

学校编码: 10384

密级

学号: 20520091151429

厦门大学

硕士学位论文

氯高铁血红素和黄曲霉毒素B₁核酸适体的 筛选、表征与优化

**Selection, Characterization, and Optimization of Aptamers
against Hemin and Aflatoxins B₁**

朱玲

指导教师姓名: 杨朝勇 教授

专业名称: 化学生物学

论文提交日期: 2012年7月

论文答辩时间: 2012年 月

学位授予日期: 2012年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2012年7月

**Selection, Characterization, and Optimization of Aptamers
against Hemin and Aflatoxins B₁**

A Thesis Presented

by

Ling Zhu

Supervisor: Professor Chaoyong James Yang

**Submitted to the Graduated School of Xiamen University for
the Degree of Master of Science**

July, 2012

Department of Chemical Biology, Xiamen University

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	III
第一章 绪论.....	1
1.1 核酸适体与 SELEX 技术.....	1
1.1.1 核酸适体的特征.....	1
1.1.2 核酸适体在生化分析中的应用.....	2
1.1.2.1 荧光偏振检测.....	2
1.1.2.2 传感器.....	3
1.1.2.3 流式细胞术.....	4
1.1.2.4 免疫化学分析.....	5
1.1.3 SELEX 技术的基本原理及特点.....	6
1.1.4 SELEX 技术的发展.....	7
1.2 G-四聚体脱氧核酶.....	11
1.2.1 G-四聚体介绍.....	11
1.2.1.1 G-四聚体的结构多样性.....	12
1.2.1.2 G-四聚体的离子选择性.....	16
1.2.1.3 G-四聚体的生物学功能.....	16
1.2.1.4 G-四聚体与小分子配体.....	17
1.2.2 G-四聚体脱氧核酶.....	19
1.2.2.1 G-四聚体脱氧核酶介绍.....	19
1.2.2.2 G-四聚体脱氧核酶的工作机理.....	19
1.2.2.3 G-四聚体的结构多样性与酶活性关联.....	21
1.2.2.4 G-四聚体脱氧核酶在生化检测分析中的应用.....	21
1.2.2.5 高效 G-四聚体脱氧核酶的筛选.....	23
1.3 黄曲霉毒素 B ₁	25
1.3.1 黄曲霉毒素 B ₁ 介绍.....	25

1.3.2 黄曲霉毒素 B ₁ 的检测方法.....	26
1.3.2.1 化学分析方法.....	26
1.3.2.2 免疫分析方法.....	27
1.4 本论文拟开展的研究内容.....	28
第二章 稳定高效的 G-四聚体脱氧核酶的筛选.....	31
2.1 引言.....	31
2.2 实验方法.....	32
2.2.1 实验试剂和仪器.....	32
2.2.2 Hemin-agarose 的合成和表征.....	34
2.2.2.1 Hemin-agarose 的合成.....	34
2.2.2.2 Hemin-agarose 的表征.....	35
2.2.3 随机寡核苷酸文库的合成和纯化.....	35
2.2.4 Hemin 核酸适体的筛选.....	36
2.2.5 克隆与测序.....	37
2.2.6 核酸适体序列结构的表征.....	37
2.2.6.1 紫外可见吸收光谱.....	37
2.2.6.2 圆二色光谱.....	38
2.2.6.3 溶解曲线.....	38
2.2.6.4 酶动力学实验.....	38
2.3 结果与讨论.....	38
2.3.1 Hemin-agarose 的合成和表征.....	38
2.3.2 核酸适体筛选过程中富集进程的监测.....	41
2.3.3 测序序列比对分析.....	43
2.3.4 核酸适体的结构和功能表征.....	48
2.3.4.1 结合亲和力测定.....	48
2.3.4.2 G-四聚体的构象表征.....	49
2.3.4.3 酶动力学实验.....	51
2.3.5 核酸适体的序列结构优化.....	53
2.3.6 修饰核酸适体的结构和功能表征.....	58
2.4 本章小结.....	61

第三章 黄曲霉毒素 B₁ 核酸适体的筛选	62
3.1 引言	62
3.2 实验方法	63
3.2.1 实验试剂和仪器.....	63
3.2.2 AFB ₁ -Beads 的合成和表征.....	65
3.2.2.1 AFB ₁ -Beads 的合成.....	65
3.2.2.2 AFB ₁ -Beads 的表征.....	66
3.2.2.3 反筛靶标 COOH-Beads 的制备.....	66
3.2.3 AFB ₁ 核酸适体的筛选.....	67
3.2.4 克隆与测序.....	68
3.2.5 核酸适体的结合亲和力测定.....	68
3.3 结果与讨论	68
3.3.1 AFB ₁ -Beads 的合成和表征.....	68
3.3.2 核酸适体筛选过程中富集进程的监测.....	71
3.3.3 测序序列比对分析.....	73
3.3.4 核酸适体的结合亲和力的测定.....	75
3.4 本章小结	78
第四章 结论与展望	79
参考文献	81
作者攻读硕士学位期间发表的论文	92
致谢	93

Table of Contents

Abstract in Chinese.....	I
Abstract in English.....	III
Chapter 1. Introduction.....	1
1.1 Aptamer and SELEX.....	1
1.1.1 Features of aptamer.....	1
1.1.2 Applications of aptamer in biochemical analysis.....	2
1.1.2.1 Fluorescence polarization analysis.....	2
1.1.2.2 Sensors.....	3
1.1.2.3 Fluorescence-activated cell sorting.....	4
1.1.2.4 Immune chemical analysis.....	5
1.1.3 Principle and features of SELEX.....	6
1.1.4 Research progress of SELEX.....	7
1.2 Selection of stable and high-efficiency G-quadruplex-based DNAzyme.....	11
1.2.1 Brief introduction of G-quadruplex.....	11
1.2.1.1 Structure diversity of G-quadruplex.....	12
1.2.1.2 Ionic selectivity of G-quadruplex.....	16
1.2.1.3 Biological function of G-quadruplex.....	16
1.2.1.4 G-quadruplex against small molecular ligands.....	17
1.2.2 G-quadruplex-based DNAzyme.....	19
1.2.2.1 Brief introduction of G-quadruplex-based DNAzyme.....	19
1.2.2.2 Working mechanism of G-quadruplex-based DNAzyme.....	19
1.2.2.3 The relationship between structure diversity and peroxidase activity of G-quadruplex.....	21
1.2.2.4 Applications of G-quadruplex-based DNAzyme in biochemical analysis	21
1.2.2.5 Selection of G-quadruplex-based DNAzyme.....	23
1.3 Aflatoxins B₁.....	25
1.3.1 Brief introduction of aflatoxins B ₁	25
1.3.2 Detection methods of aflatoxins B ₁	26

1.3.2.1 Chemical analysis methods.....	26
1.3.2.2 Immune analysis methods.....	27
1.4 Proposals of dissertation.....	28
Chapter 2. In vitro selection of high-efficiency G-quadruplex-based DNAzyme.....	31
2.1 Introduction.....	31
2.2 Experimental methods.....	32
2.2.1 Experimental materials and instruments.....	32
2.2.2 Synthesis and characterization of hemin-agarose.....	34
2.2.2.1 Synthesis of hemin-agarose.....	34
2.2.2.2 Characterization of hemin-agarose.....	35
2.2.3 Synthesis and purification of DNA.....	35
2.2.4 Selection of hemin-binding DNA aptamers.....	36
2.2.5 Cloning and sequencing.....	37
2.2.6 Characterization of aptamers.....	37
2.2.6.1 UV-visible spectra.....	37
2.2.6.2 CD spectra.....	38
2.2.6.3 Melting temperature assay.....	38
2.2.6.4 Enzyme dynamics experiment.....	38
2.3 Results and discussion.....	38
2.3.1 Synthesis and characterization of hemin-agarose.....	38
2.3.2 Monitoring enrichment progress of the selection process.....	41
2.3.3 Sequence alignment analysis.....	43
2.3.4 Characterization of aptamers.....	48
2.3.4.1 The binding affinity of aptamers.....	48
2.3.4.2 Structure characterization of G-quadruplex.....	49
2.3.4.3 Enzyme dynamics experiment.....	51
2.3.5 Sequence optimization of aptamers.....	53
2.3.6 Modification of aptamers.....	58
2.4 Conclusion.....	61
Chapter 3. Selecton of aflatoxins B₁-binding DNA aptamers.....	62
3.1 Introduction.....	62
3.2 Experimental methods.....	63

3.2.1 Experimental materials and instruments.....	63
3.2.2 Synthesis and characterization of AFB ₁ -Beads.....	65
3.2.2.1 Synthesis of AFB ₁ -Beads.....	65
3.2.2.2 Characterization of AFB ₁ -Beads.....	66
3.2.2.3 Preparation of COOH-Beads for negative selection.....	66
3.2.3 Selecton of AFB ₁ -binding DNA aptamers.....	67
3.2.4 Cloning and sequencing.....	68
3.2.5 The binding affinity of aptamers.....	68
3.3 Results and discussion.....	69
3.3.1 Synthesis and characterization of AFB ₁ -Beads.....	69
3.3.2 Monitoring enrichment progress of the selection process.....	71
3.3.3 Sequence alignment analysis.....	74
3.3.4 The binding affinity of aptamers.....	76
3.4 Conclusion.....	78
Chapter 4. Conclusion and prospect.....	79
References.....	81
Publications during master study.....	92
Acknowledgements.....	93

摘要

小分子物质,特别是有毒小分子物质的检测是抗体技术在现代分析化学领域应用的一个瓶颈。基于指数富集配体系统进化 (SELEX) 技术的核酸适体 (aptamer), 被誉为“人工抗体”, 它不仅与靶分子高亲和力和高特异性结合, 而且具有靶分子广泛、分子量小、化学合成便捷经济、稳定性高、无免疫原性、以及易于精确定点修饰等诸多优点, 是潜在的抗体替代物, 在生化分析检测领域显示出巨大的应用前景。目前, 基于核酸适体的识别与检测方法, 正逐渐成为一种新的普遍适用的技术。但是, 靶向小分子物质的核酸适体并不多见, 限制了其广泛应用; 核酸适体在生化检测分析中的应用尚处于起步阶段。因此, 筛选小分子物质的特异性核酸适体并发展核酸适体技术用于小分子物质的检测新方法具有重要的研究意义。本论文围绕小分子核酸适体的筛选及功能优化, 开展了以下两方面的工作:

(1) 基于氯高铁血红素的核酸适体筛选稳定高效的 G-四聚体脱氧核酶

氯高铁血红素 (hemin) 是生物体内多种过氧化物酶的催化活性中心, 能与 G-四聚体 (G-quadruplex) 特异性结合, 形成 G-四聚体脱氧核酶 (G-quadruplex-based DNAzyme), 并表现出增强的过氧化物酶活性, 可作为一种优良生物催化剂, 在生化反应和生物传感器中具有极大的应用潜力。基于琼脂糖微珠分离的亲筛和筛选方法, 以随机区域 G 碱基含量分别是 25%、35% 和 45% 的三个单链 DNA (ssDNA) 文库为初始库, 以 hemin-agarose 为靶分子, 进行平行筛选 hemin 的 G-quadruplex 核酸适体。利用紫外吸收光谱、圆二色光谱、溶解曲线和酶动力学实验等手段研究 G-quadruplex 的序列、结构、结合亲和力和过氧化物酶活性之间的关系。结果表明: 初始文库的 G 碱基含量越低, G-quadruplex 序列的富集效率越高; 与 hemin 有较强结合的 G-quadruplex 序列表现出相对较强的过氧化物酶活性; 核心 G-motifs 序列的两端旁侧序列会对 G-quadruplex 的拓扑结构和过氧化物酶活性产生极大影响; 最优序列 [B7]-3-0 是一个稳定紧凑的平行 G-quadruplex 结构, 与 hemin 结合的解离常数 K_d 达到 29 nM, 并表现出最高的过氧化物酶活性, 而 2' 甲氧基修饰可以进一步提高平行 G-quadruplex 的结构稳

定性和过氧化物酶活性。这些结果的获得有利于进一步认识 G-quadruplex 的自组装结构和 G-quadruplex-based DNAzyme 的工作机理，同时为设计稳定高效的 G-quadruplex-based DNAzyme 提供参考依据。

(2) 筛选高亲和力和高特异性识别黄曲霉毒素 B₁ 的核酸适体

黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁) 是一种小分子真菌毒素，其毒性和致癌性非常强，污染范围广泛，对人体健康构成严重威胁。基于琼脂糖微珠分离-流式细胞术相结合的亲和筛选方法，以 AFB₁-Beads 为靶分子，筛选特异性结合 AFB₁ 的核酸适体，并利用流式细胞术检测核酸适体的结合亲和力和选择性。结果表明：经过 11 轮筛选，获得 8 条核酸适体对 AFB₁ 的识别具有高亲和力，截短核酸适体对 AFB₁ 依然保持较高的亲和力，解离常数 K_d 值都在 0.4-2.5 μM 范围之内，在 10-50% 的甲醇-缓冲液中也能高亲和力识别 AFB₁。AFB₁ 核酸适体的获得为进一步开发核酸适体技术应用于 AFB₁ 的检测分析打下了物质基础。

关键词：核酸适体；SELEX；G-四聚体；脱氧核酶；黄曲霉毒素 B₁

Abstract

As we know, detection of small molecules, especially toxic substances is a bottleneck of antibody technology in the field of modern analytical chemistry. A new kind of ligand-binding functional nucleic acid probe named aptamer evolved by SELEX is known as the “artificial antibody” with high affinity and strong specificity to targets. Aptamers show their own dominance over antibodies such as wide targets, small size, low preparation cost, high stability under harsh conditions, no immunogenicity, easy clipping and functionalization. Aptamers are expected as alternatives of antibodies to be widely adapted to analytical applications. At present, there are just a few aptamers against small molecules which limited the detection of small molecules. Therefore, it shows greatly important significance in screening aptamers against small molecules and developing new aptamer technology in the detection of small molecules. Aiming at selection, characterization, and optimization of aptamers against small molecules, the research work of this thesis is summarized as follows:

(1) In vitro selection of highly efficient G-quadruplex-based DNazymes based on hemin-binding DNA aptamers

G-quadruplex can bind hemin to form peroxidase-like G-quadruplex-based DNzyme which can be regarded as a good biological catalyst used in biological sensors. This thesis carried out screening high-efficiency G-quadruplex-based DNzyme from the perspective of improvement in the primary sequence of nucleic acids. Three initial ssDNA libraries with 25%, 35%, and 45% guanine bases respectively at the 45-nt random regions were designed to evolve hemin-binding DNA aptamers parallelly using hemin-agarose through agarose-based affinity SELEX method. The affect factors of peroxidase activity, including sequence, structure, binding affinity were studied by CD spectra, melting curve, UV-visible spectra, and enzyme kinetics. The results showed that the lower G content of the initial library, the higher enriching efficiency; there was certain correlation between peroxidase activity and the binding affinity of G-quadruplex; the flanking nucleotides on two sides of the core G-motifs greatly affected peroxidase activity. The optimal truncated aptamer [B7]-3-0 which folded into compacted parallel

G-quadruplex structure exhibited the highest peroxidase activity and strong binding affinity to hemin with 29 nM of K_d . In addition, 2'-O-methyl modification facilitated the self-assembly of parallel G-quadruplex [B7]-3-0 and significantly promoted peroxidase activity. This study will be helpful for further understanding G-quadruplex self-assembly structure and work mechanism of G-quadruplex-based DNAzyme or a reference for designing stable, high-efficiency G-quadruplex-based DNAzyme.

(2) Selection of aptamers against aflatoxins B₁ with high affinity and high selectivity

Aflatoxins B₁ (AFB₁) is a kind of mycotoxin and poses a serious threat to human health for extreme toxicity and carcinogenicity. Based on agarose-FACS affinity SELEX method, AFB₁-binding DNA aptamers were selected using AFB₁-Beads. The affinity and selectivity of aptamers were identified by FACS. The results showed that eight G-rich aptamers were evolved from random oligonucleotide library after 11 rounds of selection. Truncate aptamers still kept high affinity to AFB₁. They all displayed high binding affinity to AFB₁ with K_d within 0.4-2.5 μ M. In the 10-50% of methanol-buffer, aptamers could also identify AFB₁ with high affinity. The obtainment of aptamers to AFB₁ will lay the fundamental material base for the further development of aptamer technology applied in the detection of AFB₁.

Keywords: Aptamer; SELEX; G-quadruplex; DNAzyme; AFB₁

第一章 绪论

1.1 核酸适体与 SELEX 技术

1.1.1 核酸适体的特征

核酸适体 (aptamer), 被冠予“人工抗体”, 是一类新型功能性核酸分子探针^[1, 2]。它是基于一种体外筛选技术——指数富集配体系统进化 (systematic evolution of ligand by exponential enrichment, SELEX)^[3], 从容量巨大的随机寡核苷酸文库中筛选得到, 一般含有 20-60 个碱基, 可以是 RNA、ssDNA、修饰 RNA 或修饰 ssDNA。在一定的环境条件下, 核酸适体容易形成稳定的三维空间结构, 诸如茎、环、发夹、假结、三聚体和 G-四聚体等。正是基于这些特定的三维空间结构, 以及堆积作用、范德华力、氢键作用、静电作用和形状匹配等各种相互作用, 核酸适体能够与靶分子高亲和力和强特异性的适应性结合, 并且影响靶分子的结构、功能和生物活性。核酸适体在表观功能上与抗体相类似, 因其核酸本质固有的生化特性还具有许多抗体无法比拟的优点:

(1) 靶分子范围广泛。随机寡核苷酸文库的容量一般达到 10^{12} - 10^{15} , 具有丰富的序列和结构多样性, 同时核酸适体与靶分子之间的相互作用也具有多样性。因此, 理论上自然界中任何物质都可以通过 SELEX 技术筛选得到其特异性核酸适体^[4]。但是抗体的靶分子范围较窄, 抗原性弱的蛋白、某些小分子、以及有毒物质等都难以或无法获得它们相应的抗体。

(2) 高亲和力和高特异性。核酸适体和靶分子之间的结合亲和力非常高, 解离常数 K_d 在 pM- μ M 之间, 可与抗体抗原相媲美^[5]。基于结构和相互作用的适应性结合模式, 核酸适体对靶分子的识别具有高度特异性, 能够区分手性分子、分子结构上一个基团的差别, 还能识别蛋白靶标上的不同抗原表位, 而且很少有非特异性结合的情况^[6]。比如, 茶碱的核酸适体并不识别在分子结构上仅少一个甲基的咖啡因, 其与茶碱的亲和力比咖啡因高 10000 倍。但茶碱的单克隆抗体会非特异性结合咖啡因^[7]。

(3) 筛选、合成、修饰简便快速。成功发展一个核酸适体通常仅需 8 周左右, 自动化 SELEX 技术的实现又大大缩减了筛选工作量, 新型筛选方法的发展

也让筛选更加高效, 仅需 1-8 轮即可, 筛选周期逐渐缩短。同时, 离体筛选过程有利于人为调控筛选条件, 如时间、温度、盐离子浓度或 pH 等。单克隆核酸适体可用化学合成技术大量制备, 基本不存在批量差异, 还可进行精确定点化学修饰以改善其功能。比如, 将核苷酸糖环上的 2'-OH 替换为 2'-NH₂、2'-F 或 2'-OCH₃, 或者在 5'端偶联聚乙二醇或二酰基甘油酯基团, 都能够显著提高核酸适体的稳定性和抗核酸酶降解能力^[8-10]。功能报告基团的引入还增加了核酸适体的应用多样性。在这些方面, 抗体与核酸适体比较未免相形见绌了。抗体的制备使用生物系统, 是一个体内筛选过程, 免疫应答过程是必需的, 通常至少需要 3-6 个月, 过程繁琐, 成本昂贵, 而且不同批次产品存在一定的差异。另外, 抗体的工作条件不可随意调控, 必须是生理环境, 限制了其应用范围。此外, 抗体的标记也不方便, 容易导致抗体失去亲和力。

(4) 稳定。核酸适体具有良好的稳定性, 制成干粉状态可以保存数年, 形成溶液状态后又立即恢复功能, 变性复性是可逆的。但抗体是蛋白质, 对环境变化很敏感, 温度、pH 或离子强度等条件的改变很容易引起抗体的变性失活。

(5) 无免疫原性。因体外筛选过程不依赖细胞系和动物, 核酸适体没有任何的免疫原性和毒性。但抗体具有异源性, 容易导致免疫反应, 限制了应用。

(6) 应用灵活。核酸适体分子量很小, 一般只有 6-40 kDa, 因此组织渗透能力很强。体外筛选过程容易实现对与靶分子结合条件的调控, 没有生理条件的限制, 可以改变其动力学参数如结合/解离速率等。应用分子生物学工具可以实现对核酸适体进行任意剪裁。核酸适体的标记、修饰和固化也大大增加了其应用功能。这些优势都是抗体望尘莫及的。

1.1.2 核酸适体在生化分析中的应用

基于分子识别机理, 核酸适体对靶分子的高亲和力和高特异性结合功能及核酸本质固有的优良特性让其在生化分析检测中的应用大放光彩。目前, 人们发展了许多基于核酸适体的新型分析检测方法^[11, 12]。

1.1.2.1 荧光偏振检测

在荧光偏振分析中, 核酸适体比抗体更有优势。它是一段寡核苷酸片段, 分子量很小, 仅是抗体的 1/10, 振动速度快, 与靶分子结合后引起构象和分子量改变就会进一步增加偏振, 且易于荧光基团的修饰标记而不影响自身的结构功能。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

廈門大學博碩士論文摘要庫