

- factors in the helix-turn-helix probe helix, hormone receptor, and zinc finger families. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, **91**: 12357~ 12361
- 10 Suzuki M. Common features in DNA recognition helice of eukaryotic transcription factors. EMBO J, 1993, **12**: 3221~ 3226
- 11 Chothia C. Principles that determine the structure of proteins. Ann Rev Biochem, 1984, **53**: 537~ 572
- 12 Suzuki M, Yagi N, Gerstein M. DNA recognition and super-structure formation by helix-turn-helix proteins. Protein Engineering, 1995, **8**: 329~ 538

Stereochemical Rules of DNA Recognition by Transcription Factors. YANG Qi-sheng (Department of Biological Science and Technology, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China).

Abstract DNA recognition of the transcription factors involves both general chemical rules and

specific stereochemical rules. Recognition helice of transcription factor families binds to DNA, positing at a major groove. Pairing between the “residues line” of recognition helix and “base line” of base positions makes full fitting, usually involving 3 turns of α -helix and 3~ 5 base pairs. The binding geometry determined by interaction of the residues and bases in recognition area is indicated in the stereochemical chart, which shows recognition specificity. Stereochemical rules of DNA recognition by transcription factor family are summarized at bases of the chart.

Key words transcription factor, recognition helix-DNA interaction, stereochemical chart, stereochemical rules of recognition

肽核酸的分子生物学效应及应用

李晓旭 张亮仁 张礼和

(北京医科大学天然及仿生药物国家重点实验室, 北京 100083)

陈耀祖

(兰州大学化学系, 兰州 730000)

摘要 肽核酸 (PNA) 是一类以酰胺键连接骨架替代核酸中核糖磷酸二酯键骨架构成的核酸类似物, 其中 N-乙基甘氨酸骨架 PNA 与核酸链以 Watson-Crick 碱基配对形式稳定互补结合, 具有广泛生物学效应, 包括调节 DNA 识别蛋白质的功能以及调节转录和翻译. 在分子生物学研究中 PNA 作为新的工具在多方面得到应用. 除它的 DNA (RNA) 结合特性外 PNA 在生物稳定性、细胞摄取、结构修饰多方面的研究进展显示出作为基因调节药物具有良好前景.

关键词 肽核酸, 生物学效应, 转录, 翻译, 基因调节药物

学科分类号 Q524

肽核酸 (peptide nucleic acid, PNA) 是以肽键为骨架的核苷酸类似物, 其中 Nielsen 和 Egholm 等提出的以 N-氨基乙基甘氨酸为单元, 通过甘氨酸 α -N 酰甲基与碱基相连的 PNA (图 1), 其基本理化特性. 分子生物学效应及应用研究十分活跃, 显示了良好的应用前景.

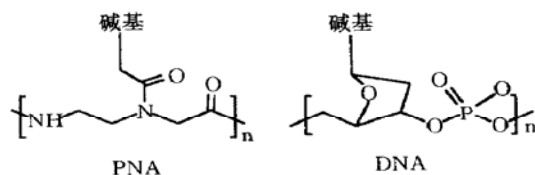


图 1 PNA 和 DNA 结构

收稿日期: 1996-10-30, 修回日期: 1997-01-24

1 基本理化特性

PNA 具有电中性, 非手性等属性, 分子中三级酰胺键旋转能阈与肽键相近, 在溶液中呈单一构象, 碱基堆砌相互作用是维持构象的主要因素^[1]. PNA 与 DNA、RNA 单链以 Watson-Crick 碱基互补配对结合成右手双螺旋, 一定条件下第二个 PNA 链反平行与 PNA/DNA (RNA) 双螺旋以 Hoogsteen 碱基配对方式形成三螺旋, 其热稳定性以及碱基错配对造成的稳定性下降程度高于对应的 DNA/DNA、DNA/RNA 复合物^[2]. PNA/DNA 双螺旋采取 B 型双螺旋结构, 而 PNA/RNA 复合物更接近 A 型双螺旋结构^[3,4]. PNA 与双链 DNA 互补链结合时可以取代非互补链, 使之解旋以单链形式存在, 形成 D-环结构, 一定条件下第二分子 PNA 链以 Hoogsteen 碱基配对方式与 PNA/DNA 双螺旋大沟结合形成三螺旋 (图 2)^[5]. PNA-DNA 骨架间的静电斥力小, 以及 PNA 骨架间的疏水引力是维持三螺旋稳定的重要因素. 最近的结构研究结果^[4]否定了 PNA 分子存在分子内氢键, 及其对稳定的 PNA/DNA 复合物形成做出贡献的推测.

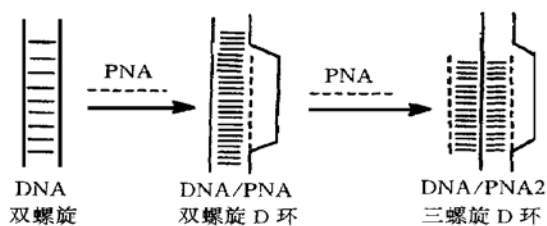


图 2 PNA 与双链 DNA 的作用

PNA 碱基之间以及碱基到骨架的合适键长是维持 PNA 与 DNA 结合特性的基本因素, 此外离子强度、pH 值对它的结合行为有重要影响, 生理盐浓度及 pH 条件下不利于 PNA/DNA 复合物形成, NaCl 浓度超过 40 mmol/L 时, 以及 K^+ 、 Mg^{2+} 在超过一定浓度时也抑制结合. 由于 Hoogsteen 配对需要在低 pH 环境下胞嘧啶质子化, 所以对于含胞嘧啶的

PNA, pH 变化可影响 Hoogsteen 碱基配对的强度^[6].

2 分子生物学效应

2.1 对核酸序列识别蛋白的影响

PNA 与 DNA 的结合导致限制性内切酶所需的特征结构发生改变, 从而序列专一性地抑制内切酶对 DNA 双链的切割, 如 BamH I、Sal I、Pst I、Hin III、Xho I 等^[7,8]. 该抑制作用具有剂量依赖性. PNA 也可抑制其他序列识别蛋白与 DNA 的结合, 与 NF- κ B 结合序列互补的 15 聚 PNA 抑制 P50 亚基与 DNA 的结合^[9]; PNA 与 RNA 结合后还可抑制 RNaseH 的作用^[10], 说明 PNA 能用于特异性的 DNA 识别蛋白抑制剂. 另一方面, PNA 与 dsDNA 的链取代结合又可导致单链 DNA 酶如 SI、Mungbean 核酸酶对 DNA 解旋部位的切割.

2.2 对转录的调节作用

PNA 分子与含有其靶序列的人工构建质粒模板在低盐条件下预处理后再置于转录缓冲液中, 在多种 RNA 聚合酶如人 pol II、T3、T4 噬菌体 RNA 聚合酶及 *E. coli* RNA 聚合酶体系中, 都有效地抑制转录产物的产生^[6,7,9,11], 除剂量因素外, 对转录的抑制作用与它同 dsDNA 结合位置有关, 结合在转录链时可以达到 100% 抑制而结合在非转录链时抑制程度大大下降, 最多不超过 50%^[7]. 此外 PNA 的大小及靶序列碱基构成也影响转录抑制效率, 10 聚 PNA 已足以抑制体外转录, 6、8 聚 PNA 的抑制效果则要差, 靶序列中 G 含量增加会降低 PNA 转录抑制效果. 就转录抑制机制而言, PNA 可以抑制聚合酶或转录因子与模板的结合^[9], 也可以阻止 RNA 链的延伸^[6]来实现转录抑制.

PNA 对转录的负调节还可以通过由转录本身介导的 PNA 与 DNA 的结合来实现, 即 PNA 可导致“序列专一的自杀性转录”^[12]. T3、T7 噬菌体 RNA 聚合酶转录体系中转录启动时, 瞬时的“转录泡”使 PNA 与模板的

结合更易于发生, 进而抑制了转录的进一步进行. 这样在一定条件下 PNA 可以在生理盐浓度下发挥转录调节作用, 另外可能利用 PNA 这一特点克服其他外源性基因调节剂导致的基因调节负反馈.

除对转录具有负的调节作用外, PNA 也可对转录进行正的调节^[13], 在转录体系中 RNA 聚合酶能利用 PNA/DNA 结合作用产生

的单链 DNA, 在 PNA 链取代反应发生的位点为起点转录生成 RNA 分子, 而且 PNA 介导的转录强度与 LacUV *E. coli* 启动子起始的转录强度相当. 如果模板质粒中有两个相邻的 PNA 靶序列在同一链或分别在相对的 2 个链上, 则以 PNA 结合序列为起点的转录更有效, 在后一种情况下产生分别以两个起点开始、向相反方向进行的转录产物 (图 3).

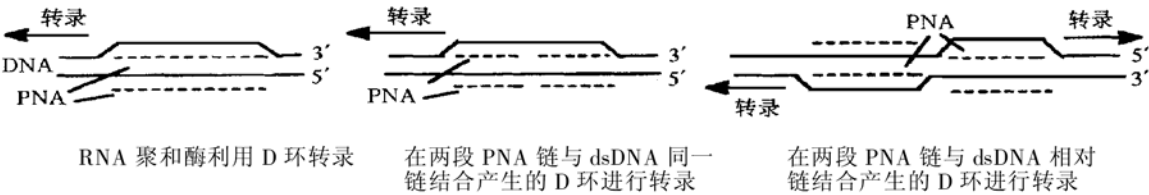


图 3 PNA 介导的转录

PNA 对转录的调节具有双向性, 分别实现对转录的序列专一的中止或启动需不同的特定条件. 一般只需单个 PNA 分子和处于模板链上的较短靶序列的相互结合即可实现对转录的抑制, 而转录的启动需较大的或多个 PNA 靶序列位于非模板链, 所以有可能控制不同的条件利用 PNA 进行序列专一性的转录人工正负调节.

2.3 对基因表达的调节

PNA 在兔网织红细胞裂解液中与 mRNA 编码区或起始密码子区中互补序列的结合均可导致剂量依赖、序列专一的翻译产物抑制, 如 SV40T 抗原、氯霉素酰基转移酶 (CAT) 等. 在起始密码子处 PNA 可能通过形成三螺旋阻碍了 80 S 核糖体与 mRNA 的结合, 而在编码区 PNA 与 mRNA 的复合体可以通过阻碍核糖体完成蛋白质链延伸抑制翻译.

在活细胞中 PNA 也显示出对基因表达的调节作用. 互补于 SV40T 抗原 mRNA5 端序列的 20 聚 PNA 显微注射入含有 SV40T 抗原 mRNA 的温度敏感细胞 *tsa8*^[7] 及 *cv-1* 细胞^[11], 均对 T 抗原表达的特异性抑制. PNA 的链长、靶序列在 mRNA 上的位置对基因表达抑制程度产生影响.

3 分子生物学应用研究

PNA 与 dsDNA 结合形成的 D 环对核酸酶 SI 敏感, 可用 SI 酶对 PNA 靶序列处进行位点专一的切割. 包含有 2 个在同一条链排列 (*cis*) 或在相对两条链上排列 (*trans*) 的邻近 PNA 靶序列 (相邻 6 个碱基对) 的质粒经与 PNA 特异结合后用 SI 酶切割获得了切割位点确定的 DNA 片段 (图 4), 其中双靶序列方式排列情况下 SI 酶切割效果更好, 特异性切割 > 90%^[14]. 所以 PNA 为分子生物学研究提供了一个实现专一位点 DNA 切割的新的手段.

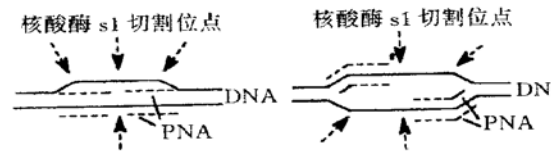


图 4 PNA 介导的 dsDNA 序列专一的 SI 酶切割
PNA 不同结合情况下 (*cis*, *trans*) 产生的单链被核酸酶切割.

配合 PCR 技术 PNA 可用来检测 DNA 序列中的点突变. PNA 与 DNA (RNA) 链结合复合体有高的热稳定性, 但又对碱基错配敏

感, 一个碱基的错配对可使 T_m 值较大幅度下降, 在 PCR 中, PNA 与引物或模板互补结合后, 可导致 PCR 中止, 但与一个碱基错配的模板结合后在合适的温度范围中由于复合体热稳定性下降, PNA 则不能干扰 PCR 的进行, 使该模板得以大量复制. 根据此原理, 互补于野生型 K₁ras 基因 12、13 密码子的 15 聚 PNA 成功地检出 12、13 密码子中出现的各类点突变, 检出的突变体在野生型中占的比例为 1/200, 利用 PNA 检测点突变简单、灵敏, 特异性强, 用于大规模筛选突变体具有独特优势^[15]. PNA 还用于辅助 PCR, 用 PCR 进行不规则重复序列基因的扩增时应用与模板互补的 PNA 片段与模板的结合, 减少了退火时模板链内或链间的相互作用, 而在进行聚合酶链反应时控制反应温度接近 PNA 与模板复合体的 T_m 值, 从而在引物延伸过程中 PNA 链又能解离, 不影响基因的正常扩增, 最终使这类基因的扩增得到增强, 同时降低了非正常产物的产生^[16].

PNA 作为探针也得到应用. 生物素标记的 PNA 与 DNA 杂交后, 经与亲合素结合可由电镜直接观察, 不但能观察研究 PNA 与核酸的相互作用, 还可通过 PNA 在 DNA 分子上的分布排列进行基因定位^[17]; 生物素标记 PNA 可与染色质中互补 DNA 片段结合, 再与磁性亲合素微球结合后可将特定基因片段从染色质中分离出来, 生物素标记的 CTG 重复序列 PNA 高效地从转录活性染色质中分离出了 COLO320DM 细胞中的 CAG 重复序列基因, 获得的基因特异性高, 信息量完整^[18], 可望利用生物素标记 PNA 探针对特定基因直接在正常和病变细胞中进行基因的分离和比较; 还可利用 PNA 的杂交特性用亲和层析分离核酸, 该方法高效、特异性强, 还能用于能形成二级结构的大核酸分子的分离^[19].

4 基因调节药物研究

PNA 分子生物学效应显示它具有基因调节药物的潜力, 还发现 PNA 具有良好的生物

稳定性, 除能抵抗核酸酶降解外^[8, 11] 对蛋白酶也有高度稳定性, 在人血清、细菌提取物、埃氏腹水癌细胞核细胞质抽提物中均无明显降解, 它抵抗真菌蛋白酶 K、猪小肠粘膜蛋白酶分解的能力是对照肽类的 1 000 和 30 倍^[20]. PNA 的细胞膜通透性差, 在动物器官摄入量极微, 但是借助合适的运载系统仍有望解决这一问题. 将生物素标记反义 PNA 与连有亲和素的转铁蛋白单克隆抗体 OX26-SA 相互作用, 再利用转铁蛋白受体的运转作用将反义于 rev mRNA 起始密码子周围序列的 18 聚 PNA 运送穿过血脑屏障被大脑摄取, 摄取量是无载体 PNA 脑摄取量的 28 倍以上, 摄取效率大致与静脉注射吗啡后脑摄取吗啡效率相同, 另外一个细胞膜上富含转铁蛋白受体的器官肝脏对 PNA 的摄取也提高了 38 倍. 有希望利用该运转模型进行 PNA 药理研究^[21] (图 5).

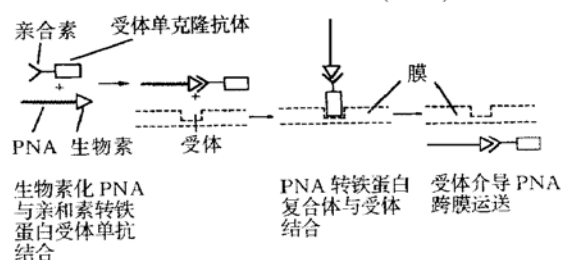


图 5 经载体的 PNA 跨膜运送

促进正常生理条件下 PNA 与核酸靶序列的结合能力是 PNA 药用研究的又一重要方面. 选择合适的 PNA 靶序列, 如基因组代谢活跃区或富含腺嘌呤的区域是能提高 PNA 结合能力的一个途径, 目前研究也多用嘧啶含量高的 PNA 序列^[6, 9]. 还可延长 PNA 与靶点的作用时间克服正常生理环境下结合缓慢的弱点^[11]. 更有前景的途径则是通过修饰 PNA 提高其结合能力, 将 2 个方向相反的 PNA 链通过一段非刚性链联接成双 PNA, 它与靶序列形成三螺旋的过程由单 PNA 分子时的三分子转变为双分子过程, 双 PNA 中一条链与靶位识别时另一条链即能迅速以 Hoogsteen 配对形式形成稳定复合物, 从而减小了反应体系的热焓, 使

PNA 与核酸序列总亲和性提高, 加快结合过程^[22, 23]; PNA 中由伪异胞嘧啶取代胞嘧啶, 可使 pH 值影响胞嘧啶质子化进而影响 Hoogsteen 三螺旋的稳定性这一问题得以忽略 (图 6), 同时仍具有三螺旋形成能力^[10, 23]. 除 PNA 结构修饰外, 深入研究利用核酸代谢活动机制使 PNA 在生理条件下实现转录抑制也是一个值得重视的研究途径^[12].

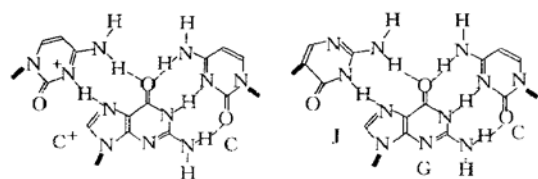


图 6 胞嘧啶与伪异胞嘧啶 (J) 三螺旋结构

PNA 已成为一类新的分子生物学研究有力的工具, 作为基因调节药物用于基因水平的治疗也具有良好的前景. 对 PNA 进行深入的化学修饰、改造研究以改进、调整其理化、生物学特性, 是拓宽 PNA 的应用范围以及发展为实用的药物的重要研究方向.

参 考 文 献

- Chen S M, Mohan V, Kiely J S *et al.* Molecular dynamics and NMR studies of single stranded PNAs. *Tetr Lett*, 1994, **35** (29): 5105~ 5108
- Egholm M, Buchardt O, Christensen L *et al.* PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen bonding Rules. *Nature*, 1993, **365** (6446): 566~ 568
- Leijon M, Graslund A, Nielsen P E *et al.* Structural characterization of PNA DNA duplexes by NMR. *Biochemistry*, 1994, **33** (33): 9820~ 9825
- Brown S C, Thomson S A, Veal J M *et al.* NMR solution structure of a PNA complexed with RNA. *Science*, 1994, **265** (5173): 777~ 780
- Demidov V V, Yavnilovich M V, Belotserkovskii B P *et al.* Kinetics and mechanism of Peptide Nucleic Acid binding to duplex DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92** (7): 2637~ 2641
- Nielsen P E, Egholm M, Buchardt O. Sequence-specific transcription arrest by Peptide Nucleic Acid bound to the DNA template strand. *Gene*, 1994, **149** (1): 139~ 145
- Hanvey J C, Peffer N J, Bisi J E *et al.* Antisense and antigenic properties of Peptide Nucleic Acid. *Science*, 1992, **258** (5086): 1481~ 1485
- Nielsen P E, Egholm M, Berg R H *et al.* Sequence specific inhibition of DNA restriction enzyme cleavage by PNA. *Nucl Acid Res*, 1993, **21** (2): 197~ 200
- Vickers T A, Griffith M C, Ramasamy K *et al.* Inhibition of NF- κ B specific transcriptional activation by PNA strand invasion. *Nucl Acid Res*, 1995, **23** (15): 3003~ 3008
- Knudsen H, Nielsen P E. Antisense properties of duplex and triplex forming PNAs. *Nucl Acid Res*, 1996, **24** (3): 494~ 500
- Bonham M A, Brown S, Boyd A L *et al.* An assessment of the antisense properties of RNase H-competent and steric blocking oligomers. *Nucl Acid Res*, 1995, **23** (7): 1197~ 1203
- Larsen H J, Nielsen P E. Transcription mediated binding of Peptide Nucleic Acid to double-stranded DNA: sequence specific suicide transcription. *Nucl Acid Res*, 1996, **24** (3): 458~ 463
- Mollegaard N E, Buchard O, Egholm M *et al.* Peptide nucleic acid DNA strand displacement loops as artificial transcription promoters. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (9): 3892~ 3895
- Demidov V, Frank-Kamenetskii M D, Egholm M *et al.* Sequence selective double strand DNA cleavage by Peptide Nucleic Acid using RNase S I. *Nucl Acid Res*, 1993, **21** (9): 2103~ 2107
- Thiede C, Bayerdorffer E, Blasczyk R *et al.* Simple and sensitive detection of mutation in the ras proto-oncogene using PNA-mediated PCR clamping. *Nucl Acid Res*, 1996, **24** (5): 983~ 984
- Demers D B, Curry E T, Egholm M *et al.* Enhanced PCR amplification of VNTR locus DS80 using Peptide Nucleic Acid. *Nucl Acid Res*, 1995, **23** (15): 3050~ 3055
- Demidov V V, Cherny D I, Kurakin A V *et al.* Electron microscopy mapping of oligopurine tracts in duplex DNA by Peptide Nucleic Acid targeting. *Nucl Acid Res*, 1994, **22** (24): 5218~ 5222
- Boffa L C, Carpaneto E M, Allfrey V G *et al.* Isolation of active gene containing CAG repeats by DNA strand invasion by a Peptide Nucleic Acid. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92** (6): 1901~ 1905
- Orum H, Nielsen P E, Jorgensen M *et al.* Sequence specific purification of nucleic acids by PNA-controlled hybrid selection. *Biotechniques*, 1995, **19** (3): 472~ 480
- Demidov V V, Potaman U N, Frank-Kamenetskii M D *et al.* Stability of Peptide Nucleic Acid in human serum and cellular extracts. *Biochem. Pharmacol*, 1994, **48** (6): 1310~ 1313
- Pardridge W M, Boado R J, Kang R S *et al.* Vector-mediated delivery of a Peptide Nucleic Acid analogue through the blood-brain barrier *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92** (12): 5592~ 5596
- Griffith M C, Risen L M, Grig M J *et al.* Single and bis Peptide Nucleic acid as triplexing agents: binding and stoichiometry. *J Am Chem Soc*, 1995, **117** (2): 831~ 832
- Egholm M, Christensen L, Dueholm K L *et al.* Efficient pH-independent sequence specific DNA binding by pseudoisocytosine-containing bis-PNA. *Nucl Acid Res*, 1995, **23** (2): 217~ 222

Molecular Effect and Application of Peptide Nucleic Acid. LI Xiao-xu, ZHANG Liang-ren, ZHANG Li-he (*National Key Laboratory of Natural and Biometric Drug, Beijing Medical University, Beijing 100083, China*); CHEN Yao-zu (*Department of Chemistry, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China*).

Abstract PNA is DNA analog in which the phosphate backbone has been replaced by (2-aminoethyl) glycine unit that is linked to the nucleotide bases *via* the glycine amino nitrogen and methylenecarbonyl linkers. PNA can bind to complementary oligonucleotides by Watson-Crick

base pairing with high thermal stability and exhibit wide biological effects including modulating the function of DNA sequence specific binding protein and modulating the transcription and translation *in vivo* or *in vitro*. Many applications have been explored for PNA as a new kind of molecular biological tools. Despite its DNA (RNA) binding properties, recent progress has shown that PNA has potential for the development of gene-targeting pharmaceuticals.

Key words peptide nucleic acid, biological effects, transcription, translation, gene modulating drugs

钙蛋白酶的结构及活性调节*

杜 敏 南庆贤

(中国农业大学食品学院, 北京 100094)

朱美君

(中国农业大学生物学院, 北京 100094)

摘要 钙蛋白酶广泛存在于各组织, 广泛表达的钙蛋白酶有两种, 钙蛋白酶 I 和钙蛋白酶 II, 它们激活所需的 Ca^{2+} 浓度不同. 这两种酶都有大、小两个亚基, 分子质量分别为 80 ku 和 30 ku. 大亚基有 4 个结构域, 小亚基由 2 个结构域构成. 新近还发现了几种组织特异表达的钙蛋白酶. 钙蛋白酶抑制蛋白是钙蛋白酶的内源抑制蛋白, 它由 5 个结构域组成, 其中 4 个为重复序列, 均具有独立抑制钙蛋白酶活性的功能. 体内钙蛋白酶活性受到严格调控, 贴膜反应可以降低钙蛋白酶对 Ca^{2+} 的依赖性, 膜磷脂头部所带的磷酸基团与激活作用有关, 自溶也可以降低对 Ca^{2+} 的依赖, 而钙蛋白酶抑制蛋白则起专一的抑制作用.

关键词 钙蛋白酶, 结构, 钙蛋白酶抑制蛋白, 活性调节

学科分类号 Q556

第一次发现钙激活中性蛋白酶 (简称钙蛋白酶, calpain) 至今已有 20 多年的历史. 在体内, 通过 Ca^{2+} 激活及自溶而表现出蛋白水解酶活性, 并通过钙蛋白酶抑制蛋白 (calpastatin) 抑制活化后的 calpain. Calpain 活性还受贴膜反应的调节, 表明 calpain 系统是一个复杂的, 高度调控的蛋白降解体系. 从目前的研究看, Calpain 的作用可能是调节胞内蛋白质的降解, 而非整个降解过程的直接参与者. 因为 calpain 主要作用对象是细胞骨架蛋白,

受体蛋白以及蛋白激酶; Calpain 可能通过对这些蛋白进行特异的局部降解而对其结构、功能进行调控. 总之, 对 calpain 的生理功能还很不清楚, 目前对 calpain 及其抑制蛋白的结构、活性调节有了初步的了解^[1].

* 国家自然科学基金 (39670548、39570535) 和国际科学基金 (International Foundation for Science, Sweden) 资助项目.

收稿日期: 1996-10-30, 修回日期: 1997-02-28