



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104480114 B

(45)授权公告日 2017.12.05

(21)申请号 201410852323.3

(22)申请日 2014.12.31

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104480114 A

(43)申请公布日 2015.04.01

(73)专利权人 湖南大学

地址 410082 湖南省长沙市河西岳麓山湖南大学化学生物传感与计量学国家重点实验室

(72)发明人 羊小海 陈南迪 王柯敏 王青 朱莹

(74)专利代理机构 湖南兆弘专利事务所(普通合伙) 43008

代理人 赵洪

(51)Int.Cl.

C12N 15/115(2010.01)

C12N 15/10(2006.01)

G01N 30/02(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

A61K 47/26(2006.01)

A61K 31/337(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(56)对比文件

CN 103898119 A, 2014.07.02,

矫丽媛. β -葡萄糖醛酸苷酶对甘草酸键选择性的改造及其 DNA 适配体筛选.《中国优秀硕士论文全文数据库》.2004,第10页.

Jens et al. Monitoring the progression of the in vitro selection of nucleic acid aptamers by denaturing high-performance liquid chromatography.《Anal Bioanal Chem》.2008,1033-1037.

审查员 马骞

权利要求书1页 说明书9页

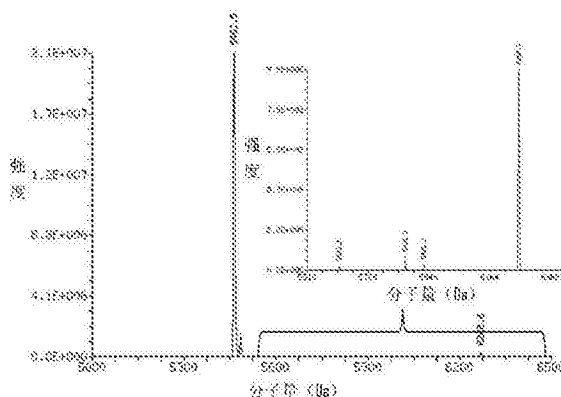
序列表4页 附图6页

(54)发明名称

高效液相色谱筛选核酸适配体的方法及核酸适配体和应用

(57)摘要

本发明公开了一种高效液相色谱筛选核酸适配体的方法及核酸适配体和应用,其中高效液相色谱筛选核酸适配体的方法,包括以下步骤:从随机文库RS36中筛选与多西紫杉醇特异性结合的核酸适配体的核酸文库;采用高效液相色谱法筛选核酸文库得到核酸适配体;高效液相色谱法中,固定相为十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱;流动相采用水-乙腈梯度洗脱;检测波长为260nm;检测器为二极管阵列检测器。按照高效液相色谱法筛选的核酸适配体具有能够与多西紫杉醇高特异性和高亲和力结合、无免疫原性、能够化学合成、生物相容性好、分子量小、稳定、易于保存等优点,可应用于药物载体、药物分离与纯化、制备多西紫杉醇检测探针或靶点探针等。



1. 高效液相色谱筛选核酸适配体的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 从随机文库RS36中筛选与多西紫杉醇特异性结合的核酸适配体的核酸文库;所述随机文库RS36具有SEQ ID NO.1所述的核苷酸序列;

(2) 采用高效液相色谱法筛选所述核酸文库得到核酸适配体;所述高效液相色谱法中,固定相为十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱;流动相采用水-乙腈梯度洗脱;检测波长为260nm;检测器为二极管阵列检测器;所述步骤(2)中所述高效液相色谱的流动相中A相为水,B相为乙腈,所述梯度洗脱方法为:

0min~5min,流动相为95 v/v%的水和5 v/v %的乙腈;

5min~20min,流动相为95 v/v%的水和5 v/v %的乙腈匀速梯度改变至85 v/v%的水和15 v/v %的乙腈;

所述步骤(2)中所述十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱的柱温为25℃。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述步骤(2)中所述高效液相色谱的进样量为20μL。

3. 一种权利要求1或2所述方法筛选得到的核酸适配体,其特征在于,所述核酸适配体的核苷酸序列包括以下序列中任意一种:

SEQ ID NO.2所述的核苷酸序列或SEQ ID NO.3所述的核苷酸序列。

4. 一种权利要求3所述的核酸适配体做为多西紫杉醇药物载体中的应用,所述核酸适配体的核苷酸序列为SEQ ID NO.2所述的核苷酸序列。

5. 一种权利要求3所述的核酸适配体在提高多西紫杉醇溶解能力中的应用,所述核酸适配体的核苷酸序列为SEQ ID NO.2所述的核苷酸序列。

6. 一种权利要求3所述的核酸适配体在制备多西紫杉醇检测探针中的应用,所述核酸适配体的核苷酸序列为SEQ ID NO.2所述的核苷酸序列。

高效液相色谱筛选核酸适配体的方法及核酸适配体和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体涉及一种高效液相色谱法筛选核酸适配体的方法,还涉及高效液相色谱法筛选得到的核酸适配体及核酸适配体的应用。

背景技术

[0002] 多西紫杉醇(Docetaxel)属于紫杉醇类抗肿瘤药,主要作用于细胞的微管蛋白从而干扰细胞有丝分裂,起到抗肿瘤效果,其不良反应主要表现为过敏反应,血小板减少,心动过速,低血压,神经毒性反应,胃肠道反应以及皮肤毒性反应等。多西紫杉醇水溶性小,市售药物泰索帝采用吐温-80增溶,乙醇助溶,会增加代谢的肝脏负担并有可能引发过敏反应、溶血反应等副作用。因此,如何降低泰索帝副作用、提高临床疗效已成为亟待解决的问题。另外,由于多西紫杉醇的结构特性,使其摩尔吸光系数较低,难以运用简单的低成本光谱方法进行高灵敏的微量定量分析。

[0003] 核酸适配体(apptamer)是通过指数富集配体的系统进化技术(SELEX)筛选得到的,能特异结合靶物质的单链寡聚核苷酸(ssDNA或ssRNA)。核酸适配体与抗体功能类似,但是与抗体相比具有更多的优势,如具有更高的亲和力与特异性,无免疫原性,能够化学合成,成本低,可进行标记,稳定性好,易于保存等优点。核酸适配体的靶分子更为广泛,包括金属离子、氨基酸、核酸、多肽、蛋白质等,并能从单一靶标扩展至完整的病毒颗粒及细胞等复合物靶标。

[0004] 在目前常规的核酸适配体筛选方法中,需要对预富集的核酸文库进行测序,再从大量的测序结果中挑选出亲和力高、选择性好的核酸适配体序列,这一过程存在耗时长、效率低、成本高、难以实现自动化的问题。快速挑选多西紫杉醇核酸适配体的方法,将有望提供一种高通量,低成本挑选多西紫杉醇的核酸适配体的方法。而且此方法也有望拓展于紫杉醇、喜树碱等其他疏水性小分子药物的核酸适配体序列的挑选。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是克服现有技术的不足,提供一种能高通量,低成本筛选多西紫杉醇核酸适配体的方法,还相应提供了采用高效液相色谱法筛选得到的核酸适配体,该核酸适配体能够与多西紫杉醇高特异性和高亲和力结合,具有无免疫原性、能够化学合成、生物相容性好、分子量小、稳定、易于保存等优势,可应用于制备多西紫杉醇检测探针、多西紫杉醇靶点探针;做为多西紫杉醇药物载体;提高多西紫杉醇的溶解能力;应用于多西紫杉醇药物分离与纯化、多西紫杉醇药物制备、设计与开发等领域。

[0006] 为解决上述技术问题,本发明提供了一种高效液相色谱筛选核酸适配体的方法,包括以下步骤:

[0007] (1) 从随机文库RS36中筛选与多西紫杉醇特异性结合的核酸适体的核酸文库;随机文库RS36具有SEQ ID NO.1所述的核苷酸序列;

[0008] (2) 采用高效液相色谱法筛选所述核酸文库得到核酸适配体;所述高效液相色谱

法中,固定相为十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱;流动相采用水-乙腈梯度洗脱;检测波长为260nm;检测器为二极管阵列检测器。

[0009] 上述的方法,进一步的,所述步骤(2)中所述高效液相色谱的流动相中A相为水,B相为乙腈,所述梯度洗脱方法为:

[0010] 0min~5min,流动相为95v/v%的水和5v/v%的乙腈;

[0011] 5min~20min,流动相为95v/v%的水和5v/v%的乙腈匀速梯度改变至85v/v%的水和15v/v%的乙腈。

[0012] 上述的方法,进一步的,所述步骤(2)中所述十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱的柱温为25℃。

[0013] 上述的方法,进一步的,所述步骤(2)中所述高效液相色谱的进样量为20μL。

[0014] 上述的方法,进一步的,所述步骤(1)中采用的5'引物为SEQ ID NO.4所述的核苷酸序列;采用的3'引物为SEQ ID NO.5所述的核苷酸序列。

[0015] 作为一个总的技术构思,本发明还提供了一种上述方法筛选得到的核酸适配体,所述核酸适配体的核苷酸序列包括以下四种序列中任意一种:

[0016] (1) SEQ ID NO.2所述的核苷酸序列或SEQ ID NO.3所述的核苷酸序列;

[0017] (2) 与SEQ ID NO.2所述的核苷酸序列或SEQ ID NO.3所述的核苷酸序列的同源性在60%以上的序列;

[0018] (3) 与SEQ ID NO.2所述的核苷酸序列或SEQ ID NO.3所述的核苷酸序列进行杂交的序列;

[0019] (4) 与SEQ ID NO.2所述的核苷酸序列或SEQ ID NO.3所述的核苷酸序列转录的RNA序列。

[0020] 作为一个总的技术构思,本发明还提供了一种上述的核酸适配体做为多西紫杉醇药物载体中的应用。

[0021] 作为一个总的技术构思,本发明还提供了一种上述的核酸适配体在提高多西紫杉醇溶解能力中的应用。

[0022] 作为一个总的技术构思,本发明还提供了一种上述的核酸适配体在制备多西紫杉醇检测探针、多西紫杉醇靶点探针中的应用。

[0023] 作为一个总的技术构思,本发明还提供了一种上述的核酸适配体在多西紫杉醇药物分离与纯化中的应用。

[0024] 作为一个总的技术构思,本发明还提供了一种上述的核酸适配体在多西紫杉醇药物制备、设计与开发中的应用。

[0025] 当本发明的核酸适配体应用于制备多西紫杉醇检测探针、多西紫杉醇靶点探针;作为多西紫杉醇药物载体,应用于多西紫杉醇药物分离和纯化时,上述的核酸适配体的核苷酸序列上的某一位置可被磷酸化、氧甲基化、甲基化、氨基化、巯基化或同位素化。

[0026] 同时,上述的核酸适配体的核苷酸序列上还可结合有生物素、地高辛、荧光物质(如FITC等)、纳米发光材料、聚乙二醇、肽段、蛋白、酶或叶酸标记;甚至连接上放射性和治疗性物质等。

[0027] 以上不论是经部分取代还是经过修饰后的核苷酸序列,都具有原核酸适配体基本相同或类似的分子结构、理化性质和功能,都可用于与多西紫杉醇特异性的结合。

[0028] 同时,本发明的核酸适配体的衍生物同样具有原核酸适配体基本相同或类似的分子结构性质和功能,即都可用于与多西紫杉醇特异性结合。前述的核酸适配体衍生物是上述所列核酸适配体的核苷酸序列的骨架衍生出的硫代磷酸酯骨架,或者是上述所列核酸适配体改造成的相应锁核酸或肽核酸。

[0029] 与现有技术相比,本发明的优点在于:

[0030] (1) 本发明提供了一种高效液相色谱法筛选核酸适配体的方法,具有仪器要求低、普适性强、免标记、成本低、可自动化的优点,可以快速地对大量候选序列进行挑选。通过高效液相色谱仪挑选的核酸适配体在乙腈-水的流动相条件下,以及色谱柱对样品的吸附解吸平衡,样品处于70bar以上的高压,多西紫杉醇依旧与核酸适配体结合。因此通过高效液相色谱法获得的多西紫杉醇核酸适配体,对目标分子具有较强亲和力。

[0031] (2) 本发明提供的核酸适配体可以高亲和力、高特异性地结合多西紫杉醇,具有稳定性好、无毒性、易于修饰、且序列长度较短等优点,有利于大规模工业化生产及应用。本发明的核酸适配体还具有亲水特性,与难溶于水的药物多西紫杉醇结合后,可提高多西紫杉醇在水中的溶解度,有望在不使用其他助溶剂(如乙醇等)、增溶剂(如吐温等)的情况下,达到临床应用治疗的目的。

[0032] (3) 本发明的核酸适配体具有易于修饰的特性,可以通过修饰信号物质,将多西紫杉醇的紫外吸收信号转化为其他信号(如荧光等),从而实现多西紫杉醇的高灵敏检测。

[0033] (4) 本发明利用核酸适配体与多西紫杉醇的结合特性,有望提高多西紫杉醇的稳定性、安全性和溶解度,延长药效,减少多西紫杉醇与其他血液内源性物质的结合。选择本发明的核酸适配体为药物载体结合多西紫杉醇,能够保护药物免受环境影响,可获得适宜的释药速度,起到作用和缓而持久的药效,并且能够避免因吐温及酒精引起的药物不良反应。同时,对本发明的核酸适配体进行标记与修饰有利于多西紫杉醇的体内示踪及新药物的开发等。

附图说明

[0034] 为使本发明实施例的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整的描述。

[0035] 图1为本发明实施例2的核酸适配体与多西紫杉醇结合的HPLC图。

[0036] 图2为本发明对比例1的核酸适配体与多西紫杉醇结合的HPLC图。

[0037] 图3为本发明对比例2的核酸适配体与多西紫杉醇结合的HPLC图。

[0038] 图4为本发明实施例2的核酸适配体与多西紫杉醇结合的质谱图。

[0039] 图5为本发明实施例2的核酸适配体与多西紫杉醇结合的圆二色谱图。

[0040] 图6为本发明实施例4中核酸适配体作为多西紫杉醇的药物载体的人乳腺癌(MCF-7)细胞增殖毒性实验结果数据图。

[0041] 图7为本发明实施例4中核酸适配体作为多西紫杉醇的药物载体的人乳腺癌(MDA-MB-231)细胞增殖毒性实验结果数据图。

[0042] 图8为本发明实施例5中不同浓度多西紫杉醇在305nm处瑞利散射实验结果数据图。

[0043] 图9为本发明实施例5中核酸适配体提高多西紫杉醇溶解度,降低其305nm处瑞利

散射实验结果数据图。

[0044] 图10为本发明实施例6中核酸适配体用于检测多西紫杉醇探针的HPLC数据图。

具体实施方式

[0045] 以下结合说明书附图和具体优选的实施例对本发明作进一步描述,但并不因此而限制本发明的保护范围。

[0046] 实施例

[0047] 以下实施例中所采用的材料和仪器均为市售。本实施例的多西紫杉醇为紫杉烷类抗肿瘤药,其化学名称为5 β ,20-环氧-1,2 α ,4,7 β ,10 β ,13 α -六羟基紫杉烷-11-烯-9-酮-4,10-二乙酸酯-2-苯甲酸酯-13-[(2'R,3'S)-N-苯甲酰-3-苯基异丝氨酸酯,CAS号为114977-28-5。

[0048] 实施例1:

[0049] 一种HPLC辅助筛选核酸适配体的方法,主要利用微流控芯片进行筛选,具体筛选过程包括以下步骤:

[0050] (a) 优化核酸文库:DNA文库的结构分为五部分:中间是一段26个碱基的固定序列,用于和固定探针(BDNA)互补杂交;固定序列的两侧是两条DNA手臂,均包括18个碱基的随机序列和19个碱基的PCR扩增所必须的序列。固定探针是一端标有生物素的与文库固定序列互补的DNA链,用于文库的固定。

[0051] 随机文库RS36具有SEQ ID NO.1所述的核苷酸序列,具体为:

[0052] 5'-CCGCTTCGCCGTCTCCTAC-NNNNNNNNNNNNNNNNNN-AAAAGTGGGTAGGGCGGGTTGGAAAA-NNNNNNNNNNNNNNNNNN-CGCTCGTCACCCCTTCTCCT-3' (注:N代表A、T、G、C中任一碱基);

[0053] 5'引物具有SEQ ID NO.4所述的核苷酸序列,具体为:

[0054] 5'-FAM-CCGCTTCGCCGTCTCCTAC-3';

[0055] 3'引物具有SEQ ID NO.5所述的核苷酸序列,具体为:

[0056] 5'-Biotin-AGGAGAAGGGTGACGAGCG-3';

[0057] 固定探针具有SEQ ID NO.6所述的核苷酸序列,具体为:

[0058] 5'-Biotin-TACCGCAAAAAAAAAACCAACCCGCCCTACCCAC-3';

[0059] (b) 初筛:将微流控表面依次修饰生物素化的牛血清白蛋白、亲和素、文库。

[0060] 其中,文库预处理方法:将1nmol文库(约 10^{14} 条DNA链)、1.5nmol BDNA溶于20 μ L的杂交缓冲液(杂交缓冲液的组分为:0.5mmol/L磷酸缓冲液,10.5mmol/L NaCl,15mmol/L MgCl₂,pH 6.8)中,95℃变性10min,缓慢冷却至室温,静置3h以上,使文库与BDNA杂交,然后加入130 μ L的结合缓冲液(结合缓冲液的组分为:100mmol/L NaCl,5mmol/L KCl,2mmol/L MgCl₂,1mmol/L CaCl₂,20mmol/L Tris-HCl,pH 7.6),备用。

[0061] 文库固定方法:首先在室温下将150 μ L、1mg/mL的生物素化的BSA通过注射泵以1 μ L/min的流速通过芯片,然后用0.01mol/L的PBS溶液以5 μ L/min的流速冲洗10min;再以同样的流速通入60 μ L、1mg/mL的亲和素,同样用0.01mol/L的PBS溶液以5 μ L/min的流速冲洗100min。将预处理过的150 μ L的DNA文库(即杂交后的DNA文库)以0.5 μ L/min的流速通过修饰过的芯片,用结合缓冲液以5 μ L/min的流速冲洗10min,则完成了文库在芯片中的固定。然后将目标物多西紫杉醇溶液通入,收集芯片中流出的溶液,得到初筛核酸文库,其中含有DNA

与多西紫杉醇的复合物。

[0062] (c) 纯化: 将步骤(b)得到的初筛核酸文库进行PCR扩增, 扩增产物(即生物素化的双链DNA)通过链霉亲和素微珠填充的亲和柱进行分离, 再通过碱变性解链、脱盐后形成次一级核酸文库。其中, PCR反应扩增条件为: 94℃预变性10min, 94℃变性45sec, 62℃退火30sec, 72℃延伸30sec, 扩增14个循环; 72℃延伸7min。采用梯度PCR, 以初始核酸文库作为模版优化退火温度, 最终得到退火温度为62℃。而每轮筛选产物的最优扩增轮数都是经过轮数优化获得的。在轮数优化后, 将剩余的文库在相同的条件下扩增。PCR结果均通过3%琼脂糖凝胶电泳进行验证, 染料为SYBR G10d。将PCR后文库进行单链制备, 用于下一轮的筛选, 单链制备方法: 取50μL链霉亲和素微珠加入到1.5mL EP管中, 用0.01mol/L PBS冲洗3次后加入PCR扩增获得的双链产物, 25℃震荡孵育30min后离心去上清; 继续用0.01mol/L PBS冲洗3次后加入500μL 200mmol/L的NaOH, 25℃震荡孵育10min进行单链化处理; 离心收集上清中游离的单链DNA; 收集产物通过高效液相色谱进行脱盐处理, 干燥浓缩后溶于少量水中, 得到次一级核酸文库, 用紫外分光光度计进行定量, 于-20℃冰箱中保存。

[0063] (d) 循环: 以上述得到的次一级核酸文库替代起始核酸文库并重复上述的步骤(b)~步骤(c), 每次循环时应当重新在微流控芯片中修饰生物素化的牛血清白蛋白及亲和素, 直至得到包含有与多西紫杉醇高亲和力和高特异性结合的核酸适配体的核酸文库。

[0064] (e) 筛选效率评价: 采用荧光法测定筛选效率, 即筛选过程中DNA的富集情况。检测信号是DNA文库的5'端修饰的荧光染料FAM的荧光值。

[0065] 本实施例将预处理过的DNA文库的荧光值设为F0, 将修饰文库时流出的溶液(含有未固定上的文库)的荧光值设为F1, 竞争结合时从芯片中收集到的溶液的荧光值设为F2, 则筛选效率计算如下式: $\text{筛选效率} = F2 / (F0 - F1 - F2) \times 100\%$ 。根据这个公式监测每一轮的筛选效率, 筛选效率越高, 说明竞争到溶液中的DNA越多, 通过筛选效率的测定可以监测筛选富集情况。当筛选达到平台期时, 对文库进行克隆测序, 得到核酸适配体的核酸文库(核酸文库中共有约 10^{14} 条核酸适配体)。

[0066] 多西紫杉醇为小分子药物, 初步推断真正与其结合的碱基应不超过三十个。对测序结果进行同源性比对, 根据文库设计方案, 固定序列与PCR引物序列存在于所有序列中且长度较长, 因此对序列两个手臂进行拆分, 删去引物部分序列, 仅对随机文库部分进行高效液相色谱法的结合能力考查。

[0067] (f) 高效液相色谱法筛选: 分别将核酸文库中的核酸适配体进行高效液相色谱筛选, 考察核酸适配体与多西紫杉醇的结合能力。具体的方法为:

[0068] 供试品: 配制核酸适配体的终浓度为3μM, 多西紫杉醇溶液的终浓度为6μM, 结合缓冲溶液为100mmol/L NaCl, 5mmol/L KCl, 2mmol/L MgCl₂, 1mmol/L CaCl₂和20mmol/L Tris-HCl的混合溶液, pH 7.6。

[0069] 色谱条件为: 色谱柱采用十八烷基硅烷键合硅胶为填料; 流动相为:A: 水, B: 乙腈; 洗脱条件为: 0min→5min→20min, 水: 95v/v%→85v/v%→85v/v%, 乙腈: 5v/v%→5v/v%→15v/v%; 流速: 1mL/min, 检测器: 二极管阵列检测器; 检测波长: 260nm; 柱温: 25℃; 进样量: 20μL。

[0070] 实施例2

[0071] 一种由实施例1方法筛选得到的多西紫杉醇的核酸适配体1, 该核酸适配体1的核

核苷酸序列具有SEQ ID NO.2所述的核苷酸序列,具体为5'-TTGTTTCTCTGTCGATTA-3'。

[0072] 实施例3

[0073] 一种由实施例1方法筛选得到的多西紫杉醇的核酸适配体2,该核酸适配体2的核苷酸序列具有SEQ ID NO.3所述的核苷酸序列,具体为5'-ATTAGCTGTCTCTTTGTT-3'。

[0074] 上述实施例2和实施例3的核酸适配体的核苷酸序列选自天然存在或人工合成的序列,或任何其他来源的同样的序列。

[0075] 实施例2和3仅是本发明筛选出的优选核酸适配体,按照本发明的筛选方法,还可以筛选到具有以下核苷酸序列的核酸适配体:

[0076] (1) 与实施例2或3所列核酸适配体的核苷酸序列的同源性在60%以上(例如可将上述核酸适配体序列删除或增加部分互补的核苷酸);

[0077] (2) 与实施例2或3所列核酸适配体的核苷酸序列进行杂交的序列;

[0078] (3) 上述实施例2或3所列核酸适配体的核苷酸序列转录的RNA序列。

[0079] 对比例1

[0080] 一种核酸适配体3,该核酸适配体3的核苷酸序列具有SEQ ID NO.7所述的核苷酸序列,具体为5'-TGCCTTTCTGTTTCTT TG-3'。

[0081] 对比例2

[0082] 一种核酸适配体4,该核酸适配体4的核苷酸序列具有SEQ ID NO.8所述的核苷酸序列,具体为5'-CGGAGGTGCCTTTCCTAC-3'。

[0083] 分别将实施例2、对比例1和2的核酸适配体的高效液相色谱图(HPLC)进行分析,以验证高效液相色谱法筛选核酸适配体的准确性。

[0084] 图1为实施例1的核酸适配体(5'-TTGTTTCTCTGTCGATTA-3')的HPLC图,由考察结果图1可知,多西紫杉醇与核酸适配体1存在较强的结合,延长了核酸适配体的保留时间,使其色谱峰分裂为两个色谱峰。

[0085] 图2为对比例1的核酸适配体(5'-TGCCTTTCTGTTTCTTTG-3')的HPLC图,由考察结果图2可知,多西紫杉醇与核酸适配体3存在一定程度结合,使其色谱峰成为肩峰。

[0086] 图3为对比例2的核酸适配体(5'-CGGAGGTGCCTTTCCTAC-3')的HPLC图,由考察结果图3可知,多西紫杉醇与核酸适配体4结合能力较弱或不结合,其色谱峰峰形对称无分裂或肩峰现象。

[0087] 从图1至图3的分析结果可知,通过高效液相色谱仪挑选的核酸适配体在乙腈-水的流动相条件下,以及色谱柱对样品的吸附解吸平衡,样品处于70bar以上的高压,多西紫杉醇依旧与核酸适配体结合。因此通过高效液相色谱法获得的多西紫杉醇核酸适配体,对目标分子具有较强亲和力。

[0088] 为了验证高效液相色谱法筛选核酸适配体的方法的可靠性,本发明同时采用了电喷雾电离质谱法和圆二色谱法进行验证。

[0089] 考察1:采用电喷雾电离质谱法,对多西紫杉醇与实施例2的核酸适配体的混合溶液进行检测。

[0090] 根据原子量表(IUPAC 2007 standard atomic weights),本发明专利提供的核酸适配体1与多西紫杉醇的复合物分子量为6270.4。通过电喷雾电离质谱法获得的核酸适配体1与多西紫杉醇的复合物分子量为6268.7(当选择的部分质谱峰放大时,仪器会出现小幅

漂移)。根据第三方检测报告,电喷雾电离质谱法误差为0.03%。因此,测量误差在方法允许误差范围内,证明本专利提供的核酸适配体1与多西紫杉醇能够以高亲和力结合,结果见图4。

[0091] 考察2:采用圆二色谱法对实施例2的核酸适配体1(5'-TTGTTTCTCTGTCGATTA-3')结构以及核酸适配体1与多西紫杉醇结合后的构型变化进行表征。

[0092] 固定核酸适配体1的浓度为20 μ M,分别加入终浓度为0 μ M、5 μ M、10 μ M、15 μ M的多西紫杉醇溶液。缓冲溶液为100mmol/L NaCl,5mmol/L KCl,2mmol/L MgCl₂,1mmol/L CaCl₂和20mmol/L Tris-HCl的混合溶液,pH 7.6。结果见图5,由圆二色谱法实验结果可见,核酸适配体1的圆二色谱图在251nm处的负峰随着多西紫杉醇的浓度增高,角度信号增强,并且波峰发生约2nm的蓝移。说明多西紫杉醇使核酸适配体1的构型发生变化,以嵌入的方式与本实施例2所提供的核酸适配体1结合。

[0093] 实施例4

[0094] 一种实施例2的多西紫杉醇的核酸适配体1(5'-TTGTTTCTCTGTCGATTA-3')作为多西紫杉醇的药物载体的应用,具体采用细胞增殖毒性实验法,包括以下步骤:

[0095] 以结合缓冲溶液配制系列浓度的多西紫杉醇及核酸适配体1,缓冲溶液为100mmol/L NaCl,5mmol/L KCl,2mmol/L MgCl₂,1mmol/L CaCl₂和20mmol/L Tris-HCl的混合溶液,pH 7.6。选取对数生长期的人乳腺癌(MCF-7)及人乳腺癌(MDA-MB-231)细胞,以 2×10^4 个细胞/孔的浓度接种于96孔细胞培养板内(每孔200 μ L培养基),于细胞培养箱中培育过夜。然后弃掉细胞培养液,用D-Hanks清洗两次,加入50 μ L浓度分别为0nM,60nM,300nM,1500nM,3000nM,6000nM的多西紫杉醇及核酸适配体1与多西紫杉醇复合物(复合物中多西紫杉醇及核酸适配体与多西紫杉醇的摩尔浓度的比例为1:1),再加入250 μ L的含15%小牛血清的1640培养基,使多西紫杉醇及核酸适配体1与多西紫杉醇复合物的终浓度分别为0nM,10nM,50nM,250nM,500nM和1000nM。将96孔板置于细胞培养箱中37 $^{\circ}$ C、5%CO₂条件下培育48h后,每孔加入浓度为5mg/mL的3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(噻唑蓝,MTT)溶液20 μ L,继续孵育4h,终止培养。弃掉培养上清液,每孔加入170 μ L DMSO(二甲基亚砜),震荡孵育10min,使结晶物充分溶解。选定吸收波长为490nm,使用酶标仪测量各孔的吸光度值,其中多西紫杉醇及核酸适配体1与多西紫杉醇的复合物浓度为0nM的孔细胞存活率假定为100%,不加细胞的孔细胞存活率假定为0,每个相同的处理组做5孔。以下列公式计算细胞存活率,结果见图6及图7。

[0096] 细胞存活率 = $\frac{\text{实验组吸光光度值} - \text{空白对照组吸光光度值}}{\text{对照组吸光光度值} - \text{空白对照组吸光光度值}} \times 100\%$

[0097] 从图6和图7中可知,本发明实施例2的多西紫杉醇核酸适配体1可以作为多西紫杉醇的载体用于治疗,并没有抑制多西紫杉醇的活性,并且有望在核酸适配体与叶酸,抗体靶向分子修饰的情况下实现靶向治疗的作用,用于新药的开发。

[0098] 实施例5

[0099] 一种实施例2的多西紫杉醇的核酸适配体1(5'-TTGTTTCTCTGTCGATTA-3')在提高多西紫杉醇溶解能力中的应用,采用测定305nm处多西紫杉醇的瑞利散射强度进行考察。具体的应用方法包括以下步骤:

[0100] 应用方法一:将实施例2的多西紫杉醇的核酸适配体1配制终浓度为50 μ M的核酸

适配体溶液,然后溶解于缓冲溶液中,缓冲溶液为100mmol/L NaCl,5mmol/L KCl,2mmol/L MgCl₂,1mmol/L CaCl₂和20mmol/L Tris-HCl的混合溶液,pH 7.6。以DMSO配制终浓度为10mM的多西紫杉醇。在核酸适配体溶液中逐渐加入多西紫杉醇,待4~8小时结合平衡后,利用荧光仪,以305nm激发305nm发射测定核酸适配体与多西紫杉醇复合物溶液的瑞利散射信号。

[0101] 由DrugBank数据库检索可知,多西紫杉醇的溶解度为12.7mg/L,即约为15.72μM。

[0102] 实验结果见图8,从图8中可知:随着待测溶液中多西紫杉醇浓度的升高,305nm处的瑞利散射信号逐渐增强。并且在200μM至300μM处出现拐点,说明此时溶液的状态发生的迅速的改变,从溶解的状态逐渐转变为不溶的状态,说明在核酸适配体的辅助下,多西紫杉醇的溶解度提升到200μM至300μM之间。结果说明,本发明所提供的核酸适配体可用于提高多西紫杉醇的溶解度。

[0103] 应用方法二:以缓冲溶液将实施例2的多西紫杉醇核酸适配体1配制终浓度为2mM的核酸适配体溶液,其中缓冲溶液为100mmol/L NaCl,5mmol/L KCl,2mmol/L MgCl₂,1mmol/L CaCl₂和20mmol/L Tris-HCl的混合溶液,pH 7.6。将多西紫杉醇混悬于缓冲溶液中配制终浓度为50μM的多西紫杉醇悬浊液。在多西紫杉醇悬浊液中逐渐加入核酸适配体溶液,待4~8小时结合平衡后,利用荧光仪,以305nm激发305nm发射测定核酸适配体与多西紫杉醇复合物溶液的瑞利散射信号。

[0104] 实验结果见图9,从图9中可知:随着待测溶液中核酸适配体浓度的升高,305nm处的瑞利散射信号逐渐减弱。说明多西紫杉醇悬浊液的状态发生改变,在核酸适配体的辅助下,多西紫杉醇悬浊液中的不溶颗粒逐渐减少。结果说明,本发明所提供的核酸适配体可用于提高多西紫杉醇的溶解度。

[0105] 实施例6

[0106] 一种实施例2的多西紫杉醇的核酸适配体1(5'-TTGTTTCTCTGTTCGATTA-3')在制备多西紫杉醇检测探针、多西紫杉醇靶点探针中的应用,具体采用HPLC法,具体包括以下步骤:

[0107] 分别以缓冲溶液配制供试品1与供试品2,缓冲溶液为100mmol/L NaCl,5mmol/L KCl,2mmol/L MgCl₂,1mmol/L CaCl₂,20mmol/L Tris-HCl,pH 7.6。供试品1为终浓度为3μM核酸适配体的溶液,供试品2为终浓度为3μM核酸适配体与6μM的多西紫杉醇复合物的溶液。色谱条件为:色谱柱采用十八烷基硅烷键合硅胶为填料;流动相为:A:水,B:乙腈;洗脱条件为:0min→5min→20min,水:95v/v%→85v/v%→85v/v%,乙腈:5v/v%→5v/v%→15v/v%;流速:1mL/min,检测器:二极管阵列检测器;检测波长:260nm;柱温:25℃;进样量:20μL。实验结果由图10可见,当没有多西紫杉醇存在的时候,核酸适配体是一个独立的色谱峰,而随着多西紫杉醇的加入,原来核酸适配体的色谱峰分裂为肩峰。此实验结果可以说明,在多西紫杉醇存在的情况下,核酸适配体的色谱峰发生明显的改变,此核酸适配体可以用作检测多西紫杉醇的探针。

[0108] 实施例2或实施例3的核酸适配体的核苷酸序列上的某一位置可被磷酸化、氧甲基化、甲基化、氨基化、巯基化或同位素化。磷酸化、氧甲基化、甲基化、氨基化、巯基化或同位素化后的多西紫杉醇核酸适配体同样具有以下用途:(1)在用于药物载体中的用途;(2)在提高药物溶解度的用途;(3)在药物设计与开发中的用途;(4)在药物分离与纯化中的用途;(5)在制备多西紫杉醇检测探针中的用途;(6)在制备多西紫杉醇用作靶点探针中的用途。

[0109] 实施例2或实施例3的核酸适配体的核苷酸序列上可结合生物素、地高辛、荧光物质、纳米发光材料、聚乙二醇、肽段、蛋白或酶标记,或叶酸等肿瘤靶向分子标记。采用生物素、地高辛、荧光物质、纳米发光材料、聚乙二醇、肽段、蛋白或酶标记,或叶酸等肿瘤靶向分子标记后的多西紫杉醇核酸适配体同样具有以下用途:(1) 在用于药物载体中的用途;(2) 在提高药物溶解度的用途;(3) 在药物设计与开发中的用途;(4) 在药物分离与纯化中的用途;(5) 在制备多西紫杉醇检测探针中的用途;(6) 在制备多西紫杉醇用作靶点探针中的用途。

[0110] 实施例2或实施例3的核酸适配体的核苷酸序列的骨架还可衍生出硫代磷酸酯骨架,上述核酸适配体还可改造成相应锁核酸或肽核酸,具有以下用途:(1) 在用于药物载体中的用途;(2) 在提高药物溶解度的用途;(3) 在药物设计与开发中的用途;(4) 在药物分离与纯化中的用途;(5) 在制备多西紫杉醇检测探针中的用途;(6) 在制备多西紫杉醇用作靶点探针中的用途。

[0111] 以上所述,仅是本发明的较佳实施例而已,并非对本发明作任何形式上的限制。虽然本发明已以较佳实施例揭示如上,然而并非用以限定本发明。任何熟悉本领域的技术人员,在不脱离本发明的精神实质和技术方案的情况下,都可利用上述揭示的方法和技术内容对本发明技术方案做出许多可能的变动和修饰,或修改为等同变化的等效实施例。因此,凡是未脱离本发明技术方案的内容,依据本发明的技术实质对以上实施例所做的任何简单修改、等同替换、等效变化及修饰,均仍属于本发明技术方案保护的范围内。

<110> 湖南大学
 <120> 高效液相色谱筛选核酸适配体的方法及核酸适配体和应用
 <130> 无
 <160> 8
 <170> PatentIn version 3.3

<210> 1
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(37)
 <223> n=a 或 g 或 c 或 t

[0001] <220>
 <221> misc_feature
 <222> (64)..(81)
 <223> n=a 或 g 或 c 或 t

<400> 1
 ccgcttcgcc gtctcctaen nnnnnnnnnn nnnnnnnaaa agtgggtagg gcgggttgga 60

aaannnnnnn nnnnnnnnnn ncgctcgtea cccctctect 100

<210> 2
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> misc_feature

	<223>	根据实验要求而设计，以作为多西紫杉醇的核酸适配体的核苷酸序列 1	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(1)..(18)	
	<223>	根据实验要求而设计，以作为多西紫杉醇的核酸适配体的核苷酸序列 1	
	<400>	2	
		ttgtttctct gtcgatta	18
	<210>	3	
	<211>	18	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
[0002]	<221>	misc_feature	
	<222>	(1)..(18)	
	<223>	根据实验要求而设计，以作为多西紫杉醇的核酸适配体的核苷酸序列 2	
	<400>	3	
		attagctgtc tccttgtt	18
	<210>	4	
	<211>	19	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(1)..(19)	
	<223>	PCR 扩增的引物序列之一	
	<400>	4	

	ccgcttcgcc gtctcctac	19
	<210> 5	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(19)	
	<223> PCR 扩增的引物序列之一	
	<400> 5	
	aggagaaggg tgacgagcg	19
	<210> 6	
	<211> 33	
[0003]	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(20)	
	<223> 根据实验要求而设计，以作为多西紫杉醇的核酸适配体的固定探针	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(33)	
	<223> 根据实验要求而设计，以作为多西紫杉醇的核酸适配体的固定探针	
	<400> 6	
	taccgcaaaa aaaaaccaac ccgcctacc cac	33
	<210> 7	

[0004]

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(18)

<223> 根据实验要求而设计，以作为多西紫杉醇的核酸适配体的核苷酸序列 3

<400> 7

tgcctttctg tttctttg

18

<210> 8

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(18)

<223> 根据实验要求而设计，以作为多西紫杉醇的核酸适配体的核苷酸序列 4

<400> 8

cggaggtgcc ttcctac

18

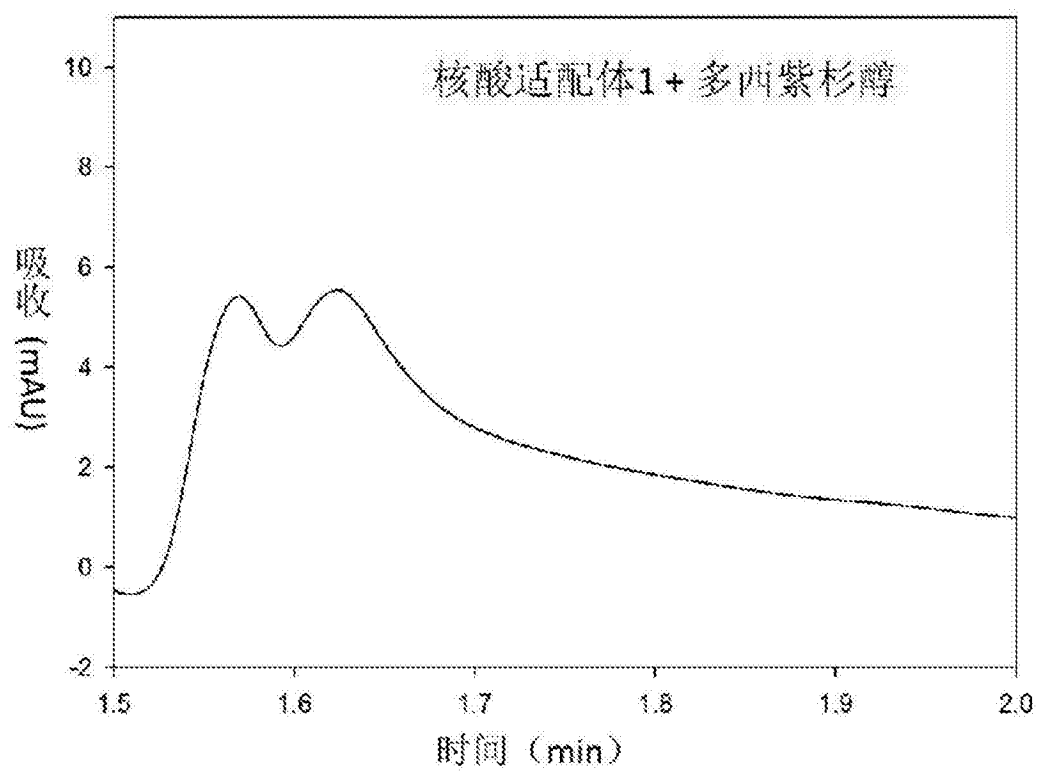


图1

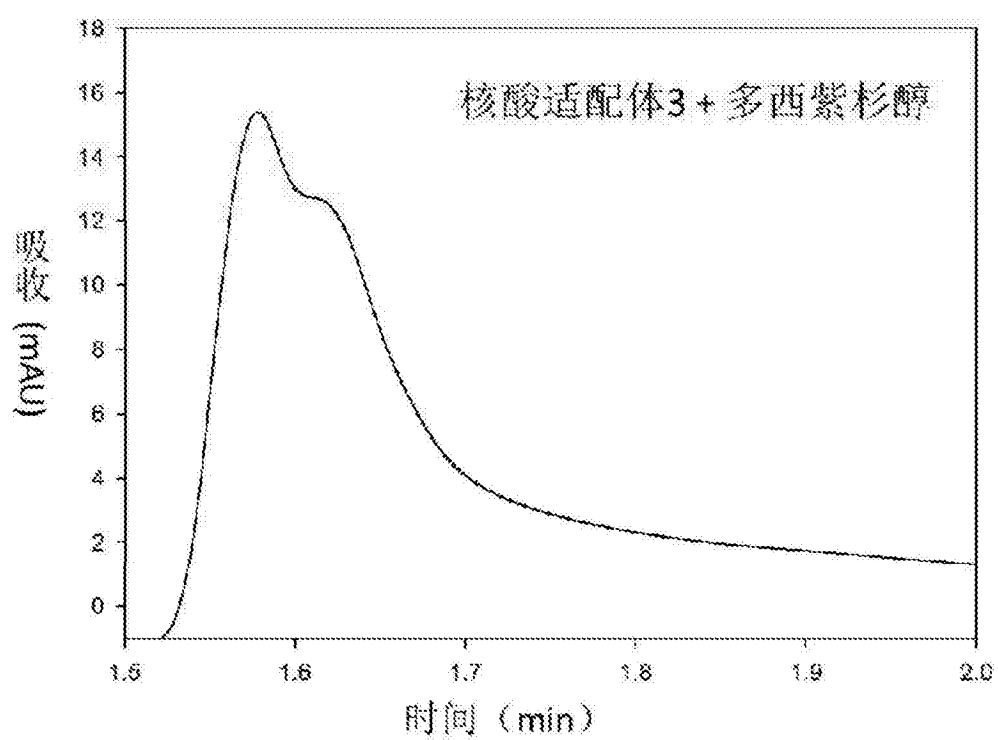


图2

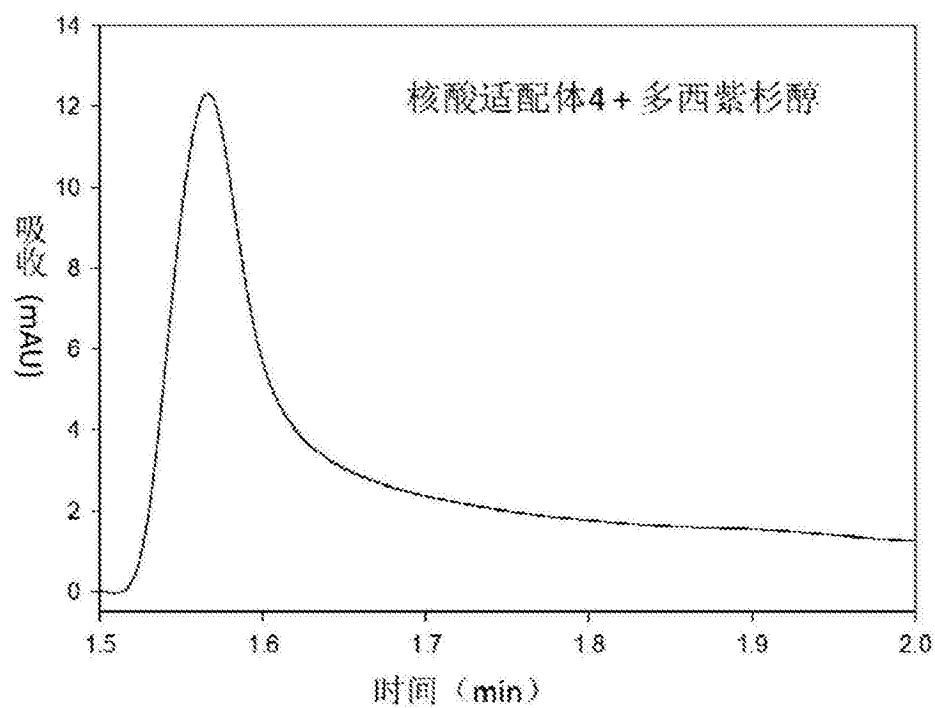


图3

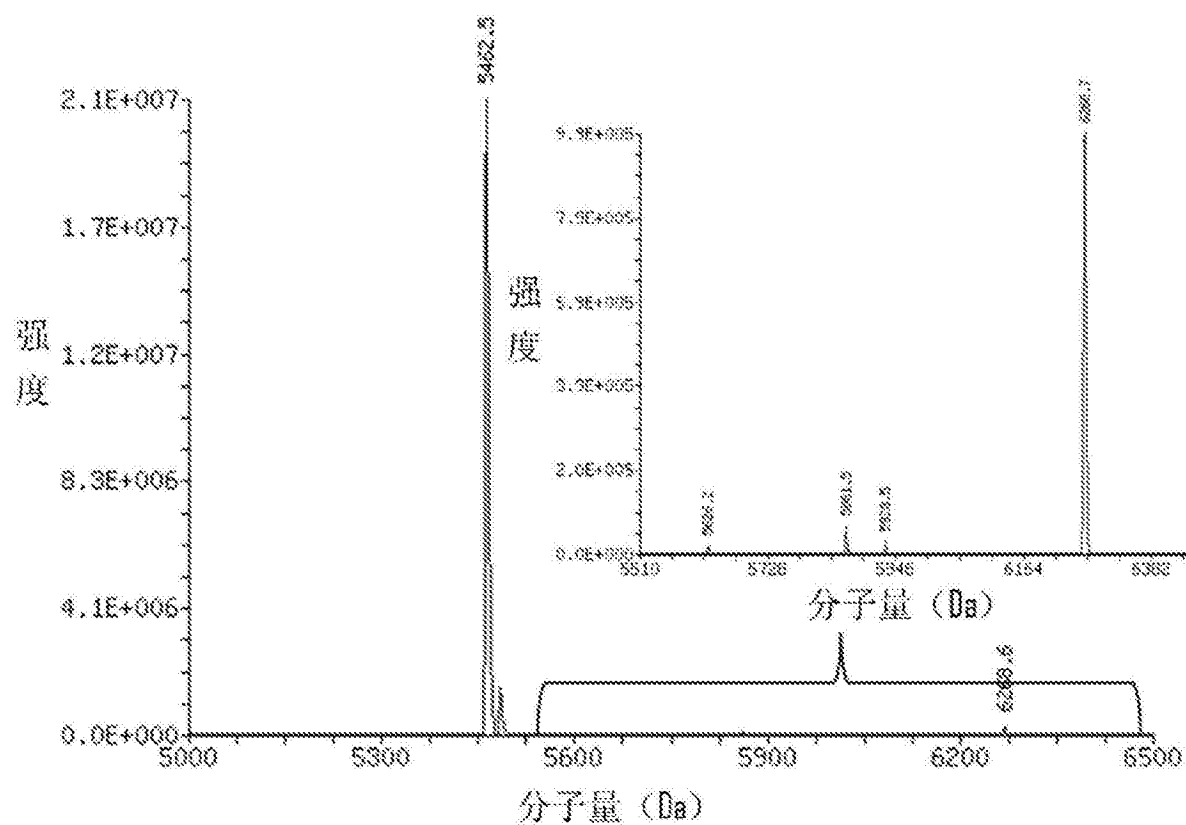


图4

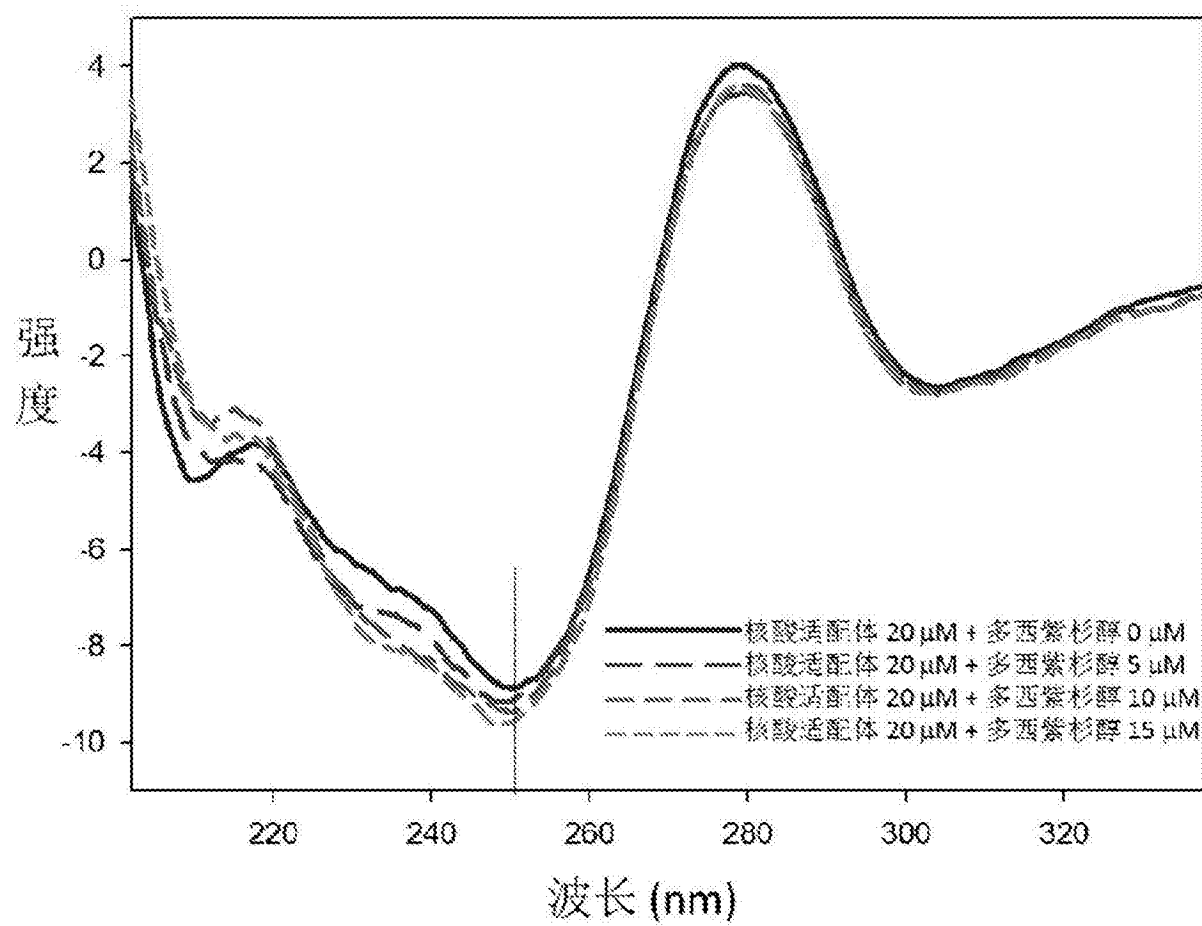


图5

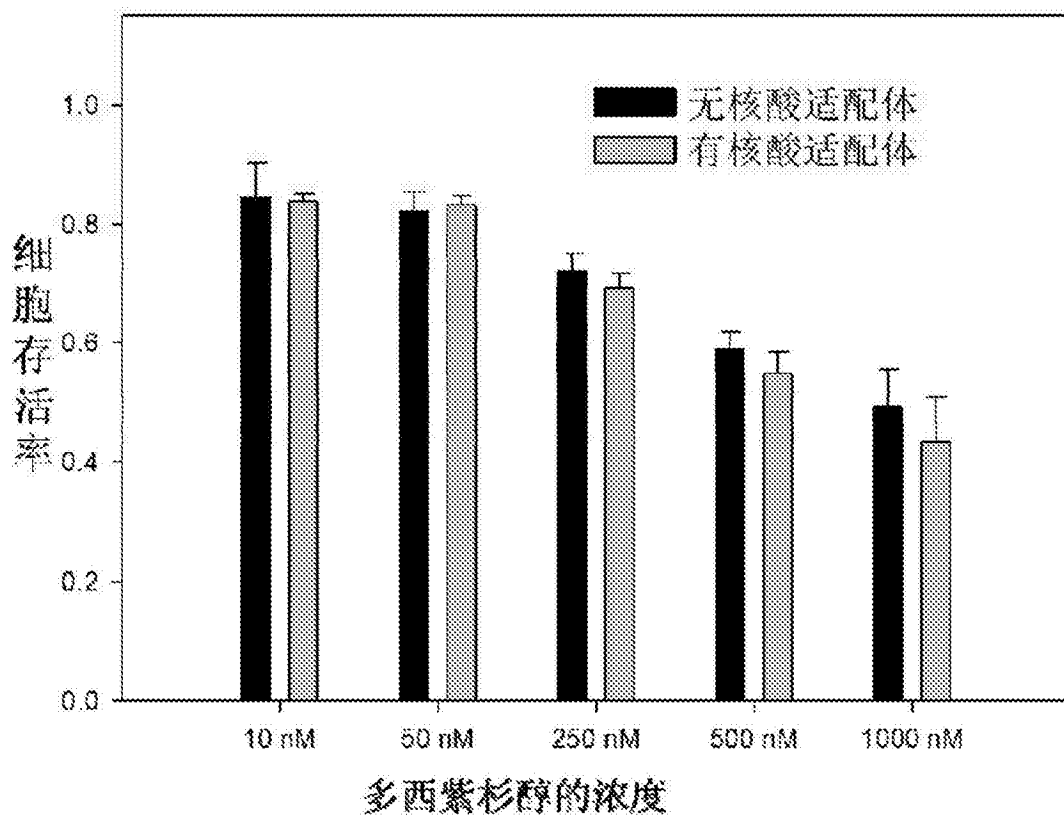


图6

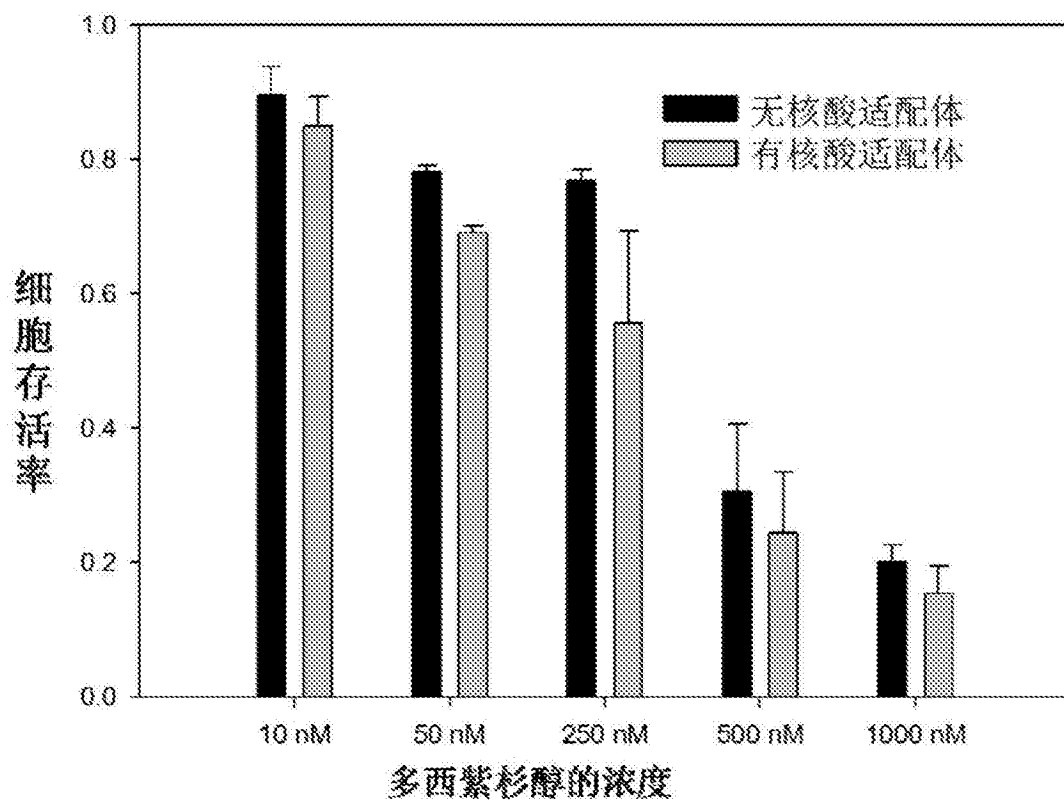


图7

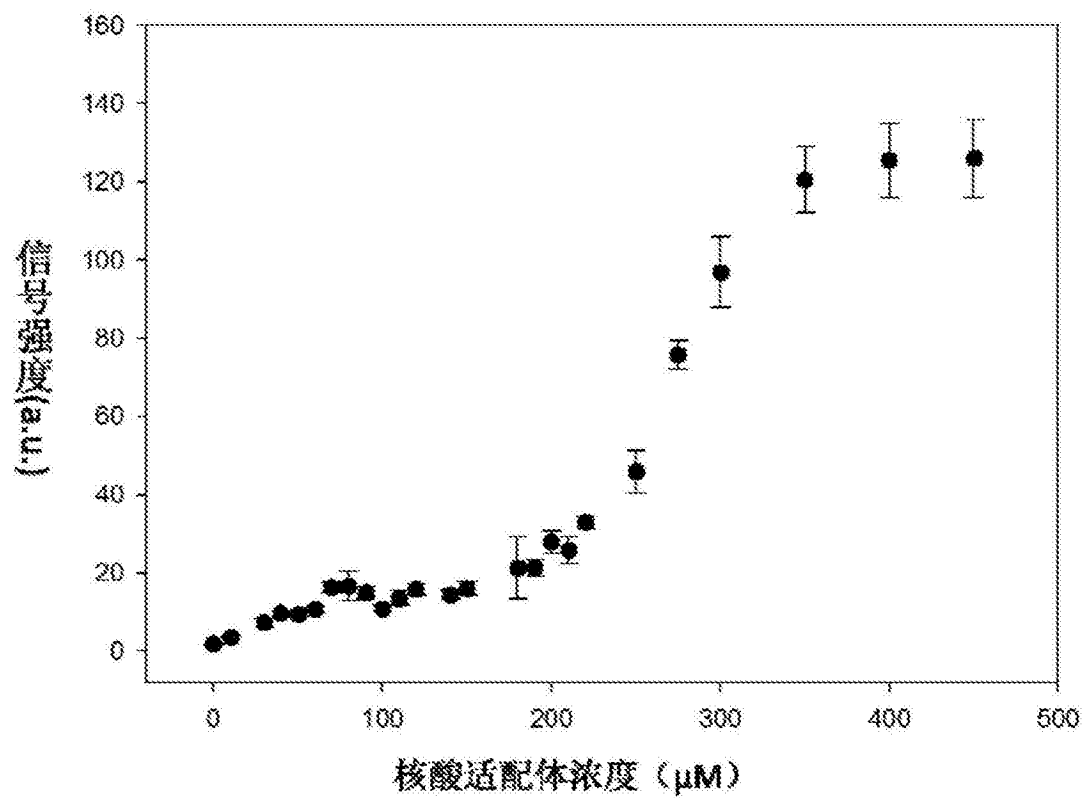


图8

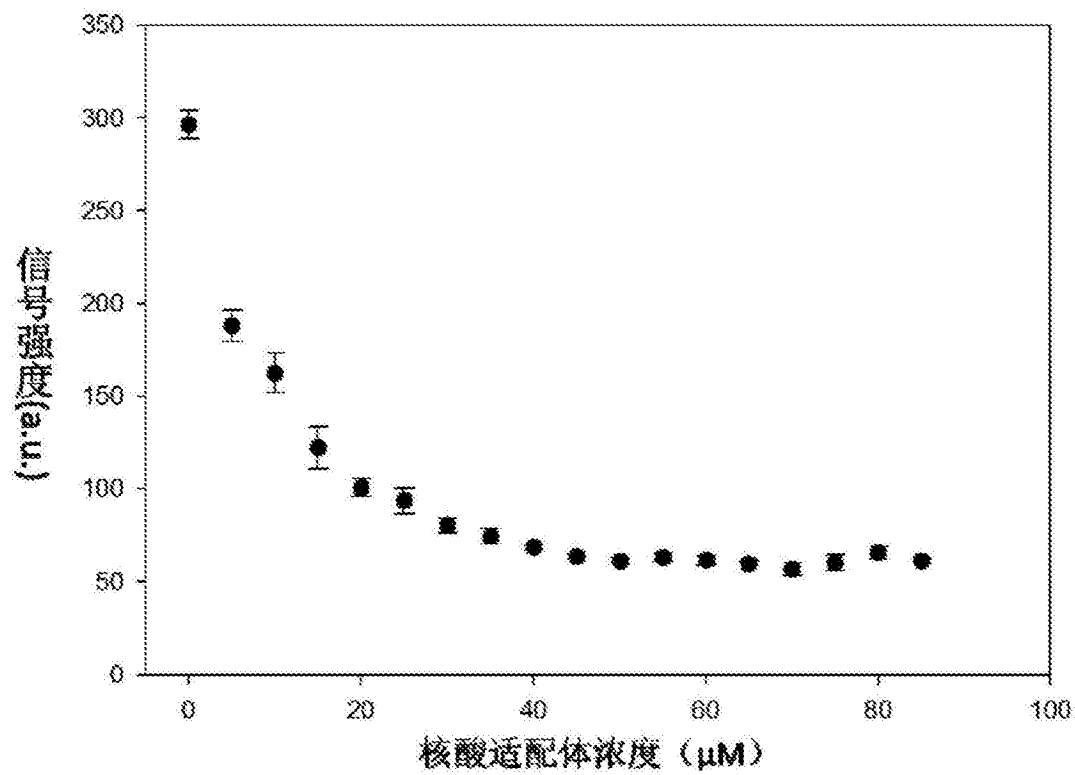


图9

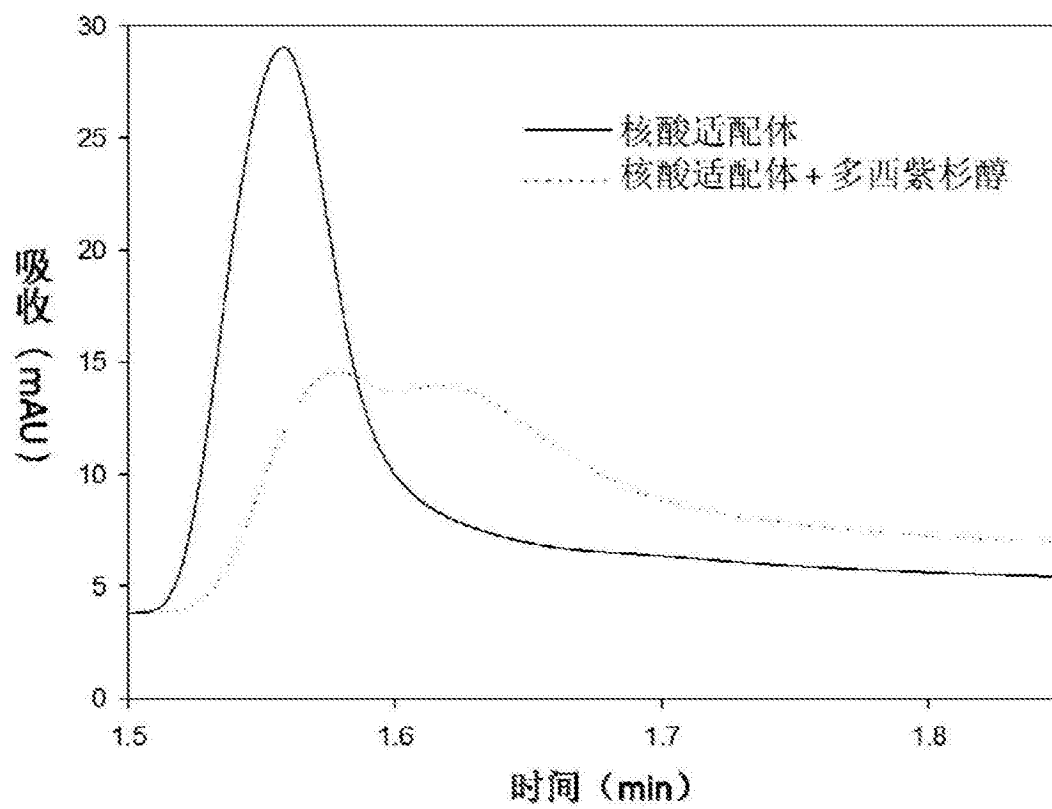


图10

专利名称(译)	高效液相色谱筛选核酸适配体的方法及核酸适配体和应用		
公开(公告)号	CN104480114B	公开(公告)日	2017-12-05
申请号	CN201410852323.3	申请日	2014-12-31
[标]申请(专利权)人(译)	湖南大学		
申请(专利权)人(译)	湖南大学		
当前申请(专利权)人(译)	湖南大学		
[标]发明人	羊小海 陈南迪 王柯敏 王青 朱莹		
发明人	羊小海 陈南迪 王柯敏 王青 朱莹		
IPC分类号	C12N15/115 C12N15/10 G01N30/02 G01N33/53 A61K47/26 A61K31/337 A61P35/00		
代理人(译)	赵洪		
审查员(译)	马骞		
其他公开文献	CN104480114A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种高效液相色谱筛选核酸适配体的方法及核酸适配体和应用，其中高效液相色谱筛选核酸适配体的方法，包括以下步骤：从随机文库RS36中筛选与多西紫杉醇特异性结合的核酸适配体的核酸文库；采用高效液相色谱法筛选核酸文库得到核酸适配体；高效液相色谱法中，固定相为十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱；流动相采用水-乙腈梯度洗脱；检测波长为260nm；检测器为二极管阵列检测器。按照高效液相色谱法筛选的核酸适配体具有能够与多西紫杉醇高特异性和高亲和力结合、无免疫原性、能够化学合成、生物相容性好、分子量小、稳定、易于保存等优点，可应用于药物载体、药物分离与纯化、制备多西紫杉醇检测探针或靶点探针等。

