

基于 RNA 适配体检测体外酶促合成的 c-di-GMP 和 cGAMP

朱彦策, 孔江南, 陈慧心, 钟 凯, 张 超*

(河南农业大学 农业部动物生化与营养重点开放实验室, 郑州 450002)

摘要: 旨在建立简单、快速的检测体外酶促合成的 c-di-GMP 和 cGAMP 的方法。本研究以含有 T7 启动子、VC2 GEMM-1 核糖开关序列或其突变序列 VC2/g20a, spinach2 和 tRNA 序列的双链 DNA 为模板, 利用 T7 RNA 聚合酶体外转录体系制备 VC2、VC2/g20a RNA 适配体。通过检测绿色荧光强度分析 RNA 适配体对 c-di-GMP 和 cGAMP 的结合能力。结果表明, 转录得到的 RNA 经过加热变性、缓慢退火后得到 VC2 RNA 适配体和 VC2/g20a RNA 适配体, 在 $125 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl 和 $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl₂ 溶液中孵育 180 min 的优化结合条件下, VC2 适配体与 c-di-GMP 特异性结合, VC2/g20a 适配体与 cGAMP 特异性结合; c-di-GMP 对 VC2 适配体的半数效应浓度 (EC₅₀) 为 $(89 \pm 1.7) \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, cGAMP 对 VC2/g20a 适配体的半数效应浓度为 $(309 \pm 4.5) \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$; VC2 和 VC2/g20a 能够分别检测低至 $5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $20 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 c-di-GMP 和 cGAMP; 并且发现转录的 RNA 混合物在未纯化的情况下同样能够检测 VC0179 体外酶促合成的 c-di-GMP 和 cGAMP。这种方法可以简单快速的检测 VC0179 体外酶促合成的 c-di-GMP 和 cGAMP, 并且为研究其他 c-di-GMP 和 cGAMP 合成酶活性提供潜在可能。

关键词: RNA 适配体; c-di-GMP; cGAMP; 荧光检测

中图分类号: S811.3

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2018)10-2145-09

Detection of *in vitro* Enzyme-synthesized c-di-GMP and cGAMP by Using RNA Aptamer

ZHU Yan-ce, KONG Jiang-nan, CHEN Hui-xin, ZHONG Kai, ZHANG Chao*

(Key Laboratory of Animal Biochemistry and Nutrition of Ministry of Agriculture, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: The aim of this study was to construct the method to simply and robustly detect the *in vitro* enzyme-synthesized c-di-GMP and cGAMP. In this study, the double-stranded DNA containing T7 promoter, VC2 GEMM-I ribose switch sequence or VC2/g20a, spinach2 and tRNA sequence was as the template, T7 RNA polymerase *in vitro* transcription system was used to prepare VC2, VC2/g20a RNA aptamers. In addition, the binding abilities of RNA aptamer to c-di-GMP and cGAMP were determined by examining the green fluorescence intensity. The results showed that the VC2 RNA aptamer and VC2/g20a RNA aptamer were obtained through the process in which transcribed RNA was heated and then was cooled slowly. Under the optimized conditions of $125 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl, $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl₂ for 180 min, VC2 and VC2/g20a aptamers could bind to c-di-GMP and cGAMP, respectively, both with specificity and selectivity. In addition, the half effect concentration (EC₅₀) of c-di-GMP for VC2 aptamer was $(89 \pm 1.7) \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, the EC₅₀ of cGAMP for VC2/g20a aptamer was $(309 \pm 4.5) \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$. The detection limit of VC2 and VC2/g20a

收稿日期: 2018-01-29

基金项目: 河南省基础与前沿技术研究计划项目(142300410153); 河南农业大学科技创新计划(30600967); 河南省自然科学基金资助项目(132300410002)

作者简介: 朱彦策(1990-), 男, 河南邓州人, 硕士生, 主要从事动物生物技术研究, E-mail: zychenau@163.com

* 通信作者: 张 超, 讲师, 主要从事生物化学与分子生物学相关的教学和科研工作, E-mail: lbandeng@126.com

aptamers for c-di-GMP and cGAMP were $5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $20 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. Moreover, it was shown that the transcribed RNA mixture without purification could noticeably detect c-di-GMP and cGAMP by VC0179 synthesized. Thus, this simple and robust method could be useful in detecting the c-di-GMP and cGAMP by VC0179 synthesized *in vitro*, and which might be applied to detect the activity of other c-di-GMP and cGAMP synthases.

Key words: RNA aptamer; c-di-GMP; cGAMP; fluorescence detection

环二鸟苷酸(c-di-GMP)、环二腺苷酸(c-di-AMP)和环腺苷酸-鸟苷酸(cGAMP)作为第二信使分子,日益成为研究的热点。c-di-GMP作为在细菌中合成的第二信使分子,参与细菌生理活动的许多方面,例如:生物被膜的形成、分化、运动性、毒力及胞外多糖的形成^[1-5]。尽管在真核细胞中尚未发现天然存在的c-di-GMP,但是已有研究报道在小鼠和人细胞中转入c-di-GMP后,可以通过TBK-IRF3信号通路刺激I型干扰素的生成^[6-7],预示它可以作为潜在的免疫佐剂。cGAMP是一种新发现的哺乳动物第二信使,可以结合并且激活干扰素基因刺激因子(STING),诱导机体产生I型干扰素,进而刺激机体产生天然免疫应答反应^[8-9]。并且已有研究报道利用原核表达系统纯化得到的环二鸟苷酸环化酶能够在体外酶促合成c-di-GMP^[10-13]。

霍乱弧菌中的DncV(VC0179)是一种环二核苷酸环化酶,可以利用ATP和GTP作为底物催化合成c-di-GMP、cGAMP和c-di-AMP^[14]。为了研究VC0179的催化功能以及通过体外酶促反应合成产生c-di-GMP和cGAMP,需要一种简单、快速的方法检测c-di-GMP和cGAMP。迄今为止已经开发了一些体外检测c-di-GMP和cGAMP的方法,包括高效液相色谱-质谱联用技术(HPLC-MS/MS)、高效液相色谱(HPLC)、荧光共振能量转移(FRET)和薄层色谱分析(TLC)^[15-18]。这些方法虽然已被证明有效,但是它们也存在一些缺点。例如,HPLC虽然分析小分子比较灵敏,可以检测c-di-GMP和cGAMP,但是对于体外酶促反应体系来说,需要严谨的纯化操作去除酶蛋白等大分子,耗费时间和人力。TLC虽然能够快速检测c-di-GMP和cGAMP,但是待检测物通常需要放射性标记,对操作者健康产生潜在的不利影响。

最近, RNA 适配体逐渐成为能够在体外和体内检测小分子的通用工具。Paige 等^[19]发现了一种基于 RNA 的适配体: spinach, 其一旦与 3,5-二氟-4-羟基亚苄基咪唑啉酮(3,5-difluoro-4-hydroxy-

benzylidene imidazolinone, DFHBI) 结合, 能够产生类似绿色荧光蛋白的激发荧光。Kellenberger 等^[20]将天然的 GEMM-I 核糖开关与 spinach 适配体结合, 构建得到的适配体用于细胞内 c-di-GMP 和 cGAMP 检测^[21-22]。为了检测体外酶促合成的 c-di-GMP 和 cGAMP, 本研究将 VC2 GEMM-I 核糖开关和它的突变体 VC2/g20a 连接到 spinach2 和 tRNA 支架上, 开发出了一一种基于 RNA 的核酸适配体, spinach2 与 spinach 相比具有更高的热稳定性和折叠效率^[23]。

本研究以含有 T7 启动子、VC2 GEMM-1 核糖开关序列或其突变序列 VC2/g20a、spinach2 和 tRNA 序列的双链 DNA 为模板, 利用 T7 RNA 聚合酶体外转录体系制备 VC2、VC2/g20a RNA 适配体。通过检测绿色荧光强度分析 RNA 适配体对 c-di-GMP 和 cGAMP 的结合能力以及 VC2 和 VC2/g20a 适配体的检测下限, 为相关研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要试剂材料

VC0179 蛋白编码序列由宝生物工程(大连)有限公司合成; 含有 T7 启动子、VC2 或 VC2/g20a 适配体、spinach2 和 tRNA 序列的单链 DNA(表 1)由生工生物工程(上海)股份有限公司合成; 限制性内切酶 BamH I、EcoR I 购自 TaKaRa 公司; T7 RNA 聚合酶、NTP 混合物、RNA 酶抑制剂、脱氧核糖核酸酶 I、RNA 酶、无机焦磷酸酶和 DEPC 水购自赛默飞世尔科技公司; ATP、GTP 标准品购自 Aladdin 公司; IPTG 购自北京索莱宝科技有限公司; Ni-NTA Agarose 购自 QIAGEN 公司; DFHBI 购自 Lucerna technologies(美国); 质粒小量快速提取试剂盒、胶回收试剂盒、RNA 纯化试剂盒、PCR 纯化试剂盒均购自生工生物工程(上海)股份有限公司; *E. coli* DH5 α 、*E. coli* BL21(DE3)感受态细胞及含 His 标签的 IPTG 诱导型载体为本实验室保存。

表 1 本研究中使用的单链 DNA 序列

Table 1 The single strand DNA sequences used in this study

名称 Name	序列(5'→3') Sequence
VC2 适配体 VC2 aptamer	CGATCCCGCGAAAT $\underline{taatacgaactcaactata}$ <u>GCCCGGATAGCTCAGTCGGTAGAGCAGCGGCCGGAT-</u> <i>GTA</i> ACTGAATGAAAATGGTGAAGGACGGGTCCACACGCACAGGGCAAACCA TTCGAAAGAGT- GGGACGCAAAGCCTCCGGCCTAAACCAGAAGACATGGTAGGTAGCGGGGTTACCGATGTTGTT- GAGTAGAGTGTGAGCTCCGTA ACTAGTTACATCCGGCCGCGGGTCCAGGGTTCAAGTCCC- <u>TGTT</u> CGGGCGCCA
VC2/g20a 适配体 VC2/g20a aptamer	CGATCCCGCGAAAT $\underline{taatacgaactcaactata}$ GCCCGGATAGCTCAGTCGGTAGAGCAGCGGCCGGAT- <i>GTA</i> ACTGAATGAAAATGGTGAAGGACGGGTCCACACGCACAGAGCAAACCA TTCGAAAGAGT- GGGACGCAAAGCCTCCGGCCTAAACCAGAAGACATGGTAGGTAGCGGGGTTACCGATGTTGTT- GAGTAGAGTGTGAGCTCCGTA ACTAGTTACATCCGGCCGCGGGTCCAGGGTTCAAGTCCC- <u>TGTT</u> CGGGCGCCA

小写的序列表示 T7 RNA 聚合酶的启动子,下划线的序列表示 tRNA 支架,斜体序列表示 spinach 2 适配体,粗体序列分别表示 VC2 适配体和 VC2 / g20a 适配体

The lowercase sequences indicate the promoter for T7 RNA polymerase, underlined sequences indicate tRNA scaffold, italic sequences indicate spinach2 aptamer, and bold sequences indicate VC2 aptamer and VC2/g20a aptamer, respectively

1.2 RNA 适配体的制备

以合成的单个 DNA 作为模板并采用以下引物:Sp-u:5'-CGATCCCGCGAAATTAATACG-3', Sp-d:5'-TGGCGCCCGAACAGGGAC-3', 通过 PCR 得到用于体外转录的线性双链 DNA (dsDNA), PCR 产物 dsDNA 经 PCR 纯化试剂盒纯化。以 dsDNA 为模板体外转录得到 RNA 适配体:1 μ g dsDNA, 60 U T7 聚合酶, NTPs (各 6 mmol \cdot L⁻¹), 80 U RNase 抑制剂, 0.3 U 无机焦磷酸酶, 加 ddH₂O 至 100 μ L, 混合均匀后 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h。孵育后加入 2 U DNase I 并孵育 15 min 以消化 DNA 模板, 然后用 RNA 纯化试剂盒进行纯化回收。用酶标仪测定 RNA 的浓度后 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3 VC0179 的表达和纯化

将 VC0179 编码序列进行 PCR 扩增, PCR 产物纯化后用 BamH I 和 Xho I 双酶切, 回收后连接至 IPTG 诱导型载体的 BamH I 和 Xho I 位点并转化至 *E. coli* DH5 α 中。转化菌液涂布于含氨苄青霉素的 LB 平板, 37 $^{\circ}$ C 倒置培养过夜。挑选阳性克隆菌小提质粒, 用 BamH I 和 Xho I 双酶切验证后送往生物工程(上海)股份有限公司测序。将测序正确的重组质粒转化至 *E. coli* BL21(DE3) 中, 37 $^{\circ}$ C 培养。待其 OD_{600 nm} 达到 0.6~0.8 时, 加入 IPTG 使其终浓度为 1 mmol \cdot L⁻¹, 室温诱导 12 h。诱导结束后 4 $^{\circ}$ C

8 000 r \cdot min⁻¹ 离心 10 min 收集菌体, 加入裂解缓冲液(50 mmol \cdot L⁻¹ NaH₂PO₄ \cdot H₂O, 300 mmol \cdot L⁻¹ NaCl, 10 mmol \cdot L⁻¹ 咪唑)重悬, 低温超声破碎, 然后 4 $^{\circ}$ C 13 000 r \cdot min⁻¹ 离心 30 min 除去细胞碎片。取上清液用 QIAGEN 公司的 Ni-NTA 填料按照操作说明书进行蛋白纯化, 根据说明书用 BCA 蛋白质测定试剂盒测定蛋白质浓度。

1.4 VC0179 体外酶促合成 c-di-GMP 和 cGAMP

用先前报道的方法由 VC0179 合成 c-di-GMP 和 cGAMP^[14]: 1 μ mol \cdot L⁻¹ VC0179 与 2 mmol \cdot L⁻¹ 的 GTP 合成 c-di-GMP, 1 μ mol \cdot L⁻¹ VC0179 与各 2 mmol \cdot L⁻¹ 的 GTP 和 ATP 合成 cGAMP; 反应体系均为 100 μ L, 缓冲液中包含 5 mmol \cdot L⁻¹ MgCl₂ 和 10 mmol \cdot L⁻¹ HEPES(pH 7.5)。37 $^{\circ}$ C 孵育 3 h 后, 将反应溶液在 99 $^{\circ}$ C 煮沸 5 min, 12 000 r \cdot min⁻¹ 离心 10 min, 收集上清液进行 c-di-GMP 和 cGAMP 的检测。

1.5 RNA 适配体检测 c-di-GMP 和 cGAMP

在 100 μ L 反应体积中, 将 100 nmol \cdot L⁻¹ 纯化的 RNA 适配体与指定浓度的 c-di-GMP 或 cGAMP 在 25 $^{\circ}$ C 下孵育结合, 结合缓冲液中包含 1 mmol \cdot L⁻¹ DFHBI, 40 mmol \cdot L⁻¹ HEPES(pH 7.5), 125 mmol \cdot L⁻¹ KCl 和 30 mmol \cdot L⁻¹ MgCl₂; 将 5 μ L 转录的 RNA 混合物与 90 μ L VC0179 反应溶液在相同的结合缓

冲液中 25 °C 孵育 3 h。然后将溶液转移到 96 孔黑色板中,在荧光和化学发光分析仪(激发:450 nm;发射:530 nm)中测量荧光强度。

1.6 数据分析

本研究中所有测量经过 3 次重复。结果用“平均值±标准误差”表示。利用 Graphpad Prism5 软件的单因素方差分析进行差异显著性判断, $P < 0.001$ 表示差异极显著。

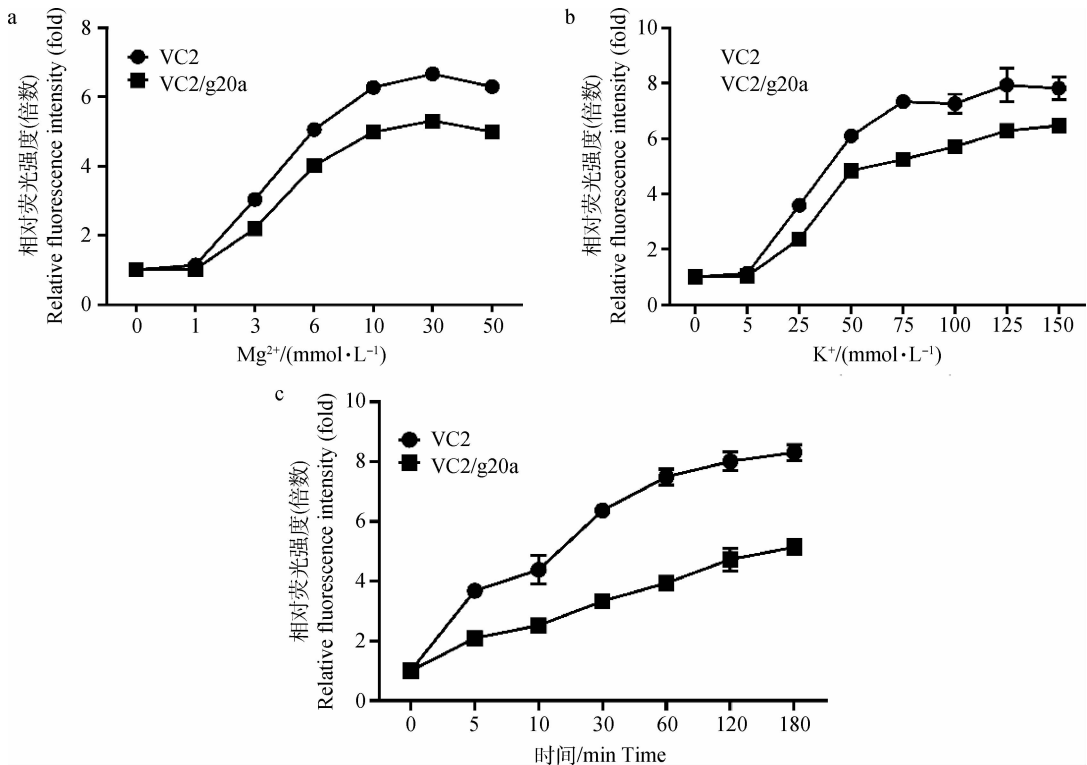
2 结果

2.1 RNA 适配体与 c-di-GMP 和 cGAMP 结合条件的优化

已有研究结果表明,一价和二价金属离子可以通过稳定 RNA 三级结构从而促进 RNA 折叠^[24-27]。因此,本试验通过改变 K^+ 和 Mg^{2+} 浓度来优化 RNA 适配体与 c-di-GMP 和 cGAMP 的结合。该 RNA 适配体通过利用 T7 RNA 聚合酶体转录体系转录得到的 RNA 加热变性、缓慢退火得到。

随着 KCl 从 $0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 增加到 $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,荧光强度逐渐增加。当 $MgCl_2$ 的浓度从 $0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 增加到 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,可以得到类似结果:在 $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ MgCl}_2$ 下,VC2 和 VC2/g20a 适配体分别与 c-di-GMP 和 cGAMP 结合后产生的荧光强度与对照相比分别增加大约 5.6 倍和 4.3 倍(图 1a)。在 $125 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KCl}$ 溶液中,与未添加 KCl 的对照相比 VC2 和 VC2/g20a 适配体与 c-di-GMP 和 cGAMP 结合后产生的荧光强度分别增加约 7 倍和 5.3 倍(图 1b)。

然后检测反应时间对荧光强度的影响。RNA 适配体与 c-di-GMP 和 cGAMP 配体孵育的时间越长,产生的荧光越强(图 1c)。当在 25 °C 孵育 180 min 时,VC2 和 VC2/g20a 适配体的荧光强度分别增加到 8.3 倍和 5.1 倍。综合上述结果,优化的试验条件定为 RNA 适配体与 c-di-GMP 和 cGAMP 配体在 $125 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KCl}$ 和 $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ MgCl}_2$ 溶液中孵育 180 min。



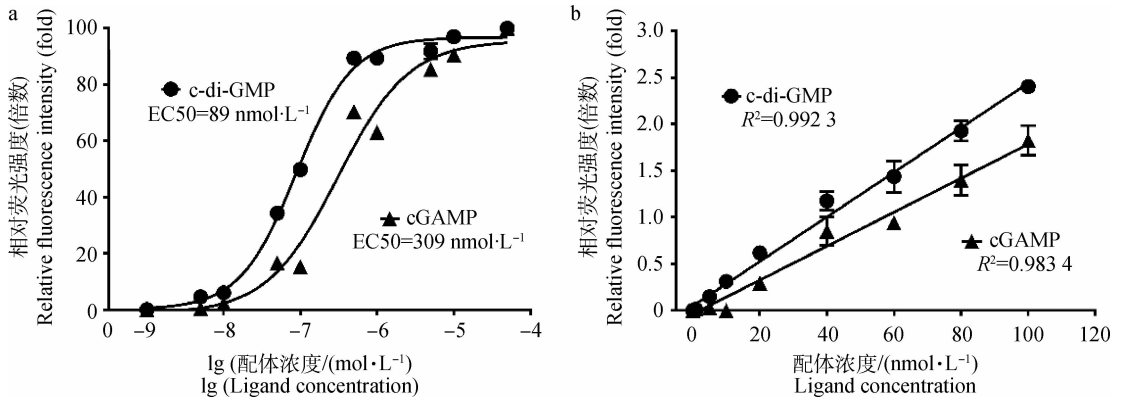
a、b、c 分别为 $MgCl_2$ 、KCl 浓度和结合时间对荧光强度的影响。所有的测量经过 3 次重复,数据误差用标准差表示,下同
a, b, c. Effect of $MgCl_2$, KCl concentrations and binding time on the fluorescence intensity produced by VC2 and VC2/g20a aptamers. All measurements were conducted with 3 duplicates and error bars represent the S. D., the same as below

图 1 RNA 适配体与 c-di-GMP 和 cGAMP 结合的条件优化

Fig. 1 Condition optimizing for c-di-GMP and cGAMP binding to RNA aptamers

2.2 VC2 和 VC2/g20a 适配体对 c-di-GMP 和 cGAMP 的检测灵敏度和检测极限

为确定 VC2 和 VC2/g20a 适配体对 c-di-GMP 和 cGAMP 检测的灵敏度,发现当添加的 c-di-GMP 和 cGAMP 从 10^{-9} mol · L⁻¹ 增加到 10^{-3} mol · L⁻¹ 时,两个适配体产生的荧光强度逐渐增加。通过将荧光强度和相应的 c-di-GMP、cGAMP 浓度作图,得到两条较好的拟合曲线(图 2a)。根据结合曲线,可以得到 c-di-GMP 对 VC2 适配体的半数效应浓度(EC50)为 (89 ± 1.7) nmol · L⁻¹,cGAMP 对 VC2/g20a 适配体的半数效应浓度为 (309 ± 4.5) nmol · L⁻¹。



a. VC2 和 VC2/g20a 适配体对 c-di-GMP 和 cGAMP 的检测灵敏度;b. VC2 和 VC2/g20a 适配体对 c-di-GMP 和 cGAMP 的检测限。未添加 c-di-GMP 和 cGAMP 配体的样品荧光强度作为背景扣除

a. The sensitivity of VC2 and VC2/g20a aptamers detecting c-di-GMP and cGAMP; b. The detection limit of VC2 and VC2/g20a aptamers towards c-di-GMP and cGAMP. Background without ligand was removed from every point

图 2 确定 VC2 和 VC2/g20 适配体分别对 c-di-GMP 和 cGAMP 的检测灵敏度及检测限

Fig. 2 The detection sensitivity and limit of VC2 and VC2/g20 aptamers towards c-di-GMP and cGAMP, respectively

2.3 RNA 适配体对 c-di-GMP 和 cGAMP 的选择性

为了确定适配体对 c-di-GMP 和 cGAMP 的选择性,使用 VC2 和 VC2/g20a 适配体分别检测 c-di-GMP、cGAMP、c-di-AMP、ATP 和 GTP;其中以 VC2 适配体的 C92U 突变体(VC2/c92u)作为阴性对照。在优化的结合条件下,与不加配体的对照相比,VC2 适配体选择性结合 c-di-GMP 并产生 5.9 倍的荧光强度。VC2/g20a 适配体与 cGAMP 特异性结合,相对于阴性对照样品产生接近 4.3 倍的荧光强度(图 3)。VC2/g20a 适配体也能够与 c-di-GMP 结合并产生明显的激发荧光,这与 Kellenberger 等^[20]报道的数据相似。

2.4 检测 VC0179 体外合成的 c-di-GMP 和 cGAMP

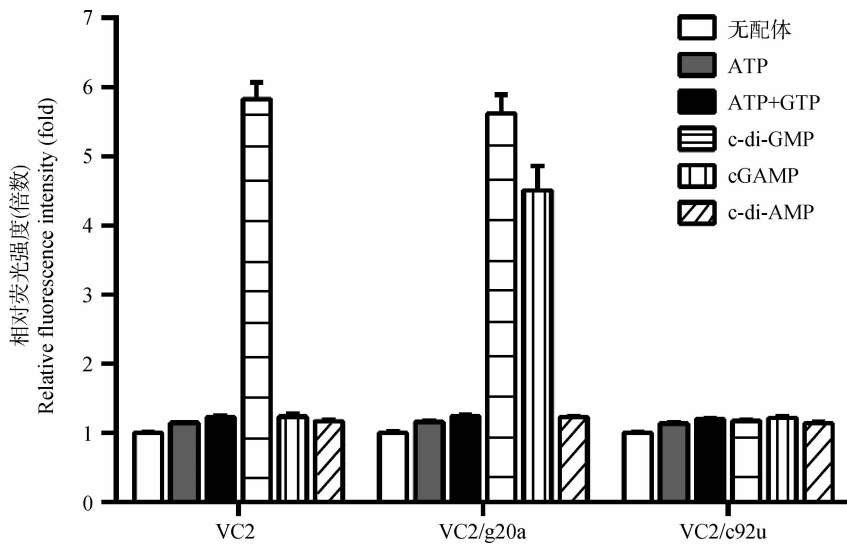
为了简单、快速的测定体外酶合成的 c-di-GMP 和 cGAMP,本研究使用转录后未经纯化的 RNA 适配体混合物来检测 VC0179 合成的 c-di-GMP 和

为了确定两种适配体的检测限,适配体的浓度保持在 100 nmol · L⁻¹,c-di-GMP 和 cGAMP 的浓度从 0 nmol · L⁻¹ 增加到 100 nmol · L⁻¹。通过对荧光强度与相应的配体浓度作图,二者呈现较好的线性关系(VC2 适配体 $R^2 = 0.9923$,线性范围: $5 \sim 100$ nmol · L⁻¹;VC2/g20a 适配体 $R^2 = 0.9834$,线性范围: $20 \sim 100$ nmol · L⁻¹)(图 2b)。另外从图上可以看到,VC2 和 VC2/g20a 适配体对 c-di-GMP 和 cGAMP 的检测限分别为 5 nmol · L⁻¹ 和 20 nmol · L⁻¹。

cGAMP。与未添加 GTP 的阴性对照相比,VC2 适配体可以与 VC0179 合成的 c-di-GMP 结合并产生大约 3.2 倍的荧光强度(图 4a, $P < 0.01$)。与未添加 ATP 和 GTP 的阴性对照相比,VC2/g20a 适配体结合 VC0179 合成的 cGAMP 后,可以产生接近 2.5 倍的荧光强度(图 4b, $P < 0.01$)。上述数据表明转录的 RNA 适配体混合物能够检测酶促反应产生的 c-di-GMP 和 cGAMP。

3 讨论

第二信使分子 c-di-GMP 和 cGAMP 能够刺激机体产生 I 型干扰素,具有潜在作为疫苗佐剂功能,因此,c-di-GMP 和 cGAMP 对家畜重大疫病的治疗具有潜在应用价值。目前获得 c-di-GMP 和 cGAMP 的一个方法是通过化学合成,此方法虽然可行但也存在一些不足,比如:合成步骤复杂、成本高^[10]。另一

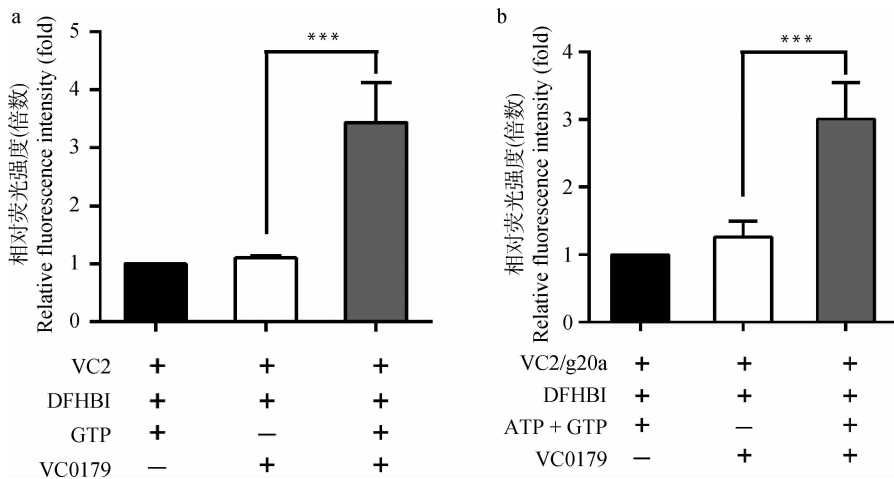


VC2 和 VC2/g20a 适配体及其阴性对照(VC2/c92u)与配体(ATP、ATP+GTP、c-di-AMP、c-di-GMP 和 cGAMP)在优化的条件下结合,并测定相应的荧光强度。将不含配体的样品荧光值作为背景扣除

The VC2 and VC2/g20a aptamers and their negative control(VC2/c92u) bound to the ligands (ATP, ATP + GTP, c-di-AMP, c-di-GMP and cGAMP) under optimal binding conditions and the corresponding fluorescence intensities were detected. Fluorescence was normalized by sample without ligands

图3 RNA 适配体对不同配体的选择性

Fig.3 The selectivity of RNA aptamers toward different ligands



a. 转录的 VC2 适配体混合物检测 VC0179 合成的 c-di-GMP; b. 转录的 VC2/g20a 适配体混合物检测 VC0179 合成的 cGAMP。***, $P < 0.001$

a. Transcribed VC2 aptamer mixture detected c-di-GMP by VC0179 synthesized; b. Transcribed VC2/g20a aptamer mixture detected cGAMP by VC0179 synthesized. ***, $P < 0.001$

图4 RNA 适配体混合物对 VC0179 合成的 c-di-GMP 和 cGAMP 的检测

Fig.4 Transcribed RNA mixture was used to detect c-di-GMP and cGAMP by VC0179 synthesized

个主要方法是通过体外酶促反应获得,例如 Korovashkina 等^[11]利用重组的环化酶在体外合成 c-di-GMP,最近 Launer-Felty 和 Strobel^[28]报道利用环化酶体外合成 c-di-GMP 和 cGAMP。与此同时,对于酶促合成的 c-di-GMP 和 cGAMP 的检测也是一个需要研究的重要问题。以往检测 c-di-GMP 和

cGAMP 的方法包括 HPLC-MS/MS、HPLC、FRET、TLC 等,这些方法虽然有效但也存在缺点。例如使用高效液相色谱-质谱联用技术检测 c-di-GMP 和 cGAMP 时仪器操作复杂,准备时间长,并且检测成本高。而高效液相色谱检测酶促合成的 c-di-GMP 和 cGAMP 时需要去除产物中的酶蛋白,

耗费人力和物力等^[15-18]。

因此为了研究体外酶促反应合成产生的 c-di-GMP 和 cGAMP,需要一种方法能够简单、快速的对其进行检测。本研究通过将 VC2 核糖开关和其突变体 VC2/g20a 与 spinach2 和 tRNA 支架融合构建得到 RNA 适配体,通过结合 DFHBI 染料产生绿色激发荧光来检测 c-di-GMP 和 cGAMP,进而开发一种基于 RNA 适配体的简单、快速检测 c-di-GMP 和 cGAMP 的方法。

本研究利用 T7 RNA 聚合酶体外转录体系转录得到的 RNA 经过加热变性和缓慢退火后,得到 RNA

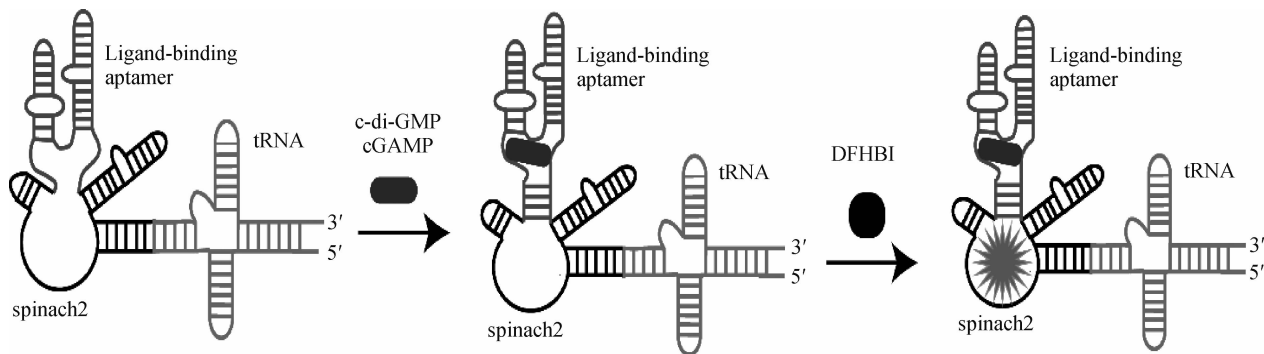


图 5 用于检测 c-di-GMP 和 cGAMP 的 RNA 适配体的示意图

Fig. 5 Schematic illustration of designed RNA aptamers for detecting c-di-GMP and cGAMP

已有文献报道一价和二价金属离子能够促进 RNA 折叠并且稳定形成三级结构^[24-27],所以在本研究中,通过改变结合溶液中的 K^+ 和 Mg^{2+} 浓度和孵育时间,对 RNA 适配体检测 c-di-GMP 和 cGAMP 的反应条件进行了优化。在含有 $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $MgCl_2$ 和 $125 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl 的结合溶液中孵育 180 min 的优化条件下,VC2 适配体对 c-di-GMP 的检测限为 $5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$;VC2/g20a 适配体对 cGAMP 的检测限为 $20 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。同时进一步研究发现,c-di-GMP 对 VC2 适配体的半数效应浓度 (EC_{50}) 为 $(89 \pm 1.7) \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$,cGAMP 对 VC2/g20a 适配体的半数效应浓度为 $(309 \pm 4.5) \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。这表明,本研究构建的两种 RNA 适配体对 c-di-GMP 和 cGAMP 的检测是灵敏的,并且能够在较大的范围内检测到 c-di-GMP 和 cGAMP。

此外,本研究通过使用 VC2 和 VC2/g20a 适配体分别检测 c-di-GMP、cGAMP、c-di-AMP、ATP 和 GTP,试验结果证明,VC2 适配体能够特异性的检测 c-di-GMP,VC2/g20a 适配体能够特异性的检测 cGAMP,这与先前报道的研究结果相似^[20]。同时发

适配体^[29]。RNA 适配体由 3 个模块构建(图 5): (1)与 c-di-GMP 和 cGAMP 结合区域;(2)spinach2 区域;(3)tRNA 支架,VC2 GEMM-1 核糖开关或其突变体 VC2/g20a 用于结合 c-di-GMP 或 cGAMP;Spinach 2 用来结合 DFHBI;tRNA 支架增加适配体的热稳定性^[30]。在没有 c-di-GMP 或 cGAMP 时,RNA 适配体不能够产生激发荧光;在有 c-di-GMP 或 cGAMP 存在时,RNA 适配体与 c-di-GMP 或 cGAMP 结合后,spinach2 形成封闭结构,能够与 DFHBI 结合,形成的复合物在 450 nm 波长激发下产生类似绿色荧光蛋白的激发荧光。

现,与空白对照相比,VC2 和 VC2/g20a 适配体对 ATP 和 GTP 没有明显的结合能力,这说明酶促反应产物中的底物 ATP 和 GTP 对 RNA 适配体检测 c-di-GMP 和 cGAMP 的结果没有影响,因此可以使用 VC2 和 VC2/g20a 适配体直接检测酶促反应产物中的 c-di-GMP 和 cGAMP,并且该检测方法是灵敏的。

进一步的研究发现,转录未经纯化的 RNA 适配体混合物也能够显著检测体外 VC0179 酶促合成的 c-di-GMP 和 cGAMP。这就进一步简化了使用 RNA 适配体检测 c-di-GMP 和 cGAMP 的步骤,使得使用 VC2 和 VC2/g20a 适配体分别检测 c-di-GMP 和 cGAMP 时更加简单、快速,同时也为在其他条件下检测 c-di-GMP 和 cGAMP 提供了可能。需要说明的是,如果要定量检测体外酶促合成的 c-di-GMP 和 cGAMP,需要用 c-di-GMP 和 cGAMP 标准样品做标准曲线,并且给出相应的线性范围。

4 结论

本研究通过将 VC2 核糖开关和其突变体 VC2/g20a 与 spinach2 和 tRNA 支架融合构建得到 RNA

适配体,开发了一种基于 RNA 适配体简单、快速的检测 c-di-GMP 和 cGAMP 的方法,进一步发现,转录未经纯化的 RNA 混合物也能够较灵敏地检测 VC0179 酶促合成的 c-di-GMP 和 cGAMP。这种检测方法也为在其他条件下检测 c-di-GMP 和 cGAMP 提供了可能。

参考文献 (References):

- [1] RÖMLING U, GALPERIN M Y, GOMELSKY M. Cyclic di-GMP: The first 25 years of a universal bacterial second messenger[J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2013, 77(1):1-52.
- [2] LEONI L, PAWAR S V, RAMPIONI G. Genetic tools to study c-di-GMP-dependent signaling in *Pseudomonas aeruginosa* [M]//SAUER K. c-di-GMP Signaling: Methods and Protocols. New York, NY: Humana Press, 2017:471-480.
- [3] BARAQUET C, HARWOOD C S. Use of nonradiochemical DNase footprinting to analyze c-di-GMP modulation of DNA-binding proteins [M]//SAUER K. c-di-GMP Signaling: Methods and Protocols. New York, NY: Humana Press, 2017:303-315.
- [4] AHMAD I, CIMDINS A, BESKE T, et al. Detailed analysis of c-di-GMP mediated regulation of *csdG* expression in *Salmonella typhimurium* [J]. *BMC Microbiol*, 2017, 17:27.
- [5] SLOUP R E, KONAL A E, SEVERIN G B, et al. Cyclic di-GMP and VpsR induce the expression of type II secretion in *Vibrio cholerae* [J]. *J Bacteriol*, 2017, 199(19):e00106-17.
- [6] YIN Q, TIAN Y, KABALEESWARAN V, et al. Cyclic di-GMP sensing via the innate immune signaling protein STING [J]. *Mol Cell*, 2012, 46(6):735-745.
- [7] ALYAQOUB F S, ALDHAMEN Y A, KOESTLER B J, et al. *In vivo* synthesis of Cyclic-di-GMP using a recombinant adenovirus preferentially improves adaptive immune responses against extracellular antigens [J]. *J Immunol*, 2016, 196(4):1741-1752.
- [8] TAO J L, ZHOU X, JIANG Z F. cGAS-cGAMP-STING: The three musketeers of cytosolic DNA sensing and signaling [J]. *IUBMB Life*, 2016, 68(11):858-870.
- [9] WU J X, SUN L J, CHEN X, et al. Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA [J]. *Science*, 2013, 339(6121):826-830.
- [10] SHCHOKOLOVA A S, RYMKO A N, KVACH S V, et al. Enzymatic synthesis of 2'-ara and 2'-deoxy analogues of c-di-GMP [J]. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids*, 2015, 34(6):416-423.
- [11] KOROVASHKINA A S, RYMKO A N, KVACH S V, et al. Enzymatic synthesis of c-di-GMP using inclusion bodies of *Thermotoga maritima* full-length diguanylate cyclase [J]. *J Biotechnol*, 2013, 164(2):276-280.
- [12] SPEHR V, WARRASS R, HÖCHERL K, et al. Large-scale production of the immunomodulator c-di-GMP from GMP and ATP by an enzymatic cascade [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2011, 165(3-4):761-775.
- [13] RAO F, PASUNOOTI S, NG Y, et al. Enzymatic synthesis of c-di-GMP using a thermophilic diguanylate cyclase [J]. *Anal Biochem*, 2009, 389(2):138-142.
- [14] DAVIES B W, BOGARD R W, YOUNG T S, et al. Coordinated regulation of accessory genetic elements produces cyclic di-nucleotides for *V. cholerae* virulence [J]. *Cell*, 2012, 149(2):358-370.
- [15] SPANGLERC, BÖHM A, JENAL U, et al. A liquid chromatography-coupled tandem mass spectrometry method for quantitation of cyclic di-guanosine monophosphate [J]. *J Microbiol Methods*, 2010, 81(3):226-231.
- [16] IRIE Y, PARSEK M R. LC/MS/MS-based quantitative assay for the secondary messenger molecule, c-di-GMP [M]//FILLOUX A, RAMOS J L. *Pseudomonas Methods and Protocols*. New York, NY: Humana Press, 2014:271-279.
- [17] PAIJO J, KAEVER V, KALINKE U. cGAMP quantification in virus-infected human monocyte-derived cells by HPLC-coupled tandem mass spectrometry [M]//MOSSMAN K. *Innate Antiviral Immunity: Methods and Protocols*. New York, NY: Humana Press, 2017:153-166.
- [18] BAIRD N J, INGLESE J, FERRÉ-D'AMARÉ A R. Rapid RNA-ligand interaction analysis through high-information content conformational and stability landscapes [J]. *Nat Commun*, 2015, 6:8898.
- [19] PAIGE J S, WU K Y, JAFFREY S R. RNA mimics of green fluorescent protein [J]. *Science*, 2011, 333(6042):642-646.
- [20] KELLENBERGER C A, WILSON S C, SALES-LEE J, et al. RNA-based fluorescent biosensors for live cell imaging of second messengers cyclic di-GMP and cyclic AMP-GMP [J]. *J Am Chem Soc*, 2013, 135(13):

- 4906-4909.
- [21] SUDARSAN N, LEE E R, WEINBERG Z, et al. Riboswitches in eubacteria sense the second messenger cyclic Di-GMP [J]. *Science*, 2008, 321 (5887): 411-413.
- [22] SMITH K D, LIPCHOCK S V, AMES T D, et al. Structural basis of ligand binding by a c-di-GMP riboswitch[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2009, 16 (12): 1218-1223.
- [23] STRACK R L, DISNEY M D, JAFFREY S R. A superfolding Spinach2 reveals the dynamic nature of trinucleotide repeat-containing RNA[J]. *Nat Methods*, 2013, 10(12):1219-1224.
- [24] TRACHMAN III R J, DRAPER D E. Comparison of interactions of diamine and Mg^{2+} with RNA tertiary structures: Similar versus differential effects on the stabilities of diverse RNA folds [J]. *Biochemistry*, 2013, 52(34):5911-5919.
- [25] LEIPPLY D, DRAPER D E. Dependence of RNA tertiary structural stability on Mg^{2+} concentration: Interpretation of the Hill equation and coefficient [J]. *Biochemistry*, 2010, 49(9):1843-1853.
- [26] TAN Z J, CHEN S J. RNA helix stability in mixed Na^+/Mg^{2+} solution [J]. *Biophys J*, 2007, 92 (10): 3615-3632.
- [27] KLEIN D J, MOORE P B, STEITZ T A. The contribution of metal ions to the structural stability of the large ribosomal subunit [J]. *RNA*, 2004, 10 (9): 1366-1379.
- [28] LAUNER-FELTY K D, STROBEL S A. Enzymatic synthesis of cyclic dinucleotide analogs by a promiscuous cyclic-AMP-GMP synthetase and analysis of cyclic dinucleotide responsive riboswitches [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(6):2765-2776.
- [29] KELLENBERGER C A, HAMMOND M C. *In vitro* analysis of riboswitch-spinach aptamer fusions as metabolite-sensing fluorescent biosensors [J]. *Methods Enzymol*, 2015, 550:147-172.
- [30] PONCHON L, DARDEL F. Recombinant RNA technology: The tRNA scaffold [J]. *Nat Methods*, 2007, 4(7):571-576.

(编辑 郭云雁)