

Kato T, Shimada I, Kimura R, Hyuga M.
Light-up fluorophore-DNA aptamer pair for label-free turn-on
aptamer sensors. *Chem Commun (Camb)*. **2016**

2016. 03. 01. Csoportgyűlés

Eördögh Ádám

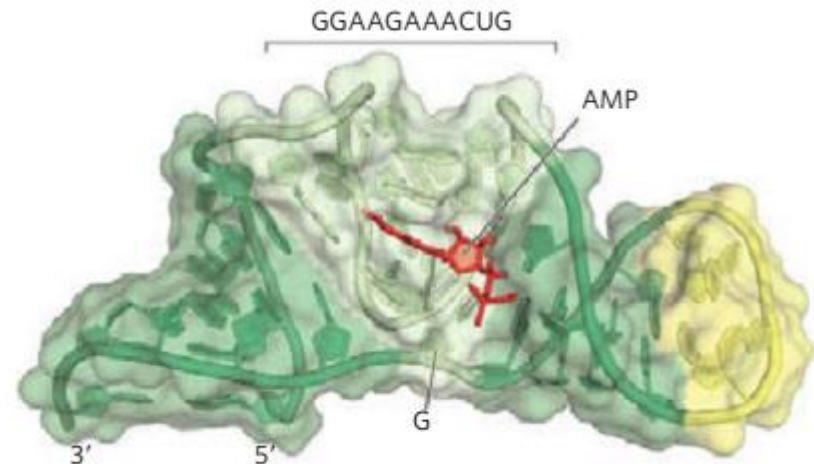
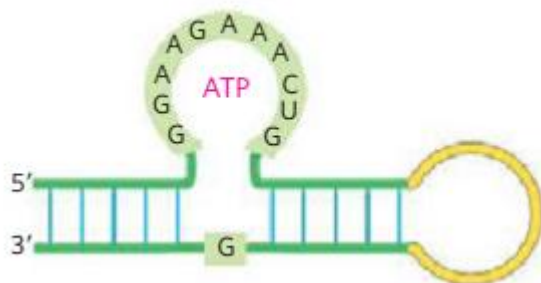
Témavezető:
Dr. Kele Péter



Magyar Tudományos Akadémia
Természettudományi Kutatóközpont
Szerves Kémiai Intézet
Kémiai Biológia Kutatócsoport

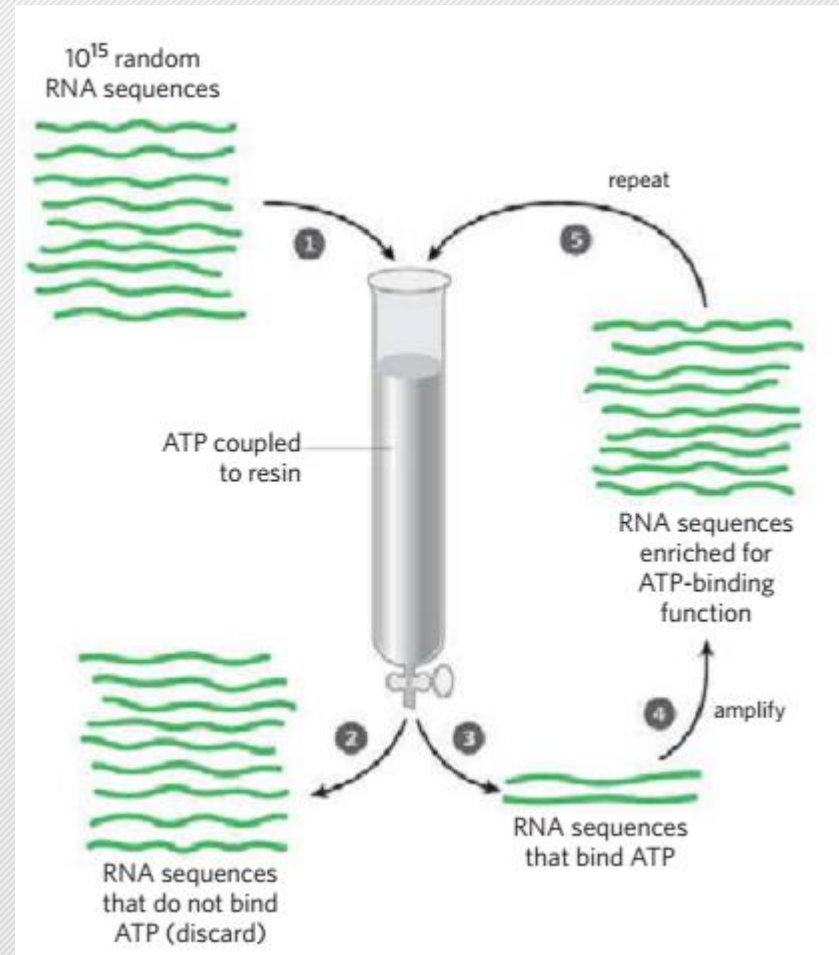
Aptamerek

- Olyan rövid nukleotid- vagy fehérje láncok, melyek egy targethez nagy affinitással kötődni tudnak
- Interakció szekvenciára jellemző
- Pl. ATP-kötő RNS aptamer:



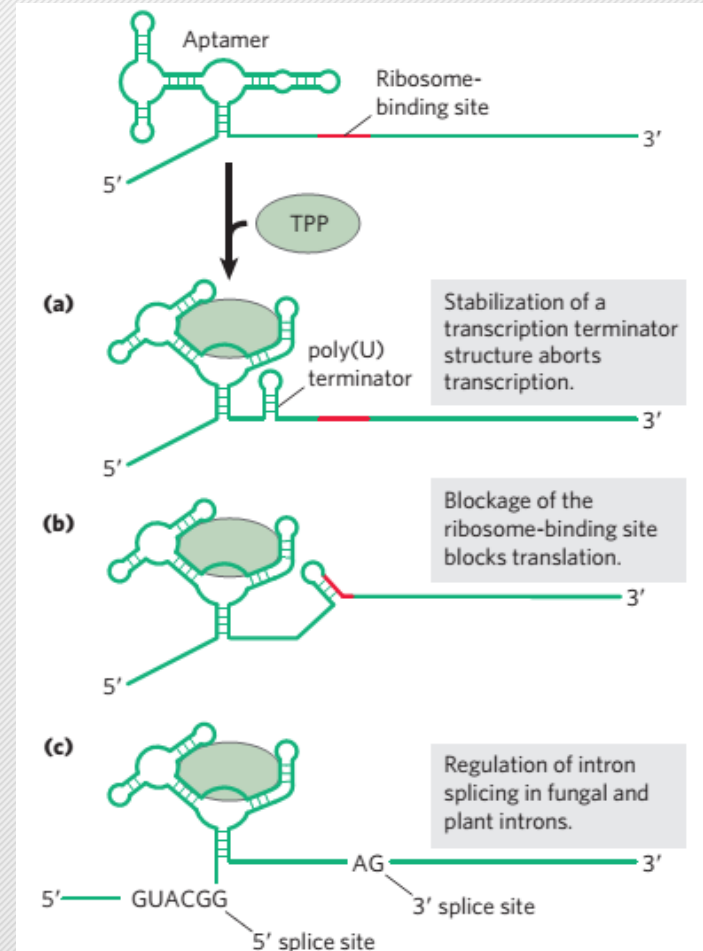
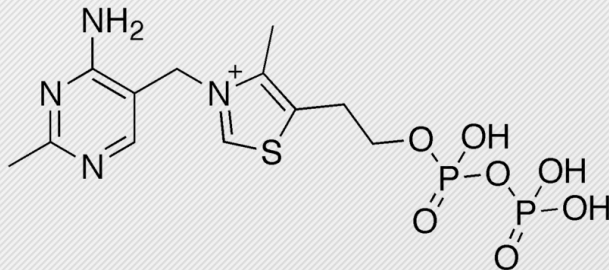
SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment)

- 1, random DNS szekvenciák ligandum immobilizált oszlopon
 - 2, nem kötődős szekvenciák könnyen eluálhatók
 - 3, erősen kötődőek sóoldattal eluálhatóak
 - 4, amplifikáció
 - 5, ismételt affinitás teszt
- Kapacitás: 10^{15}
 - $4^{25} = 10^{15}$ 25 bp hossz



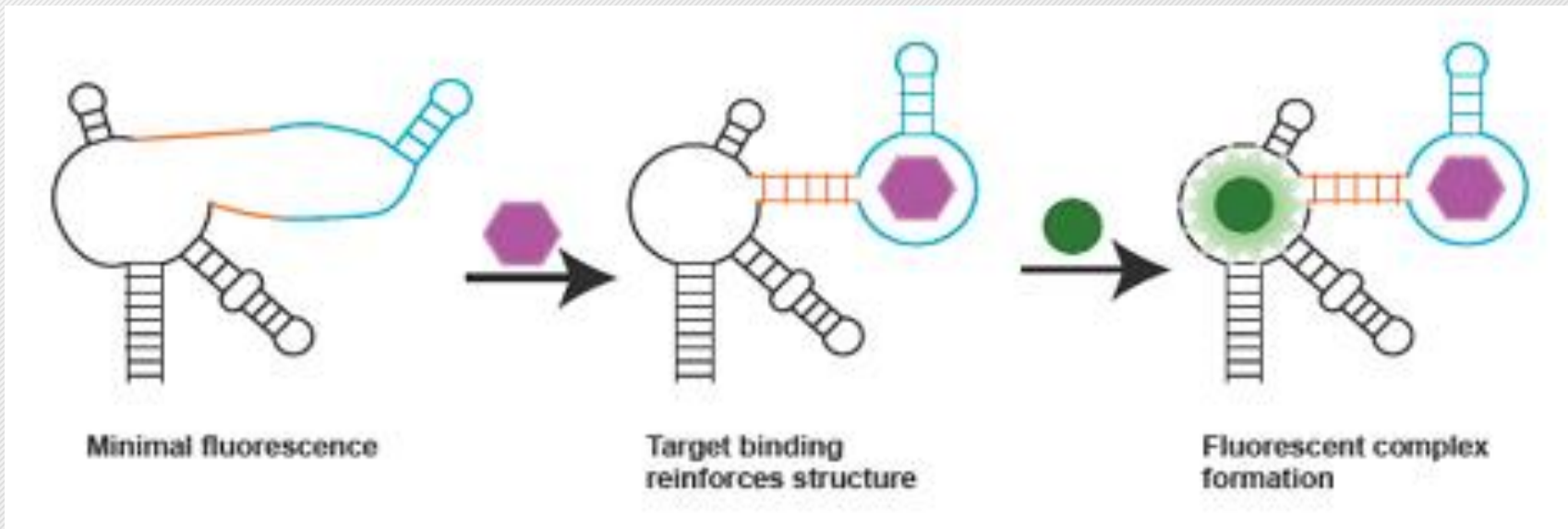
„Természetes aptamerek” - Riboswitches

- Transzkripció szabályzás egy lehetősége
- Főleg baktériumokban
- RNS aptamer
- Gyakori target: tiaminpirofszfát



Light-up aptamers

- Felismerő modul (gyakran riboswitchből)
- Rövid komplementer szekvencia
- Felismerő modul konformáció változása indukálja a festék komplexációt, fluoreszcencia bekapcsolást

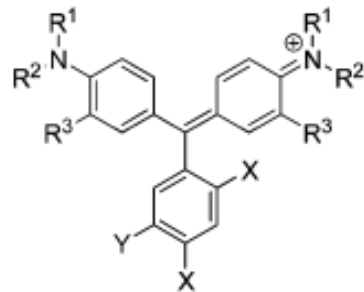


Első Light-up aptamer

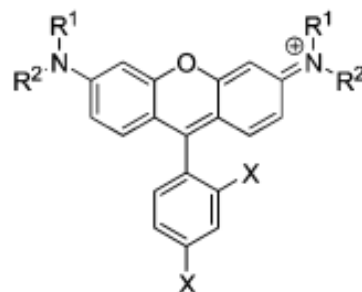
Table 1. Spectral Enhancements of Triphenylmethane Dyes Bound to MG and SRB Aptamers

dye	RNA aptamer	$\Delta\lambda_{\max}$ (nm)	QY free	QY bound	fold increase	K_d μM
MG	MG	12	7.9×10^{-5}	0.187	2360	0.117
IMG	MG	8	1.5×10^{-4}	0.324	2090	0.666
PBVF	SRB	7.5	3.7×10^{-4}	0.034	92	86
PBV	SRB	10	3.9×10^{-4}	0.042	107	23

Chart 1. Relevant Triphenylmethane and Xanthenes Dyes



MG: $R^1 = R^2 = \text{Me}$; $R^3 = X = Y = \text{H}$
 IMG: $R^1 = \text{Me}$; $R^2, R^3 = \text{CH}_2\text{CH}_2$; $X = Y = \text{H}$
 PBVF: $R^1 = R^2 = \text{Et}$, $R^3 = Y = \text{H}$; $X = \text{SO}_3^-$
 PBV: $R^1 = R^2 = \text{Et}$, $R^3 = \text{H}$; $X = \text{SO}_3^-$; $Y = \text{OH}$



TMR: $R^1 = R^2 = \text{Me}$; $X = \text{H}$
 SRB: $R^1 = R^2 = \text{Et}$; $X = \text{SO}_3^-$

- Malachite green szenzor

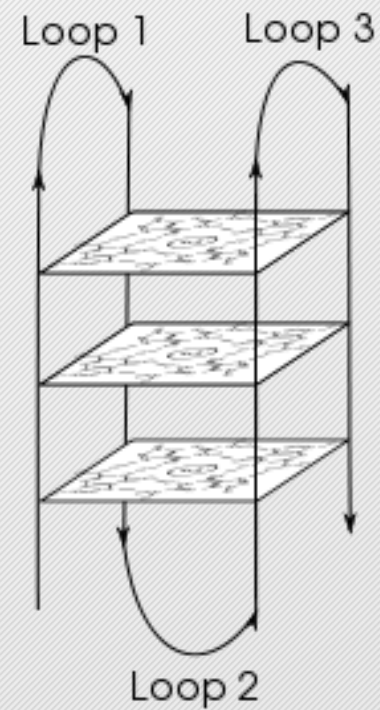
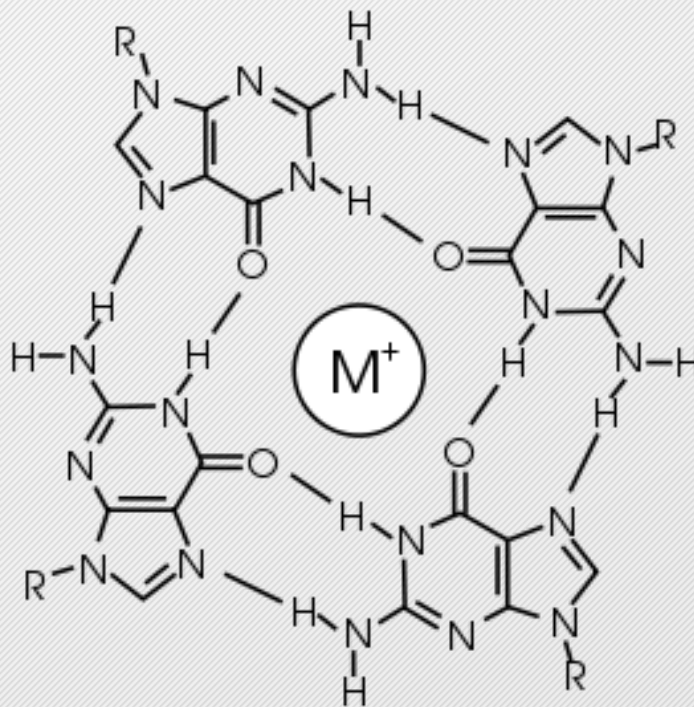
Korábbi Light-up aptamerek

- GFHB (GFP) fluorofór + Spinach RNS aptamer
- Megvalósított targetek:
 - Metionin
 - ADP
 - Cyc-di-GMP
 - Tiaminepirofoszfát
 - Néhány fehérje/peptid
- Mind RNS aptamer



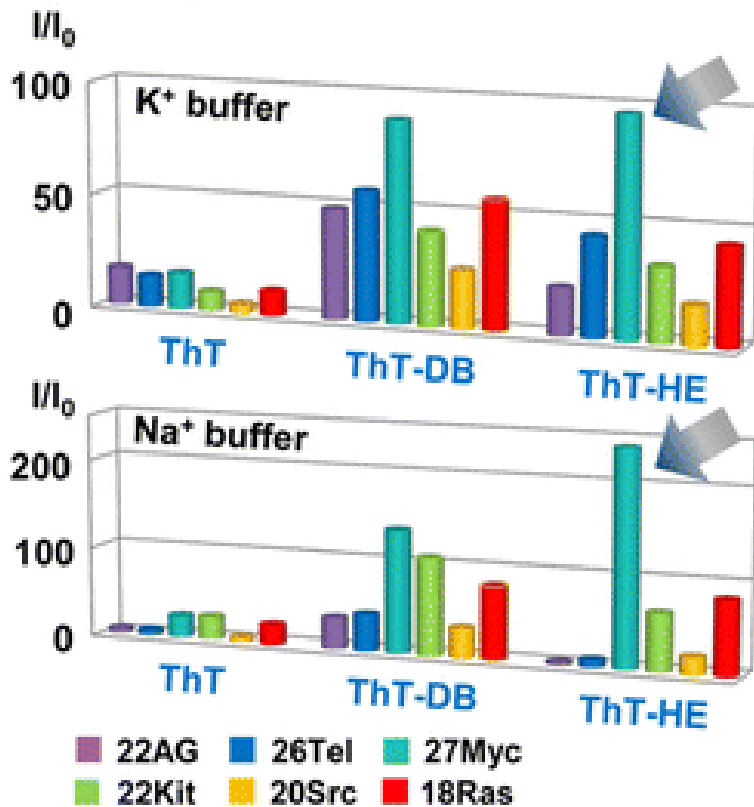
G quadruplex

- DNS struktúra

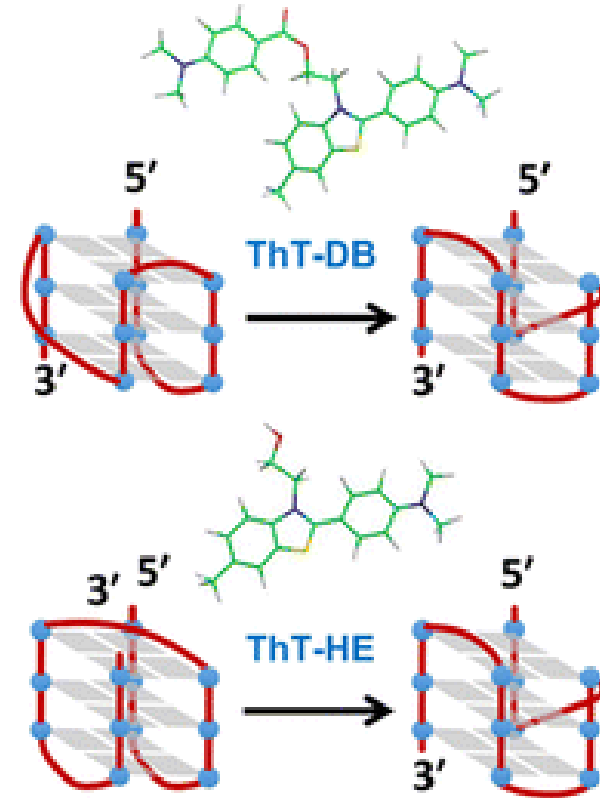


G quadruplex alapú light-up DNS-ek

Selectivity based on fluorescence intensity



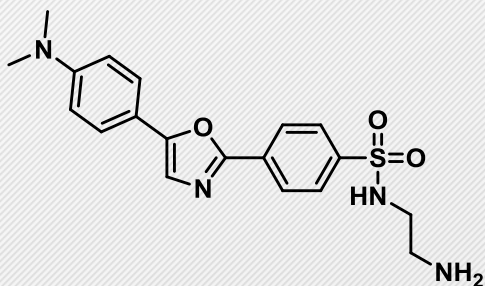
Compound-induced topological change



Light-up fluorofór-DNSaptamer pár

10

- Dapoxiszulfoniletilindiamin (SEDA)



- Erősen oldószerfüggő fluoreszcencia
- Poláris oldószerekben ICT quenchel

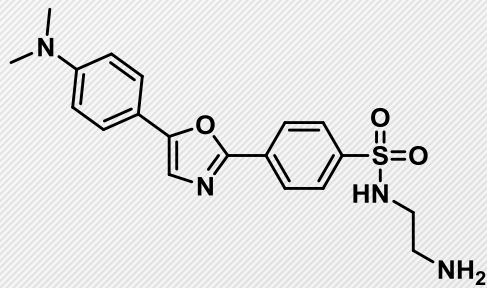
SELEX eljárás

11

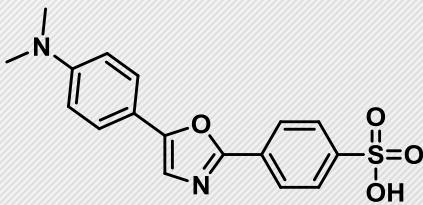
- 76mer 40bp random ssDNA
- 9-kör elő szelekció
- Szekvenálás 31 szekvencia
- 2 kategória: DAP-1 és DAP-10

Etiléndiamin csoport jelentősége

12

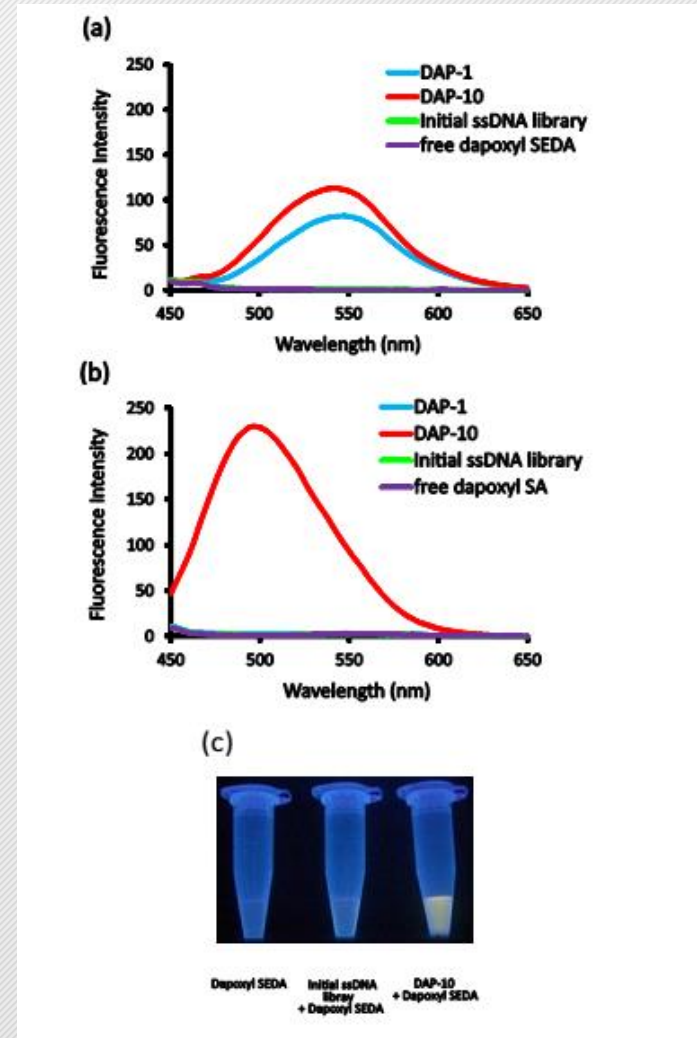


SEDA



SA

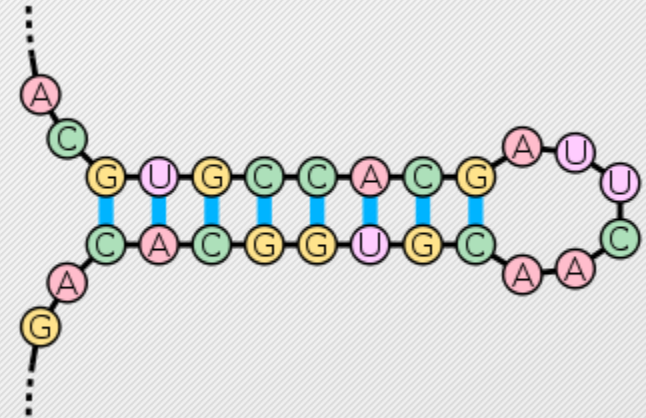
- DAP-1 nélkül részt vesz az interakcióban



Kötődésért felelős részlet azonosítása

13

- Hairpin struktúra
- Törlés a szekvencia végekről
- DAP-10-42
 - Felesleges részlet törölve
 - További 50% fluoreszcencia fényesség
 - $K_d=7.6$ nM (SEDA) $K_d=25$ nM (SA)
- DAP-10-27
 - Komplementer régió is törölve
 - Minimális fluoreszcencia



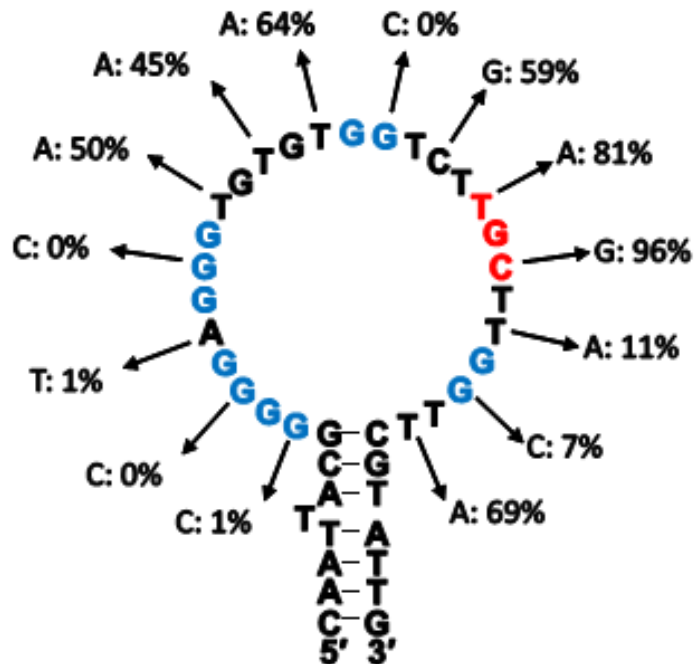
Spektroszkópiai adatok

14

Fluorophore	Excitation maximum (nm)	Emission maximum (nm)	Extinction coefficient ($M^{-1}cm^{-1}$)	Fluorescence quantum yield	K_d (nM)
Dapoxyl SEDA	359	561	9,990 (at 400 nm)	0.00086	-
Dapoxyl SEDA bound to DAP-10-42	402	540	10,200 (at 400 nm)	0.621	7.6 ± 1.2
Dapoxyl SA	354	558	5,700 (at 390 nm)	0.025	-
Dapoxyl SA bound to DAP-10-42	391	497	12,000 (at 390 nm)	0.866	24.8 ± 1.9

Mutációs analízis

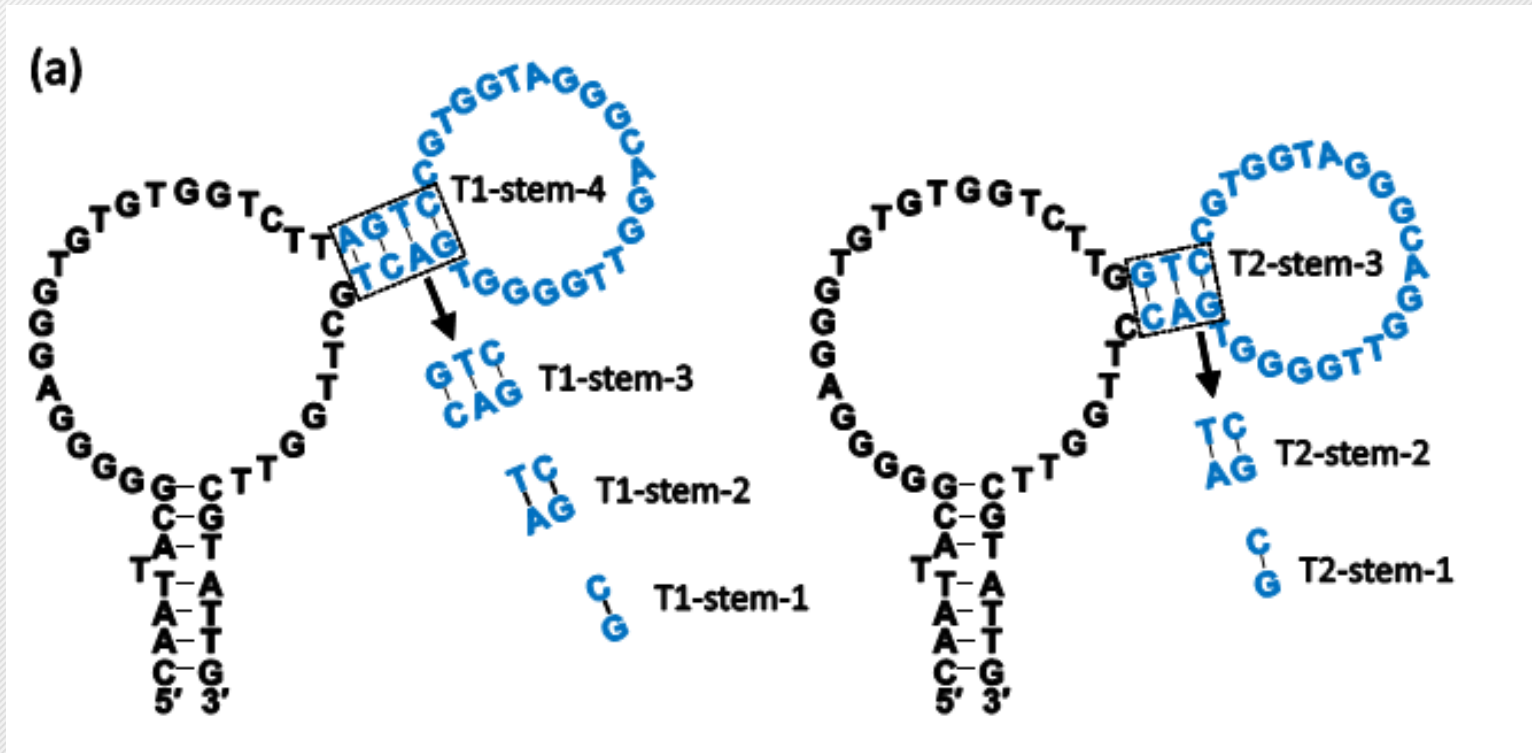
- Hol kellene beépíteni a felismerő aptamer régiót?
- Egy bázis cserék (SPM)



Trombin felismerő rész beépítése

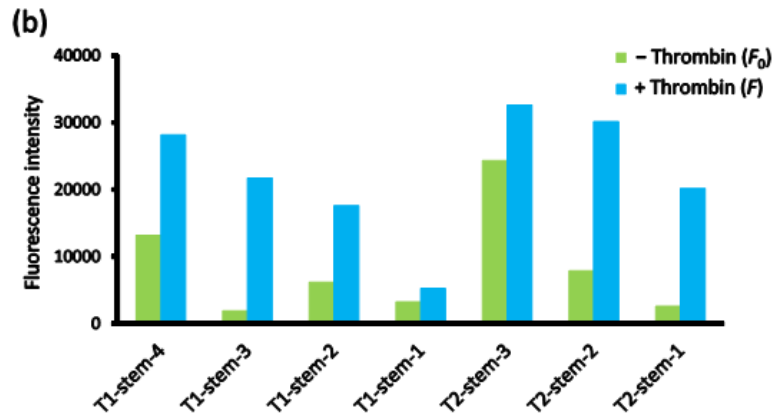
16

- 2 Helyen
- Különböző nyakhosszal

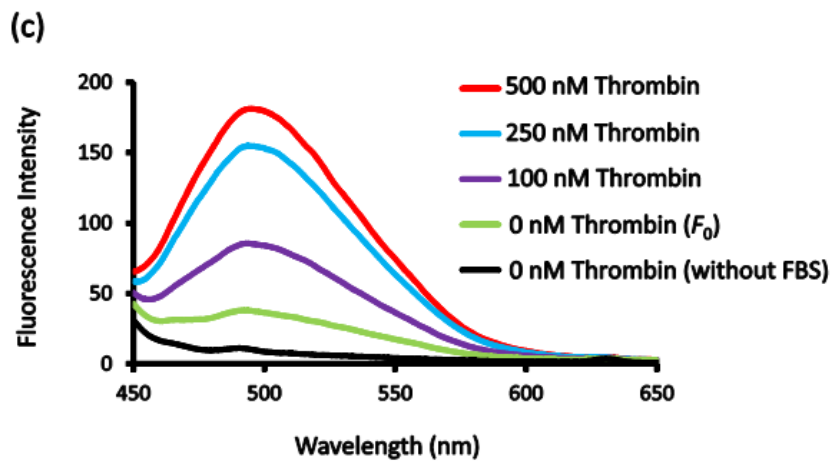


Összehasonlítás

17



250 nM Trombin + 250 nM SA
Microplate, 3 mérésből

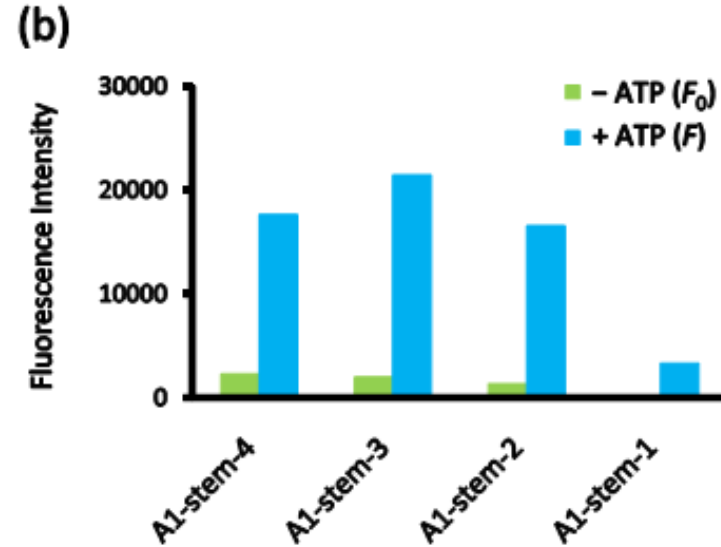
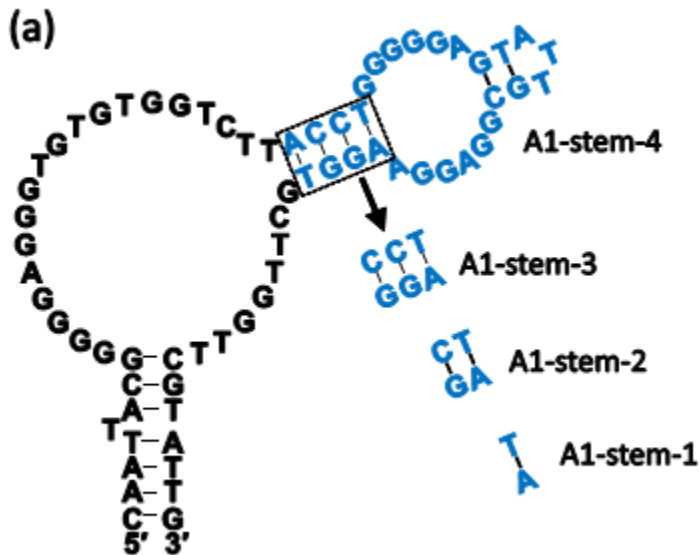


T1stem3 a legjobb konstrukció
11x-es erősítés

ATP felismerő rész beépítése

18

- 1 helyen
- Különböző nyakhosszakkal



Összefoglalás

19

- Új, optimált festék aptamer pár (SEDA,SA)
- 700x turn-on aránnyal
- Jó ligandum affinitással
- Sikeres beépítés trombin és ATP szenzorba

lehetséges folytatás:

- nyak-rész további optimalálása

Köszönöm a figyelmet.

- Témavezetőmnek: Dr. Kele Péternek
- Kémiai Biológia kutatócsoport minden tagjának