

分子信标连接体系用于核酶切割产物的超灵敏检测

孟祥贤 唐志文 王柯敏* 谭蔚泓 羊小海 李军 郭秋平

(湖南大学化学生物传感与计量学国家重点实验室, 生命科学与技术研究院, 湖南省生物纳米工程技术研究中心, 化学化工学院, 长沙 410082. *联系人, E-mail: kmwang@hnu.cn)

摘要 建立了一种新的核酶切割产物的超灵敏检测方法. 利用分子信标作为核酶切割产物的连接模板和检测分子, 在 RNA/DNA 核酸杂合体连接过程中, 核酶切割产物的信息被实时转换为荧光信号. 该方法实现了在不标记核酶或 RNA 底物的情况下, 高灵敏、高特异性地检测核酶切割产物, 检测下限可达 0.05 nmol/L. 为真实准确地反映核酶切割反应提供了一种简便快捷的非同位素分析方法, 也为核酶基因药物的快速筛选、核酶动力学、核酶在基因治疗中的深入研究提供了全新的思路和技术. 应用该方法对丙型肝炎病毒锤头核酶的切割产物进行了检测.

关键词 分子信标连接体系 核酶切割 核酸连接 丙型肝炎病毒锤头核酶

核酶(Ribozyme, RZ)是具有切割特定RNA或mRNA能力的小RNA分子^[1]. 在抗病毒、抗恶性肿瘤基因治疗研究中有着广阔的应用前景^[2-5]. 核酶切割RNA底物, 生成 2'(3')-环磷酸和 5'-羟基末端切割产物^[6]. 传统检测核酶切割产物的方法是用放射性同位素标记和聚丙烯酰胺凝胶电泳相结合的方法^[6-9], 操作复杂, 耗时长. 近年发展的基于荧光的检测方法, 如荧光共振能量转移法^[10-12], 荧光熄灭法^[13], 荧光各向异性法^[14], 2-aminopurine探针法^[15]和本实验室以丙型肝炎病毒RNA(HCV-RNA)为底物, 将其两端进行标记构建的分子信标核酶探针法^[16], 都能方便地对核酶切割产物进行检测. 但是这些方法需要将核酶或RNA底物进行标记, 不利于临床研究及应用.

利用分子信标连接体系, 我们实时监测了DNA与DNA之间的连接过程^[17-19]及DNA磷酸化过程^[20]. 本文在此基础上, 发展了一种核酶切割产物的检测新方法. 该方法不需要对核酶或RNA底物进行标记, 利用分子信标作为核酶切割产物(RNA片段)与待连接DNA片段的连接模板和检测分子在RNA/DNA核酸杂合体连接过程中, 实现核酶切割产物的高灵敏、高特异性的检测. 检测下限可达 0.05 nmol/L, 其线性响应范围为 0.25~40 nmol/L. 应用该方法, 快速、准确地检测了锤头核酶切割HCV-RNA的产物, 该方法还可用于其他核酶切割产物及RNA活性物质的检测.

1 实验

1.1 试剂和仪器

试剂: 核酶RZ: 5'-GCA CGG UCC UGA UGA GUC CGU GAG GAC GAA ACG AGA CCU C-3'; 底

物HCV-RNA: 5'-GAG GUC UCG UAG ACC GUG CAC-3'; 分子信标MB: 5'-FAM-CGTCGAGTGCA-CGGTCTGGAGCACTTCGACG-DABCYL-3', 5'端标记荧光基团 6-羧基-荧光素(FAM), 3'端标记熄灭基团 4-(4'-二甲对氨基偶氮苯)苯甲酸(DABCYL); 模拟核酶切割产物N1: 5'-OHGACCGUGCAC-3'; 待连接DNA片段N2: 5'-AGTGCTCCA-3'; 分子信标互补序列N3: 5'-AGTGCTCCAGACCGTGCAC-3'; 对照RNA序列N4: 5'-OH CUGGAUGACG -3', 以上序列由大连宝生物公司(Takara)合成. T4 DNA 连接酶(Takara), T4 多聚核苷酸激酶(Takara), 焦碳酸二乙酯(DEPC, Sigma), Spermine(Sigma), 其他试剂均为国产分析纯. 实验所用水及试剂配制均经过DEPC处理(0.1% DEPC室温处理 12 h后高压灭菌), 实验器皿均经过 0.1% DEPC或高温处理.

仪器: 法国 Jobin Yvon Fluolog Flau3 荧光分光光度仪, 美国 Thermo Neslab 恒温水浴.

1.2 实验方法

() 荧光强度测定. 分子信标荧光基团为 FAM, 实验中荧光强度的测定采用 469 nm 激发, 在 518 nm 处检测. 仪器的入射狭缝与发射狭缝都设为 5 nm. 检测温度为 37 . T4 DNA 连接酶在样液中恒温 10 min, 荧光值稳定后用微量进样器加入, 搅拌溶液 4 s, 连续进行荧光强度的时间扫描. 样品的发射光谱在 469 nm 激发, 490 nm 至 590 nm 区间扫描荧光强度获得.

() RNA核酸片段的磷酸化实验. 选用T4多聚核苷酸激酶(PNK酶)对RNA性质的模拟核酶切割产

物和真实核酶切割产物进行 5' 羟基末端寡核苷酸的磷酸化^[21]。磷酸化反应液为: 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.6), 20 mmol/L MgCl₂, 5 mmol/L DTT, 1 mmol/L ATP, 1.0 U T4 PNK 酶, 3 μmol/L N1 或 N4. 37 °C 磷酸化反应 30 min 后, 于 80 °C 处理 5 min, 灭活 PNK 酶. 反应体积为 50 μL. p-N1 代表 5' 磷酸化的 N1, p-N4 代表 5' 磷酸化的 N4.

() RNA/DNA 核酸杂合体的连接. 配制底液 A: 100 mmol/L Tris-HCl (pH 7.6), 10 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L DTT, 0.1 mmol/L ATP, 300 nmol/L MB; 配制底液 B: 在底液 A 中加入 300 nmol/L N2.

核酸连接效率的实验需配制 3 种溶液: (1) 在底液 B 中加入终浓度为 300 nmol/L 的 p-N1 及 1.5 U T4 DNA 连接酶; (2) 在底液 A 中加入终浓度为 300 nmol/L 的 N3; (3) 底液 A.

核酶切割产物检测实验需配制 4 种溶液: 在底液 B 中分别加入终浓度为 300 nmol/L 的 p-N1, N1, p-N4, 另一个是底液 A. 在核酶切割产物灵敏度检测实验中, 在底液 B 中分别加入 40, 25, 15, 6, 0.25, 0.05, 0 nmol/L 浓度的 p-N1. 反应体积为 150 μL, 反应温度为 37 °C, 加入的 T4 DNA 连接酶为 1.5 U.

() 锤头核酶切割 HCV-RNA 的切割反应及切割产物的检测. 切割缓冲液参考文献^[16]并稍作修改: 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.6), 20 mmol/L MgCl₂, 0.5 mmol/L Spermine, 100 nmol/L HCV-RNA, 分别加入终浓度为 1, 2, 3 μmol/L 的核酶 RZ. 反应体积为 100 μL. 在 37 °C 切割反应进行 1 h 后, 在溶液中加入 1.0 U T4 PNK 酶及终浓度为 1 mmol/L 的 ATP 和 5 mmol/L 的 DTT, 于 37 °C 磷酸化反应 30 min, 80 °C 处理 5 min. 取出 20 μL 磷酸化核酶切割产物, 参考步骤 (), 在底液 B 中进行检测.

2 结果与讨论

2.1 实验原理

本文以 HCV-RNA 的 5' 端非编码区高度保守的一段序列为核酶的底物, 进行切割反应. 分子信标连接体系对核酶切割产物的检测原理见图 1. HCV-RNA 底物在锤头核酶切割作用下, 生成 5' 端带羟基的切割产物 N1 和另一段产物 N0 (图 1(a)). 在 PNK 酶作用下, N1 被磷酸化, 生成磷酸化的 N1 (p-N1) (图 1(b)). 图 1(c) 是分子信标连接体系对 p-N1 的检测. 分子信标环部被设计与 N1 及待连接的 DNA 片段 N2 互补, 连接酶识别并结合到 p-N1 与 N2 核酸杂合体的切口

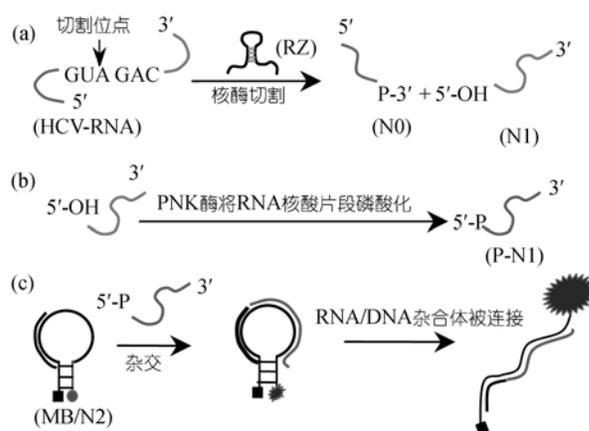


图 1 分子信标连接体系用于检测核酶切割产物原理的示意图

(a) 锤头核酶 RZ 切割 HCV-RNA 底物; (b) 在 PNK 酶作用下, 5'-羟基末端核酶切割产物磷酸化; (c) 分子信标连接体系检测核酶切割产物. 磷酸化核酶切割产物与分子信标杂交, 在连接酶作用下, 与待连接的 DNA 片段连接, 使分子信标打开, 产生荧光

部位, 将两个核酸片段连接成一条与分子信标互补的核酸长链, 分子信标被打开, 荧光信号得以恢复. 在连接过程中, 分子信标不仅起到了监测 RNA/DNA 核酸杂合体连接过程的作用, 还作为模板参与了连接反应, 将核酸杂合体连接反应的信息实时转换为荧光信号, 实现对核酶切割产物的灵敏监测.

2.2 分子信标连接体系检测核酶切割产物的标准体系

从图 1 可知, 分子信标连接体系对核酶切割产物的检测涉及到切割、磷酸化及连接等反应, 是一个复杂的过程. 首先用合成的一段 RNA 序列 N1, 模拟核酶切割 HCV-RNA 生成的 5' 端带羟基的切割产物, 建立标准检测体系.

(1) 核酶切割产物与待连接 DNA 片段的连接效率. 模拟核酶切割产物 N1 (5' 端带羟基) 必须经过 PNK 酶磷酸化后才能参与连接反应, p-N1 代表 PNK 酶磷酸化的 N1. p-N1 与待连接的 DNA 片段 N2 的连接效率直接影响分子信标检测体系的灵敏度. 图 2 考察了 p-N1 与 N2 的连接反应, 3 个样液的发射光谱从上至下分别是分子信标与完全互补的 N3 (MB+N3)、分子信标与 p-N1 及 N2 (MB+p-N1+N2)、分子信标本底 (MB). 从图中可以看出, 分子信标与完全互补 DNA 链杂交后荧光强度明显增强 (曲线 1), 是分子信标本底的 11 倍, 而分子信标与 p-N1 及 N2 在连接酶连接作用下荧光强度也明显增强 (曲线 2), 达到分子

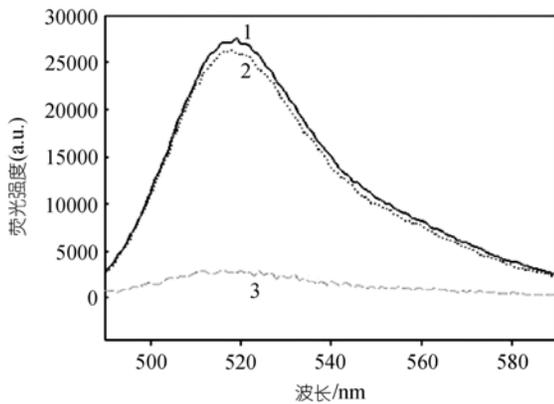


图 2 核酶切割产物与待连接的 DNA 片段的连接效率
曲线 1~3 分别是 MB+N3, MB+N2+p-N1, MB

信标本底的 10.5 倍, 这说明 p-N1 与 N2 的连接效率很高, 此体系适合检测核酶切割产物的 RNA 片段.

(2) 核酶切割产物的检测. 核酶切割产物的检测见图 3. 曲线 1 是核酶切割产物 p-N1 与待连接 DNA 片段 N2 的荧光强度的时间扫描, 在 t_0 时加入连接酶, 荧光强度迅速而持续上升, 这是由于连接酶将 p-N1 与 N2 的之间缺口连接, 形成一条与 MB 互补的核酸长链, 使 MB 打开, 荧光强度恢复. 为验证体系中荧光强度的增加是由于 p-N1 与 N2 之间的连接产生的, 而不是由于体系中其他核酸片段或连接酶引起, 设计了 3 个对照实验. 曲线 2 是对照 RNA 序列 p-N4 与 N2 荧光强度的时间扫描图, 在 t_0 时加入连接酶, 发现荧光强度没有明显变化, 说明非核酶切割产物的核酸片段对荧光没有增强作用; 曲线 3 是没有磷酸化的 N1 与 N2 的作用曲线, 加入连接酶, 由于没有磷酸化的 N1 不能参与连接反应, 荧光信号没有明显

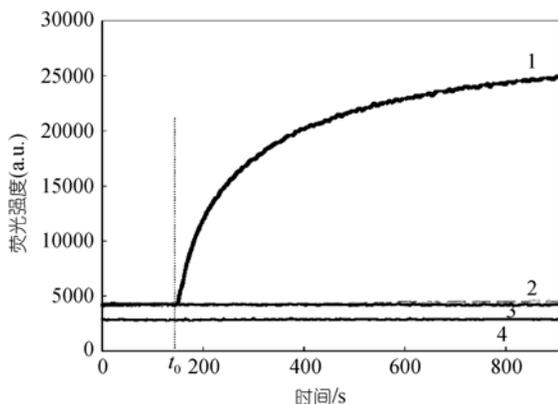


图 3 核酶切割产物检测图

曲线 1~4 分别是 MB+N2+p-N1, MB+N2+p-N4, MB+N2+N1, MB 的检测曲线. 时间 t_0 处加入 1.5 U 的 T4 DNA 连接酶

的变化; 曲线 4 是 MB 本底, 加入连接酶, 荧光强度同样没有的变化; 明显的变化, 说明连接酶在检测体系中对荧光信号没有影响. 以上结果表明: 曲线 1 中荧光强度的增加是由于 p-N1 与 N2 连接产生的. 分子信标连接体系通过将核酶切割产物的信息实时同步转换为荧光信号, 实现核酶切割产物快速简便的检测.

(3) 核酶切割产物灵敏度检测. 分子信标作为一种设计巧妙的核酸探针, 具有很高的灵敏度与特异性^[22], 为检测低浓度核酶切割产物提供了一种可行的手段. 图 4 是不同浓度的核酶切割产物 p-N1 的时间扫描图. 从图中可知, 随着 p-N1 浓度的增加, 荧光强度逐渐增强. 荧光强度的增加与核酶切割产物的浓度密切相关, 根据文献^[17]计算连接反应的初速度, 插图给出了连接反应初速度与核酶切割产物浓度之间的关系, 在 0.25~40 nmol/L 范围时, 核酶切割产物浓度与连接反应的初速度呈线性关系, 符合关系式(1).

$$V_0 = 0.931 \times C, \quad (1)$$

式中 V_0 是连接反应初速度, C 表示核酶切割产物的浓度 (nmol/L). 当核酶切割产物浓度为 0.05 nmol/L 时, 在 1000 s 内, 荧光信号大于本底噪声的 3 倍, 这是该方法在本实验条件下的检测下限.

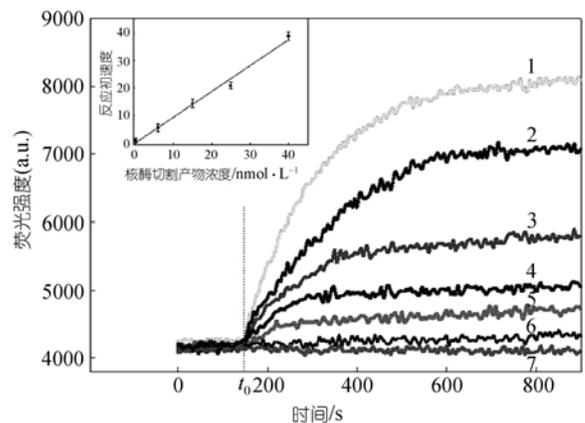


图 4 核酶切割产物灵敏度检测

曲线 1~7 表示核酶切割产物 (p-N1) 浓度依次为: 40, 25, 15, 6, 0.25, 0.05, 0 nmol/L. 时间 t_0 处加入 1.5 U 的 T4 DNA 连接酶. 插图是连接反应初速度与核酶切割产物浓度的关系图

2.3 分子信标连接体系检测锤头核酶切割 HCV-RNA 的切割产物

将 HCV-RNA 两端进行标记, 构建分子信标核酶探针, 筛选出了具有较好切割活性的锤头核酶及其反应条件^[16]. 本文在此基础上, 运用分子信标连接体

系,不需要对HCV-RNA和核酶进行标记,实现核酶切割产物的检测.图5是锤头核酶RZ与HCV-RNA不同比例时的核酶切割产物检测图.曲线1~3表示RZ与HCV-RNA的摩尔比分别为30:1,20:1,10:1时的检测曲线,曲线4是没有加切割产物的样液.加入连接酶后,曲线1~3的荧光信号逐渐上升,说明核酶切割产物与待连接DNA片段N2连接,形成一条与MB互补的核酸链,使MB荧光基团和猝灭基团分开,荧光上升.根据连接反应初速度及关系式(1),得知核酶与底物摩尔比为30:1,20:1,10:1时,切割产物的浓度分别为8.36,5.28,1.18 nmol/L.这说明随着核酶与底物摩尔比的减少,核酶切割底物的能力下降,生成的切割产物减少.根据切割产物的浓度及稀释倍率,能快速得知在相应摩尔比条件下核酶切割效率分别为62.7%,39.6%,8.85%(核酶切割效率计算公式为实际检测到的核酶切割产物量/理论核酶切割产物量).由此可知,运用分子信标连接体系,不仅可以实现在不标记核酶或底物的情况下检测核酶切割产物,而且能快速得到核酶切割效率,与已有标记核酶切割反应的研究方法相比,该方法将更有利于核酶在基因药物筛选及临床医学上的深入应用与研究.

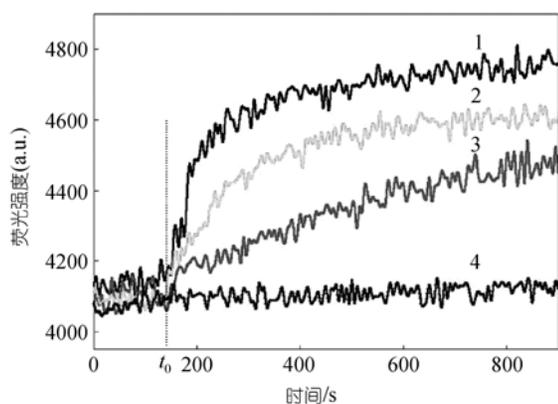


图5 锤头核酶与HCV-RNA不同比例时的核酶切割产物检测图

曲线1~3表示核酶与底物摩尔比分别为30:1,20:1,10:1,曲线4是没有加切割产物的分子信标连接体系的基底

3 结论

核酶是具有酶切功能的小RNA分子,在基因治疗中有着巨大的应用潜力.发展高灵敏、高特异性的核酶切割的检测体系在临床上具有重要意义.利用分子信标连接体系,本文高灵敏、高特异地对核酶切割产物进行了检测.优化实验条件,进一步提高核

酶切割产物与待连接的DNA片段之间的连接效率,将更有助于检测灵敏度的提高.该方法具有以下几个优点:

(1) 操作简便.核酶、核酶底物及切割产物都是RNA性质的核酸片段,很容易污染降解.该方法与传统核酶切割检测方法相比,不需要对RNA进行放射性同位素标记、变性凝胶电泳和放射性自显影等一系列复杂操作,直接以荧光信号给出核酶切割产物的信息,有效避免核酸降解.

(2) 灵敏、快速的核酶切割产物检测方法.该方法中分子信标作为RNA/DNA核酸杂合体的连接模板和检测分子,在连接过程中,核酶切割产物的信息被实时转换为荧光信号,实现核酶切割产物快速简便、高灵敏、高特异性的检测.该方法还可用于其他核酶、脱氧核酶与RNA活性物质的分析研究.

(3) 真实准确地反映核酶切割反应的行为.该方法不需要对核酶和RNA底物进行标记,避免了由标记带来的核酶或底物空间结构的变化,真实准确地反映了核酶切割RNA底物的反应,为筛选具有临床应用价值的核酶基因药物及深入研究核酶基因治疗提供了一种有力的分析手段.

致谢 本工作为国家重点基础研究发展计划(批准号:2002CB513110)、国家自然科学基金(批准号:20505007,20475015)资助项目和湖南省科技厅重点项目(批准号:02JEY2004,0399Y1006).

参 考 文 献

- 1 Guerrier T, Altman S. Catalytic activity of an RNA molecule prepared by transcription *in vitro*. *Science*, 1984, 223: 285—286[DOI]
- 2 Baum D A, Testa S M. *In vivo* excision of a single targeted nucleotide from an mRNA by a trans excision-splicing ribozyme. *RNA*, 2005, 11: 897—905[DOI]
- 3 Yu X K, Trang P, Shah S, et al. Dissecting human cytomegalovirus gene function and capsid maturation by ribozyme targeting and electron cryomicroscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(20): 7103—7108[DOI]
- 4 Waninger S, Kuhen K, Hu X Y, et al. Identification of cellular cofactors for human immunodeficiency virus replication via a ribozyme-based genomics approach. *J Virol*, 2004, 78(23): 12829—12837[DOI]
- 5 Zhang J, Yamada O, Sakamoto T, et al. Exploiting cis-acting replication elements to direct hepatitis C virus-dependent transgene expression. *J Virol*, 2005, 79(10): 5923—5932[DOI]
- 6 Chen S, Song C S, Lavrovsky Y, et al. Catalytic cleavage of the androgen receptor messenger RNA and functional inhibition of androgen receptor activity by a hammerhead ribozyme. *Mol Endocrinol*, 1998, 12(10): 1558—1566[DOI]

- 7 Soukup G A. Core requirements for glmS ribozyme self-cleavage reveal a putative pseudoknot structure. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(3): 968—975[DOI]
- 8 Legiewicz M, Wichlacz A, Brzezicha B, et al. Antigenomic delta ribozyme variants with mutations in the catalytic core obtained by the in vitro selection method. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(4): 1270—1280[DOI]
- 9 Zhang Q W, Ohannesian D W, Erickson L C. Hammerhead ribozyme-mediated sensitization of human tumor cells after treatment with 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *J Pharmacol Exp Ther*, 2004, 309(2): 506—514[DOI]
- 10 Hopkins J, Woodson S A. Molecular beacons as probes of RNA unfolding under native conditions. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(18): 5763—5770[DOI]
- 11 Wilson T J, Lilley D M. Metal ion binding and the folding of the hairpin ribozyme. *RNA*, 2002, 8: 587—600 [DOI]
- 12 Vitiello D, Pecchia D B, Burke J M. Intracellular ribozyme-catalyzed trans-cleavage of RNA monitored by fluorescence resonance energy transfer. *RNA*, 2000, 6: 628—637 [DOI]
- 13 Walter N G, Burke J M. Real-time monitoring of hairpin ribozyme kinetics through base-specific quenching of fluorescein-labeled substrates. *RNA*, 1997, 3: 392—404
- 14 Singh K K, Rcker T, Hanne A, et al. Fluorescence polarization for monitoring ribozyme reactions in real time. *Biotechniques*, 2000, 29: 344—348
- 15 Kirk S R, Luedtke N W, Tor Y. 2-Aminopurine as a real-time probe of enzymatic cleavage and inhibition of hammerhead ribozymes. *Bioorg Med Chem*, 2001, 9: 2295—2301[DOI]
- 16 孟祥贤, 王柯敏, 谭蔚泓, 等. 分子信标核酶探针用于核酶切割反应的实时监测. *科学通报*, 2003, 48(11): 1158—1162
- 17 Tang Z W, Wang K M, Tan W H, et al. Real-time monitoring of nucleic acid ligation in homogenous solutions using molecular beacons. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(23): e148[DOI]
- 18 Liu L F, Tang Z W, Wang K M, et al. Using molecular beacon to monitor activity of E.coli DNA ligase. *Analyst*, 2005, 130: 350—357[DOI]
- 19 唐志文, 王柯敏, 谭蔚泓, 等. 分子信标用于核酸连接过程的实时监测. *科学通报*, 2003, 48(3): 1030—1035
- 20 Tang Z W, Wang K M, Tan W H, et al. Real-time investigation of nucleic acids phosphorylation process using molecular beacons. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(11): e97[DOI]
- 21 Wang L K, Lima C D, shuman S. Structure and mechanism of T4 polynucleotide kinase: a RNA repair enzyme. *EMBO J*, 2002, 21: 3873—3880[DOI]
- 22 Tyagi S, Kramer F R. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotech*, 1996, 14(3): 303—308[DOI]

(2006-09-06 收稿, 2006-11-06 接受)