

毛细管电泳法高效筛选 8-氧代鸟嘌呤 DNA 糖基化酶的核酸适配体

韩诗邈, 赵丽萍, 杨歌, 屈锋*

(北京理工大学生命学院, 北京 100081)

摘要: 8-氧代鸟嘌呤 DNA 糖基化酶(OGG1)是人体中重要的功能蛋白,在修复 DNA 氧化性损伤过程中起关键作用。氧化应激等引起的氧化损伤易导致炎症反应的发生,对 OGG1 的抑制可以一定程度上起到缓解作用;对癌细胞 OGG1 的抑制有望作为癌症治疗的新方法。目前的研究多集中于小分子对 OGG1 功能的影响和调控,而 OGG1 的核酸适配体筛选尚未见报道。作为功能配体,适配体具有合成简单、高亲和力及高特异性等优点。该文筛选了 OGG1 的核酸适配体,结合毛细管电泳高效快速的优点建立了两种基于毛细管电泳-指数富集进化(CE-SELEX)技术的筛选方法:同步竞争法和多轮筛选法。同步竞争法利用单链结合蛋白(SSB)与核酸库中单链核酸的强结合能力,与目标蛋白 OGG1 组成竞争体系,并通过增加 SSB 浓度来增加竞争筛选压力,以去除与 OGG1 弱结合的核酸序列,一步筛选即可获得与 OGG1 强结合的核酸序列。多轮筛选法在相同孵育条件和电泳条件下,经 3 轮筛选获得 OGG1 的核酸适配体。比较两种筛选方法的筛选结果,筛选结果中频次最高的 3 条候选核酸适配体序列一致,其解离常数(K_D)值在 1.71~2.64 $\mu\text{mol/L}$ 之间。分子对接分析结果表明候选适配体 1(Apt 1)可能与 OGG1 中具有修复氧化性损伤功能的活性口袋结合。通过对两种筛选方法的对比,证明同步竞争法更加快速高效,对其他蛋白核酸适配体筛选方法的选择具有一定的指导意义。得到的适配体有望用于 OGG1 功能调控,以抑制其修复功能。

关键词: 毛细管电泳;核酸适配体;8-氧代鸟嘌呤 DNA 糖基化酶;竞争筛选;多轮筛选

中图分类号: O658 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8713(2021)07-0721-09

Efficient screening for 8-oxoguanine DNA glycosylase binding aptamers via capillary electrophoresis

HAN Shimiao, ZHAO Liping, YANG Ge, QU Feng*

(School of Life Science, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China)

Abstract: 8-Oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) is an important enzyme that plays a key role in oxidative DNA damage repair. OGG1 can specifically recognize and excise 8-oxoG (a product of oxidative damage found in double-stranded DNA) through base excision repair (BER). OGG1 is expressed in normal tissues, and in most tumor tissues. Oxidative cellular damage can produce an inflammatory reaction, alleviating some measure of constitutive OGG1 inhibition. OGG1 inhibition in cancer cells shows some promise as a new method of cancer treatment. Most current OGG1 research focuses on regulating OGG1 with targeted small molecules. To date, no aptamer screen for OGG1 has been reported. Aptamers are single-stranded DNA (ssDNA) or RNA oligonucleotides that can bind to a target with high affinity and specificity *in vitro*, that can be identified by systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX). Aptamers can be used as chemical ligands to regulate intermolecular interactions. In this study, a screen for aptamers with OGG1 affinity was performed for the first time. Capillary electrophoresis (CE) is a microanalytical technique that offers speed and high separation

收稿日期:2020-12-18

* 通讯联系人.Tel:(010)68918015,E-mail:qufengqu@bit.edu.cn.

基金项目:国家自然科学基金项目(21675012,21874010,21827810).

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (Nos. 21675012, 21874010, 21827810).

efficiency. In this work, two screening methods based on CE-SELEX technology were established: a one-round pressure controllable selection, and a multi-round selection. The most important criterion for successful one-round pressure controllable selection is to select a competitive target with a different CE migration time than that of the target of interest. We mixed OGG1 with a competitive target and a nucleic acid library for CE analysis. Two proteins competitively bind sequences in the library, forming independent complexes. The concentration of the competitive target is continuously increased until complexes with the target stop decreasing, indicating that the target and the ssDNA library have formed a stable complex. Complexes were collected for PCR amplification, purification, and high-throughput sequencing to obtain high affinity aptamers. This method greatly improves screening efficiency, and reduces non-specific binding to the target, which is helpful for obtaining aptamers with high affinity and specificity. One-round pressure controllable selection for high affinity OGG1 selective aptamers was performed using single strand binding protein (SSB) to competitively and tightly bind nucleic acids in the library. The competitive screening pressure was increased by increasing the SSB concentration to eliminate sequences with low affinity for OGG1 from the random oligonucleotide library. Nucleic acid sequences with high OGG1 affinity were obtainable in one step, and OGG1-ssDNA complexes were collected by creating a timed program on Beckman P/ACE MDQ capillary electrophoresis. Collection occurred from 2.2 to 2.8 min. Under identical incubation and electrophoresis conditions, multiple round selections were conducted by injecting samples of co-incubated nucleic acid library and target into the capillary. After separation under a high-voltage electric field, nucleic acid target complexes were collected, amplified by PCR, purified, and used as an enriched secondary library in the next round of screening. High affinity aptamers were generally obtained within three rounds. Comparing results of the two screening methods, the three candidate aptamer sequences found with the highest frequency were consistent, and displayed K_D values ranging from 1.71 to 2.64 $\mu\text{mol/L}$. Molecular docking analysis suggests that Apt 1 may bind to the OGG1 active pocket, which functions to repair oxidative damage. Comparison of the two screening methods indicates that one-round pressure controllable selection is more rapid and efficient, providing guidance for the design of other protein aptamer screening methods. The obtained aptamer is expected to be function effectively as an OGG1-mediated DNA repair inhibitor.

Key words: capillary electrophoresis (CE); aptamer; 8-oxoguanine DNA glycosylase; one-round pressure controllable selection; multi-round selection

8-氧代鸟嘌呤 DNA 糖基化酶 (OGG1) 是修复 DNA 氧化性损伤的关键蛋白^[1,2], 能够将 DNA 双链中的氧化损伤产物 8-oxoG 通过碱基切除修复途径 (base-excision repair, BER) 进行特异性识别和切除^[3]。OGG1 修复功能如果被抑制, 将会导致正常细胞的 DNA 修复能力降低, DNA 损伤蓄积, 细胞凋

亡增加^[4,5]。但对于依赖 DNA 修复功能的癌细胞来说, OGG1 蛋白修复功能的抑制则可以作为治疗癌症的新途径^[6]。此外, OGG1 也参与氧化应激等引发的炎症反应, 在一些免疫调节疾病^[7,8]中, 过敏原会导致 OGG1 功能完好的上皮细胞产生更加严重的炎症反应^[9], 因此, 削弱 OGG1 的功能也能在

引用本文: 韩诗邈, 赵丽萍, 杨歌, 屈锋. 毛细管电泳法高效筛选 8-氧代鸟嘌呤 DNA 糖基化酶的核酸适配体. 色谱, 2021, 39(7): 721-729.

HAN Shimiao, ZHAO Liping, YANG Ge, QU Feng. Efficient screening for 8-oxoguanine DNA glycosylase binding aptamers via capillary electrophoresis. Chinese Journal of Chromatography, 2021, 39(7): 721-729.

一定程度上缓解炎症反应。

目前的研究工作多集中于小分子对 OGG1 功能的影响和调控研究, Donley 等^[10]筛选了数十种药物以抑制 OGG1 的修复功能, 目前其药物的效用和特异性仍需验证; Visnes 等^[11]发现了一种 OGG1 的小分子抑制剂 TH5487, 能够减弱 OGG1 引起的炎症反应。对 OGG1 修复功能有抑制作用的配体的相关研究具有重要的理论意义和应用价值。核酸适配体是在体外通过指数富集配体进化技术 (systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX) 得到的与靶标以高亲和力和高特异性结合的单链 DNA (ssDNA) 或 RNA。筛选 OGG1 蛋白的核酸适配体, 可作为潜在的 OGG1 功能的调节因子, 控制 OGG1 修复功能。目前, 未见有 OGG1 蛋白的核酸适配体筛选及相关报道。

基于 CE-SELEX 筛选核酸适配体有多种方法^[12-19]。其中利用毛细管区带电泳的多轮筛选方法是较为常用的筛选方法, 通常需要 3~4 轮筛选可获得核酸适配体; 本课题组最近发展了一轮同步竞争筛选方法^[20], 通过在筛选过程中引入竞争靶标, 并增加竞争靶标的浓度来增加筛选压力, 同步提高筛选序列的亲和力和特异性。本文基于多轮筛选和一轮同步竞争筛选方法, 筛选了 OGG1 的核酸适配体。筛选的示意图如图 1 所示, 在竞争筛选中增加竞争靶标单链结合蛋白 (SSB) 的浓度就可以获得 ssDNA 与 OGG1 稳定结合的复合物; 多轮筛选需要

将 ssDNA 与 OGG1 的复合物收集后 PCR 形成 Sub ssDNA 以重复多轮筛选过程, 收集亲和力不再提高的轮次的复合物, 并利用高通量测序对两种复合物在 PCR 后获得的 ssDNA 进行分析。采用分子对接分析预测了核酸适配体 Apt 1 与 OGG1 的结合位点, 发现该适配体可能与 OGG1 蛋白的活性口袋区域结合, 有望成为该蛋白的调控因子。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Beckman P/ACE MDQ 毛细管电泳仪配荧光检测器 (美国 Beckman-coulter 公司)、S1000™ Thermal Cycler PCR 仪 (美国 BIO-RAD 公司)、Fresco21 低温离心机 (美国 ThermoFisher Scientific 公司)、PICO21 台式高速离心机 (美国 ThermoFisher Scientific 公司)、300 V/400 mA/75 W Power 凝胶电泳仪 (美国 BIO-RAD 公司)。

熔融石英毛细管: 75 μm i.d. \times 50.2 cm (40 cm 有效长度) (河北鑫诺光纤色谱有限公司)。硼酸、硼酸钠、氢氧化钠 (分析纯, 北京化工厂)。OGG1 重组蛋白 (美国 ImmunoClone 公司); 80 nt 荧光素标记 (FAM) 标记的 ssDNA 核酸库: 5'-FAM-AG-CAGCACAGAGGTCAGATG-40-CCTATGCGTGCT-ACCGTGAA-3' (两端为 20 nt 引物区固定序列, 中间为 40 nt 的随机序列)。引物 P1: 5'-AGCAGCA-CAGAGGTCAGATG-3', 标记荧光的引物 5'-FAM-

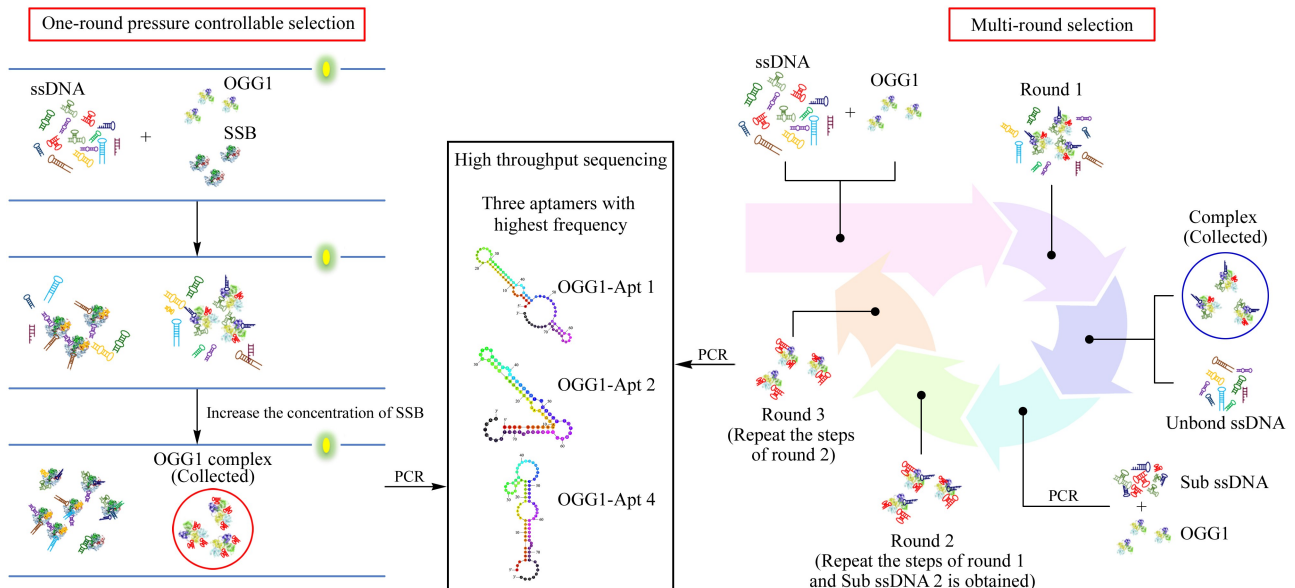


图 1 两种筛选方法原理示意图

Fig. 1 Schematic diagram of two screening methods

P1: FAM-5'-AGCAGCACAGAGGTCAGATG-3'), 引物 P2: 5'-TTCACGGTAGCACGCATAGG-3' (生工生物工程(上海)股份有限公司)。

1.2 溶液配制

毛细管电泳分离缓冲溶液: 50 mmol/L 硼酸-硼砂溶液 (pH 7.8)。缓冲液需经 0.22 μmol/L 滤膜过滤后使用。ssDNA 核酸库固体粉末, 使用前需按照说明用超纯水溶解, 配制母液。配制好的母液于 94 °C 变性处理 5 min, 冷却至室温后取出备用。根据实验需要用孵育缓冲溶液稀释蛋白质和核酸溶液。

1.3 实验条件

1.3.1 毛细管电泳条件

电泳运行缓冲液为 50 mmol/L pH 7.8 硼酸-硼砂缓冲溶液; 分离电压为 15 kV; 分离温度为 25 °C。进样压力为 3.45 kPa, 时间 5 s。激光诱导荧光检测器 (LIF) 检测激发和发射波长分别为 488 nm 和 520 nm; 毛细管在样品进样前需依次使用 0.1 mol/L NaOH、H₂O 和电泳缓冲液冲洗 3 min。使用新毛细管时按照常规活化方法处理^[21]。

1.3.2 PCR 扩增条件及产物浓缩和纯化

详细步骤参考本课题组已报道的方法^[21], 具体如下。

PCR 扩增: 将引物 P1、P2、收集模板、2×Taq DNA 聚合酶预混液、双蒸水混合, 95 °C 预变性 5 min, 变性 10 s, 59 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 30 s; 循环 20 次后, 72 °C 后延伸 10 min。

PCR 产物琼脂糖凝胶电泳: 将 PCR 产物与 DNA 凝胶加样缓冲液混匀后依次注入进样孔中, 90 V 下电泳 40 min, 用凝胶成像分析仪拍照记录。

产物浓缩: PCR 产物加入 3 mol/L 醋酸钠溶液及 -20 °C 预冷的无水乙醇混匀, 15 000 r/min 离心 15 min; 加入 70% 乙醇洗涤沉淀, 弃去乙醇, 沉淀干燥。

产物纯化: 切下琼脂糖凝胶电泳上目标条带, 转入 1.5 mL 离心管中, 捣碎后加入 ddH₂O, 振荡; 加入 Tris 饱和纯苯酚, 振荡后离心; 将上清液移入新离心管, 加入氯仿-异戊醇 (24:1, v/v), 振荡后离心; 将上清液移入新离心管, 加入无水乙醇, 3 mol/L 醋酸钠溶液, 混匀后离心, 弃去上清液, 室温下风干沉淀物。

1.3.3 序列分析与亲和力表征

核酸序列高通量测序及核酸适配体合成均由生

工生物公司完成, 使用 NUPACK 分析序列二级结构。平衡解离常数 K_D 计算参考 NECCEEM 方法^[22], 利用公式(1)进行计算。

$$K_D = \frac{P_0 \left(1 + \frac{A_{DNA}}{A_{diss} + A_{DNA \cdot P}} \right) - DNA_0}{1 + \frac{A_{diss} + A_{DNA \cdot P}}{A_{DNA}}} \quad (1)$$

其中, P_0 和 DNA_0 是 OGG1 和 ssDNA 的初始浓度, A_{DNA} 为游离 ssDNA 的峰面积, A_{diss} 为解离区峰面积, $A_{DNA \cdot P}$ 为 OGG1-ssDNA 复合物的峰面积。

1.3.4 分子对接

在 RCSB PDB 数据库中检索 ID 为 2XHI 的结构文件, 由 UCSF Chimera 对其进行可视化并绘制出 OGG1 的 3D 结构。适配体的 3D 结构最初由 RNA Composer 软件绘制, 再通过模式 RNA 网络服务器和 MDWeb 网络服务器转换为 DNA 3D 坐标。基于文献^[23] 和 Uniprot 数据库预测 OGG1 的结合残基, 利用 PatchDock 对接程序对 OGG1 与适配体进行全局刚性对接以预测二者的结合模式。对接和模拟过程都优先选择默认参数, 并通过 FireDock 方法^[24] 迅速消除 PatchDock 对接引入的空间冲突, 完成侧链位置和相对蛋白质方向的细化和优化。消除空间位阻后, 使用能量分析功能模块对接模型根据界面能量得分进行排序。最终选取的对接模型其界面能量得分是最小化的范德华力、去溶剂化、静电、氢键、二硫键、 π -堆积、脂类相互作用和旋转异构体偏好的加权组合。

2 结果与讨论

2.1 同步竞争法筛选 OGG1 核酸适配体

在竞争筛选方法中, 竞争蛋白的选择原则主要有两个, 一是可以选择不同的与核酸序列具有强结合能力的蛋白作为竞争蛋白以达到竞争筛选、提高筛选效率的目的; 二是选择与靶标蛋白具有明显不同电泳迁移时间的竞争蛋白, 以便于区别各自复合物峰, 从而高效收集靶标蛋白与核酸序列的复合物。参考本课题组建立的同步竞争筛选法, 并考虑 SSB 能够无序列选择性地与单链核酸以纳摩尔级别的 K_D 结合^[20], 且其复合物峰与 OGG1 复合物峰在电泳图谱中分离度较好, 能够作为竞争蛋白结合与 OGG1 结合力弱的序列, 因此选择 SSB 作为竞争靶标。将 OGG1 靶标、SSB 反靶标与 ssDNA 核酸库共同孵育。收集电泳图中的 OGG1-ssDNA 复合物部

分,进行 PCR 扩增、纯化及高通量测序。SSB 反筛靶的存在降低了靶标的非特异性结合,显著提高了筛选效率,有助于获得高亲和力、高特异性的适配体。

从图 2 可以看出,0.05 $\mu\text{mol/L}$ 的核酸库峰在 6 min 出现(见图 2a)。加入 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 的反筛靶 SSB 后,游离核酸峰降低,同时在 3.8 min 处出现 SSB-ssDNA 的复合物峰(见图 2b),由于该分离缓冲溶液条件下,加入的 SSB 蛋白羧基解离导致带负电的单链核酸本身带电性发生变化,荷质比变小,游离核酸峰迁移时间变快。加入 5.0 $\mu\text{mol/L}$ OGG1 后,游离核酸库峰面积降低,在 2.5 min 处出现 OGG1-ssDNA 复合物峰(见图 2c)。将 5.0 $\mu\text{mol/L}$ OGG1 和 1.0 $\mu\text{mol/L}$ SSB 及 ssDNA 库同时孵育,电泳图中出现两种复合物的峰(见图 2d)。因 SSB 蛋白与 ssDNA 之间具有强结合作用,增大其浓度可以对 OGG1 与 ssDNA 的结合形成竞争,从而增加对 OGG1 适配体的筛选压力。在图 2d~e 中,SSB 的浓度由 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 增加到 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 时,SSB-ssDNA 复合物的峰面积增大,OGG1-ssDNA 复合物的峰面积略有减小。增加 SSB 的浓度至 4.0 $\mu\text{mol/L}$ 和 8.0 $\mu\text{mol/L}$,结合加入不同浓度 SSB 后对 OGG1-ssDNA 复合物峰面积的统计(见图 3),OGG1-ssDNA 复合物的峰面积与 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 相比没有明显变化(见图 2a~f),说明 OGG1 与 ssDNA 已形成稳定的复合物。通过在 Beckman 毛细管电泳仪上设置相应的时间程序,收集 2.2~2.8 min 区段的 OGG1-ssDNA 复合物,直接进行 PCR 扩增和纯化后,由生工生物科技有限公司进行高通量测序。

2.2 高通量测序及结果分析

剔除测序结果中读码区段错误及引物多聚体,选择频次最高的 4 条序列 OGG1-Apt 1、2、4、6(见表 1)。利用 NUPACK、M-fold 软件模拟序列二级

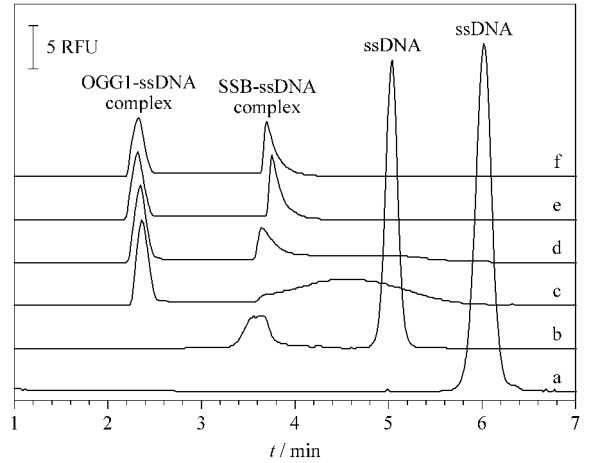


图 2 OGG1 蛋白的竞争筛选

Fig. 2 Competitive screening of OGG1

a. ssDNA (0.05 $\mu\text{mol/L}$); b. ssDNA (0.05 $\mu\text{mol/L}$) + SSB (1.0 $\mu\text{mol/L}$); c. ssDNA (0.05 $\mu\text{mol/L}$) + OGG1 (5.0 $\mu\text{mol/L}$); d. ssDNA (0.05 $\mu\text{mol/L}$) + OGG1 (5.0 $\mu\text{mol/L}$) + SSB (1.0 $\mu\text{mol/L}$); e. ssDNA (0.05 $\mu\text{mol/L}$) + OGG1 (5.0 $\mu\text{mol/L}$) + SSB (2.0 $\mu\text{mol/L}$); f. ssDNA (0.05 $\mu\text{mol/L}$) + OGG1 (5.0 $\mu\text{mol/L}$) + SSB (4.0 $\mu\text{mol/L}$).

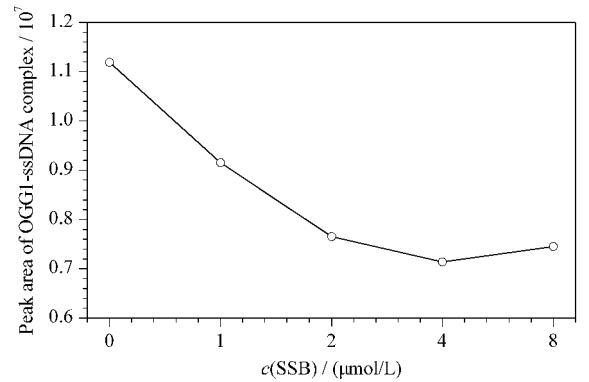


图 3 OGG1-ssDNA 复合物峰面积变化

Fig. 3 Peak area change of OGG1-ssDNA complex

结构及预测热力学参数,结果显示这些序列普遍形成茎环结构(见图 4)。OGG1-Apt 1 与 OGG1-Apt 2 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 时的 ΔG 较其他两条序列更低,说明这两条序列更易折叠成稳定的二级结构。

表 1 4 条候选适配体序列及其热力学参数

Table 1 Four candidate aptamer sequences and thermodynamic parameters

Aptamer	Sequence	$\Delta G/$ (J/mol)	$\Delta H/$ (J/mol)	$\Delta S/$ (J/(K·mol))	$T_m/$ $^{\circ}\text{C}$
OGG1-Apt 1	AGCAGCACAGAGGTTCAGATGGCCACATTAGTCTCACCCTACCT GCGTACCTACCGCCGCCCTATGCGTGCTACCGTGAA	-23571.67	-510789.38	-1571.34	52
OGG1-Apt 2	AGCAGCACAGAGGTTCAGATGTTGATGGCAGGTATTGCTAGGTCT ACATGGAACCTTGTTAACCTATGCGTGCTACCGTGAA	-26041.88	-539678.29	-1655.96	52.7
OGG1-Apt 4	AGCAGCACAGAGGTTCAGATGGCGAAGCGTACCGGCTACCCAGT GACAGTCGCCGTGGGTCCCTATGCGTGCTACCGTGAA	-30312.42	-458454.40	-1380.45	58.9
OGG1-Apt 6	AGCAGCACAGAGGTTCAGATGCCGATCGTTGTTCCCGATCAAGAT GGGAATCTCAGTCGCCCTATGCGTGCTACCGTGAA	-28763.30	-417005.10	-1251.49	59.9

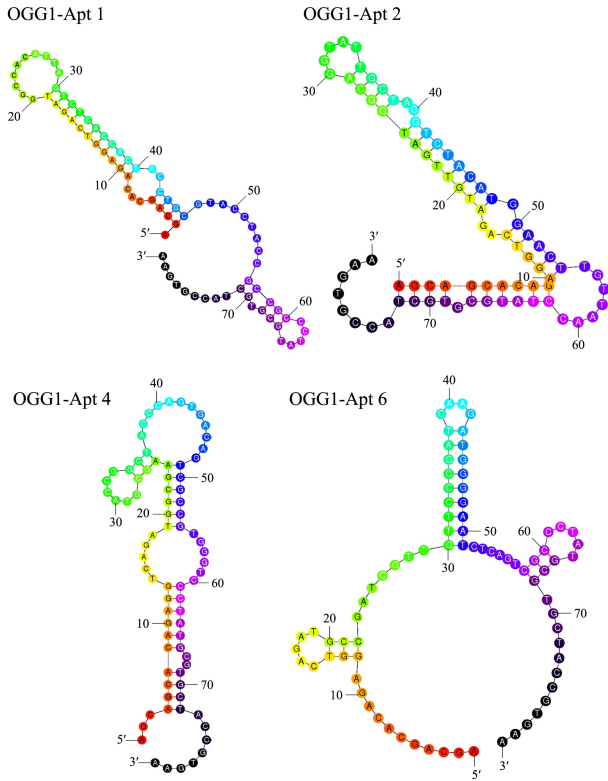


图 4 4 条候选序列的二级结构
Fig. 4 Secondary structure of four candidate aptamer sequences

2.3 候选适配体的亲和力表征

通过 CE 方法对 4 条候选序列 Apt 1、2、4、6 进行亲和力表征并计算其 K_D 值。图 5 中, 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 的 Apt 1、2、4、6 的电泳峰均在 5.3 min 处出现。加入 5.0 $\mu\text{mol/L}$ OGG1 后, 游离序列峰降低, 在 2.5 min 处出现复合物峰 (OGG1-Apt 1、2、4、6 复合物), 以及复合物峰与游离序列峰之间的解离区。通过对复合物峰、解离区、游离核酸峰三者峰面积的处理计算, OGG1-Apt 1、2、4、6 的 K_D 值分别为 $1.7 \pm 0.1 \mu\text{mol/L}$ 、 $2.6 \pm 0.2 \mu\text{mol/L}$ 、 $2.8 \pm 0.2 \mu\text{mol/L}$ 、 $1.8 \pm 0.1 \mu\text{mol/L}$ (见图 5)。

2.4 多轮筛选法筛选 OGG1 核酸适配体

多轮筛选法是将核酸库和靶标混合物孵育后进行, 收集核酸-靶标复合物, 并进行 PCR 扩增、核酸纯化, 得到次级库 (Sub-ssDNA), 然后进行下一轮筛选。通常在 4 轮以内便能得到高亲和力的适配体。为了验证竞争筛选的结果, 在相同的筛选条件下又采用多轮筛选法进行了筛选验证。

在第一轮筛选中, 将 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 的 ssDNA 核酸库与 5.0 $\mu\text{mol/L}$ OGG1 混合孵育 15 min 后, 进

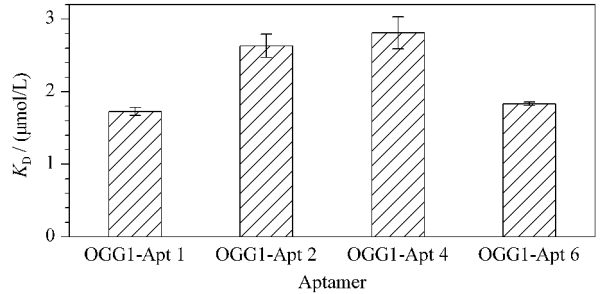
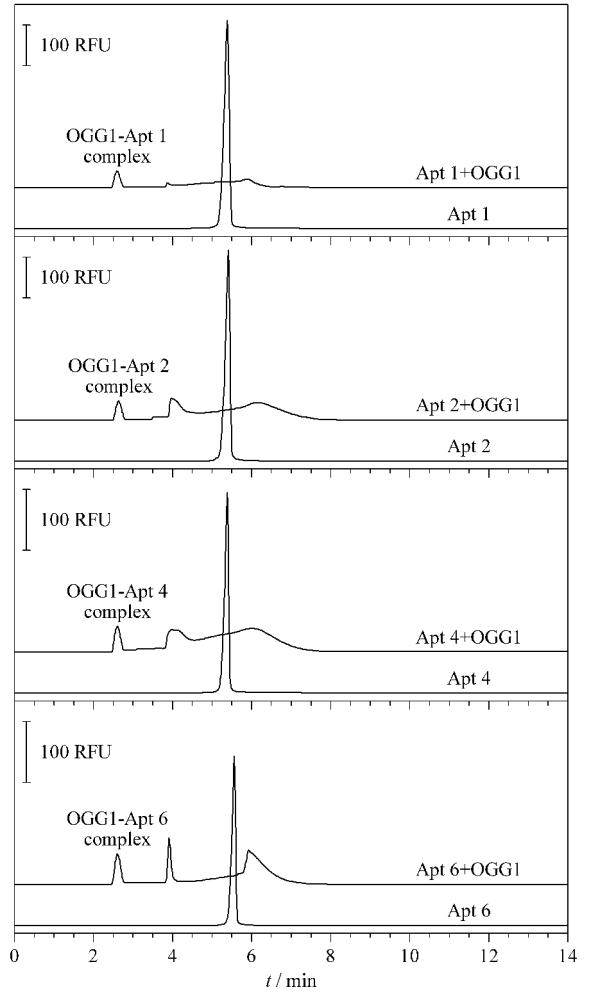


图 5 候选序列与 OGG1 结合的电泳图及 K_D 值 ($n=3$)
Fig. 5 Electrophoretograms and K_D values ($n=3$) of Apt 1, 2, 4, 6 binding to OGG1
 Apt 1, 2, 4, 6: 0.2 $\mu\text{mol/L}$; OGG1: 5.0 $\mu\text{mol/L}$.

行 CE 分析。在图 6-Round 1 中, 游离核酸峰出现在 5.1 min 处, 加入 OGG1 后, 游离核酸峰面积降低, 在 2.5 min 处出现 OGG1-ssDNA 复合物峰。设置相应的时间程序, 对区间 2.0~3.0 min 的复合物进行收集, 经对称 PCR 扩增、不对称 PCR 扩增及纯化过程, 得到第一轮次级库 (Sub ssDNA1) 以用于第二轮筛选。将第一轮得到的次级库与 5.0

$\mu\text{mol/L}$ OGG1 混合孵育 15 min 后,进行 CE 分析,在图 6-Round 2 中,加入 OGG1 后游离 Sub ssDNA1 峰面积显著降低,在 2.5 min 处出现复合物峰,收集 1.8~3.0 min 区段复合物。经对称 PCR 扩增、不对称 PCR 扩增及纯化过程,得到第二轮的次级库 (Sub ssDNA2) 以用于第三轮筛选。保持筛选条件不变,将 Sub ssDNA2 与 OGG1 混合孵育进行第三轮筛选(图 6-Round 3),收集 1.9~3.0 min 区段内复合物。随着筛选轮次的不断增加,与靶标弱结合的核酸序列不断被去除,使得亲和力更高的核酸序列保留下来。经三轮筛选后,分别计算蛋白与核酸初始库和次级库间的 K_D 值:第一轮 K_D 值为 $3.0 \mu\text{mol/L}$,第二轮 K_D 值为 $0.8 \mu\text{mol/L}$,第三轮为 $1.0 \mu\text{mol/L}$ 。实验结果表明,第二轮获得的核酸序列的亲和力较第一轮有一个数量级的提升,第三轮与第二轮所得核酸序列亲和力差别不大,并略弱于第二轮。因此,将第二轮获得的次级库经 PCR 扩增、纯化,送至生工生物科技有限公司进行高通量测序。

2.5 高通量测序及结果分析

分析高通量测序结果,去除测序结果中读码区段错误及引物多聚体,选取其中最高频次的 3 条序列。将结果与竞争筛选法得到的序列进行对比(见表 2),多轮筛选法筛选出的 3 条适配体序列与竞争法得到频次最高的 3 条适配体的序列相同。在多轮筛选中经过 3 轮筛选得到的序列频次最高达到 1 521 次,而竞争筛选方法得到的适配体频次则较为均一(100 次左右),多轮筛选过程是将可与靶标结合的核酸序列通过逐轮筛选富集,而同步竞争筛选法则是在共同孵育时,为靶标提供了一个强结合的反筛靶,通过竞争结合以更有效地获得高亲和力和

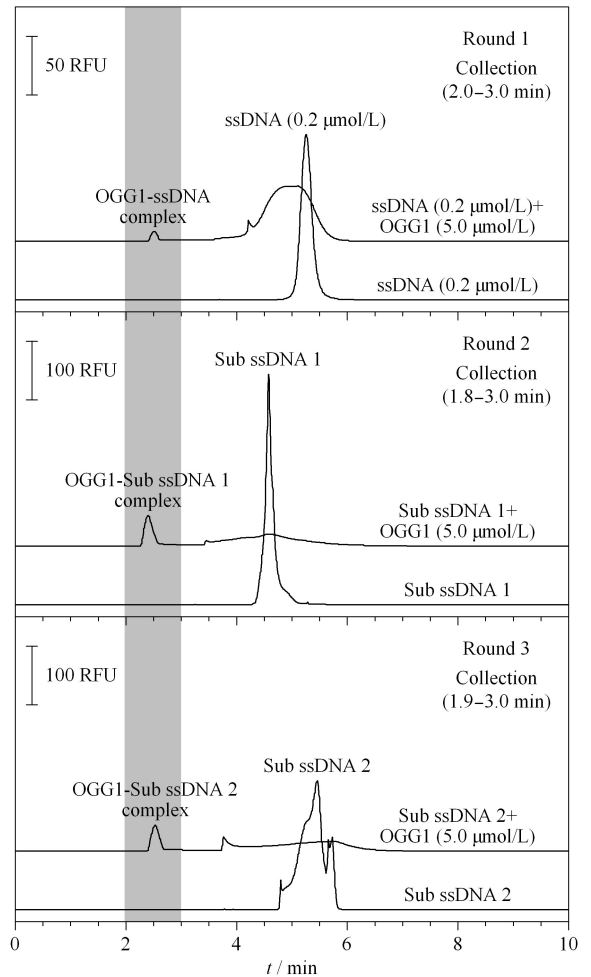


图 6 OGG1 蛋白适配体 3 轮筛选的电泳图
Fig. 6 Electrophoretograms of three rounds screening of OGG1 protein's aptamer

高特异性的适配体序列。因此当存在合适的竞争蛋白的情况下,同步竞争筛选法仅通过一轮筛选即可获得亲和力和特异性更好的适配体,且使筛选过程加快,筛选时间和费用成本降低。

表 2 多轮筛选与竞争筛选序列对比

Table 2 Sequence comparison between multi round screening and competitive screening

Method	Sequence (5'-3')	Copy
Multi-round selection	AGCAGCACAGAGGTCAGATGGCCACATTAGTCTCACCACACTACCTGCGTACCTACCGCCGCC TATGCGTGCTACCGTGAA	1521
	AGCAGCACAGAGGTCAGATGTTGATGGCAGGTATTGCTAGGTCTACATGGAACCTGTTAACC TATGCGTGCTACCGTGAA	760
	AGCAGCACAGAGGTCAGATGGCGAAGCGTACCGGCTACCCAGTGACAGTCGCGGTGGGTCCC TATGCGTGCTACCGTGAA	36
One-round pressure controllable selection	AGCAGCACAGAGGTCAGATGGCCACATTAGTCTCACCACACTACCTGCGTACCTACCGCCGCC TATGCGTGCTACCGTGAA	132
	AGCAGCACAGAGGTCAGATGGCGAAGCGTACCGGCTACCCAGTGACAGTCGCGGTGGGTCCC TATGCGTGCTACCGTGAA	91
	AGCAGCACAGAGGTCAGATGTTGATGGCAGGTATTGCTAGGTCTACATGGAACCTGTTAACC TATGCGTGCTACCGTGAA	17

2.6 OGG1 与 Apt 1 的分子对接分析

PatchDock 是一种高效的基于几何形状互补增强的刚性对接方法。在 PatchDock 中输入两个分子的序列,并计算其中一个作为配体的分子相对于另一个作为受体的分子的三维变换。本次分析的两个分子是其中亲和力最高的 OGG1-Apt 1 及 OGG1,根据给定的分子,PatchDock 首先根据表面形状(凹陷,凸起或平整)将其表面分解成几个模块。然后,它执行几何散列算法以匹配具有平整形状的区域和具有凸起形状模块,并生成一组有效的变换。将一组评分函数应用于每个候选变换来进行更深入的评估用以估计所获得的复合物的原子去溶剂化能量和形状互补性。最后,应用均方根偏差聚类(RMSD)将冗余的解决方案排除。在 PatchDock 成功对接并由 FireDock 进行细化后,选择 10 个原始的对接结果进行结合分析。

通过使用 PyMol^[25] 进行对接结果分析,并基于全局自由能和结合残基选择最优的 3 个结果。

OGG1 在 245~270 位氨基酸残基处都具有螺旋-发夹-螺旋结构,该处是 DNA 的结合部位,同样也是酶的催化活性部位;Arg154 和 Arg204 构成了识别 8-oxoG-C 碱基对的基础结构^[26]; Asn149 能够利用氢键将 8-oxoG 与 OGG1 形成的空隙填补; Cys249 和 Phe319 之间会形成 OGG1 对 8-oxoG 的识别口袋,当氧化损伤发生产生的 8-oxoG 被修复时会插入该识别口袋; Gln315 也对蛋白对底物的识别有用。分析对接结果显示从 5'~3'端的 50~80 位的适配体残基与指定用于 DNA 和 8-氧代鸟嘌呤结合的两个主要活性位点结合(见图 7)。在 OGG1 适配体复合物中观察到不同类型的相互作用,即 56 个极性接触、26 个范德华相互作用、39 个氢键、6 个疏水相互作用、14 个离子相互作用和 70 个芳族相互作用。分子对接结果表明所筛选的适配体的 50、51 位胞嘧啶能与 Arg154 和 Arg204 形成氢键,且能够结合在 OGG1 蛋白的识别口袋上。

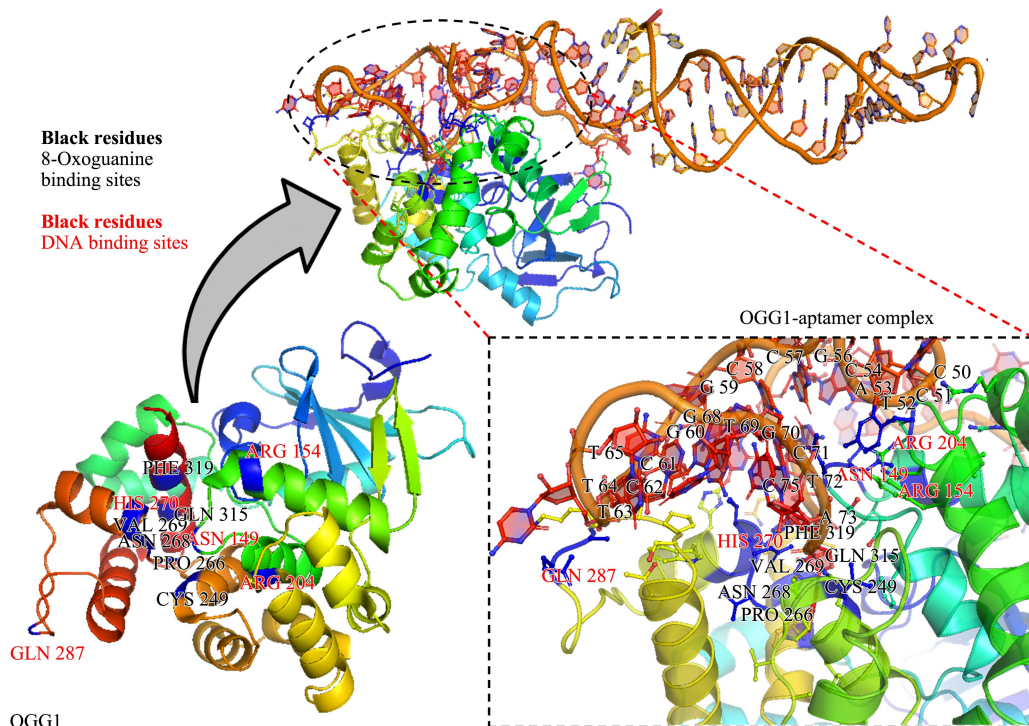


图 7 OGG1 的活性位点的残基名称和标识符

Fig. 7 Residue names and identifiers of active sites of OGG1

OGG1-Apt 1 complex showed that the binding of the last 50~80 residues (from 5' to 3') was involved in the inhibition of the active site of OGG1.

3 结论

本文建立和比较了两种 OGG1 蛋白的核酸适

配体筛选方法,即同步竞争筛选法及多轮筛选法。二者筛选到的 3 条适配体序列相同,同步竞争筛选法效率更高,可通过一轮筛选获得高亲和力、高特异

性的适配体。分子对接分析表明,所筛选的 Apt 1 适配体可能结合于 OGG1 蛋白的活性口袋中,表明该适配体有望作为 OGG1 潜在的功能调控因子,抑制其修复作用。适配体对 OGG1 作用的相关研究正在进一步展开。

参考文献:

- [1] Li R, Jia Z, Trush M A. *React Oxyg Species (Apex)*, 2016, 1(1): 9
- [2] Bauer N C, Corbett A H, Doetsch P W. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(21): 10083
- [3] Seeborg E, Eide L, Bjørås M. *Trends in Biochemical Sciences*, 1995, 20(10): 391
- [4] Nyaga S G, Lohani A, Jaruga P, et al. *BMC Cancer*, 2006 (6): 297
- [5] Xu B, Sathitsuksanoh N, Tang Y, et al. *PLoS One*, 2012, 7 (12): e47399
- [6] Curtin N J. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12(12): 801
- [7] Mohamed R H, El Shal A S, El Shahawy E E, et al. *Gene*, 2016, 578(1): 112
- [8] Bacsı A, Aguilera L, Szczesny B, et al. *DNA Repair (Amst)*, 2013, 12(1): 18
- [9] Simon H, Vartanian V, Wong M H, et al. *PLoS One*, 2020, 15(1): e0227501
- [10] Donley N, Jaruga P, Coskun E, et al. *ACS Chem Biol*, 2015, 10(10): 2334
- [11] Visnes T, Cazares Korner A, Hao W J, et al. *Science*, 2018, 362(6416): 834
- [12] Gong Q, Wang J, Ahmad K M, et al. *Anal Chem*, 2012, 84 (12): 5365
- [13] Li L S, Zhao Y, Wang H M, et al. *Chinese Journal of Chromatography*, 2019, 37(5): 463
李林森, 赵毅, 汪慧敏, 等. 色谱, 2019, 37(5): 463
- [14] Zhu C, Yang G, Ghulam M, et al. *Biotechnol Adv*, 2019, 37(8): 107432
- [15] Yu F Z, Zhang D P, Yuan Z, et al. *Chinese Journal of Chromatography*, 2020, 38(10): 1133
余方志, 章大鹏, 袁征, 等. 色谱, 2020, 38(10): 1133
- [16] Yang G, Han S M, Zhao L P, et al. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2020, 48(5): 601
杨歌, 韩诗邈, 赵丽萍, 等. 分析化学, 2020, 48(5): 601
- [17] Li Q, Zhao X Y, Liu H Y, et al. *J Chromatogr A*, 2014, 1364: 289
- [18] Zhu C, Li L S, Yang G, et al. *Biochem Biophys Res*, 2018, 506(1): 169
- [19] Riley K R, Satio S, Gagliano J, et al. *J Chromatogr A*, 2014, 1368: 183
- [20] Yang G, Zhu C, Zhao L, et al. *Chin Chem Lett*, 2020, 32 (1): 218
- [21] Yang G, Zhu C, Liu X H, et al. *Chinese J Anal Chem*, 2018 (10): 1595
- [22] Berezovski M, Drabovich A, Krylova S M, et al. *J Am Chem Soc*, 2005, 127(9): 3165
- [23] Dina S D, Yuval I, Ruth N, et al. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(Web Server issue): W363
- [24] Andrusier N, Nussinov R, Wolfson H J. *Proteins*, 2007, 69: 139
- [25] Lill M A, Danielson M L. *J Comput Aided Mol Des*, 2011, 25(1): 13
- [26] David S S, O'shea V L, Kundu S. *Nature*, 2007, 47(7147): 941