

文章编号: 0253-2239(2006)03-0521-5

# 用光波导光模光谱技术研究 DNA-DNA 结合蛋白相互作用\*

吴中伟 刘全俊 吴凌伟 谢 晓 庄 莹 温 恬 白云飞 陆祖宏

(东南大学生物电子学国家重点实验室, 南京 210096)

**摘要:** 探讨了应用光波导光模光谱(Optical waveguide lightmode spectroscopy, OWLS)技术研究 DNA-DNA 结合蛋白相互作用的可行性和灵敏性。以固定在传感器芯片表面的 DNA 探针为捕捉分子, 溶液中同时含有探针结合序列和 NF- $\kappa$ B 结合位点序列的寡核苷酸与 NF- $\kappa$ B 亚单位 p50 同源二聚体形成的 DNA-蛋白质复合物为检测分子, 用光波导光模光谱检测技术建立非标记 DNA-DNA 结合蛋白相互作用检测研究体系。利用这一体系对不同样品中 NF- $\kappa$ B p50 浓度和具不同 NF- $\kappa$ B 结合位点序列的寡核苷酸与 NF- $\kappa$ B p50 亲和力和进行检测。样品中低至 0.33 nmol/l 的 NF- $\kappa$ B p50 被光波导光模光谱检测出, 不同的 NF- $\kappa$ B 结合序列与 NF- $\kappa$ B p50 亲和力有显著差异。研究发现, 光波导光模光谱技术可以用于 DNA-DNA 结合蛋白相互作用研究, 所建立的非标记检测研究体系可以进行样品中结合蛋白含量高灵敏检测和核酸序列与结合蛋白的亲合力的检测研究。

**关键词:** 医用光学与生物技术; 传感器; 非标记检测; 光波导光模光谱技术; DNA-蛋白质复合物; NF- $\kappa$ B p50

中图分类号: Q513; TP212; TN247 文献标识码: A

## Application of Optical Waveguide Lightmode Spectroscopy in Studying the Interaction of DNA to DNA-Binding Protein

Wu Zhongwei Liu Quanjun Wu Lingwei Xie Xiao Zhuang Ying Wen Tian  
Bai Yunfei Lu Zuhong

(State Key Laboratory of Bioelectronics, Southeast University, Nanjing 210096)

**Abstract:** The feasibility and sensitivity of optical waveguide lightmode spectroscopy (OWLS) in studying DNA-protein interaction are discussed. In the label-free DNA and DNA-protein interaction detection assay based on optical waveguide lightmode spectroscopy (OWLS), the probe was located online onto the amino silanized sensor chip of optical waveguide lightmode spectroscopy by glutaraldehyde covalent coupling; the DNA-protein complex, combination of NF- $\kappa$ B p50 homodimer and oligonucleotide with binding site to NF- $\kappa$ B p50 homodimer and binding sequence to probe, was used as the detect molecule. The different concentrations of p50 in detection samples and affinity of oligonucleotides with different binding site sequence of NF- $\kappa$ B to p50 were tested in this system. With this detection system, as low as 0.33 nmol/l of NF- $\kappa$ B p50 in the samples was detected, and the affinity of oligonucleotides with different binding site sequence to NF- $\kappa$ B is quite different. The label-free studying system of DNA-protein interaction based on the optical waveguide lightmode spectroscopy technique is feasible and high sensitivity, and this system can be used in the research targeted at the interaction of DNA and DNA-binding proteins and detection of the affinity of oligonucleotides to binding protein.

**Key words:** medical optics and biotechnology; sensor; label-free detection; optical waveguide lightmode spectroscopy; DNA-protein complex; NF- $\kappa$ B p50

\* 国家自然科学基金(60121101, 60501010)资助课题。

作者简介: 吴中伟(1970—), 男, 江西永丰人, 博士研究生, 主要从事生物电子学和生物信息学研究。

E-mail: zww@seu.edu.cn

导师简介: 陆祖宏(1960—), 男, 江苏无锡人, 教授, 博士生导师, 主要从事生物电子学和生物信息学研究。

E-mail: zhlu@seu.edu.cn

收稿日期: 2006-09-15; 收到修改稿日期: 2006-11-10

# 1 引 言

脱氧核糖核酸(DNA)结合蛋白(DNA-binding protein)在细胞的转录调控、基因重组和重排、DNA复制、修复等过程中扮演着重要的角色。目前,作为一类重要的核转录因子,核转录因子- $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$  appa B, NF- $\kappa$ B)家族因其与肿瘤的发生、转移及细胞凋亡关系密切而倍受关注<sup>[1]</sup>。研究 NF- $\kappa$ B 与 DNA 相互作用,对于揭示 NF- $\kappa$ B 作用的分子机理,开发肿瘤治疗的新药物等都有重要的意义。

许多检测蛋白质和 DNA 序列相互结合的技术方法已经被用于 NF- $\kappa$ B 与 DNA 相互作用的研究,例如凝胶迁移或电泳迁移率检测(Electrophoretic mobility shift assay, EMSA)<sup>[2,3]</sup>, DNA 酶 I 印迹(DNase I footprinting assays)<sup>[4]</sup>, 蛋白结合双链 DNA 芯片(Protein binding microarrays)<sup>[5]</sup>, 荧光共振能量转移-外切酶 III 保护检测(FRET-Exonuclease III protection assay)<sup>[6,7]</sup>, 蛋白质芯片(Protein microarrays)<sup>[8]</sup>以及表面等离子共振(Surface plasmon resonance, SPR)<sup>[9]</sup>等。但是这些方法大都需要对 DNA 或蛋白质进行标记,有的还需要放射性同位素标记,在安全、生物分子活性、检测灵敏性等方面存在的不足,影响了它们的广泛应用;表面等离子共振虽然也是一种非标记的方法,但是仪器和芯片价格昂贵、芯片表面修饰比较困难,不容易控制。

光波导光模光谱(Optical waveguide lightmode spectroscopy, OWLS)技术,是一种在分子水平上研究表面作用过程的非标记光学原位传感器探测技术,已被成功的用于血清中抗原抗体检测<sup>[10]</sup>、在线监测细胞对有毒化合物的反应<sup>[11]</sup>、环境中除草剂探测<sup>[12]</sup>等,但在 DNA-DNA 结合蛋白相互作用的应用还罕见报道。

为了发展安全、高灵敏的非标记 DNA-DNA 结合蛋白相互作用研究技术,利用固定在传感器芯片表面的 DNA 探针为捕捉分子,以同时含有探针结合序

列和 NF- $\kappa$ B 结合位点序列的寡核苷酸与 NF- $\kappa$ B 亚单位 p50 同源二聚体形成的 DNA-蛋白质复合物为检测分子,结合光波导光模光谱检测技术建立了非标记 DNA-DNA 结合蛋白相互作用实验检测体系,通过利用这一体系对不同样品中 NF- $\kappa$ B p50 浓度和具不同 NF- $\kappa$ B 结合位点序列的寡核苷酸与 NF- $\kappa$ B p50 亲和力进行检测,探讨利用光波导光模光谱技术研究 DNA-DNA 结合蛋白相互作用的可行性和灵敏性。

## 2 材料与方 法

### 2.1 实验材料与仪器

NF- $\kappa$ B p50 购自英国 Active Motif,所有化学试剂购自南京生兴公司;去离子双蒸水由 Millipor 水纯化系统(美国 Billerica 公司产品)提供;光波导光模光谱检测系统光波导光模光谱-120 和光波导传感器芯片 OW2400 是匈牙利微真空公司(Micro Vacuum)产品,系统由 BioSense 2.2 (MicroVacuum)软件控制。光波导光模光谱仪器检测系统的示意图见图 1。

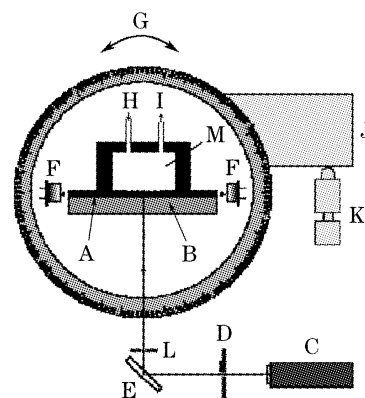


图 1 光波导光模光谱传感器示意图

Fig. 1 Schematic arrangement of an optical waveguide lightmode spectroscopy sensor

研究用探针和寡核苷酸(见表 1)根据文献报道的人 NF- $\kappa$ B 抑制物 i- $\kappa$ B 启动子基因序列设计<sup>[2]</sup>,其中划线部分是 NF- $\kappa$ B 位点,探针和寡核苷酸都由南京百龙基因公司化学合成。

表 1 探针和寡核苷酸

Table 1 Probes and oligonucleotide sequences used in this assay

Name	Sequence
P-U	NH <sub>2</sub> -5'-T(5)CAGGTGGCGTGAATGGGTCC-3'
S1-1	5'-GGGGATTTCTCGTTAGTAAC <u>GAGAAATCCCC</u> GGACCCATTCACGCCACCTG-3'
S2-1	5'-GGGGAATTTCCGTTAGTAAC <u>GGAAATTTCCCC</u> GGACCCATTCACGCCACCTG-3'
S3-1	5'-GGGGTTTCCCGTTAGTAAC <u>GGGAAACCCCC</u> GGACCCATTCACGCCACCTG-3'

DNA 稀释缓冲液为 50 mmol Tris/HCl (pH 8.0), 100 mmol NaCl, 1 mmol EDTA; DNA 探针溶解液为 0.1 mol Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 9.0; 清洗缓冲液为

10 mmol HEPES [N'-(2-hydroxyethyl) piperazine-N-ethanesulphonic acid-NaOH], 0.2 mol NaCl, 3 mmol MgCl<sub>2</sub>, pH 7.9; 上述清洗缓冲液中加入 5 mmol DDT

(dithiothreitol)作为结合蛋白稀释缓冲液。

## 2.2 传感器芯片修饰

用 2, 3-氨基丙基三乙氧基硅烷 (2, 3-aminopropyltriethoxysilane, APTES) 进行传感器芯片硅烷化<sup>[13]</sup>; 2.5% 戊二醛、0.2  $\mu\text{mol}$  探针和 20 mmol 己二胺分别用于芯片的醛基化、探针的固定以及封闭等在线修饰<sup>[12]</sup>; 固定、封闭结束后, 芯片从光波导光模光谱传感器中取出, 置于硼氢化钠溶液中反应 30 min, 蒸馏水水洗 3 次, 每次 5 min, 氮气吹干后重新装入光波导光模光谱传感器用于下面的实验。

## 2.3 样品制备

具有探针结合序列和 NF- $\kappa$ B p50 结合位点序列的寡核苷酸 S1-1 用 DNA 稀释缓冲液稀释到 1  $\mu\text{mol}$ , 95  $^{\circ}\text{C}$  加热变性 1 min, 然后冷却到 25  $^{\circ}\text{C}$ , 保温 60 min。分别取 1  $\mu\text{l}$  上述样品与不同摩尔浓度 (0, 0.09 nmol/l, 0.17 nmol/l, 0.33 nmol/l, 0.66 nmol/l, 1.32 nmol/l, 2.64 nmol/l) 的 NF- $\kappa$ B p50 混合, 样品体积 150  $\mu\text{l}$ , 充分混匀, 室温温育 30 min 后用于光波导光模光谱检测实验。另外, 不加寡核苷酸的 150  $\mu\text{l}$  0.66 nmol/l NF- $\kappa$ B p50 作为对照。

具有探针结合序列和不同 NF- $\kappa$ B 结合位点序列的寡核苷酸 S1-1、S2-1、S3-1 分别用 DNA 稀释缓冲液稀释到 1  $\mu\text{mol}$ /l, 95  $^{\circ}\text{C}$  加热变性 1 min, 然后冷却到 25  $^{\circ}\text{C}$ , 保温 60 min。分别取 1  $\mu\text{l}$  上述样品与摩尔浓度为 0.66 nmol/l 的 NF- $\kappa$ B p50 混合, 样品体积 150  $\mu\text{l}$ , 充分混匀, 室温温育 30 min 后用于光波导光模光谱检测实验。

## 2.4 光波导光模光谱实验及数据处理

用速度为 80  $\mu\text{l}/\text{min}$  的清洗缓冲液冲洗传感器芯片, 用微量注射器注入样品。当样品到达芯片上的流动池时停止液流 15 min, 重新用清洗缓冲液清洗芯片, 注入 50 mmol HCl 再生芯片, 清洗缓冲液清洗芯片, 当检测基线平稳后开始新样品的上样。

取样品进入流动池前 1~2 min 作为基线, 对样品进入流动池后 5~6 min 的区段的表面结合物质量 (Mass) 变化数据采用 BioSense 2.2 的分析功能和 Sigmaplot 对数据进行处理分析。

## 3 结果与讨论

### 3.1 非标记 DNA-DNA 结合蛋白相互作用检测研究模型

为了探索光波导光模光谱技术在 DNA-DNA 结合蛋白相互作用的应用的可行性及其敏感性, 以

NF- $\kappa$ B p50 和其相应 NF- $\kappa$ B 位点建立了检测研究模型, 其作用原理见图 2: 同时具有 NF- $\kappa$ B 位点和探针互补序列的寡核苷酸与 NF- $\kappa$ B p50 混合, 充分作用后上样, 样品中的 DNA-蛋白质复合物和游离的寡核苷酸竞争与固定在光波导光模光谱传感器芯片表面的探针结合, 由于复合物和游离的寡核苷酸两者分子大小的差异, 与探针结合引起的折射率变化也不一样。因此, 可以对样品中 DNA-蛋白质的相互作用进行定量定性研究。

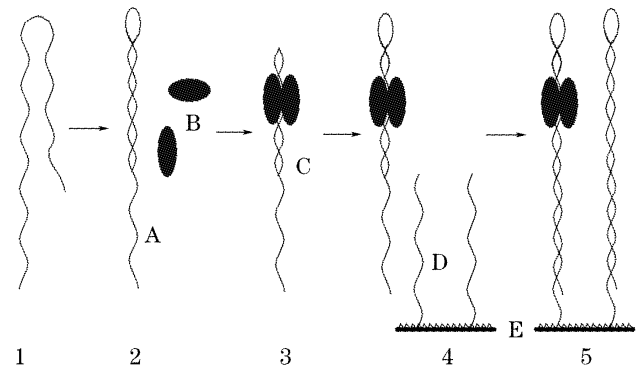


图 2 非标记 DNA-DNA 结合蛋白相互作用检测体系工作原理

Fig. 2 Schematic working principle of for lable-free NDA and DNA-binding protein interaction detection

图 3 表示光波导光模光谱传感器芯片在线修饰过程, 醛基化和探针固定后, 表面结合物质量变化量明显可见, 表明探针已成功固定在光波导光模光谱传感器芯片的表面。

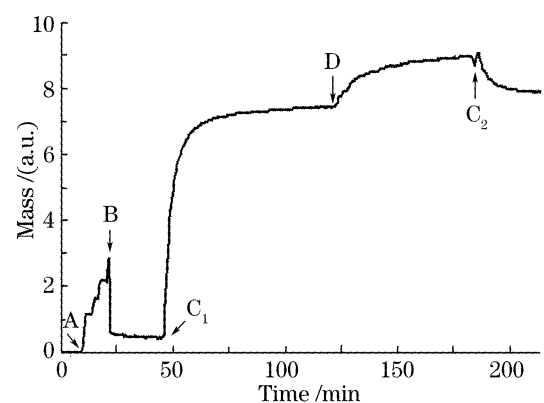


图 3 光波导光模光谱传感器芯片在线修饰

Fig. 3 Online modification of the OWLS sensor chip

### 3.2 样品中 NF- $\kappa$ B p50 检测及其灵敏度

NF- $\kappa$ B p50 是 NF- $\kappa$ B 家族的重要成员, 在生物体内主要以 p50/p50 同源二聚体和 p50/p65 异源二聚体形式存在。p50/p50 同源二聚体与基因启动子区的 NF- $\kappa$ B 位点结合, 形成 DNA-蛋白质复合物, 对基因的表达起负调控作用。因此也常被用作于 NF- $\kappa$ B 与 DNA 相互作用和 NF- $\kappa$ B 检测的各种研究

模型<sup>[5~7,9]</sup>。在寡核苷酸 S1-1 中具有与 p50 同源二聚体专一结合的 NF- $\kappa$ B 位点<sup>[2]</sup>,因此选择其与 p50 同源二聚体形成的 DNA-蛋白质复合物作为检测对象。不同浓度的 p50 与寡核苷酸 S1-1 相互作用后用光波导光模光谱进行检测的传感器芯片表面结合物质量变化结果见图 4:随着 p50 浓度的增加,表面结合物质量相应同时增加。图中空白对照组 1(C1) 是不含核酸和蛋白质的缓冲液,相应的表面结合物质量变化来自样品到达流动池后停止液流导致的变化;对照组 2(C2)是不含核酸的 p50 蛋白质样品,其表面结合物质量变化可能来自停止液流操作和非特异性随机吸附作用;对照组 3(C3)是只含核酸不含蛋白质的样品,除去停止液流带来的影响,其表面结合物质量变化主要来自核酸分子与探针特异结合,但核酸分子与探针的特异性作用由于样品中核酸分子分子量小,摩尔浓度也较低(大约 6.7 nmol/l),表面结合物质量变化数量并不大。

光波导光模光谱技术是一种高灵敏的非标记光学原位传感器探测技术,表面物质相互作用产生的微小的折射率变化都可以反映在光波导光模耦合角的变化上;同时,折射率又与温度、压力以及液流速度等环境条件密切相关。综合考虑上述停止液流操作、寡核苷酸分子与探针竞争性结合以及非特异性随机吸附作用等因素的影响,在我们的实验条件下,基于光波导光模光谱技术的非标记 DNA-DNA 结合蛋白相互作用检测体系对 NF- $\kappa$ B p50 的检测灵敏度可以达到 0.33 nmol/l,这比荧光共振能量转移-外切酶 III 保护检测<sup>[6,7]</sup>(约 15 nmol/l),蛋白结合双链 DNA 芯片<sup>[5]</sup>(约 16 nmol/l),电泳迁移率检测实

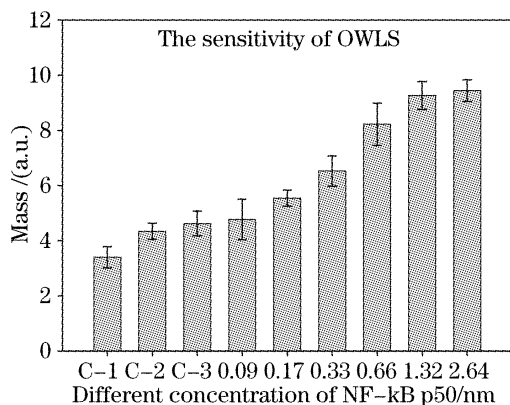


图 4 不同摩尔浓度 p50 与 S1-1 混合物与传感器芯片表面结合物质量变化

Fig. 4 Optical waveguide lightmode spectroscopic measurement result of combination between mass of different dilutions of p50 homodimer mixed with oligonucleotide S1-1 and the sensor chip surface

验(约 10 nmol/l)<sup>[3]</sup>都要高,这一摩尔浓度比文献中用表面等离子共振<sup>[9]</sup>进行 NF- $\kappa$ B p50 与 DNA 识别研究所用的摩尔浓度 20 nmol/l 也要低得多。通过改变实验方案,减少环境变化等因素引起的折射率变化的影响,例如,消除操作模式和寡核苷酸分子的竞争性作用,光波导光模光谱的检测灵敏度还可望大幅度提高。

### 3.3 不同 NF- $\kappa$ B 位点与 p50 亲和力研究

为了进一步验证体系的检测功能,分别将含有和 NF- $\kappa$ B p50 有不同亲和力的 NF- $\kappa$ B 位点的寡核苷酸 S1-1、S2-1 和 S3-1 与 0.66 nmol/l NF- $\kappa$ B p50 混合,对不同 NF- $\kappa$ B 位点的亲和力进行检测。图 5 所示是光波导光模光谱系统循环对不同 NF- $\kappa$ B 位点的亲和力检测的过程曲线。不同摩尔浓度 p50 与传感器芯片表面结合物质量变化分析见图 6,其中对照组是不加 p50 的 S1-1 寡核苷酸样品;检测分析

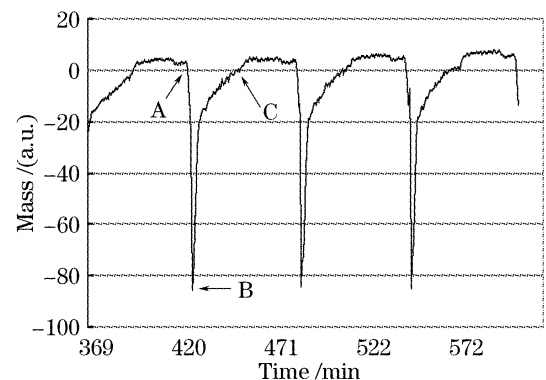


图 5 不同 NF- $\kappa$ B 位点与 NF- $\kappa$ Bp50 亲和力检测循环  
Fig. 5 Measuring cycles of affinity detection of different NF- $\kappa$ B sites to NF- $\kappa$ B p50 with Optical waveguide lightmode spectroscopic

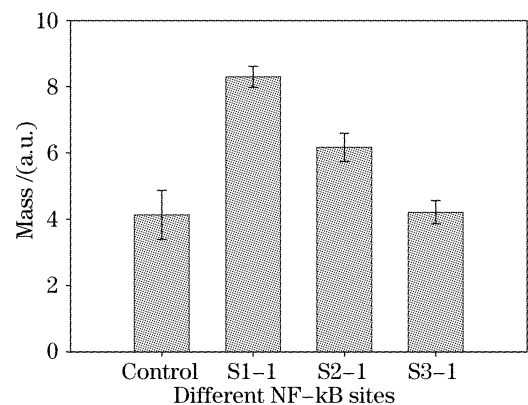


图 6 不同 NF- $\kappa$ B 位点与传感器芯片表面结合物质量变化

Fig. 6 Optical waveguide lightmode spectroscopic measurement result of mass of combination between different NF- $\kappa$ B sites and the sensor chip surface

结果表明, S1-1 与 NF- $\kappa$ B p50 二聚体的亲合力最高, S2-1 其次, 而 S3-1 与 p50 的亲合力几乎没有, 这与 Caryn Y. Ito 等<sup>[2]</sup>用电泳迁移率检测实验得出的 S1-1 只和 P50 结合, S2-1 主要和 p50/p65 异源二聚体结合, S3-1 只和 p50 以外的其他 NF- $\kappa$ B 家族成员形成的聚合物结合的结果相一致。

## 4 结 论

综上所述, 光波导光模光谱技术可以用于 DNA-DNA 结合蛋白相互作用研究, 所建立的非标记检测研究体系可以进行样品中结合蛋白含量高灵敏检测和核酸序列与结合蛋白的亲合力的检测研究。

## 参 考 文 献

- 1 Eli Pikarsky, Rinnat M. Porat, Ilan Stein *et al.*. NF- $\kappa$ B functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer [J]. *Nature*, 2004, **431**(7007): 461~466
- 2 C. Y. Ito, Alexey G. Kazantsev, Albert S. J. Baldwin Three NF- $\kappa$ B sites in the I $\kappa$ B- $\alpha$  promoter are required for induction of gene expression by TNF $\alpha$ [J]. *Nucleic Acids Research*, 1994, **22**(18): 3787~3792
- 3 Christopher B. Phelps, Lei Lei Sengchanthalangsy, Shiva Malek *et al.*. Mechanism of  $\kappa$ B DNA binding by Rel/NF- $\kappa$ B dimmers [J]. *J. Biological Chemistry*, 2000, **275**(32): 24392~24399
- 4 Lynn M. Powell, Bernard A. Connolly, David T. F. Dryden. The DNA binding characteristics of the trimeric EcoKI methyltransferase and its partially assembled dimeric form determined by fluorescence polarisation and DNA footprinting [J]. *J. Molecular Biology*, 1998, **283**(5): 947~961
- 5 Yunfei Bai, Qinyu Ge, Quanjun Liu *et al.*. A free-labeled method for DNA-binding protein detection using a double-stranded DNA microarray [J]. *J. Nanoscience and Nanotechnology*, 2005, **5**(7): 1216~1219
- 6 Jinke Wang, Tongxiang Li, Xiaoying Guo *et al.*. Exonuclease III protection assay with FRET probe for detecting DNA-binding proteins[J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, **33**(2): e23
- 7 Zaozao Chen, Meiju Ji, Peng Hou *et al.*. Exo-dye-based assay for rapid, inexpensive, and sensitive detection of DNA-binding proteins [ J ]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, **345**(3): 1254~1263
- 8 Suwen Ho, Ghil Jona, Christina T. L. Chen *et al.*. Linking DNA-binding proteins to their recognition sequences by using protein microarrays[J]. *Proc. National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, **103**(26): 9940~9945
- 9 Darren J. Hart, Robert E. Speight, Matthew A. Cooper *et al.*. The salt dependence of DNA recognition by NF- $\kappa$ B p50: a detailed kinetic analysis of the effects on affinity and specificity [J]. *Nucleic Acids Research*, 1999, **27**(4): 1063~1069
- 10 Corinne R. Wittmer, Paul R. Van Tassel. Probing adsorbed fibronectin layer structure by kinetic analysis of monoclonal antibody binding [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2005, **41**(2~3): 103~109
- 11 J. Vörös, R. Graf, G. L. Kenausis *et al.*. Feasibility study of an online toxicological sensor based on the optical waveguide technique[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2000, **15**(9~10): 423~429
- 12 András Székács, Nikoletta Trummer, Nóra Adanyi *et al.*. Development of a non-labeled immunosensor for the herbicide trifluralin via optical waveguide lightmode spectroscopic detection [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2003, **487**(1): 31~42
- 13 N. Trummer, N. Adanyi, M. Varadi *et al.*. Modification of the surface of integrated optical wave-guide sensors for immunosensor applications[J]. *Fresenius J. Analytical Chemistry*, 2001, **371**(1): 21~24