

- 13 Mouzaki A, Weil R, Muster L *et al.* Silencing and trans-activation of the mouse IL-2 gene in *Xenopus* oocytes by proteins from resting and mitogen-induced primary T-lymphocytes. *EMBO J*, 1991; **10**:1399
- 14 Yokota T, Arai N, Arai K-I *et al.* Interleukin-4. In: Sporn M B, Roberts A B eds, *Peptide Growth factors and their receptors*, 1, Berlin: Springer-Verlag, 1990;577
- 15 Ray A, LaForge K S, Sehgal P B. On the mechanism for efficient repression of the interleukin-6 promoter by glucocorticoids; enhancer, TATA box, and RNA start site (Inr motif) occlusion. *Mol Cell Biol*, 1990; **10**:5736
- 16 Kinoshita S, Akira S, Kishimoto T. A member of the C/EBP family, NF-IL6, forms a heterodimer and transcriptionally synergizes with NF-IL6. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992; **89**:1473
- 17 Reis L F L, Harada H, Wolchok J D *et al.* Critical role of a common transcription factor, IRF-1, in the regulation of IFN- and IFN-inducible genes. *EMBO J*, 1992; **11**:185
- 18 Daigneault L, Skup D. Increased levels of interferon regulating element-binding activities in a nuclei of high interferon-producing IF-1h mice. *Cell Growth Differentiat*, 1992; **3**:93
- 19 Krays V, Kemmer K, Shakhov A *et al.* Constitutive activity of the tumor necrosis factor-promoter is canceled by the 3'-untranslated region in nonmacrophage cell lines; a transdominant factor overcomes this suppression effect. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992; **89**:673
- 20 Stahl J, Gearing D P, Wilson T A *et al.* Structural organization of the genes for murine and human leukemia inhibitory factor. *J Biol Chem*, 1990; **265**:8833
- 21 Blum S, Forsdyke R E, Forsdyke D R. Three human homologs of a murine gene encoding an inhibitor of stem cell proliferation. *DNA Cell Biol*, 1990; **9**:589
- 22 Seto Y, Fukunaga R, Nagata S. Chromosomal gene organization of the human granulocyte colony-stimulating factor receptor. *J Immunol*, 1992; **148**:259
- 23 Mouche L, Tounamille C, Hattab C *et al.* Cloning of the gene encoding the human erythropoietin receptor. *Blood*, 1991; **78**:2557
- 24 Guarra J R, Oten H, Wang M G *et al.* Human interleukin 2 receptor β -chain gene: chromosomal localization and identification of 5' regulating sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990; **87**:3440
- 25 Sugita T, Totsuka T, Saito M *et al.* Functional murine interleukin 6 receptor with the intracisternal A particle gene product at its cytoplasmic domain. *J Exp Med*, 1990; **171**:2001

化学合成的 DNA 定位断裂工具

沈先荣

(海军医学研究所, 上海 200433)

韩 玲

(第二军医大学, 上海 200433)

提 要

化学合成的 DNA 定位断裂工具是 80 年代初发展起来的一种新型非酶 DNA 定位断裂工具。它由 DNA 识别结合系统及化学断裂系统组成, 能在人们预先设计的任何位点断裂 DNA 分子, 具有制备简便、价格便宜、不受酶的天然专一性限制等优点, 可应用于基因分离、染色体图谱分析、大片段基因的序列分析以及 DNA 定位诱变、肿瘤基因治疗与新的化学疗法等分子生物学领域。

关键词 DNA 定位断裂, DNA 的非酶定位断裂, EDTA-Fe (II), 1, 10-菲啰啉

DNA 定位断裂技术被广泛应用于分子生物学的各个领域. 限制性内切酶能在特定位点切割 DNA 分子, 但其识别位点仅为 4—8 个核苷酸, 且只能在数目有限的位点断裂 DNA, 这给基因工程技术带来一定的限制. 化学合成的 DNA 定位断裂工具是 80 年代初发展起来的新型非酶 DNA 断裂工具. 它具有限制性内切酶的高度专一性, 又能在人们预先设计的任何位点断裂 DNA, 可应用于基因分离、染色体图谱分析、大片段基因的序列分析以及 DNA 定位诱变、肿瘤基因治疗与新的化学疗法等分子生物学领域.

1 基本原理

限制性内切酶所以能特异切割 DNA 分子是因为它能识别特殊核苷酸序列并与之结合, 由酶分子中的化学基团催化断裂 DNA 分子. 化学合成的 DNA 定位断裂工具由二部分组成: 一是 DNA 识别结合系统, 它能识别 DNA 上某段核苷酸序列并与之结合, 主要有天然存在或人工合成的寡聚核苷酸、蛋白质和抗生素; 二是化学断裂系统, 主要由金属螯合剂和金属离子二部分组成, 如 EDTA-Fe(II)^[1]、双(1, 10-菲啰啉) Cu(I)^[2], 硫醇-Cu(II)^[3]等, 它们在分子氧、还原剂等存在下, 反应产生 O_2^- , $\cdot OH$ 或 H_2O_2 等, 从而导致 DNA 氧化断裂. 合成与靶 DNA 断裂位点互补的寡聚核苷酸, 或寻找能与断裂位点特异结合的蛋白质或抗生素等生物大分子作为 DNA 识别结合系统, 连接到适当的化学断裂系统, 即可在人们预先设计的任何位点断裂 DNA (图 1)^[4].

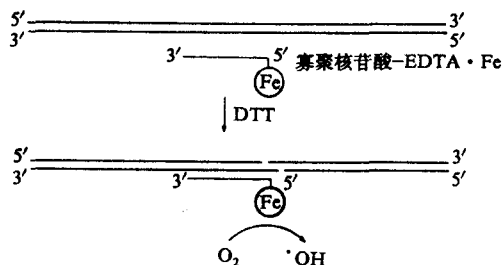


图 1 寡聚脱氧核苷酸-EDTA · Fe(II)
定位断裂 DNA 原理

2 DNA 识别结合系统

DNA 识别结合系统包括所有天然或人工合成的能识别结合特殊核苷酸序列的生物大分子. 常用的有以下三类.

2.1 寡聚脱氧核苷酸 寡聚脱氧核苷酸既能与互补的单链 DNA 杂交, 又能与互补的双链 DNA 形成三螺旋结构. 随着寡聚核苷酸化学合成技术的发展, 合成一段寡聚脱氧核苷酸已不再非常困难. 人们可根据需要合成不同的寡聚脱氧核苷酸作为识别结合系统, 在预先设计的位点断裂 DNA. 1985 年 Dreyer 等合成一段 19 个脱氧核苷酸的寡聚体, 连接上 EDTA Fe(II), 作用于质粒 pBR322 DNA 的 EcoR I / Rsa I 片段, 在互补结合区产生断裂反应, 断裂区域包括 7—8 个核苷酸^[5]. Moser 等利用寡聚脱氧核苷酸-EDTA · Fe(II), 通过形成三螺旋结构, 对双链的质粒 pDMAG10 DNA 片段成功地进行了定位断裂反应^[4].

2.2 蛋白质和多肽 许多天然存在的蛋白质和多肽能与 DNA 特定部位结合. λ 阻遏物 (λ -repressor) 和分解代谢基因激活蛋白 (catabolite gene activator protein, CAP) 能识别结合特殊 DNA 序列, 对基因表达起一定的调控作用. Ebright 等将 CAP 与 1, 10-菲啰啉 (1, 10-phenanthroline, Phen) 共价结合生成具有核酸酶活性的 CAP-(1, 10-Phen), 作用于含有 CAP 识别位点的 DNA, 在结合位点断裂 DNA^[2]. Iverson 等报道用单克隆抗体与 Co(III)、Zn(II) 等结合能断裂与其特异结合的多肽^[6]. 如果能制备出可与某段 DNA 特异结合的单克隆抗体, 将其与化学断裂系统结合, 即可获得多种 DNA 定位断裂工具.

2.3 抗生素 许多抗肿瘤抗生素能与 DNA 特异结合. 博来霉素是一种有效的抗肿瘤药物, 它对 5'-GC-3' 和 5'-GT-3' 含量高的部位有特殊的亲和力, 与 Fe(II) 联合作用, 可在该位点断裂 DNA^[7]. Carter 等报道较高浓度的博来霉素对 RNA 也具有定位断裂作用, 断裂位点在 5'-GU-3' 集中区^[8]. 此外, 新制癌菌素 (neo-

carzinostatin), elsamicin A^[9], dynemicin A^[10] 等对 DNA 也有特异亲和力, 联合化学断裂系统可定位断裂 DNA.

3 化学断裂系统

化学断裂系统在人工合成的 DNA 定位断裂工具中起着重要作用, 其主要是通过形成活性氧(如 $\cdot\text{OH}$, O_2^- , H_2O_2 等)作用于 DNA 链, 使其发生断裂反应. 常用的有以下几种.

3.1 EDTA-Fe(II) 在足迹图谱技术中, EDTA-Fe(II)常被作为 DNA 断裂工具用于双链 DNA 的非特异断裂. 其原理是 EDTA 与 Fe(II)形成络合物, 促使 H_2O_2 还原生成 $\cdot\text{OH}$, 作用于 DNA 链的脱氧核糖, 导致 DNA 链的断裂^[11]. 将 EDTA-Fe(II)与 DNA 识别系统结合, 即可定位断裂 DNA.

EDTA-Fe(II)常以寡聚脱氧核糖核酸作为识别结合系统. 寡聚脱氧核糖核苷酸-EDTA·Fe(II)的合成方法为: a. 合成 2'-脱氧胸苷的类似物 5'-DMT-脱氧尿嘧啶核苷-EDTA 三乙基酯^[5]; b. 以 5'-DMT-U*-EDTA 三乙基酯作为脱氧胸苷的替代物, 将其标记到与靶 DNA 断裂位点互补的寡聚脱氧核苷酸中. 值得一提的是用固相氨基磷酸法合成寡聚脱氧核苷酸, 可以固定修饰尿苷的位置, 从而有效控制断裂位点.

3.2 双-(1,10-菲啰啉)Cu(I) 在过量的 1,10-Phen、还原剂和分子氧存在下, Cu(II)能引起 DNA 断裂. 断裂反应的活性物质是 $(1,10\text{-Phen})_2\text{Cu(I)}$ 复合物. 其原理可能是 Cu(II)被还原成 Cu(I), 与过量的 1,10-Phen 结合生成 $(1,10\text{-Phen})_2\text{Cu(I)}$, 该复合物与 H_2O_2 反应生成 $\cdot\text{OH}$, 作用于 DNA 磷酸骨架. 断裂产物主要为 5'或 3'-单磷酸酯末端的 DNA 片段^[12].

$(1,10\text{-Phen})_2 \cdot \text{Cu(I)}$ 可以蛋白质作为 DNA 识别结合系统. Ebright 等将 1,10-Phen 与 CAP 的 Cys¹⁷⁸结合生成 $(1,10\text{-Phen-Cys}^{178})\text{CAP}$, 作用于含有一个 CAP 位点的质粒 M13mp63-lacP1 双链 DNA, 在 Cu(II)、还原剂

(如抗坏血酸)、cAMP 存在下发生特异性断裂反应, 生成 4816 bp 和 2348 bp 二个片段^[2]. $(1,10\text{-Phen-Cys}^{178})\text{CAP}$ 的合成分二步进行, 第一步将 5-硝基-1,10-Phen 与 $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ 反应生成 5-氨基-1,10-Phen, 再将 5-氨基-1,10-Phen 与碘乙酸反应生成 N-碘乙酰-5-氨基-1,10-Phen; 第二步是将第一步的合成产物与 CAP 分子上的巯基反应生成 $(1,10\text{-Phen-Cys}^{178})\text{CAP}$ ^[2].

$(1,10\text{-Phen})_2\text{Cu(I)}$ 也可以寡聚核苷酸作为识别结合系统. Chen 等利用寡聚脱氧核苷酸- $(1,10\text{-Phen})_2 \cdot \text{Cu(I)}$ 作用于噬菌体 M13mp8 单链 DNA 和质粒 pBR322 lac 操纵子双链 DNA, 在互补结合区发生断裂反应^[13]. $(1,10\text{-Phen})_2 \cdot \text{Cu(I)}$ -寡聚核苷酸的合成步骤是, 先合成 5-甘氨酸氨基-1,10-菲啰啉, 再与寡聚脱氧核苷酸反应生成寡聚脱氧核苷酸- $(1,10\text{-Phen})$. 应注意的是寡聚脱氧核苷酸只有连接到 1,10-Phen 的 5 位上才具有较高的核酸酶活性.

3.3 Cu(II)-硫醇 Cu(II)或硫醇单独存在时不对 DNA 产生断裂作用. 当过量的 Cu(II)存在时, $10\mu\text{mol/L}$ 的硫醇即可产生相当强的断裂 DNA 作用. 其反应原理可能与 $\cdot\text{OH}$ 及 H_2O_2 的形成有关. Reed 等发现 $\cdot\text{OH}$ 清除剂及过氧化氢酶可抑制硫醇-Cu(II)的断裂作用^[14]. Cu(II)-硫醇断裂 DNA 有较强的温度和 NaCl 浓度依赖性, 提高反应温度及适当的 NaCl 浓度 (0.1—0.25mol/L) 有利于反应的进行.

Cu(II)-硫醇断裂 DNA 的意义不仅在于提供一个 DNA 断裂工具, Cu(II)及谷胱甘肽都是细胞的正常组分, 维持生命物质的正常结构和功能, 如果细胞中谷胱甘肽遇到过高浓度的游离 Cu(II), 将对 DNA 产生损伤作用. 虽然细胞中有多种途径防止这种损伤的发生, 但其对细胞 DNA 仍构成潜在威胁.

3.4 Cu(II)-甲基胍 在 Cu(II)存在时, 一甲基胍, 1,1-二甲基胍, 1,2-二甲基胍均可引起 DNA 断裂反应^[15], 其中二种二甲基胍的断裂效率较高. 其原理可能与 H_2O_2 的形成及 Cu

(I)过氧化物复合物有关,而与甲基自由基($\cdot\text{CH}_3$)无关.因为一甲基胍产生 $\cdot\text{CH}_3$ 的能力远比二甲基胍强,而过氧化氢酶及 $\text{Cu}(\text{I})$ 特异性螯合剂——浴铜灵(bathocupro-ine)能抑制它们的断裂反应. $\text{Cu}(\text{II})$ -甲基胍的DNA断裂位点一般为5'-GTC-3'序列中的胸腺嘧啶残基.此外,1,2-二甲基胍- $\text{Mn}(\text{III})$ 也能引起DNA断裂,其与 $\cdot\text{OH}$ 和 O_2^- 的形成有关,断裂反应受 $\cdot\text{OH}$ 清除剂和SOD的抑制,而与过氧化氢酶无关.

除了上述几种DNA断裂系统外,Iverson等报道CNBr-甲基硫醚也具有断裂DNA作用^[16],他们将甲基硫醚(MT)连接到dUTP的5位上生成MT-dUTP,将其作为dTTP的替代物合成到寡聚脱氧核苷酸中,生成的MT-寡聚脱氧核苷酸与靶DNA杂交,加入CNBr,即可在互补结合区将靶DNA断裂.此外,Take-naka报道 $\text{Cu}(\text{II})$ -双吡啶衍生物也具有较强烈的DNA断裂作用^[17].DNA化学断裂系统有多种,各有其特点,根据所要断裂的靶DNA,可选择合适的系统与DNA识别结合分子联合,达到有效的DNA定位断裂.

4 应用展望

随着遗传工程及分子生物学技术的不断发展,人们越来越不满足于限制性内切酶的应用,化学合成的DNA定位断裂工具引起人们极大重视,特别是近二年来国外开展了许多有关工作,国内这方面的工作尚未见报道.化学合成的DNA定位断裂工具可根据需要在任何位点断裂DNA,这就使其成为遗传工程技术中非常有用的工具.此外,它可用来切割破坏细胞中特定mRNA,进行基因表达的研究^[18].合成能与病原体(如病毒)DNA或RNA特异结合的化学断裂工具,就可利用它对该疾病进行研究和治疗,从而发展出新的化学治疗方法.如果在核酸探针上连接不同的化学断裂系统,就可在DNA产生高度专一性的定点突变.化学合成的DNA定位断裂工具尚处于基础研究阶段,许多问题有待于进一步研究探讨,如果能使其切断的

DNA产生较合适的粘性末端,可较容易地与其相对应的DNA片段进行重组,那么,这些“酶类似物”因为能在DNA或RNA的任何位点产生高度专一性的定位断裂作用,将会有广阔的应用前景.

参 考 文 献

- 1 Oakley M G, Dervan P B. Structural motif of GCN4 DNA binding domain characterized by affinity cleaving. *Science*, 1990; **248**:847
- 2 Ebright R H, Ebright Y W, Pendergrast P S *et al.* Conversion of a helix-turn-helix motif sequence-specific DNA binding protein into a site-specific DNA cleavage agent. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990; **87**:2882
- 3 Reed C J, Douglas K T. Single-strand cleavage of DNA by copper and thiols; a powerful chemical DNA-cleaving system. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989; **162**:1111
- 4 Moser H E, Dervan P B. Sequence-specific cleavage of double helical DNA by triple helix formation. *Science*, 1987; **238**:645
- 5 Dreyer G B, Dervan P B. Sequence-specific cleavage of single-stranded DNA; Oligodeoxynucleotide-EDTA: Fe(II). *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985; **82**:968
- 6 Iverson B L, Lemer R A. Sequence-specific peptide cleavage catalyzed by an antibody. *Science*, 1989; **243**:1184
- 7 Hertzberg R P, Caranfa M J, Hecht S M *et al.* Degradation of structurally modified DNAs by bleomycin group antibiotics. *Biochemistry*, 1988; **27**:3164
- 8 Carter B J, Vroom E D, Long E C *et al.* Site-specific cleavage of RNA by Fe(II): Bleomycin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990; **87**:9373
- 9 Uesugi M, Sekida T, Matsuki S *et al.* Selective DNA cleavage by elsamycin A and switch function of its amino sugar group. *Biochemistry*, 1991; **30**:6711
- 10 Sugiura Y, Arakawa T, Uesugi M *et al.* Reductive and nucleophilic activation products of dynemicin A with methyl thioglycolate. A rational mechanism for DNA cleavage of the thiol activated dynemicin A. *Biochemistry*, 1991; **30**:2989
- 11 Lu M, Guo Q, Wink D J *et al.* Charge dependence of Fe(II)-catalyzed DNA cleavage. *Nucleic Acids Res.*, 1990; **18**:3333
- 12 Veal J M, Merchant K, Rill R L *et al.* The influence of reducing agent and 1,10-phenanthroline concentration on DNA cleavage by phenanthroline+copper. *Nucleic Acids Res.*, 1991; **19**:3383

- 13 Chen C H, Sigman D S. Nuclease activity of 1, 10-phenanthroline-copper: Sequence-specific targeting. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986; **83**:7147
- 14 Reed C J, Douglas K T. Chemical cleavage of plasmid DNA by glutathione in the presence of Cu(II) ions. The Cu(II)-thiol system for DNA strand scission. *Biochem J*, 1991; **275**:601
- 15 Kawanishi S, Yamamoto K. Mechanism of site-specific DNA damage induced by methylhydrazines in the presence of copper (II) or manganese (II). *Biochemistry*, 1991; **30**:3069
- 16 Iverson B L, Dervan P B. Nonenzymatic sequence-specific cleavage of single-stranded DNA to nucleotide resolution. DNA methyl thioether probes. *J Am Chem Soc*, 1987; **109**:1241
- 17 Takenaka S, Thara T, Takagi M *et al*. Cleavage of double helical DNA by Cu(II) ion in the presence of bisintercalator containing penta (ethylene glycol) connector chain. *J Mol Recognit*, 1990; **3**:156
- 18 Doan T L, Perrouault L, Chassignol M *et al*. Sequence-targeted chemical modifications of nucleic acids by complementary oligonucleotides covalently linked to porphyrin. *Nucleic Acids Res.*, 1987; **15**:8643

γ-氨基丁酸受体及其基因研究进展*

陈俊杰 程汉华

(华西医科大学生物化学教研室, 成都 610041)

提 要

γ-氨基丁酸 (GABA) 是脊椎动物脑内一种重要的神经递质。它与其特异性受体 (即 GABAR) 分子的相互作用, 可引起该受体偶联的 Cl^- , K^+ 和 Ca^{2+} 通道传导的改变并产生神经元抑制效应。近年 GABA_AR 基因及其表达的研究, 已为不同的种属、不同脑区域和细胞类型中 GABA_AR 的亚基组成、生理功能及其对很多中枢神经系统药物反应的多样性提供了令人信服的依据, 可以预见不久这方面深入的探索也必将为有关该受体的神经精神病发病的分子机理研究及其治疗性药物的设计提出新的线索。

关键词 脑, γ-氨基丁酸受体 (GABAR) 亚基, 基因表达

γ-氨基丁酸 (GABA) 广泛存在于脊椎动物脑的各个区域内, 是一种重要的抑制性神经递质。GABA 与神经突轴后膜的特异性受体结合, 即可改变膜对 Cl^- , K^+ , Ca^{2+} 的传导并改变膜电位, 从而产生神经元抑制效应。脑内 γ-氨基丁酸受体有 A 型和 B 型 (简称 GABA_AR 和 GABA_BR) 之分。GABAR 与临床上一系列重要的中枢神经系统药物如抗癫痫、抗惊厥、抗焦虑和镇静催眠等类药 (多属于巴比妥类和苯二氮杂革类) 的药理学效应密切相关^[1]; 此外, 该受体可能还涉及某些神经精神病如癫痫、震颤麻痹、Huntington 氏病、Angelman 综合征

(AS) 和 Prader-Willi 综合征 (PWS) 等的发病机理^[2-5]。因此, 该受体研究十分引人注目。近年, 由于重组 DNA 技术的迅速发展和应用, 对 GABA_AR 及其基因的结构与功能研究已取得显著进展, 本文仅就此进行重点综述。

1 GABAR

大量配体-受体结合实验已证明, 脊椎动物脑组织内可与 GABA 特异性结合并引起神经

*国家自然科学基金项目。

收稿日期: 1992-05-08 修回日期: 1992-06-23