

金属离子对二甲亚砜依赖的RNA切割型脱氧核酶催化活性的影响

崔力¹, 李素慧¹, 郑星¹, 常天俊¹, 邴涛²

(1. 河南理工大学资源环境学院, 焦作 454003;

2. 中国科学院杭州医学研究所, 杭州 310022)

摘要 在高浓度有机溶剂中工作的RNA切割型脱氧核酶(RNA-cleaving DNzyme, RCD)及其构筑的分子器件不仅拓展了DNA作为酶的能力, 还可将功能核酸推进新的应用领域. 本文研究了一个需要二甲亚砜才能工作的RCD(命名为E3)对金属离子的需求, 发现二价金属离子对其催化活性至关重要, 活性顺序为 Zn^{2+} , Mg^{2+} > Fe^{2+} > Pb^{2+} > Mn^{2+} > Co^{2+} . 以 Mg^{2+} 或 Zn^{2+} 为辅因子, 表征了E3的速率-pH值关系及其与二者的结合比例. E3的催化速率-pH曲线在 Mg^{2+} 存在下为“钟形”, 高速率的pH值范围为7.0~9.0; Zn^{2+} 存在下为“尖峰”, 速率最高时pH=7.0; E3与 Mg^{2+} 和 Zn^{2+} 的数量结合比例均为1:1. 另外, E3以 Fe^{2+} 为辅因子时易失活, Fe^{2+} 被氧化成 Fe^{3+} 是失活的关键, 加入还原剂可使其复活. 进一步研究发现, Cu^{2+} , Fe^{3+} 和 Ni^{2+} 等金属离子可抑制 Mg^{2+} 或 Zn^{2+} 的作用, 使E3的催化活性急剧降低. 本文研究结果为理解E3的性质及催化机制提供了有用信息.

关键词 RNA切割型脱氧核酶; 功能核酸; 有机溶剂; 金属离子

中图分类号 O629.8

文献标志码 A

doi: 10.7503/cjcu20240004

Effect of Metal Ions on the Catalytical Activity of a DMSO-dependent RNA-cleaving DNzyme

CUI Li¹, LI Suhui¹, ZHENG Xing¹, CHANG Tianjun^{1*}, BING Tao^{2*}

(1. Institute of Resources and Environment, Henan Polytechnic University, Jiaozuo 454003, China;

2. Hangzhou Institute of Medicine (HIM), Chinese Academy of Sciences, Hangzhou 310022, China)

Abstract Engineering RNA-cleaving DNzymes (RCDs) and RCD-based molecular devices that are highly functional in high content of organic co-solvents may not only expand the ability of DNAs as enzymes, but also promote functional nucleic acids for novel applications. In this work, we have investigated the requirement of divalent metal ions for a dimethyl sulfoxide (DMSO)-dependent RCD (named E3) that we previously reported. The divalent metal ions were proved to be crucial for E3 to function in 35% (volume fraction) DMSO, and the metal ions with the ability to activate E3 followed the order: Zn^{2+} , Mg^{2+} > Fe^{2+} > Pb^{2+} > Mn^{2+} > Co^{2+} . The rate-pH profile of E3 in Mg^{2+} showed a “bell” shaped curve with a plateau at the pH range from 7.0 to 9.0, yet a sharp peak at pH value of 7.0 in Zn^{2+} .

收稿日期: 2024-01-02. 网络首发日期: 2024-02-19.

联系人简介: 常天俊, 男, 博士, 副教授, 主要从事化学与生物传感/环境分析化学方面的研究. E-mail: changtj@hpu.edu.cn

邴涛, 男, 博士, 研究员, 主要从事细胞核酸适配体的筛选、靶标鉴定与应用方面的研究. E-mail: bingtao@iccas.ac.cn

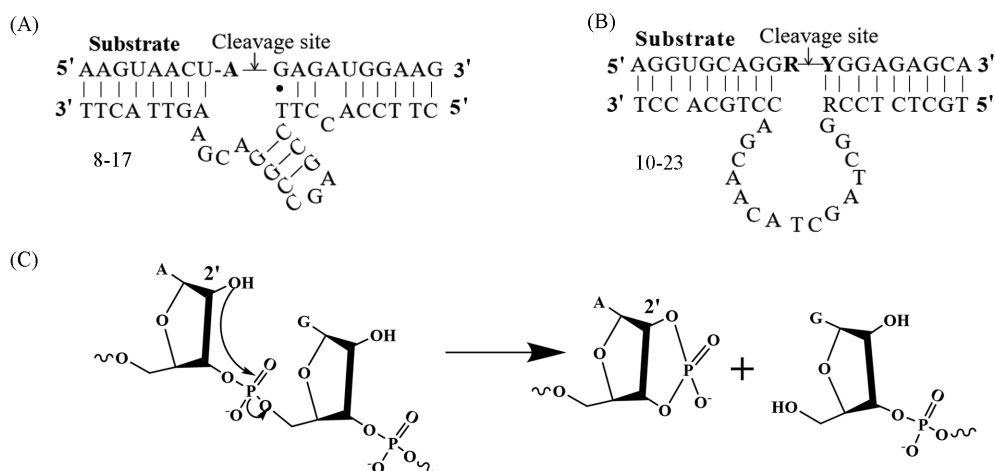
基金项目: 国家自然科学基金(批准号: U1704241, 22274139)、浙江省自然科学基金(批准号: YXD24B0401)、浙江省“尖兵”“领雁”研发攻关计划(批准号: 2023SDYXS0002)、国家卫生健康委科学研究基金-浙江省卫生健康重大科技计划(批准号: WKJ-ZJ-2424)和浙江省核酸适配体与临床诊治重点实验室开放基金项目(批准号: 2022ASC001)资助.

Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. U1704241, 22274139), the Natural Science Foundation of Zhejiang Province, China (No. YXD24B0401), the Pioneer and Leading Goose Research and Development Program in Zhejiang Province, China (No. 2023SDYXS0002), the National Health Commission Scientific Research Fund-Zhejiang Province Health Major Science and Technology, China (No. WKJ-ZJ-2424) and the Key Laboratory of Aptamers and Clinical Diagnosis and Treatment in Zhejiang Province, China (No. 2022ASC001).

Moreover, both Zn^{2+} and Mg^{2+} bound to E3 at a number ratio of 1:1. We also observed that E3 could be activated by Fe^{2+} in 35% DMSO, but quickly inactive by the rapid oxidation of Fe^{2+} to Fe^{3+} . This inactivation of E3 could be further rescued by the addition of ascorbic acid. In addition, the catalytic activity of E3 in the presence of Zn^{2+} or Mg^{2+} was sharply inhibited with the competition of Cu^{2+} , Ni^{2+} , and Fe^{3+} . These results are helpful for understanding the characterization and catalytical mechanism of the DMSO-dependent RCD.

Keywords RNA-cleaving DNAzyme; Functional nucleic acid; Organic solvent; Metal ion

脱氧核酶(DNAzyme)是具有催化功能的DNA分子^[1]. 1994年, Breaker等^[2]首次通过体外筛选(也称为定向进化)分离得到具有RNA切割功能的脱氧核酶(RNA-cleaving DNAzyme, RCD). 迄今, 研究人员已分离得到具有催化多种化学反应活性的脱氧核酶, 不仅拓展了酶的范围, 也带来从基因治疗^[3-5]和分子机器^[6,7]到生物传感^[8-10]等领域的广泛应用. 在众多脱氧核酶中, 对RCD的研究最为深入. 目前, 催化活性最高的RCD是Joyce等^[11]于1997年发现的8-17和10-23[Scheme 1(A)和(B)](表观催化反应速度 $k_{obs} \approx 10 \text{ min}^{-1}$). 虽然RCD催化反应机理并未被完全阐释, 但通常认为反应历程包括RCD通过与RNA底物特定序列形成双链的结合臂来捕获底物, 同时在辅助因子帮助下折叠成催化活性结构, 该结构可与底物上切割位点处的碱基发生作用, 如催化核心的碱基可能起到广义碱作用促使底物中2'-OH去质子化, 从而激活2'-OH亲核进攻邻近的磷酸二酯键上的5'-O, 切断底物链, 最后产生一个3'端为2',3'-环状磷酸和另一个5'端为羟基的2个切割片段[Scheme 1(C)]^[12-14].



Scheme 1 Sequence and secondary structure of 8-17(A) and 10-23(B) RCD, and the cleavage of the RNA substrate by RCD(C)

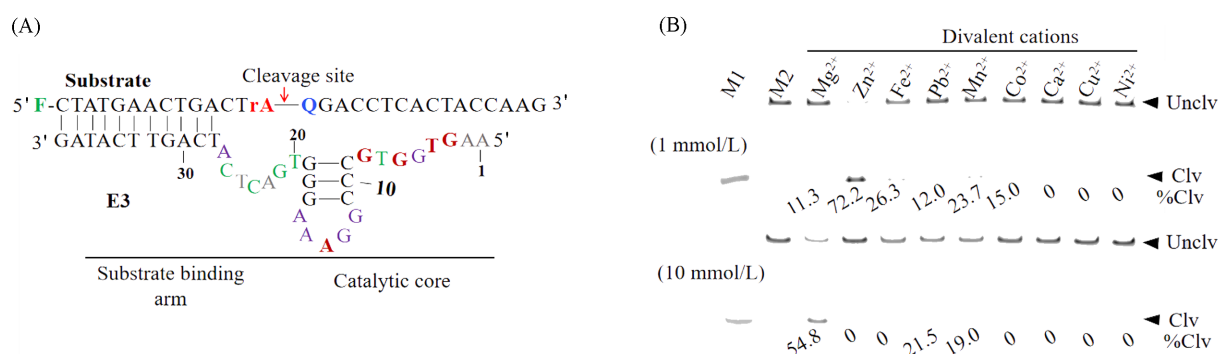
The sequence of 8-17: 5'-CTTCCACCTTCCGAGCCGGACGGAAGTTACTT-3';

the sequence of 10-23: 5'-TGCTCTCCRGCTAGCTACAACGACCTGCACCT-3'. R=A or G, and Y=U or C in (B).

大部分RCD执行催化功能需要二价金属离子^[15]. 二价金属离子可帮助RCD折叠成活性结构^[16], 或者与水分子配位使其活化为广义酸来催化RCD的切割反应^[13]. 随着研究深入, 研究人员已分离得到多种不需要二价阳离子的高活性RCD^[8,17,18], 不仅丰富了人们对RCD采取的催化策略的认识, 而且为生物传感和环境分析等领域提供了多样化的工具.

目前已知的绝大多数RCD均是在纯水溶液中被发现和应用的. 众所周知, 有机溶剂是化学合成和分析检测等领域的常用溶剂. 研究在有机溶剂或含高浓度有机溶剂的水溶液中的RCD不仅可以拓展DNA分子作为酶的能力, 也可为其它需要有机溶剂的功能核酸, 如在有机溶剂中催化不同化学反应的DNA催化剂及不溶于水的分子的核酸适体等的筛选研究提供经验^[19,20]. 本课题组^[20]通过“强制体外进化”的策略在35%(体积分数)二甲亚砜(DMSO)中筛选到一个依赖DMSO的、顺式切割底物的RCD(DR11-4), 经优化表征将其改造为反式作用的RCD[E3, Scheme 2(A)]. 这是首次有目的筛选需要有机溶剂的脱氧核酶, 证明了在高浓度有机溶剂中可以通过“强制体外进化”的策略得到具有高活性的

RCD. 虽然 E3 已被证实高度依赖有机溶剂和 Mg^{2+} ^[20], 但除 Mg^{2+} 外, 还有哪些金属离子可作为 E3 的辅因子, 其浓度范围及相应 pH 值条件等尚不清楚. 基于此, 本文以 5'FRQ30 为 RNA 底物 [Scheme 2(A)], 评估了不同的二价金属离子对 E3 催化活性的影响, 对高活性离子的浓度范围、适用 pH 值及其与 E3 的结合比例进行了研究, 并探讨了离子的不同价态和多种离子共存对 E3 催化反应的影响.



Scheme 2 Divalent cations requirements for E3 to function

(A) The secondary structure of E3 and its substrate(5'FRQ30); (B) divalent metal ion requirement for E3 to cleave its substrate. The concentration of the divalent metal ions was set at either 1 mmol/L or 10 mmol/L. The cleavage reaction was carried out in 50 mmol/L Tris-HCl buffer(pH=7.5) including 300 mmol/L NaCl and 35%(volume fraction) DMSO in the presence of the above-mentioned divalent metal ions at 23 °C for 1 h. %Clv represents the percent cleavage of the substrate by E3.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

三羟甲基氨基甲烷(Tris)、四甲基乙二胺(TEMED)、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、二甲基亚砷(DMSO)和无水乙醇, 分析纯, 北京百灵威科技有限公司; 蔗糖、尿素、硼酸、抗坏血酸(Ascorbic acid, Vc)、2-(*N*-吗啡啉)乙磺酸(MES)、过硫酸铵(APS)、NaOAc、乙二胺四乙酸(EDTA)、 $MgCl_2$ 、 $CoCl_2$ 、 $MnCl_2$ 、 $NiSO_4$ 、 $ZnSO_4$ 、 $PbOAc$ 、 $FeSO_4$ 、 $CuSO_4$ 、 $CaCl_2$ 和 $FeCl_3$, 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司.

DNA 序列由上海生工生物有限公司合成和纯化, 具体序列如下: E3: 5'-AAGTGGTGCCCG-GAAAGGGTGACTCATCAGTTCATAG-3'; 5'FRQ30: 5'Fluorescein-CTATGAACTGACTrA↓QGACCTCACTACCAAG-3', 其中Q=DABCYL-dT, 指 DABCYL 修饰的胸腺嘧啶, 该修饰紧邻 RNA 底物切割位点的 3' 位置, 对 E3 的催化底物切割的活性非常重要^[20].

UV-2550 型紫外-可见分光光度计(UV-Vis), 日本 Shimadzu 公司; Amersham Typhoon 型凝胶电泳成像系统, 美国 Cytiva(GE)公司; Allegra 64R 型高速冷冻离心机, 美国 Beckman 公司; DYY-7C 型垂直电泳仪, 北京六一生物科技有限公司; VC-15S/SP 型真空离心浓缩仪, 日本 Taitec 公司; Milli-Q 型超纯水系统, 德国默克公司; Thermo Orion Star A111 型 pH 计, 美国赛默飞世尔科技公司.

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 样品的制备 用超纯水溶解 DNA 样品, 通过 260 nm 处的吸光度值和对应序列的摩尔消光系数计算得到其浓度. 所有 DNA 样品在反应开始前经 90 °C 变性 1 min, 然后于室温下冷却复性后使用.

利用 NaOH 处理 5'FRQ30, 制备底物的切割产物分子标记物. 在 10 μ L 100 μ mol/L 的 5'FRQ30 中加入 1 μ L 2 mol/L NaOH, 于 90 °C 加热 10 min, 随后加入 2 μ L 1 mol/L HCl 中和反应. 制备的分子标记物于 4 °C 保存, 使用时适当稀释.

1.2.2 有机溶剂-水混合溶液的配制 有机溶剂与缓冲溶液混合可能会改变混合溶剂的 pH 值^[21], 导致所标识的溶液 pH 值与实际值不符, 配制混合溶剂时, 需先将缓冲溶液调节到合适的 pH 值, 然后加入有机溶剂到一定浓度, 待混合溶剂冷却至室温后, 再测量混合溶剂的实际 pH 值. 实验中使用的有

机-水混合溶剂体系均采用此方式配制和确定 pH 值。

1.2.3 RCD 催化底物切割反应 除特殊说明外, 实验过程中 RCD 催化底物切割的反应均在单转换条件下 ($[E]/[S]=10:1$) 进行。具体来说, RCD(E3) 与底物 (5'FRQ30) 按摩尔比为 10:1 混合, 经 90 °C 加热变性 1 min, 冷却至室温形成酶-底物复合物。典型的反应体系为 1000 nmol/L E3+100 nmol/L 5'FRQ30+50 mmol/L Tris-HCl (pH=7.5)+300 mmol/L NaCl+30 mmol/L MgCl₂+35% (体积分数) DMSO。将 10 μL 上述反应体系于 23 °C 反应 1 h, 加入 1 μL 0.5 mol/L EDTA 终止反应, 随后加入 1 μL 3 mol/L NaOAc 和 40 μL 预冷无水乙醇, 于 -20 °C 沉淀反应产物 2 h。在 4 °C 下, 以 15000 r/min 的速度离心 20 min 后真空干燥回收反应产物。

采用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (dPAGE) 分析催化反应产物。将纯化后的产物置于 20% (质量分数) dPAGE [7 mol/L 尿素+1×TBE+20% 丙烯酰胺-亚甲基双丙烯酰胺 (29:1)] 中进行电泳分析。电泳缓冲液为 1×TBE (89 mmol/L Tris-硼酸+2 mmol/L EDTA, pH=8.3), 于 400 V 恒压下室温电泳 30 min。样品在分析前溶于超纯水, 加入尿素变性加样缓冲溶液 [100 mL 溶液包括 20 g 蔗糖、28 mg 二甲苯青、1 mL 10% (质量分数) SDS、10 mL 10×TBE 和 110 g 尿素], 于 90 °C 变性 1 min。采用凝胶成像系统获取产物条带在凝胶中的图像, 用 ImageJ 软件分析产物电泳条带的荧光强度 (以灰度值表示), 用于计算底物的切割产率, 以被切割的底物含量占底物总量的百分数 (%Clv, %) 表示:

$$\%Clv = \frac{F_{\text{product}}}{F_{\text{substrate}} + F_{\text{product}}} \times 100\% \quad (1)$$

式中: F_{product} 表示切割产物条带的荧光强度; $F_{\text{substrate}}$ 表示未被切割的完整底物的荧光强度。

1.2.4 RCD 催化底物切割动力学 通过测定 RCD 在单转换条件下催化底物切割的表观催化常数 (k_{obs}) 来研究其动力学。E3 催化 5'FRQ30 切割反应按 1.2.3 节方法进行, 反应时间点设定为 0, 10, 30, 60, 120, 240 和 420 min。对反应采取相同方法终止、沉淀和电泳分析。以底物的切割产率对反应时间作图, 根据描述一级反应动力学的单相指数方程 (One-phase exponential equation) 拟合得到表观速率常数 (k_{obs} , min):

$$Y = Y_0 + (Y_M - Y_0) \times (1 - e^{-k_{\text{obs}} t}) \quad (2)$$

式中: Y 为特定反应时间 E3 催化底物的切割率; Y_0 为 $t=0$ min 的背景切割率; Y_M 为最大切割率; 文中所有数据为至少 3 次独立实验的平均值, 误差用 ± 标准偏差 (SD) 表示。

2 结果与讨论

2.1 E3 对二价金属离子的需求

实验评估了 E3 催化底物切割的温度条件, 发现其在 4 ~ 23 °C 范围内有高活性, 但温度超过 27 °C 时, 活性显著降低 (见本文支持信息图 S1)。研究了 E3 对金属离子的需求, 发现缺少二价阳离子, E3 切割底物的速度为 $2.73 \times 10^{-6} \text{ min}^{-1}$ (见本文支持信息图 S2), 仅为底物非催化反应速度 ($k_{\text{obs}} \approx 7.0 \times 10^{-7} \text{ min}^{-1}$)^[20] 的 3.9 倍, 表明二价阳离子对 E3 的催化活性至关重要。以反应速度最高^[20] 的 5'端荧光标记的 5'FRQ30 作为底物, 评估了常见二价金属离子对 E3 催化活性的影响 [Scheme 2(B)], 发现除 Mg²⁺ 以外, E3 在 Zn²⁺, Fe²⁺, Pb²⁺, Mn²⁺ 和 Co²⁺ 存在下均有切割活性; 这些金属离子单独与底物作用 1 h 或 24 h, 均不能催化底物切割, 只有加入 E3 才能催化底物切割 (见本文支持信息图 S3)。此外, Ca²⁺, Cu²⁺ 或 Ni²⁺ 在 50 μmol/L 到 10 mmol/L 浓度范围内均未观察到切割产物 [Scheme 2(B) 和本文支持信息图 S4]。

进一步探究了上述几种能激活 E3 催化的离子 (Mg²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺, Pb²⁺, Mn²⁺ 和 Co²⁺) 的浓度范围。在 Mg²⁺, Mn²⁺ 和 Pb²⁺ 存在下, E3 的活性随其浓度增加而逐渐增强, 当离子浓度分别升高到 30, 2 和 2 mmol/L 后, 其活性保持稳定 [图 1(A), 图 1(C) 和本文支持信息图 S5], 表明这 3 种离子已达到饱和浓度。然而, 在 Fe²⁺, Co²⁺ 和 Zn²⁺ 存在下, E3 活性随着离子浓度增大先增加后减弱, 峰值时浓度分别为 1 mmol/L (Fe²⁺ 和 Zn²⁺) 和 0.5 mmol/L (Co²⁺), 表明 3 种离子有高浓度抑制效应。类似的现象在切割 DNA 的脱氧核酶 I-R3^[22]、切割 RNA 的氟代脱氧核酶^[23] 和依赖铀酰离子 (UO₂²⁺) 的脱氧核酶 39E^[24] 中也可观

察到. 高浓度金属离子与DNA非特异性作用导致脱氧核酶的活性结构被破坏可能是抑制其活性的原因之一^[24,25]. E3催化底物切割的产率在 Zn^{2+} (1 mmol/L)和 Mg^{2+} (30 mmol/L)存在下最高(约为70%), 远高于 Mn^{2+} , Pb^{2+} , Co^{2+} 和 Fe^{2+} 等(20%~30%). 为了准确评估以上金属离子增强E3催化活性的能力, 分别在30 mmol/L Mg^{2+} , 1 mmol/L Zn^{2+} , 10 mmol/L Pb^{2+} , 2 mmol/L Mn^{2+} , 0.5 mmol/L Co^{2+} 以及1 mmol/L Fe^{2+} 存在下测试了E3的催化速率[图1(D)和本文支持信息图S6]. 结果表明, 在 Mg^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Mn^{2+} 和 Co^{2+} 存在下, E3催化底物切割随时间变化表现一级反应特征, k_{obs} 分别为 0.026 min^{-1} (Mg^{2+} 和 Zn^{2+}), 0.0095 min^{-1} (Pb^{2+}), 0.0063 min^{-1} (Mn^{2+})和 0.003 min^{-1} (Co^{2+}). 令人意外的是, 当 Fe^{2+} 存在时, 前10 min内E3催化反应快速增加, 但很快停止, 说明E3在该条件下容易失活. 通过比较E3在二价金属离子存在下的切割产率[Scheme 2(B), 图1(A)~(C)]和 k_{obs} [图1(D)], 将其作用排序如下: Zn^{2+} , Mg^{2+} > Pb^{2+} > Mn^{2+} > Co^{2+} ; Fe^{2+} 因不能获得准确的速率常数, 位次不确定; 未发现 Ca^{2+} , Cu^{2+} 或 Ni^{2+} 介导的E3催化反应.

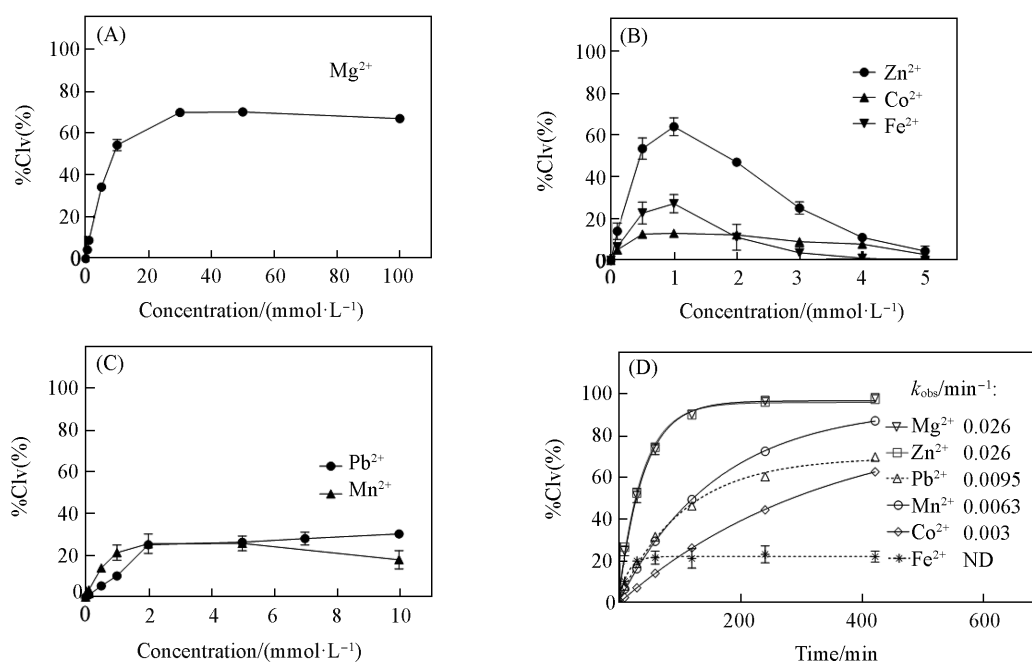


Fig. 1 Catalytic cleavage of the substrate by E3 in the presence of divalent cations at different concentrations

(A—C) The percent cleavage of E3 in the presence of different concentrations of these divalent cations; (D) the cleavage rate constants of E3 in the presence of different divalent cations. The concentration of Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Pb^{2+} , Co^{2+} , and Fe^{2+} were set at 30 mmol/L, 1 mmol/L, 10 mmol/L, 2 mmol/L, 0.5 mmol/L, and 1 mmol/L, respectively. ND in (D) indicates not determined. Fig. S5 was the dPAGE images for the analysis of the %Clv in (A) and (B), and Fig. S6 was the dPAGE images in (D). The cleavage experiments were carried out in 50 mmol/L Tris-HCl buffer (pH=7.5, including 300 mmol/L NaCl) supplemented with 35% (volume fraction) DMSO under single-turnover conditions (1000 nmol/L enzyme and 100 nmol/L substrate) at 23 °C in the presence of the indicated divalent metal ions.

2.2 E3的催化速率与pH值以及 Mg^{2+} 和 Zn^{2+} 浓度的关系

有些核酶和RCD采取广义酸碱催化机制, pH值对其活性影响很大^[26-28]. 虽然目前尚未明确E3也采取该策略, 但在含有35% (体积分数) DMSO和 Mg^{2+} 的体系中, 其母体RCD在pH<5时没有催化活性, 当pH=6~8时具有高催化速率, 显示出pH依赖性^[20]. 鉴于 Mg^{2+} 和 Zn^{2+} 的活性最高, 在二者分别存在下, 研究了E3的速率与溶液pH值的关系. 结果表明, Mg^{2+} 存在下, E3的pH-速率曲线为“钟形”[图2(A)和本文支持信息图S7(A)], 在pH=7.0~9.0范围内均具有高活性, 在pH=7.5~8.0时速率最大, 与其母体RCD略有不同^[20]. 然而, 在 Zn^{2+} 存在下, pH-速率曲线呈现尖锐的“峰形”, 其 k_{obs} 在pH=5.5~7.0范围内快速增加, pH=7.0时达到峰值, 然后迅速下降, pH=9.0时几乎无催化活性

[图2(B)和本文支持信息图S7(B)]. Zn^{2+} 水解程度远高于 Mg^{2+} , 1 mmol/L Zn^{2+} 在pH \approx 6时聚集, 而30 mmol/L Mg^{2+} 在pH \approx 9时聚集. 因此, 与 Mg^{2+} 相比, Zn^{2+} 的活性对pH值更敏感. 虽然 Zn^{2+} 的水解限制了其溶解性, 但 Zn^{2+} 与DNA作用形成“M-DNA”有利于其作为辅因子促进DNAzyme的催化反应^[29], 这可能是E3在pH=7.0和1 mmol/L Zn^{2+} 中仍具有高催化速率的原因. 类似现象在依赖 Zn^{2+} 的I-R3 DNAzyme中也可观察到, 其 Zn^{2+} 浓度可达1 mmol/L且最优的溶液pH值达到7.0^[22]. 另外, 也有研究认为中性pH值条件下, RCD需要的 Zn^{2+} 浓度达到mmol/L范围时, Zn^{2+} 的活性结构成分可能是多核复合物, 即RCD催化反应需要多个 Zn^{2+} ^[29].

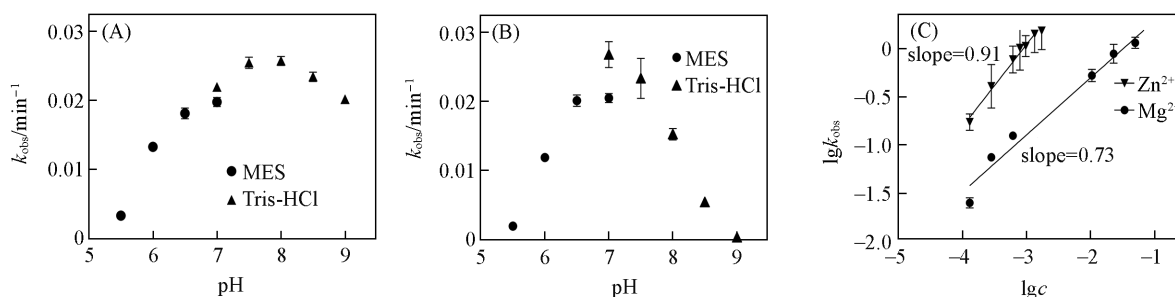


Fig. 2 pH-rate and metal ion concentration-rate profiles of E3

The pH-rate profile of E3 under 30 mmol/L Mg^{2+} (A) or 1 mmol/L Zn^{2+} (B). The buffers in (A) and (B) were made of 50 mmol/L MES for pH=5.5—7.0, and 50 mmol/L Tris-HCl for pH=7.0—9.0. The dPAGE assay for the k_{obs} of E3 in 30 mmol/L Mg^{2+} or 1 mmol/L Zn^{2+} at various pH values were in Fig. S7. (C) Double logarithmic plot of the concentration of Zn^{2+} and Mg^{2+} against the rate constants of E3. The plot of the concentration of Zn^{2+} or Mg^{2+} vs. the rate constants of E3 were illustrated in Fig. S8.

为了进一步理解 Mg^{2+} 和 Zn^{2+} 对E3催化过程的作用, 在含35%(体积分数)DMSO的混合溶液体系中, 测试了E3在0~1 mmol/L Zn^{2+} 和0~30 mmol/L Mg^{2+} 存在下的 k_{obs} 值(见本文支持信息图S8). 为了确定二者与E3的结合比, 将速率的对数与离子浓度的对数作图^[30,31]. 反应速率= $k[M^{2+}]^n$ (k 为速率常数, M^{2+} 代表 Zn^{2+} 或 Mg^{2+} , n 为离子数目), 以双对数作图得到直线的斜率为 n , 即离子数目. 由双对数图[图2(C)]得到的直线斜率分别为0.91(Zn^{2+})和0.73(Mg^{2+}), 表明E3结合 Mg^{2+} 和 Zn^{2+} 的数目均为1. 因此, 在反应体系中, Zn^{2+} 浓度虽达到mmol/L, 其活性结构可能不是多核复合物, 仍是单个阳离子.

2.3 Fe^{2+} 及其氧化对E3催化活性的影响

对于在水溶液中工作的17E RCD, Fe^{2+} 的活性比 Mg^{2+} 高21倍^[32]. 但对于在35%(体积分数)DMSO中工作的E3来说, Fe^{2+} 虽能作为其辅因子, 但会很快失活[图1(D)]. 考虑到 Fe^{2+} 在水溶液中容易被氧化成 Fe^{3+} , 推测E3失活可能与 Fe^{2+} 的氧化有关. 为了理解Fe在不同价态下对RCD活性的作用, 在反应体系中引入还原剂Vc来评估 Fe^{2+} 的作用. 首先比较了Vc在反应体系中(50 mmol/L Tris-HCl, pH=7.5+300 mmol/L NaCl+1 mmol/L Fe^{2+} +35%DMSO)对E3活性的影响[图3(A)]. 无Vc存在时, E3切割底物的产率仅为约20%; 当Vc浓度增加到2 mmol/L时, 切割产率达到最大值(约50%); 当Vc浓度超过3 mmol/L时, E3的切割产率快速下降. 仅加入不同浓度Vc而没有 Fe^{2+} , E3不能切割底物[见本文支持信息图S9(A)]. 随后, 在含2 mmol/L Vc的反应体系中研究了E3在 Fe^{2+} 存在下催化底物切割的产率与时间的关系. 结果表明, E3在1 mmol/L Fe^{2+} 和(2 mmol/L Vc同时存在下, 切割产率随时间增加而上升, 最大切割率接近80%, 与仅含 Fe^{2+} 未加Vc或仅有Vc而不含 Fe^{2+} 明显不同[图3(B)和本文支持信息图S9(B)]. 以上数据表明, 加入还原剂可抑制 Fe^{2+} 的氧化, 使E3保持催化活性. 该条件下E3的 $k_{obs, Fe^{2+}}$ 达到0.015 min^{-1} , 小于 Mg^{2+} 和 Zn^{2+} , 大于 Pb^{2+} [图1(D)]. 以上结果表明, Fe^{2+} 的氧化可能是E3失活的原因. 将 Fe^{2+} 换成 Fe^{3+} 测试E3的活性发现, 在0~2 mmol/L浓度范围内, 均未见到切割产物[图3(C)]; 加入2 mmol/L Vc后, 无 Fe^{3+} 时观察不到切割产物; 随着 Fe^{3+} 浓度增加产物逐渐增加, Fe^{3+} 浓度为1.0 mmol/L时, 切割率最大; 进一步提高 Fe^{3+} 浓度, 反应产率则下降. 该结果说明 Fe^{3+} 不支持E3的催化反应, 但被还原成 Fe^{2+} 可以激活E3. 因此, Fe^{2+} 而非 Fe^{3+} 是E3催化的辅因子, 也进一步证实了 Fe^{2+} 的氧化导致E3失活.

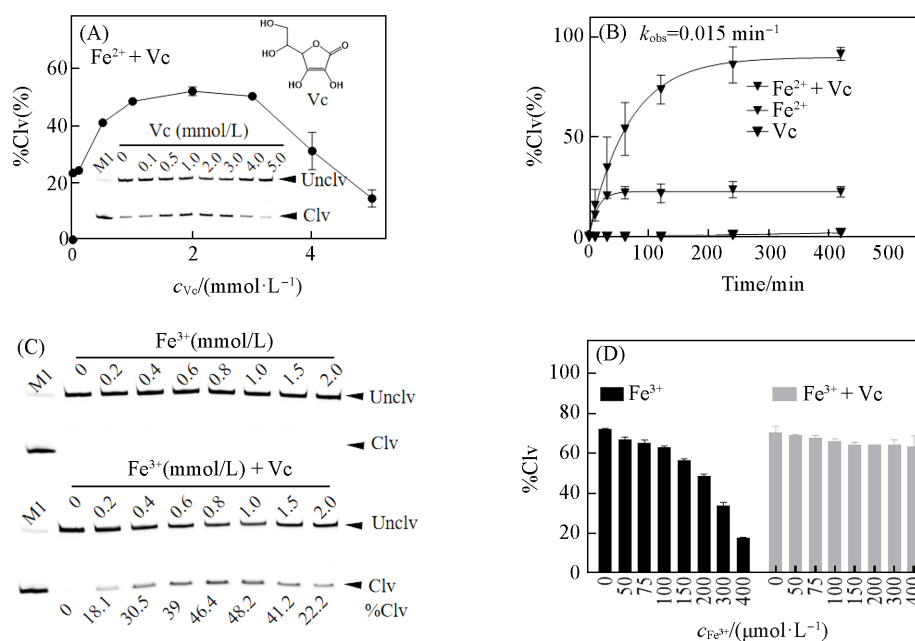


Fig. 3 The effect of Fe^{2+} and its oxidation on the catalytic activity of E3

(A) Effect of Fe^{2+} on the cleavage reaction of E3 in the presence of Vc. The concentration of Fe^{2+} was set at 1 mmol/L. (B) Kinetics of the cleavage reaction of E3 in the presence of 1 mmol/L $Fe^{2+} + 2$ mmol/L Vc, or 2 mmol/L Vc only. dPAGE images for (B) were presented in Fig. S9. (C) dPAGE assay for the cleavage products of the substrate by E3 in the presence of Fe^{3+} or $Fe^{3+} + 2$ mmol/L Vc. (D) Effect of Fe^{3+} on the catalytic activity of E3 in the reaction buffer (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5 + 300 mmol/L NaCl + 30 mmol/L Mg^{2+} + 35% DMSO). The concentration of E3 was at the range from 0 to 400 $\mu\text{mol/L}$. A cleavage reaction of E3 in various concentration of Fe^{3+} and 2 mmol/L Vc was used as a control.

2.4 不同金属离子共存对 E3 催化活性的影响

不同金属离子与核酸结合力存在较大差异^[33], 如 Zn^{2+} 与核酸的亲合力是 Mg^{2+} 的数 10 倍^[29,33]. 那么在反应体系中不同离子之间是否存在竞争, 从而导致酶的活性受到影响? 考虑到 Fe^{2+} 容易被氧化成 Fe^{3+} , 评估了在 Mg^{2+} 存在下 Fe^{3+} 对 E3 催化反应的影响. 结果表明, Fe^{3+} 即使在很低的浓度下也会导致 E3 活性的大幅降低, 如 400 $\mu\text{mol/L}$ 浓度即可使 E3 的切割率从 75% 降至 17%; 但 Fe^{3+} 被 Vc 还原成 Fe^{2+} , 则不会抑制 E3 的催化反应[图 3(D)]. 此外, E3 在 Zn^{2+} 或 Mg^{2+} 存在下, 其活性受共存的 Ni^{2+} 和 Cu^{2+} 强烈抑制, Co^{2+} 使活性有所降低, Ca^{2+} , Mn^{2+} , Pb^{2+} 及 Mg^{2+} 或 Zn^{2+} 影响很小(见本文支持信息图 S10). Sigel 等^[33] 报道, Cu^{2+} 结合核酸的能力远强于 Zn^{2+} 和 Mg^{2+} , Ca^{2+} 结合核酸的能力与 Mg^{2+} 相当, 本文结果表明 Ca^{2+} , Fe^{3+} , Ni^{2+} 和 Cu^{2+} 不能作为 E3 催化的辅因子, 推测对于结合核酸越强的金属离子, 如果不能激活酶, 则抑制酶活的能力可能越强; 而与核酸结合力较弱的金属离子对酶的活性影响较小. 以上结果表明, 在复杂的体系中应用 RCD 时, 除了应明确单一金属离子的作用, 还应评估不同离子共存对 RCD 催化活性的影响.

3 结 论

研究了二价金属离子对需要有机溶剂才能工作的 RCD——E3 催化活性的影响, 发现 Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Pb^{2+} , Fe^{2+} 及 Co^{2+} 可以作为辅因子激活 E3 的催化活性, 其中 Zn^{2+} , Fe^{2+} 及 Co^{2+} 表现出高浓度抑制效应. 二价离子在 E3 活性最高时的浓度分别为 1 mmol/L Zn^{2+} , 30 mmol/L Mg^{2+} , 2 mmol/L Mn^{2+} , Pb^{2+} 和 Fe^{2+} , 以及 0.5 mmol/L Co^{2+} ; 对 E3 催化活性的作用顺序为 Zn^{2+} , $Mg^{2+} > Fe^{2+} > Pb^{2+} > Mn^{2+} > Co^{2+}$. 未发现 Ca^{2+} , Cu^{2+} 和 Ni^{2+} 介导的 E3 催化反应. 在 Mg^{2+} 存在下, E3 的 pH 值-速率曲线为“钟形”, 在 pH=7.0~9.0 范围内有高活性; 而在 Zn^{2+} 存在下, pH-速率曲线为“尖峰”, 当 pH=7.0 时活性最高, 但在其它 pH 值时活性显著降低. 此外, E3 在 35% DMSO 中执行催化功能所需的 Zn^{2+} 和 Mg^{2+} 数量为 1. Fe^{2+} 在溶液中的氧化对 E3

活性也有重要影响, 其被氧化成 Fe^{3+} 导致E3快速失活, 但加入还原剂可恢复其活性. 研究还发现, E3在被 Mg^{2+} 或 Zn^{2+} 激活的状态下, 溶液中共存的 Cu^{2+} , Fe^{3+} 和 Ni^{2+} 等阳离子对其活性有强烈地抑制作用. 本文揭示了二价金属离子对E3催化活性影响的多样性和复杂性, 有助于进一步理解E3的催化机制, 也为其应用提供了有用信息.

支持信息见 <http://www.cjcu.jlu.edu.cn/CN/10.7503/cjcu20240004>.

参 考 文 献

- [1] Mao Y., Qu H., Zheng L., *Chem. J. Chinese Universities*, **2021**, 42(11), 3445—3456(毛瑜, 瞿昊, 郑磊. 高等学校化学学报, **2021**, 42(11), 3445—3456)
- [2] Breaker R. R., Joyce G. F., *Chem. Biol.*, **1994**, 1(4), 223—229
- [3] Wang H. M., Chen Y. Q., Wang H., Liu X. Q., Zhou X., Wang F., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2019**, 58(22), 7380—7384
- [4] Hu Q. Q., Tong Z. X., Yalikong A., Ge L. P., Shi Q., Du X. Y., Wang P., Liu X. Y., Zhan W. Q., Gao X., Sun D., Fu T., Ye D., Fan C. H., Liu J., Zhong Y. S., Jiang Y. Z., Gu H. Z., *Nat. Chem.*, **2024**, 16(1), 122—131
- [5] Wang Y. Y., Wang Y., Song D. F., Sun X., Li Z., Chen J. Y., Yu H. Y., *Nat. Chem.*, **2022**, 14(3), 350—359
- [6] Mao X. H., Liu M. M., Li Q., Fan C. H., Zuo X. L., *JACS Au*, **2022**, 2(11), 2381—2399
- [7] Zheng X. D., Yang J., Zhou C. J., Zhang C., Zhang Q., Wei X. P., *Nucleic Acids Res.*, **2019**, 47(3), 1097—1109
- [8] Zhou Q. B., Zhang G. X., Wu Y. P., Zhang Q., Liu Y., Chang Y. Y., Liu M., *J. Am. Chem. Soc.*, **2023**, 145(39), 21370—21377
- [9] Mcconnell E. M., Cozma I., Mou Q. B., Brennan J. D., Lu Y., Li Y. F., *Chem. Soc. Rev.*, **2021**, 50(16), 8954—8994
- [10] Wang Q., He Y. Q., Wang F. A., *Chem. J. Chinese Universities*, **2021**, 42(11), 3334—3356(王庆, 何雨秋, 王富安. 高等学校化学学报, **2021**, 42(11), 3334—3356)
- [11] Santoro S. W., Joyce G. F., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, 94(9), 4262—4266
- [12] Tong Z. X., Hu Q. Q., Gu H. Z., *Chem. J. Chinese Universities*, **2020**, 41(11), 2345—2355(佟宗轩, 胡沁沁, 顾宏周. 高等学校化学学报, **2020**, 41(11), 2345—2355)
- [13] Liu H. H., Yu X., Chen Y. Q., Zhang J., Wu B. X., Zheng L. N., Haruehanroengra P., Wang R., Li S. H., Lin J. Z., Li J. X., Sheng J., Huang Z., Ma J. B., Gan J. H., *Nat. Commun.*, **2017**, 8, 2006
- [14] Zheng X., Ma M., Cui L., Wu L., Chang T. J., *Chemistry*, **2022**, 85(7), 770—780(郑星, 马明, 崔力, 武俐, 常天俊. 化学通报, **2022**, 85(7), 770—780)
- [15] Schlosser K., Li Y. F., *Chem. Biol.*, **2009**, 16(3), 311—322
- [16] Borggrafe J., Victor J., Rosenbach H., Viegas A., Gertzen C. G. W., Wuebben C., Kovacs H., Gopalswamy M., Riesner D., Steger G., Schiemann O., Gohlke H., Span I., Eitzkorn M., *Nature*, **2022**, 601(7891), 144—149
- [17] Saran R., Liu J. W., *Anal. Chem.*, **2016**, 88(7), 4014—4020
- [18] Liu Z. J., Mei S. H., Brennan J. D., Li Y. F., *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125(25), 7539—7545
- [19] Chang T. J., He S. S., Amini R., Li Y. F., *ChemBioChem*, **2021**, 22(14), 2368—2383
- [20] Chang T. J., Li G. P., Chang D. R., Amini R., Zhu X. N., Zhao T. Q., Gu J., Li Z. P., Li Y. F., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2023**, 62(42), e202310941
- [21] Mukerjee P., Ostrow J. D., *Tetrahedron Lett.*, **1998**, 39(5/6), 423—426
- [22] Gu H. Z., Furukawa K., Weinberg Z., Berenson D. F., Breaker R. R., *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, 135(24), 9121—9129
- [23] Wang Y. J., Ngor A. K., Nikoomanzar A., Chaput J. C., *Nat. Commun.*, **2018**, 9, 5067
- [24] Brown A. K., Liu J. W., He Y., Lu Y., *ChemBioChem*, **2009**, 10(3), 486—492
- [25] Carmi N., Breaker R. R., *Bioorg. Med. Chem.*, **2001**, 9(10), 2589—2600
- [26] Nakano S., Chadalavada D. M., Bevilacqua P. C., *Science*, **2000**, 287(5457), 1493—1497
- [27] Ma L. Z., Kartik S., Liu B. W., Liu J. W., *Nucleic Acids Res.*, **2019**, 47(15), 8154—8162
- [28] Sun X., Gao M. M., Zhang Z., Wang H. Y., Yu H. Y., *Chem. J. Chinese Universities*, **2023**, 44(3), 20220246(孙昕, 高明媚, 张泽, 王海燕, 于涵洋. 高等学校化学学报, **2023**, 44(3), 20220246)
- [29] Moon W. J., Yang Y. J., Liu J. W., *ChemBioChem*, **2021**, 22(5), 779—789
- [30] Huang P. J. J., de Rochambeau D., Sleiman H. F., Liu J., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2020**, 59(9), 3573—3577
- [31] Zhou W. H., Saran R., Ding J. S., Liu J. W., *ChemBioChem*, **2017**, 18(18), 1828—1835
- [32] Moon W. J., Liu J. W., *ChemBiochem*, **2020**, 21(3), 401—407
- [33] Sigel R. K. O., Sigel H., *Acc. Chem. Res.*, **2010**, 43(7), 974—984

(Ed.: L, W, K)