



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ วิธีการอย่างง่ายในการระบุตำแหน่งที่ใช้ในการยึดจับ โมเลกุลเป้าหมายของแอพทาเมอร์

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. บุญช่วย สุนทรวรจิต

มิถุนายน 2560

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ วิธีการอย่างง่ายในการระบุตำแหน่งที่ใช้ในการยึดจับ โมเลกุลเป้าหมายของแอพทาเมอร์

ผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุญช่วย สุนทรวรจิต

สังกัด

สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

สนับสนุนโดย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.และต้นสังกัดไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: TRG5880201

ชื่อโครงการ: วิธีการอย่างง่ายในการระบุตำแหน่งที่ใช้ในการยึดจับโมเลกุลเป้าหมายของแอฟทาเมอร์

ชื่อนักวิจัย: ผศ.ดร.บุญช่วย สุนทรวรจิต

อีเมลล์: sbooncho@tu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

บทคัดย่อ:

แอฟทาเมอร์เป็นกลุ่มโมเลกุลที่มีความสามารถจดจำเป้าหมายได้อย่างจำเพาะจึงถูกนำมาใช้งานในด้านต่างๆที่เกี่ยวข้องกับชีววิทยารวมถึงงานชีวการแพทย์เป็นต้นว่าเป็นโมเลกุลที่ใช้ตรวจวินิจฉัยหรือใช้รักษาโรคได้ อย่างไรก็ตามแอฟทาเมอร์เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่สายโซ่โมเลกุลมีขนาดใหญ่ส่งผลให้มีข้อจำกัดในการสังเคราะห์รวมไปถึงนิวคลีโอไทด์บางตำแหน่งไปรบกวนการยึดจับระหว่างแอฟทาเมอร์กับโมเลกุลเป้าหมาย จุดประสงค์ของโครงการนี้จึงมุ่งเป้าไปที่การพัฒนาวิธีการในการระบุตำแหน่งที่ใช้ในการยึดจับโมเลกุลเป้าหมายของแอฟทาเมอร์เพื่อให้ได้แอฟทาเมอร์ที่มีความยาวของโมเลกุลสั้นลง โมเลกุลต้นแบบที่ใช้ในงานวิจัยนี้คือโกรทแฟคเตอร์ชนิดพีดีจีเอฟบีบีและแอฟทาเมอร์ที่จำเพาะกับโมเลกุลดังกล่าวด้วยเทคนิคทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยาทำให้สามารถระบุตำแหน่งที่แอฟทาเมอร์ใช้ในการยึดจับและตามด้วยการทำให้แอฟทาเมอร์มีความยาวของโอลิโกนิวคลีโอไทด์สั้นลงได้ โดยแอฟทาเมอร์ดังกล่าวมีค่าคงที่ในการแตกตัวอยู่ในช่วงพีเคโมลาร์และมีความแข็งแรงในการยึดจับเพิ่มขึ้น 150 เท่า เมื่อเทียบกับโมเลกุลดั้งเดิม นอกจากนี้ได้ทำการยืนยันความสามารถในการยึดจับด้วยการคำนวณทางโมเลกุลาร์ไดนามิกส์พบว่าค่าพลังงานการยึดจับที่ได้จากการทดลองทางภูมิคุ้มกันวิทยาและการคำนวณทางคอมพิวเตอร์มีความสอดคล้องกัน ซึ่งโมเลกุลแอฟทาเมอร์ที่ได้จากกระบวนการนี้จะถูกนำไปพัฒนาเป็นตัวตรวจวัดสำหรับการวินิจฉัยหรือเป็นสารที่ใช้ในการรักษาอาการเจ็บป่วยได้

คำหลัก: โกรทแฟคเตอร์, แอฟทาเมอร์, เทคนิคทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยา

Abstract

Project Code: TRG5880201

Project Title: A Practical Protocol for Identify Binding Region of Aptamer

Investigator: Asst.Prof.Dr.Boonchoy Soontornworajit

Email Address: sbooncho@tu.ac.th

Project Period: 2 years

Abstract:

Aptamers as specific molecular recognitions play a critical role in various biological and biomedical applications such as diagnostic and therapeutic molecules. However, the aptamer usages are limited, because long sequences of aptamer are not practical to synthesize and cause the reduction in binding efficacy. The project is aimed to develop a standard protocol for identifying binding sequences of aptamer and truncating the aptamer sequence. Model molecules are PDGF-BB and its aptamer. Based on the immunoassay, the aptamer was truncated to a number of sequences with lengths of 36-40 nt. Those sequences had $K_{D,app}$ at a picomolar scale, indicating their binding capability. Particularly, the $K_{D,app}$ of truncated aptamer with a length of 36 nt was approximately 150-fold lower than that of the full-length aptamer. The binding of the truncated sequences was confirmed using MD simulation. For the studied aptamer sequences, the binding energies obtained experimentally correlated well with those calculated from the MD, with correlation coefficients (R^2) of 0.9435 (MMPB/SA) and 0.9868 (MMGB/SA). The expected outcome is the development of an aptamer-based recognition molecule that could find applications in both diagnostic assays and therapeutic treatments.

Keywords: Growth Factor, Aptamer, Immunoassay

1.บทสรุปผู้บริหาร (Executive Summary)

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โมเลกุลที่มีความสามารถจดจำอย่างจำเพาะมีบทบาทสำคัญในการใช้งานด้านต่างๆ ทั้งทางด้านชีววิทยาและการแพทย์ ตัวอย่างของโมเลกุลดังกล่าว เช่น แอนติบอดี สายโซ่พอลิเพปไทด์ และโมเลกุลขนาดเล็กอื่นๆ เป็นต้น นอกจากความสามารถในการยึดจับกับเป้าหมายอย่างจำเพาะเจาะจงของโมเลกุลดังกล่าว อีกสิ่งหนึ่งที่ต้องคำนึงถึงคือความแข็งแรงในการยึดจับ ปัจจุบันนี้แอนติบอดีเป็นโมเลกุลหลักที่ถูกใช้งานเพื่อเป็นโมเลกุลที่มีความสามารถในการจดจำในเทคนิคการวิเคราะห์ต่างๆ อย่างไรก็ตาม แอนติบอดีเองก็มีข้อจำกัดในการใช้งาน อันเนื่องมาจากเป็นโมเลกุลที่มีความเปราะบางเสถียรภาพได้ง่ายในระหว่างขั้นตอนการเตรียมสารต่างๆ แอนติบอดียังไปกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกายทำให้ฤทธิ์ทางชีวภาพที่จะเป็นยาลดลง นอกจากนี้โมเลกุลของแอนติบอดีมีขนาดใหญ่ ทำให้หากไหลเวียนภายในร่างกายเป็นเวลานานจะส่งผลให้เกิดอาการข้างเคียง ดังนั้นจึงจำเป็นในการพัฒนาโมเลกุลที่มีความสามารถในการจดจำชนิดใหม่ซึ่งมีสมบัติที่ดีกว่าแอนติบอดีตามที่กล่าวไว้ข้างต้น

จากความก้าวหน้าของเทคโนโลยีทางด้านสารชีวโมเลกุล ส่งผลทำให้มีการพัฒนาสารในกลุ่มแอนพทาเมอร์มาเป็นคู่แข่งของแอนติบอดี แอนพทาเมอร์เป็นสารประเภทกรดนิวคลีอิกที่ต่อกันเป็นสายเดี่ยวเรียกว่าโอลิโกนิวคลีโอไทด์ แอนพทาเมอร์มีความสามารถในการยึดจับกับโมเลกุลเป้าหมายได้อย่างจำเพาะและจับอย่างแข็งแรงเช่นเดียวกับแอนติบอดี แอนพทาเมอร์มีจุดเด่นที่เหนือกว่าแอนติบอดีดังต่อไปนี้ แอนพทาเมอร์สามารถสังเคราะห์ให้มีลำดับเบสตามต้องการได้และมีการจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ ระยะเวลาที่ใช้ในสังเคราะห์สั้นกว่าเวลาที่ใช้ในการเตรียมแอนติบอดี อีกทั้งโมเลกุลของแอนพทาเมอร์มีความคงทนต่อสภาวะแวดล้อมมากกว่า แอนพทาเมอร์ก่อให้เกิดผลข้างเคียงเนื่องจากการต่อต้านของภูมิคุ้มกันร่างกายน้อยกว่า นอกจากนี้อันตรกิริยาการยึดจับระหว่างแอนพทาเมอร์กับโมเลกุลเป้าหมายสามารถถูกรบกวนได้ด้วยโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่เป็นเบสคู่สม ยังผลให้เป็นแนวทางในการควบคุมการยึดจับระหว่างแอนพทาเมอร์กับโมเลกุลเป้าหมาย ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างมากในการเตรียมระบบนำส่งยา โดยปกติแอนพทาเมอร์จะมีความยาวสายโซ่โอลิโกนิวคลีโอไทด์ในช่วง 60-80 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งบางช่วงของสายโซ่นั้นที่มีบทบาทเกิดเป็นโครงสร้างสามมิติที่ใช้ในการยึดจับกับโมเลกุลเป้าหมาย ดังนั้นในสายโซ่แอนพทาเมอร์จะประกอบไปด้วยสองส่วนคือส่วนที่จำเป็นและส่วนที่ไม่จำเป็นต่อการยึดจับ ในบางครั้งส่วนที่ไม่จำเป็นนี้ไปมีผลกระทบต่อความสามารถในการยึดจับของแอนพทาเมอร์ นอกจากนี้ส่วนที่ไม่จำเป็นในการยึดจับนี้ ทำให้ความยาวโดยรวมของแอนพทาเมอร์ยาวมากขึ้นเกินความจำเป็น ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการสังเคราะห์ลดลง รวมทั้งการปรับแต่งด้วยหมู่ฟังก์ชันอื่นๆทำได้ยากขึ้น ดังนั้นจึงมีความจำเป็นในการที่จะระบุตำแหน่งของส่วนที่จำเป็นบนสายโซ่แอนพทาเมอร์ สำหรับการระบุตำแหน่งที่จำเป็นนั้นโดยทั่วไปจะใช้วิธีการตัดสายโซ่แอนพทาเมอร์ต้นแบบแบบสุ่ม แล้วนำสายโซ่แอนพทาเมอร์ที่ผ่านการตัดนั้นมาจำลองโครงสร้างสามมิติของโมเลกุลเปรียบเทียบกับโครงสร้างสามมิติของแอนพทาเมอร์ต้นแบบว่าเหมือนกันหรือไม่ แล้วจึงทำการทดลองยืนยัน โดยรวมแล้วขั้นตอนจะมีลักษณะการสุ่มเดาซึ่งทำให้ใช้เวลาและแรงงานมาก ดังนั้นในโครงการวิจัยนี้จึงได้เสนอแนวทางในการคัดเลือกและระบุตำแหน่งที่จำเป็นสำหรับโมเลกุลแอนพทาเมอร์ โดยหลักการที่ใช้คือการที่แอนพทาเมอร์สามารถจับกับโอลิโกนิวคลีโอไทด์คู่เบสเกิด

เป็นดีเอ็นเอสายคู่ ส่งผลทำให้ความสามารถในการยึดจับของแอฟทาเมอร์เปลี่ยนไป จึงสามารถระบุตำแหน่งที่จำเป็นในการยึดจับได้

1.2 วัตถุประสงค์

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยนี้คือ การพัฒนาวิธีการเพื่อใช้ในการระบุตำแหน่งบนสายโซ่แอฟทาเมอร์ที่ใช้ในการยึดจับกับโมเลกุลเป้าหมาย

1.3 ระเบียบวิธีวิจัย

1.3.1 สารเคมี

โมเลกุลที่ใช้ในโครงการวิจัยนี้คือ แอฟทาเมอร์ที่สามารถยึดจับกับโกรทแฟกเตอร์ที่มีชื่อว่าฟีดจีเอฟได้ และโอลิโกนิวคลีโอไทด์คู่เบส

1.3.3 การศึกษาการเกิดดีเอ็นเอสายคู่

การเกิดดีเอ็นเอสายคู่ระหว่างแอฟทาเมอร์และโอลิโกนิวคลีโอไทด์คู่เบสจะถูกตรวจสอบด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

1.3.4 การระบุตำแหน่งที่ใช้ในการยึดจับโมเลกุลเป้าหมายของแอฟทาเมอร์

แอฟทาเมอร์สายที่มีลำดับเบสสมบูรณ์จะถูกผสมกับโอลิโกนิวคลีโอไทด์คู่เบสที่มีความยาวต่างกัน เพื่อให้เกิดเป็นดีเอ็นเอสายคู่ ดีเอ็นเอสายคู่ที่เกิดขึ้นจะถูกทดสอบการยึดจับกับโปรตีนเป้าหมายโดยอาศัยหลักการการแข่งขันยึดจับระหว่างแอฟทาเมอร์ โปรตีน และแอนติบอดี และตรวจวัดสัญญาณการยึดจับโดยเทคนิคอิลูซา

1.3.5 การยืนยันความสามารถในการยึดจับของแอฟทาเมอร์

แอฟทาเมอร์ที่เหลือแต่ส่วนที่จำเป็นต่อการยึดจับจะถูกผสมกับสารละลายมาตรฐานฟีดจีเอฟ ก่อนทำการตรวจวัดสมบัติการยึดจับของฟีดจีเอฟต่อแอนติบอดีด้วยเทคนิคอิลูซาที่จำเพาะต่อฟีดจีเอฟ หากแอฟทาเมอร์สามารถจับได้กับโปรตีนฟีดจีเอฟจะทำให้สัญญาณที่วัดได้จากอิลูซาลดลง

1.3.6 การศึกษาพลังงานอิสระในการยึดจับ

อันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลแอฟทาเมอร์และฟีดจีเอฟจะถูกคำนวณออกมาในรูปพลังงานอิสระในการยึดจับ โดยใช้แบบจำลองทางโมเลกุลและการคำนวณทางเคมีคอมพิวเตอร์

1.4 ผลการดำเนินงานโครงการวิจัย

จากการศึกษาด้วยเทคนิคทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยาพบว่าสามารถระบุตำแหน่งที่แอฟทาเมอร์ใช้ในการยึดจับและตามด้วยการทำให้แอฟทาเมอร์มีความยาวของโอลิโกนิวคลีโอไทด์สั้นลงได้ โดยแอฟทาเมอร์ดังกล่าวมีค่าคงที่ในการแตกตัวอยู่ในช่วงพิโคโมลาร์และมีความแข็งแรงในการยึดจับเพิ่มขึ้น 150 เท่าเมื่อเทียบกับโมเลกุลดั้งเดิม นอกจากนี้ได้ทำการยืนยันความสามารถในการยึดจับด้วยการคำนวณทางโมเลกุลาร์ไดนามิกส์ พบว่าค่าพลังงานการยึดจับที่ได้จากการทดลองทางภูมิคุ้มกันวิทยาและการคำนวณ

ทางคอมพิวเตอร์มีความสอดคล้องกัน ซึ่งโมเลกุลแอฟทาเมอร์ที่ได้จากกระบวนการนี้จะถูกนำไปพัฒนาเป็นตัวตรวจวัดสำหรับการวินิจฉัยหรือเป็นสารที่ใช้ในการรักษาอาการเจ็บป่วยได้

2. วัตถุประสงค์

วัตถุประสงค์ของโครงการนี้คือ การพัฒนาวิธีการในการระบุตำแหน่งที่ใช้ในการยึดจับโมเลกุลเป้าหมายของแอฟทาเมอร์เพื่อให้ได้แอฟทาเมอร์ที่มีความยาวของโมเลกุลสั้นลง เพื่อบรรลุวัตถุประสงค์ดังกล่าวแผนการสำหรับดำเนินการวิจัยแบ่งเป็น 3 ข้อดังนี้

- 1) การเตรียมอนุภาคที่เคลือบด้วยโปรตีนเป้าหมายเพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษาอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุล
- 2) การระบุตำแหน่งที่ใช้ในการยึดจับของโมเลกุลแอฟทาเมอร์ด้วยวิธีการไฮบริดไตเซชันกับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่มีเบสคู่สม
- 3) การยืนยันความสามารถในการยึดจับของแอฟทาเมอร์ที่มีสายสั้นลงด้วยวิธีการทดสอบทางภูมิคุ้มกันวิทยาและการหาค่าพลังงานอิสระสำหรับการยึดจับด้วยวิธีการทางเคมีคอมพิวเตอร์

ผลสำเร็จของงานวิจัยนี้คือได้สร้างองค์ความรู้ถึงความเข้าใจในอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลต่อไปนี้ แอฟทาเมอร์ โปรตีนเป้าหมายและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ ทั้งในแง่การทดลองและคำนวณทางทฤษฎี และใช้องค์ความรู้ดังกล่าวในการสร้างวิธีที่ใช้ในการระบุตำแหน่งที่จำเป็นต่อการยึดจับของแอฟทาเมอร์ส่งผลให้ได้แอฟทาเมอร์ที่มีสายโซ่โมเลกุลสั้นลง

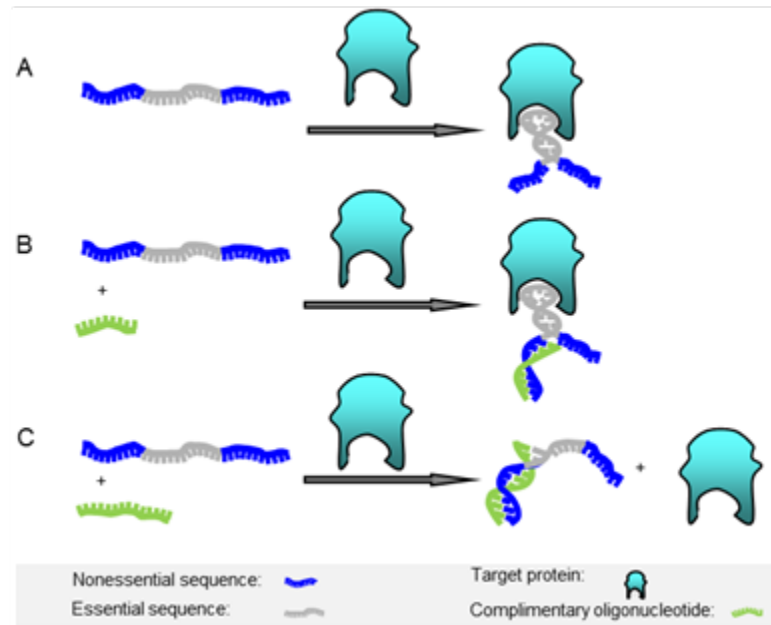
3 ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 สมมติฐาน

โดยสมมติฐานของโครงการวิจัยนี้คือหากการไฮบริดไตเซชันเกิดขึ้นที่ตำแหน่งเบสที่สำคัญต่อการยึดจับก็จะส่งผลให้แอฟทาเมอร์เสียความสามารถในการยึดจับไปดังแสดงในรูปที่ 1 หากสามารถตรวจวัดเหตุการณ์ดังกล่าวได้ก็จะนำไปสู่การระบุตำแหน่งเบสที่จำเป็นต่อการยึดจับและทำให้แอฟทาเมอร์มีขนาดสั้นลงได้

3.2 สารเคมี

โมเลกุลต้นแบบที่ใช้ในการศึกษา คือ โกรทแฟกเตอร์ชนิด พีดิจีเอฟ-บีบี (platelet-derived growth factor-BB, PDGF-BB) แอฟทาเมอร์ที่สามารถยึดจับกับ พีดิจีเอฟ-บีบี และโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่เป็นคู่เบส (CO) สารเคมีรวมถึงอุปกรณ์ที่สำคัญอื่นได้แก่ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (phosphate buffer saline, PBS), โบวีนซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin, BSA), ชุดตรวจวัดปริมาณโปรตีนด้วยเทคนิคเอนไซม์ (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) ที่จำเพาะต่อโปรตีน พีดิจีเอฟ-บีบี



รูปที่ 1 (A) แอพทาเมอร์สายโซ่เริ่มต้นสามารถจับโมเลกุลเป้าหมายได้ (B) กรณีที่การไฮบริดไตเซชันเกิดขึ้นในตำแหน่งที่ไม่สำคัญต่อการยึดจับส่งผลให้แอพทาเมอร์สามารถจับกับโมเลกุลเป้าหมายได้ (C) กรณีที่การไฮบริดไตเซชันเกิดที่ตำแหน่งสำคัญต่อการยึดจับส่งผลให้แอพทาเมอร์สูญเสียความสามารถในการยึดจับโมเลกุลเป้าหมาย

3.3 การตรวจสอบการไฮบริดไตเซชัน

เทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสถูกใช้ในการศึกษาการไฮบริดไตเซชันระหว่างแอพทาเมอร์กับโอลิโกนิวคลีโอไทด์คู่สม โดยใส่แอพทาเมอร์สายโซ่เริ่มต้นลงในสารละลายที่มีโอลิโกนิวคลีโอไทด์คู่สมหรือโอลิโกนิวคลีโอไทด์เส้นอ้างอิงอย่างใดอย่างหนึ่ง อุณหภูมิที่เตรียมสารดังกล่าวคืออุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นนำสารละลายดังกล่าวไปทดสอบด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสโดยใช้เจลชนิดพอลิอะคริลามิด

3.4 การระบุตำแหน่งที่ใช้ในการยึดจับโมเลกุลเป้าหมายของแอพทาเมอร์

แอพทาเมอร์สายโซ่เริ่มต้นสำหรับพีดีจีเอฟ-บีบีถูกใส่เข้าไปในสารละลายที่มีโอลิโกนิวคลีโอไทด์คู่สม โดยที่โอลิโกนิวคลีโอไทด์คู่สมจะมีความยาวแตกต่างกันตั้งแต่ 15-30 นิวคลีโอไทด์ และสามารถเกิดไฮบริดไตเซชันได้ที่ปลาย 5' และปลาย 3' ของแอพทาเมอร์ หลังจากนั้นสารละลายดังกล่าวถูกผสมเข้ากับพีดีจีเอฟ-บีบี สัญญาณการดูดกลืนแสงด้วยเทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยา การลดลงของการดูดกลืนแสงแสดงว่าแอพทาเมอร์ยังสามารถจับกับพีดีจีเอฟ-บีบีได้ภายหลังการไฮบริดไตเซชัน แสดงให้เห็นว่าบริเวณของแอพทาเมอร์ที่เกิดการไฮบริดไตเซชันและให้ผลดังกล่าวไม่ได้มีบทบาทต่อการยึดเกาะโมเลกุลเป้าหมาย ส่งผลให้สามารถตัดบริเวณดังกล่าวออกจากโมเลกุลแอพทาเมอร์และทำให้แอพทาเมอร์มีความยาวสั้นลงได้

3.5 การยืนยันความสามารถในการยึดจับของแอฟทาเมอร์

สารละลายที่มีโมเลกุลแอฟทาเมอร์ที่ถูกทำให้สั้นลงแล้ว (ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 1pM-1 μ M) จะถูกผสมเข้ากับสารละลายฟิซีเจเอฟ-บีบีเพื่อให้แอฟทาเมอร์ดังกล่าวไปจับกับฟิซีเจเอฟ-บีบี หลังจากนั้นจึงนำสารละลายที่เตรียมได้นี้ไปตรวจวัดด้วยวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา (ELISA) ข้อมูลการดูดกลืนคลื่นแสงที่ตรวจวัดได้จะนำมาคำนวณหาค่าคงที่ของการแตกตัวของแอฟทาเมอร์ (K_D) ซึ่งเป็นค่าที่ใช้บอกความแข็งแรงในการยึดจับของแอฟทาเมอร์ที่ศึกษาในโครงการนี้

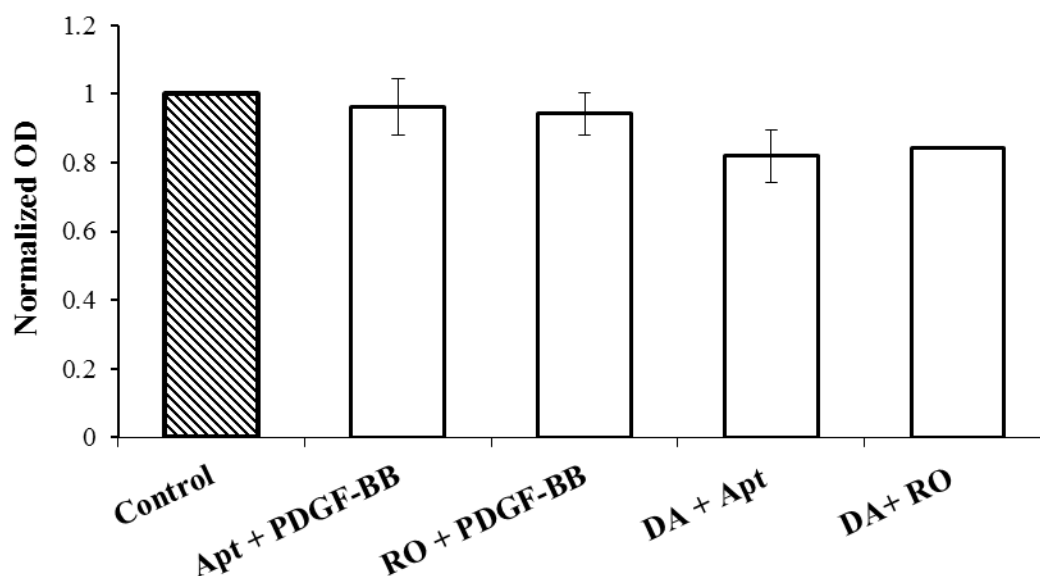
3.6 การหาค่าพลังงานอิสระสำหรับการยึดจับ

อันตรกิริยาระหว่างแอฟทาเมอร์และฟิซีเจเอฟ-บีบีจะถูกจำลองโดยโมเลกุลาร์ไดนามิกส์ (molecular dynamics simulation) ซึ่งข้อมูลของโครงสร้างผลึกของสารเชิงซ้อนระหว่างฟิซีเจเอฟ-บีบีและแอฟทาเมอร์จะได้จากฐานข้อมูลของโปรตีน (protein data bank; code 2VPF) โดยขั้นเริ่มต้นจะไม่มีโมเลกุลของน้ำและไอออนต่างๆปรากฏในระบบที่เตรียมขึ้น การจำลองจะใช้ Amber stimulation package ค่าพลังงานอิสระสำหรับการยึดจับจะคำนวณด้วยวิธี MM-PBSA โดยผลจากการจำลองจะถูกเปรียบเทียบกับข้อมูลที่ได้จากการทดลอง

4. ผลงานวิจัยที่ได้รับ

4.1 ผลของขั้นตอน ELISA ต่ออันตรกิริยาระหว่างแอฟทาเมอร์และโปรตีน

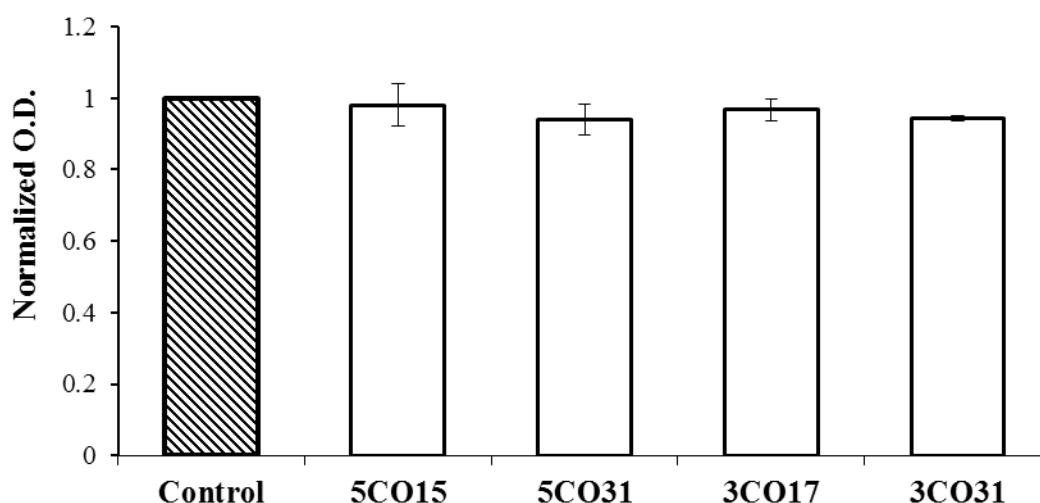
หลักการของการทดลองในตอนนี้คือ การผสมกันระหว่างแอนติบอดีและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ต้องการทดสอบไม่ว่าจะเป็นแอฟทาเมอร์ หรือโมเลกุลควบคุม (RO) ก่อนที่จะตรวจวัดโปรตีนด้วยELISA รูป 4.1 แสดงผลของการรบกวนอันตรกิริยาระหว่างแอฟทาเมอร์และโปรตีนจากแอนติบอดีที่ใช้ในการทำ ELISA พบว่า อันตรกิริยาระหว่างแอนติบอดีและโปรตีนฟิซีเจเอฟ-บีบี ไม่ถูกรบกวนด้วยโอลิโกนิวคลีโอไทด์ ดังเห็นได้จากค่า OD ที่ตรวจวัดได้มีค่าใกล้เคียงกับชุดการทดลองที่ไม่ได้เติม โอลิโกนิวคลีโอไทด์ลงไป การทดลองนี้ช่วยยืนยันความเป็นไปได้ของการใช้ ELISA ในการศึกษาอันตรกิริยาระหว่างแอฟทาเมอร์และโปรตีนฟิซีเจเอฟ-บีบี



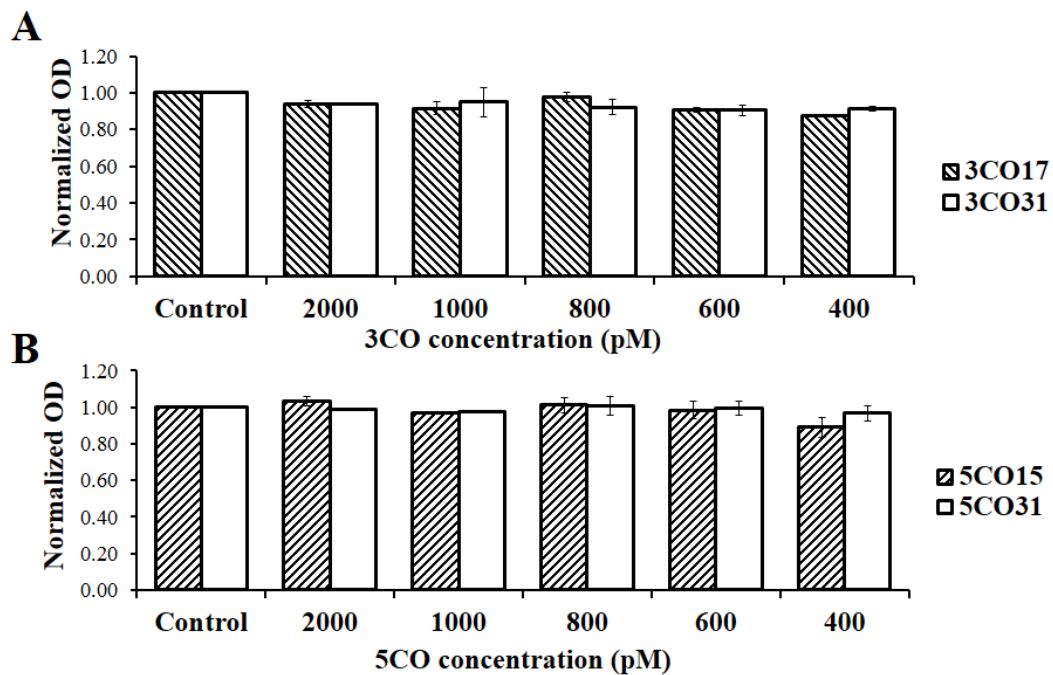
รูป 4.1 ผลของขั้นตอน ELISA ต่ออันตรกิริยาระหว่างแอนติบอดีและโปรตีน Control แสดงโปรตีนฟิตีจีเอพ-บีบีความเข้มข้น 20 pM, DA คือ detection antibody, RO คือ โมเลกุลโอลิโกนิวคลีโอไทด์

4.2 การหาสถานะที่เหมาะสมสำหรับการไฮบริดไดเซชัน

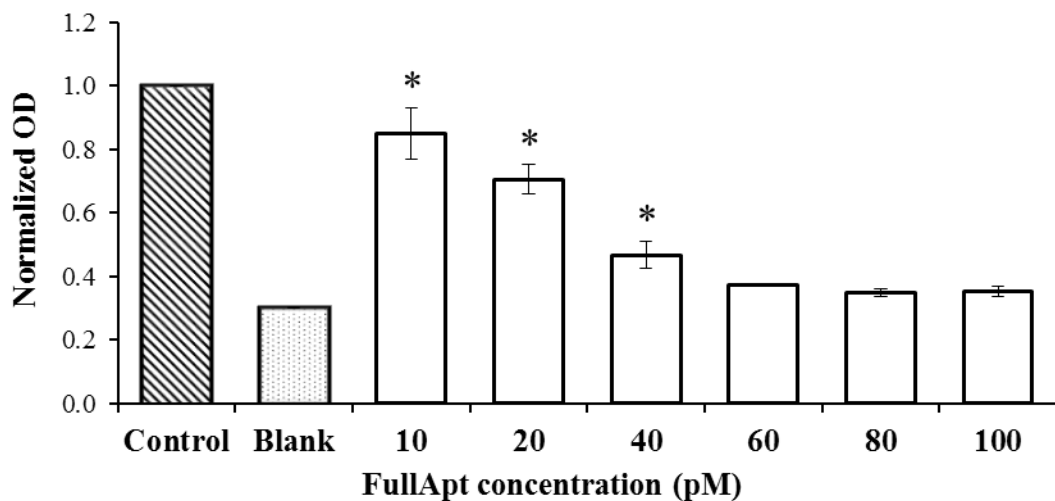
มีข้อควรพิจารณาข้อหนึ่งคือ CO จะมีอันตรกิริยาต่อโปรตีนเป้าหมายหรือไม่ ซึ่งจะมีผลไปรบกวนการไฮบริดไดเซชัน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทดสอบว่า CO สามารถยึดจับได้กับฟิตีจีเอพ-บีบีหรือไม่ โดยผสมฟิตีจีเอพ-บีบีเข้มข้น 20 pM กับ CO สายต่างๆ ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 2000 pM แล้วจึงทำการทดสอบด้วย ELISA CO ที่ทดสอบมีความยาว 15, 17, และ 31 nt หาก CO สามารถยึดจับได้กับฟิตีจีเอพ-บีบีจะทำให้ ค่า OD ที่วัดได้จาก ELISA มีค่าลดลง แต่ปรากฏว่าค่าที่วัดได้จากการทดลองนั้นไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบกับการทดลองที่ไม่ได้เติม CO ดังรูป 4.2 รวมทั้งเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ CO ค่า OD ที่ตรวจวัดได้ก็ไม่เปลี่ยนแปลงดังรูป 4.3 แสดงว่า CO ไม่สามารถยึดจับกับฟิตีจีเอพ-บีบีได้ ดังนั้นจึงสามารถใช้ CO เหล่านี้ในการศึกษาขั้นต่อไปได้



รูป 4.2 ผลของการยึดจับกันระหว่างฟิตีจีเอพ-บีบี และ CO สายต่างๆ



รูป 4.3 ผลของความเข้มข้น CO ต่ออันตรกิริยาระหว่าง CO และ โปรตีนพีดีจีเอฟ-บีบี; (A) CO สำหรับปลายด้าน 5' ของแอฟทาเมอร์ (B) CO สำหรับปลายด้าน 3' ของแอฟทาเมอร์ ชุดการทดลองควบคุมคือตัวอย่างที่มีเฉพาะพีดีจีเอฟ-บีบี



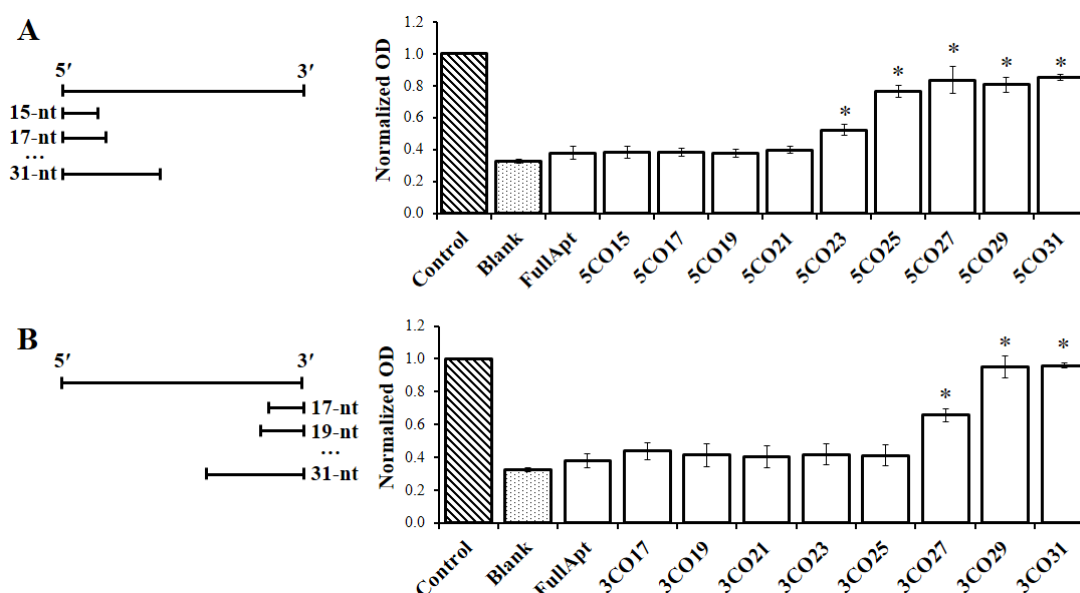
รูป 4.4 ผลของความเข้มข้นแอฟทาเมอร์สายโซ่เริ่มต้น (FullApt) ต่อการรบกวนการยึดจับระหว่างแอนติบอดีและพีดีจีเอฟ-บีบีในการตรวจวัดELISA

นอกจากนี้เพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับโปรตีนที่ใช้ในการทดลอง จึงได้ศึกษาผลของความเข้มข้นแอฟทาเมอร์สายโซ่เริ่มต้น (FullApt) ต่อการรบกวนการยึดจับระหว่างแอนติบอดีและพีดีจีเอฟ-บีบี ดังแสดงในรูป 4.4 พบว่าความสามารถของแอฟทาเมอร์สายโซ่เริ่มต้นในการรบกวนอันตรกิริยาดังกล่าวแปรตามความเข้มข้นของแอฟทาเมอร์ที่เติมลงไป โดยที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ยังคงรบกวนอันตรกิริยาได้

คือ 60 pM จากการทดลองข้างต้นพบว่าอัตราส่วนโดยโมลที่เหมาะสมระหว่าง พีดีจีเอฟ-บีบี: แอพทาเมอร์ สายโซ่เริ่มต้น: CO คือ 1:3:100

4.3 การระบุตำแหน่งที่ใช้ในการยึดจับของแอพทาเมอร์

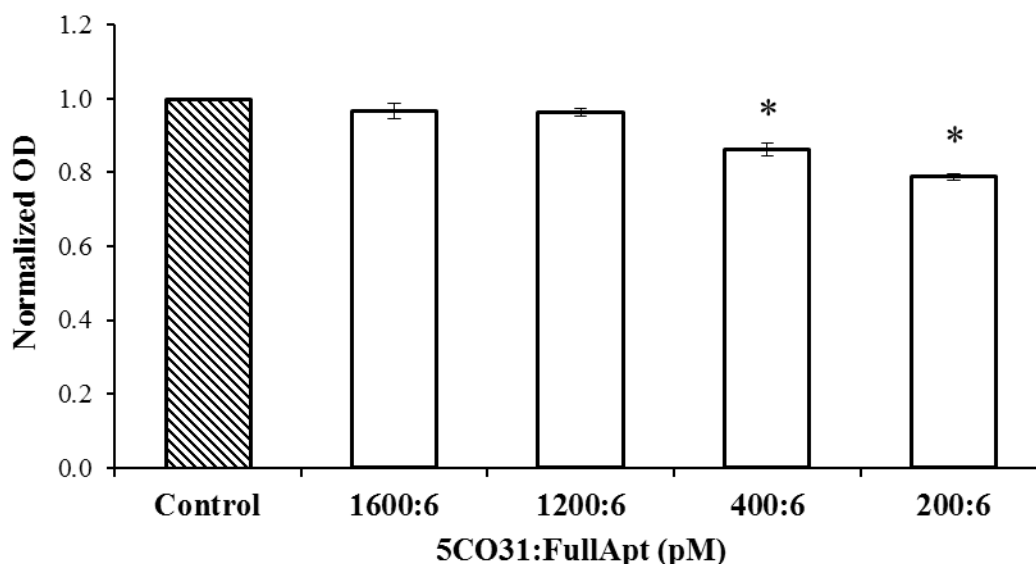
การทดลองเพื่อระบุตำแหน่งที่ใช้ในการยึดจับของแอพทาเมอร์ทำได้โดยการเตรียมไฮบริดไคเซชัน ระหว่างแอพทาเมอร์สายโซ่เริ่มต้นและCOที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมเป็นเวลา 30 นาที ก่อนที่เติมโมเลกุล ที่เตรียมขึ้นข้างต้นลงไปยังสารละลายที่มีพีดีจีเอฟ-บีบี แล้วจึงทำการตรวจวัดด้วย ELISA สำหรับการ ไฮบริดไคเซชันที่ปลาย 5' พบว่าหากความยาวของ CO ที่ใช้มีความยาวน้อยกว่าหรือเท่ากับ 21 nt จะ ส่งผลให้แอพทาเมอร์ที่เกิดไฮบริดไคเซชันนั้นยังคงมีความสามารถในการยึดจับกับพีดีจีเอฟ-บีบี เช่นเดียวกับแอพทาเมอร์สายโซ่เริ่มต้น โดยพิจารณาจากค่า OD ที่ตรวจวัดได้ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกันหรือไม่ เปลี่ยนแปลงดังแสดงในรูป 4.5A นอกจากนี้ เมื่อความยาวของการไฮบริดไคเซชันเพิ่มขึ้นมากกว่า 21 nt ค่า OD ที่วัดได้มีค่าเพิ่มขึ้นเป็นผลมาจากการสูญเสียความสามารถในการยึดจับของแอพทาเมอร์ที่เกิดการ ไฮบริดไคเซชัน จากผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าบริเวณที่ไม่เกี่ยวข้องกับการยึดจับกับพีดีจีเอฟ-บีบีของ แอพทาเมอร์สายโซ่เริ่มต้นอยู่ที่ปลาย 5' โดยมีความยาว 23 nt เมื่อทดลองด้วยขั้นตอนเดียวกับที่ปลาย3' ของแอพทาเมอร์สายโซ่เริ่มต้นพบว่า แอพทาเมอร์สูญเสียความสามารถในการยึดจับเมื่อ CO ที่ใช้ในการ ไฮบริดไคเซชันมีความยาวมากกว่า 27nt ดังแสดงในรูป 4.5B



รูป 4.5 การศึกษาความสามารถในการยึดจับของแอพทาเมอร์หลังจากการไฮบริดไคเซชัน (A) ผลของความยาวของการไฮบริดไคเซชันที่ปลาย 5' (B) ผลของความยาวของการไฮบริดไคเซชันที่ปลาย 3' รูปวาดทางด้านซ้ายมือแสดงภาพรวมของการเกิดไฮบริดไคเซชันทั้งสองปลายของสายโซ่แอพทาเมอร์

นอกจากนี้พบว่าถึงแม้จะใช้ CO ที่ยาวมาก เช่น 5CO31 ที่มีความยาวมากที่สุดในการทำไฮบริดไคเซชันแต่ความสามารถในการยึดจับของแอพทาเมอร์ต่อโปรตีนก็ไม่สูญเสียไปอย่างสมบูรณ์ อันเกิดจากประสิทธิภาพของการไฮบริดไคเซชันยังไม่สมบูรณ์ เพื่อยืนยันสมมติฐานดังกล่าวจึงได้ศึกษาผลของอัตราส่วนโดยโมลของแอพทาเมอร์และ CO ต่ออันตรกิริยาการยึดจับ การเพิ่มขึ้นของอัตราส่วนโดยโม

ดังกล่าวจะเป็นแรงผลักดันให้เกิดไฮบริดไคเซชันอย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยพบว่าเมื่ออัตราส่วนโดยโมลมีค่าถึง 1200:6 จะเกิดการไฮบริดไคเซชันอย่างสมบูรณ์ ส่งผลให้แอฟทาเมอร์สูญเสียความสามารถในการยึดจับอย่างสมบูรณ์ดังเช่นที่ค่า OD ที่วัดได้มีค่ากลับคืนมาใกล้เคียงกับค่า OD ที่วัดได้จากชุดการทดลองควบคุมดังแสดงในรูป 4.6



รูป 4.6 ผลของอัตราส่วนโดยโมลของแอฟทาเมอร์และ CO ต่อประสิทธิภาพของการไฮบริดไคเซชัน

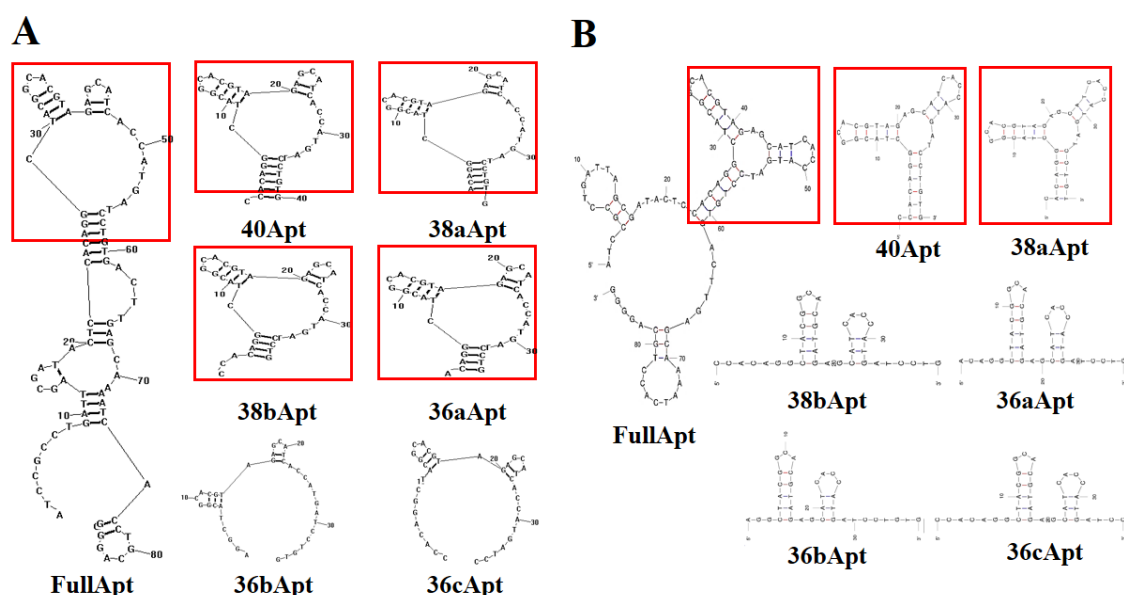
การไฮบริดไคเซชันแอฟทาเมอร์ด้วย CO ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในความสามารถในการยึดจับของแอฟทาเมอร์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการดังกล่าวต่อโปรตีนเป้าหมาย โดยที่เมื่อความยาวของไฮบริดไคเซชันเพิ่มขึ้นทำให้โครงสร้างของโมดูลแอฟทาเมอร์เปลี่ยนไปยังผลให้ความสามารถในการยึดจับโปรตีนสูญเสียไปด้วย สามารถแบ่งสายโซ่เริ่มต้นของแอฟทาเมอร์จากการรบกวนการยึดจับด้วย CO ออกเป็นสามบริเวณ คือ 1) บริเวณที่ไม่กระทบต่อการยึดจับ 2) บริเวณที่กระทบต่อการยึดจับในระดับปานกลาง และ 3) บริเวณที่ทำให้สูญเสียการยึดจับอย่างสมบูรณ์ โดยที่ปลาย 5' บริเวณดังกล่าวอยู่ความยาวของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ 21, 23, และ 25 nt ตามลำดับ ส่วนที่ปลาย 3' อยู่ที่ 25, 27 และ 29 nt ตามลำดับ ถัดจากนี้โมเลกุลแอฟทาเมอร์จะถูกตัดให้สั้นลงและสอดคล้องต่อบริเวณดังกล่าว โดยมีชื่อดังนี้ 36aApt; 36bApt; 36cApt; 38aApt; 38bApt และ 40Apt แล้วจึงทดสอบความสามารถในการยึดจับของแอฟทาเมอร์เหล่านี้ในลำดับถัดไป

4.4 การทดสอบความสามารถในการยึดจับของแอฟทาเมอร์สายสั้น

ก่อนที่จะทดสอบความสามารถในการยึดจับของแอฟทาเมอร์สายสั้นโดยการทดลองนั้น จะทำการศึกษาโครงสร้างระดับทุติยภูมิของแอฟทาเมอร์โดยโปรแกรม RNAstructure และ m-fold ซึ่งข้อมูลที่ได้จะเป็นแนวทางในการคาดคะเนอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลที่เกิดขึ้น หากโครงสร้างที่ได้แตกต่างจากแอฟทาเมอร์สายโซ่เริ่มต้น แอฟทาเมอร์สายสั้นที่แสดงโครงสร้างดังกล่าวก็อาจจะสูญเสียความสามารถใน

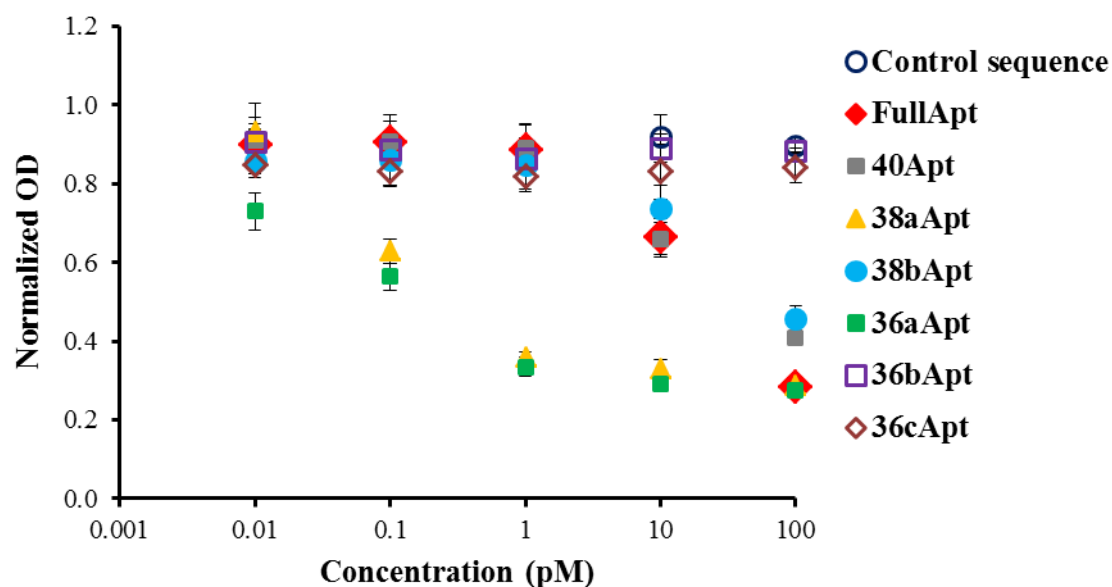
การยัดจับ แต่หากโครงสร้างเหมือนกับแอฟทาเมอร์ไซ้เริ่มต้นแอฟทาเมอร์ก็ยังคงมีความสามารถในการยัดจับกับโปรตีนเป้าหมาย

จากโครงสร้างที่แสดงในรูป 4.7 แสดงให้เห็นว่าโปรแกรมที่ใช้ทั้งสองโปรแกรมให้โครงสร้างทุติยภูมิที่แตกต่างกัน โดยที่โปรแกรม RNAstructure แสดงโครงสร้างของแอฟทาเมอร์ สายไซ้40Apt, 38aApt, 38bApt, และ 36aApt เหมือนโครงของแอฟทาเมอร์สายไซ้เริ่มต้น ในขณะที่สายไซ้ 36bApt, 36cApt มีโครงสร้างต่างจากแอฟทาเมอร์สายไซ้เริ่มต้น ทำให้มีความเป็นไปได้ว่า 36bApt, 36cApt จะไม่ยัดจับกับพีดีจีเอฟ-บีบี ส่วนโปรแกรม m-fold นั้น มีเพียง 40Apt, และ 38aAptเท่านั้นที่มีโครงสร้างเหมือนแอฟทาเมอร์สายไซ้เริ่มต้น โดยที่สายไซ้อื่นมีโครงสร้างทุติยภูมิที่แตกต่างออกไป



รูป 4.7 โครงสร้างทุติยภูมิของ FullApt และ แอฟทาเมอร์สายสั้น (A) คาดคะแนนโดย RNAstructure. (B) คาดคะแนนโดย m-fold แสดงโครงสร้างที่มีค่าพลังงานต่ำสุด กรอบสี่เหลี่ยมแสดงบริเวณที่มีการเปลี่ยนแปลงในกระบวนการ SELEX

การทดสอบความสามารถในการยัดจับของแอฟทาเมอร์สายสั้นทำได้โดยผสมแอฟทาเมอร์ดังกล่าวเข้ากับโปรตีนพีดีจีเอฟ-บีบีก่อนที่จะนำโปรตีนดังกล่าวผสมเข้ากับแอนติบอดีและตรวจวัดโดยELISA โดยมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแอฟทาเมอร์ในช่วง 0.01-100 pM ผลการทดลองในรูป3.8 แสดงให้เห็นว่าค่า OD ที่วัดได้มีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของแอฟทาเมอร์สายไซ้ FullApt, 40Apt, 38aApt, 38bApt และ 36aApt เพิ่มขึ้น ในขณะที่ 36bApt และ 36cApt เมื่อความเข้มข้นเปลี่ยนไปไม่ส่งผลต่อค่า OD ที่วัดได้ การลดลงของค่าOD แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการยัดจับกับโปรตีนของแอฟทาเมอร์ข้างต้น โดยเฉพาะสายไซ้ 38aApt และ 36aApt แสดงความสามารถในการยัดจับโปรตีนที่ความเข้มข้นต่ำถึง 1 pM แสดงถึงความแข็งแรงในการยัดจับ



รูป 4.8 ผลของความเข้มข้นของแพพทาเมอร์ต่อความสามารถในการยึดจับโปรตีนพีดีจีเอฟ-บีบี

ตาราง 4.1 ค่าคงที่การแตกตัว (dissociation constants ($K_{D,app}$)) ของแพพทาเมอร์สายโซ่ต่างๆ

Entries	Dissociation constants $K_{D,app}$ (pM)
FullApt	5.33
40Apt	5.92
38aApt	0.094
38bApt	7.03
36aApt	0.036
36bApt	ND
36cApt	ND
Control sequence	ND

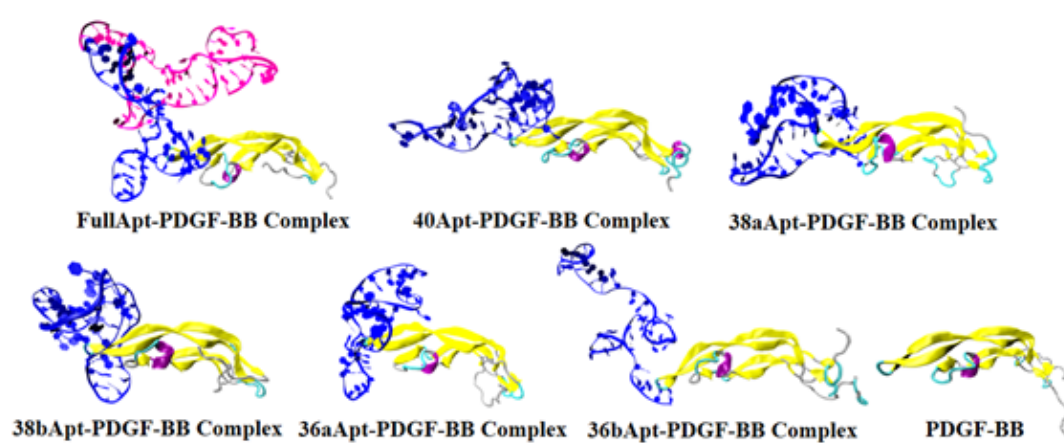
*ND: $K_{D,app}$ was not able to be determined

ความแข็งแรงของการยึดจับของแพพทาเมอร์สายสั้นสามารถประเมินได้จากค่าคงที่ของการแตกตัว (dissociation constant ($K_{D,app}$)) ดังแสดงในตาราง 4.1 พบว่า แพพทาเมอร์สาย 38aApt และ 36aApt มีความแข็งแรงในการยึดจับมากกว่าแพพทาเมอร์สายเริ่มต้นอยู่ประมาณ 60 และ 150 เท่า ตามลำดับ ในขณะที่ 40Apt และ 38bApt มีความแข็งแรงในการยึดจับน้อยกว่า สาเหตุอาจเกิดจากนิวคลีโอไทด์ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการยึดจับไปรบกวนความเสถียรของโครงสร้างแพพทาเมอร์ส่งผลทำให้รูปร่างที่เหมาะสมต่อ

การยึดจับสูญหายไปบางส่วน ส่งผลทำให้ความแข็งแรงในการยึดจับลดลง ผลดังกล่าวเห็นได้ชัดในกรณี 36bApt และ 36cApt ซึ่งไม่สามารถจับกับโปรตีนได้ นอกจากนี้ผลการทดลองนี้ยังสอดคล้องกับการคาดคะเนโครงสร้างที่ได้จาก RNAstructure จากการศึกษาถึงขั้นนี้แสดงให้เห็นว่าหลักการไฮบริดไดเซชันสามารถนำมาใช้ระบุหาตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการยึดจับกับโปรตีนฟิตีจีเอฟ-บีบีได้

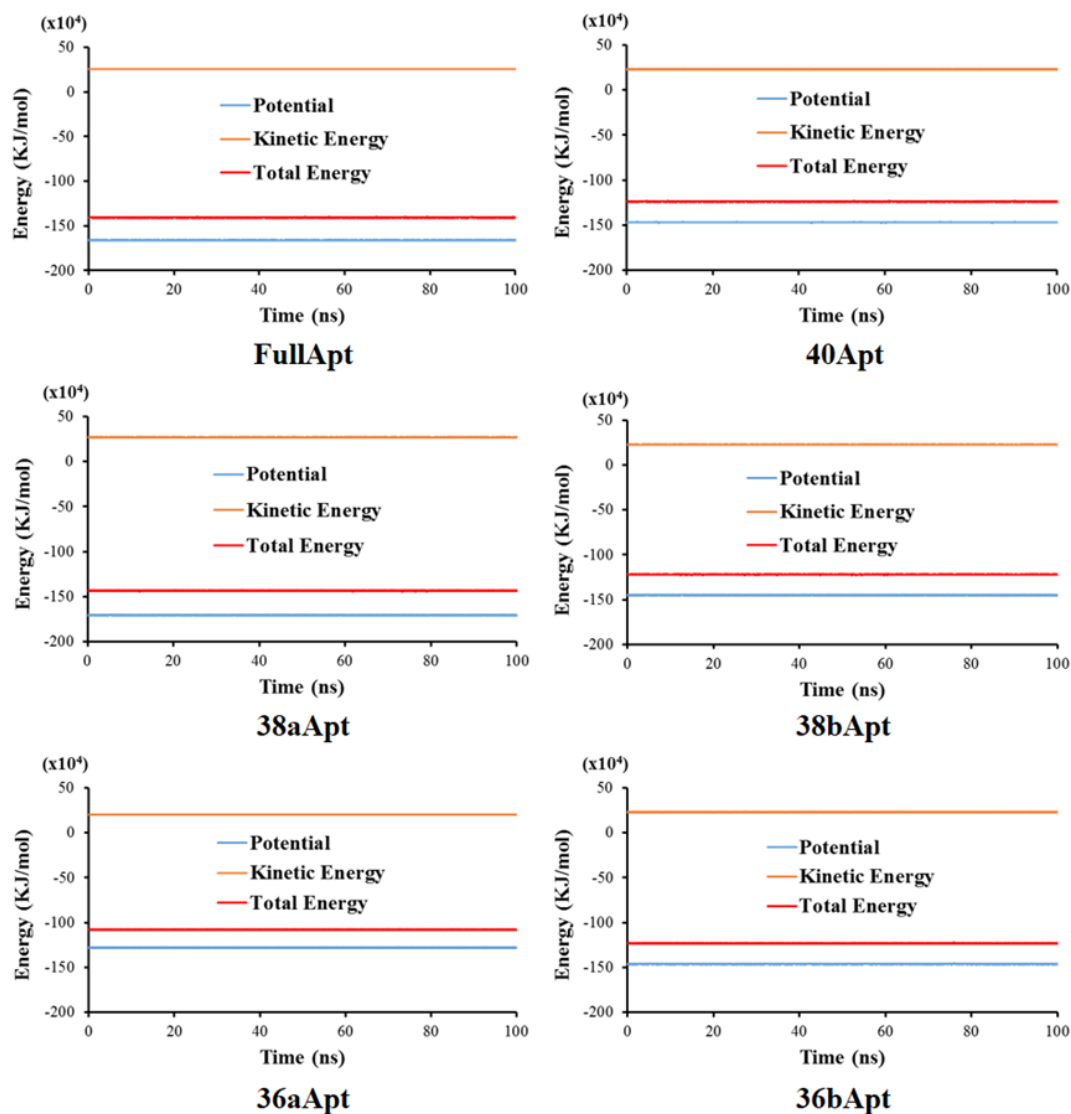
4.5 ศึกษากระบวนการสำหรับการคำนวณทาง Molecular Dynamics Simulation เพื่อศึกษาอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุล

โครงสร้างระดับทุติยภูมิและตติยภูมิของแอฟทาเมอร์ถูกจำลองขึ้นด้วยโปรแกรม RNAstructure และ RNAComposer ตามลำดับ ส่วนโครงสร้างของฟิตีจีเอฟ-บีบีถูกจำลองขึ้นโดยอาศัยข้อมูลทางคริสตัลจากฐานข้อมูลโปรตีน (PDB code:3MJG) ตามด้วยการใช้โปรแกรม AUTODOCK4 ในการทำนายตำแหน่งการยึดจับกันของทั้งสองโมเลกุล ผลการจำลองโครงสร้างดังกล่าวแสดงไว้ในรูปที่ 4.9 บริเวณสีชมพูแสดงถึงตำแหน่งในโมเลกุลแอฟทาเมอร์ที่ใช้จับกับโปรเมอร์



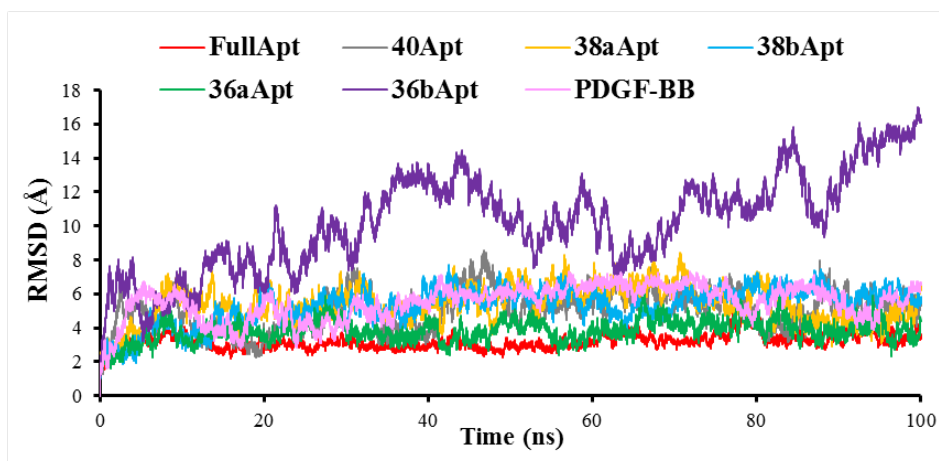
รูปที่ 4.9 รูปร่างและตำแหน่งที่ยึดจับกันที่จุดเริ่มต้นของการจำลอง ของโมเลกุลโปรตีนและแอฟทาเมอร์

ภายหลังจากจำลองโครงสร้างของฟิตีจีเอฟ-บีบี และแอฟทาเมอร์ โมเลกุลทั้งสองถูกนำมาใส่กรอบของการจำลองทาง Molecular Dynamics ที่มีรูปร่างเป็น โตเดคาฮีดรอล โดยประจุในระบบจะถูกปรับให้สมดุลด้วยไอออนของโซเดียมและคลอไรด์ และตั้งค่าอุณหภูมิและความดันของระบบการจำลองให้คงที่ และทำการติดตามค่าพลังงานของระบบ ดังรูปที่ 4.10 พบว่าค่าพลังงานโดยรวม พลังงานศักย์ พลังงานจลน์ มีค่าคงที่ตลอดช่วงระยะเวลา 100 ns ที่ทำการจำลองแสดงให้เห็นว่าระบบที่ทำการศึกษาดังกล่าวมีความเสถียร อยู่ในสภาวะสมดุล และไม่มีการหยุดชะงักหรือระบบล่มในระหว่างการศึกษาซึ่งเหมาะแก่การนำผลมาวิเคราะห์ในขั้นต่อไป



รูปที่ 4.10 พลังงานต่างๆในระบบ

ผลจากการวิเคราะห์เส้นทางการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดังกล่าวพบว่า ค่าเฉลี่ยกำลังสองของการเบี่ยงเบนระยะทาง (root mean square deviation, RMSD) ของ 36bApt มีค่าอยู่ระหว่าง 3-14 Å ซึ่งมีค่ามากที่สุดดังแสดงในรูปที่ 4.11 แสดงว่า โมเลกุลของ 36bApt มีการเคลื่อนไหวอย่างเป็นอิสระมากกว่า แอพทาเมอร์โมเลกุลอื่นๆอันเนื่องมาจาก 36bApt มีอันตรกิริยาการยึดจับต่อโปรตีนน้อยที่สุด



รูปที่ 4.11 ค่าเฉลี่ยกำลังสองของการเบี่ยงเบนระยะทาง ของแอฟทาเมอร์และโปรตีน

4.6 คำนวณพลังงานอิสระของการยึดจับกันระหว่างโปรตีนพีดีจีเอฟ-บีบี และแอฟทาเมอร์สายโซ่สายสั้นที่ได้คัดเลือกไว้

ข้อมูลจากการทดลองอิลิซานามาใช้คำนวณพลังงานอิสระของการยึดจับ (ΔG_{exp}) โดยใช้สมการ (1)

$$\Delta G_{exp} = -RT \ln K_{D,app} \quad (1)$$

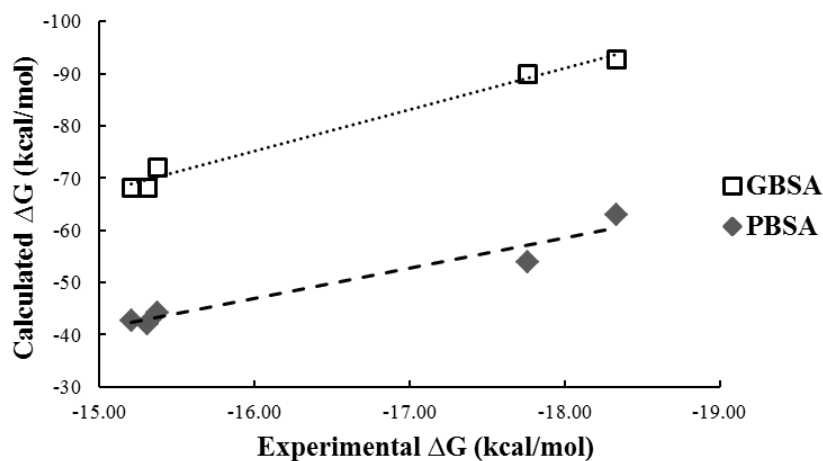
โดย $T = 298 \text{ K}$, R คือค่าคงที่ของแก๊ส, $K_{D,app}$ คือค่าคงที่ของการแตกตัววัดได้จากการทดลองอิลิซา ส่วนข้อมูลจากการจำลองด้วย molecular dynamics ผ่านภาพเส้นทางการเคลื่อนที่ของโมเลกุลจำนวน 1000 ภาพ จาก ช่วง 50 ns ท้ายของการจำลอง จะนำมาคำนวณพลังงานอิสระด้วยวิธีการ MM/PBSA และ MM/GBSA ดังแสดงผลการคำนวณในตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.12

ตารางที่ 4.2 พลังงานอิสระในการยึดจับของแอฟทาเมอร์ชนิดต่างๆ

Entries	$K_{D,app}$ (pM)	ΔG_{exp} (kcal/mol)	ΔG_{PB} (kcal/mol)	ΔG_{GB} (kcal/mol)
FullApt	5.33	-15.37	-44.28 ± 14.99	-72.09 ± 10.36
40Apt	5.92	-15.31	-42.14 ± 19.15	-68.19 ± 13.29
38aApt	0.094	-17.76	-54.05 ± 12.38	-90.13 ± 10.83
38bApt	7.03	-15.21	-42.82 ± 12.67	-68.18 ± 12.15
36aApt	0.036	-18.33	-63.18 ± 17.56	-92.91 ± 11.08
36bApt	-	-	-26.70 ± 18.16	-42.35 ± 18.88

36aApt มีค่าพลังงานอิสระที่คำนวณได้จากข้อมูลการทดลองและข้อมูลจากการจำลองทางคอมพิวเตอร์ที่ต่ำที่สุด ค่าพลังงานยิ่งต่ำแสดงให้เห็นว่าอันตรกิริยาการยึดจับเกิดขึ้นได้ดีกว่า หรือแข็งแรงกว่า ส่วน 36bApt มีค่าพลังงานอิสระที่คำนวณได้จากข้อมูลการจำลองทางคอมพิวเตอร์มากที่สุดแสดงถึง

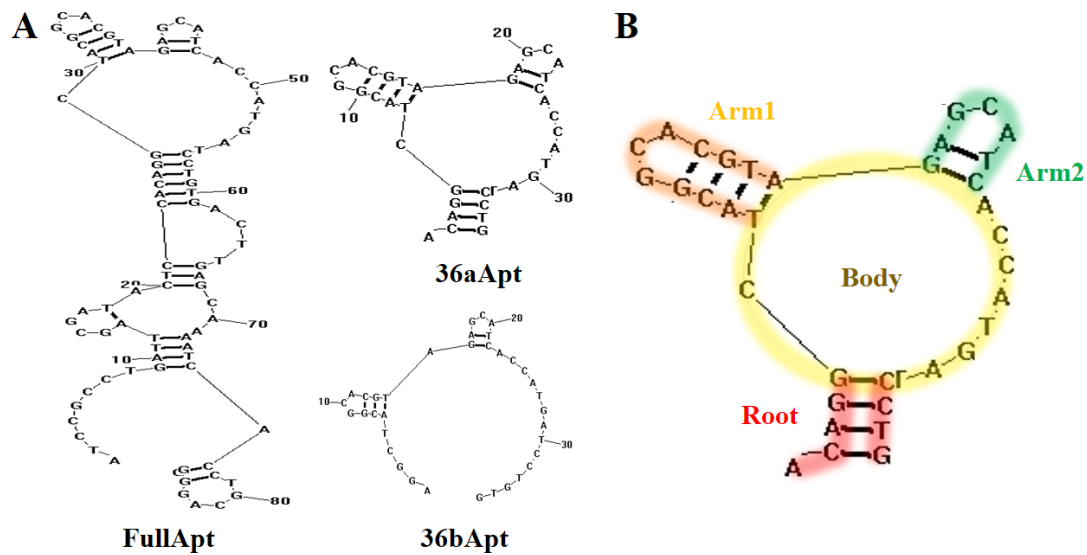
อันตรกิริยาการยึดจับเกิดขึ้นได้ยากกว่า หรือไม่แข็งแรง ส่วนข้อมูลจากการทดลองนั้นไม่สามารถคำนวณค่าพลังงานอิสระของ 36bApt ได้เนื่องจาก 36bApt ไม่สามารถยึดจับกับโปรตีนฟิดิจีเอฟ-บีบีได้ นอกจากนี้ทั้งข้อมูลจากการทดลองและการจำลองทางคอมพิวเตอร์ยังสัมพันธ์กันเป็นอย่างดี ดังแสดงด้วยค่า R^2 โดยเมื่อเปรียบเทียบผลจากวิธีการ MM/PBSA และ MM/GBSA กับค่าที่ได้จากการทดลองพบว่า มีค่า R^2 เท่ากับ 0.9435 และ 0.9868 ตามลำดับ ผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่านิวคลีโอไทด์บางตำแหน่งในโมเลกุลแอฟทาเมอร์มีบทบาทต่ออันตรกิริยาการยึดจับกับโมเลกุลเป้าหมาย



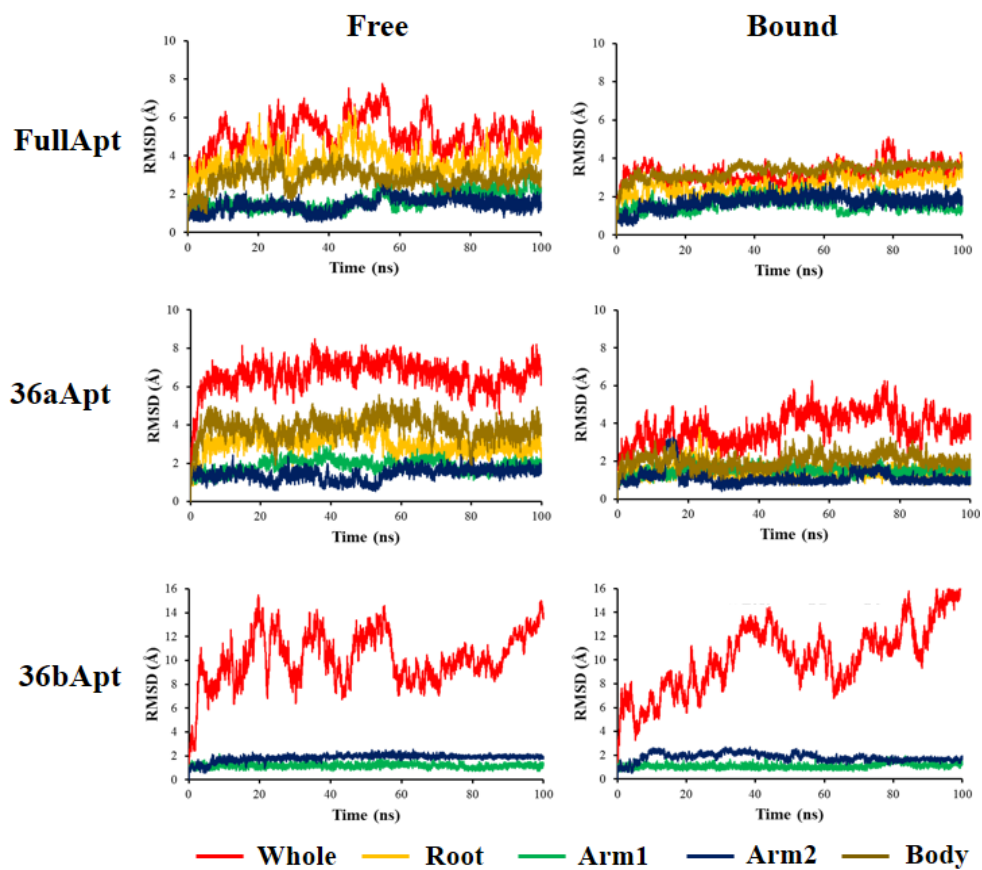
รูปที่ 4.12 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าพลังงานอิสระที่คำนวณได้จากข้อมูลการทดลองและข้อมูลจากการจำลองทางคอมพิวเตอร์

4.7 การศึกษาอันตรกิริยาระหว่างแอฟทาเมอร์และฟิดิจีเอฟ-บีบี

การวิเคราะห์ทราเจกทอรีของสารเชิงซ้อนระหว่างแอฟทาเมอร์และฟิดิจีเอฟ-บีบี ช่วยให้เข้าใจอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลดังกล่าวในรายละเอียดมากขึ้น โดยประเมินจากการจัดเรียงตัวของโครงสร้างโมเลกุลแอฟทาเมอร์ในสถานะที่เป็นโมเลกุลอิสระและสถานะที่เกิดการยึดจับกับโมเลกุลโปรตีน โครงสร้างของแอฟทาเมอร์จะแบ่งออกเป็นบริเวณต่างๆดังต่อไปนี้ โครงสร้างระดับทุติยภูมิของแอฟทาเมอร์ 36aApt ประกอบไปด้วยสเต็ม (stem) 3 บริเวณ และ แฮร์พินลูป (hair pin loop) 2 บริเวณ ซึ่งมีลักษณะใกล้เคียงกับ FullApt ส่งผลให้ 36aApt สามารถยึดจับกับโมเลกุลเป้าหมายได้ (รูปที่ 4.13) ในขณะเดียวกัน 36bApt ไม่พบโครงสร้างในลักษณะดังกล่าว ส่งผลให้ความสามารถในการยึดจับสูญเสียไป



รูปที่ 4.13 (A) โครงสร้างระดับทุติยภูมิของแอพทาเมอร์ที่ทำนายโดยโปรแกรม RNAstructure (B) รูปแสดงแต่ละบริเวณของโมเลกุลแอพทาเมอร์



รูปที่ 4.14 ค่า RMSD ของทั้งโมเลกุลแอพทาเมอร์และแต่ละส่วนของโมเลกุล ในสภาวะอิสระและในสภาวะที่มี ฟิตซีเอฟ-บีบี

จากรูปที่ 4.14 ผลของโมเลกุลาร์ไดนามิกส์แสดงให้เห็นว่าค่า Root mean square deviation (RMSD) ของทั้งโมเลกุลแอฟทาเมอร์ (FullApt และ 36aApt) และ ค่าของแต่ละบริเวณในโมเลกุลในสภาวะที่มีการยึดจับกับโมเลกุลเป้าหมายจะมีค่าน้อยกว่าค่า RMSD ของโมเลกุลดังกล่าวเมื่ออยู่ในสภาวะอิสระ ในกรณีของ FullApt มีค่า RMSD อยู่ในช่วง 2-5 Å เมื่อเกิดการยึดจับ และอยู่ในช่วง 2-6 Å เมื่ออยู่ในสภาวะอิสระ ที่เห็นการเปลี่ยนแปลงได้ชัดคือกรณี 36aApt ซึ่งมีค่า RMSD อยู่ในช่วง 6-8 Å เมื่ออยู่ในสภาวะอิสระ และ 3-5 Å เมื่อเกิดการยึดจับ ในกรณีของ 36bApt นั้นมีค่า RMSD มีค่าไม่ต่างกันทั้งในสภาวะอิสระและในสภาวะที่มีฟิสิกส์เอฟ-บีบีอยู่รวมถึงค่ามีความแปรปรวนค่อนข้างมากอันเป็นผลมาจากการที่ 36bApt มีอันตรกิริยาการยึดจับต่อ ฟิสิกส์เอฟ-บีบี ไม่แข็งแรง โดยค่าเฉลี่ยของ RMSD ของแอฟทาเมอร์ดังกล่าวถูกแสดงไว้ในตารางที่ 4.3 ข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าโครงสร้างของแอฟทาเมอร์จะมีความเสถียรมากขึ้นเมื่อเกิดการยึดจับกับฟิสิกส์เอฟ-บีบี

ตารางที่ 4.13 ค่าเฉลี่ย RMSD ของทั้งโมเลกุลแอฟทาเมอร์และแต่ละส่วนของโมเลกุล ในสภาวะอิสระและในสภาวะที่มี ฟิสิกส์เอฟ-บีบี

		Free	Bound
		Mean $\pm$ SD (Å)	Mean $\pm$ SD (Å)
FullApt	Whole	5.11 $\pm$ 0.92	3.20 $\pm$ 0.45
	Root	3.79 $\pm$ 0.68	2.57 $\pm$ 0.44
	Arm1	1.67 $\pm$ 0.46	1.57 $\pm$ 0.32
	Arm2	1.45 $\pm$ 0.37	1.73 $\pm$ 0.36
	Body	2.87 $\pm$ 0.51	3.33 $\pm$ 0.37
36aApt	Whole	6.62 $\pm$ 0.76	3.80 $\pm$ 0.80
	Root	3.04 $\pm$ 0.57	1.47 $\pm$ 0.34
	Arm1	1.88 $\pm$ 0.31	1.51 $\pm$ 0.22
	Arm2	1.43 $\pm$ 0.32	1.13 $\pm$ 0.40
	Body	3.85 $\pm$ 0.58	2.01 $\pm$ 0.37
36bApt	Whole	10.18 $\pm$ 2.14	10.24 $\pm$ 2.82
	Root	-	-

จากการวิเคราะห์ในแต่ละส่วนของแอฟทาเมอร์พบว่าตรงส่วนที่เป็น ราก (root) และบอดี (body) มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการจัดเรียงโครงสร้างอย่างมาก โดยเฉพาะโมเลกุล FullApt ที่ค่า RMSD

เปลี่ยนแปลงมากในบริเวณรูล คือจาก $3.79 \pm 0.68 \text{ \AA}$ ไปเป็น 2.57 ± 0.44 จากสภาวะอิสระไปเป็นมีพีดีจีเอฟ-บีบีปรากฏอยู่ในส่วนที่เป็น arm1 และ arm2 นั้นไม่มีการเปลี่ยนแปลง ในกรณีของ 36aApt การจัดเรียงโครงสร้างไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก ซึ่งแสดงให้เห็นว่า 36aApt มีโครงสร้างที่เสถียรมากกว่า FullApt ส่วนข้อมูลRMSDของ 36bApt นั้นไม่เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญเนื่องจากโมเลกุลดังกล่าวไม่มีอันตรกิริยายึดจับกับพีดีจีเอฟ-บีบี

5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลจากโครงการดังกล่าวสามารถระบุตำแหน่งที่ใช้ในการยึดจับของแอฟทาเมอร์ชนิดพีดีจีเอฟ-บีบีได้ นอกจากนี้แอฟทาเมอร์ดังกล่าวถูกทำให้มีโมเลกุลขนาดเล็กลงได้ กระบวนการไฮบริดไดซ์เซชันช่วยให้เข้าใจบทบาทของแต่ละนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลแอฟทาเมอร์ว่าเกี่ยวข้องกับการจัดเรียงรูปร่างโมเลกุลซึ่งส่งผลต่ออันตรกิริยาการยึดจับอย่างไร ผลการทดลองพบว่าสามารถตัดปลายด้าน 5' ได้ 25 นิวคลีโอไทด์ และตัดปลายด้าน 3' ได้ 29 นิวคลีโอไทด์ ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาโครงสร้างทุติยภูมิของแอฟทาเมอร์ ความสามารถในการยึดของ 36aApt ต่อโมเลกุลพีดีจีเอฟ-บีบี ดีกว่าแอฟทาเมอร์ดั้งเดิมซึ่งยืนยันทั้งจากผลทางภูมิคุ้มกันวิทยาและการจำลองทางโมเลกุลาร์ไดนามิกส์ การที่แอฟทาเมอร์มีความสามารถในการยึดจับมากขึ้นเนื่องจากได้กำจัดเอานิวคลีโอไทด์ที่ไปรบกวนอันตรกิริยาออกไป จากการคำนวณค่าพลังงานอิสระพบว่ามีค่าที่สอดคล้องกันทั้งจากการทดลองทางภูมิคุ้มกันวิทยาและการจำลองทางโมเลกุลาร์ไดนามิกส์ และพบว่าบริเวณที่สำคัญต่อการยึดจับของแอฟทาเมอร์คือ Stem I, Stem II, Stem III, และ center loop ผลการศึกษทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าวิธีการที่พัฒนาขึ้นนี้เชื่อถือได้ว่าสามารถใช้ระบุตำแหน่งในการยึดจับของแอฟทาเมอร์ได้ และสามารถใช้เป็นวิธีการมาตรฐานในการศึกษารายละเอียดในการยึดจับสำหรับโมเลกุลอื่นๆได้

6. ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

1. เพิ่มความเข้มข้นของโมเลกุลดีเอ็นเอแอฟทาเมอร์
2. ปรับสภาวะของปัจจัยต่างๆที่เกี่ยวข้อง เช่น สารละลายบัฟเฟอร์, ความเข้มข้นของโมเลกุลต่างๆ ให้มีความเหมาะสมในการยึดจับกับโมเลกุลเป้าหมายได้มากขึ้น
3. เลือกใช้โมเลกุลแอฟทาเมอร์ตัวอื่นที่มีความจำเพาะกับโมเลกุลโปรตีนวีโอจีเอฟ
4. ใช้โมเลกุลอาร์เอ็นเอแอฟทาเมอร์แทนโมเลกุลดีเอ็นเอแอฟทาเมอร์

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่มที่ เลขที่ และหน้า) หรือผลงานตามที่คาดไว้ในสัญญาโครงการ
 - Cong Quang Vu, Pichayanoot Rotkrua, Yuthana Tantirungrotechai, and **Boonchoy Soontornworajit***, Oligonucleotide Hybridization Combined with Competitive Antibody Binding for the Truncation of High-Affinity Aptamer. *ACS Combinatorial Science* **2017**, (revision).
 - Vu, Q.C.; Tantirungrotechai, Y.; **Soontornworajit, B.***; Rotkrua, P., Truncation of PDGF-BB Aptamer by Secondary Structural Analysis and Immunoassay. *International Journal of Pharma Medicine and Biological Sciences* **2016**, 5(1), 86-90.
2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์
 - เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)
มีมหาบัณฑิตที่สำเร็จการศึกษาจากการทำวิจัยภายใต้ขอบเขตของโครงการวิจัยนี้จำนวน 1 คน คือ Mr.Cong Quang Vu
มีนักศึกษาปริญญาโทกำลังดำเนินการทำวิจัยต่อยอดจากโครงการวิจัยนี้จำนวน 1 คน คือ นางสาว สุรราภร แซ่ลิ้ม
3. การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ
 - Quang Cong Vu, Somrudee Boonpanchantee, Jittrapon Sangkeaw and **Boonchoy Soontornworajit***, Validation of Aptamer Binding Capability, *Conference of Protein Society of Thailand*, **2015**, Bangkok.
 - Vu Quang Cong and **Boonchoy Soontornworajit***, Investigation of binding functionality of aptamer via immunoassay, *Polymer Society of Thailand*, 2015, Bangkok.
 - Cong Quang Vu, Pichayanoot Rotkrua, Yuthana Tantirungrotechai and **Boonchoy Soontornworajit***, Evaluated Binding Energy of Truncated PDGF-BB Aptamer via Molecular Dynamics Simulation, *International Conference on Pharmaceutical Bioinformatics*, **2016**, Pattaya.
 - Vu Quang Cong, Somrudee Boonpanchantee, Jittrapon Sangkeaw, and **Boonchoy Soontornworajit***, Identification of the Binding Functionality of PDGF-BB Aptamer by Using Immunoassay, *PACCON* **2016**, Bangkok.

ภาคผนวก

Identification of the Binding Functionality of PDGF-BB Aptamer by Using Immunoassay

Vu Quang Cong, Somrudee Boonpanchantee, Jitraporn Saengkaew, and Boonchoy Soontornworajit*

Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Thammasat University, Pathumthani 12120, Thailand

*e-mail: sbooncho@tu.ac.th

Abstract:

Platelet-derived growth factor BB (PDGF-BB) is one of potent mitogens for many cancer cells. It also plays significant roles in an angiogenesis which a part of blood vessel formation. The inhibition of PDGF-BB bioactivity via a certain recognition molecule could provide a way to treat both cancer and angiogenesis-related diseases. A DNA aptamer which is capable of specifically binding to PDGF-BB has drawn much interest to the field. However, an original sequence of the aptamer was 86 nucleotides (nt) in length which might not be synthesized and used, practically. It was, therefore, necessary to truncate the sequence but maintain the binding capability of the aptamer. This work was aimed to develop a practical protocol to identify the binding region of the PDGF-BB aptamer in order to shorten the sequence and enhance the binding interaction. A key strategy relied on the hybridization between the original aptamer and complementary sequences (COs) resulting in loss of aptamer binding to the PDGF-BB. Then non-essential nucleotides could be deleted out from the aptamer sequence. The hybridization was performed at both 5' end and 3' end before being incubated with PDGF-BB. The binding capabilities of aptamer-PDGF-BB complexes were investigated by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Experimental results showed that the aptamer lost its binding functionality after forming hybridization with the COs length of 25 nt and 29 nt for 5' end and 3' end, respectively. The aptamer was therefore truncated to 36-40 nt. The truncated aptamers exhibited the higher binding comparing to the full-aptamer sequence with the dissociation constants were 0.036; 0.094; 5.92 and 9.14 pM for 36-nt; 38-nt; 40-nt and full-length aptamer, respectively. Within our results, a protocol relying on hybridization and ELISA could be used to identify the aptamer binding region, and it is expectedly contributed to the disease treatment based on PDGF-BB regulation.

Keywords: aptamer binding region, DNA aptamer, ELISA, PDGF-BB

Truncation of PDGF-BB Aptamer by Secondary Structural Analysis and Immunoassay

Cong Quang Vu, Yuthana Tantirungrotechai, and Boonchoy Soontornworajit

Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Thammasat University, Pathumthani 12120, Thailand

Email: mrq.cong@gmail.com; yt203y@gmail.com; sbooncho@tu.ac.th

Pichayanoot Rotkrua

Division of Biochemistry, Department of Preclinical Science, Faculty of Medicine, Thammasat University, Pathumthani, 12120, Thailand

Email: Pichayanoot@gmail.com

Abstract—Aptamers demonstrate high binding affinity and specificity to their targets and contribute to a number of applications which require recognition molecules. Typically, original sequences of the aptamers comprised of 80 to 100 nucleotides (nt). Only certain nucleotides in each aptamer sequence play a key role in the binding functionality of the aptamers. Thus, each aptamer sequence comprised of two oligonucleotide regions: essential region and non-essential region. In many cases, the non-essential region causes a reduction of binding affinity of the parent aptamer sequence. It was, therefore, necessary to identify the essential region after aptamer screenings. This work aimed to truncate the PDGF-BB aptamer. The strategy relied on analyses of the secondary structure generated by RNAstructure and mfold. Then the truncated sequences were experimentally verified their bindings by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The results indicated that RNAstructure showed the high probability for predicting the secondary structure of aptamer and the truncated 36Apt exhibited an excellent binding capability to the target comparing to the binding capability of the full-length aptamer. Within the results, the secondary structural analysis was a promising strategy not only for aptamer truncation but also for the prediction of oligonucleotide structures.

Index Terms—secondary structure, PDGF-BB aptamer, ELISA

I. INTRODUCTION

Nucleic acid aptamers are short single-stranded oligonucleotides (RNA, DNA or chemically modified RNA, DNA) which are systematically isolated from a randomly combinatorial oligonucleotide library by a well-defined process accomplished in vitro selection. Through the selection, several high-affinity and high-specificity aptamers have been selected against a wide range of targets including small inorganic and organic molecules (K^+ , Hg^{2+} , ATP, ethanolamine, etc.), large biomolecules (peptides and proteins), and even supramolecular complexes (viruses, bacteria or cells) [1], [2]. Aptamers had tremendously contributed to a wide range of application due to their advantages as following.

First, due to the robustness of the phosphodiester backbone, aptamers could be able to withstand harsh biological or chemical conditions while antibodies or proteins are denatured easily and irreversibly [3]. Second, the aptamers exhibit high binding affinity, and their dissociation constants could be consequently achieved to picomolar – femtomolar scales [4]. Third, because the aptamer generation is accomplished in vitro selection, the aptamers have been claimed as less immunogenic or toxic molecules [5]. Possession of these characteristics makes the aptamers as rising-star molecules in several fields, especially therapeutic [6]-[8] and diagnostic [9]-[11].

The aptamers were normally screened by a well-established process called Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX). To perform the SELEX, a library containing a number of single-stranded oligonucleotides with random sequences was used. Typically, each oligonucleotide sequence comprised of a randomized nucleotide region and two fixed nucleotide regions. The randomized region demonstrated a diversity in the library sequences. The fixed regions were used as primer sites in enzymatic amplification process (i.e. polymerase chain reaction) [12]. After the SELEX, original sequences of the screened aptamer were comprised of 80 to 100 nucleotides including the primer sites. In principle, different nucleotide regions of the screened aptamers played different roles in binding to their targets [13]. In addition, the primer regions would not play roles in binding. Thus, not all of nucleotides in a full-length aptamer played a critical role for binding capabilities. Only certain nucleotides in the full-length aptamers were essential for molecular folding and responded to the binding functionality of the aptamers [14]. The essential nucleotides interacting to the targets were typically 10 – 15 nt in length and displayed as following structures: hairpin loops, G-quartet loops, bulges, or pseudoknots [15]. Other essential nucleotides which did not directly contact to the target also played an important role in supporting the interactions and remaining the structural conformation of the contacting nucleotides which relatively indicated the binding capability. In general, the number of essential nucleotides was approximately 25 –

Manuscript received December 21, 2015; revised February 21, 2016.

40 nt [16]. Consequently, the other nucleotide regions were therefore called non-essential nucleotide regions. In many cases, the non-essential nucleotides might reduce the binding affinity of the full-length aptamer. Therefore, cutting off those nucleotides either does not change or can significantly enhance the binding affinity. Truncation of the aptamer sequences provided additional merits. First, short aptamer sequences were easy to be encapsulated or modified for novel nanostructures and nanomaterial [17]. Second, the aptamer sequences whose lengths were shorter than 60 nt were feasible to synthesize or modify, chemically [18]. It was, therefore, necessary to identify the essential region and to truncate the full-length aptamers after the SELEX.

It has been reported that RNAstructure and mfold software gave out the information of oligonucleotide structures. Since the structures also related to the binding functionality of those oligonucleotides, it was feasible to use this two software as a strategy for aptamer truncation. The prediction of the structure was performed to generate the secondary structure based on dynamic calculation [19], [20]. In order to identify the binding segment, a comparison of similar structures between a given full-length aptamer and shortened sequences was carried out. Then the information relating to the binding region could be evaluated. This technique was successful to identify the binding region of the anti-hPTK7 aptamer [21].

Herein, the truncation of the full-length aptamer that could bind to PDGF-BB was performed by secondary structural analysis using RNAstructure and mfold. After analysis the structural conformation, the full-length sequence was truncated. Those truncated sequences were experimentally verified their binding capabilities by using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

II. MATERIALS AND METHODS

A. Reagents

All of the DNA molecules were purchased from Integrated DNA Technologies (Coralville, IA). Recombinant human platelet-derived growth factor BB (PDGF-BB, MW = 24.6 kDa), anti-human PDGF-BB antibodies, streptavidin-HRP, substrates were purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN). Phosphate buffered saline (PBS) and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Tween 20 was purchased from Bio-Rad laboratories (Hercules, CA).

B. Analysis of Secondary Structure

The secondary structures were generated by using RNAstructure version 5.7 (<http://rna.urmc.rochester.edu/software.html>) and the mfold online web server (<http://unafold.rna.albany.edu>). The most stable structures with the lowest free energy were reported.

C. Investigation of the Binding Functionality

To investigate the binding capabilities of truncated aptamers, the competitive assay was performed by using ELISA. Briefly, capture antibodies were immobilized on

the surface of ELISA strips. Any unoccupied sites on the surface sites were blocked by BSA. Meanwhile, the aptamers incubated with PDGF-BB. After incubation, the solutions containing aptamer and PDGF-BB were transferred into the ELISA strips coated by the capture antibodies. Then, detection antibodies, streptavidin-HRP, and substrate were added into the strip, respectively (as shown in Fig. 1). The optical density of the solutions was measured by the plate reader (Chameleon, Hidex). The $\lambda_{\max}$ was set at 472 nm. The experiments were performed in triplicate.

Finally, the percentage was calculated by using equation:

$$\text{Percentage (\%)} = \frac{OD - OD_0}{OD_c - OD_0} \times 100$$

Whereas: OD is the optical density of samples; OD_0 is the optical density without PDGF-BB (blank); OD_c is the optical density with PDGF-BB only (control).

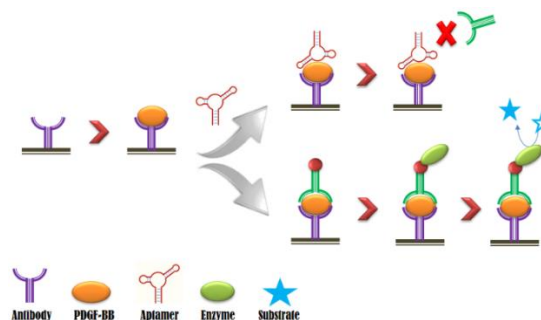


Figure 1. Schematic illustration for testing the binding functionality by ELISA [4].

III. RESULTS AND DISCUSSION

A. Analysis of Secondary Structure

The original sequence of PDGF-BB aptamer was 86 nucleotides comprising of 40 randomized nucleotides and 46 nucleotides for the primer region [22]. At 5'-end, there were 21 nucleotides while at 3'-end, there were 25 nucleotides as the primer sites, respectively. The primer regions were possible points to be deleted out so that after the deletion remaining sequences were able to bind to PDGF-BB. The full-length aptamer, denoted as Full-Apt, was therefore truncated either each side of 5'-end or 3'-end or both ends to generate truncated sequences named as 5N21Apt, 3N25Apt and 40Apt, respectively. The structural analysis suggested that if the essential nucleotides region did not change the conformation, the truncated aptamers would remain the binding functionalities. Furthermore, the binding functionalities were significantly reduced or completely lost when the structural conformation of the essential region was changed. To study the structural analysis, the lowest free energy of Full-Apt, 5N21Apt, 3N25Apt and 40Apt is shown in Fig. 2. Both RNA structure and m fold indicated that the essential nucleotides still remain the initial conformation. It suggested that the binding functionality of these truncated sequences should be comparable to that of the full-length aptamer.

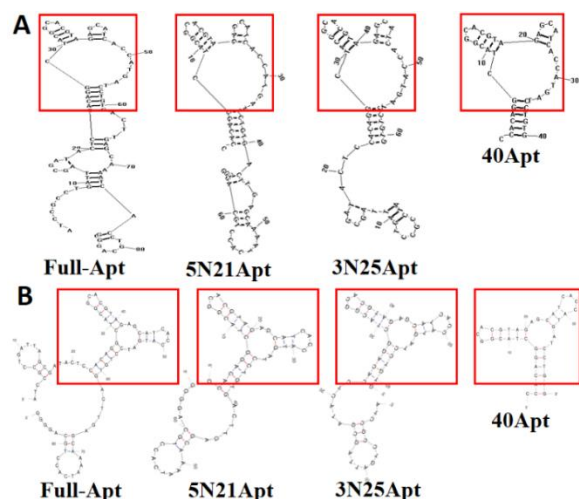


Figure 2. Represented secondary structures of Full-Apt, 5N21Apt, 3N25Apt, and 40Apt aptamers. (A) Using RNAstructure. (B) Using mfold. These structures were generated and displayed the lowest free energy. Rectangular boxes indicate the randomized nucleotides.

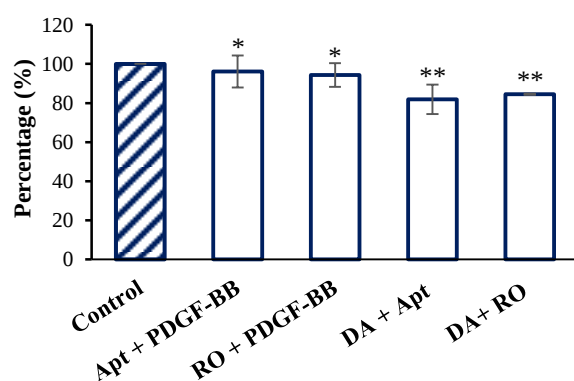


Figure 3. The effect of ELISA procedure on aptamer-protein interaction. 20 pM of PDGF-BB was sequentially incubated with different components. Control displays PDGF-BB (20pM). DA indicates detection antibody. RO indicates random oligonucleotide. Error bars indicate S.D ($n=2$). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ vs. control (two-tailed Student's t -test).

B. Study of the Effect of ELISA Procedure on the Aptamer-Protein Interaction

Prior to performing ELISA, effect of antibodies used in ELISA on the interference of aptamer-PDGF-BB interaction has been investigated (Fig. 3). To investigate the role of capture antibody on the interference, a certain amount of aptamer (Apt) or random oligonucleotide (RO) was incubated with the antibody. Then PDGF-BB was added and ELISA was performed normally. The results indicated that neither Apt nor RO interrupted interaction between PDGF-BB and capture antibody. The effect of detection antibody (DA) on the interference was also investigated by incubating the DA with the nucleotides and then performing ELISA normally. The results indicated that both Apt and RO did not interact with DA, therefore, the optical density of these two samples was 85% of the control. It suggested that there was no Apt-DA interaction. Within these results, the ELISA procedure could be utilized for investigating the binding interaction between aptamers and PDGF-BB.

C. Examination of the Binding Functionality

The secondary structural analysis suggested that after cutting off the primer sites, PDGF-BB aptamer could maintain the binding functionality. To confirm this hypothesis, a competitive assay based on ELISA was carried out (Fig. 4). 20 pM of PDGF-BB was incubated with 0.1 and 100 pM of Full-Apt and 40Apt. The results showed that truncation of primer sites could remain the binding capability of the aptamer. However, the truncated 40Apt exhibited a four-fold lower binding capability than the full-length aptamer. The possible explanation was that some remaining nucleotides were non-essential nucleotides and they caused the reduction of the binding affinity. Therefore, the truncation of aptamer should be further performed.

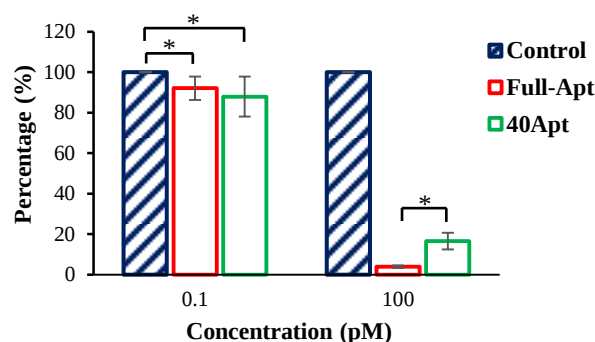


Figure 4. Effect of Full-Apt and 40Apt on PDGF-BB function measured by ELISA. The competitive binding assay, the low percentage indicates the binding capability; 20 pM of PDGF-BB incubated with different concentrations of these sequences. The control displays PDGF-BB (20pM). Error bars indicate S.D ($n=3$). * $P < 0.05$ (two-tailed Student's t -test).

D. Truncation of PDGF-BB Aptamer

To further study the ability of structural analysis for aptamer truncation, a nucleotide at both ends of 40Apt has been eliminated to generate 38Apt, 36Apt, 34Apt, and 32Apt. These sequences were analyzed the secondary structure by using RNAstructure and mfold (Fig. 5). Interestingly, there was a different structure prediction between two software. The RNAstructure predicted that the sequence conformation was changed after the truncation was over 4 nucleotides while mfold suggested that the conformation was changed once the truncation was over 2 nucleotides. The ELISA was then carried out to validate the binding of those sequences generated by the software.

Based on the structural prediction by mfold and RNAstructure, 36Apt, 34Apt, and 32Apt demonstrated different structures. The binding capability of two representative sequences, 36Apt and 32Apt, is shown in Fig. 6. The results showed that the binding capability of truncated 36Apt was greater than that of Full-Apt. The binding inhibition of 100 pM of 36Apt was approximately a hundred percent. More important, 36Apt displayed an excellent binding even at 0.1 pM. Meanwhile, Full-Apt did not bind to the target at this concentration. It indicated that the binding capability of the aptamer could be enhanced even though a number of

non-essential nucleotides has been removed. Not surprisingly, the 32Apt did not bind to the PDGF-BB. In this case, random 31Apt showed no binding.

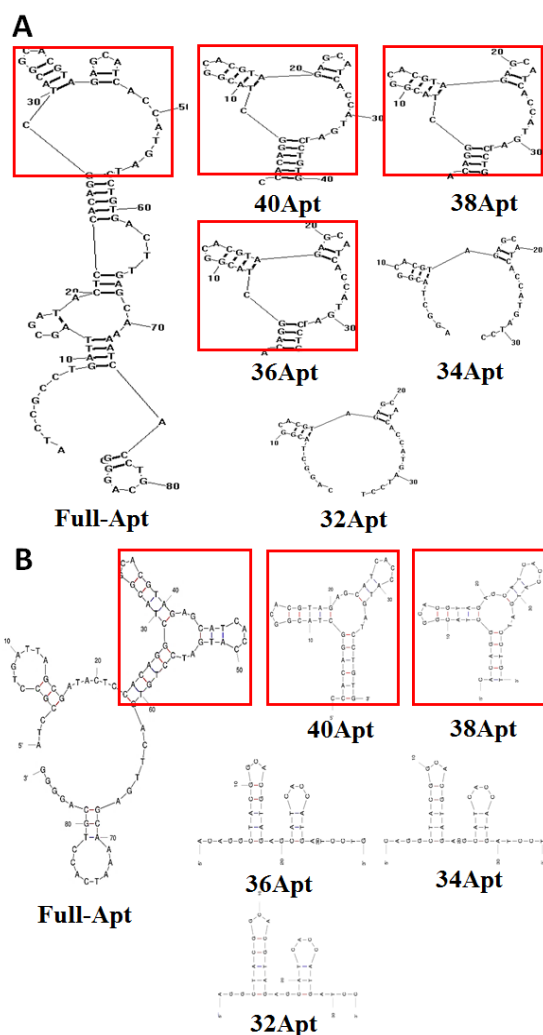


Figure 5. Secondary structures of Full-Apt and truncated aptamers (A) Using RNAstructure. (B) Using mfold. These structures were generated and displayed the lowest free energy.

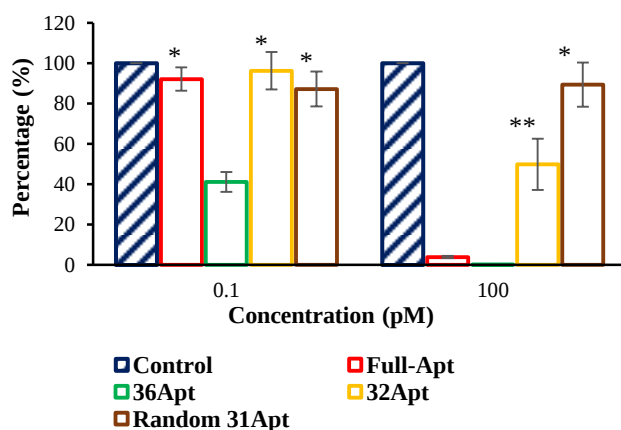


Figure 6. Binding verification of Full-Apt and truncated aptamers. The competitive binding assay. The control displays PDGF-BB (20pM). The random apt31 indicates no binding. Error bars indicate S.D (n=3). *P < 0.05; **P < 0.01 vs. control (two-tailed Student's t-test).

Our results demonstrated that the truncation was successful by analysis of the secondary structure. The existence of some non-essential nucleotides could induce the great interference to the binding capability of the aptamer. The RNAstructure software demonstrated high probability for predicting the secondary structure of the aptamers. It revealed an advanced understanding of the functionality of aptamers. However, there was a limitation. Since the secondary structure was theoretically generated through the algorithms which were based on the calculation of thermal parameters and free energy binding. In addition, the analysis has been done without the real biological environment or absence of target molecule. Consequently, there were numerous factors that could affect the binding functionality, including not only the changing of conformation but also the real biological media (pH, temperature, ions, etc.). However, the software provided an easy method for insight understanding of the binding functionality. Therefore, in the future work, investigation of aptamer interaction by the molecular dynamic simulation is a promising aspect. X-ray crystallography or nuclear magnetic resonance might be tools for the aptamer-target complex or interaction.

IV. CONCLUSION

In summary, the truncation of PDGF-BB aptamer has investigated by analysis the secondary structure generated by RNAstructure and mfold software. Our results demonstrated that the truncation was successful through the secondary structural analysis. The existence of some non-essential nucleotides could induce the great interference to the binding capability of the aptamer. In comparison with the full aptamer, the truncated 36Apt exhibited an excellent binding capability to the target. The RNAstructure software displayed the high probability for predicting the secondary structure of aptamer. Through this study, the secondary structural analysis was a promising tool not only for aptamer truncation but also for the secondary structural prediction of oligonucleotides.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Faculty of Science and Technology, Thammasat University for the support of lab equipment. Mr. Cong was financially supported by Asean Economics Community (AEC) scholarship from Thammasat University. This work was granted by Research Grant for New Researcher from Thailand Research Fund (TRG5880201).

REFERENCES

- [1] B. Soontornworajit and Y. Wang, "Nucleic acid aptamers for clinical diagnosis: Cell detection and molecular imaging," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 399, no. 4, pp. 1591-1599, 2011.
- [2] S. M. Nimjee, C. P. Rusconi, and B. A. Sullenger, "Aptamers: An emerging class of therapeutics," *Annual Review of Medicine*, *Annual Review of Medicine*, pp. 555, 2005.

- [3] J. Zhou, B. Soontornworajit, and Y. Wang, "A Temperature-Responsive Antibody-Like Nanostructure," *Biomacromolecules*, vol. 11, no. 8, pp. 2087-2093, 2010.
- [4] S. Y. Toh, M. Citartan, S. C. B. Gopinath, et al., "Aptamers as a replacement for antibodies in enzyme-linked immunosorbent assay," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 64, pp. 392-403, 2015.
- [5] S. D. Jayasena, "Aptamers: An emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics," *Clin Chem*, vol. 45, no. 9, pp. 1628-1650, 1999.
- [6] J. F. Lee, G. M. Stovall, and A. D. Ellington, "Aptamer therapeutics advance," *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 10, pp. 282-289, 2006.
- [7] P. R. Bouchard, R. M. Hutabarat, and K. M. Thompson, "Discovery and development of therapeutic aptamers," *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, vol. 50, pp. 237-257, 2010.
- [8] B. Soontornworajit, J. Zhou, M. P. Snipes, et al., "Affinity hydrogels for controlled protein release using nucleic acid aptamers and complementary oligonucleotides," *Biomaterials*, vol. 32, no. 28, pp. 6839-6849, 2011.
- [9] E. J. Cho, J. W. Lee, and A. D. Ellington, "Applications of aptamers as sensors," *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*, vol. 2, pp. 241-264, 2009.
- [10] N. Fischer, T. M. Tarasow, and J. B. H. Tok, "Aptasensors for biosecurity applications," *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 11, no. 3, pp. 316-328, 2007.
- [11] J. W. Liu, Z. H. Cao, and Y. Lu, "Functional nucleic acid sensors," *Chemical Reviews*, vol. 109, no. 5, pp. 1948-1998, 2009.
- [12] A. D. Keefe and S. T. Cload, "SELEX with modified nucleotides," *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 12, no. 4, pp. 448-456, 2008.
- [13] J. Zhou, M. R. Battig, and Y. Wang, "Aptamer-based molecular recognition for biosensor development," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 398, no. 6, pp. 2471-2480, 2010.
- [14] M. McKeague and M. C. DeRosa, "Challenges and opportunities for small molecule aptamer development," *Journal of Nucleic Acids*, vol. 2012, pp. 20, 2012.
- [15] L. Gold, B. Polisky, O. Uhlenbeck, et al., "Diversity of oligonucleotide functions," *Annu Rev Biochem*, vol. 64, pp. 763-97, 1995.
- [16] R. Stoltenburg, C. Reinemann, and B. Strehlitz, "SELEX - A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands," *Biomolecular Engineering*, vol. 24, no. 4, pp. 381-403, 2007.
- [17] Y. Ito and E. Fukusaki, "DNA as a 'nanomaterial'," *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, vol. 28, no. 4-6, pp. 155-166, 2004.
- [18] A. Vater, F. Jarosch, K. Buchner, et al., "Short bioactive Spiegelmers to migraine-associated calcitonin gene-related peptide rapidly identified by a novel approach: Tailored-SELEX," *Nucleic Acids Research*, vol. 31, no. 21, pp. 7, 2003.
- [19] S. Bellaousov, J. S. Reuter, M. G. Seetin, et al., "RNAstructure: Web servers for RNA secondary structure prediction and analysis," *Nucleic Acids Research*, vol. 41, no. W1, pp. W471-W474, 2013.
- [20] L. A. Meyers, J. F. Lee, M. Cowperthwaite, et al., "The robustness of naturally and artificially selected nucleic acid secondary structures," *Journal of Molecular Evolution*, vol. 58, no. 6, pp. 681-691, 2004.
- [21] D. Shangguan, Z. W. Tang, P. Mallikaratchy, et al., "Optimization and modifications of aptamers selected from live cancer cell lines," *Chembiochem*, vol. 8, no. 6, pp. 603-606, 2007.
- [22] L. S. Green, D. Jellinek, R. Jenison, et al., "Inhibitory DNA ligands to platelet-derived growth factor B-chain," *Biochemistry*, vol. 35, no. 45, pp. 14413-14424, 1996.



Cong Quang Vu was born in 1992 at Vung Tau Province, Vietnam. He received his B.S. in chemical engineering from Industrial University of HoChiMinh City, Vietnam in 2014. He is now studying his M.S in chemistry at Thammasat University, Thailand under the guidance of Asst. Prof. Dr. Boonchoy Soontornworajit, Assoc. Prof. Yuthana Tantirungrotechai, and Dr. Pichayanoot Rotkruea. He has received Asean Economics Community (AEC) scholarship from Thammasat University since 2014. He is concerned about cancer treatment, particularly aptamer as a tool in therapeutics and diagnostic.

Boonchoy Soontornworajit was born in 1979 at Nongkai Province, Thailand. He received his B.S. in chemistry at Khon Kean University in May 2002, and M.S. in polymer science at the Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University in May 2004. From 2004-2006, he worked as a research assistant at the National Metal and Materials Technology Center. In the fall of 2011, he received his Ph.D. in chemical engineering from the University of Connecticut, USA. Now, he is an assistant professor in chemistry at Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Thammasat University, Thailand.

Yuthana Tantirungrotechai was born in 1973 at Bangkok, Thailand. He received his B.Sc. degree in Chemistry from Mahidol University, Thailand in 1995, and Ph.D. degree in Theoretical Chemistry from University of Cambridge, UK in 1999. He is now an associate professor in Chemistry at Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Thammasat University, Thailand.

Pichayanoot Rotkruea received her B.Sc. in Biology from Mahidol University, Thailand in 2006. In 2008, she received her M.Sc. in Medical Science and Ph.D. in Molecular Oncology from Tokyo Medical and Dental University, Japan in 2012. Now, she is a lecturer at Division of Biochemistry, Department of Preclinical Science, Faculty of Medicine, Thammasat University, Thailand.