

· 论 著 ·

穿孔素适配体的筛选及电化学传感器的制备

孟凡飞, 刘畅, 蒋栋能, 张立群, 蒲晓允[△]

(中国人民解放军陆军军医大学新桥医院检验科, 重庆 400037)

摘要:目的 研发能特异性结合穿孔素的 DNA 适配体并构建适配体电化学传感器, 为发展穿孔素的新型检测技术提供基础。方法 体外合成全长为 81 个碱基并含有 35 个随机寡核苷酸的单链 DNA 文库, 库容量大约为 1×10^{10} , 以穿孔素蛋白为靶标, 利用指数富集配体系统进化技术(SELEX), 从单链 DNA 文库中筛选能够结合穿孔素蛋白的 DNA 适配体; 采用 M-fold 程序(version 3.2)预测二级结构; 设计并构建适配体电化学传感器, 进行穿孔素电化学特异性检测, 绘制标准曲线。结果 经多轮筛选, 获得 6 条穿孔素蛋白的 DNA 适配体, 分别为序列 SEQ1~SEQ6, 适配体 SEQ6 能够特异性结合穿孔素, 并可通过电化学方法用于检测穿孔素, 而与其与牛血清清蛋白、 γ -干扰素、肿瘤坏死因子 α 结合较弱。该电化学传感器检测穿孔素的线性水平范围为 1~20 nmol, 检出限为 0.7 nmol。结论 成功利用 SELEX 筛选获得特异结合穿孔素的 DNA 适配体, 其在研发针对穿孔素的新型检测技术方面具有应用潜能。

关键词:穿孔素; 适配体; 指数富集配体系统进化技术

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2017.22.023 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2017)22-3340-03

Screening of perforin aptamers and preparation of electrochemical aptasensor

MENG Fanfei, LIU Chang, JIANG Dongneng, ZHANG Liqun, PU Xiaoyun[△]

(Department of Clinical Laboratory, Xinqiao Hospital of PLA Army Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To research and develop DNA aptamers specifically combining with perforin and to construct an aptamers electrochemical aptasensor to provide a basis for developing perforin new-type detection technique. **Methods** The total length of 81 basic groups and single stranded DND library containing 35 random oligonucleotides were synthesized in vitro. The DNA library capacity was approximately 1×10^{10} . The DNA aptamers capable binding with perforin were screened by using the systematic evolution of ligands by exponential enrichment(SELEX) technique from single stranded DNA library with perforin protein as target. The secondary structures of aptamers were predicted by MFold program(version 3.2). The electrochemical aptasensor was design and constructed for conducting the perforin electrochemical specificity detection and drawing the standard curve. **Results** Six perforin protein DNA aptamers were obtained by multiple screening, which were sequences SEQ1—SEQ6 respectively. The aptamer SEQ6 could specifically bind with perforin and could be used to detect perforin by electrochemical method, while its binding with BSA, TNF- α and IFN- γ were all weaker. The aptasensor exhibited a linear range of 1—20 nmol for detecting perforin with a detection limit of 0.7 nmol. **Conclusion** The DNA aptamers specifically combining with perforin is successfully obtained by using the SELEX technique, which may have application potentials in the aspects of researching and developing new type detection technique aiming at perforin.

Key words: perforin; aptamers; SELEX

穿孔素是机体内具有细胞毒作用的效应分子, 主要由细胞毒性 T 细胞和自然杀伤细胞(NK 细胞)细胞质颗粒释放^[1], 具有抗病毒、抗肿瘤等活性, 在免疫监视中起重要作用。适配体是利用指数富集配体系统进化技术(SELEX)从含有大量序列的随机文库中筛选出能与靶物质高特异性、高亲和力结合的配体^[2]。与抗体比较, 适配体具有易合成储存、易修饰、免疫原性低、价格低廉及低毒性等特点。目前, 适配体作为新型医疗工具被广泛应用于研究、诊断和治疗^[3]。传统的穿孔素检测方法通常为酶联免疫吸附试验(ELISA), 此方法成本相对较高。利用 DNA 适配体替代抗体检测穿孔素将更为经济、高效。至今为止, 国内外尚无穿孔素适配体的相关报道, 本研究通过 SELEX 筛选获得针对穿孔素的适配体, 并通过电化学方法在体外分析其对穿孔素的结合性质。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 单链 DNA(ssDNA)文库(南京全式金公司), 由 81 个寡核苷酸构成, 两端为 18 个碱基的固定序列, 中间为 35 个碱基的随机序列, 库容量约为 1×10^{10} , 包括 5'-CCC CTG

CAG GTG ATT TTG CTC AAG T-(N35)-AGT ATC GCT AAT CAG GCG GAT-3'、引物 I P81-SP(5'-CCC CTG CAG GTG ATT TTG CTC AAG T-3')、引物 II P81-AP(5'-Biotin-ATC CGC CTG ATT AGC GAT ACT-3')。其他材料包括 Dynal 公司提供的 Dynabeads M-280 Streptavidin(DM-S), Invitrogen 公司提供的酵母 tRNA, Takara 公司提供的聚合酶链反应(PCR)试剂, 欧孚生物科技有限公司提供的 PCR 纯化试剂盒, Amresco 公司提供的牛血清清蛋白(BSA), 艾博抗(上海)贸易有限公司提供的重组人穿孔素蛋白、干扰素- γ 、肿瘤坏死因子- α , sigma 公司提供的二甲基甲酰胺(DMF)、硫酸铵、氢氧化钠等。

1.2 方法

1.2.1 羧基磁珠包被蛋白 取 1 mL DMF 溶解水平为 2×10^9 /mL 的 DM-S 磁珠溶液于离心管(EP 管), 0.1 mol/L 选择缓冲液(50 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷、100 mmol/L 氯化钠, 1 mmol/L 氯化镁, 5 mmol/L 氯化钾, pH 7.4)洗涤磁珠, 600 μ L 结合缓冲液(10 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷、1 mmol/L 乙二胺

四乙酸、2.0 mmol/L 氯化钠, pH 7.4) 重悬, 加入 600 μ L 水平为 1 mg/mL 穿孔素溶液, 混匀; 加入 600 μ L 水平为 3 mol/L 的硫酸铵溶液, 混匀, 37 $^{\circ}$ C 震荡孵育 20 h, 放磁力架 5 min, 吸出上清液, 收集到全部磁珠, 封闭缓冲液[1% BSA-磷酸缓冲盐溶液(PBS), pH 7.4]洗包被磁珠 4 次, 1.8 mL 封闭缓冲液重悬磁珠 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.2 ssDNA 文库筛选 取 2 000 pmol ssDNA 文库, 用 1 mL 选择缓冲液稀释, 经 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 冰浴 15 min。先将 ssDNA 文库加入 BSA(25 mg/L) 封闭的 EP 管中进行负筛, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 去除与管壁结合的 ssDNA, 将负筛后的 ssDNA 文库与包被穿孔素的磁珠混合, 同时加入酵母 tRNA 竞争结合, 37 $^{\circ}$ C 反应 1 h, 置磁力架, 弃上清液, 用洗涤选择缓冲液(0.2% BSA, 选择缓冲液)洗去未结合的 ssDNA, 200 μ L 去离子水重悬穿孔素包被磁珠, 100 $^{\circ}$ C 加热 5 min, 置磁力架, 分离上清液保存。

1.2.3 PCR 扩增 以筛选得到的上清液为模板, 优化 PCR 反应条件, 引物 P81-SP 和 P81-AP 扩增双链 DNA(94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 50 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 30 个循环)。

1.2.4 PCR 产物纯化及分离 ssDNA 严格按产品操作说明, 利用核酸纯化柱进行 PCR 产物纯化, 并在碱性条件下分离得到单链 ssDNA, 作为下一轮筛选的文库, 重复以上步骤。

1.2.5 克隆测序及适配体二级结构分析 将第 12 轮筛选产物克隆至 pMD18-T 载体中并转化至 DH5 α 感受态菌, 经蓝白斑筛选, 随机挑取 6 个克隆进行测序, 序列测定由上海生工生物技术公司进行。按着 Zuker 的最小自由能原则, 通过 M-fold 程序(version 3.2)对适配体进行二级结构的分析预测^[4]。

1.2.6 适配体 SEQ6 电化学传感器的构建 (1) 适配体 SEQ6 电化学应用检测原理。设计并合成 1 条 5' 端巯基化、中间序列为 G4 分体而两端序列与穿孔素适配体 SEQ6 互补的探针(设计探针), 另合成 1 条 5' 端加入核酸外切酶作用位点(AAA)的 SEQ6, 设计探针与 SEQ6 预先形成 DNA 双连体, DNA 双连体通过金硫键固定在已经预处理好的金电极上, 巯基乙醇封闭。穿孔素加入后, SEQ6 和其特异性结合, 形成具有特定空间构象的聚合物, 使 SEQ6 从 DNA 双连体解离出来, 从而使 DNA 双链体的结构破坏, 将设计探针中 G4 分体结构暴露出来。为监测每一步实验成功与否, 笔者将每一步固定结合后的电极进行电化学循环伏安法测试, 循环伏安法采用的反应体系为含有 0.1 mol/L 氯化钾和 5 mmol/L 六氰合铁络合离子/六氰合亚铁络合离子的混合溶液。扫描电压为(-0.2)~0.6 V, 扫描速率为 50 mV/s。存在氯化高铁血红素(Hemin)的情况下, G4 分体发生结构变化, 与 Hemin 特异度结合形成血红素过氧化物酶的模拟酶体, 后者可催化过氧化氢的氧化还原反应, 放大穿孔素蛋白检测的反应电流。此外, 在加入核酸外切酶, RecJf 后, RecJf 作用于穿孔素-SEQ6 复合物, 使 SEQ6 裂解为核苷酸片段, 释放出穿孔素, 穿孔素可重新结合 DNA 双连体中的 SEQ6, 从而起循环放大作用。

(2) DNA 双连体的合成。设计探针溶解在水平为 10 mmol/L PBS 缓冲液[150 mmol/L 氯化钠、10 mmol/L 三(2-羧乙基)膦, pH 7.4]中, 避光孵育 1 h, 避免二硫键的形成及非特异性结合。将水平为 10 mmol/L 的适配体 SEQ6 溶液(10 mmol/L PBS 缓冲液、150 mmol/L 氯化钠、50 mmol/L 氯化钾、16 mmol/L 氯化镁, pH 7.4)与水平为 10 mmol/L 的设计探针溶液等比例混合。用 10 mmol/L PBS 缓冲液(150 mmol/L 氯化钠、50 mol/L 氯化钾、6 mmol/L 氯化镁, pH 7.4)将混

合溶液稀释至每寡核苷酸 1 mmol/L。将稀释后的混合 DNA 溶液 90 $^{\circ}$ C 加热 5 min, 逐渐冷却至室温后 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h, DNA 双链体即可形成。

(3) 电化学传感器的准备。金电极用 0.05 μ m 的铝粉打磨光滑, 分别在水和乙醇的超声波中清洗, 然后将金电极于 0.5 mol/L 的硫酸中, 通过电化学循环伏安法扫描 10 次清洗, 扫描电压为(-0.3)~1.5 V, 速率为 100 mV/s, 然后在氮气中干燥。金电极在 DNA 双链体溶液中室温孵育 20 h, 使 DNA 双链体通过金硫键固定在金电极表面。采用 10 mmol/L 的 PBS 缓冲液(150 mmol/L 氯化钠, pH 7.4)清洗电极, 1 mmol/L 的甲基环己烷(MCH)溶液封闭金电极表面 1 h, PBS 缓冲液清洗电极, 不同水平穿孔素和 0.03 U/ μ L RecJf 混合溶液 20 μ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育电极 90 min, PBS 缓冲液清洗电极, 10 μ mol/L 的 Hemin 溶液电极表面孵育 1 h, 形成血红素过氧化物酶的模拟酶体结构。最后将电极于水平为 10 mmol/L 的 PBS 缓冲液(150 mmol/L 氯化钠, 50 mmol/L 氯化钾, pH 7.4)和 1 mmol/L 的过氧化氢混合溶液中进行循环伏安法检测, 扫描电压为(-0.8)~0 V, 速率为 20 mV/s, 选择-0.8 V 处的电流反应作为解析信号。

2 结 果

2.1 适配体二级结构的分析 将第 12 轮筛选产物进行克隆测序, 得到 6 条含 35 个寡核苷酸碱基适配体的序列, 序列分别为 SQE1(GTC GGG CAG GGT TCG GCG TAT CGT GTC GGG TCA)、SQE2(GTG TGA TCG CTG GTG GAT TCC TGG CCG CGT ACA AC)、SQE3(CTG GTG CCC GCC CGA TCC TCC ATT ATT TGC CCC AG)、SQE4(ACA AGT ATA GAG GTC CTG GCC ACC CTT GCG CTC C)、SQE5(GGC TTC CGC TGT CAT GCG GCT TCG CAC ACT AAG TC)、SQE6(GTC GCC GTA GTA TAG AGC AGG TGG GGT GCG GCA TT)。经过 Clustal X 软件和 Macaw 2.05 软件分析, 6 条适配体并无共同的保守序列。

2.2 适配体二级结构的分析 采用 M-fold 程序(version 3.2)对 6 条适配体进行二级结构的分析预测。结果显示, 6 条适配体结构各异; 除 SEQ2 外, 均有茎环结构, 且 SEQ3、SEQ4 和 SEQ5 具有双茎环; SEQ6 具有 21 个碱基的大茎环结构而其他适配体的茎环结构均小于 10 个碱基。

2.3 适配体传感器的电化学特性

2.3.1 金电极逐步修饰的表征监测 采用循环伏安法在 0.1 mol/L 氯化钾和 5 mmol/L 六氰合铁络合离子/六氰合亚铁络合离子的混合溶液中对金电极的修饰进行表征监测, 裸金电极电流峰值最大, 为 1.6×10^{-4} A; DNA 双链体固定于电极表面后, 阻碍了电子传递, 电流峰值降低, 为 1.0×10^{-4} A; 巯基乙醇封闭后, 电流峰值进一步降低, 为 0.9×10^{-4} A; 穿孔素和核酸外切酶加入体系后, 破坏了 DNA 双链体结构, 仅剩设计探针固定于电极表面, 电子转移阻力降低, 电流峰值增加, 为 1.25×10^{-4} A。

2.3.2 核酸外切酶 RecJf 的作用 采用循环伏安法验证反应体系中核酸外切酶 RecJf 的作用。取 3 支电极, 电极准备及检测均按照 1.2.6。在 MCH 封闭、缓冲液清洗后, 3 支电极加入不同的反应物, 电极 a 加入 10 mmol/L 的 PBS 缓冲液(150 mmol/L 氯化钠, pH 7.4)20 μ L 作为空白对照, 电极 b 加入 10 nmol/L 穿孔素 10 μ L 和 10 mmol/L 的 PBS 缓冲液(150 mmol/L 氯化钠, pH 7.4)10 μ L, 电极 c 加入 10 nmol/L 穿孔素 10 μ L 和 0.03 U/ μ L RecJf。结果显示, a 电极-0.8 V 的电流值为-0.75 μ A, b 电极-0.8 V 的电流值为-2.71 μ A, c 电极

-0.8 V 的电流值为 $-4.85 \mu\text{A}$ 。核酸外切酶 RecJf 使解析信号明显放大,提高了传感器的灵敏度。

2.3.3 孵育时间的优化 10 nmol/L 穿孔素和 0.03 U/ μL RecJf 加入电化学传感器后,孵育时间的优化见图 1。

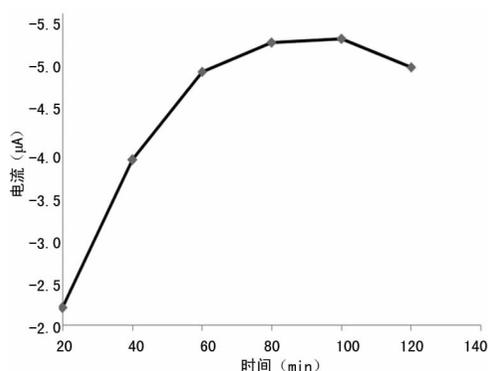


图 1 孵育时间的优化

2.3.4 不同水平穿孔素的循环伏安法反应监测及标准曲线

取 7 支电极 (a~g), 按照 1.2.6 进行电极准备及检测, 电极 a~g 加入穿孔素水平依次为 0、1、5、10、20、50、100 nmol/L, a 电极 -0.8 V 的电流值为 $-0.75 \mu\text{A}$, b 电极 -0.8 V 的电流值为 $-1.21 \mu\text{A}$, c 电极 -0.8 V 的电流值为 $-2.85 \mu\text{A}$, d 电极 -0.8 V 的电流值为 $-4.85 \mu\text{A}$, e 电极 -0.8 V 的电流值为 $-6.72 \mu\text{A}$, f 电极 -0.8 V 的电流值为 $-8.30 \mu\text{A}$, g 电极 -0.8 V 的电流值为 $-11.23 \mu\text{A}$ 。穿孔素的水平在 1~20 nmol/L 范围时与电流变化呈线性, 线性方程为 $i = -0.311c - 1.054$, $R^2 = 0.973$ 。

2.3.5 适配体传感器特异性检测 采用 BSA、 γ -干扰素、肿瘤坏死因子 α 及 3 种物质与穿孔素组成的混合组分对适配体传感器特异性进行检测, 各组分水平均为 10 nmol/L, 其中混合组分各组分水平均为 10 nmol/L。各物质分别替代穿孔素进行电化学检测, 操作方法同电化学传感器的准备 1.2.6。结果显示, 加入 BSA 的电极 -0.8 V 解析电流值为 $-0.85 \mu\text{A}$, 加入 γ -干扰素的电极 -0.8 V 解析电流值为 $-1.06 \mu\text{A}$, 加入肿瘤坏死因子 α 的电极 -0.8 V 解析电流值为 $-0.94 \mu\text{A}$, 而加入混合组分的电极 -0.8 V 解析电流值为 $-4.46 \mu\text{A}$ 。由结果可知, 该传感器对穿孔素具有较高的选择性, 特异性高, 抗干扰能力强。

3 讨论

穿孔素是人体内一类由 prfi 基因编码的蛋白质, 相对分子质量为 67×10^3 ^[5], 穿孔素和颗粒酶 B 具有杀伤靶细胞的细胞毒性作用。穿孔素产生于多种组织器官, 与机体的攻击防御机制有关^[6]。其在靶细胞膜上聚合形成活性孔道, 在钙离子作用下形成渗透压反差, 导致靶细胞胀裂坏死^[7], 临床上主要发挥免疫监视功能, 抵御内外环境中致病物质的危害。为筛选到确实能结合穿孔素的 DNA 适配体, 本研究选择的靶标为重组人穿孔素蛋白, 蛋白靶标纯度较高, 更容易筛选到与靶标特异性结合的 DNA 适配体。适配体是通过 SELEX 合成的 ssDNA 或 RNA 的寡核苷酸^[8], 能特异性识别并结合小分子、蛋白质和细胞等多种靶物质^[9-10]。由于适配体容易被合成和修饰, 其作为小分子识别的配体作用广泛^[11]。某些与神经退行性病变相关的蛋白质适配体, 已应用于诊断和治疗中^[12]。本研究利用 SELEX 筛选出 6 条寡核苷酸序列, 成功构建了核酸外切酶辅助放大电化学传感器信号用于检测穿孔素的方案。由于各种原因, 本研究未构建其他 5 条适配体的传感器, 而其他 5 条

适配体能否通过电化学传感器应用于检测穿孔素, 仍需进一步研究。已筛选出的适配体 SEQ6 在电化学传感器的构建中, 体现出与穿孔素蛋白结合的高亲和力和高特异度特征, 核酸外切酶催化靶物质循环提高了适配体传感器的灵敏度。该传感器应用于检测穿孔素具有灵敏度高、稳定性好、低检出限和可再现性, 在临床诊断检测中有较好的应用前景。

参考文献

- [1] Law RH, Lukoyanova N, Voskoboinik I. The structural basis for membrane binding and pore formation by lymphocyte perforin[J]. Nature, 2010, 18(468): 447-451.
- [2] 兰小鹏. 适配体技术及其在医学检验研究中的作用[J]. 临床检验杂志, 2012, 30(10): 765-768.
- [3] Mittal R, Araujo I, Czanner G. Perforin expression in eyelid sebaceous carcinomas: a useful and specific immunomarker for the differential diagnosis of eyelid carcinomas[J]. Acta Ophthalmol, 2016, 94(5): 325-330.
- [4] Du JC, Hong JM, Xu C, et al. Screening and identification of ssDNA aptamer for human GP73[J]. Biomed Res Inter, 2015, 2015(9): 1-8.
- [5] Kondos SC, Hatfaludi T, Voskoboinik I, et al. The structure and function of mammalian membrane-attack complex/perforin-like proteins[J]. Tissue Antigens, 2010, 5(76): 341-351.
- [6] Lukoyanova N, Hoogenboom BW, Saibil HR. The membrane attack complex, perforin and cholesterol-dependent cytolysin superfamily of pore-forming proteins[J]. J Cell Sci, 2016, 11(129): 2125-2133.
- [7] Voskoboinik I, Whisstock JC, Trapani JA, et al. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology[J]. Nat Rev Immunol, 2015, 6(15): 388-400.
- [8] Bao T, Wen W, Zhang XH, et al. An exonuclease-assisted amplification? Cation electrochemical aptasensor of thrombin coupling signal on/off strategy [J]. Anal Chim Acta, 2015, 10(860): 70-76.
- [9] Wen W, Bao T, Yang, J, et al. A novel amperometric adenosine triphosphate biosensor by immobilizing graphene/dual-labeled aptamers complex onto poly(o-phenylenediamine) modified electrode [J]. Sensor Actuat B Chem, 2014, 5(191): 695-702.
- [10] Li YJ, Ma MJ, Zhu JJ, et al. Dual-signal amplification? cation strategy for ultrasensitive photoelectrochemical immunosensing of α -fetoprotein [J]. Anal Chem, 2012, 84(6): 10492-10499.
- [11] Wang CY, Wu CY, Hung TC, et al. Sequence-constructive SELEX: a new strategy for screening DNA aptamer binding to Globo H [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 452(3): 484-489.
- [12] Tsukakoshi K, Harada R, Sode K, et al. Screening of DNA aptamer which binds to alpha-synuclein [J]. Biotechnol Lett, 2010, 5(32): 643-648.