的 50%;第二种三茎环结构

(54#),占测序总数的 12.5%;其他的结构在变链 UA159 适配子和乳杆菌适配子中出现过(7#,52#,54#),各占其测序总数的 25%。

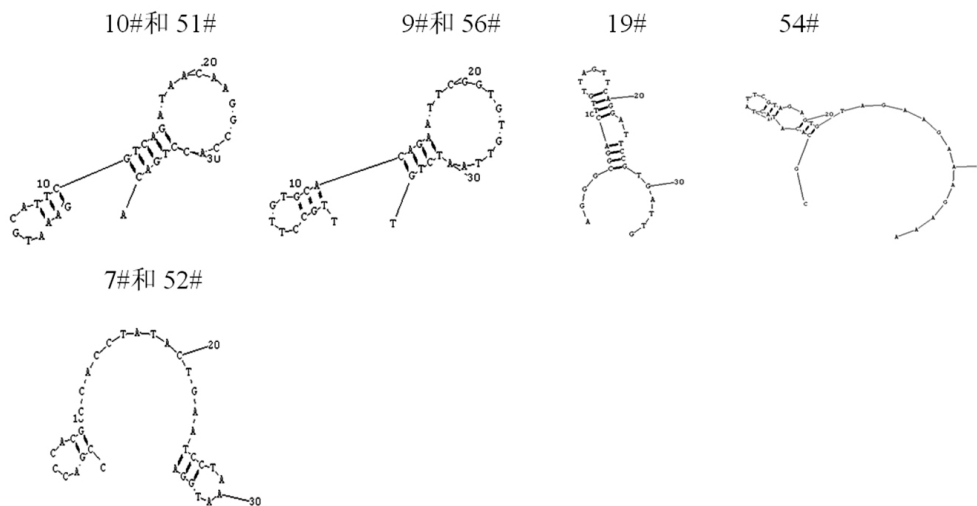


图 4 离心管适配子二级结构

Fig. 4 The secondary structure of centrifugal tube aptamer

3 讨论

近年来,随着免疫学、分子生物学和基因工程技术的飞速发展,极大推动了变形链球菌疫苗的发展。其基本原理是抗原-抗体模式的宿主免疫应答反应,达到预防和治疗疾病的目的^[7,8]。但是此类疫苗生产较为复杂、成本高、存在副作用。SELEX 技术是一种新的化学技术。它应用大容量的随机寡核苷酸文库,结合体外 PCR 技术,以指数级富集与靶分子结合的寡核苷酸,经筛选得到高亲和力、高特异性的寡核苷酸适配子。核酸适配子的作用机制与单克隆抗体类似,通过与靶分子特异结合,核酸适配子可起到识别或抑制靶分子生物学活性的作用,并且适配子具有易合成、成本低、容易操作等特点^[4]。在基础研究、临床诊断与治疗以及新药研发等诸多领域展示了广阔的应用前景。目前,大多研究都集中在利用 SELEX 技术对细胞、蛋白的适配子进行筛选^[12-14],以细菌为靶物质的研究很少,目前仅有针对炭疽芽孢和结核分枝杆菌的研究^[5,15],筛选出的特异性适配子通过与这两种细菌结合,作为诊断探针用于样本的检测。本实验

将口腔致龋菌作为靶物质进行筛选,分析 SELEX 技术对于筛选变链 UA159 适配子的可行性,为获得高特异性及高亲和力的适配子奠定了基础。

本研究构建全长为 80mer 的随机 ssDNA 文库,中间含有 35 个随机寡核苷酸,理论库容为 10^{16} ,实际库容为 10^{13-14} ,足以筛出目的寡核苷酸^[16,20,21]。由于单链的寡核苷酸形成的空间结构要比双链寡核苷酸的空间结构多,被筛选的机会要大于双链,所以在保证库容的情况下,还应保证每一轮筛选产物 ssDNA 的量。传统的方法是将筛选产物先进行 PCR 扩增,然后将扩增产物 99 °C 热变性,解链为 ssDNA,这种方法所得到的 ssDNA 文库不稳定,很容易在操作过程中复性,重新形成双链结构。本实验采用的是传统的对称 PCR 与不对称 PCR 相结合的方法:在不对称 PCR 前先进行对称 PCR 是为了增加不对称 PCR 的模板量,但是考虑到 PCR 会造成文库的偏移,所以减少轮数至 10 轮,然后将对称 PCR 的产物作为不对称 PCR 的模板进行扩增^[22]。采用不对称 PCR 的方法,其主要原理是在扩增体系中引入不同引物浓度,不对称引物的比例一般为 50 : 1 或 100 : 1,在

开始的 10 至 15 个循环中主要产物是双链 DNA, 但当低浓度的引物被耗尽后高浓度引物介导的 PCR 则会产生大量单链 DNA。此方法所得的 ssDNA 文库更加稳定, 不易受到操作的影响。

变链 UA159、乳杆菌、离心管分别作为靶物质筛选所得的适配子, 通过 RNAstructure 3.7 软件模拟其二级结构, 结果显示: 不同靶物质筛选所得的适配子具有明显的结构差异。变链 UA159 适配子和乳杆菌适配子都以双茎环的二级结构为主, 所有变链 UA159 适配子双茎环结构中, 100% 的筛选产物表现出特征性的一大一小、不对称的双茎环结构; 所有乳杆菌适配子双茎环结构中, 75% 的筛选产物表现出大小相当的对称双茎环结构; 除了以上高比例出现的特征性二级结构外, 这两种靶细菌筛选的适配子中, 各有 25% 的适配子表现出与 1.5mL 离心管适配子相似的二级结构。考虑到靶细菌的筛选是在 1.5mL 的离心管中进行的, 所以有可能性是部分与管壁结合的寡核苷酸在获得靶细菌适配子的同时被一同洗脱下来。而 1.5mL 离心管作为靶物质筛选所得适配子结构中, 同时具有双茎环结构和三茎环结构, 各占 50%。其中 10#, 51#, 9#, 56# 和 54# 这两种结构在变链 UA159 适配子和乳杆菌适配子中从未见过。综上所述: 以不同靶物质筛选所得的适配子均具有其特征性的二级结构, 除了由于管壁上少量结合的寡核苷酸混入变链 UA159 和乳杆菌适配子中, 出现在筛选产物中, 各个高比例特征性的筛选产物均未在其他筛选产物中发现, 所以这些特征性的茎环结构很可能就是适配子与靶物质结合的结构学基础, 进一步说明以口腔致龋菌作为靶物质进行 SELEX 筛选的可行性。筛选得到高亲和力和高特异性的适配子, 在龋病的易感性检测方面有广阔的应用前景。

参考文献(References)

- [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] 李卫滨, 兰小鹏. 适配技术的特征与临床应用 [J]. 实用医学杂志, 2006, 22(14): 1704-1706
Li Wei-bin, Lan Xiao-peng. The Characteristics and Clinical Applications of Aptamer [J]. The Journal of Practical Medicine, 2006, 22(14): 1704-1706
- [3] Jayasena S D. Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics[J]. Clinical Chemistry, 1999, 45(9): 1628-1650
- [4] Y Wang. SELEX and its applications in medicine[J]. Basic & Clinical Medicine, 2007, 07: 834-839
- [5] 甄蓓, 宋亚军, 郭兆彪, 等. 体外筛选炭疽芽孢适配子[J]. 生物化学与生物物理学报, 2002, 34(5): 635-642
Zhen Bei, Song Ya-jun, Guo Zhao-biao, et al. In Vitro Selection of DNA Aptamer against Bacillus Anthracis[J]. Acta Biochemica et Biophysica Sinica, 2002, 34(5): 635-642
- [6] Fan Chen, Jing Zhou, Fengling Luo, et al. Aptamer from whole-bacterium SELEX as new therapeutic reagent against virulent Mycobacterium tuberculosis [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007, 357: 743-774
- [7] 樊明文, 边专. 防龋疫苗主动免疫的现状与未来[J]. 中华口腔医学杂志, 2002, 37(6): 401-403
Fan Ming-wen, Bian Zhuan. The Progress of Active Immunization[J]. Chinese Journal of Stomatology, 2002, 37(6): 401-403
- [8] Tombelli, S., M. Minunni, and M. Mascini. Analytical applications of aptamers[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2005, 20(12): 2424-2434
- [9] Santulli Marotto S, Nair SIC, Rusconi C, et al. Multivalent RNA aptamers that inhibit CTLA24 and enhance tumor immunity [J]. Cancer Real, 2003, 03: 7483-7489
- [10] Daniels DA, Chen H, Hicke BJ, et al. A tenascin-C aptamer identified by tumor cell SELEX: systematic evolution of ligands by exponential enrichment[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(26): 15416-15421
- [11] H Zhang, Z Wang, X F Li, et al. Ultrasensitive detection of proteins by amplification of affinity aptamers[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2006, 45: 1576-1580
- [12] Loesche, W.J. Role of Streptococcus mutans in human dental decay [J]. Microbiology and molecular biology reviews, 1986, 50(4): 353
- [13] Santulli-Marotto, S. Multivalent RNA aptamers that inhibit CTLA-4 and enhance tumor immunity[J]. Cancer research, 2003, 63(21): 7483
- [14] Zhang, H. Ultrasensitive detection of proteins by amplification of affinity aptamers [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2006, 45(10): 1576-1580
- [15] Daniels, D.A. A tenascin-C aptamer identified by tumor cell SELEX: systematic evolution of ligands by exponential enrichment [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003, 100(26): 15416
- [16] Chen, F. Aptamer from whole-bacterium SELEX as new therapeutic reagent against virulent Mycobacterium tuberculosis [J]. Biochemical and biophysical research communications, 2007, 357(3): 743-748
- [17] 詹林盛. 随机单链 DNA 文库 SELEX 筛选寡核苷酸适配子方法的建立[J]. 生物化学与生物物理进展, 2003, 30(1): 151-155
Zhan Lin-sheng. A Procedure for SELEX Screening Aptamers From ssDNA Random Library[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2003, 30(1): 151-155
- [18] Michalek, S.M., J. Katz, and N.K. Children. A vaccine against dental caries: an overview[J]. Biodrugs, 2001, 15(8): 501-508
- [19] Shivakumar, K., S. Vidya, and G. Chandu. Dental caries vaccine[J]. Indian Journal of Dental Research, 2009, 20(1): 99
- [20] 樊明文, 边专. 防龋疫苗主动免疫的现状与未来[J]. 中华口腔医学杂志, 2002, 37(6): 401-403
Fan Ming-wen, Bian Zhuan. Present-day and future researches of active immunization with anti-caries vaccines [J]. Chinese Journal of Stomatology, 2002, 37(6): 401-403
- [21] 王岩. SELEX 技术及其在医学中的应用 [M]. 基础医学与临床, 2007, 27(7): 834-840
Wang Yan. SELEX and its applications in medicine [M]. Basic & Clinical Medicine, 2007, 27(7): 834-840
- [22] 府伟灵, 姚春艳. SELEX 技术在微生物检测中的应用[J]. 中华医院感染学杂志, 2005, 15(4): 361-362
Fu Wei-ling, Yao Chun-yan. SELEX Applied in the Microorganism Examination [J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2005, 15(4): 361-362
- [23] Mehedi Masud, M. Sialyllactose-binding modified DNA aptamer bearing additional functionality by SELEX[M]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2004, 12(5): 1114-1120