

多肽核酸

张立刚 闵吉梅 张礼和

(北京医科大学天然药物与仿生药物国家重点实验室, 北京 100083)

摘要 通过计算机模型设计出一种以肽骨架取代 DNA 中脱氧核糖磷酸酯骨架的 DNA 类似物. 实验已证明其与互补寡核苷酸的结合具有高度的特异性. 综述了其合成、杂交性及在分子生物学等方面的应用.

关键词 多肽核酸, 寡核苷酸, 反义, 杂交, 特异性

能选择性地与单链或双链核酸结合的试剂有希望定靶于基因而成为特定基因的调节剂或作为生物学和诊断学的生物探针, 因而它们在分子生物学和药物化学上占有很重要的地位^[1]. 正因为如此, 近年来, 寡核苷酸及其类似物一直是许多化学家们研究的热点问题. 虽然反义硫代寡核苷酸抑制癌基因、病毒基因的表达已有大量报道, 而且已进入临床试验, 但从生物学稳定性、溶解性、细胞摄入及合成等方面综合考虑, 迄今仍无一种寡核苷酸类似物能成为理想的反义药物^[2]. 最近, 有人通过计算机模型, 设计了一种以多肽 (聚酰胺) 骨架取代普通核酸中磷酸二酯骨架的多聚物, 因其结构类型介于肽和核酸之间而被命名为多肽核酸 (peptide nucleic acid, PNA).

1 构效关系研究

最先合成的 PNA 骨架是由 (2-氨基乙基) 甘氨酸单体聚合而成的, 碱基部分则通过亚甲基连接于主骨架上. 与天然核酸相似, 碱基与骨架间保持 2~3 个键, 上下相邻碱基间隔 6 个键 (图 1)^[3,4].

将 PNA 骨架单元中的各部分分别延长一个碳单位, 得到三种类型的化合物 (图 2), 其与相应互补的 DNA 形成的杂交体的热稳定性均显著降低 (亲和力减小)^[5,6], 说明保持骨架与碱基间及碱基与碱基之间的适当空间距

离是至关重要的^[5~7].

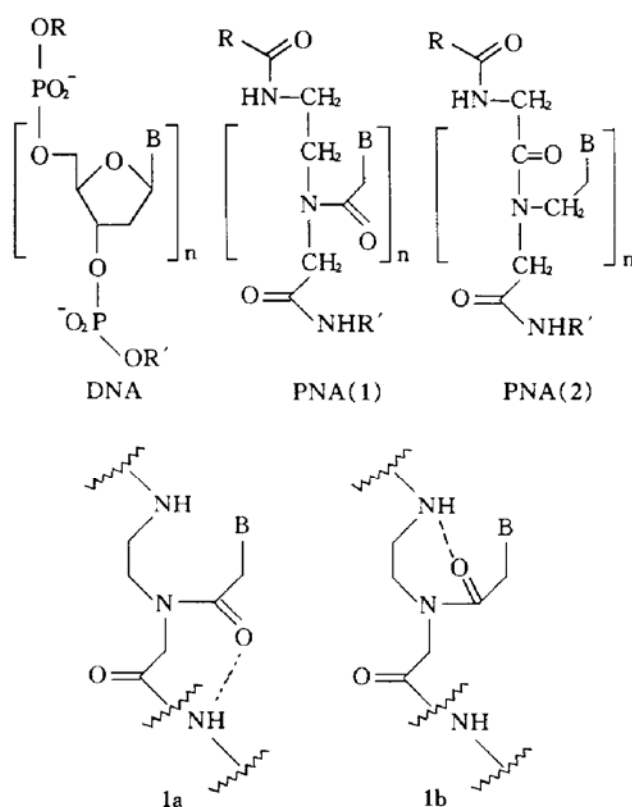


图 1 各种骨架比较及 PNA 分子内部氢键作用方式

对 PNA 与互补寡核苷酸杂交体的高度热稳定性的原因分析, 推测除了互补链之间正常的碱基与碱基间的氢键作用, 还与 PNA 分子内部靠近碱基的羰基氧与链上氨基氢之间的氢

键作用有关. 如果将羰基与骨架上的亚甲基调换, 所得 PNA 类似物 2 几乎不与互补 DNA 发生杂交^[8,9]. 进一步由分子图形学计算可知, PNA 分子内部氢键对其杂交体高度稳定性的贡献主要是通过 1a 方式, 而几乎不通过 1b 方式^[8] (图 1).

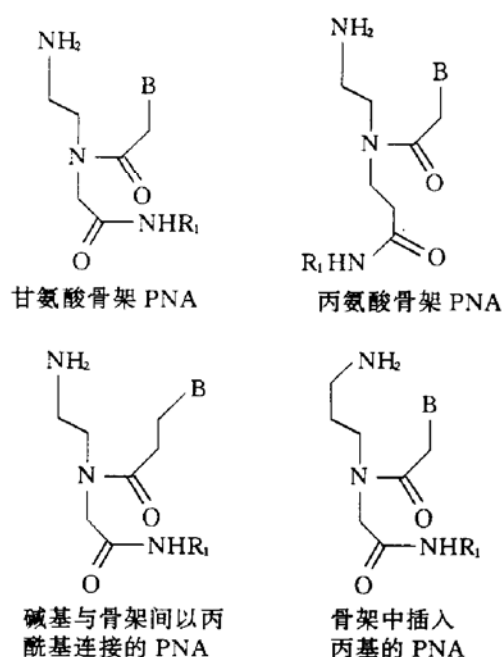


图 2 各种不同类型的 PNA 骨架

2 合 成

PNA 的聚合利用了以下保护的单体^[3,10,11]. (图 3)

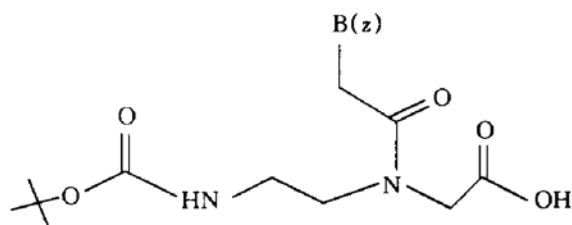
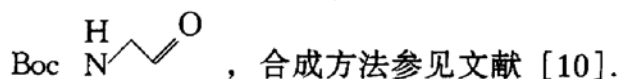


图 3 PNA 合成所用单体

通过 Merrifield 固相合成法^[3]先后合成了纯嘧啶碱基的 PNA、十聚体 PNA T_{10} -Lys-NH₂ 和含嘌呤、嘧啶混合碱基的 PNA^[11].

单体合成中所用的结构单元



, 合成方法参见文献 [10].

另外, Millipore 公司发展了一种新的固相合成 PNA 的方法. 它采用糖醛酸离子作活化剂 (uronium activation), 而不用碳二亚胺 (DCC) 进行活化, 得到了更高产率和质量的 PNA 寡聚物.

3 杂交性质

PNA 保留了 DNA 的杂交特性, 甚至具有更高的亲和力和特异性.

酶学和化学探针实验发现, PNA T_{10} -Lys-NH₂ 与其靶双链 DNA 的一条链互补结合后, 使另一条非互补 DNA 链极易被单链特异的核酸酶 S₁ 消化^[12] 或被 KMnO₄ 氧化^[5]. 人们推测 PNA 与靶双链 DNA 的结合可能是通过一种链取代机制来完成的^[2,13]. 即 PNA 遵循 Watson-Crick 规则与双链 DNA 中的一条互补链结合后, 同时取代另一条非互补链, (使之以单链形式游离)^[5,13,14]. 这种链取代机制已由电子显微学观察^[15] 和对环状 DNA 解链研究的结果^[16] 证实.

比较杂交复合物的 T_m 值发现, PNA T_{10} -Lys-NH₂ 与 dA₁₀ 形成的复合物的 T_m 值高达 72°C, 而对应的 dT₁₀ 与 dA₁₀ 形成的复合物 T_m 仅有 23°C^[3]. 由其他纯嘧啶碱基或嘌呤、嘧啶混合碱基的 PNA 与相应互补寡核苷酸的杂交复合物的 T_m 值比较, 得到了同样的结果^[4,14,17].

导致 PNA 杂交复合物高度稳定性的原因除前述的氢键作用外, 可能还与 PNA 骨架的非电性 (电荷中性) 而避免了杂交物中两条链间的电性斥力有关^[13,18]. 对纯嘧啶碱基的 PNA 杂交复合物的圆二色性分析发现, 其结构与 (dT₁₀)₂/dA₁₀ 无显著差别, 且该复合物中 PNA 与 DNA 的化学计量比为 2:1^[2,11,14,15,19]. 两条 PNA 链分别遵循 Watson-Crick 和 Hoogsteen 碱基互补配对规则

与 DNA 结合^[2,5,11,15] (图 4). 这可能是导致其高度稳定性的另一原因.

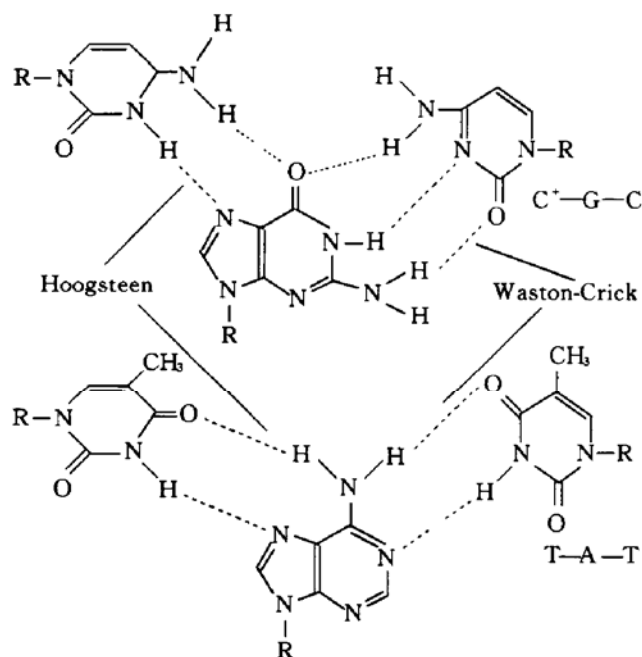


图 4 PNA 与 DNA 链间碱基的相互作用方式

那么纯嘧啶碱基 PNA 与 DNA 是怎样形成三链复合物的呢? 推测有三种可能的机制^[2,3] (图 5).

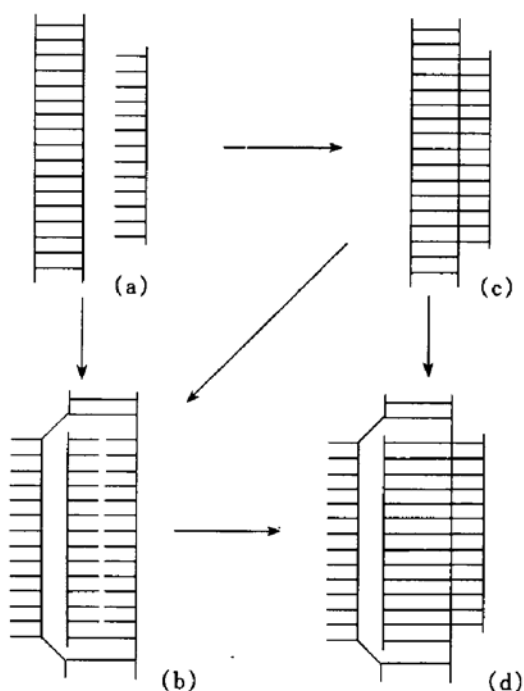


图 5 三链复合物形成的可能机制

其中二种认为先形成 PNA/DNA₂ 复合物,

再接受第二条 PNA 链. ($a \rightarrow c \rightarrow b$) 或 ($a \rightarrow c \rightarrow d$). 第三种机制则是 PNA 通过链取代方式直接取代了非互补链. ($a \rightarrow b \rightarrow d$) 也就是说经历了热力学 DNA “呼吸” 方式 (碱基对打开) 进行的^[20]. 实验观察到杂交复合物的形成与离子强度 (盐浓度) 有关^[15], 从而说明最后一种机制 ($a \rightarrow b \rightarrow d$) 是正确的. 因为高离子强度稳定双螺旋, 减少了碱基对被打开的可能性, 而使 PNA 无法与 DNA 结合^[2,5].

用三条 PNA 链 (T_{10} -Lys-NH₂, T_5CT_4 -Lys-NH₂, $T_2CT_2CT_4$ -Lys-NH₂) 与不同序列的寡核苷酸进行杂交实验来研究 PNA 识别 DNA 序列的特异性. 结果发现, 在与 dA₁₀ 进行杂交时, 序列完全互补的 PNA T_{10} -Lys-NH₂ 形成的复合物 T_m 达 72℃, 而 PNA T_5CT_4 -Lys-NH₂ 形成的复合物则因有一个错配碱基而使 T_m 下降 13℃^[2,3,11,18]. 含二个错配碱基的 PNA $T_2CT_2CT_4$ -Lys-NH₂ 则几乎不发生杂交. 以 A₂GA₂GA₄ 和 A₅GA₄ 分别作为靶 DNA 与 PNA 进行杂交时, 得到的实验结果也表明: 含 10 个碱基的 PNA, 能特异地识别对应靶 DNA 中的二个错配碱基而完全不与之发生作用. 这一结论同时还被核酸酶 S₁ 对 DNA 的降解实验^[12] 和 PNA 对限制性酶作用的抑制实验^[16] 的结果验证. 可见, PNA 与 DNA 的结合具有高度的特异性.

另外, 由于 PNA 骨架的非手性特征, 也使其具有了不同于其他寡核苷酸类似物的性质. 即它与互补 DNA 的结合可以发生在两个取向上, 既可平行于靶 DNA, 又可与之反平行^[17], 二种杂交复合物的稳定性稍有差别^[11,17].

4 分子生物学研究

同其他能与 DNA 形成三链复合物的寡核苷酸类似物相似, PNA 亦可通过与双链 DNA 结合而干扰该 DNA 序列识别蛋白发挥作用. 例如, 当 PNA 的作用靶点与限制性内切酶的识别序列相近时, 限制性内切酶对 DNA 的切

断作用则完全被抑制^[18]. 因此, PNA 可用作 DNA 识别蛋白的特异阻断剂.

含纯嘧啶碱基的 PNA 能通过链取代机制, 局部解开 DNA 双链, 被取代的 DNA 单链可被核酸酶 S_1 降解. 因此, 当两个 PNA 的靶点在一段 DNA 双链上的邻近位置时, 尤其当它们分别处于两条链上时, 利用与靶序列互补的 PNA 片段, 就可达到选择性地断裂双链 DNA 的目的. 使核酸酶 S_1 具有类似限制性内切酶的活性^[12].

普通的寡核苷酸只有通过补骨脂素光交联作用, 与模板 DNA 共价结合或在启动区形成三链复合物, 才能抑制转录过程^[21]. 而 PNA_2/DNA 因其高度的稳定性, 当 PNA 与 DNA 结合时, 在结合位置就可使 RNA 聚合酶被抑制, 而导致转录的终止. 体外转录实验中, PNA 对 RNA 聚合酶 T3、T7 参与的转录过程的抑制作用证明了以上观点^[2, 5, 16].

PNA 还用于 PCR 钳制 (PCR clamping) 来探测 DNA 中点突变的存在. 分别合成与野生型 DNA 互补的 PNA 寡聚物和与突变 DNA 序列互补的 DNA 引物. 让两者与待测 DNA 发生竞争结合. 若 PNA 优先结合, 则 DNA 增殖终止, 表明所测 DNA 未发生突变; 反之, 突变 DNA 引物优先与待测 DNA 结合, DNA 继续增殖, 表明待测 DNA 中存在着突变序列. 利用 PNA 来探测点突变, 是比较准确的^[22].

总之, PNA 与 DNA 杂交复合物的高度稳定性及序列特异性, 使 PNA 广泛用于各种分子生物学技术中.

5 反义活性

目前的寡核苷酸类似物不能通过与 mRNA 结合而直接抑制翻译过程. 而只有当其定靶于 mRNA 上的一个控制区, 如核糖体的结合位点, 或当寡核苷酸与 mRNA 形成的复合物被 RNA H 酶降解时, 翻译过程才可被终止.

对 PNA 反义活性的研究却发现, 在体外翻译实验中, 由 20 个碱基单体形成的 PNA,

可导致其结合位点上翻译终止^[4, 20]. 通过免疫荧光显微观察发现, 定靶于 SV40 T 抗原 mRNA 的 PNA 微注入细胞后, 可抑制 T 抗原上靶基因的表达^[5, 20]. 而这种抑制作用并不借助 RNA H 酶的作用.

6 结 论

目前研究表明, PNA 与 DNA 的结合具有较普通寡核苷酸更好的亲和力和特异性^[13, 18]. PNA 的化学稳定性亦较好, 又因它既非蛋白, 又非核酸, 因而在体内不易被酶降解^[18]. 从合成角度来看, 多肽合成又比核酸合成灵活度高^[3], 使 PNA 可进行较大规模 (millimole or mole) 生产, 因而有希望成为一类理想的反义试剂.

但同时, PNA 骨架的水溶性大, 使细胞摄入 PNA 成为一个问题^[5]. 再加上 PNA 和双链 DNA 的结合需在低离子强度下进行, 给它在人体内生理环境下发挥作用带来不便^[5].

总之, 对 PNA 的研究尚需深入, 其前景有待进一步探讨.

参 考 文 献

- 1 Milligan J F, Matteucci M D, Martin J C. *J Med Chem*, 1993; **36** (14): 1923
- 2 Nielsen P E, Egholm M, Berg R H *et al.* *Anti-Cancer Drug Design*, 1993; **8**: 53
- 3 Egholm M, Buchardt O, Nielsen P E *et al.* *J Am Chem Soc*, 1992; **114**: 1895
- 4 Maher III L J, Wold B, Derwan P B. *Science*, 1989; **245**: 725
- 5 Nielsen P E, Egholm M, Buchardt O. *Bioconjugate Chem*, 1994; **5**: 3
- 6 Hyrup B, Egholm M, Nielsen P E *et al.* *J Am Chem Soc*, 1994; **116**: 7964
- 7 Hyrup B, Egholm M, Rolland M *et al.* *J Chem Soc Chem Commun*, 1993; (6): 518
- 8 Alamarsson O, Brnice T C. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993; **90**: 9542
- 9 Alamarsson O, Bruce T C, Kerr J *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993; **90**: 7518
- 10 Dueholm K L, Egholm M, Buchardt O. *Org Prep Proc Inc*, 1993; **25** (4): 457

- 11 Egholm M, Nielsen P E, Buchardt O *et al.* J Am Chem Soc, 1992; **114**: 9677
- 12 Bemidov V, Frank-Kamenetskii M D, Egholm M *et al.* Nucleic Acid Research, 1993; **21** (9): 2103
- 13 Nielsen P E, Egholm M, Berg R H *et al.* Science, 1991; **254**: 1497
- 14 Rose D J. Anal Chem, 1993; **65**: 3545
- 15 Cherny D Y, Belosterkovskii B D, Frank-Kamenetskii *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1993; **90**: 1667
- 16 Nielsen P E, Egholm M, Berg R H *et al.* Nucleic Acid Research, 1993; **21** (2): 197
- 17 Egholm M, Buchardt O, Christensen L *et al.* Nature, 1993; **365** (7): 566
- 18 Francois J C, Behmoaras T S, Thutong N T *et al.* Biochemistry, 1989; **28**: 9617
- 19 Kim S K, Nielsen P E, Egholm M *et al.* J Am Chem Soc, 1993; **115** (15): 6477
- 20 Hanvey J C, Peffer N J, Bisi J E *et al.* Science, 1992; **258**: 1481
- 21 Wittung P, Nielsen P E, Buchardt O *et al.* Nature, 1994; **368** (7): 561

- 22 ørum H, Nielsen P E, Egholm M *et al.* Nucleic Acid Research, 1993; **21** (23): 5332

Peptide Nucleic Acid. Zhang Ligang, Min Jimei, Zhang Lihe (*National Key Laboratory of Natural and Biometric Drug, Beijing Medical University, Beijing 100083, China*).

Abstract A DNA analogue was designed in a computer model by replacing the deoxyribose phosphate backbone in DNA with a peptide backbone. Its binding to the complementary oligonucleotide was observed with great specificity. PNA's synthesis, hybridization and its application in molecular biology etc. were reviewed.

Key words peptide nucleic acid (PNA), oligonucleotides, antisense hybridization, specificity

膜蛋白的拓扑学

王庆达 林其谁

(中国科学院上海生物化学研究所, 分子生物学国家重点实验室, 上海 200031)

摘要 膜蛋白的拓扑学是研究膜蛋白三维结构的出发点。利用融合蛋白和化学修饰等实验技术已确定了很多膜蛋白的拓扑学。对膜蛋白的转运与插膜的研究确定可能存在两类插膜元件。对已知拓扑学的膜蛋白的统计分析以及蛋白质工程的研究表明存在膜蛋白拓扑学的内正规则。目前已形成预测膜蛋白的拓扑学的比较可靠的策略, 这在反向生物学上具有重要意义。但要进行三维结构的预测还有许多路要走。

关键词 膜蛋白, 蛋白质拓扑学, 结构预测

膜蛋白的拓扑可定义为它来回穿膜的方式, 即跨膜片段在氨基酸序列中的定位和分子在膜上的总的定向。拓扑代表了膜蛋白的二级结构, 可看作是膜蛋白的折叠中间体, 它是预测膜蛋白三维结构的出发点。

成束螺旋蛋白 (helix-bundle proteins) 代表了一类最丰富的膜蛋白, 它们由一束基本垂

直于膜平面的跨膜 α 螺旋以及连接这些跨膜螺旋的环 (外周环和胞质环) 组成。本文主要讨论这一类膜蛋白的拓扑学。其他类型的膜蛋白, 例如在革兰氏阴性菌外膜和线粒体外膜上发现的 β 桶 (β -barrel) 类型的膜蛋白^[1,2], 目