

# 利用 SELEX 技术筛选小檗碱核酸适配体及其亲和力表征

张丽娜<sup>1</sup> 赵 鹏<sup>1</sup> 田国英<sup>2</sup> 田平芳<sup>1\*</sup>

(1. 北京化工大学 生命科学与技术学院, 北京 100029; 2. 石家庄市农林科学研究院, 石家庄 050041)

**摘 要:** 小檗碱是一种价格低廉且生物安全性良好的小分子化合物, 筛选能与小檗碱互相作用的核酸片段, 旨在开发新型遗传元件并拓展其在生物技术领域的应用。利用指数富集的配基系统进化技术 (SELEX), 经 8 轮实验从随机单链 DNA 文库中筛选出 4 条能与小檗碱高度特异性结合的核酸适配体。对其中两条重现性较好的适配体进行结构模拟分析表明, 适配体序列富含鸟嘌呤和胞嘧啶且多形成茎环及 G-四链体结构。亲和力测定结果显示, 其中的 2 条核酸适配体与小檗碱作用的解离常数  $K_d$  都处于 nmol 级, 表现出较高的亲和力, 适配体 S1 的  $K_d$  值最小, 仅为 523 nmol/L, 与小檗碱亲和力最大。

**关键词:** 小檗碱; 指数富集的配基系统进化技术 (SELEX); 核酸适配体

**中图分类号:** Q52      **DOI:** 10.13543/j.bhxbzr.2018.06.008

## 引 言

小檗碱 (BBR) 俗称黄连素, 因其低廉的价格和良好的生物安全性在医药及农业领域受到广泛关注。近年来, 小檗碱多用于治疗胃肠疾病及防治植物病害<sup>[1]</sup>, 而在工业生物技术领域的应用鲜有报道。开发受小檗碱诱导的遗传元件可有望使其替代现有的昂贵诱导剂, 从而建立小檗碱-DNA 探针介导的生物传感器, 灵敏、安全地完成靶标检测<sup>[2-4]</sup>。而筛选能与小檗碱高特异性、高亲和力结合的核酸适配体 (aptamer) 是实现该目标的前提。

Tuerk 和 Gold 于 1990 年建立了一种指数富集的配体系统进化技术 (SELEX)<sup>[5]</sup>, 可用于从随机单链寡核苷酸文库中筛选出能与靶物质特异性结合且高度亲和的核酸适体。目前, 该技术已成功用于抗生素、蛋白质、有机物、金属离子、细胞等靶标的适配体筛选<sup>[6-8]</sup>。本文拟利用 SELEX 技术从随机单链 DNA 文库中筛选出能与小檗碱高特异性结合的适配体, 并对其亲和力进行表征, 为构建受小檗碱调控的遗传元件奠定基础。

收稿日期: 2018-04-16  
基金项目: 国家自然科学基金 (21276014/21476011)  
第一作者: 女, 1994 年生, 硕士生  
\* 通信联系人  
E-mail: tianpf@mail.buct.edu.cn

## 1 实验部分

### 1.1 材料

#### 1.1.1 单链 DNA 随机文库

用于 SELEX 的随机单链寡核苷酸文库由上海生工生物工程有限公司合成, 两端各含 15 nt 固定序列, 中间为 40 nt 的随机序列, 理论库容为  $10^{14} \sim 10^{15}$  条不同的碱基序列。具体序列为 5'-CCGGCG-TAGAGGATC-40N-GGCCTCTAAACGGGT-3'。

#### 1.1.2 引物

捕获引物 F0 用于将单链寡核苷酸库固定到链霉亲和素磁珠上, 其 3' 端标记生物素。扩增引物 F1/R1 用于聚合酶链式反应 (PCR) 过程对每轮筛选得到的单链次级库进行富集, 其中 R1 的 5' 端标记生物素。具体引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primers used in this study

引物	序列
捕获引物 F0	5'-GATCCTCTACGCCG-Biotin-3'
扩增引物 F1	5'-CCGGCGTAGAGGATC-3'
扩增引物 R1	5'-Biotin-ACCCGTTTAGAGGCC-3'

#### 1.1.3 主要试剂

链霉亲和素磁珠, New England Biolabs (Beijing) 有限公司; DNA 分子量 Marker、DNA 聚合酶,

博迈德生物技术有限公司;小檗碱,陕西慧科植物开发有限公司;克隆载体 pClone007,大肠杆菌感受态细胞 DH5 $\alpha$ ,北京擎科新业生物技术有限公司;其余试剂为国产分析纯,购自宝如亿(北京)生物技术有限公司。

#### 1.1.4 缓冲液及培养基

结合缓冲液:0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA),调节 pH 至 7.5。

Luria-Bertani(LB)培养基(g/L):酵母提取物 5,NaCl 10,胰蛋白胨 10。固体培养基需加琼脂至终质量浓度 15 g/L;抗性培养基需加入氨苄青霉素至终质量浓度 60  $\mu$ g/mL。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 PCR 反应条件优化

每轮筛选得到的单链次级库需经 PCR 反应扩增得到双链 DNA,再经过不对称 PCR 富集目的单链<sup>[9]</sup>。首先,分别设置 PCR 过程的循环数为 5、8、12、16、20、24、30,扩增后经琼脂糖凝胶电泳鉴定,确定最佳循环数;之后,为确定不对称 PCR 过程的最佳引物浓度比例,分别设置上游扩增引物 F1 与下游扩增引物 R1 的浓度比为 30:1、50:1、80:1、100:1,模板为之前对称 PCR 纯化产物,凝胶电泳鉴定。

PCR 反应参数:95  $^{\circ}$ C,4 min;94  $^{\circ}$ C,1 min,55  $^{\circ}$ C,40 s,72  $^{\circ}$ C,30 s,重复  $x$  个循环;72  $^{\circ}$ C,5 min;16  $^{\circ}$ C 保存。

#### 1.2.2 SELEX 筛选小檗碱的核酸适配体

具体筛选步骤如下。

(1)取 2  $\mu$ L 单链随机库(1  $\mu$ mol/L),加入 200  $\mu$ L 结合缓冲液,混匀后加入 4  $\mu$ L 捕获引物 F0(100  $\mu$ mol/L),95  $^{\circ}$ C 解链 10 min,自然冷却至室温,此时捕获引物与单链随机库 5'端互补配对,因此退火形成双链,同时捕获引物 3'端标记生物素,用于将单链随机库固定至链霉亲和素磁珠上。

(2)取 150  $\mu$ L 链霉亲和素磁珠,加入 800  $\mu$ L 结合缓冲液,磁分离,弃上清,洗涤两次。

(3)将结合有捕获引物的单链随机库与链霉亲和素磁珠混匀,30  $^{\circ}$ C 轻振 30 min,此时单链随机库通过生物素-链霉亲和素的作用固定到磁珠表面。经磁分离、去上清后,用结合缓冲液洗涤 3 次,备用。

(4)在已连接单链随机库的磁珠中加入 200  $\mu$ L

质量浓度为 50  $\mu$ g/mL 的小檗碱溶液,充分吸打混匀,37  $^{\circ}$ C 振荡孵育 1 h,间隙摇匀,与 BBR 结合而引起构象变化的单链寡核苷酸片段会与捕获引物脱离。

(5)孵育 1 h 后,磁分离,收集清液,测定单链 DNA 浓度,以单链 DNA 为模板、F1/R1 为引物进行对称 PCR 扩增得到双链 DNA。

(6)以对称 PCR 产物为模板,一定比例的 F1/R1 为引物进行不对称 PCR,获得大量不含生物素标记的目的单链 DNA,而双链 DNA 的一条链上携带生物素标记,用于后续分离。

(7)取 150  $\mu$ L 链霉亲和素磁珠用缓冲液洗涤 3 次后,用 200  $\mu$ L 缓冲液重悬,加入 300  $\mu$ L 不对称 PCR 产物,30  $^{\circ}$ C 下 100 r/min 振荡 30 min。之后磁分离收集上清,测定单链次级库浓度,用于第二轮筛选。

重复步骤(1)~(7),反复筛选以得到特异性较高的核酸适配体。

#### 1.2.3 适配体序列的测定

多轮筛选结束后,将单链次级库进行对称 PCR 扩增,纯化后与载体 pClone007 进行 TA 克隆,并转化到大肠杆菌感受态细胞 DH5 $\alpha$  中,37  $^{\circ}$ C 培养 12 h 后,挑选单菌落,PCR 鉴定后测序。

#### 1.2.4 适配体结构预测分析

适配体经测序后,使用 Clustal X 对其一级结构的同源性进行分析,并使用 RNA Structure 软件进行二级结构预测。

#### 1.2.5 适配体与小檗碱亲和力的测定

采用平衡渗透法评估适配体与小檗碱的亲和力<sup>[10]</sup>。选取同源性较高的几条适配体进行体外合成,用结合缓冲液配制一系列浓度梯度的适配体溶液(0、1、2、3、4、5、6  $\mu$ mol/L),分别加入终质量浓度为 20  $\mu$ g/mL 的小檗碱溶液,30  $^{\circ}$ C 结合反应 1 h。之后将混合液加入到截留率为 3 kD 的超滤离心管中,12 000 r/min 离心 30 min,收集清液并用高效液相色谱(HPLC)测定小檗碱含量。根据式(1)对每一个适配体的  $K_d$  值进行计算。

$$y = \frac{B_{\max}x}{K_d + x} \quad (1)$$

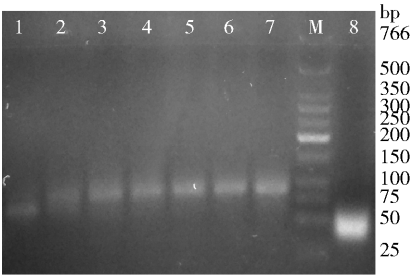
式中  $y$  表示饱和度,即适配体结合的小檗碱占总小檗碱的质量分数; $x$  表示加入适配体的浓度, $\mu$ mol/L; $B_{\max}$  为适配体与小檗碱的最大结合数目; $K_d$  表示二者的解离常数, $\mu$ mol/L。

2 结果与讨论

2.1 最佳 PCR 反应条件的确定

SELEX 技术可通过多轮循环将与小分子高特异性亲和的片段筛选出来,利用 PCR 扩增富集筛选的片段是 SELEX 过程中的重要步骤。

首先,以随机库为模板,进行对称 PCR 扩增得到双链 DNA。由图 1 可知,70 nt 单链随机库条带大致位于 50 bp DNA Marker 附近,经过 PCR 后的 70 bp 双链 DNA 位于 75 bp DNA Marker 附近。同时 PCR 循环数为 20、24、30 时,均能得到较清晰的条带,考虑到扩增产物浓度,最终确定 PCR 循环数为 30。



M—DNA 分子量 Marker;1~7—对称 PCR 产物(对应循环数分别为 5, 8, 12, 16, 20, 24, 30);8—单链随机库。

图 1 对称 PCR 扩增双链 DNA  
Fig. 1 PCR amplification of dsDNA

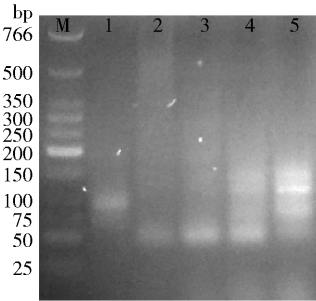
为获得大量目的单链 DNA 作为后续筛选的次级库,采用不对称 PCR 方法进行扩增,其中引物比例是影响不对称 PCR 的重要因素。由图 2 可知,当上下游扩增引物 F1 与 R1 浓度比为 30:1、50:1 时,均得到明显的单链条带;而 F1 与 R1 浓度比为 80:1、100:1 时,可能由于上游引物浓度过大导致非特异性结合明显,扩增结果出现了多条杂带。为保证单链次级库的浓度与质量,选择 F1 与 R1 浓度比为 50:1 作为不对称 PCR 的引物条件。

2.2 小檗碱核酸适配体的筛选

经过 8 轮筛选,将每轮得到的单链次级库进行琼脂糖凝胶电泳鉴定,结果如图 3 所示。在 50 bp Marker 附近均出现目标条带,且随着筛选轮数的增加,单链条带越发致密单一,说明单链库中的成分已得到较充分的富集。

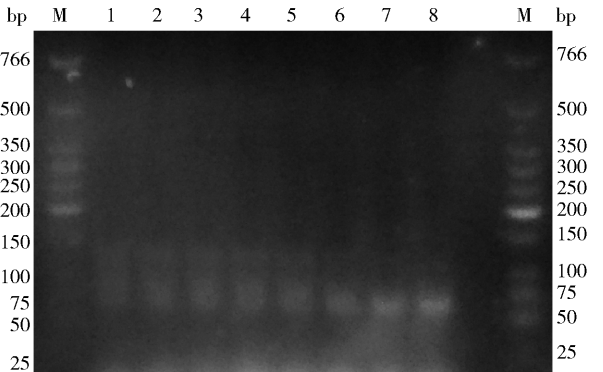
2.3 适配体测序及二级结构分析结果

第 8 轮的筛选结果经过 PCR 扩增,纯化回收后与载体进行 TA 克隆,转化宿主菌 *E. coli* DH5 $\alpha$ ,经菌落 PCR 鉴定后,选取了 70 株阳性克隆进行序列测定。共有 67 个重组子测序成功,结果分为 4 组,



M—DNA 分子量 Marker;1—双链 DNA;2~5—不对称 PCR 产物 (F1 与 R1 浓度比分别为 30:1, 50:1, 80:1, 100:1)。

图 2 不对称 PCR 扩增单链 DNA  
Fig. 2 Asymmetric PCR amplification of ssDNA



M—DNA 分子量 Marker;1~8—每轮筛选的不对称 PCR 产物。

图 3 1~8 轮筛选不对称 PCR 产物  
Fig. 3 Asymmetric PCR amplification of one to eight rounds of screening products

其中 S2 和 S4 两组序列重现性较低,S1、S3 两组在整体结果中分别出现 22 及 38 次重复,证明了经 8 轮筛选后,适配体已得到充分富集,序列特异性有了明显提高。同时各组结果之间也存在一些保守序列,主要包括富含 GC 的序列 TCC 和 GCC(表 2 中以斜体及下划线标明)。具体序列及保守性分析如表 2 所示。

表 2 适配体测序结果  
Table 2 Sequencing results of aptamers

序列	序列(40N)5'—3'
S1	CACAGGGGGTTCTCTACG <u>TCCGGCCT</u> ATCAGATCATACCAT
S3	A <u>TCCAGT</u> GCGACATGGATGATTCTTGACCGCCGTAGAGTTGTG

分别对 S1、S3 2 组适配体进行二级结构模拟预测。如图 4 所示,适配体中都存在明显的茎环结构,且 S1 结构较为饱满(图 4(a)),而 S3 则由多个小茎环组成(图 4(b))。核酸适配体形成发夹、茎、环、假结等构象,可以在空间结构上与靶分子互补契合,

这是适配体高特异性、高亲和力结合靶标的机制之一。同时,适配体一级结构包含多个富含鸟嘌呤(G)的区域,可能会形成常见的 G-四链体结构,这也是核酸适配体的重要特征之一<sup>[11-12]</sup>。

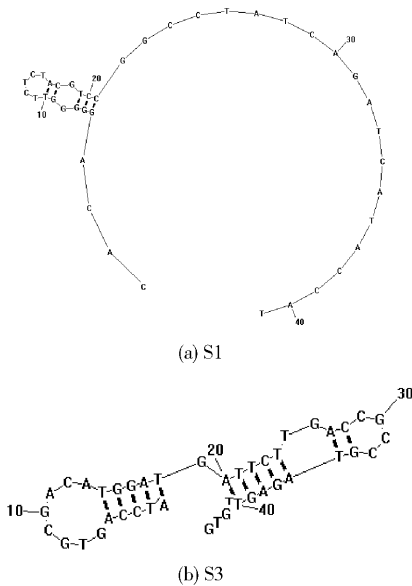


图 4 小檗碱适配体二级结构模拟

Fig. 4 Secondary structure simulation of aptamers

2.4 适配体与小檗碱作用的亲和力

利用平衡渗透法对适配体与小檗碱的亲和力进行评估。固定小檗碱质量浓度为 20 μg/mL,分别加入不同浓度的适配体混合反应。混合液经过超滤离心管离心后,与适配体结合的小檗碱被截留在膜内,滤液中仅包括未与适配体结合的游离小檗碱,其含量用 HPLC 法进行测定。

与米氏常数的表征方法类似,将式(1)进行双倒数变换,得到式(2)

$$\frac{1}{y} = \frac{K_d}{B_{\max}} \frac{1}{x} + \frac{1}{B_{\max}}$$

(2)

根据适配体的浓度梯度及测得的小檗碱含量对式(2)进行线性拟合,即可计算得到每条适配体与小檗碱作用的解离常数  $K_d$ ,具体结果如表 3 所示。

表 3 适配体与小檗碱作用的解离常数  
Table 3 Dissociation constants of aptamers

适配体	拟合曲线	$B_{\max}$	$K_d/(\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1})$
S1	$Y = 1 \times 10^{-6}X + 1.9133$	0.523	523
S3	$Y = 3 \times 10^{-6}X + 4.8096$	0.208	624

$Y$  为  $1/y$ ,  $X$  为  $1/x$ 。

从表 3 可以看出,2 条适配体的  $K_d$  值均为 nmol 级别,说明经过 8 轮 SELEX 筛选,成功获得了与小

檗碱具有高亲和力作用的适配体序列。其中 S1 的  $K_d$  值仅为 523 nmol/L,与小檗碱的亲和力最大,能够满足后续小檗碱介导遗传元件的构建或生物传感器的开发。

3 结论

(1)采用不对称 PCR 方法成功扩增得到大量可用于 SELEX 筛选的单链 DNA,经反应条件优化,确定 PCR 最佳循环数为 30,最佳上下游引物浓度比为 50:1。

(2)经 8 轮筛选,对 67 个重组子进行测序,成功获得 4 条与小檗碱高度特异性结合的适配体,对其中 2 条重现性较好的序列进行一级结构分析及二级结构模拟的结果表明,适配体序列富含 GC,且易形成茎环及 G-四链体结构。

(3)采用平衡渗透法对 2 条适配体与小檗碱作用的亲和力测定结果表明,2 条适配体均表现出对小檗碱的高亲和力,其中 S1 的  $K_d$  值最小,仅为 523 nmol/L,与小檗碱亲和力最大。

参考文献:

[1] HOU D Y, YAN C Q, LIU H X, et al. Berberine as a natural compound inhibits the development of brown rot fungus *Monilinia fructicola* [J]. Crop Protection, 2010, 29(9): 979-984.

[2] PARK J H, BYUN J Y, JANG H, et al. A highly sensitive and widely adaptable plasmonic aptasensor using berberine for small-molecule detection [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2017, 97: 292-298.

[3] OVÁDEKOVÁ R, JANTOVÁ S, LETAŠIOVÁ S, et al. Nanostructured electrochemical DNA biosensors for detection of the effect of berberine on DNA from cancer cells [J]. Analytical & Bioanalytical Chemistry, 2006, 386(7/8): 2055-2062.

[4] LETAŠIOVÁ S, JANTOVÁ S, MIKO M, et al. Effect of berberine on proliferation, biosynthesis of macromolecules, cell cycle and induction of intercalation with DNA, dsDNA damage and apoptosis in Ehrlich ascites carcinoma cells [J]. Journal of Pharmacy & Pharmacology, 2006, 58(2): 263-270.

[5] TUEK C, GOLD L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase [J]. Science, 1990, 249(4968): 505-510.

[6] YANG X J, BING T, MEI H C, et al. Characterization



- and application of a DNA aptamer binding to L-tryptophan [J]. *Analyst*, 2011, 136(3): 577–585.
- [7] CERCHIA L, DUCONGÉ F, PESTOURIE C, et al. Neutralizing aptamers from whole-cell SELEX inhibit the RET receptor tyrosine kinase [J]. *PLoS Biology*, 2005, 3(4): e123.
- [8] WANG L H, LIU X F, HU X F, et al. Unmodified gold nanoparticles as a colorimetric probe for potassium DNA aptamers [J]. *Chemical Communications*, 2006, 36: 3780–3782.
- [9] SVOBODOVÁ M, PINTO A, NADAL P, et al. Comparison of different methods for generation of single-stranded DNA for SELEX processes [J]. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*, 2012, 404(3): 835–842.
- [10] ZIMMERMANN G R, JENISON R D, WICK C L, et al. Interlocking structural motifs mediate molecular discrimination by a theophylline-binding RNA [J]. *Nature Structural Biology*, 1997, 4(8): 644–649.
- [11] ZHANG L H, LIU H, SHAO Y, et al. Selective lighting up of epiberberine alkaloid fluorescence by fluorophore-switching aptamer and stoichiometric targeting of human telomeric DNA G-quadruplex multimer [J]. *Analytical Chemistry*, 2015, 87(1): 730–737.
- [12] WANG J, ZHANG Y J, WANG H Y, et al. Selection and analysis of DNA aptamers to berberine to develop a label-free light-up fluorescent probe [J]. *New Journal of Chemistry*, 2016, 40: 9768–9773.

## Systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) screening and affinity characterization of berberine aptamers

ZHANG LiNa<sup>1</sup> ZHAO Peng<sup>1</sup> TIAN GuoYing<sup>2</sup> TIAN PingFang<sup>1\*</sup>

(1. College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029;

2. Shijiazhuang Academy of Agriculture and Forestry, Shijiazhuang 050041, China)

**Abstract:** Berberine (BBR) is a low-cost and biosafe small molecule. Screening of BBR-binding nucleic acid fragments holds promise for the development of novel genetic elements which might extend BBR's applications in industrial biotechnology. In this study, four aptamers with high specificity for BBR were acquired through eight rounds of systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) screening. Structural simulation showed that the aptamer sequences were rich in guanine-cytosine (GC) and formed stem-ring and G-quadruplex structures. Affinity determination results demonstrated that the dissociation constants  $K_d$  of the two aptamers were at a nanomolar level, indicating their high affinity for BBR. Of screened two aptamers, the aptamer S1 displayed the lowest  $K_d$  value (523 nmol/L), indicating it had the highest affinity to BBR.

**Key words:** berberine; systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX); aptamer

(责任编辑:吴万玲)