

基于核酸适体和胶体金技术构建 凝血酶的 DNA 逻辑门

曹青锋, 闫舒雅, 龙佳宝, 孟祥贤*

(湖南大学 生物学院, 中国湖南 长沙 410082)

摘要: DNA 逻辑门在分子计算机和分子水平上的计算技术中具有重要作用。我们通过设计核酸适体与凝血酶特异结合导致胶体金团聚的方法, 构建了凝血酶的 DNA 逻辑门。凝血酶作为输入信号与其核酸适体结合, 将监测探针上的胶体金结合位点释放, 两个核酸功能化修饰的胶体金同时结合到监测探针上, 引起胶体金团聚, 实现信号输出。根据这个设计原理, 成功构建了蛋白质凝血酶的 YES 逻辑门。

关键词: DNA 逻辑门; 凝血酶; 胶体金; 核酸适体

中图分类号: Q955

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2015)03-0210-03

DNA Logic Gate for Thrombin Based on Aptamer and Gold Nanoparticle Technology

CAO Qing-feng, YAN Shu-ya, LONG Jia-bao, MENG Xiang-xian*

(College of Biology, Hunan University, Changsha 410082, Hunan, China)

Abstract: DNA logic gate plays an important role in the molecular computer and a molecular level of computer technology. Based on the binding of the aptamer and thrombin and assemble of functionalized gold nanoparticles, a DNA logic gate was constructed. When added thrombin as the input, the binding of thrombin and its aptamer results to release the site of the gold nanoparticle site in a detection probe, in which two gold nanoparticles hybridizes with the probe and causes the assemble of gold nanoparticles and realizes the output signal of logic gate. According to the design principle, the YES logic gate for protein thrombin was successfully constructed.

Key words: DNA logic gate; thrombin; gold nanoparticle; aptamer

(Life Science Research, 2015, 19(3): 210~212)

以核酸为基础的分子计算机或者分子水平上的信息处理有望代替传统的以硅作为原件的计算机技术, 在生物医学领域具有重要意义^[1-6]。这是因为核酸与以硅为基础的生物运算相比具有结构简单、能和其互补链杂交, 以及能与目标分子(金属离子、小分子、蛋白质)相互作用的特点, 在构建 DNA 计算机方面有巨大优势。设计并构建 DNA 逻辑门引起了国内外广大研究者的兴趣^[7-13]。如:

汪尔康院士利用核酸置换技术和 G 四聚体组装技术构建逻辑门, 在体外模拟控制光敏剂 PPIX 的释放^[8]; Song 等采用两个 DNA origami 纳米结构构建用于 microRNA 检测的逻辑门^[9]; Xu 等利用连接酶形成环形 DNA 分子构建逻辑门^[10]; Winner 等构建了一个基于离子的 DNAzyme 逻辑门实现 UO_2^{2+} 的灵敏检测等等^[11]。

在本文中, 我们利用核酸适体和胶体金技术

收稿日期: 2015-01-15; 修回日期: 2015-04-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21275043)

作者简介: 曹青锋(1990-), 女, 江西南昌人, 主要从事生物样品分析研究; * 通讯作者: 孟祥贤(1972-), 女, 湖南华容人, 湖南大学副教授, 博士, 主要从事分子水平上的生物分析化学研究, E-mail: xmeng@hnu.edu.cn。

构建了一种新型的DNA逻辑门,用于蛋白质凝血酶分析。核酸适体是经体外筛选技术SELEX(指数富集配体系统进化)筛选出的能特异结合蛋白质或其他小分子物质的寡聚核苷酸片段。它是一系列单链核酸分子,与特异靶分子相结合,特异性如同抗体一样,对可结合的配体有严格的识别能力和高度的亲和力。核酸适体在生物传感器、新药开发以及纳米技术等方面有着广泛的用途^[14]。本文选用凝血酶蛋白质作为逻辑门的输入,利用凝血酶与其核酸适体特异结合,释放出监测探针上的胶体金结合位点,引起胶体金团聚,实现逻辑门信号输出,实现凝血酶分析。

1 试验方法

1.1 试剂与仪器

试剂:本文中用寡核苷酸由大连宝生物公司合成。N1:CTT CTT GGC AGT CCG TGG TAG GGC AGG TGG GGG TGA CT; N2:GCC AAG AAG GGG GAC TGC CAA GAA G; N3: SH - TTTT CT-TCTTGGC。N1是凝血酶核酸适体序列;N2是监测探针序列;N3序列在5'端修饰有巯基。HAuCl₄、BSA、HSA、IgG,柠檬酸三钠购自上海生工生物有限公司,凝血酶购自北京鼎国生物有限公司,所用其他化学试剂均为分析纯。仪器:紫外可见分光光度计(UV 1750 日本岛津)。

1.2 实验方法

1.2.1 胶体金的制备

该方法采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金。首先将100 mL 0.01%的HAuCl₄溶液在加热搅拌器上搅拌加热至沸腾,迅速加入4.5 mL 1%的柠檬酸三钠水溶液并继续搅拌加热。煮沸7~10 min,最后定格为透明酒红色。室温冷却,封存于4℃的冰箱中。

1.2.2 胶体金的核酸功能化修饰

首先将制得的金溶胶浓缩1倍,于1 mL浓缩的纳米金中缓慢加入N3溶液,室温放置16 h后逐滴加入100 mmol/L磷酸缓冲溶液(pH 7.4),随后加入2 mol/L NaCl进行老化。离心分离,最后将沉积物分散于10 mmol/L PBS中,4℃保存备用。

1.2.3 紫外吸收光谱的测定

配制底液:20 mmol/L Tris-HCl (pH=7.4), 2 mmol/L MgCl₂。在底液中加入10 nmol/L凝血酶和100 nmol/L N1,孵育30 min,再加入100 nmol/L N2和N3,孵育5 min后在紫外可见分光光度计

上进行测定。特异性实验过程和凝血酶实验过程一样,只是用其他蛋白(BSA、HSA、IgG)代替凝血酶。以上反应温度为室温。

2 结果与分析

通过二进制“1-0”概念设计的可进行特殊运算的逻辑门,有一个输入便有一个输出结果。“YES”门是当输入为1时输出也为1。我们把蛋白质凝血酶作为输入信号,胶体金团聚信息作为输出信号,利用凝血酶与其核酸适体特异相互作用导致胶体金团聚的原理,构建了YES逻辑门。示意图见图1。逻辑门由链N1、N2和N3组成。N1是核酸适体序列,由两部分组成,一部分是凝血酶的核酸适体序列,另一部分能与N2互补,封闭胶体金结合位点;N3是核酸功能化修饰的胶体金(Au-DNA);N2是监测探针序列,有两个相同的Au-DNA结合位点。当N2监测探针上的两个Au-DNA结合位点同时与Au-DNA结合时,胶体金团聚,引起胶体金吸收峰值下降,甚至吸收峰红移;但是当没有凝血酶输入时,核酸适体与监测探针结合,封闭胶体金结合位点,则不能引起胶体金团聚,没有吸收峰值下降或吸收峰红移现象,从而没有信号输出。

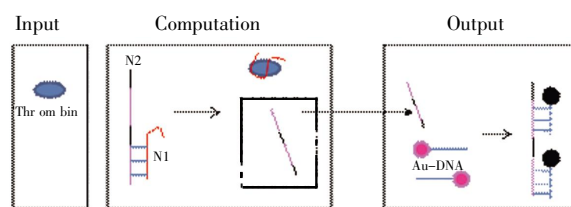


图1 逻辑门的构建原理

逻辑门包括两部分:计算模块和输出模块。计算模块接收并分析凝血酶;根据计算结果输出信号。释放出的监测探针N2将这两个模块联系起来,将计算信息转换为输出信号。

Fig.1 The construction of logic gate

Logic gates contain two modules: computation module and output module. The computation module receives and analyzes thrombin input, while the output module displays different symbols, depending on the computing results. The two modules are connected by a specific N2, which transfers information from the computation module to the output module.

从图1可以看出,作为逻辑门信号输出方式的功能化胶体金对逻辑门构建具有重要意义。我们首先检测了核酸功能化修饰的胶体金(图2)。我们发现新制备的胶体金在522 nm有一个明显的吸收峰,但是加入钠离子后,吸收峰发生明显的红移,且522 nm处吸收明显下降(图2A);但是当

胶体金用核酸进行功能化修饰后,加入钠离子,我们发现吸收峰没有明显的偏移,同时 522 nm 处的吸收值没有显著变化。这些结果说明胶体金进行了很好的核酸功能化,即使加入较高浓度的盐条件下仍然能保持良好的分散性能,能够很好地用于逻辑门构建。

YES 门是逻辑门中最简单的门之一。当有输入信号时,就有输出信号产生。在图 3 中,发现输入凝血酶,在 522 nm 的吸收值发生明显下降,吸收峰明显红移;而没有凝血酶时,在 522 nm 有一个明显的吸收峰。这是因为凝血酶与核酸适体结合,将探针上胶体金结合位点释放,加入核酸功能化修饰的胶体金,两个胶体金同时结合到探针上,导致胶体金团聚,输出信号;当没有凝血酶输入时,不能有效释放胶体金结合位点,功能化胶体金

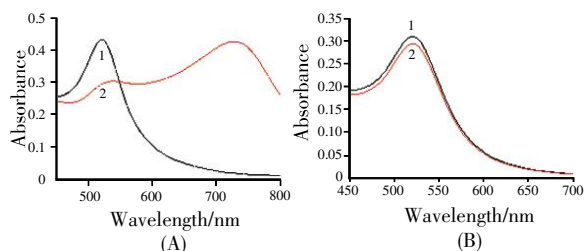


图 2 核酸功能化胶体金的检测

(A)没有修饰核酸的胶体金的吸收光谱图;(B)修饰核酸的胶体金的吸收光谱图。曲线 1 是没有加 0.5 nmol/L NaCl;曲线 2 是加 0.5 nmol/L NaCl。

Fig.2 The detection of nucleic acid functionalized gold nanoparticles

(A) The absorption spectrum of gold nanoparticles without modification of nucleic acids; (B) The absorption spectrum of gold nanoparticles modified nucleic acid. Without addition of 0.5 nmol/L NaCl (curve 1) and addition of 0.5 nmol/L NaCl (curve 2).

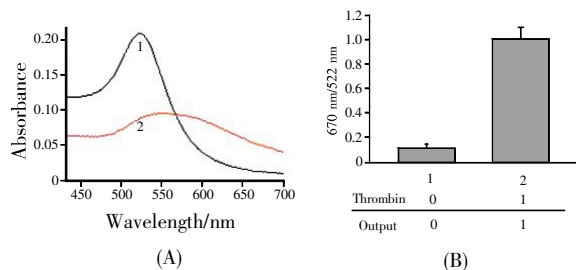


图 3 凝血酶的 YES 逻辑门

(A)加入和不加入凝血酶时的吸收光谱图;(B)以 670 nm/522 nm 吸收值归一化显示的输出信号。曲线 1 是没有加入凝血酶;曲线 2 是加入凝血酶。

Fig.3 Thrombin YES logic gate

(A) The absorption spectra with and without the addition of thrombin; (B) The normalized absorption value of 670 nm/522 nm in a truth table. Without addition of thrombin (curve 1) and with addition of thrombin(curve 2).

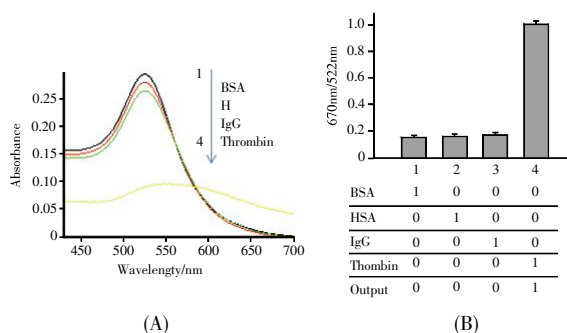


图 4 逻辑门特异性研究

(A)输入 BSA、HSA、IgG 和凝血酶时的吸收光谱图;(B)是 670 nm/522 nm 吸收值归一化显示的输出信号^[15]。1~4 分别是输入 BSA、HSA、IgG 和凝血酶。

Fig.4 Specificity of the logic gate

(A) The absorption spectra when BSA, HSA, IgG and thrombin as inputs; (B) The normalized absorption value of 670 nm/522 nm in a truth table according to reference^[15]. 1~4 is the BSA, HSA, IgG and thrombin as the input, respectively.

不能同时结合到探针上,则不能输出信号。上述结果证明我们有效地构建了以凝血酶为输入信号,以胶体金团聚为输出信号的 YES 逻辑门。

最后我们探索了新研制的 DNA 逻辑门的特异性。这是因为作为分子计算机基础的 DNA 逻辑门为实现疾病的诊治及预后,必须具有好的特异性^[3-5]。我们用非凝血酶蛋白质(BSA、HSA、IgG)对逻辑门的特异性进行了研究。结果显示在图 4 中。我们发现当输入 BSA、HSA、IgG 等蛋白质时,吸收峰及吸收值都没有明显变化,但是当输入凝血酶蛋白质时,522 nm 吸收峰明显降低,峰出现明显红移。这些实验说明逻辑门具有好的特异性。

3 讨论

我们根据核酸适体和蛋白质特异性结合,引起功能化胶体金团聚的特性,构建了凝血酶输入信号的 YES 逻辑门,快速监测凝血酶在样品中的存在。当我们将凝血酶的核酸适体设计为其他蛋白质或小分子的核酸适体时,依据该逻辑门构建方法,我们可以构建其他蛋白质或小分子的逻辑门,从而实现更多蛋白质等物质的监测,在临床上为疾病的防治将有重要的作用。

参考文献(References):

- [1] BENENSON Y, ELIZUR T, ADAR R, *et al.* Programmable and autonomous computing machine made of biomolecules[J]. Nature, 2001, 414(6862): 430-434.
- [2] ADLEMAN L M. Molecular computation of solutions to combinatorial problems[J]. Science, 1994, 266(5187):1021-1024.

(下转第 223 页)

在 Ang1 调节 BSCB 屏障功能的过程中是否发挥作用仍需进一步的研究阐明。

参考文献 (References):

- [1] ABBOTT N J, PATABENDIGE A A, DOLMAN D E, *et al.* Structure and function of the blood-brain barrier[J]. *Neurobiology of Disease*, 2010, 37(1):13-25.
- [2] BALENTINE J D. Pathology of experimental spinal cord trauma. I. The necrotic lesion as a function of vascular injury[J]. *Laboratory Investigation*, 1978, 39(3):236-253.
- [3] NOBLE L J, WRATHALL J R. Blood spinal cord barrier disruption proximal to a spinal cord transection in the rat: time course and pathways associated with protein leakage[J]. *Experimental Neurology*, 1988, 99(3):567-578.
- [4] NORDAL R A, WONG C S. Intercellular adhesion molecule-1 and blood-spinal cord barrier disruption in central nervous system radiation injury[J]. *Journal of Neuropathology Experimental Neurology*, 2004, 63(5):474-483.
- [5] NICAISE C, MITRECIC D, DEMETTER P, *et al.* Impaired blood-brain and blood-spinal cord barriers in mutant SOD1-linked ALS rat[J]. *Brain Research*, 2009, 1301:152-162.
- [6] HENKEL J S, BEERS D R, WEN S, *et al.* Decreased mRNA expression of tight junction proteins in lumbar spinal cords of patients with ALS[J]. *Neurology*, 2009, 72(18):1614-1616.
- [7] SAIDA K, SAIDA K, KAI K, *et al.* Central nervous system lesions in rats infected with Friend murine leukemia virus-related PVC441: ultrastructural and immunohistochemical studies[J]. *Acta Neuropathologica*, 1997, 93(4):369-378.
- [8] RIVERO F, KOPPEL B, PERACINO B, *et al.* The role of the cortical cytoskeleton: F-actin crosslinking proteins protect against osmotic stress, ensure cell size, cell shape and motility, and contribute to phagocytosis and development[J]. *Journal of Cell Science*, 1996, 109(11):2679-2691.
- [9] WONG A L, HAROON Z A, WERNER S, *et al.* Tie2 expression and phosphorylation in angiogenic and quiescent adult tissues[J]. *Circulation Research*, 1997, 81(4):567-574.
- [10] THURSTON G, SURI C, SMITH K, *et al.* Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically over expressing angiopoietin-1[J]. *Science*, 1999, 286(5449):2511-2514.
- [11] LEE S W, KIM W J, JUN H O, *et al.* Angiopoietin-1 reduces vascular endothelial growth factor-induced brain endothelial permeability via up regulation of ZO-2[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2009, 23(2):279-284.
- [12] PAPAPETROPOULOS A, FULTON D, MAHBOUBI K, *et al.* Angiopoietin-1 inhibits endothelial cell apoptosis via the Akt/surviving pathway[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(13):9102-9105.
- [13] ZHANG J, FUKUHARA S, SAKO K, *et al.* Angiopoietin-1/Tie2 signal augments basal Notch signal controlling vascular quiescence by inducing delta-like 4 expression through AKT-mediated activation of beta-catenin[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(10):8055-8066.
- [14] GE S, PACTHER J S. Isolation and culture of microvascular endothelial cells from murine spinal cord[J]. *Journal of Neuroimmunology*, 2006, 177(1):209-214.
- [15] WATSON P M, PATERSON J C, THOM G, *et al.* Modelling the endothelial blood-CNS barriers: a method for the production of robust *in vitro* models of the rat blood-brain barrier and blood-spinal cord barrier[J]. *BMC Neuroscience*, 2013, 14:59.
- [16] ABBOTT N J, DOLMAN D E, DRNDARSKI S, *et al.* An improved *in vitro* blood-brain barrier model: rat brain endothelial cells co-cultured with astrocytes[J]. *Methods Molecular Biology*, 2012, 814:415-430.
- [17] ABBOTT N J, RONNBACK L, HANSSON E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier[J]. *Nature Reviews Neuroscience*, 2006, 7(1):41-53.
- [18] SURI C, MCCLAIN J, THURSTON G, *et al.* Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin[J]. *Science*, 1998, 282(5388):468-471.
- [19] KIM I, KIM H G, MOON S O, *et al.* Angiopoietin-1 induces endothelial cell sprouting through the activation of focal adhesion kinase and plasmin secretion[J]. *Circulation Research*, 2000, 86(9):952-959.

(上接第 212 页)

- [3] BONEH D, DUNWORTH C, LIPTON R J, *et al.* On the computational power of DNA[J]. *Discrete Applied Mathematics*, 1996, 71(12):79-94.
- [4] GIFFORD D K. On the path to computation with DNA[J]. *Science*, 1994, 266:993-994.
- [5] STOJANOVIC M N, STEFANOVIC D. A deoxyribozyme-based molecular automaton[J]. *Nature Biotechnology*, 2003, 21(9):1069-1074.
- [6] PEI H, LIANG L, YAO G H, *et al.* Reconfigurable three-dimensional DNA nanostructures for the construction of intracellular logic sensors[J]. *Angewandte Chemie*, 2012, 124(36): 9154-9158.
- [7] YANG J, SHEN L J, MA J J, *et al.* Fluorescent nanoparticle beacon for logic gate operation regulated by strand displacement[J]. *ACS Applied Materials*, 2013, 5(12):5392-5396.
- [8] ZHU J B, ZHANG L B, LI T, *et al.* Enzyme-free unlabeled DNA logic circuits based on toehold-mediated strand displacement and split G-quadruplex enhanced fluorescence[J]. *Advanced Materials*, 2013, 25(17):2440-2444.
- [9] WANG D F, FU Y M, YAN J, *et al.* Molecular logic gates on DNA origami nanostructures for microRNA diagnostics[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(4):1932-1936.
- [10] ZHANG C, YANG J, XU J. Circular DNA logic gates with strand displacement[J]. *Langmuir*, 2010, 26(3):1416-1419.
- [11] MOSHE M, ELBAZ J, WILLENER I. Sensing of UO_2^{2+} and design of logic gates by the application of supramolecular constructs of ion-dependent DNazymes[J]. *Nano Letters*, 2009, 9(3): 1196-1200.
- [12] GIL B, KAHAN H M, SKIRTENKO N, *et al.* Detection of multiple disease indicators by an autonomous biomolecular computer[J]. *Nano Letters*, 2011, 11(7): 2989-2996.
- [13] LIU X Q, AIZEN R, FREEMAN R, *et al.* Multiplexed aptasensors and amplified DNA sensors using functionalized Graphene oxide: application for logic gate operations[J]. *ACS Nano*, 2012, 6(4): 3553-3563.
- [14] BEYER S, SIMMEL F C. A modular DNA signal translator for the controlled release of a protein by an aptamer[J]. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34(5): 1581-1587.
- [15] LIU X P, ZHOU Z H, ZHANG L L, *et al.* Colorimetric sensing of adenosine based on aptamer binding inducing gold nanoparticle aggregation[J]. *Chinese Journal of Chemistry*, 2009, 27(8): 1855-1859.