

脱氧核酶研究进展

詹林盛* 王全立 孙红琰

(军事医学科学院野战输血研究所, 北京 100850)

摘要 使用体外分子进化技术, 从一个人工合成的随机多核苷酸单链 DNA 库中筛选出具有酶活性的 DNA 分子, 称为脱氧核酶. 目前已经筛选出具有 RNA 切割作用、DNA 切割作用、金属螯合作用和过氧化物酶活性、DNA 激酶活性以及 DNA 连接酶活性等多种催化功能的脱氧核酶. 特别是脱氧核酶 10~ 23, 无论在体外应用于 RNA 限制性内切酶, 还是在生物系统内作为 RNA 水平上的基因失活剂, 都具有很好的应用前景.

关键词 脱氧核酶, 体外筛选, 催化活性, 脱氧核酶 10~ 23

学科分类号 Q55

自然界中绝大多数的酶是由蛋白质构成, 近年来发现 RNA 也具有催化功能 (称为核酶), 而 DNA 在自然界中主要以双螺旋形式存在, 被认为是一种被动分子, 仅适合于编码和携带遗传信息, 其结构及化学特征限制了本身具备其他功能的可能性. 但近年来随着体外分子进化技术 (SELEX) 的发展, 发现 DNA 也具有酶的活性 (称为脱氧核酶).

1 脱氧核酶的体外筛选

Breaker 等^[1]根据 SELEX 技术的原理建立了以 PCR 为基础的体外“催化洗脱”筛选系统. 首先合成一个随机的多核苷酸单链 DNA 库, 随机库的两端为固定序列, 中间为 50~ 100 个随机核苷酸. 以此随机单链库为模板, 用一个 RNA-DNA 杂合分子作为引物, 在逆转录酶的催化下, 将单链库转变为双链库, 此双链库就引入了 RNA 靶序列. RNA 的引入是一个关键步骤, 这样就把潜在的催化型 DNA 与 RNA 分子连在一起, 从而进行以分子内切割为基础的选择反应. RNA 的引入是由一个人工合成的 RNA-DNA 杂合分子介导的, 这杂合分子的特征是: 12~ 15 个核苷酸的 RNA 的 5' 端有一个固定序列, 其 3' 端含有一个互补于模板 3' 端的序列. 另外, 这一杂合引物的 5' 端还含有一个生物素基团, 用于以后的亲和柱分离.

接着将双链随机库核酸分子通过链亲和素柱, 通过生物素基团结合于链亲和素柱上, 经碱变性, 洗脱下不含生物素的一条单链 DNA, 从而产生了一个固相化的单链随机寡核苷酸库. 在一定的温度和 pH 下, 用一定的离子缓冲液洗脱柱子, 若有切

割反应发生, 被切割的分子就被洗脱下来. 再经 PCR 放大和亲和分离, 可重新回到与起始库类似的随机库, 从而完成了第一轮筛选. 经过 10 多轮筛选即可产生具有催化功能的分子. 再对功能分子进行克隆及测序, 并由此推测其二级结构.

2 脱氧核酶的性质

随着越来越多的脱氧核酶被筛选出, 对其功能性质的研究也随之深入, 发现脱氧核酶具有 RNA 切割作用、DNA 切割作用、金属螯合作用和过氧化物酶活性、DNA 激酶活性以及 DNA 连接酶活性等多种催化功能.

2.1 RNA 切割作用

脱氧核酶最重要的一种性质, 也是目前研究最活跃的一个方面, 是具有通过酯化作用而切割 RNA 分子的功能. DNA 这种独特的性质, 使其有可能应用于破坏体内细胞和病毒的 RNA, 具有潜在的体内治疗作用. 脱氧核酶发挥 RNA 切割作用有以下几种形式:

2.1.1 以金属离子为辅因子: Breaker 等^[1,2]用“催化洗脱”的方法从一个随机序列库中筛选出一系列二价金属离子依赖的具有 RNA 切割作用的脱氧核酶, 分别以 Mg^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 等为辅因子. Faulhammer 等^[3,4]使用 Ca^{2+} 、 Cd^{2+} 为辅因子, 同样筛选出具有 RNA 切割作用的脱氧核酶, 扩展了金属辅因子的范围. 每一种结构脱氧核酶依赖的二价金属离子种类和程度都有差别, 具有

* 通讯联系人.

Tel: 010-66931222, E-mail: zhanls@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2001-04-05, 接受日期: 2001-05-24

特异性, 这种特异性表明脱氧核酶存在一个或几个对几何形状和大小尺寸有严格要求的金属离子结合位点. 金属离子的作用可能是促进 DNA 正确折叠以形成催化中心, 保持脱氧核酶处于活性状态, 稳定反应物的中间过渡态, 以及屏蔽寡核苷酸所带的负电荷, 以利于酶与 RNA 底物杂交等. 另外, 三价的稀土元素镧系金属离子 (铽、铈、镧) 也可作为辅因子, 协助脱氧核酶空间折叠和发挥催化作用^[5].

特别是 Santoro 等^[6]筛选出的两个 Mg^{2+} 依赖的脱氧核酶, 能切割所有 RNA 底物, 分别命名为“8~17”和“10~23”(图 1), 都由结合部位和催化部位组成, 结合部位通过 Watson-Crick 碱基配对与底物 RNA 分子结合, 而催化部位在 RNA 分子的一个未配对的嘌呤和一个已配对的嘧啶碱基处切割 RNA. 改变结合部位的碱基序列就可作用于不同底物 RNA 靶分子.

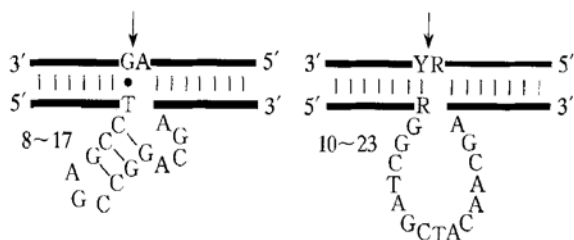


Fig 1 Deoxyribozyme 8~17 and Deoxyribozyme 10~23
图 1 脱氧核酶 8~17 和脱氧核酶 10~23

2.1.2 以氨基酸为辅因子: 除了金属辅因子外, 脱氧核酶还可利用氨基酸作为辅因子. Roth 等^[7]筛选出一个以 L-组氨酸为辅因子的脱氧核酶, 只有在 L-组氨酸存在的条件下才发挥 RNA 切割作用, 而 D-组氨酸不能有效促进脱氧核酶的切割功能, 说明 DNA 能够形成精确的空间结构以识别底物分子和辅因子. 组氨酸作为一般碱催化剂起着独特作用, 起主要作用的是分子内的咪唑基团. 另外精胺也可作为辅助因子, 依赖精胺的脱氧核酶的切割机制与锤头状核酶相似, 产生游离的 5'-OH 和 2', 3'-环磷酸基团.

2.1.3 自身具有 RNA 切割作用: 不需要任何辅因子, 单链 DNA 分子依靠自身的结构变化也具有 RNA 切割作用. Geyer 等^[8]用二价金属离子螯合剂 EDTA 排除二价金属离子的污染, 并进行准确的微量金属分析, 在确认没有二价金属离子或其他适合辅因子存在的条件下, 通过“催化洗脱”的方法筛选到一个具有 RNA 切割作用的脱氧核酶, 命

名为“G3”. 与不加酶的反应相比, 它提高催化效率 10^8 倍. 此研究表明 DNA 分子自身也能提供具有活性的化学基团而发挥催化效应.

2.2 DNA 切割作用

脱氧核酶不仅具有 RNA 切割作用, 而且也能切割 DNA 分子. Carmi 等^[9]筛选出两类具有 DNA 自我切割作用的脱氧核酶, I 类自我切割脱氧核酶需要 Cu^{2+} 和维生素 C 参与, 而 II 类脱氧核酶只需要 Cu^{2+} . II 类脱氧核酶以顺式方式切割 DNA 靶分子, 与不加酶的反应相比, 它提高催化效率 10^6 倍. 多数脱氧核酶只能与底物形成二联体形式, 而 II 类脱氧核酶能与底物形成二联体或三联体形式, 结合并切割 DNA 底物, 通过改变二联体或三联体的识别位点, 就可以切割不同核苷酸序列的单链 DNA 分子. 因此脱氧核酶还可以作为简单的限制性内切酶, 位点特异性地切割单链 DNA 分子.

2.3 卟啉金属螯合作用和过氧化物酶活性

Li 等^[10]分离到一个 DNA 配基 (aptamer), 能催化 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 螯合到卟啉环底物上, 命名为“PS5.ST1”, 其 K_{cat} 和米氏常数 K_m 值分别为 0.23 min^{-1} 和 2.9 mmol/L . 在随后的实验中, 他们通过优化 DNA 配基序列和反应参数, 提高了 DNA 配基的催化能力, 筛选出一个只有 24 nt 富含鸟嘌呤 (G) 的脱氧核酶“PS5M”. PS5M 形成一个 G 四聚体结构的催化活性中心, 结合一个扭曲的卟啉分子, 使卟啉分子类似于金属螯合反应的中间过渡态, 从而促进了金属的螯合作用. PS5M 还能与血红素结合, 形成的复合物具有过氧化物酶活性, 能催化氯高铁血红素-氢过氧化物的分解^[11].

2.4 DNA 激酶活性

脱氧核酶还具有 DNA 激酶活性, 类似 T4 多核苷酸激酶的作用, 能把 NTP 或 dNTP 上的 γ -磷酸基团转移到 DNA 的 5'-OH 上. Li 等^[12]从一个随机单链 DNA 库中筛选出 50 个不同序列类型的具有自我磷酸化作用的脱氧核酶, 都能把 NTP 或 dNTP 上的 γ -磷酸基团转移到 DNA 的 5'-OH 上, 实现 DNA 分子 5'-OH 端自我磷酸化. 通过优化反应条件, 脱氧核酶还能区分 NTP 和 dNTP. 其中一个优化的 ATP 依赖的脱氧核酶能特异性地选择 ATP, 高出 CTP、GTP 及 UTP 4 000 倍. 相对于不加酶的 ATP 水解反应, 脱氧核酶提高催化效率 10^6 倍.

2.5 DNA 连接酶活性

Li 等^[13]从一个随机序列 DNA 库中筛选出 12

个具有连接酶活性的脱氧核酶, 都能促进 ATP 依赖的自我“加帽”反应, 即把 ATP 上的 AMP 基团转移到脱氧核酶自身的 5' 端磷酸基团上, 形成 5', 5'-磷酸连接, 与 T4 DNA 连接酶活性相同. 其中一个 41nt 的脱氧核酶需要 Cu^{2+} 作为辅因子, 能识别 ATP 或 dATP 上的腺苷和三磷酸化合物, 催化效率为 $10^4 \text{ mmol/L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. 结构分析表明这种脱氧核酶的活性部位是个 G 四聚体结构.

3 脱氧核酶的应用前景

尽管自然界没有发现脱氧核酶, 但实验已证明 DNA 具有酶活性. 由于脱氧核酶比核酶更加稳定, 且相对生产成本低廉, 脱氧核酶的开发应用已成为新药开发的热门课题. 目前对脱氧核酶的结构和功能已有初步了解, 但多数研究仍处于实验阶段. 还必须继续寻找新的催化效率更高的脱氧核酶, 进一步了解其结构和功能特点.

目前最具有应用前景的是脱氧核酶 10~ 23, 作为一种潜在的强有力的 RNA 特异性切割工具, 无论是在体外应用于 RNA 限制性内切酶, 还是在体内作为 RNA 水平上的基因失活剂, 具有很好的应用前景. 脱氧核酶 10~ 23 由 29 个核苷酸组成, 其中催化中心有 15 个核苷酸 (GGCTAGCTACAACGA), 催化中心的两侧各连有 7 个核苷酸的结合臂, 用于结合底物 RNA. 切割反应发生在 RNA 分子的嘌呤 (G 或 A) 与嘧啶 (U 或 C) 之间, 切割反应产生的 5' 端产物带有 2'-3' 环型磷酸基团, 3' 端产物含有自由的 5'-OH^[6].

脱氧核酶 10~ 23 的酶动力学研究表明, 其催化效率 K_{cat}/K_m 可达到 $10^9 \text{ mol/L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 以上, 比 RNase、发夹型核酶及锤头型核酶的催化效率更高. 其催化效率以及与靶分子结合的特异性与结合臂的长度和序列相关^[14].

研究表明脱氧核酶 10~ 23 与 HIV-1gag/pol、env、vpr、tat 和 nef 的 mRNA 转译起始区 15~ 17 个单核苷酸一致的合成底物作用, 都能在预期位点准确、高效地切割底物 mRNA 分子, 从而抑制这些基因的表达^[6]. 结合臂为 7×7 结构的 10~ 23 能在 RNA 的 A·UG 位点处有效切割 HIV-1 化学趋化因子受体 CCR5 的 mRNA, 并抑制细胞的融合活性^[15]; 8×8 结构的 10~ 23 能在 G·CC 和 A·UG 位点处切割体外转录的 Huntingtin mRNA, 并在共转染体系中降低 Huntingtin 蛋白的表达^[16]; 9×9 结构的 10~ 23 能在人 c-myc mRNA 的起始密码 A·

UG 处切割 mRNA, 阻断 c-myc 表达并抑制动脉平滑肌细胞增殖^[14]; 10~ 23 还能切割 bcr-abl mRNA, 抑制其在 HeLa 细胞中表达, 并抑制慢性白血病人 CD_{34}^+ 骨髓细胞增殖^[17, 18]. 这些研究都表明脱氧核酶 10~ 23 在基因治疗方面具有潜在的应用价值.

但要使脱氧核酶真正用于人类疾病的防治, 仍有很长的路要走. 包括脱氧核酶如何导入细胞与表达; 脱氧核酶引入细胞后的稳定性; 脱氧核酶结构的设计, 特别是选择合适长度的侧翼; 底物的选择以及如何提高脱氧核酶的活性等方面均有待进一步探索 and 解决.

参 考 文 献

- 1 Breaker R R, Joyce G F. A DNA enzyme that cleaves RNA. *Chem Biol*, 1994, **1** (4): 223~ 229
- 2 Breaker R R, Joyce G F. A DNA enzyme with Mg^{2+} dependent RNA phosphoesterase activity. *Chem Biol*, 1995, **2** (10): 655 ~ 660
- 3 Faulhammer D, Famulok M. The Ca^{2+} ion as a cofactor for a novel RNA cleaving deoxyribozyme. *Angew Chem Int Ed Engl*, 1996, **35** (5): 2837~ 2841
- 4 Faulhammer D, Famulok M. Characterization and divalent metal-ion dependence of *in vitro* selected deoxyribozymes which cleave DNA/RNA chimeric oligonucleotides. *J Mol Biol*, 1997, **269** (2): 188~ 202
- 5 Geyer C R, Sen D. Lanthanide probes for a phosphodiester-cleaving, lead-dependent, DNAzyme. *J Mol Biol*, 1998, **275** (3): 483~ 489
- 6 Santoro S W, Joyce G F. A general-purpose RNA-cleaving DNA enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (9): 4262~ 4266
- 7 Roth A, Breaker R R. An amino acid as a cofactor for a catalytic polynucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** (11): 6027 ~ 6031
- 8 Geyer C R, Sen D. Evidence for the metal-cofactor independence of an RNA phosphodiester cleaving DNA enzyme. *Chem Biol*, 1997, **4** (8): 579~ 593
- 9 Carmi N, Shultz L A, Breaker R R. *In vitro* selection of self-cleaving DNAs. *Chem Biol*, 1996, **3** (12): 1039~ 1046
- 10 Li Y, Sen D. A catalytic DNA for porphyrin metallation. *Nat Struct Biol*, 1996, **3** (9): 743~ 747
- 11 Li Y, Sen D. Towards an efficient DNAzyme. *Biochemistry*, 1997, **36** (18): 5589~ 5599
- 12 Li Y, Breaker R R. Phosphorylation DNA with DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (6): 2746~ 2751
- 13 Li Y, Liu Y, Breaker R R. Capping DNA with DNA. *Biochemistry*, 2000, **39** (11): 3106~ 3114
- 14 Sun L Q, Cairns M J, Gerlach W L, *et al.* Suppression of smooth muscle cell proliferation by a c-myc RNA-cleaving deoxyribozyme. *J Biol Chem*, 1999, **274** (24): 17236~ 17241
- 15 Goila R, Banerjee A C. Sequence-specific cleavage of the HIV-1 coreceptor CCR5 gene by a hammer-head ribozyme and a DNA-enzyme: inhibition of the coreceptor function by DNA-enzyme. *FEBS Lett*, 1998, **436** (2): 233~ 238
- 16 Yen L, Strittmatter S M, Kalb R G. Sequence-specific cleavage of Huntingtin mRNA by catalytic DNA. *Ann Neurol*, 1999, **46**

- (3): 366~ 373
- 17 Warashina M, Kuwabara T, Nakamatsu Y, *et al.* Extremely high and specific activity of DNA enzymes in cell with a Philadelphia chromosome. *Chem Biol*, 1999, **6** (4): 237~ 250
- 18 Wu Y, McMahon R, Rossi J, *et al.* Inhibition of bcr-abl oncogene by novel deoxyribozymes (DNAzymes). *Hum Gene Ther*, 1999, **10** (17): 2847~ 2857

Progress on Deoxyribozymes

ZHAN Lin-Sheng^{*}, WANG Quan-Li, SUN Hong-Yan

(*Institute of Transfusion Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China*)

Abstract DNAs with catalytic potential isolated from a ssDNA pool with random-sequence *in vitro* selection, were called deoxyribozymes or DNAzyme. Deoxyribozymes that exhibit RNA transesterification, DNA transesterification, porphyrin metalation and peroxidase activities, DNA kinase activity and DNA ligase activity have recently been reported. Deoxyribozyme 10~ 23 might act as a sequence-specific RNA endoribonuclease *in vitro*, and could be used to inactivate target cellular RNA *in vivo*.

Key words deoxyribozymes, *in vitro* selection, catalytic activity, deoxyribozyme 10~ 23

^{*} Corresponding author. Tel: 86-10-66931222, E-mail: zhanls@nic.bmi.ac.cn

Received: April 5, 2001 Accepted: May 24, 2001