



DOI:10.14188/j.ajsh.20240329002

## 原核 Argonaute 蛋白介导的干扰作用及其应用

张欢,李怀,唐晓峰\*

(武汉大学 生命科学学院,湖北 武汉 430072)

**摘要:** Argonaute(Ago)蛋白是具有核酸结合能力的蛋白质,有些具有核酸内切酶活性。Ago蛋白在生物体中普遍存在,过去人们主要关注来源于真核生物的真核 Ago 蛋白,它可以结合小干扰 RNA 组成 RNA 诱导沉默复合体,是 RNA 干扰途径中的重要一环。近年来,人们开始关注原核 Ago 蛋白。与原核 Ago 蛋白不同,原核 Ago 蛋白的结构更加多样,可以分为长型原核 Ago 蛋白、短型原核 Ago 蛋白和 PIWI-RE 这三大类,而且更倾向于结合单链 DNA 进行 DNA 干扰。不同的原核 Ago 蛋白通过 DNA 引导的 DNA 干扰、RNA 引导的 DNA 干扰等体内干扰途径,利用其识别和结合核酸的能力、核酸酶活性或与其他核酸酶协同作用来抵御外来核酸,为宿主提供免疫保护。由于部分原核 Ago 蛋白具有对 DNA 链或 RNA 链的靶向识别和切割能力,因此可以开发为可编程人工限制性内切酶,还能应用在核酸检测、基因突变检测、荧光原位杂交技术等方面,并且在基因编辑方面具有巨大的应用潜力。概述了 Ago 蛋白的分类、生理功能,以及原核 Ago 蛋白的体内干扰途径及其应用前景。

**关键词:** 原核 Argonaute 蛋白;DNA 干扰;核酸切割

中图分类号: Q93

文献标志码:A

文章编号:2096-3491(2024)05-0413-09

## Prokaryotic Argonaute-mediated interference and its application

ZHANG Huan, LI Huai, TANG Xiaofeng\*

(College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, Hubei, China)

**Abstract:** Argonaute (Ago) proteins are nucleic acid-binding proteins, some of which have endonuclease activity. Ago proteins are widely present in organisms. In the past, researchers mainly focused on eukaryotic Ago proteins. Eukaryotic Ago proteins load small interfering RNAs to form the RNA-induced silencing complex, which is an important part of the RNA interference pathways. In recent years, people have begun to focus on prokaryote Ago proteins. Different from eukaryotic Ago proteins, prokaryotic Ago proteins are more structurally diverse and can be categorized into three main groups: long prokaryotic Ago proteins, short prokaryotic Ago proteins, and PIWI-RE. They are more inclined to bind to single-stranded DNA for DNA interference. Different prokaryotic Ago proteins participate in DNA-guided DNA interference, RNA-guided DNA interference and other interference pathways *in vivo*, providing immune protection to the host through their ability to recognize and bind nucleic acids, nuclease activity or synergistic interaction with other nucleases to resist foreign nucleic acids. Since some of the prokaryotic Ago proteins have the ability to target recognition and cleavage of DNA or RNA strands, they can be developed as programmable artificial restriction endonuclease. Prokaryotic Ago proteins can also be applied in nucleic acid detection, gene mutation detection, fluorescence *in situ* hybridization technology, etc., and have great application potential in gene editing. In this paper, we provide a review of the classification and

收稿日期:2024-03-29 修回日期:2024-07-08 接受日期:2024-10-14

作者简介:张欢(2000-),女,硕士生,主要从事原核 Argonaute 蛋白的酶学性质研究。E-mail:2021202040026@whu.edu.cn

\* 通讯联系人:唐晓峰(1968-),女,博士,教授,主要从事极端嗜盐、嗜热古菌适应极端环境的分子机理研究。E-mail:tangxf@whu.edu.cn

基金项目:国家自然科学基金项目(31770072)

引用格式:张欢,李怀,唐晓峰.原核 Argonaute 蛋白介导的干扰作用及其应用[J].生物资源,2024,46(5):413-421.

Zhang H, Li H, Tang X F. Prokaryotic Argonaute-mediated interference and its application [J]. Biotic Resources, 2024, 46(5): 413-421.

physiological functions of Ago proteins, the *in vivo* interference pathways and application prospect of prokaryotic Ago proteins.

**Key words:** prokaryotic Argonaute(pAgo); DNA interference; nucleic acid cleavage

## 0 引言

Argonaute(Ago)蛋白是一类能结合短的核酸向导链(guide strand),并利用它们进行序列特异性识别的蛋白质,有些Ago具有切割互补靶标链(target strand)的核酸内切酶活性。Ago广泛存在于各类生物体中<sup>[1]</sup>,最早是在1998年对拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)突变体的研究中发现的,由于该突变体植物的卷曲叶片类似于船蛸(argonaute)的触手,因此将该突变基因编码的蛋白命名为Argonaute<sup>[2]</sup>。Ago蛋白家族根据其来源可分为真核Ago(eukaryotic argonaute, eAgo)和原核Ago(prokaryotic argonaute, pAgo)。eAgo在结构上具有较高的保守性,是RNA诱导沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC)的重要组成部分,在RNA干扰(RNA interference, RNAi)过程中起着至关重要的作用<sup>[3]</sup>。eAgo可以结合ssRNA向导链(guide RNA, gRNA),并利用其核酸酶活性切割靶标RNA(target RNA, tRNA)或招募其他沉默蛋白进行转录抑制<sup>[3]</sup>。

eAgo发现数年后,pAgo才被人们关注。pAgo与eAgo最大的不同是,pAgo更倾向于结合ssDNA向导链(guide DNA, gDNA),而且大多以DNA作为靶标(target DNA, tDNA)。不同的pAgo能结合5'-OH/5'-P的ssDNA或ssRNA向导链,形成

pAgo-guide二元复合物,特异性识别互补靶标链后,激活核酸内切酶活性,靶向切割DNA或RNA底物<sup>[4]</sup>。如果向导链是5'-P链,那么pAgo在靶标链互补区域的第10到11个核苷酸间切割磷酸二酯键(图1),如果向导链是5'-OH链,则切割位点可能发生1~2个碱基的偏移<sup>[4]</sup>。pAgo这种核酸靶向切割能力与规律间隔成簇短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)/CRISPR相关蛋白(CRISPR associated protein, Cas)系统相似。CRISPR-Cas系统是原核生物体内的获得性免疫系统,可以识别外源性核酸,并进一步对其切割,近年来已被广泛应用于基因编辑、疾病治疗等领域<sup>[5]</sup>。pAgo的核酸内切酶活性也使其被广泛应用于核酸的靶向切割、病毒核酸检测以及癌症早期诊断等方面<sup>[6]</sup>。与CRISPR-Cas系统不同的是pAgo缺乏解旋酶功能,而且只有一个活性位点,一次只能切割一条DNA链,想要切割双链DNA,就需要让pAgo分别结合两条互补的靶向切割部位的向导链。切割方式的不同并不影响pAgo和CRISPR-Cas一样具有应用于基因编辑的潜力。

本文着重介绍不同种类Ago蛋白的基本性质,以及pAgo在体内的不同干扰途径,并概述基于pAgo体外性质(如特异性结合和切割核酸)设计的应用方向,以期pAgo的体外应用以及基因编辑技术

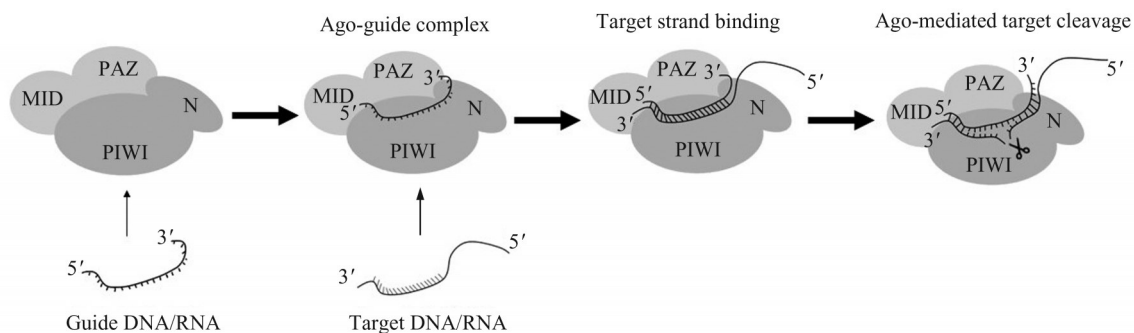


图1 pAgo切割过程示意图

Fig. 1 Schematic representation of pAgo cleavage process

注:N、PAZ、MID、PIWI是长型pAgo的结构域(详见正文);长型pAgo结合短核酸向导链后形成Ago-guide复合物(Ago-guide complex),特异性识别并结合互补的靶标核酸,进行切割;在切割过程中,部分pAgo会将结合在PAZ结构域的向导链3'端释放

Note: N, PAZ, MID, and PIWI are the domains of long pAgos (see text for details); long pAgos bind to short nucleic acid guide strands to form the Ago-guide complexes, which specifically recognize and bind to complementary nucleic acid target strands for cleavage; during cleavage, some of pAgos release the 3' end of the guide strands bound to the PAZ domain

的进一步开发与改进提供参考。

## 1 Ago 蛋白的分类

### 1.1 真核 Ago 蛋白

eAgo 蛋白参与细胞内基因表达调控,它们结合小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)、microRNA (miRNA) 或 PIWI 相互作用 RNA (PIWI-interacting RNA, piRNA), 通过与其他蛋白因子相互协作来使基因沉默,可以抑制转座子活性,保护细胞免受病毒感染<sup>[7]</sup>。另外,部分 eAgo 具有核酸内切酶活性,与 CRISPR-Cas 系统中的 Cas 蛋白一样,eAgo 可以结合 RNA 向导链,然后识别并切割互补的靶标 RNA,但其靶标核酸中不需要含有 PAM 序列等额外的序列。

基于结构特征和作用机制,eAgo 主要分为四大类,见图 2(a)<sup>[8]</sup>。第一类是参与细胞质中转录后基因沉默的 Ago 样 (Ago-like) 蛋白;第二类包括 PIWI (pelement induced wimpy testis) 样 (PIWI-like) 蛋白,主要存在于动物生殖细胞中,它们通过 piRNA 抑制转座元件的表达,有助于维持基因组的完整性<sup>[9]</sup>;第三类是秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 的 WAGO 蛋白;第四类是布氏锥虫 (*Trypanosoma brucei*) 的可干扰转座子活性的 Trypanosoma Ago 蛋白。

eAgo 的数量和功能多样,但在结构上都非常保守,都由 N 端、PAZ (PIWI-argonaute-zwille)、MID (middle domain) 和 PIWI<sup>[10]</sup> 4 个结构域组成,见图 2 (b)。N 端结构域是 4 个结构域中保守性最低的,可能在双链 RNA 的解旋与分离过程中起促进作用<sup>[10]</sup>。PAZ 结构域是一个较小的结构域,大约 140 个氨基酸残基,参与了向导链 3' 端的结合,但不是绝对必要的;而且 PAZ 结构域不仅存在于 eAgo 中,也存在于核酸内切酶 Dicer 中,这说明 eAgo 可能和 Dicer 具有相似的祖先<sup>[11]</sup>。MID 结构域包含一个与向导链 5' 端结合相关的口袋,有的 eAgo 对向导链 5' 端首位核苷酸具有结合偏好性,比如人的 hAgo2 和多孢克鲁维酵母 (*Kluyveromyces polysporus*) 的 KpAgo 偏好结合 5' 端为尿嘧啶的向导链<sup>[10]</sup>。PIWI 结构域包含一个保守的催化四联体 Asp-Glu-Asp-X (DEDX, 其中 X 可以是天冬氨酸、组氨酸或赖氨酸残基),其与二价阳离子结合后激发核酸切割活性<sup>[12]</sup>。

不同的 eAgo 与不同的小 RNA 结合,形成了多样的 RNAi 途径,而不同的 RNAi 途径可以在同一生物体甚至同一细胞中发挥作用<sup>[7]</sup>。eAgo 结合短的双链 RNA 后,释放一条 RNA 乘客链 (passenger

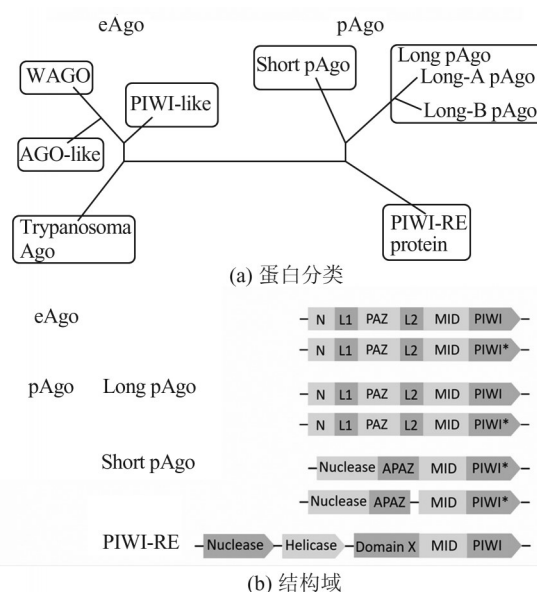


图 2 Argonaute 蛋白分类和结构域组成示意图

Fig. 2 Schematic representation of the Argonaute protein classification and domain architectures

注: N、PAZ、MID、PIWI 为 Argonaute 蛋白的结构域; L1、L2 为 Argonaute 蛋白不同结构域之间的连接片段; APAZ 为 PAZ 结构域类似物; Nuclease 为结合的相关核酸酶; Domain X 为 PIWI-RE 独有的保守结构域 X; Helicase 为招募的相关解旋酶

Note: N, PAZ, MID, PIWI are the domains of Argonaute protein; L1, L2 are the linkage fragments between different domains of Argonaute protein; APAZ is the analog of PAZ domain; Nuclease is the nuclease related to binding; Domain X is the conserved domain X unique to PIWI-RE; Helicase is the recruited associated helicase

strand), 之后 eAgo 与 ssRNA 向导链结合形成二元复合物,可以识别完全或部分互补的靶标 mRNA,具有内切酶活性的 eAgo 可以进一步对靶标核酸进行切割,不具有内切酶活性的 eAgo 可以招募其他核酸酶对 mRNA 进行降解,导致翻译过程受到抑制。RNAi 途径广泛参与了各种细胞功能,包括生长、发育、凋亡,及癌变等病理生理过程<sup>[13]</sup>,eAgo 在其中起到了重要的作用。

### 1.2 原核 Ago 蛋白

通过基因组分析,人们发现细菌和古菌中同样存在编码 Argonaute 的基因,2018 年统计 pAgo 数量为 1 010 个<sup>[14]</sup>,随着基因组测序技术的不断发展,发现 pAgo 的数量还在不断增加。约 10%~20% 的细菌基因组和约 30% 的古菌基因组中至少含有一个 pAgo 基因。少数情况下,一种原核生物能同时含多个 pAgo 基因。

通过系统发育分析可将 pAgo 分为 3 大类:长型 pAgo (long pAgo)、短型 pAgo (short pAgo) 和 PIWI-

RE,见图2(a)。长型 pAgo 具有与 eAgo 相同的 4 个结构域,每个结构域的功能也大致相同,长型 pAgo 又分为 long-A 和 long-B 两种类型<sup>[15]</sup>。所有 long-B pAgo 都无核酸内切酶活性,它们通常还具有截短的 PAZ 结构域,而大多数 long-A pAgo 具有完整的 DEDX 催化四联体和 PAZ 结构域,见图2(b)。短型 pAgo 缺少 N 端和 PAZ 结构域,在 PIWI 结构域的催化四联体中发生一个或多个氨基酸突变,导致其缺乏核酸内切酶活性<sup>[3,15]</sup>。PIWI-RE 也不具有 N 端和 PAZ 结构域,其 PIWI 结构域中具有保守的精氨酸(R)和谷氨酸(E)残基,具有独特的生化特性和生理功能。

通过对 pAgo 生理功能的研究,发现虽然原核生物不具有 RNAi 途径,但 pAgo 可以参与细胞其他生理活动(见表 1),或以其他方式保护原核细胞免受外来核酸的侵害。主要作用有:①参与 DNA 复制。有研究表明,来源于细菌嗜热栖热菌(*Thermus thermophilus*)的 TtAgo,在体内唯一的 II 型嗜热菌拓扑异构酶-解旋酶被抑制的情况下,可以结合来自 DNA 复制终点的 15~18 nt 的 DNA 片段,并与 DNA 复制的相关蛋白互作,完成环状基因组的复制,表明 TtAgo 在体内的主要生理功能是帮助解开由 DNA 复制产生的环状染色体<sup>[16-22]</sup>。②与 CRISPR 系统协同作用抵御外来核酸。生物信息学分析显示,pAgo 基因通常位于防御岛(defense island)上,这是基因组中流动性较强的区域,具有各种与防御相关的基因,保护细菌和古菌免受外来核酸的侵害<sup>[23]</sup>。有研究发现,一些 pAgo 与某些防御系统有关,部分 pAgo 基因与参与宿主防御的基因(如 CRISPR-Cas 系统)存在于同一个操纵子中<sup>[1]</sup>。③与其他核酸酶协同作用抵御外来核酸。许多短型 pAgo 含有 SIR2(silent information regulator 2)或 TIR(Toll/interleukin-1 receptor)结构域,或者与 SIR2 和 TIR 基因相邻近<sup>[3,24]</sup>。这些结构域是细菌抗噬菌体的 Thoeris 防御系统的

一部分,SIR2/Ago 和 TIR/Ago 系统保护细菌细胞免受噬菌体和质粒的侵害,在噬菌体感染细胞后,具有 MID-PIWI 结构域的短型 pAgo 识别外源 DNA,通过 MID 结构域形成多聚体,激发 SIR2 或 TIR 的 NADase 活性,耗尽细胞内的 NAD<sup>+</sup><sup>[24]</sup>,导致细胞死亡并阻止噬菌体在群体中的传播<sup>[25]</sup>。也有部分长型 pAgo 与来自不同家族的核酸酶相互协作,利用这些核酸酶产生向导链,引发下一步切割。④诱导同源序列之间的 DNA 干扰。来源于丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)的 CbAgo 从质粒或其他多拷贝遗传元件中产生并结合 gDNA,然后在同源位点引入双链断裂(double-strand breaks,DSB)<sup>[26]</sup>,并与大肠杆菌(*Escherichia coli*)核酸外切酶 RecBCD 一起作用,介导 DNA 降解,产生更多能与 CbAgo 结合的 ssDNA 向导链,通过这种机制,可以有效靶向和消除多拷贝遗传元件,并抑制质粒的传播和噬菌体的感染<sup>[17]</sup>。

## 2 pAgo 的体内干扰途径

### 2.1 DNA 引导的 DNA 干扰

有许多 pAgo 是在 DNA 引导下进行 DNA 干扰,其中的典型代表就是 TtAgo。有研究发现,当嗜热栖热菌的 TtAgo 基因被转座子插入破坏后,嗜热栖热菌能够吸收外源 DNA<sup>[4]</sup>,这一现象表明,TtAgo 可能在宿主防御方面起作用。进一步的研究发现,TtAgo 不是在 mRNA 水平上调节其他参与宿主防御的基因的表达,而是通过 DNA 引导的 DNA 干扰,直接在 DNA 水平上切割入侵的核酸。

在体内,TtAgo 与长度为 13~25 nt 的 DNA 向导链结合,在这些向导链的引导下结合和切割互补的 DNA 靶标。研究表明这些小的 DNA 向导链主要是 TtAgo 通过“chopping”机制产生的,见图 3(a)<sup>[27]</sup>。无向导链的 TtAgo 切割稳定性不高的 DNA(例如富含 AT 的双链 DNA 或错配的 DNA)并产生短双链 DNA 片段,这些片段随后结合到 TtAgo 上。之后双

表 1 部分 pAgo 特征  
Table 1 Features of some pAgos

Ago 名称	来源菌株	活性温度范围/℃	向导链	靶标链	作用
CbAgo	<i>Clostridium butyricum</i>	30~60	DNA	DNA/RNA	宿主防御,干扰和切割靶标基因 <sup>[17]</sup>
NgAgo	<i>Natronobacterium gregory</i>	37	DNA	DNA/RNA	宿主防御,干扰和切割靶标基因 <sup>[18]</sup>
TtAgo	<i>Thermus thermophilus</i>	20~75	DNA	DNA/RNA	宿主防御,干扰和切割靶标基因,参与 DNA 复制 <sup>[16]</sup>
MjAgo	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	75~95	DNA	DNA	干扰和切割靶标基因 <sup>[19]</sup>
PfAgo	<i>Pyrococcus furiosus</i>	37~99	DNA	DNA	宿主防御,干扰和切割靶标基因 <sup>[20]</sup>
RsAgo	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	25~37	RNA	DNA	宿主防御,干扰靶标基因 <sup>[21,22]</sup>

链DNA片段中与向导链互补的乘客链释放,形成TtAgo-gDNA复合物,复合物结合并切割与其互补的靶标DNA<sup>[27]</sup>。分别具有互补的DNA向导链的两个TtAgo-gDNA复合物可以同时切割双链DNA的两条链,造成双链断裂<sup>[4]</sup>。通过“chopping”机制,TtAgo可以从外源质粒上获得向导链,引发DNA引导的DNA干扰,切割入侵的DNA,降低细胞内外源质粒的水平。

与TtAgo类似,大部分具有切割活性的long-A pAgo都能以“chopping”机制从质粒DNA上获得向导链,进而在DNA引导下进行DNA干扰。pAgo可以通过几个因素来区分入侵DNA和自己的基因组DNA,如DNA染色质状态、入侵DNA的AT含量、基因拷贝数和Chi位点的存在与否<sup>[19]</sup>。对于pAgo,“chopping”机制造成的切割不如ssDNA介导的靶向切割迅速高效。因此,尽管pAgo的DNA“chopping”机制可能提供一定的机会来抵抗入侵的核酸,但消除入侵DNA主要还是依靠效率更高的DNA引导的DNA干扰<sup>[17]</sup>。此外,pAgo-gDNA复合物可以靶向同一入侵DNA的多个拷贝,因此可能会对入侵DNA进行多代干扰<sup>[28]</sup>。

## 2.2 RNA引导的DNA干扰

来源于类球红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*)的RsAgo<sup>[21]</sup>是使用RNA引导的DNA干扰的典型代表。RsAgo不具备核酸酶活性,但可以通过靶向识别和结合能力对DNA进行干扰。RsAgo的PAZ结构域中没有与向导链3'端结合相关的口袋<sup>[22]</sup>,这可能使RNA向导链和DNA靶标链之间的碱基完全配对,而不会引起RsAgo的构象变化,增强了RsAgo-gRNA复合物与DNA靶标结合的稳定性。

在类球红细菌基因组中,RsAgo基因与DNA酶基因相邻,在RsAgo结合靶标DNA后可以招募这些核酸酶进行DNA降解,见图3(b)<sup>[22]</sup>。人们还发现,即使缺乏核酸酶,与不表达RsAgo的大肠杆菌相比,在大肠杆菌中异源表达RsAgo也会导致细胞内质粒浓度降低,质粒编码基因的表达也变低<sup>[29]</sup>。与TtAgo类似,RsAgo不影响其他参与宿主防御相关的内源性基因的表达,这表明它能直接由RNA引导进行DNA干扰,参与宿主防御<sup>[30]</sup>。

与RsAgo类似的部分长型pAgo可以从转录组中获得RNA向导链片段<sup>[21]</sup>,在RNA引导下间接对DNA进行干扰,比如利用其识别和结合能力,通过抑制转录或复制来沉默DNA。也可能在结合靶标DNA后,招募基因共定位的核酸酶,对互补链进行降解<sup>[29]</sup>。还有部分长型pAgo本身就具有靶向切割

DNA的能力,可以在RNA引导下直接进行DNA干扰,这些DNA分子大部分来自质粒、基因组编码转座子或噬菌体基因的外源片段。

## 2.3 其他干扰途径

尽管长型pAgo的体内其他干扰途径未有明确报道,但通过体外研究发现,AaAgo由DNA引导进行RNA干扰<sup>[31]</sup>;来源于耐氢海袍菌(*Marinitoga hydrogenitolerans*)的MhAgo可以使用所有类型的向导链(5'-OH/5'-P DNA/RNA)在体外靶向切割DNA和RNA<sup>[32]</sup>。

短型pAgo缺乏N端和PAZ结构域,而且PIWI的催化四联体不完整<sup>[24]</sup>,其编码基因通常与编码PAZ类似物APAZ结构域的基因相关联<sup>[15]</sup>。部分情况下,APAZ结构域与Mrr、TIR等核酸酶连接,形成APAZ-核酸酶结构域,结合在短型pAgo上,见图3(c)<sup>[24]</sup>。短型pAgo虽然没有核酸切割活性,但可以获取mRNA片段作为向导链,识别和结合靶标核酸,在结合靶标核酸之后,短型pAgo形成多聚体,相关的APAZ-核酸酶则在DNA/RNA干扰中发挥作用。

与短型pAgo类似,PIWI-RE同样缺乏N端和PAZ结构域,但其MID和PIWI结构域是保守的,这表明它们也具有靶标识别功能,一些PIWI-RE还具有完整的催化四联体,可以对靶标核酸进行切割。此外,PIWI-RE在N端含有一个独特的保守结构域X(Domain X)<sup>[33]</sup>,其可能为与大多数与PIWI-RE共存的解旋酶和核酸酶提供了一个相互作用位点。大多数PIWI-RE基因在具有DinG型解旋酶和核酸酶的操纵子上,DinG型解旋酶作用于在噬菌体和质粒复制和转录过程中发现的RNA-DNA双链,这些解旋酶有可能参与PIWI-RE-guide二元复合物中向导链与靶标链的解离,或者将靶标核酸的双链解开以便PIWI-RE可以发挥切割作用<sup>[33]</sup>;共同表达的核酸酶可能参与了向导链的生成或靶标链的切割,协助PIWI-RE进行DNA/RNA干扰。

## 3 pAgo的主要应用方向

### 3.1 可编程人工限制性内切酶

与普通限制性核酸内切酶不同,pAgo可以通过结合不同的ssDNA向导链,识别和靶向切割任何位点的DNA序列,并获得具有粘性末端或平末端的片段,不要求靶标链中存在固定的限制位点。根据这一特点,pAgo被开发为可编程的人工限制性核酸内切酶(artificial restriction enzyme, ARE),用于DNA组装和DNA指纹识别。部分pAgo已投入商用<sup>[34]</sup>,

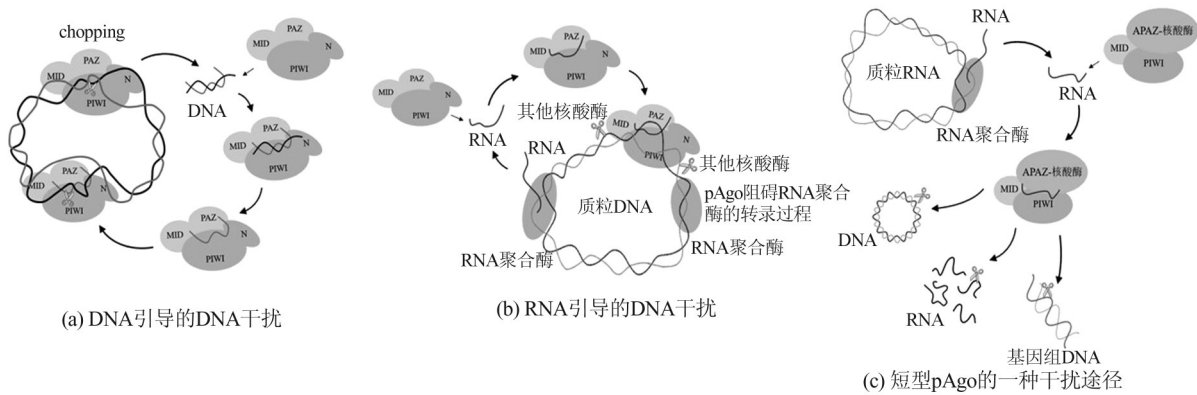


图3 pAgo的不同干扰途径示意图

Fig. 3 Schematic representation of pAgo's different interference pathways

注:相关pAgo在RNA向导链的引导下与DNA靶标链结合,招募其他核酸酶对DNA进行切割,同时阻碍RNA聚合酶的转录过程;短型pAgo与APAZ-核酸酶结构域结合,形成复合物,在RNA向导链的引导下,对DNA或RNA进行非特异性切割,达到干扰目的

Note: the associated pAgos bind to the DNA target strands under the guidance of the RNA guide strand, then recruit other nucleases to cleave the DNA, simultaneously blocking the transcription process of RNA polymerases; short pAgos bind to the APAZ-nuclease domain to form a complex, under the guidance of the RNA guide strand, the complex cleaves DNA or RNA nonspecifically for interference purposes

比如 PlasmidMaker 平台利用来源于激烈热火球古菌 (*Pyrococcus furiosus*) 的 PfAgo 的人工限制性内切酶将多个 DNA 片段组装成质粒,该方法具有更高的灵活性和精确度。pAgo 不仅比普通限制性核酸内切酶的使用范围更广,而且还能通过反应体系的调整或向导链的特殊设计来提升切割的活性和准确性。

### 3.2 核酸检测

pAgo 的一个重要应用领域是检测生物样品中的靶标序列。基于 pAgo 的核酸检测方法灵敏度极高,可在多种情况下检测单核苷酸多态性<sup>[35,36]</sup>。基于 PfAgo 开发了一种检测样品中保守序列的系统,称为 PAND (PfAgo-mediated nucleic acid detection)<sup>[35]</sup>,该技术对逆转录得到的 SARS-CoV-2 DNA 进行靶向切割,为随后切割荧光分子信标产生荧光输出提供向导链。由于 pAgo 的高转换率,使得信号的扩增来自快速的酶切,而不是传统 qPCR 检测中较慢的 PCR 扩增,这使得检测所需时间大大缩短,这一方法已被成功用于 SARS-CoV-2 RNA 及其突变体鉴定<sup>[36]</sup>。

将 PAND 和连接酶链式反应结合,形成了 PLCR (PfAgo coupled with modified ligase chain reaction for nucleic acid detection)<sup>[37]</sup>,可以区分野生型 SARS-CoV-2 基因的单碱基突变,有效区分新型冠状病毒和其他冠状病毒,在 70 min 内实现多通路检测。此外,连接酶链式反应产物可以直接作为 DNA 向导链被使用,无需额外输入向导链,简化了核酸检

测的流程<sup>[37]</sup>。在所有这些分子诊断应用中,主要使用高温 pAgo,因为较高的操作温度可以避免靶标识别或切割时对解旋酶的需求。基于 pAgo 的分子诊断方法具有与商业方法相当的灵敏度,成本较低,而且比 qPCR 更快产生结果。

### 3.3 基因突变检测

当向导链和靶标链互补区域的第 10 或第 11 位核苷酸出现错配情况时,与完全互补配对的情况相比,pAgo 的核酸酶活性大大降低。根据这一特性,可以快速分析目标等位基因是否发生突变,如果基因发生突变,pAgo 无法在未突变向导链的引导下对其进行切割,而野生型基因能被靶向切割,通过凝胶电泳就可以观察到条带的不同。根据相同的原理,也可以对单核苷酸突变进行检测,野生型 DNA 将被 pAgo 快速切割,而突变基因的相对数量将增加,这种富集完成后,可以提高后续检测(各种 PCR 技术、测序等)罕见基因突变的灵敏度<sup>[38]</sup>。基于此原理开发了 NAVIGATER 方法 (nucleic acids of clinical interest Via DNA guided Argonaute from *Thermus thermophilus*),用于检测罕见的单核苷酸突变,例如检测早期癌症,发现在癌细胞中发生的碱基替换<sup>[38]</sup>。

### 3.4 Ago-PAINT

pAgo 还可以应用在超分辨率成像技术中。DNA-PAINT (DNA point accumulation in nanoscale topology) 是一种超分辨率显微成像技术,将 DNA 靶标链连接在目标分子上,作为对接链 (docking strand),利用与荧光物质相连的成像链 (imager

strand)与对接链的结合和解离对目标分子进行荧光成像。目前的DNA-PAINT技术成像链与对接链的结合率低,导致荧光获取速度缓慢<sup>[39]</sup>。有研究发现,不具有切割活性的pAgo可以将DNA成像链转换成螺旋结构,使其与对接链的结合速度提高10倍,将这种方法称为Ago-assisted DNA-PAINT(Ago-PAINT)<sup>[39]</sup>。通过2D DNA折纸结构实验,研究者对Ago-PAINT和DNA-PAINT在每个时间点后的超分辨率图像质量进行了评估,发现Ago-PAINT在每个时间点的定位精度标准误差都小于DNA-PAINT,证明了Ago-PAINT可以在保证高分辨率的同时,将现有DNA-PAINT技术的速度提高一个数量级。

### 3.5 基于dTtAgo蛋白的AgoFISH

DNA荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)是将标记生物素或荧光素的单链核酸作为探针,通过碱基互补配对,使探针与细胞内的DNA原位杂交,让细胞中的基因组区域可视化。当前FISH的探针制备方法具有合成成本高、实验程序复杂、结合效率较低等问题,限制了该方法的适用性。有研究发现基于失活TtAgo(dTtAgo)的DNA结合能力,可开发一种新的称为AgoFISH(Argonaute-based fluorescence *in situ* hybridization)的方法<sup>[40]</sup>。该方法的原理为:N端含有荧光蛋白的dTtAgo与5'-P gDNA结合后,将荧光标记带到与DNA向导链互补的内源性DNA序列上,使基因组序列可视化。与传统的FISH技术相比,AgoFISH具有以下两个优势:一是AgoFISH使用的ssDNA向导链长度为15~21 nt,是传统FISH方法所需ssDNA长度的1/3到1/5,节约了单链核酸的合成成本;二是AgoFISH将荧光标记转移到dTtAgo上,dTtAgo作为一种可以在大肠杆菌中表达和纯化的蛋白,简化了探针制备程序。这种经济高效且简单的方法,为染色质精细结构研究以及基于FISH的临床分子诊断提供了方便而强大的工具<sup>[40]</sup>。

### 3.6 基因编辑

从第一代锌指核酸酶(zinc finger nuclease, ZFN)技术,到第二代类转录激活因子效应物核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TAL-EN)技术,再到第三代CRISPR-Cas9(CRISPR-associated protein 9, Cas9)系统,基因组编辑工具在不断发展,人们也在不断寻找更简单和更完善的基因编辑方法。pAgo对于核酸的靶向切割能力使其很有可能成为编辑基因组和转录组的重要工具。

来源于格氏嗜盐碱杆菌(*Natronobacterium*

*gregoryi*)的NgAgo是一种中温嗜盐pAgo,2016年有报道称其可以结合DNA向导链在体内编辑人类细胞基因组<sup>[41]</sup>,但由于可重复性问题在科学界引发了争议<sup>[42,43]</sup>。在后续实验中发现NgAgo在体外和在大肠杆菌体内均表现出DNA引导的切割活性,并在大肠杆菌和多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*)中增强了同源重组介导的基因插入或基因编辑。虽然目前尚不清楚这种现象是否仅由NgAgo的切割活性引起,但有证据表明,基因编辑与NgAgo结合的外源5'-P ssDNA向导链相关,而且依赖于PIWI结构域的切割活性<sup>[18]</sup>。然而,NgAgo是一种来源于嗜盐古菌的蛋白质,在正常盐浓度条件下,这种蛋白质的溶解性不高,并且具有额外的ssDNA结合蛋白结构域,因此不适合进一步开发。

迄今为止,最有希望实现基因编辑的中温pAgo是CbAgo,CbAgo利用5'-P DNA作为向导链,可以在30~50 °C对DNA底物进行切割,体外表达时在37 °C具有最佳活性,也证明可以在37 °C培养的大肠杆菌中切割DNA<sup>[26]</sup>。CbAgo结合的向导链具有高拷贝数、存在Chi位点等特征,说明向导链可能是来源于质粒的内源性DNA分子,而不是外源输入的ssDNA<sup>[26]</sup>。向导链生成和传递可能是pAgo进行基因编辑的限制性因素,因此可以自主生成内源向导链的CbAgo具有极大的应用潜力。

pAgo相比于Cas核酸酶具有应用优势。第一,pAgo分子的大小比Cas9分子小,而且不需要逆转录酶的协作,基于pAgo的基因编辑体系可以更加精简。第二,pAgo不受PAM限制,从而可以更灵活地选择靶标核酸,更精细地控制细胞表型<sup>[5]</sup>。第三,大多数pAgo结合短DNA向导链<sup>[15]</sup>,而Cas核酸酶需要结合长RNA。DNA相对于RNA更加稳定,而且DNA合成更加经济。以上因素将促进基于pAgo的基因组编辑系统的发展。迄今为止,对于中温pAgo的研究越来越多,虽然暂时还不能成功将pAgo用于体内基因编辑,但它们在37 °C表现出的靶向切割活性,为基因编辑和其他应用打下基础<sup>[8]</sup>。

## 4 展望

pAgo较eAgo发现晚,但近年来对pAgo的结构和功能的研究已经取得了很大进展,发现不同的pAgo以不同的体内干扰途径参与宿主的生理活动,在免疫防御中起作用。大多数长型pAgo可以由DNA或RNA向导链介导,特异性识别和靶向切割DNA或RNA,这一性质使得pAgo具有广阔的应用范围,也说明pAgo具有作为基因编辑工具的潜在可

能性。

由于高温 pAgo 最适温度较高,不适合对中温生物的细胞进行基因编辑,因此中温 pAgo 在基因编辑等应用方面具有巨大的潜力<sup>[8]</sup>。虽然目前还未发现可以独立表现出有效的基因编辑能力的中温 pAgo,但是未来人们可以探究 pAgo 进行基因编辑的适合反应条件,或者挖掘更多的 pAgo 蛋白。克服各种障碍后,pAgo 将和 CRISPR 系统一样,用于基因表达调控、表观基因组编辑和体内成像<sup>[44]</sup>,而且 pAgo 具有分子量小、不依赖 PAM 序列等独特的优势。基于 pAgo 的基因编辑体系有望成为 CRISPR-Cas 系统的替代品<sup>[45]</sup>,在癌症研究、人类疾病动物模型的生成和作物开发等多个领域产生重大影响。

### 参考文献

- [1] Bobadilla Ugarte P, Barendse P, Swarts D C. Argonaute proteins confer immunity in all domains of life [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2023, 74: 102313.
- [2] Bohmert K, Camus I, Bellini C, *et al.* AGO1 defines a novel locus of *Arabidopsis* controlling leaf development [J]. *EMBO Journal*, 1998, 17(1): 170-180.
- [3] Swarts D C, Makarova K, Wang Y L, *et al.* The evolutionary journey of Argonaute proteins [J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2014, 21(9): 743-753.
- [4] Swarts D C, Jore M M, Westra E R, *et al.* DNA-guided DNA interference by a prokaryotic Argonaute [J]. *Nature*, 2014, 507(7491): 258-261.
- [5] Yang Z, Mao S, Wang L, *et al.* CRISPR/Cas and Argonaute-Based Biosensors for Pathogen Detection [J]. *ACS Sensors*, 2023, 8(10): 3623-3642.
- [6] Wu Z Y, Yu L, Shi W F, *et al.* Argonaute protein-based nucleic acid detection technology [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1255716.
- [7] Sioud M. RNA interference: story and mechanisms [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2021, 2282: 1-15.
- [8] Hegge J W, Swarts D C, van der Oost J. Prokaryotic Argonaute proteins: novel genome-editing tools? [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16(1): 5-11.
- [9] Santos D, Feng M, Kolliopoulou A, *et al.* What are the functional roles of piwi proteins and piRNAs in insects? [J]. *Insects*, 2023, 14(2): 187.
- [10] Elkayam E, Kuhn C D, Tocilj A, *et al.* The structure of human Argonaute-2 in complex with miR-20a [J]. *Cell*, 2012, 150(1): 100 - 110.
- [11] Koonin E V. Evolution of RNA- and DNA-guided anti-virus defense systems in prokaryotes and eukaryotes: common ancestry vs convergence [J]. *Biology Direct*, 2017, 12(1): 5.
- [12] Makarova K S, Wolf Y I, van der Oost J, *et al.* Prokaryotic homologs of Argonaute proteins are predicted to function as key components of a novel system of defense against mobile genetic elements [J]. *Biology Direct*, 2009, 4: 29.
- [13] Bhattacharjee S, Roche B, Martienssen R A. RNA-induced initiation of transcriptional silencing (RITS) complex structure and function [J]. *RNA Biology*, 2019, 16(9): 1133 - 1146.
- [14] Xiong X, Lu Z, Ma L, *et al.* Applications of Programmable Endonucleases in Sequence- and Ligation-Independent Seamless DNA Assembly [J]. *Biomolecules*, 2023, 13(7): 1022.
- [15] Ryazansky S, Kulbachinskiy A, Aravin A A. The expanded universe of prokaryotic Argonaute proteins [J]. *mBio*, 2018, 9(6): e01935-e01918.
- [16] Jolly S M, Gainetdinov I, Jouravleva K, *et al.* *Thermus thermophilus* Argonaute functions in the completion of DNA replication [J]. *Cell*, 2020, 182(6): 1545 - 1559.
- [17] Kuzmenko A, Oguienko A, Esyunina D, *et al.* DNA targeting and interference by a bacterial Argonaute nuclease [J]. *Nature*, 2020, 587(7835): 632 - 637.
- [18] Lee K Z, Mechikoff M A, Kikla A, *et al.* NgAgo possesses guided DNA nicking activity [J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(17): 9926-9937.
- [19] Zander A, Willkomm S, Ofer S, *et al.* Guide-independent DNA cleavage by archaeal Argonaute from *Methanocaldococcus jannaschii* [J]. *Nature Microbiology*, 2017, 2: 17034.
- [20] Swarts D C, Hegge J W, Hinojo I, *et al.* Argonaute of the archaeon *Pyrococcus furiosus* is a DNA-guided nuclease that targets cognate DNA [J]. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(10): 5120-5129.
- [21] Lisitskaya L, Petushkov I, Esyunina D, *et al.* Recognition of double-stranded DNA by the *Rhodobacter sphaeroides* Argonaute protein [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2020, 533(4): 1484-1489.
- [22] Miyoshi T, Ito K, Murakami R, *et al.* Structural basis for the recognition of guide RNA and target DNA heteroduplex by Argonaute [J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 11846.
- [23] Koonin E V, Makarova K S, Wolf Y I. Evolutionary genomics of defense systems in archaea and bacteria [J]. *Annual Review of Microbiology*, 2017, 71: 233-261.
- [24] Koopal B, Mutte S K, Swarts D C. A long look at short prokaryotic Argonautes [J]. *Trends in Cell Biology*, 2023, 33(7): 605-618.

- [25] Ofir G, Herbst E, Baroz M, *et al.* Antiviral activity of bacterial TIR domains via immune signalling molecules [J]. *Nature*, 2021, 600: 116-120.
- [26] Vaiskunaite R, Vainauskas J, Morris J J L, *et al.* Programmable cleavage of linear double-stranded DNA by combined action of Argonaute CbAgo from *Clostridium butyricum* and nuclease deficient RecBC helicase from *E. coli* [J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(8): 4616-4629.
- [27] Swarts D C, Szczepaniak M, Sheng G, *et al.* Autonomous Generation and Loading of DNA Guides by Bacterial Argonaute [J]. *Molecular Cell*, 2017, 65(6): 985-998. e6.
- [28] Willkomm S, Makarova K S, Grohmann D. DNA silencing by prokaryotic Argonaute proteins adds a new layer of defense against invading nucleic acids [J]. *FEMS Microbiol Reviews*, 2018, 42(3): 376-387.
- [29] Zander A, Holzmeister P, Klose D, *et al.* Single-molecule FRET supports the two-state model of Argonaute action [J]. *RNA Biology*, 2014, 11(1): 45-56.
- [30] Olovnikov I, Chan K, Sachidanandam R, *et al.* Bacterial argonaute samples the transcriptome to identify foreign DNA [J]. *Molecular Cell*, 2013, 51(5): 594-605.
- [31] Yuan Y R, Pei Y, Ma J B, *et al.* Crystal structure of *A. aeolicus* Argonaute, a site-specific DNA-guided endoribonuclease, provides insights into RISC-mediated mRNA cleavage [J]. *Molecular Cell*, 2005, 19(3): 405-419.
- [32] Wang L Y, Xie X C, Lü B, *et al.* A bacterial Argonaute with efficient DNA and RNA cleavage activity guided by small DNA and RNA [J]. *Cell Reports*, 2022, 41(4): 111533.
- [33] Jin S J, Zhan J, Zhou Y Q. Argonaute proteins: structures and their endonuclease activity [J]. *Molecular Biology Reports*, 2021, 48(5): 4837-4849.
- [34] Enghiad B, Xue P, Singh N, *et al.* PlasmidMaker is a versatile, automated, and high throughput end-to-end platform for plasmid construction [J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 2697.
- [35] He R Y, Wang L Y, Wang F, *et al.* *Pyrococcus furiosus* Argonaute-mediated nucleic acid detection [J]. *Chemical Communications*, 2019, 55(88): 13219-13222.
- [36] Wang F, Yang J, He R Y, *et al.* PfAgo-based detection of SARS-CoV-2 [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2021, 177: 112932.
- [37] Wang L, He R, Lü B, *et al.* *Pyrococcus furiosus* Argonaute coupled with modified ligase chain reaction for detection of SARS-CoV-2 and HPV [J]. *Talanta*, 2021, 227: 122154.
- [38] Song J Z, Hegge J W, Mauk M G, *et al.* Highly specific enrichment of rare nucleic acid fractions using *Thermus thermophilus* Argonaute with applications in cancer diagnostics [J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(4): e19.
- [39] Filius M, Cui T J, Ananth A N, *et al.* High-speed super-resolution imaging using protein-assisted DNA-PAINT [J]. *Nano Letters*, 2020, 20(4): 2264-2270.
- [40] Shin S, Jung Y, Uhm H, *et al.* Quantification of purified endogenous miRNAs with high sensitivity and specificity [J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 6033.
- [41] Gao F, Shen X Z, Jiang F, *et al.* DNA-guided genome editing using the *Natronobacterium gregoryi* Argonaute [J]. *Nature Biotechnology*, 2016, 34(7): 768-773.
- [42] O'Geen H, Ren C H, Coggins N B, *et al.* Unexpected binding behaviors of bacterial Argonautes in human cells cast doubts on their use as targetable gene regulators [J]. *PLoS One*, 2018, 13(3): e0193818.
- [43] Burgess S, Cheng L Z, Gu F, *et al.* Questions about NgAgo [J]. *Protein & Cell*, 2016, 7(12): 913-915.
- [44] Wu Y K, Li Y, Jin K, *et al.* CRISPR-dCas12a-mediated genetic circuit cascades for multiplexed pathway optimization [J]. *Nature Chemical Biology*, 2023, 19(3): 367-377.
- [45] Graver B A, Chakravarty N, Solomon K V. Prokaryotic Argonautes for *in vivo* biotechnology and molecular diagnostics [J]. *Trends in Biotechnology*, 2024, 42(1): 61-73.

□

(编辑: 杨晓翠)