

一种基于三维凝胶阵列的序列特异性 DNA 结合蛋白检测方法

潘沁¹, 陆祖宏², 何农跃²

(1. 中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 210009;

2. 东南大学生物医学工程学院, 南京 210018)

摘要: 聚丙烯酰胺凝胶微阵列检测序列特异性 DNA 结合蛋白, 具有高度并行性、微量化、高结合容量和低背景的优点。本方法将通用寡核苷酸固定在聚丙烯酰胺凝胶微阵列上形成单链发夹寡核苷酸, 通过固相延伸为双链寡核苷酸后, 采用酶切法非标记检测序列特异性 DNA 结合蛋白 NF- κ B 芯片扫描信号和荧光显微信号。结果表明本方法具有高灵敏度和高特异性, 为蛋白质与序列特异性 DNA 的亲和力等芯片研究提供了有力工具

关键词: 聚丙烯酰胺凝胶微阵列; 非标记蛋白质; 固相延伸双链寡核苷酸

中图分类号: R

A gel pad-based approach for detection of sequence specific DNA binding protein

PAN Qin¹, LU Zuhong², HE Nongyue²

(1. Life Science and Technology School, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009;

2. Biomedical Engineering School, Southeast University, Nanjing 210018)

Abstract: Polyacrylamide gel pad (PGP) matrix shows high throughput, miniaturization, content and low background for detection of sequence specific DNA binding protein. Here constant oligonucleotides were immobilized into PGP and linked to uniform hairpin oligonucleotides. Then double strand DNA oligonucleotides formed by elongation on the solid phase before labeled-free NF- κ B was detected by cut of EcoRI in scanner and fluorescence microscopy. The results indicated this method showed high sensitivity and specificity and could find application to research on affinity between protein and sequence specific DNA on chip.

Keywords: Polyacrylamide gel pad; Labeled-free NF- κ B; uniform hairpin oligonucleotides

0 引言

DNA 芯片具有高度并行性、多样性、微型化和自动化以及高灵敏度的优点^[1-2], 最近双链 DNA 芯片检测 DNA-蛋白质相互作用引起越来越多的关注^[3-7]。基于芯片的序列特异性蛋白检测通常采用荧光标记蛋白质, 步骤烦琐, 蛋白质容易失活。探索非标记蛋白检测法具有重要意义。

聚丙烯酰胺凝胶阵列被用于固定核苷酸、DNA、蛋白质和抗体^[8], 具有高结合容量和低荧光背景的优点。Mirzabekov 等人^[9]报道了聚丙烯酰胺凝胶块和涂覆玻片表面的聚丙烯酰胺凝胶膜, 并以此制备 DNA 芯片、蛋白质芯片、PCR 系统和结构化寡核苷酸芯片, 并研究了他们的反应特点。Yersgov^[10]先在 Bind-Silane 处理的玻片上蚀刻出 $40\mu\text{m} \times 40\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$ 凝胶元件微阵列, 然后用毛细管把寡核苷酸加载到凝胶元件上形成分子微阵列, 再用 Reple-Silane

处理使凝胶微阵列间的玻璃间隙呈疏水性。基于聚丙烯酰胺凝胶阵列检测序列特异性蛋

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金 (编号 S132015)

作者简介: 潘沁 (1973-), 女, 讲师, 主要研究方向: 生物医学工程. E-mail: ginup@163.com

白至今未见报道。

本文提出一种基于聚丙烯酰胺凝胶芯片非标记检测序列特异性蛋白的新方法。通用寡核苷酸固定在聚丙烯酰胺凝胶芯片上，与靶核苷酸连接形成单链发夹寡核苷酸，固相延伸后采用酶切法非标记检测序列特异性 DNA 结合蛋白 NF- κ B。本方法具有高灵敏度，为蛋白质与序列特异性 DNA 的亲和力研究提供了有力工具。

1 材料和方法

1.1 原理

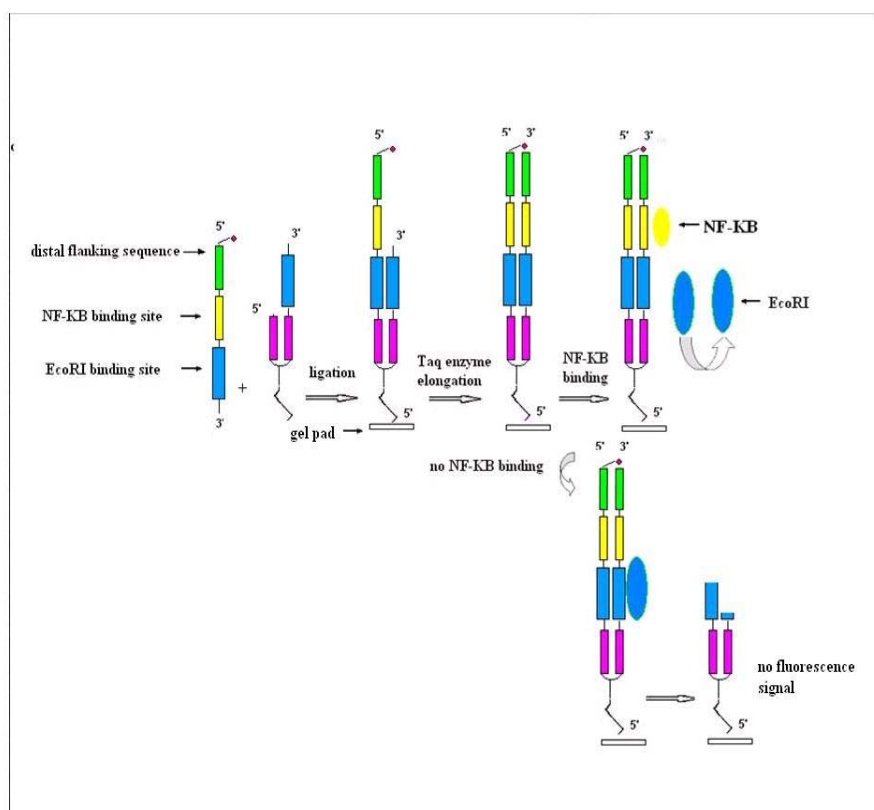


图1 基于聚丙烯酰胺凝胶芯片非标记检测序列特异性蛋白的原理

本章提出的新的非标记高通量检测序列特异性蛋白方法的基本原理如图1所示。通用寡核苷酸序列 (CS) 以丙基修饰，固定在聚丙烯酰胺凝胶芯片上，包含 NF- κ B 结合位点的靶序列 (TS) 5'端标记 Cy5，与 CS 通过连接酶形成单分子发夹寡核苷酸，在电极表面延伸形成 dsDNA。由于 NF- κ B 结合位点与 EcoRI 结合位点相邻，NF- κ B 结合位点与 EcoRI 结合所占据的序列具有一定的重叠，NF- κ B 与 dsDNA 的特异性结合导致 EcoRI 不能稳定结合，酶切反应不能进行。若 NF- κ B 不存在，EcoRI 酶切去 Cy5 标记的 DNA 片段，这些片段由电泳除去，导致荧光减弱。由荧光的强度可检测 NF- κ B 与序列特异性结合位点的相互作用。

1.2 材料

表1为实验中使用的寡核苷酸序列，各种寡核苷酸均在上海英竣公司合成；NF- κ B p50 和 γ -甲基丙烯酰氧基丙基三甲氧基硅烷购自 Sigma 公司；Cy5-dUTP 购自 Promega 公司；T4 DNA

连接酶购自 MBI fermentas 公司；EcoR I 购自 New England BioLabs；杂交液购自 Telechem 公司；芯片点样仪购自 Captial Biochip 公司；芯片扫描仪 ScanMicroarray[®] Lite 购自 Packard Biochip Technologies 公司；扫描数据分析软件为 Packard BioScience BioChip Technologies 公司的 QuantArrayR 芯片分析软件。

表 1 单分子发夹寡核苷酸探针序列

| Name | Sequence [*] | Length(nt) |
|------|--|------------|
| CS | 5' ---GGAATCCCCC T-Acr -GGGGGATTCC GGC GAATTC---3' | 30 |
| TS1 | 5' --- cy5--- AGTTGAG GGGACTTTCC GAATTC ---3' | 23 |
| TS2 | 5' --- AGTTGAG GGGACTTTCC GAATTC ---3' | 23 |
| TS3 | 5' --- AGTTGAGTTTCCGGGAATTC ---3' | 23 |

*黑体为 NF-KB 结合位点，斜体为 ECORI 切割位点。

1.3 丙烯基团修饰玻片的制备

玻片首先在 10% 的硝酸溶液中浸泡 2 小时，随后用去离子水、丙酮反复冲洗 3 遍，氮气吹干。再将其浸泡在 γ -甲基丙烯酰氧基丙基三甲氧基硅烷/丙酮溶液 (v/v) 中 1 小时，取出后用丙酮清洗 3 遍，氮气吹干备用。

1.4 聚丙烯酰胺凝胶芯片制备

丙烯酰胺基修饰的寡核苷酸溶液加入含有丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺 (29:1 w/w)，30% w/w 的丙三醇及 1% w/v 的过硫酸铵的预聚合液中，用点样仪点样于丙烯基团修饰的玻片上。完成点样后，将玻片置于潮湿的盛有四甲基乙二胺 (TEMED) 的容器中。在真空状态下当 TEMED 挥发到玻片表面时，丙烯基团之间会发生共聚合反应，从而将丙烯酰胺修饰的寡核苷酸固定在玻片上。

1.5 连接反应

CS 分别与 TS 以 1:1 摩尔比混合，在含有 10 mM MgCl₄, 10 mM DTT, 0.5mM ATP 和 0.5 U/ μ LT4 DNA 连接酶的 40 mM Tris-HCl(pH 7.8)中反应。反应完成后芯片在 1×TBE 缓冲溶液中电泳 30 分钟去除未连接的 TS。

1.6 单链寡核苷酸延伸及检测

CS 与 TS 连接形成的单分子发夹寡核苷酸进行延伸，延伸溶液分为 A 液、B 液和 C 液。A 液成分为 40mM dATP、40mM dCTP、40mM dGTP、40mM dTTP、50mM Tris-HCl (pH 7.2)、10 mM MgSO₄、0.1 mM DTT 和 20 μ g/mL BSA 和 0.05 U/ μ L Taq 酶，1 μ L Cy5-dUTP。B 液以 dUTP 代替 Cy5-dUTP，其它成分与 A 液相同；C 液不含 Taq 酶，其它成分与 A 液相同。TS1、TS2 与 CS 形成的单分子发夹寡核苷酸在 A 液中延伸，TS3 与 CS 形成的单分子发夹寡核苷酸分别在 A 液、B 液和 C 液中延伸，反应在 37℃ 进行 2 小时。延伸完成后芯片分别以 2×SSC/0.1% SDS、0.2×SSC/0.1% SDS 和去离子水洗 5 分钟，吹干。

1.7 NF- κ B 结合序列特异性 DNA

NF- κ B 以蛋白质结合缓冲液(10 mM HEPES pH 7.9, 50 mM KCl, 2.5 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0.05% NP-40, 10%甘油和 5% BSA)稀释。30 μ L NF- κ B 溶液加入双链 DNA 的芯片上，盖上硅烷化处理的盖玻片，于 37℃ 保温 60 分钟，然后用 0.01M pH7.4 PBS/0.1%Tween-20、

0.01M PBS 和去离子水分别洗涤 5 分钟，吹干。

1.8 限制性内切酶 EcoRI 消化

20 μ L 的 EcoRI 反应体系组分为 1 \times RE 缓冲液, 2 μ g 乙酰化 BSA, 5U 限制性内切酶 EcoRI, 于 37 $^{\circ}$ C 酶切 1 小时。酶切反应结束后芯片分别用 2 \times SSC、0.2 \times SSC/0.5%SDS 及去离子蒸馏水各洗涤 5 分钟, 在 1 \times TBE 缓冲溶液中电泳 30 分钟, 用氮气流吹干。

1.9 芯片扫描和信号分析

芯片在片延伸掺入的荧光信号通过芯片扫描仪 ScanMicroarray Lite 在 Cy3 波长下进行扫描, 扫描条件为 85% laser power, 80% PMT gain, 5 μ m 分辨率。扫描数据由 QuantArrayR 芯片分析软件进行分析。

2 结果与讨论

2.1 通用寡核苷酸自组装

通用寡核苷酸以丙烯酰胺基标记和丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺单体混合后, 所形成的预聚合物点样于用丙烯基团修饰的玻璃片上, 点样后的芯片与 TEMED 共处于真空泵中, TEMED 易挥发而使芯片点聚合形成自组装通用寡核苷酸的聚丙烯酰胺凝胶芯片。传统的聚丙烯酰胺凝胶芯片法是将 TEMED 加入预聚合物中, 这样由于点样过程中发生聚合从而使点样溶液粘度增加, 不利于芯片制备。本法点样过程中不会出现由于凝聚造成的点样浓度不均而形成通用寡核苷酸的低效自组装, 同时也保证样品粘度稳定。由凝胶芯片的 SEM 照片 (图 4-2) 可看到, 凝胶点样貌均匀, 证实聚丙烯酰胺凝胶芯片被成功制备。

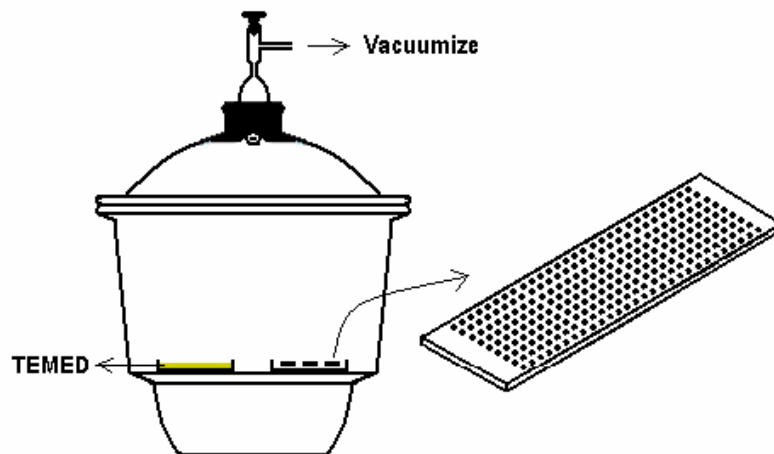


图2 聚丙烯酰胺凝胶芯片制备和通用寡核苷酸自组装原理

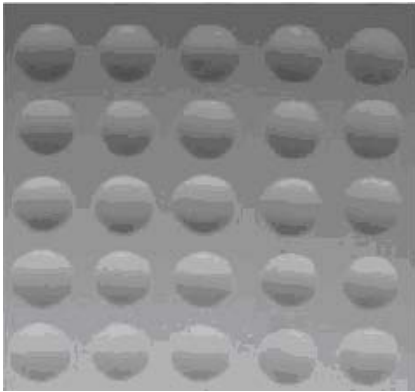


图3 凝胶聚合后的 DNA 芯片扫描电镜照片

2.2 在片连接反应

5'端标记 cy5 的 TS1 与自组装在凝胶芯片上的通用序列 CS 在 T4 连接酶催化作用下连接成为单分子发夹寡核苷酸。连接反应结果如图 4 所示。由荧光强度图 C 得到连接形成的单分子寡核苷酸相对荧光强度为 0.836，与反应体系不包括 T4 连接酶的阴性对照的相对荧光强度 0.0256 相比，增强了 33 倍，表明连接效率较高。

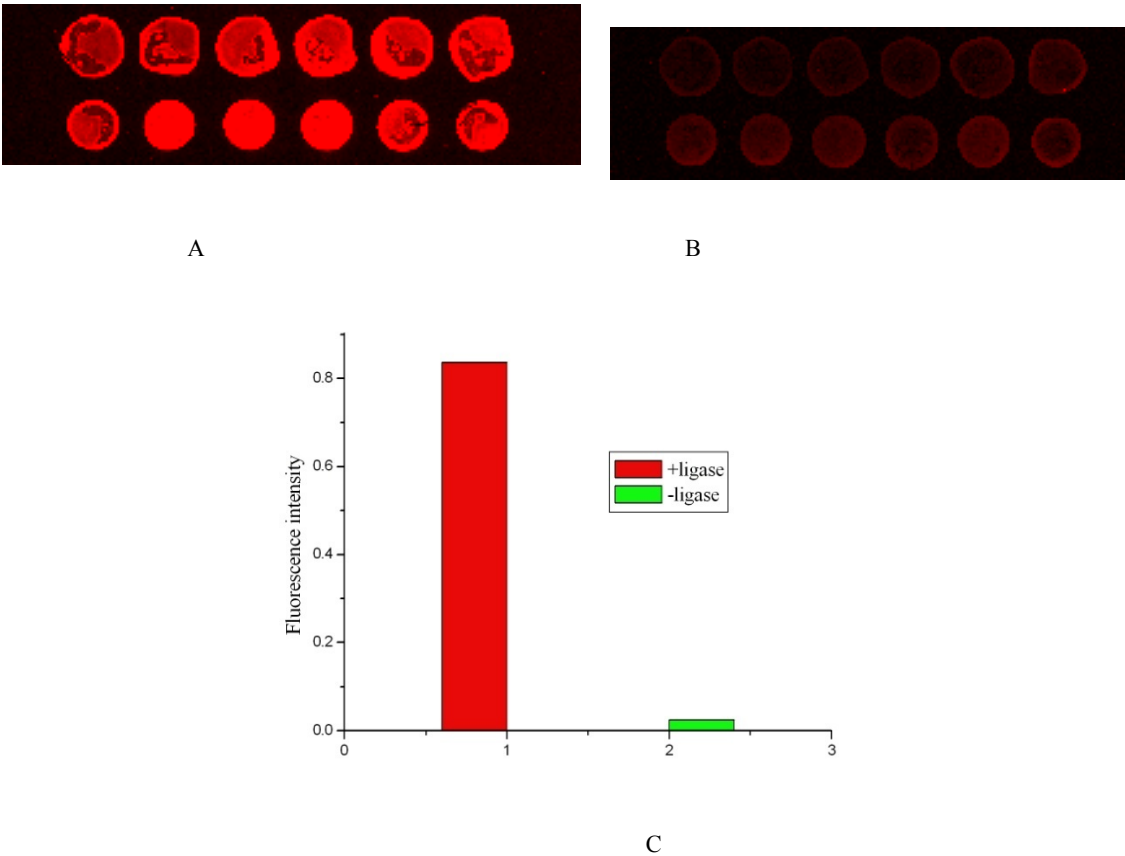


图4 5'端 Cy 5 标记靶序列连接反应的荧光图 (A-B) 和荧光强度分析图 (C)
(A)连接反应液包含 T4 连接酶的荧光图; (B)连接反应液不包含 T4 连接酶的荧光图; (C) A 和 B 的荧光强度值比较。

2.3 在片延伸特异性

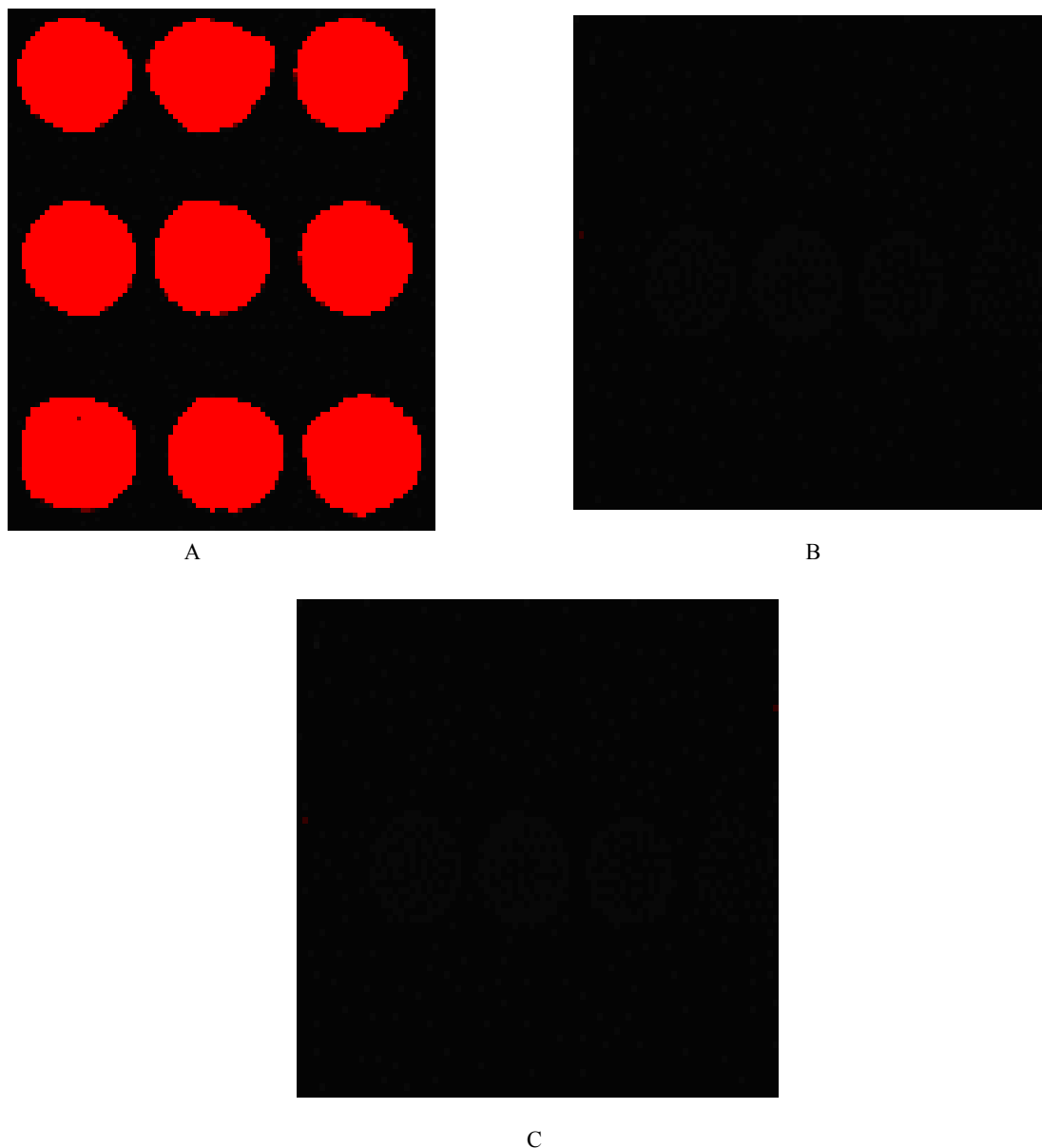


图5 连接后的单分子寡核苷酸延伸形成双链的荧光图

(A) 延伸体系中掺入 Cy5-dUTP; (B) 延伸体系中未掺入 Cy5-dUTP; (C) 延伸体系未加入 Taq 酶

为检验形成的单分子发夹寡核苷酸在凝胶芯片上延伸成双链寡核苷酸的延伸效果,采用 5'端无 Cy5 标记的 TS3 与 CS 连接形成单分子寡核苷酸。延伸结果扫描图如图 5 所示,图(A)延伸过程中掺入 Cy5-dUTP,因而扫描显示荧光信号,相对荧光强度为 0.927。由于单链的延伸需要 Taq 酶催化,由于缺乏 Taq 酶导致单链无法延伸,因而(C)图中不出现荧光信号。综上所述,单链在聚丙烯酰胺凝胶芯片上的延伸具有显著特异性。

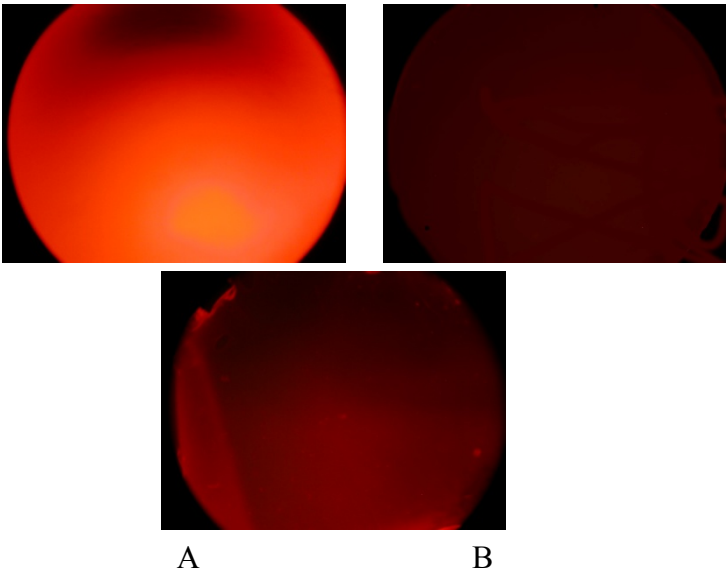


图 6 连接后的单分子寡核苷酸延伸形成双链的凝胶点荧光显微镜高倍放大图
(A) 延伸体系中掺入 Cy5-dUTP; (B) 延伸体系中未掺入 Cy5-dUTP; (C) 延伸体系未加入 Taq 酶

为进一步证实单分子寡核苷酸在凝胶芯片上的延伸，采用荧光显微镜检测延伸。由图 6 可看出，延伸体系中掺入 Cy5-dUTP 明显具有荧光，对照组 B 和 C 具有较弱的荧光，表明延伸具有显著的特异性。因此，根据上面荧光扫描图 5 和荧光显微镜高倍放大图，可得知连接后的单分子发夹结构在凝胶阵列表面延伸具有高度特异性。

由荧光扫描和荧光显微镜监测结果显示连接形成的单分子寡核苷酸在凝胶芯片上具有高度特异性延伸。

2.4 NF-KB 结合的特异性

图 7 为 NF-κB 结合双链 DNA 的荧光图。其中 TS1 包含 NF-κB 的序列特异性结合位点，TS2 不包含 NF-κB 的序列特异性结合位点。由图可知 NF-κB 与序列特异性 DNA 结合具有显著特异性。

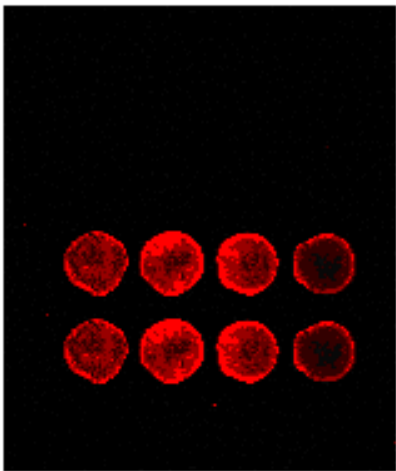
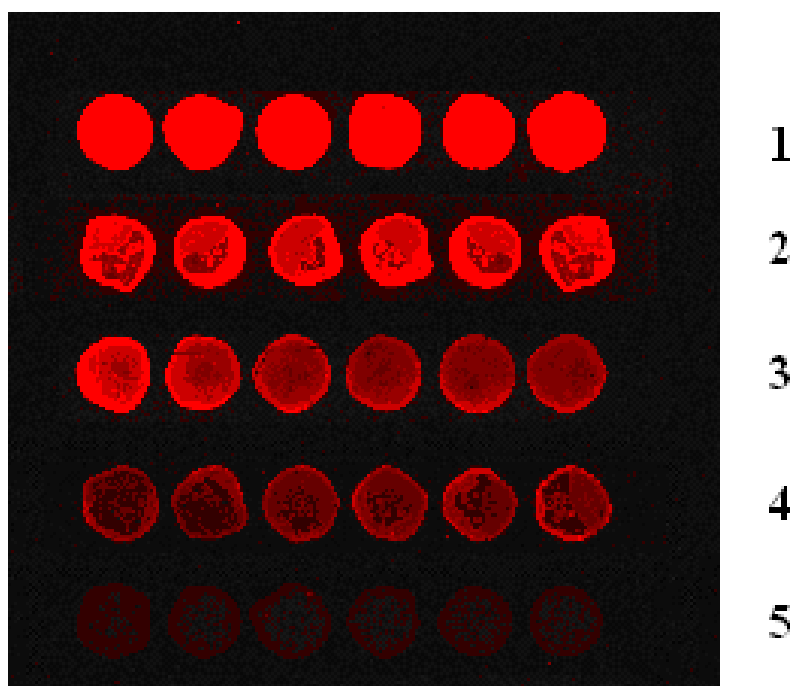


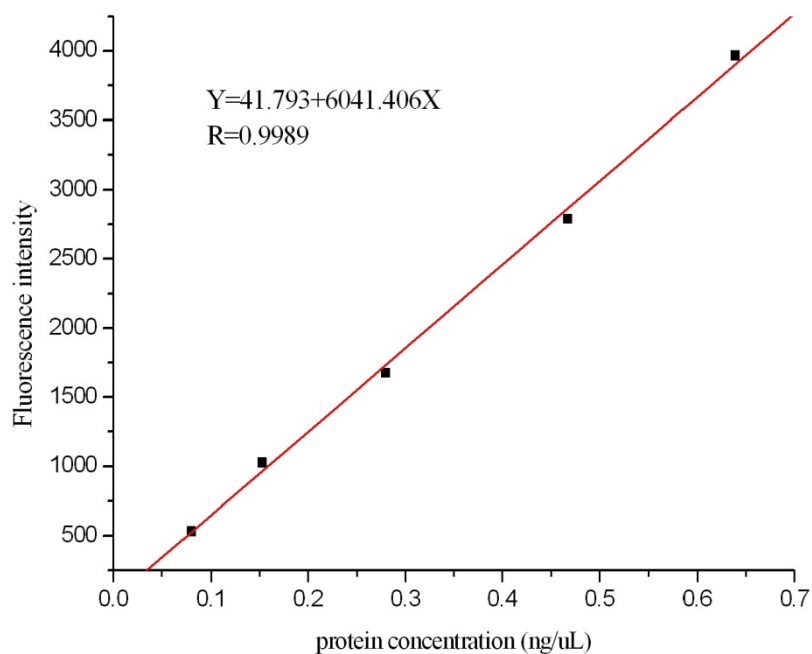
图 7 NF-κB 结合双链 DNA 阵列荧光图。行 X1 为 TS2 与 CS 连接后的荧光图；行 X2 为 TS1 与 CS 连接后的荧光图。

2.5 NF-κB 结合灵敏度检测



180

A



B

图8 不同浓度 NF-κB 的荧光图 (A) 和荧光强度 (B)。A 中 1-5 分别对应 NF-κB 浓度 0.639ng/μL、0.467ng/μL、0.28ng/μL、0.153ng/μL 和 0.08ng/μL；B 为蛋白质浓度对荧光强度曲线。

185

NF-κB 检测下限为 0.08 ng/μL (0.16nM)，与常用的基于玻璃片基检测荧光标记蛋白的方

法相比^[11], 灵敏度提高了 2 个数量级。这是由于聚丙烯酰胺具有高结合容量, 并且为各类反应提供了半液相环境, 更加类似体内反应环境, 使蛋白不易失活, 更易与序列特异性 DNA 结合。因而检测灵敏度显著提高。在 0.1ng/μL-0.5ng/μL 范围内呈现线性相关性 (见图 8), 表明可作为定量检测的依据。

3 结论

本文提出了一种基于聚丙烯酰胺凝胶芯片的非标记检测序列特异性 DNA 结合蛋白的方法, 具有以下特点:

(1) 首次提出基于双链聚丙烯酰胺凝胶 DNA 芯片检测序列特异性 DNA 结合蛋白的方法。为蛋白质与序列特异性 DNA 的相互作用和功能基因组研究提供有力工具。本方法具有高灵敏度, 检测下限为 0.16nM;

(2) 在 0.1ng/μL-0.5ng/μL 范围内呈现线性相关性, 可作为定量检测的依据;

(3) 采用双链 DNA 聚丙烯酰胺凝胶芯片结合蛋白质, 与常规的采用双功能化学试剂固定蛋白的方法相比, 蛋白质活性大为提高, 为蛋白质芯片的制备提供了有力工具。

致谢

本文受到高等学校博士学科点专项科研基金新教师类资助课题(项目号 S132015) 资助, 特此致谢。

[参考文献] (References)

- [1] Yershov G, Barsky V, Belgovskiy A, et al. DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide chips [J] Proc Natl Acad Sci, 1996, 93: 4913-4918.
- [2] Drobyshv A, Mologina N, Shik V, et al. Sequence analysis by hybridization with oligonucleotide microchip: identification of beta-thalassemia mutations [J]. Gene, 1997, 188: 45-52.
- [3] Heller RA, Schena M, Chaia, et al. Discovery and analysis of inflammatory disease related genes using cDNA microarray [J]. Proc Natl Acad Sci, 1997, 94: 2150-2155.
- [4] Fodor SP. DNA sequencing: Massively parallels genomics [J]. Science, 1997, 277: 393-395.
- [5] Guschin D, Mobarry B, Proudnikov D, et al. [J] Appl Environ Microbiol, 1997, 63: 2397-2402.
- [6] McGall, GH, Barone AD, Diggelmann M, Fodor SPA, et al [J], J Am Chem Soc, 1997, 119: 5081-5090.
- [7] Wang J, Li T, Lu Z. A method for fabricating uni-dsDNA microarray chip for analyzing DNA-binding proteins [J]. J Biochem Biophys Methods, 2005, 63: 100-110.
- [8] Heller RA, Schena M, Chai A, Shalon D, Bedilion T, Gilmore J, Wooley DE, Davis RW. Discovery and analysis of inflammatory disease-related genes using cDNA microarrays. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 2150-2155.
- [9] Timofeev E, Kochetkova SV, Mirzabekov AD, et al. Regioselective immobilization of short oligonucleotides to acrylic copolymer gels. Nucleic Acids Res. 1996, 24(16):3142-3148.
- [10] Yershov G, Barsky V, Belgovskiy A, et al. DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide microchips. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996, 93:4913-4918.
- [11] Boon EM, Salas JE, Barton JK, et al. An electrical probe of protein-DNA interactions on DNA-modified surfaces [J]. Nat Biotechnol, 2002, 20: 282-286.