

基于聚合酶反应和发夹型核酸适体的 蛋白质荧光检测新方法

郭秋平, 羊小海, 王柯敏, 孟祥贤, 李 军, 谭蔚泓

(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, 生命科学与技术研究院,
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)

摘要 设计合成了一种发夹型核酸适体(Aptamer), 结合聚合酶反应建立了蛋白质荧光分析新方法. 该核酸适体同时作为蛋白质配体和聚合反应模板, 与靶蛋白特异结合后, 其构象发生了变化, 启动聚合反应, 从而在未直接标记核酸适体的情况下, 通过监测聚合反应进程来检测蛋白质的浓度. 采用该方法检测凝血酶的线性范围为0.5~8 nmol/L, 检测下限为0.5 nmol/L, 为蛋白质检测提供了一种简便快速的非直接标记的荧光分析方法, 有望在蛋白质组学的研究中得到广泛的应用.

关键词 核酸适体; 蛋白质检测; 聚合酶反应; 凝血酶

中图分类号 O657; O629.73

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2008)01-0037-04

核酸适体(Aptamer)是一段寡核苷酸, 通过体外人工进化程序(Systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)筛选得到. 它能高效、特异地结合各种配体, 具有易合成、易储存和易修饰等优点, 在医学诊断治疗、药物分子设计以及分析检测等方面具有广泛的应用前景^[1]. 目前基于核酸适体的蛋白质检测方法主要有比色法^[2]、混合夹心法^[3]、电化学法^[4,5]和荧光检测法^[6~9]等, 其中利用信号核酸适体(Signaling Aptamer)的荧光检测法因其无需分离洗脱样品, 操作简便快速, 从而得到了广泛的研究^[7~10].

目前利用信号核酸适体均相检测蛋白质的方法通常是直接在核酸适体上标记荧光基团, 利用它与靶分子结合时荧光信号的变化实现对靶分子的检测^[5~7]. 但对核酸适体的标记有可能影响它与配体的结合, 且标记位点往往难以确定. 近年来发展了一些不需直接标记核酸适体的蛋白质检测方法. 如利用DNA光开关化合物 $[Ru(phen)^2dppz]_2 + (RU)$ 与核酸适体复合物作为信号核酸适体的方法对蛋白质进行检测^[9~11], 然而这种方法对核酸适体的构象要求较高; 采用接近循环延伸核酸适体(Proximity extension of circular DNA aptamers)的方法检测具有二聚体靶位点的蛋白^[12]; 本实验室发展的基于空间位阻效应的方法虽无需直接标记核酸适体, 但须以分子信标为报告分子进行信号的转换^[13].

本文建立了一种基于聚合酶反应的发夹型核酸适体均相检测蛋白质的方法. 将发夹核酸适体设计成蛋白质配体和聚合反应模板, 当蛋白质与核酸适体特异性结合后, 发夹构象转变为线性, 成为聚合反应的模板而启动聚合反应, 聚合反应的进程被荧光染料实时转换为荧光信号, 实现了在未直接标记核酸适体的情况下检测蛋白质. 与已有的研究方法^[6~12]相比, 本方法无须直接标记, 对核酸适体的空间结构无特殊要求, 且只需要一个核酸适体靶位点进行蛋白质检测. 对人凝血酶的检测线性范围为0.5~8 nmol/L, 检测下限为0.5 nmol/L.

收稿日期: 2007-06-05.

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目(批准号: 2002CB513110)、国家科技攻关计划项目(批准号: 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)和湖南省科技计划重点项目(批准号: 0399Y1006)资助.

联系人简介: 王柯敏, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 从事纳米及分子水平上的生物分析化学及纳米生物技术研究.

E-mail: kmwang@hnu.cn

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

发夹型核酸适体: 5'-GGTTGGTGTGGTTGGACTTAG(T)₃₅CTAAGTCCAAGATTTT-3', 其中黑斜体部分为凝血酶适体部分^[14], 下划线部分为茎部. 引物 1: 5'-CAGGTT-3'; 引物 2: 5'-TCAGGTT-3'; 引物 3: 5'-TTCAGGTT-3'; 引物 4: 5'-ATTCAGGTT-3'. 以上序列均由大连宝生物公司合成. 人凝血酶和人血清白蛋白(HSA)购自Sigma公司; 人IgG和牛血清白蛋白(BSA)购自北京鼎国生物技术有限责任公司; Klenow Fragment(exo⁻)DNA聚合酶(KF⁻)和dNTPs购自大连宝生物公司; SYBR Green I购自上海开放科技有限公司; 其它试剂均为国产分析纯. 实验用水均为过滤除菌的高纯水, 实验器皿均经过高温灭菌.

日本 Hitachi FL-2500 荧光分光光度计; 美国 Thermo Neslab 恒温水浴装置.

1.2 实验方法

1.2.1 荧光强度测定 选用双链 DNA 特异结合染料 SYBR Green I 示踪聚合反应的进程. $\lambda_{\text{ex}} = 497$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 520$ nm, 激发与发射狭缝均为 2.5 nm, 所有样品均在 37 °C 下检测.

1.2.2 聚合反应的引物筛选 配制底液: 20 mmol/L Tris-HCl (pH = 7.4), 2 mmol/L MgCl₂, 50 nmol/L 发夹型核酸适体, 1 × SYBR Green I, 50 μmol/L dNTPs, 混合. 再分别加入 50 nmol/L 各引物, 在荧光分光光度计上待溶液荧光稳定后, 加入 10 nmol/L 凝血酶孵育 10 min, 再加入 2.5 U 的 KF⁻, 监测荧光强度的变化.

1.2.3 凝血酶的检测 在底液中加入 50 nmol/L 引物 2, 在荧光分光光度计上待溶液荧光稳定后, 分别加入 0.5 ~ 10 nmol/L 凝血酶孵育 10 min, 再加入 2.5 U 的 KF⁻, 监测荧光强度的变化.

1.2.4 特异性检测 在荧光分光光度计上待底液荧光值稳定后, 分别加入 10 nmol/L 的凝血酶、BSA、人 IgG 和 HSA, 孵育 10 min, 再加入 2.5 U 的 KF⁻, 反应 1000 s 后检测溶液的荧光强度.

2 结果与讨论

2.1 实验原理

实验原理参见图 1. 发夹型核酸适体探针由 A, B, C, D 等 4 部分组成. A 为人凝血酶 G-15D 序列^[14], 用于结合靶分子; B 为 10 个互补核酸序列形成的茎部(其中 4 个核酸序列为 G-15D 的一部分), 用于形成稳定的发夹结构; C 为由 dT 形成的环状部分; D 为防止核酸适体的自身聚合反应而设计的序列.

被检测的凝血酶是直径约为 2 nm 的球形蛋白^[15], 当它存在时, G-15D 与凝血酶特异结合, 探针的茎部被打开形成线性核酸序列; 在聚合酶的作用下, 引物以此线性序列为模板进行聚合反应, 当聚合到与凝血酶结合的核酸适体部分时, 聚合酶具有的碱基替换能力将凝血酶释放出来, 从而又可以与另一个发夹型探针的适体部分结合引发新的聚合反应. 聚合产物与 SYBR Green I 结合发出荧光, 间接指示凝血酶的存在. 作为被检测对象的凝血酶充当了整个反应的诱发剂, 并可以在反应中循环发生作用.

2.2 聚合反应的引物筛选

确保聚合反应在蛋白质与发夹型核酸适体结合后才能启动是本方法检测蛋白质的关键. 考虑到聚合反应是由引物与模板退火而进行的, 设计合成了序列长度分别为 6-nt, 7-nt, 8-nt 和 9-nt 的引物(即引物 1, 2, 3 和 4), 结果如图 2 所示. 当凝血酶存在时, 引物 2, 3 和 4 的体系均有明显的荧光信号增

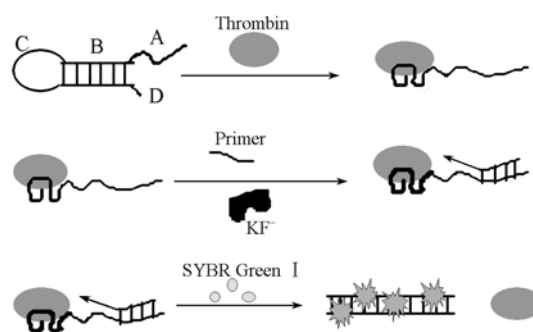


Fig. 1 Mechanism of protein detection using hairpin aptamers based on polymerase reaction

A. Aptamer sequence; B. stem sequence;
C. loop sequence; D. tail sequence.

强,表明发生了聚合反应. 没有凝血酶存在时,只有引物 2 的体系没有明显的荧光信号增强,说明聚合反应是因为核酸适体与凝血酶结合后转变为线型结构而被启动的;引物 3 和 4 的体系有明显的荧光信号增强,表明引物过长时能直接与发夹型核酸适体退火而引发聚合反应,导致假阳性反应;无论凝血酶是否存在,引物 1 的体系都没有荧光信号的变化,这可能是由于引物太短不能引发聚合反应的发生之故. 因此筛选引物 2 用于凝血酶的检测.

2.3 发夹型核酸适体对蛋白质的检测

考察发夹型核酸适体对凝血酶的检测,结果如图 3 所示. 曲线 *a* 为有核酸适体、引物和凝血酶的体系;曲线 *b* 为仅有核酸适体和引物的体系;曲线 *c* 为仅有核酸适体和凝血酶的体系. 在时间 *t* 处加入 KF^- 后,曲线 *a* 的荧光信号迅速增强,表明发生了聚合反应,说明加入凝血酶后,发夹型核酸适体与之结合,结构由发夹型转变为线型,在引物作用下启动了聚合反应. 曲线 *b* 在加入 KF^- 后的一段时间内,荧光信号没有发生明显变化,说明没有聚合反应的发生,表明没有凝血酶存在时聚合反应不能被启动. 但是随着时间的延长,曲线 *b* 有微弱的荧光信号增强,这种现象与文献[12]的结果相似. 其原因可能是引物与核酸适体的发夹型结构存在轻微的杂交退火现象,从而引发弱的聚合反应. 曲线 *c* 没有荧光信号的增强,表明没有发生聚合反应. 说明聚合反应是由引物与核酸适体退火而引起的,而不是核酸适体自身引起的,表明基于聚合反应的发夹型核酸适体可以很好地实现对凝血酶的检测. 在反应中,凝血酶与核酸适体结合后使发夹型结构转变为线型结构,再启动聚合反应,所以聚合反应的初速度并不适合用来表示凝血酶的浓度. 参照 King 等^[12]的方法,凝血酶浓度用单位时间内荧光信号的增加量即荧光增强速率来表示.

图 3 插图表示凝血酶浓度与荧光增强速率的关系,实验结果表明,加入 KF^- 反应 1000 s 后,凝血酶浓度与荧光增强速率有较好的线性关系. 随着凝血酶浓度的升高,荧光信号的增强速率升高,反应速度加快. 在 0.5 ~ 8 nmol/L 范围内,凝血酶浓度与荧光增强速率有较好的线性关系($R^2 = 0.984$),检测下限为 0.5 nmol/L ($S/N = 3$),优于直接在核酸适体上标记荧光基团的检测方法^[8]. 然而比不直接标记核酸适体的方法^[12]的检测灵敏度要低一些,但此方法只涉及到靶分子的一个核酸适体识别位点,因此具有更好的通用性.

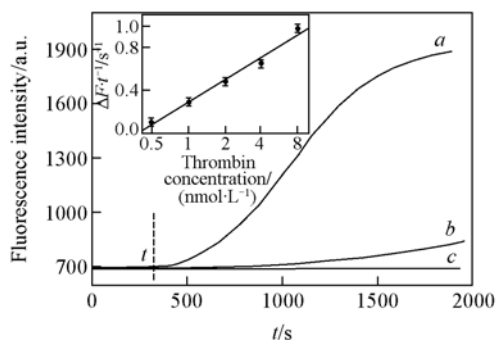


Fig. 3 Real-time fluorescence detection of mixture of thrombin and primers 1 (*a*), 2 (*b*) and 3 (*c*)

Inset: The linear relationship between fluorescence in creasing within 1000 s and thrombin concentration.

2.4 发夹核酸适体检测特异性

考察了不同体系(BSA、人 IgG 和 HSA), 反应 1000 s 时荧光信号的增长与时间的比值,结果示于图 4. 从图 4 可知,除加入凝血酶的体系外,含有其它 3 种蛋白质的体系没有明显的荧光信号增强,表明基于聚合反应的发夹型核酸适体对凝血酶的检测具有很高的特异性.

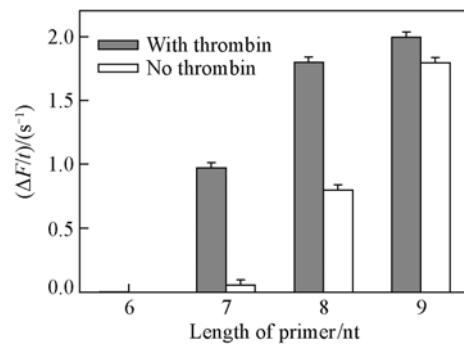


Fig. 2 Protein detection based on polymerase reaction with different length of primer

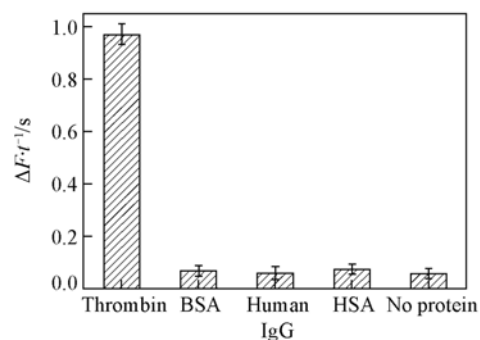


Fig. 4 Specificity of protein detection with hairpin aptamer based on polymerase for the reaction within 1000 s in thrombin, BSA, human IgG and HSA systems

综上所述,本文基于发夹型核酸适体和聚合酶反应,建立了一种蛋白质检测新方法,该方法无须直接标记核酸适体和蛋白质,只涉及到靶分子的一个核酸适体识别位点,通用性好,有望在蛋白质组学的检测研究中得到广泛应用。

参 考 文 献

- [1] Hermann T., Patel D. J. . Science[J], 2000, **287**: 820—825
- [2] Stojanovic M. N., Landry D. W. . J. Am. Chem. Soc. [J], 2002, **124**: 9678—9679
- [3] ZHEN Bei(甄蓓), ZHANG Min-Li(张敏丽), SONG Ya-Jun(宋亚军), *et al.* . Letters in Biotechnology(生物技术通讯)[J], 2002, **13**(2):123—125
- [4] Xu D., Yu X., Liu Z., *et al.* . Anal. Chem. [J], 2005, **77**: 5107—5113
- [5] ZHENG Jing(郑静), LIN Li(林莉), CHENG Gui-Fang(程圭芳), *et al.* . Science in China, Series B(中国科学, B辑)[J], 2006, **36**: 485—492
- [6] Nobuko H., Andrew E., Martin S., *et al.* . Anal. Biochem. [J], 2001, **294**: 126—131
- [7] Li W., Wang K. M., Tan W. H., *et al.* . Analyst[J], 2007, **132**: 107—113
- [8] Razvan N., Li Y. . J. Am. Chem. Soc. [J], 2003, **125**: 4771—4778
- [9] Jiang Y. X., Fang X. H., Bai C. L., *et al.* . Anal. Chem. [J], 2004, **76**: 5230—5235
- [10] Wang J., Jiang Y. X., Zhou C. S., *et al.* . Anal. Chem. [J], 2005, **77**: 3542—3546
- [11] ZHOU Cui-Song(周翠松), JIANG Ya-Xin(江雅新), WANG Jun(汪俊), *et al.* . Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2006, **27**(5): 826—829
- [12] Di Giusto D. A., Wlassoff W. A., Gooding J. J., *et al.* . Nucleic Acids. Res. [J], 2005, **33**: e64
- [13] ZHONG Zhi-Hong(仲志鸿), YANG Xiao-Hai(羊小海), WANG Ke-Min(王柯敏), *et al.* . Life Science Research(生命科学研究)[J], 2006, **10**: 206—209
- [14] Bock L. C., Griffin L. C., Latham J., *et al.* . Nature[J], 1992, **355**: 564—566
- [15] Liu Y., Lin C., Yan H., *et al.* . Angenwandte Chemie International Edition[J], 2005, **44**: 4333—4338

Novel Fluorescent Method of Protein Detection Using Hairpin Nucleic Acid Aptamer Based on Polymerase Reaction

GUO Qiu-Ping, YANG Xiao-Hai, WANG Ke-Min*, MENG Xiang-Xian, LI Jun, TAN Wei-Hong
(State Key of Laboratory of Chemo/biosensing and Chemometrics, Biomedical Engineering Center,
Institute of Biological Science and Technology, College of Chemistry and Chemical Engineering,
Key Laboratory for Bio-Nanotechnology and Molecule Engineering of Hunan Province,
Hunan University, Changsha 410082, China)

Abstract Aptamers are a new class of oligonucleotides generated from *in vitro* selection with a high affinity and specificity to targets. In this paper, a novel fluorescent method of protein detection was developed *via* hairpin aptamer based on polymerase reaction. The hairpin aptamer was designed as protein ligand and template of the polymerase reaction. When the aptamer was bound to the target protein, it would change to a linear strand and induce the polymerase reaction. Then protein detection was carried out by monitoring the polymerase reaction without directly labeling with the aptamer, with a linear range of 0.5—8 nmol/L and detection limit of 0.5 nmol/L. This proposed method has a potential advantage to design other protein probe with linear aptamer with a complex structure and can be used as a simple and general tool for protein detection.

Keywords Aptamer; Protein detection; Polymerase reaction; Thrombin

(Ed.: H, J, Z)