

抑制肿瘤坏死因子- α 的 DNA 适配子的筛选与鉴定

郭克泰* * 严馨蕊 黄国锦 徐春晓 柴映爽 张智清*

(中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所基因室, 北京 100052)

摘要 应用 SELEX 技术筛选能与 TNF 结合的 DNA 适配子。化学合成随机寡聚 DNA 库, 以 TNF 为靶蛋白, 经过 12 轮 SELEX 筛选, 将所得产物克隆、测序。根据所测序列化学合成寡聚 DNA 适配子, 用生物素-亲和素-辣根过氧化物酶显色系统检测适配子与 TNF 的结合活性; 用鼠 L929 细胞检测适配子拮抗 TNF 活性。结果显示, 所筛选到的寡聚 DNA 能与 TNF- α 高亲和力结合, 并能在细胞培养中拮抗 TNF- α 的细胞毒活性。

关键词 SELEX, TNF- α , aptamer, 结合活性

中图分类号 Q756 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)06-0730-04

SELEX 是“配体通过指数富集达到系统进化”

(Systematic evolution of ligands by exponential enrichment) 的缩写, 是由 Tuerk 和 Gold 在 1990 年分别研究出的一种新型体外筛选技术^[1], 用于研究小分子核酸与靶物质相结合的部位、序列及空间构象。经 SELEX 筛选出的配体称为适配子(Aptamer)。目前, 该技术已被成功地用于筛选各种靶物质的结合序列, 包括小分子、肽、单体蛋白、核酸、病毒等等^[2]。用 SELEX 技术筛选出的与细胞因子及其受体特异结合的寡核苷酸具有很多优点, 如高特异性、高亲和力, 能很快进入靶组织, 具有快速的血浆清除率, 从肾脏排泄, 免疫原性低, 可以反复使用等, 是一种理想的抑制剂^[3]。

TNF- α 是一种多功能的细胞因子, 除能引起肿瘤细胞凋亡之外还具有多种生物学功能。同时 TNF- α 是一种重要的炎性因子, 与许多自身免疫性疾病相关, 如成人风湿性关节炎(RA)、儿童多发性风湿性关节炎(JRA)、脓毒血症、心肌炎、系统性红斑狼疮(SLE)及糖尿病等。拮抗 TNF- α 是治疗这些疾病的重要措施之一。目前已经研制出多种用于治疗这些疾病的 TNF 蛋白抑制剂, 如可溶性受体、单克隆抗体等^[4]。但国内外尚未见到 TNF 核酸抑制剂方面的研究报道。本文应用 SELEX 技术筛选出 TNF- α 的 DNA 适配子, 并对其生物学活性进行了

研究。

1 材料和方法

1.1 寡聚 DNA 库的构建与引物的合成

寡聚随机 DNA 库由大连 TaKaRa 公司合成, 两端为固定序列以便 PCR 扩增, 中间 40 个为随机序列的单链 DNA: 5'-GGG AGG ACG ATG TTA (N_{40}) AAG AAG ACT CGC AAG A -3', 其库容约为 10^{16} 。

PCR 引物参考 Primer Design 软件设计, 由大连 TaKaRa 公司合成。其序列如下:

引物 1: 5'-GGG AGG ACG ATG TTA-3'; 引物 2: 5'-T CTT GCG AGT CTT-3'。

1.2 SELEX 过程

取随机 DNA 库 $1\mu\text{L}$ 作 PCR 扩增(95 $^{\circ}\text{C}$ 45s, 45 $^{\circ}\text{C}$ 1min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1min, $\times 5$; 95 $^{\circ}\text{C}$ 45s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 1min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1min, $\times 20$; 95 $^{\circ}\text{C}$ 45s, 45 $^{\circ}\text{C}$ 1min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 8min, $\times 1$), 将产物回收。

取 $1\mu\text{L}$ 作不对称 PCR, 循环参数: 95 $^{\circ}\text{C}$ 3min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 15s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 15s $\times 15$, 72 $^{\circ}\text{C}$ 8min。引物 1 与引物 2 的浓度比分别为 1:1、10:1、50:1、100:1、500:1。不对称 PCR 的产物作琼脂糖凝胶电泳分析。根据预实验结果, 引物 1 与引物 2 的最佳浓度比为 50:1。

将产物回收, 加 Binding buffer ($2 \times 1\text{mol/L NaCl}$,

收稿日期 2003-06-20, 修回日期 2003-08-19。

基金项目: 国家高技术 863 计划基金资助(No. 2001AA215251)。

* 通讯作者。 Tel: 86-10-63519655; Fax: 86-10-63532053; E-mail: zhangzq@public3.bta.net.cn

* * 为安徽医科大学代培的硕士研究生。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

40mmol/L Tris-Cl, 2mmol/L $MgCl_2$) 200 μ L, 95 $^{\circ}C$ 5min, 冰浴 5min; 加入 1 μ L TNF(1 μ g/ μ L), 37 $^{\circ}C$ 1h; 过硝酸纤维素膜(0.45 μ m), 用 1 \times Binding buffer 5mL 冲洗; 然后将膜放入 EP 管, 加入 300 μ L eluting buffer(binding buffer 中加 EDTA 10mmol/L)和 200 μ L 7mol/L 尿素, 95 $^{\circ}C$ 5min; 用等体积的酚/氯仿抽提; 异丙醇沉淀, 70%乙醇洗沉淀, 最后溶于 30 μ L ddH₂O。

取上述洗脱的 DNA 10 μ L 作模板, 进行不对称 PCR 扩增, 产物回收后用于下一轮筛选。

1.3 克隆和测序

SELEX 筛选 12 轮后, 将筛选产物 PCR 扩增后连接到 pGEM-T vector (Promega)上, 转化大肠杆菌 DH5 α 。小量提取质粒, 经酶切鉴定正确后测定 DNA 序列。

1.4 DNA 序列分析

用 DNASY 2.5 软件分析所得序列最低二级结构能量值。

1.5 DNA 适配子的化学合成

根据测定的 TNF 特异的 DNA 适配子序列, 化学合成寡聚 DNA, 并将其 5' 端用生物素标记。

1.6 适配子与 TNF 结合活性的测定

1.6.1 酶联法: 用 100ng/孔 TNF 包被 96 孔酶标板, 1% BSA 封闭, 将 5' 标记生物素的寡聚 DNA 对倍稀释后加入各孔, 然后与辣根过氧化酶标记的链亲和素反应, OPD 显色。

1.6.2 Dot-blot 法: 将 5' 标记生物素的 DNA 适配子与 TNF 混合, 37 $^{\circ}C$ 水浴 1h。然后结合到硝酸纤维素膜。洗去未结合的核酸, 加辣根过氧化酶标记的链亲和素, DAB 显色。

1.7 适配子拮抗 TNF 活性的测定

小鼠 L929 细胞在 96 孔细胞培养板培养成单层。每孔加入含 1 μ g/mL 的丝裂霉素和 TNF 与连续稀释的 DNA 适配子的混合物。37 $^{\circ}C$ CO₂ 孵箱培养, 24 h 后开始观察细胞的杀伤情况, 待 TNF 对照孔细胞破坏达 + + + + 时记录结果, MTT 染色, 570nm 测 OD 值。

2 结果

2.1 SELEX 筛选产物的克隆和测序

按照材料与方法中的 SELEX 过程进行了 12 轮筛选, 使能与 TNF- α 结合的序列富集。然后将筛选出的 DNA 适配子克隆到 pGEM-T 载体, 提取质粒作内切酶谱鉴定, 其中一个克隆的鉴定结果见图 1。

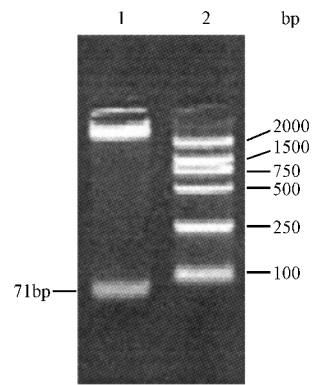


图 1 内切酶谱鉴定 TNF 适配子克隆

Fig. 1 Restriction map of TNF aptamer clone

选 15 个克隆子测定其 DNA 序列, 结果如下:

- 1 5'CGATCTACGTGGTACTCATACGTGTCGATGTGCCITTC 3'
- 2 5'TGCACACCCGGTGATTTAGCCTGGCGTGCTTCACCTTCACC 3'
- 3 5'ATGGCGCAGTCGGCGACAATCACTTTGGTTACTATTGGCC 3'
- 4 5'GCACACTAAGTTTCTACACGCTCTCGTCGCCCTCTTTGTGC 3'
- 5 5'CGCGGTAATCTTCTTCTGTGTACCCTCTCTTCATGTCCG 3'
- 6 5'TGGGGATGCGGTCTGCCCTAACACAGGGCTTCACTTACCC 3'
- 7 5'TGGCGAGTATACTCACAAACCTCTCACAGGAACCTGGGGC 3'
- 8 5'TCCCATCAAAACCAATTTTCGGGTCTGCTCTCTCTCGCC 3'
- 9 5'CCAGTCTACACTTACCCCTGTGACAGCTATACTCATCAC 3'
- 10 5'CCGACGTACTCGGTAGACAAGTCCCCTGAAGTGTGACGCC 3'
- 11 5'GGCGGGTCTCTAAAGTGTGTATATCATCTGCTTGTGGCC 3'
- 12 5'CACTGTAATCAGAGGCTTTTTTACTCTCGCTGCATTCCGG 3'
- 13 5'CCCCGCCATGTGCTTAGTGCAATAACGTTCTCACCCGCC 3'
- 14 5'CACTGTTGACGTTTCGGATTAAGGAGTCCGCTCCGACCC 3'
- 15 5'CGCTGGAGGACGATGTTAATTAGCCGCAACTACATTGCA 3'

2.2 TNF 适配子的二级结构分析

用 DNASY 2.5 软件分析 15 个适配子序列的最低二级结构能量, 模拟其二级结构, 发现至少可能存在 4 种二级结构, 主要特征都包括发夹结构或茎环结构。这些结构与其结合功能的关系尚待进一步研究。

2.3 适配子与 TNF 亲和力的测定

Dot-blot 测定结果表明, 我们筛选的 DNA 适配子可与 TNF 结合, 并随浓度变化而改变。当 TNF 为 5 μ g, ssDNA 量不超过 4 μ g 时, 信号随浓度增加逐渐增强; ssDNA 量大于 4 μ g 后, 信号不再增强; 当 ssDNA 量少于 10⁻⁶ μ g 时, 无阳性信号, 见图 2。

将 15 种生物素标记的 DNA 适配子各取同样量进行酶联法检测, 结果表明不同的适配子序列与 TNF 的亲合力不同, 见图 3。其中 10 号最高, 2 号最低。

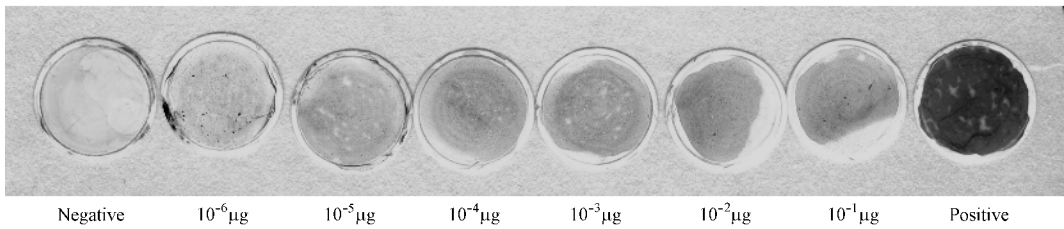


图 2 Dot-blot 检测适配子对 TNF 的亲合性

Fig.2 Binding assay of TNF aptamers tested with Dot-blot

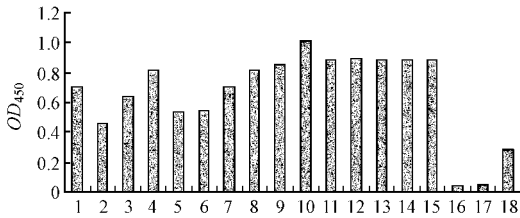


图 3 酶联法检测适配子与 TNF 的亲合力

Fig.3 Binding assay of TNF aptamers tested on ELISA plate

1 ~ 15. Selected TNF aptamer ; 16. Blank ; 17. Negative control ;
18. Random DNA library

2.4 DNA 适配子对 TNF 活性的拮抗作用

用鼠 L929 细胞测定 DNA 适配子拮抗 TNF 的活性。图 4 为 MTT 法检测 DNA 适配子中和 TNF 活性的结果,显示我们筛选到的核酸适配子对 TNF 具有中和活性,能抑制 TNF 对 L929 细胞的杀伤作用。根据我们的结果推算,1 μ g 的核酸能中和 2.5 ng TNF 蛋白的活性。

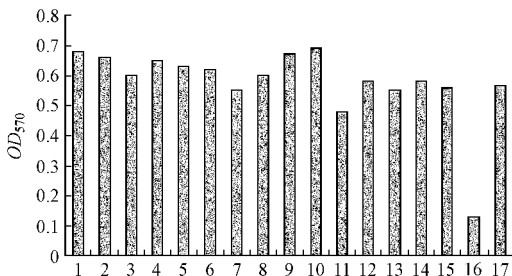


图 4 在小鼠 L929 细胞检测 DNA 适配子对 TNF 的拮抗活性

Fig.4 Antagonist activity of aptamer to hTNF- α on L 929 cell line

1 ~ 15. Selected TNF aptamer ; 16. TNF control ; 17. Normal L 929 cell

3 讨 论

单链寡核苷酸无论在分子结构和功能上都有多样性,因此构建单链寡核苷酸的随机序列库,其结构的多样性将提供特异性结合靶位点的分子。经过多轮的扩增和筛选,就可能从随机序列库中得到与靶分子高亲和力结合的适配子。我们从库容为 10^{16} 的随机 DNA 库中筛选出与 TNF 特异结合的 ssDNA,并对其亲和力进行了检测。结果显示筛选出的 DNA 适配子能以高亲和力与 TNF 结合,可以作为 TNF 的拮抗剂。我们知道 TNF 与其受体的亲和力较低,而用 SELEX 技术筛选出的与细胞因子特异结合的寡核苷酸具有高特异性、高亲和力,所以是一种理想的抑制剂^[5]。目前,国内外尚未见到有 TNF 核酸抑制剂方面的研究报道。我们的工作为开发新的治疗 TNF 相关的疾病的药物具有重要意义。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 1990, **249** (4968): 505 - 510
- [2] Wilson D S, Szostak J W. *In vitro* selection of functional nucleic acids. *Annu Rev Biochem*, 1999, **68**: 611 - 647
- [3] Gold L. Diversity of oligonucleotide functions. *Annu Rev Biochem*, 1995, **64**: 763 - 797
- [4] James W. Nucleic acid and polypeptide aptamers: a powerful approach to ligand discovery. *Curr Opin in Pharm*, 2001, **1**: 540 - 546
- [5] Klug S J, Famulok M. All you know about SELEX. *Molecular Biology Reports*, 1994, **20**: 97 - 107

Screening and Characterization of DNA Aptamers with hTNF- α Binding and Neutralizing Activity

GUO Ke-Tai YAN Xin-Rui HUANG Guo-Jin XU Chun-Xiao CHAI Ying-Shuang ZHANG Zhi-Qing*

(*State Key Laboratory of Molecular Virology and Genetic Engineering, Institute of Virology, China Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100052, China*)

Abstract Human tumor necrosis factor α (hTNF- α) is one of the most important inflammatory cytokines that acts as a mediator in inflammatory and immune response and plays a key role in host defense against infection. The over expression of hTNF- α is associated with serious consequences, such as shock, hypotension, thrombus, septicemia and even death. It has been implicated in many autoimmune and inflammatory diseases, such as rheumatoid arthritis, Crohn's disease, chronic heart failure and septic shock. Inhibiting the bio-activity of hTNF- α is one of the strategy for the treatment of these diseases. Compared with traditional recombinant protein drugs, small molecule drugs have many advantages, such as high affinity, low immunogenicity and low cost. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) is a powerful method for the selection of oligonucleotides that bind with high affinity and specificity to target proteins. Such oligonucleotides are called aptamers, and are potential therapeutics for blocking the activity of pathologically relevant proteins.

To obtain oligonucleotide aptamers specifically binding to TNF, a 40nt random DNA combinatorial library flanked by 31nt fixed sequences was chemically synthesized. The random library was amplified with PCR and subjected to selection by SELEX protocol against hTNF α . After incubation of the library with hTNF α , the mixture was blotted onto Immobilon-NC transfer membrane. The no-specific binding was washed away and the hTNF α binding aptamers were eluted and detached from the target protein. The eluted oligo nucleotides were amplified with PCR and served as the DNA library for the next round selection. After 12 rounds of such selection, the selected aptamers were cloned to pGEM-T vector. Positive clones were identified by restriction enzyme digestion and DNA sequencing.

Oligo DNA were synthesized according to the sequence data and tested for their activities. Binding activity of the aptamers to hTNF α were detected by ELISA and dot blot with biotin-streptavidin-horseradish peroxidase system. Mouse L929 cells were used to test the anti-hTNF α activity of the DNA aptamers. The aptamers were incubated with hTNF α and added to the L929 cells. The results were read under microscope and with MTT staining. It was shown that these DNA aptamers bound to hTNF α with high affinity, and can inhibit the cytotoxicity of hTNF α on cell culture. The affinity of these aptamers are different and may related to their structure. These ssDNA aptamers are potential for the treatment and diagnosis of hTNF α related diseases.

Key words SELEX, hTNF α , aptamer, binding activity

Received: 06-20-2003

This work was supported by Grant from National Hi-Tech Plan (No. 2001AA215251).

* Corresponding author. Tel: 86-10-63519655; Fax: 86-10-63532053, © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>