

文章编号: 1000-5404(2014)04-0307-06

论著

**SELEX 技术筛选钙通道特异性核酸适配体及其抗肥大细胞活化的作用**

杨永强<sup>1</sup>, 陈晓红<sup>2</sup>, 李怡然<sup>2</sup>, 陈波<sup>2</sup>, 冉新泽<sup>3</sup>, 杨涛<sup>1</sup>, 孙仁山<sup>1</sup> (400042 重庆, 第三军医大学大坪医院野战外科研究所皮肤科<sup>1</sup>; 400038 重庆, 第三军医大学: 药理学教研室<sup>2</sup>, 军事预防医学院全军复合伤研究所, 创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室<sup>3</sup>)

**[摘要]** 目的 筛选针对 Orai1 分子第 1 膜外区蛋白的核酸适配体, 探讨适配体通过拮抗钙离子释放激活通道 (Ca<sup>2+</sup> release activation channel, CRAC) 抑制肥大细胞活化的效应。方法 构建随机单链 DNA 文库, 利用不对称 PCR 对单链 DNA 文库进行扩增。采用聚苯乙烯酶联板为介质的指数富集配体系统进化 (systematic evolution of ligand by exponential enrichment, SELEX) 技术筛选核酸适配体。利用酶联免疫吸附实验检测各轮筛选序列与靶蛋白的亲合力, 验证适配体与靶蛋白的特异性结合; 激光共聚焦显微镜观察适配体对细胞内钙离子浓度变化的影响; 利用 IgE 介导的肥大细胞脱颗粒模型, 观察适配体对 β-氨基己糖苷酶释放的抑制效应。结果 经过 12 轮 SELEX 筛选, 获得了 7 条核酸适配体, 其中 AptamerY1 解离常数 (Kd 值) 为 1.72 × 10<sup>-8</sup> mol/L。以终浓度 2 μg/mL 的 AptamerY1 可抑制由 IgE 介导的人肥大细胞系 LAD2 钙离子内流, 并对 LAD2 细胞的 β-氨基己糖苷酶释放抑制率达 95%。结论 通过 SELEX 筛选, 获得了 7 条针对 Orai1 分子第 1 膜外区的核酸适配体, 所获得适配体可对肥大细胞 LAD2 钙内流有效抑制, 进而抑制肥大细胞活化和 β-氨基己糖苷酶的释放。

**[关键词]** 肥大细胞; SELEX 选体技术; 钙离子释放激活通道; β-氨基己糖苷酶

**[中图分类号]** R392.33; R392.12; R392.2

**[文献标志码]** A

**Calcium channel-specific oligonucleotide aptamers selected by SELEX inhibit mast cell activation**

Yang Yongqiang<sup>1</sup>, Chen Xiaohong<sup>2</sup>, Li Yiran<sup>2</sup>, Chen Bo<sup>2</sup>, Ran Xinze<sup>3</sup>, Yang Tao<sup>1</sup>, Sun Renshan<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Department of Dermatology, Institute of Battle Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042; <sup>2</sup>Department of pharmacology, College of Pharmacy, <sup>3</sup>State Key Laboratory of Trauma, Burns, and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

**[Abstract]** **Objective** To screen the oligonucleotide aptamers for the first extracellular domain of Orai1 protein in order to determine the inhibitory effects of aptamers on mast cells activation by Ca<sup>2+</sup> release activation channel (CRAC). **Methods** Random single-strand DNA (ssDNA) library was constructed. The key parameters of asymmetric PCR were optimized to amplify ssDNA library. The oligonucleotide aptamers were screened by systematic evolution of ligand by exponential enrichment (SELEX) technology with enzyme-linked polystyrene plate as medium. The affinity between ssDNA library and target protein was examined in each round by ELISA. The changes of intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration in LAD2 mast cell line were tested by laser confocal microscopy. The β-hexosaminidase release from LAD2 cells was measured so that the aptamer effects on mast cell activation mediated by IgE could be evaluated. **Results** Seven oligonucleotide aptamers were obtained after 12 rounds of SELEX. The Kd value of Aptamer Y1 reached 1.72 × 10<sup>-8</sup> mol/L. Aptamer Y1 at the final concentration 2 μg/mL decreased the calcium entry and inhibited the β-hexosaminidase release from LAD2 cells by 95%. **Conclusion** The seven oligonucleotide aptamers targeting the first extracellular domain of Orai1 protein are obtained by SELEX technology. The aptamers can decrease intracellular calcium influx and inhibit the release of β-hexosaminidase from LAD2 cells effectively, and therefore, inhibit mast cell activation through CRAC channels.

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30972647)

**[通信作者]** 孙仁山 E-mail: pharsunr@126.com

**[优先出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131129.1809.007.html> (2013-11-29)

[Key words] mast cells; SELEX aptamer technique;  $Ca^{2+}$  release activation channel;  $\beta$ -hexosaminidase

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30972647). Corresponding author: Sun Renshan, E-mail: pharsunr@126.com

2006年 Feske 等<sup>[1]</sup> 识别出一种新蛋白,命名为 Orai1,证实了 Orai1 蛋白是钙离子释放激活通道( $Ca^{2+}$  release activation channel, CRAC)的组成部分。20世纪90年代 SELEX 技术<sup>[2]</sup> 问世,由此获得的适配体可与靶分子高特异性和高亲和力地结合。适配体的另外一个优点是没有免疫原性<sup>[3]</sup>,故在临床上具有广泛和潜在的应用价值。速发型过敏反应的关键环节是激活肥大细胞,活化的主要标志是脱颗粒反应。 $Ca^{2+}$  从细胞外经 CRAC 通道迅速进入细胞内是有效激活肥大细胞、产生脱颗粒反应的充分和必要条件<sup>[4]</sup>。现在已经明确 Orai1 是细胞膜表面蛋白,具有4个跨膜区域,2个膜外区<sup>[5]</sup>。Orai1 第1膜外区 D110 和 D112 位的带负电荷的天冬氨酸密码子突变为编码中性的甘氨酸密码子,突变体 cDNA 转染 HEK293 细胞,可使 Orai1 丧失对钙离子的通道功能<sup>[6]</sup>。因此,采用化合物结合 Orai1 第1膜外区,改变其电荷分布,有可能终止 Orai1 的钙通道功能。本研究以 Orai1 分子第1膜外区蛋白为靶分子,采用 SELEX 技术筛选适配体,利用 IgE 介导的 LAD2 细胞脱颗粒模型,研究适配体对肥大细胞钙通道的抑制效应,旨在为研究适配体用于 IgE 介导的 I 型超敏反应的治疗提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与主要试剂

目的蛋白为 Orai1 膜外区 11 个氨基酸残基的短肽(氨基酸顺序为 N-DADHDYPPGLL-C)、对照蛋白 Cd4215(氨基酸顺序为 N-LIPTHTQPSY-C)、IgE 寡肽均由北京赛百盛公司合成;  $2 \times Taq$  Mix、PMD19-T Simple vector 购自 TaKaRa 公司;STEMPRO-34 SFM Complete Medium、琼脂糖购自 Invitrogen 公司;凝胶回收试剂盒购自 Omega 公司;HRP-labeled Streptavidin 购自碧云天公司;Biotin-IgE 购自 USBiological 公司;人体干细胞因子购自 Peprotech 公司;链霉素和素购自上海生工公司;BSA 购自 Sigma 公司;96 孔可拆酶联板购自 Corning 公司;SELEX 筛选缓冲液及台式液根据文献<sup>[7]</sup> 配制,所用化学试剂均为国产分析纯。

### 1.2 方法

1.2.1 随机单链 DNA(ssDNA)文库的构建和引物的合成  
构建长度为 80 nt 的随机 ssDNA 文库,两端为固定序列,中间含 39 个随机碱基序列,5'-CTTCTGCCCGCCTCCTCC-(39N)-GGAGACGAGATAGCGGACACT-3';上游引物 P1 为 5'-CTTCTGCCCGCCTCCTCC-3',下游引物 P2 为 5'-AGTGTCCGCTATC-TCGTCTCC-3',生物素标下游引物(biotin-P2)为 5'-biotin-AGTGTCCGCTATC-TCGTCTCC-3'。随机 ssDNA 文库和引物由上海英骏生物公司合成。3 条对照序列 HSP27-UP: 5'-TCAAGCT-TATGACCGAGCGCCGCTGCC-3'; TRIM72-UP: 5'-TAGGATC-

CCCAGACCTGCCCGCCATGT-3'; UP-2.5: 5'-GGTACCGCAGAA-TTGGAAGAGATAGA-3'。序列由本校药理学教研室陈晓红教授提供 3 条对照序列和 AptamerY1 序列由上海百力格公司进行生物素化合成。

1.2.2 LAD2 细胞的培养 LAD2 细胞由美国哥伦比亚大学 Michael D. Gershon, MD 惠赠。细胞培养于 50 mL 的培养瓶中,每瓶 5 mL 完全培养基。完全培养基包含 Stem Pro-34 Nutrient Supplement、100 U/mL 青霉素、100  $\mu$ g/mL 链霉素、2 mmol/L 谷氨酰胺、100 ng/mL 人体干细胞因子。细胞密度应维持在  $0.5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^6$  /mL,每周半量更换新鲜培养基<sup>[8]</sup>。

1.2.3 直接不对称 PCR 法制备 ssDNA 文库的优化 ssDNA 文库 1  $\mu$ L (100 pmol),  $2 \times Taq$  Mix 15  $\mu$ L,具有比例关系的 P1:P2 (1:50, 1:100),加去离子水至总体积为 30  $\mu$ L。PCR 扩增条件:94  $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94  $^{\circ}$ C 变性 30 s,55~65  $^{\circ}$ C 退火 30 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s,35 个循环;最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

1.2.4 ssDNA 文库合成双链 DNA(dsDNA) ssDNA 文库 4  $\mu$ L (20 pmol),  $2 \times Taq$  Mix 15  $\mu$ L, P1 2  $\mu$ L, P2 2  $\mu$ L,  $2 \times Taq$  Mix 10  $\mu$ L,加去离子水至总体积为 20  $\mu$ L。PCR 扩增条件:94  $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94  $^{\circ}$ C 变性 30 s,58  $^{\circ}$ C 退火 30 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s,35 个循环;最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

1.2.5 酶联板为介质的 SELEX 筛选 根据文献<sup>[7-8]</sup>,略加改进进行。按预先设定的实验参数,用包被缓冲液将 Orai1 蛋白包被到酶联板中,37  $^{\circ}$ C 3 h 或 4  $^{\circ}$ C 过夜,同时设置未包被蛋白的空白孔。拍干后,用 1% BSA 37  $^{\circ}$ C 封闭 1 h。不对称 PCR 产物切胶回收,按参数设定用结合缓冲液混匀后加入到空白孔中,37  $^{\circ}$ C 孵育,反向筛选去除与 BSA 和微孔结合的序列,然后转移到包被孔中继续孵育,孵育时间根据参数减少。弃去结合缓冲液,用冲洗缓冲液冲洗包被孔,冲洗次数根据参数增加。甩干后加入洗脱缓冲液 80  $^{\circ}$ C 作用 10 min。向洗脱液中加入等体积的酚/氯仿/异戊醇溶液进行抽提,氯仿/异戊醇再抽提,经乙醇沉淀后,TE 缓冲液保存获得筛选产物,用于下一轮筛选及亲和力检测。

1.2.6 酶联免疫吸附实验(ELISA)检测亲和力 用 P1 和 biotin-P2 对筛选产物进行 PCR 扩增,电泳观察目的条带,切胶回收。取 10  $\mu$ g 目的蛋白 37  $^{\circ}$ C 3 h 或 4  $^{\circ}$ C 过夜包被,同时设空白孔,洗涤,用 1% BSA 37  $^{\circ}$ C 封闭 1 h,洗涤,各轮 selex 纯化产物 0.1  $\mu$ g 在 selex 结合缓冲液中 37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h。selex 冲洗缓冲液洗涤 6 次,加入 100  $\mu$ L 1:2 000 稀释的辣根过氧化物酶标记链霉素 37  $^{\circ}$ C 孵育 40 min。PBST 缓冲液洗涤 4 次,然后加入四甲基联苯胺 37  $^{\circ}$ C 10 min 2 mol/L 浓硫酸终止反应,用酶标仪测 450 nm 光密度值 [ $D(450)$ ]。

1.2.7 连接转化克隆测序及结构分析 由亲和力检测值确定 SELEX 筛选轮数,得到的 ssDNA 文库经 PCR 扩增至 dsDNA,琼脂糖凝胶电泳,DNA 回收试剂盒纯化回收产物,将其与 pMD19-T 连接,转化 DH5 $\alpha$  感受态大肠杆菌。蓝白斑筛选,挑取 22 个白色菌落摇菌培养,随机挑选 6 瓶菌液,PCR 法鉴定阳性克隆,将摇菌后的菌液送上海英骏公司测序。用 DNAMAN

软件分析其空间结构。测序后的适配子序列进行人工合成,并用ELISA检测适配子与靶蛋白的亲合力。

### 1.2.8 核酸适配体对IgE介导β-氨基己糖苷酶释放的影响

根据文献[9-10]略加改进进行。用台式液配制 $1 \times 10^6$ /mL LAD2细胞悬液。取6个EP管,每管0.5 mL。标记总酶组, Biotin-IgE + Streptavidin组, Aptamer组,并以SELEX第1轮筛选产物作对照组。实验设置空白调零孔。总酶组细胞 $1\,000\text{ r/min} \times 5\text{ min}$ 离心后加500 μL的Triton X-100,其余各管加Biotin-IgE(终浓度500 ng/mL),重悬后放37℃孵育2 h。适配体组分别加Aptamer Y1、Y6、Y22(终浓度为2 μg/mL) 10 μL,对照组加第1轮筛选产物21 μL(终浓度为2 μg/mL)。5 min后上述4管及Biotin-IgE + Streptavidin组分别加链霉亲和素(终浓度为500 ng/mL) 37℃孵育30 min。将各管 $1\,000\text{ r/min} \times 5\text{ min}$ 离心后吸取各孔细胞上清液30 μL于96孔板上,加入50 μL的β-氨基己糖与30 μL细胞上清液在37℃孵育2 h。2 h后100 μL 0.1 mol/L的 $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 终止反应,并用酶标仪检测405 nm下的光密度值 $[D(405)]$ 。实验中采用3个平行实验管,重复实验3次。

### 1.2.9 特异性结合的检测

将目的蛋白Orail,对照蛋白Cd32-4215蛋白、IgE寡肽、BSA蛋白配制成浓度为100 μg/mL溶液,采用生物素标记的Aptamer Y1与其进行亲合力检测;将生物素化的Aptamer Y1、HSP27-UP、TRIM72-UP、UP-2.5配制浓度为10 μmol/L溶液,检测上述寡核苷酸与目的蛋白Orail的亲合力。实验步骤同1.2.6所述的酶联免疫吸附实验。实验中采用3个平行实验管,重复实验3次。

### 1.2.10 解离常数(Kd值)的检测

根据文献[7,11]略加改进进行。将Aptamer Y1溶解在0.05 mol/L碳酸缓冲液(pH 9.5)中,终浓度为1 μg/mL。每孔100 μL将溶液加到96孔板中4℃包被过夜。以含1% BSA的PBS溶液对板进行封闭,将板干燥后在4℃保存备用。配制Orail蛋白溶液初始浓度为5 ng/mL( $4 \times 10^{-9}$  mol/L),Aptamer Y1的初始浓度为1 μg/mL( $80 \times 10^{-9}$  mol/L),向下倍比稀释(表2)和Orail蛋白混合建立8个反应系统。在37℃反应1 h,以每孔100 μL的量将反应液以双孔加入到包被了适配体的免疫反应板。37℃孵育1 h后洗板5次,加入100 μL生物素化Aptamer Y1溶液37℃反应30 min,然后加入50 μL过氧化物酶标记的链霉亲和素37℃反应30 min,洗板5次,加入底物显色15 min后加入50 μL浓硫酸终止反应,测定 $D(450)$ 值计算各个反应溶液的抗原结合率,并按公式计算Kd值。

### 1.2.11 激光共聚焦观察核酸适配体对LAD2细胞内钙内流的影响

根据文献[12]略加改进进行。实验设置1组:阴性对照组;2组: Biotin-IgE + Streptavidin组;3组: Aptamer Y1抑制组;4组: HSP27-UP对照组。各制备细胞样本0.5 mL,细胞浓度为 $1 \times 10^6$ /mL。在每组样本观察前加入Streptavidin(100 ng/mL)激活。1组:细胞不用IgE致敏,直接加Fluo-4-AM避光染色30 min, $1\,000\text{ r/min} \times 5\text{ min}$ ,加台式液重悬后转入专用平皿。2组:将细胞用IgE致敏,混匀后孵育2 h, $1\,000\text{ r/min} \times 5\text{ min}$ ,加台式液重悬后用5 μmol/L的Fluo-4-AM避光染色30 min, $1\,000\text{ r/min} \times 5\text{ min}$ 。加台式液重悬后转入共聚焦专用平皿。3组:在Fluo-4-AM避光染色后, $1\,000\text{ r/min} \times 5\text{ min}$ 离心重悬

后加入Aptamer Y1(终浓度为2 μg/mL)孵育5 min后,余步骤同2组。4组:在Fluo-4-AM避光染色后, $1\,000\text{ r/min} \times 5\text{ min}$ 离心重悬后加入HSP27-UP(终浓度为2 μg/mL)孵育5 min后,余步骤同2组。观察前用500 ng/mL链霉亲和素激活后立即观察。观察过程中每隔5 s采集1张图片,加链霉亲和素前1 min为基线,加入Streptavidin后观察约4 min。

### 1.3 统计学分析

采用SPSS 13.0统计软件进行数据分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用两样本均数t检验。多组间比较采用单因素方差分析。

## 2 结果

### 2.1 PCR扩增条件的优化结果

不对称PCR扩增条件的优化对于ssDNA次级文库的生成、筛选的成功至关重要。本实验对退火温度和上下游引物比进行了优化。通过对比发现:(1)退火温度在64.3℃时目的片段较为明显且杂带及拖尾少;(2)上下游引物浓度为1:50时目的条带较为明显。以上2个因素的优化已基本能够满足筛选的需要,循环次数为35次。

### 2.2 SELEX筛选

通过12轮筛选,第11轮后 $D(450)$ 值不再升高。这说明经过12轮筛选后获得的ssDNA文库与Orail蛋白的亲合力基本达到饱和(图1)。SELEX各轮筛选产物电泳结果发现,产物条带逐渐单一,且比初始文库更为致密(图2)。因此,经过12轮筛选可以获得与靶蛋白高亲和力的ssDNA文库。

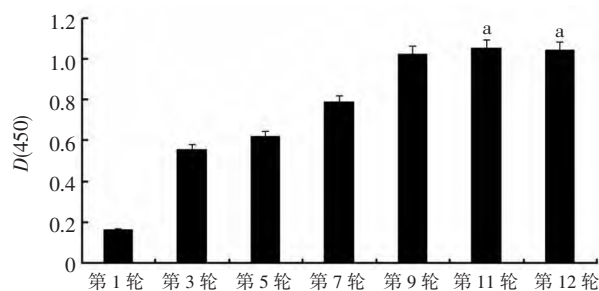


图1 12轮筛选获得的ssDNA与Orail之间的亲合力检测  
a:  $P < 0.05$ ,与第9轮 $D(450)$ 值比较

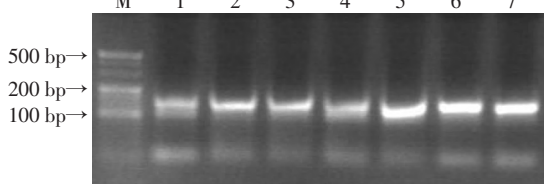
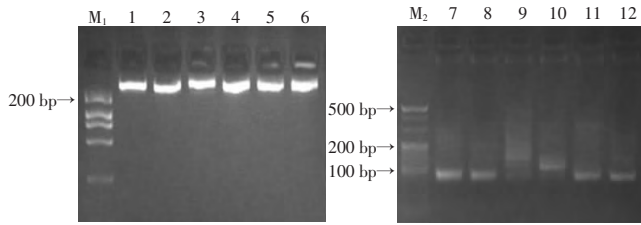


图2 SELEX各轮筛选产物电泳结果  
M: 20bp DNA Ladder标准; 1: 第1轮; 2: 第3轮; 3: 第5轮; 4: 第7轮; 5: 第9轮; 6: 第11轮; 7: 第12轮

### 2.3 适配体的连接转化及克隆

对第11轮筛选产物进行PCR扩增双链DNA(dsDNA),切胶回收目的条带后与载体pMD19-T连接,转化DH5α感受态细胞。蓝白斑筛选及摇菌后,随机取其中6瓶菌落抽提质粒后PCR法鉴定目的片段。图3表明目的片段连接克隆成功。



M<sub>1</sub>: DL2000 DNA 标准, 1~6: 随机抽取的6条质粒; M<sub>2</sub>: 20 bp DNA Ladder 标准; 7~12: 随机抽提的6条目的片段

图3 目的片段与 pMD19-T 连接效果的鉴定

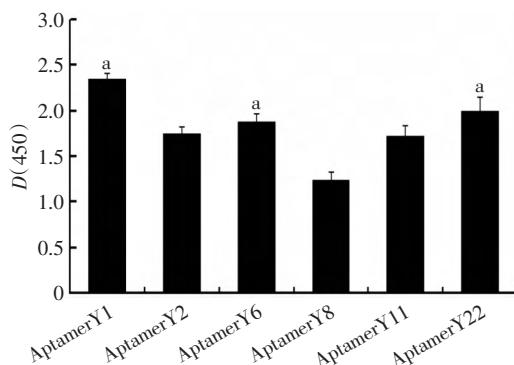
#### 2.4 测序结果及亲和力检测

将22个克隆子送测序,分别标记为 AptamerY1-Y22,结果显示,成功筛选到7条序列。其中随机序列段的一级结构如表1。通过序列对比发现 AptamerY1 与 Aptamer14 相似度为100%, AptamerY2 与 AptamerY22 有1个碱基不同, AptamerY6 与 AptamerY11 有1个碱基不同。因此有6条序列,4条40个碱基,2条51个碱基。采用 DNAMAN 软件分析其二级结构,表明茎环和口袋结构为主要的结构形式,提示其可能是适配体与人 Orail 蛋白特异性结合的基础。每条序列的中间随机序列部分如表1所示。

表1 12轮筛选后的核酸适配体(省略两端固定序列)

序列编号	一级结构
AptamerY1	5'-CCAGTAGCCATACCCGGTTTGTGGATGGGGTGTATGCCAGT-3'
AptamerY2	5'-GATGGTGGATTGGAGCTTGTCCGCAAAAGGGTTCACCACAT-3'
AptamerY6	5'-CGATGGCCTGCCCGATTTCCGGAGGGGCGATCTGCACATG- CCGCAACGGG-3'
AptamerY8	5'-TCCGAGCATCTCGTATCAGAGTGAGGTGATTGTGCATA-3'
AptamerY11	5'-CGATGGCCTGCCCGATTTCCGGAGGGGCGATCTGCACATGC- CCGACGGG-3'
AptamerY14	5'-CCAGTAGCCATACCCGGTTTGTGGATGGGGTGTATGCCAGT-3'
AptamerY22	5'-GATGATGGATTGGAGCTTGTCCGCAAAAGGGTTCACCACAT-3'

我们将测序后的6条序列交由上海英骏生物公司人工合成后,采用 ELISA 方法进行亲和力检测,发现合成序列的亲和力均比11轮的 ssDNA 文库亲和力提高1倍,如图4所示。其中 AptamerY1 亲和力最高, AptamerY8 亲和力最低。我们选取较高的3个适配体 AptamerY1、Y6、Y22 进行后续的细胞功能实验。

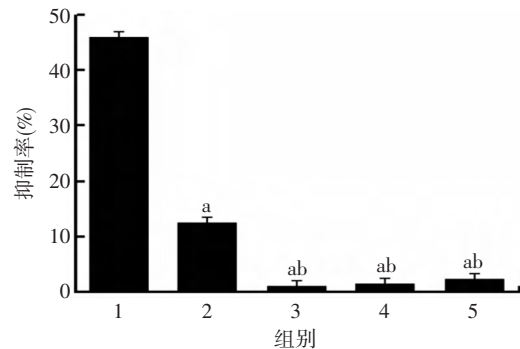


a:  $P < 0.05$ , 与 Aptamer8 比较

图4 适配体与靶蛋白的亲和力检测

#### 2.5 适配体对 IgE 介导 $\beta$ -氨基己糖苷酶释放的影响

对比 SELEX 第1轮后的筛选产物,3条适配子均显示了较好的抑制  $\beta$ -氨基己糖苷酶释放的效果,与 IgE 介导的脱颗粒模型比较,抑制率(IgE 脱颗粒模型的  $\beta$ -氨基己糖苷酶-适配体干预的  $\beta$ -氨基己糖苷酶释放量)/IgE 脱颗粒模型的  $\beta$ -氨基己糖苷酶释放量均大于95%,其中 AptamerY1 抑制效果较好(图5)。

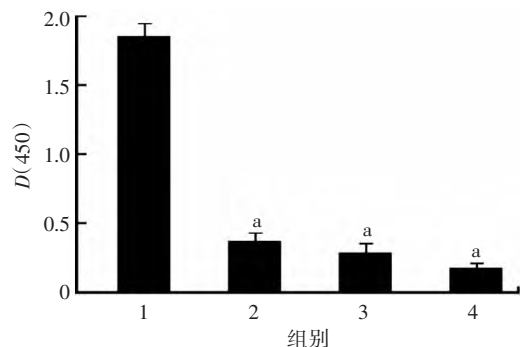


1: Biotin-IgE + Streptavidin 组; 2: SELEX 第1轮筛选产物组; 3: AptamerY1 组; 4: AptamerY6 组; 5: AptamerY22 组; a:  $P < 0.05$ , 与1组比较; b:  $P < 0.05$ , 与 SELEX 第1轮筛选产物组比较

图5 AptamerY1 对  $\beta$ -氨基己糖苷酶释放的抑制效果

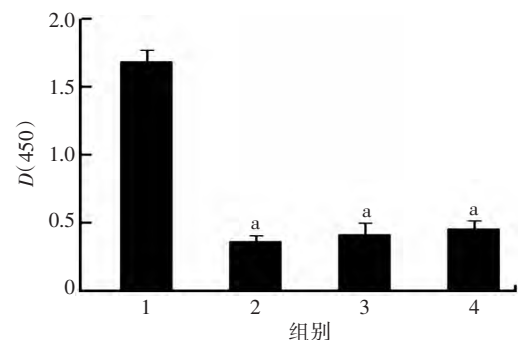
#### 2.6 适配体与靶蛋白特异性结合的检测

通过选取不同的蛋白与 AptamerY1 进行亲和力检测,显示 Orai1 膜外区蛋白亲和力最强。通过选取不同的寡核苷酸与 Orai1 膜外区蛋白进行亲和力检测,显示 AptamerY1 亲和力最强(图6、7)。



1: Orai1 膜外蛋白组; 2: Cd32-4215 蛋白组; 3: IgE 寡肽组; 4: BSA 蛋白组; a:  $P < 0.05$ , 与 Orai1 膜外蛋白组比较

图6 AptamerY1 与不同靶蛋白亲和力检测



1: AptamerY1 组; 2: HSP27-UP 组; 3: TRIM72-UP 组; 4: UP-2.5 组; a:  $P < 0.05$ , 与 AptamerY1 组比较

图7 Orai1 膜外区蛋白与不同寡核苷酸序列亲和力检测

### 2.7 AptamerY1 的 Kd 值检测

Kd 值的检测公式:  $Kd(i_0 - a_0 B) = B / (1 - B)$ ,  $B = (A_0 - A_1) / A_0$ , 计算 Kd 值为  $1.72 \times 10^{-8}$  mol/L (表 2)。

表 2 不同浓度 AptamerY1 竞争下的 Orai1 膜外区蛋白结合率

	1	2	3	4	5	6	7	8
$a_0$ ( $10^{-9}$ mol/L)	4	4	4	4	4	4	4	4
$i_0$ ( $10^{-9}$ mol/L)	80	40	20	10	5	2.5	1.25	0
$D(450)$	0.12	0.23	0.41	0.58	0.86	1.22	1.54	1.87
B	0.93	0.88	0.78	0.69	0.54	0.35	0.17	0

$a_0$ : Orai1 膜外蛋白初始浓度;  $i_0$ : AptamerY1 初始浓度;  $A_0, A_1$  是 AptamerY1 浓度为 0 和各浓度时的  $D(450)$  检测值

### 2.8 激光共聚焦显微镜观察 AptamerY1 对 LAD2 细胞钙离子内流的影响

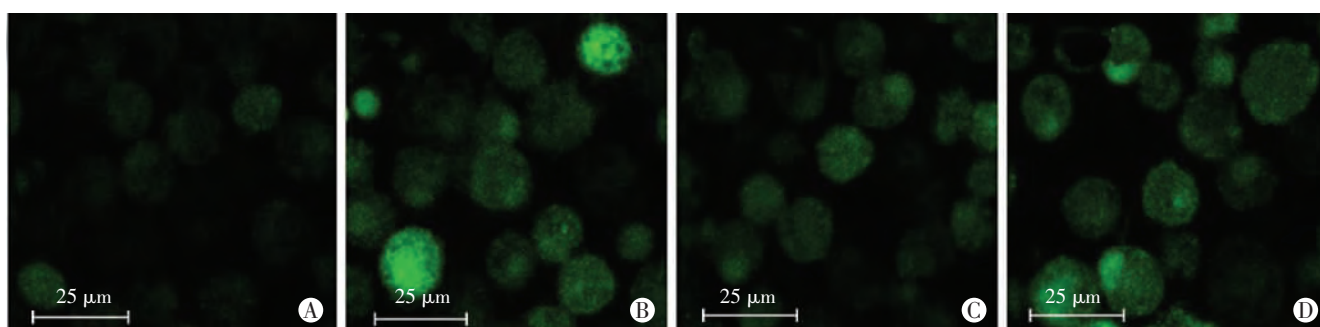
在 Biotin-IgE + Streptavidin 组脱颗粒模型中, 将细胞转入共聚焦专用平皿后 50 s 时加入链霉亲和素激活, 约 200 s 时荧光强度值达到最大。而 AptamerY1 抑制实验组未出现荧光强度的增强, 显示了与阴性对照相似的荧光变化。对照组 HSP27-UP 组出现了荧光强度的增加, 显示了与 Biotin-IgE + Streptavidin 组相似的荧光变化(图 8 表 3)。

### 3 讨论

特异性 IgE 结合于肥大细胞表面上的高亲和力 IgE 受体, 多价抗原 2 次进入机体后, 交联肥大细胞膜表面高亲和力 IgE 受体, 引起 Lyn 和 Spk 等信号蛋白磷酸化, 导致细胞钙离子内流, 从而激活肥大细胞, 引起脱颗粒反应<sup>[13]</sup>。关于抑制上述肥大细胞活化途径的研究有: 抗 IgE 单克隆抗体、CRAC 钙通道拮抗剂<sup>[14]</sup>、高亲和力 IgE 受体抑制肽等。由于肥大细胞属

于静息细胞, 肥大细胞的钙内流依赖于胞内钙池(线粒体、内质网等)的耗竭<sup>[15]</sup>, 而不是通过细胞膜去极化导致, 因此通常的钙拮抗剂不起作用。CRAC 通道介导的钙离子内流导致了肥大细胞等静息细胞的活化, 因此将 CRAC 通道的重要组成分子 Orai1 蛋白作为靶点抑制肥大细胞等静息细胞的活化受到越来越多研究者的关注。Harteneck 等<sup>[16]</sup>对 SKF-96365 进行的研究, DeHaven 等<sup>[17]</sup>对 2-APB 的研究, 以及 Ng 等<sup>[18]</sup>对 SK66 的研究, 均发现该类小分子化合物在抑制 CRAC 通道的同时, 也对其他离子通道抑制。表明该类小分子抑制剂受体特异性不强, 而且研究也发现该类化合物毒性较大, 仅限于实验室研究。

核酸适配体具有比抗体更小, 更易制备, 更易于化学修饰, 在疾病治疗和诊断中显示了明显的优势, 越来越多的研究者开始关注这方面的研究<sup>[19]</sup>。而且不少适配体药物正处于不同的临床实验阶段。ARC1779 是 1 种 DNA 适配体, 针对 vWF 因子, 通过作用于 vWF A1 区, 抑制 vWF 与 GP 1b 的交联, 从而达到抗血栓形成的作用<sup>[20]</sup>。Nox-E36 为 RNA 适配体, 针对 CCL2 配体, 通过与  $40 \times 10^3$  PEG 的共轭结合效应来抑制糖尿病的发生<sup>[21]</sup>。E10030 作为 DNA 适配体, 针对 PGDF 因子, 诱导新生血管的复原治疗新生血管年龄相关性黄斑变性疾病<sup>[22]</sup>。本研究表明, 适配体 AptamerY1 能特异结合肥大细胞钙内流的必经通路 Orai1 分子, 抑制了钙离子内流和减少炎症介质  $\beta$ -氨基己糖苷酶的释放, 抑制率达 95%, 从而抑制了肥大细胞的活化。



AptamerY1	-	-	+	-
HSP27-UP	-	-	-	+
Biotin-IgE	-	+	+	+
Streptavidin	+	+	+	+

A: 阴性对照组; B: Biotin-IgE + Streptavidin 组; C: Aptamer Y1 抑制组; D: HSP27-UP 对照组

图 8 激光共聚焦显微镜观察适配体 Y1 对钙离子内流的干预效果

表 3 不同条件下 LAD2 细胞内钙离子荧光强度随时间的变化 (s,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

组别	0	50	100	150	200	250	300
阴性对照组	37.7 ± 9.9	37.5 ± 9.2	38.2 ± 10.1	37.9 ± 9.5	37.6 ± 9.4	37.5 ± 9.4	37.4 ± 9.7
Biotin-IgE + Streptavidin 组	56.3 ± 5.7	59.1 ± 2.3	58.9 ± 4.6	74.6 ± 6.9	88.3 ± 11.2 <sup>c</sup>	82.5 ± 9.8	78.9 ± 8.6
AptamerY1 抑制组	45.5 ± 3.2	45.9 ± 3.9	44.5 ± 3.3	43.4 ± 4.3 <sup>ab</sup>	43.8 ± 5.5 <sup>ab</sup>	44.1 ± 7.5 <sup>ab</sup>	42.3 ± 7.6
HSP27-UP 对照组	44.6 ± 3.5	45.7 ± 4.3	50.4 ± 5.8	62.6 ± 6.2	79.5 ± 7.4 <sup>c</sup>	76.6 ± 8.4	74.5 ± 6.4

a:  $P < 0.05$ , 与 Biotin-IgE + Streptavidin 组同时时间点的荧光强度值比较; b:  $P > 0.05$ , 与本组 50s 荧光强度值比较; c:  $P < 0.05$ , 与本组 50 s 荧光强度值比较

本实验通过改变靶蛋白与寡核苷酸序列对筛选序列和靶蛋白的结合进行了验证: AptmerY1 与 Orail 第1膜外区蛋白反应的  $D(450)$  为 1.86, 而与 Cd32-4215 蛋白、IgE 寡肽、BSA 蛋白的  $D(450)$  分别为 0.37、0.29、0.18。我们改变了寡核苷酸序列, 采用 HSP27-UP、TRIM72-UP、UP-2.5 三条对照序列分别于 Orail 第1膜外区蛋白结合, 其检测结果也验证了 AptmerY1 与 Orail 第1膜外区蛋白特异性结合。本实验采用 Fluo-4 钙离子荧光探针观察了 AptmerY1 对 CRAC 通道的抑制效应, 以 IgE 介导的 LAD2 细胞脱颗粒模型为基础, 采用 HSP27-UP 序列作为对照, 在加入链霉亲和素 150 s 后, 脱颗粒模型组荧光强度达到最高 ( $88.3 \pm 11.2$ ), AptamerY1 抑制组在加入链霉亲和素 150 s 后, 荧光强度未见明显变化 ( $P > 0.05$ ), HSP27-UP 对照组在加入链霉亲和素 150 s 后, 荧光强度也达到最高 ( $79.5 \pm 7.4$ ), 该实验证明了 AptmerY1 对钙离子内流的抑制效应, 也在细胞水平间验证了筛选序列与目的蛋白的结合。下步实验中, 拟将 Orail 质粒转染至 HEK293 细胞, 利用流式细胞术检测筛选序列 AptamerY1 与 Orail 靶蛋白的结合。本研究以液相 AptamerY1 和固相 AptamerY1 竞争结合 Orail 膜外区蛋白, 通过双抗体夹心 ELISA 测出 Kd 值, 而且本实验获得的 AptamerY1 的 Kd 值为  $1.72 \times 10^{-8}$  mol/L, 达到纳摩尔级。以上结果均显示了 AptmerY1 与 Orail 膜外区蛋白的高特异性高亲和力结合。

本研究获得的适配体对肥大细胞活化中信号传导通路及其他释放介质如白三烯等的影响及该适配体对其他来源的肥大细胞抑制效果如何, 以及该适配体如何进行化学修饰以保证其在机体内的稳定性等方面, 都需要进一步研究。

#### 参考文献:

[1] Feske S, Gwack Y, Prakriya M, et al. A mutation in Orail causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function [J]. *Nature*, 2006, 441(7090): 179-185.  
[2] Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase [J]. *Science*, 1990, 249(4968): 505-510.  
[3] 田红英, 符兆英. SELEX 技术的原理和核酸适配体在医学上的应用进展 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2012, 28(10): 1103-1106.  
[4] Galli S J, Tsai M, Piliponsky A M. The development of allergic inflammation [J]. *Nature*, 2008, 454(7203): 445-454.  
[5] Engh A, Somasundaram A, Prakriya M. Permeation and gating mechanisms in store-operated CRAC channels [J]. *Front Biosci (Landmark*

*Ed)*, 2012, 17: 1613-1626.  
[6] Yeromin A V, Zhang S L, Jiang W, et al. Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orail [J]. *Nature*, 2006, 443(7108): 226-229.  
[7] 秦莲花, 郑瑞娟, 杨华, 等. SELEX 技术筛选结核分枝杆菌 MPT64 蛋白 DNA 适配子方法学研究 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2008, 28(2): 176-180.  
[8] 谢琳, 刘韧, 朱旭东, 等. 人重组 TGF- $\beta$ R II 亲和核酸筛选方法的建立 [J]. *第三军医大学学报*, 2008, 30(23): 2168-2171.  
[9] Gage M C, Keen J N, Buxton A T, et al. Proteomic analysis of IgE-mediated secretion by LAD2 mast cells [J]. *J Proteome Res*, 2009, 8(8): 4116-4125.  
[10] 杨永强, 陈晓红, 孙仁山, 等. 肥大细胞系 LAD2 的培养及肥大细胞脱颗粒模型的建立 [J]. *中国皮肤性病学杂志*, 2014, 28(1): 34-37.  
[11] 郭杰标, 郭锐, 刘艳华. 以抗体竞争结合抗原测定单抗亲和力和常数的研究 [J]. *南方医科大学学报*, 2006, 26(7): 1057-1059.  
[12] 陆月明, 李莉, 罗文侗, 等. 肥大细胞抗原活化时钙离子信号变化的研究 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2000, 23(4): 243-246.  
[13] 孙仁山, 陈晓红, 冉新泽, 等. 高亲和力 IgE 受体介导的信号传导及其相关的抑制性受体 [J]. *中国药理学通报*, 2005, 21(4): 385-389.  
[14] Parekh A B. Store-operated CRAC channels: function in health and disease [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2010, 9(5): 399-410.  
[15] Di-Capite J, Parekh A B. CRAC channels and  $Ca^{2+}$  signaling in mast cells [J]. *Immunol Rev*, 2009, 231(1): 45-58.  
[16] Harteneck C, Gollasch M. Pharmacological modulation of diacylglycerol-sensitive TRPC3/6/7 channels [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2011, 12(1): 35-41.  
[17] DeHaven W I, Smyth J T, Boyles R R, et al. Complex actions of 2-aminoethyl-diphenyl borate on store-operated calcium entry [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(28): 19265-19273.  
[18] Ng S W, di-Capite J, Singaravelu K, et al. Sustained activation of the tyrosine kinase Syk by antigen in mast cells requires local  $Ca^{2+}$  influx through  $Ca^{2+}$  release-activated  $Ca^{2+}$  channels [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(46): 31348-31355.  
[19] Banerjee J, Nilsen-Hamilton M. Aptamers: multifunctional molecules for biomedical research [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2013, 91(12): 1333-1342.  
[20] Bae ON. Targeting von Willebrand factor as a novel anti-platelet therapy; application of ARC1779, an Anti-vWF aptamer, against thrombotic risk [J]. *Arch Pharm Res*, 2012, 35(10): 1693-1699.  
[21] Esposito C L, Catuogno S, de-Francis V, et al. New insight into clinical development of nucleic acid aptamers [J]. *Discov Med*, 2011, 11(61): 487-496.  
[22] Ni X, Castanares M, Mukherjee A, et al. Nucleic acid aptamers: clinical applications and promising new horizons [J]. *Curr Med Chem*, 2011, 18(27): 4206-4214.

(收稿: 2013-10-16; 修回: 2013-11-19)

(编辑 邓强庭)