

SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) 是一种生物技术, 用于筛选和优化具有特定结合活性的单链核酸 (如 DNA 或 RNA 分子), 这些分子被称为适配体 (aptamers)。这种技术最初由 Larry Gold 和 Jack Szostak 在 1990 年提出, SELEX 技术的核心思想是通过逐步的筛选和富集, 从一个大的随机核酸库中选择出能够与目标分子高度特异性结合的短核酸序列。

SELEX 主要分为以下几个步骤:

1. 筛选: 将核酸片段暴露于拥有目标分子的环境, 让其结合。在经过离心和洗涤等方式去除未能结合上的核酸片段。
2. 富集和扩增: 通过 PCR 大量复制通过筛选的核酸片段, 之后继续进行筛选工作, 重复进行以筛选出最能特异性结合的片段。
3. 建库: 为能够特异性结合的 DNA 片段加上测序用的标签, 最后通过这些标签进行数据统计。

### 1. SELEX 实验材料准备

1.1 蛋白 (0.1mg/ml; -80 冻存); 冰上待用。

1.2 DNA (随机->3 library) 冰上待用

1.3 缓冲液 (冰上待用)。

SB: SELEX buffer: 使用 H<sub>2</sub>O 等体积稀释 2\*SELEX buffer

#### 1.4 SELEX-binding buffer (S-BB) (5ml)

药品名称	药品规格	用量	作用
SELEX buffer	2*SELEX buffer	2.5ml	提供反应环境
DTT	1M	2.5μl	保护蛋白
DIDC	(200ng/μl)	125μl	减少杂 DNA 结合
Water	去离子水	2.4ml	

Note: 以上是配制 5ml 的用量, 具体用量根据需要的 buffer 量进行调整

#### 1.5 SELEX-wash buffer(S-WB) (5ml)

药品名称	药品规格	用量	作用
SELEX buffer	2*SELEX buffer	2.5ml	提供反应环境
DTT	1M	2.5μl	保护蛋白
Water	去离子水	2.5ml	

Note: 以上是配制 5ml 的用量, 具体用量根据需要的 buffer 量进行调整

#### 1.6 平衡磁珠的反应环境

1. 将取出的磁珠置于磁力架上, 将保存液倒掉
2. 加入和磁珠总体积相等的 S-BB, 从磁力架上取出, 混合均匀
3. 再次置于磁力架, 将 S-BB 倒出
4. 重复步骤 2-3 两次
5. 加入磁珠总体积的 0.8 倍的 S-BB, 混合均匀, 完成环境平衡

Note: 为了留出损耗空间, 要用预期总用量\*1.1 (用量详见步骤 2.4)

## 2. 第一轮 SELEX (筛选&富集)

2.1 蛋白核酸结合：向单个 0.2ml 的 PCR 试管中加入以下试剂：

	体积	总量
蛋白	10 $\mu$ l	1 $\mu$ g
文库	0.7 $\mu$ l	~1.5 $\mu$ g
S-BB	89.3 $\mu$ l	89.3 $\mu$ l

Note:具体体积根据 DNA 和蛋白质浓度换算，优先确保总量。请根据文库和蛋白的量调整 S-BB 的量。可以最后加入 S-BB 以保证溶液混合均匀

### 2.2 制作对照组

为了确保可信度，需要使用三个不同的文库，同时每种文库需要一个空白对照组。

空白对照组成分如下：

	体积	总量
水	10 $\mu$ l	
文库	0.7 $\mu$ l	~1.5 $\mu$ g
S-BB	89.3 $\mu$ l	89.3 $\mu$ l

Note：如果使用八联排试管，可以参考以下顺序添加

1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
无	实验组 (1)	实验组 (2)	实验组 (3)	对照组 (1)	对照组 (2)	对照组 (3)	无

其中有着相同序号的实验组和对照组采用同一种文库

### 2.3 蛋白核酸结合

1.在室温静置 10 分钟，等待蛋白质与核酸结合。

### 2.4 蛋白富集

1.每个试管中加入 50 $\mu$ l 磁珠

2.室温放置 20min，等待磁珠与蛋白质结合

### 2.5 去杂

1. 放磁板静置 5-10 分钟，直到溶液清澈
2. 去上清
3. 加入 300 $\mu$ l (实际 270 $\mu$ 左右) S-WB
4. 从磁板中取出，混合均匀
5. 再次置于磁板上静置 5-10 分钟，去上清
6. 重复步骤 3-5 三次
7. 加入 100 $\mu$ l 水，重悬

### 2.6 PCR 混合物配制

## 1.配制 PCR 环境

药品名称	药品规格	用量	作用
SELEX F	10μM	8.25μl	引物
SELEX R	10μM	8.25μl	引物
Master mix	2*Master mix	82.5μl	核苷酸&酶
水		49.5μl	

Note: 以上用量是一个试管的 PCR 用量，根据需要的量进行调整。

2.向配好的 PCR 环境中加入 16.5μl 的磁珠混合物（步骤 2.5 的最终成品）

3.将已有的样本分成三等份，分别进行 12,15,20 轮 PCR

## 2.7 PCR

PCR 程序如下：

12 轮：

94℃	5min	1 次
94℃	10s	12 次
58℃	20s	
72℃	10s	
72℃	5min	1 次
10℃	∞	1 次

15 轮

94℃	5min	1 次
94℃	10s	15 次
58℃	20s	
72℃	10s	
72℃	5min	1 次
10℃	∞	1 次

20 轮

94℃	5min	1 次
94℃	10s	20 次
58℃	20s	
72℃	10s	
72℃	5min	1 次
10℃	∞	1 次

## 2.8 配制电泳胶

### 1.配制 3%DNA 胶

药品名称	药品规格	用量	作用
琼脂		1.5g	
TAE 缓冲液	1*	50ml	
DNA 染料		10μl	染色 DNA

Note: 以上是 50ml 胶的配制用量, 实际用量根据使用量更改

配胶过程:

1. 将琼脂与 TAE 缓冲液混合
2. 使用微波炉加热至沸腾
3. 用凉水降温 (从经验来讲 50ml 的胶冲 6-7 秒, 切忌不能冲太久, 避免凝固)
4. 加入 10 $\mu$ l DNA 染料, 混合均匀
5. 倒入制胶盒, 等待冷却

## 2.9 跑胶

1. 取 4 $\mu$ l PCR 上清 (步骤 2.7 的结果) 与 4 $\mu$ l 2\*loading buffer 混合
2. 加入 5 $\mu$ l marker
3. 上样 6 $\mu$ l
4. 200V 194mA 10min
5. 蓝光/紫外 观察条带, 取荧光最明显的 cycle 数 (PCR 轮数), 如果 cycle 间的荧光相近, 取最少的 cycle 数

## 2.10 纯化

1. 取最佳 cycle 数量的 PCR 的上清 40 $\mu$ l 加入一个新的八联排中
2. 加入 80 $\mu$ l DNA 结合磁珠
3. 加入 170 $\mu$ l 异丙醇
4. 室温下静置 10 分钟
5. 放到磁板上 5min (上清清澈就可以)
6. 去上清 (DNA 此时已经结合在底部的 DNA 结合磁珠上)
7. 加入 200 $\mu$ l 80%乙醇 混匀
8. 重复步骤 5-7 三次
9. 放到磁板上 5min (上清清澈就可以)
10. 去上清 (DNA 此时已经结合在底部的 DNA 结合磁珠上)
11. 静置 10min, 等待乙醇晾干
12. 加入 12 $\mu$ l 水 (把 DNA 从 DNA 结合磁珠上取下来)
13. 静置 2min
14. 放到磁板上 5min
15. 取出并保留上清 (DNA 水溶液) 得到样本

## 2.11 成果检验

1. 超微量分光光度计测定浓度 (80-100 $\mu$ g/ $\mu$ l 为正常值)

## 3 第 2-3 轮 SELEX

### 3.1 准备 PCR 混合物

蛋白核酸结合：向单个 0.2ml 的 PCR 试管中加入以下试剂：

	体积	总量
蛋白	10 ul	1ug
文库	0.7ul	~1.5ug
S-BB	89.3ul	89.3ul

Note: 这里的文库是上一次提纯完的 DNA (步骤 2.8 的结果)，具体体积根据浓度换算。优先确保总量。请根据文库和蛋白的量调整 S-BB 的量。可以最后加入 S-BB 以保证溶液混合均匀

其余操作与第一轮 SELEX 相同，从大步骤 2 开始（确切来说是 2.3，对照组制作把水替换完上一次 PCR 之后的对照组）。如果药剂用完自行配制

4. 建库

Note：这一大步骤的目的是给已经纯化好的蛋白打上不同的标签，在测序中起到分类的作用。

I 标签：区分不同的用户

Q 标签：区分一个用户的不同样本

4.1 准备 PCR 混合物（Q 标签）

药品名称	药品规格	用量	作用
SELEX F (Q tag)	10μM	1μl	加 Q 标签
SELEX R (Q tag)	10μM	1μl	加 Q 标签
Master mix	2*Master mix	10μl	核苷酸&酶
水		7μl	

Note：不同的样品中要加入有着不同 Q tag 的 F 和 R 引物

2.加入 1μl DNA 到 PCR 混合物中

3.准备一组阴性对照（negative control），把 1μl DNA 替换成 1μl 水。

4.2 第一轮 PCR

94°C	5min	1 次
94°C	10s	8 次
55°C	20s	
72°C	10s	
72°C	5min	1 次
10°C	∞	1 次

4.3 跑胶

1.电泳胶

药品名称	药品规格	用量	作用
琼脂		0.75g	
TAE 缓冲液	1*	50ml	
DNA 染料		10μl	染色 DNA

Note: 以上是 50ml 胶的配制用量，实际用量根据使用量更改

配胶过程：

- 1.将琼脂与 TAE 缓冲液混合
- 2.使用微波炉加热至沸腾
- 3.用凉水降温（从经验来讲 50ml 的胶冲 6-7 秒，切忌不能冲太久，避免凝固）
- 4.加入 10μl DNA 染料，混合均匀
- 5.倒入制胶盒，等待冷却

#### 4.4 跑胶

- 1.取 4μl PCR 产物（步骤 4.2 的结果）与 4μl 2\*loading buffer 混合
- 2.加入 5μl marker
- 3.上样 6μl
- 4.200V 194mA 10min

#### 4.5 观察跑胶

- 1.观察杂带情况，过多可能需要重新 PCR
- 2.观察主带长度，如果和 marker 不匹配，可能需要重新 PCR（这一步的长度在 150bp 左右）
- 3.观察阴性对照，如果出现条带，可能需要重新 PCR

#### 4.6 准备 PCR 混合物（I 标签）

药品名称	药品规格	用量	作用
SELEX F (I tag)	10μM	1μl	加 I 标签
SELEX R (I tag)	10μM	1μl	加 I 标签
Master mix	2*Master mix	10μl	核苷酸&酶
水		6μl	

Note: 每个人的样品加入同样的 I 标签

- 2.加入 2μl 第一轮 PCR 产物（步骤 4.2 的结果）到 PCR 混合物中
- 3.准备一组阴性对照（negative control），把 2μl 第一轮阴性对照组加入 PCR 混合物

#### 4.7 第二轮 PCR

94°C	5min	1 次
94°C	10s	8 次
55°C	20s	
72°C	10s	
72°C	5min	1 次

10℃	∞	1 次
-----	---	-----

#### 4.8 跑胶

##### 1.配制电泳胶

药品名称	药品规格	用量	作用
琼脂		0.75g	
TAE 缓冲液	1*	50ml	
DNA 染料		10μl	染色 DNA

Note: 以上是 50ml 胶的配制用量，实际用量根据使用量更改

配胶过程：

- 1.将琼脂与 TAE 缓冲液混合
- 2.使用微波炉加热至沸腾
- 3.用凉水降温（从经验来讲 50ml 的胶冲 6-7 秒，切忌不能冲太久，避免凝固）
- 4.加入 10μl DNA 染料，混合均匀
- 5.倒入制胶盒，等待冷却

#### 4.9 跑胶

- 1.取 4μl PCR 产物（步骤 4.7 的结果）与 4μl 2\*loading buffer 混合
- 2.加入 5μl marker
- 3.上样 6μl
- 4.200V 194mA 10min

#### 4.10 观察跑胶

- 1.观察杂带情况，过多可能需要重新 PCR
- 2.观察主带长度，如果不和 marker 匹配，可能需要重新 PCR（这一步的长度在 270bp 左右）
- 3.观察阴性对照，如果出现条带，可能需要重新 PCR

### 5. 切胶回收 DNA

#### 5.1.配制电泳胶

药品名称	药品规格	用量	作用
琼脂		0.75g	
TAE 缓冲液	1*	50ml	
DNA 染料		10μl	染色 DNA

Note: 以上是 50ml 胶的配制用量，实际用量根据使用量更改。这次制胶时梳子放在长方形的短边，让跑胶的距离变长

#### 5.2 跑胶

- 1.将所有 PCR 产物（步骤 4.7 的结果）集中到一个管中（如果严格按照之前的步骤，现在应该有 96μl）。

- 2.加入 PCR 产物 1/9 体积的 10\*loading buffer 混合均匀制成样品 (96μl PCR 产物的话就加入 10.67μl 的 10\*loading buffer)
- 3.在一个孔中尽可能的加入所有的样品
4. 180V 194mA 20min

### 5.3 切胶

- 1.把整块胶置于蓝光切胶仪中, 观察目标条带位置
- 2.用刀片仔细切下含有主带的胶, 尽可能少的留下别的胶

### 5.4 溶胶

- 1.称量胶的质量, 之后加入 3 倍胶体积的 QG buffer (溶胶剂)  
Note:100mg 胶=100μl。也就是说每 100mg 胶加入 300μl 的 QG buffer。

- 2.放到 50 度 10 分钟, 等待胶完全溶解

Note:如果是黄色就可以, 如果橙色或者紫色就加入 10μl 3M 醋酸钠 (pH 5.0)

### 5.5 纯化

- 1.加一倍胶体积 (胶体积换算见步骤 5.4.1) 的异丙醇, 转入 MinElute 过滤管中, 套在一个剪掉盖子的离心管上方

- 2.晃匀之后用离心机 (没有特定参数, 龟背离心机即可) 将上面的液体过滤到下方离心管之中, 倒掉即可

- 3.加入 500μl QG buffer, 放入离心机中离心 (13000RPM 1 分钟), 倒掉过滤下来的废液。

- 4.加入 750μl PE buffer, 放入离心机中离心 (13000RPM 1 分钟), 倒掉过滤下来的废液, 重复两次。

Note: 如果做的是对于盐敏感的测试, 加入 Buffer PE 后静置 5 分钟

- 5.准备 55 °C 的水, 更换底部管子, 加 55°C 水 20ul (加在正中间, 不要触碰到管壁) 静置 1 分钟

- 6.放入离心机中离心 (13000RPM, 1 分钟)

- 7.取底部小试管里的 DNA 水溶液

### 5.6 检查结果

- 1.检查蛋白含量, 盐含量和核酸含量 (核酸正常浓度在 80~120ng/μl, 蛋白和盐的含量不超过核酸浓度就可以接受)

核酸吸光度峰值: AD260

蛋白吸光度峰值: AD230

盐吸光度峰值: AD280

- 2.送去测序, 等待结果。