

DNA 的酯酶催化活性研究

王得元¹ 韩新民² 刘志昕³ 彭世清³ 王 鸣¹ 郑学勤³

(1 西北农业大学园艺系, 陕西杨陵 712100)

(2 陕西省畜牧兽医研究所, 陕西咸阳 712039)

(3 热带作物生物技术国家重点实验室, 海南儋州 571737)

摘 要 应用萘酯坚固蓝反应显色法对 DNA 的酯酶催化活性进行了研究。结果表明, 辣椒 DNA、鲑鱼精 DNA 具有分解萘酯的活性; 反应混合物中鲑鱼精 DNA 浓度为 0.0034 mg/mL 时, DNA 仍有分解萘酯的活性; 随着 DNA 浓度增加, DNA 的催化活性增强。6 种寡聚核苷酸均具有催化萘酯水解的能力, 但活性强弱不同; 4 种 dNTP 均不能催化萘酯水解。双链 DNA、单链 DNA 的显色反应完全来自 DNA 的催化萘酯水解反应。

关键词 DNA, 乙酸- α -萘酯, 催化活性

中图分类号 S641.303.2

转接

生物体的一切代谢反应都是在酶的作用下进行的, 长期以来生物催化作用一直被视为蛋白质的专利。Cech 等^[1]首次发现了 RNA 的生物催化作用。就 RNA 和 DNA 的结构而言, 尽管 2'-OH 赋予了 RNA 一些特殊的性质, 但在生物催化方面, DNA 也可能具备催化功能。锤头状核酶可以分成两个 RNA 片段: 核酶部分和底物部分。Chartrand 等^[2]将锤头状核酶的核酶部分的碱基序列进行了替换, 得到了 DNA 占主导地位的核酶构建体和全部为 DNA 的构建体。他们发现二者均有催化作用, 但强弱不同。Cuenoud 和 Szostak^[3]合成的单链 DNA-E₄₇ 具有连接酶活性, E₄₇ 催化连接反应的机制属一般酸碱催化机制, 其中金属离子复合物参与质子转移。这些研究又一次丰富了酶学。

萘酯加坚固蓝是酯酶同工酶研究中常用的检测方法^[4], 王身立等^[5]用这种方法检测到裸露的绿豆 DNA 具有分解萘酯的活性。戴君惕等^[6]和张学文等^[7,8]也用这种技术开展了研究, 发现小麦、鲤鱼和 λ -噬菌体的裸露 DNA 具有分解萘酯的活性, 并讨论了 DNA 可能的催化机理。DNA 酶学研究虽刚刚开展, 却是 DNA 研究中意义重大的发现。本文对两种物种 DNA 和 6 种寡聚核苷酸进行了分解萘酯活性的检测, 据此探讨了 DNA 催化萘酯的水解机理及应用前景。

1 材料和方法

1.1 供试 DNA

辣椒 DNA 取西杂 7 号辣椒幼叶按作者^[9]改进了的 Pich 和 Schubert^[10]的方法提取, 所提取的辣椒 DNA OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为 1.807。

收稿日期 1996-12-12

课题来源 热带作物生物技术国家重点开放实验室课题资助项目

作者简介 王得元, 男, 1968 年生, 博士

鲱鱼精 DNA Promega 公司产品, $OD_{280}/OD_{260}=1.80$.

单链寡核苷酸 6 个寡聚核苷酸在 ABI 370A DNA 合成仪上合成, 其序列分别为:

ON-1 5' CCGGATCCAGCTACTATAACG 3'
 ON-2 5' TGGTCTCCTTTTGGAGGCC 3'
 ON-3 5' GTTTATTTACAAGAGCGTACG 3'
 ON-4 5' AGCTGGATCCGGTCTGTCGAT 3'
 ON-5 5' GACTCGAGATGGCTCTAGTTGTAAAG 3'
 ON-6 5' TCGGTACCTTAAACGAATCCGATTCGG 3'

脱氧核苷酸 dATP, dCTP, dGTP, dTTP 二钠盐为德国宝灵曼公司产品。

1.2 反应底物和显色剂

反应底物为 1% 乙酸- α -萘酯(100 mg 乙酸- α -萘酸溶于 10 mL 50% 丙酮), 显色剂为 1% 固蓝 RR 盐(100 mg 固蓝 RR 盐溶于 10 mL 0.2 mol/L 磷酸缓冲液(pH6.8)过滤)。将反应底物与显色剂等体积混合过滤即成 α -萘酯固蓝显色液。

1.3 不同物种 DNA 分解萘酯活性的测定

将辣椒 DNA、鲱鱼精 DNA 用 TE(pH8.0) 稀释到 0.4 mg/mL, 取 0.3 mL DNA 稀释液于 1.5 mL Eppendorf 管中, 再加入 0.9 mL α -萘酯固蓝显色液, 混匀后于 37℃ 温浴, 定时取样 150 μ L 用双蒸水稀释至 300 μ L, 测定 540 nm 吸光度。

1.4 不同浓度 DNA 分解萘酯活性的检测

将鲱鱼精 DNA 用 TE(pH8.0) 稀释成不同浓度的 DNA 溶液。取 150 μ L DNA 溶液于 0.5 mL Eppendorf 管中, 加入 400 μ L α -萘酯固蓝显色液, 混匀后于 37℃ 反应, 定时取样 40 μ L 用双蒸水稀释至 300 μ L, 测定 540 nm 吸光度。

1.5 单链寡聚核苷酸的酯酶催化活性

取 150 μ L 0.25 mg/mL 的寡聚核苷酸溶液和 400 μ L α -萘酯固蓝显色液混合, 混匀后于 37℃ 反应。定时取样 40 μ L 用双蒸水稀释至 300 μ L 进行吸光度测定。

参照酶的测定方法^[11], DNA 催化活性可以单位 DNA 在单位时间内分解的萘酯数量来表示, 用下列公式计算:

$$\text{DNA 催化活性} = \frac{(\text{样品 } OD_{540} - \text{对照 } OD_{540})}{\text{反应时间 (h)}}$$

1.6 dNTP 的酯酶活性检测

取 50 μ L 10 mmol/L dNTP 于 Eppendorf 管中和 600 μ L α -萘酯固蓝染色液充分混匀后于 37℃ 反应, 观测颜色反应。

1.7 DNA 的酯酶催化活性机理探讨

以双链 DNA(鲱鱼精 DNA) 和单链 DNA(寡聚核苷酸 ON-5) 与反应底物、显色剂、 α -萘酯固蓝染色液的共同温浴作为处理, 设置了 8 个反应体系, 于 37℃ 反应 5 h 后观测结果。

2 结果与分析

2.1 不同物种 DNA 分解 α -萘酯的活性

辣椒 DNA、鲱鱼精 DNA 与 α -萘酯固蓝染色液于 37℃ 温浴, 定时取样测定 OD_{540} 值,

结果(表1)表明,辣椒DNA、鲱鱼精DNA均具有分解乙酸- α -萘酯的活性,且辣椒DNA的催化活性较鲱鱼精DNA强。37℃温浴1h反应混合物已呈现出黑褐色,此时辣椒DNA、鲱鱼精DNA的催化活性分别为0.9983,0.6733。

表1 不同物种DNA分解 α -萘酯的活性

物种DNA	37℃温浴时间(h)				
	0	1	2	3	4
辣椒	0.0136	0.9983	0.6391	0.4389	0.3532
鲱鱼精	0.0005	0.6733	0.5454	0.4146	0.3556

2.2 不同浓度DNA分解 α -萘酯活性的比较

从表2可以看出,随着DNA浓度的增大,DNA分解 α -萘酯的活性增强。当DNA浓度为0.0125 mg/mL时,反应体系中DNA的实际浓度为0.0034 mg/mL,DNA仍具有催化活性,说明微量DNA也具有分解 α -萘酯的活性。

表2 不同浓度DNA分解 α -萘酯活性的比较

DNA浓度 (mg/mL)	37℃温浴时间(h)					
	0	0.5	1	2	3	4
0.0125	0.0576	0.4498	0.3444	0.2314	0.1633	0.1130
0.0250	0.0652	0.5924	0.4184	0.3097	0.2158	0.1550
0.0500	0.0750	0.6910	0.5420	0.3352	0.2430	0.1687
0.1000	0.0435	0.7880	0.6068	0.3712	0.2665	0.1921
0.2000	0.0655	0.8078	0.5743	0.4204	0.2876	0.2042
0.4000	0.0977	0.7406	0.6638	0.4175	0.2805	0.2188

2.3 寡聚核苷酸分解萘酯的活性

6种寡聚核苷酸均有分解 α -萘酯的活性(表3)。寡聚核苷酸ON-1,ON-3,ON-4的碱基数量均为21个,但它们的催化活性却有强弱之分,ON-4的催化活性最强,ON-1次之,ON-3最弱;ON-4,ON-1,ON-3的核苷酸组成中,嘧啶类碱基(C+G)数目分别为12,11,8,这虽与其催化活性排序结果相吻合,但尚不能排除嘌呤类碱基参与催化作用可能性。这说明,寡聚核苷酸催化活性与其碱基组成及排列顺序有关。寡聚核苷酸ON-5,ON-6的核苷酸数目分别为27,28个,但其催化活性却大大低于ON-4(核苷酸数量为21个),这表明,寡聚核苷酸的催化活性除了受核苷酸数量影响外,特别是与其碱基组成及排列顺序有密切的关系。

表3 寡聚核苷酸分解 α -萘酯的活性

寡聚核苷酸	37℃温浴时间(h)				
	0	1	2	3	4
ON-1	0.0001	0.1925	0.1715	0.1154	0.0908
ON-2	0.0029	0.1182	0.0770	0.0250	0.0316
ON-3	0.0029	0.1406	0.0956	0.0441	0.0450
ON-4	0.1330	0.8023	0.3802	0.2435	0.1861
ON-5	0.0365	0.1617	0.1051	0.0441	0.0382
ON-6	0.0737	0.2227	0.1195	0.0549	0.0422

2.4 dNTP、分解萘酯活性的检测

经 4 h 反应后, dATP, dCTP, dGTP, dTTP 分别与 α -萘酯固蓝染色液的反应体系均无颜色反应, 即反应体系明显不变成黑褐色(结果未示), 说明 4 种 dNTP, 即单个碱基成份不具备催化乙酸- α -萘酯水解的能力。

2.5 双链 DNA 和单链 DNA 的催化机理探讨

为了排除 DNA 与萘酯、固蓝 RR 盐生成某种有色复合物的可能性, 作者采用了严格的试验设计(见表 4)进行研究。8 个反应体系于 37℃ 反应 5 h 后观测结果表明, 反应 1 和 5 仍呈现出 1% 乙酸- α -萘酯的丙酮溶液的白色, 反应 2 和 6 仍呈现出 1% 固蓝 RR 盐磷酸溶液的棕红色, 这说明单链 DNA、双链 DNA 均不与乙酸- α -萘酯、固蓝 RR 盐反应形成黑褐色复合物。反应 4 和 8 的颜色仍呈现出 α -萘酯固蓝染色液的颜色, 只是颜色变浅, 说明在温浴过程中染料和萘酯已部分析出, 且无 DNA 存在时 α -萘酯和固蓝 RR 盐不发生反应。反应 3 和 7 则呈现出明显的黑褐色, 说明单链 DNA、双链 DNA 均具有催化乙酸- α -萘酯的功能, 正是由于 α -萘酯水解产生的 α -萘酚与固蓝作用发生了颜色反应, 才使得反应混合物呈黑褐色。显色反应完全来自于 DNA 催化 α -萘酯的水解作用, DNA 分子和 α -萘酯或固蓝 RR 盐不形成有色复合物。

表 4 双链 DNA 和单链 DNA 的催化机理

项 目	处 理							
	1	2	3	4	5	6	7	8
DNA	dsDNA	dsDNA	dsDNA		ssDNA	ssDNA	ssDNA	
DNA 浓度(mg/mL)	0.25	0.25	0.25		0.25	0.25	0.25	
DNA 体积(μ L)	130	130	130		100	100	100	
1%乙酸- α -萘酯体积(μ L)	400		200	200	400		200	200
1%固蓝体积(μ L)		400	200	200		400	200	200
TE(pH8.0)体积(μ L)				130				100
总体积(μ L)	530	530	530	500	500	500	500	
显色反应	—	—	+	—	—	—	+	—
OD ₅₄₀	1.4450	1.5093	1.5234	0.1230	1.1969	1.4599	1.2191	0.1113

注: +, — 分别表示发生或没发生黑褐色颜色反应。

3 讨 论

本试验所用的辣椒 DNA, 经苯酚、苯酚: 氯仿(1:1)、氯仿: 异戊醇(24:1)的多次抽提, 可以排除蛋白质的影响; 抽提的 DNA 经 RNA 酶处理, 亦可排除 RNA 的影响。提取的辣椒 DNA 经紫外检测, $OD_{260}/OD_{280}=1.807$, 说明提取的 DNA 纯净。鲑鱼精 DNA 购自 Promega 公司, DNA 质量亦有保证。因此, 试验结果表明不同物种 DNA 具有分解萘酯的活性。这与已有的研究绿豆 DNA^[5]、小麦 DNA、鲤鱼 DNA、 λ -噬菌体 DNA^[6]均具有分解萘酯活性的结果趋势是一致的。本研究证实动物与植物的总 DNA 均有分解萘酯的活性。

供试的 6 个寡聚核苷酸的碱基数目、组成及排列顺序均不相同, 但均具有催化活性。这说明, 单链 DNA 由 4 种碱基 A, C, T, G 构成时, 如果碱基数量足够, 催化强度取决于碱基组成与排列顺序。张学文等^[7]认为单链 DNA 不具有催化作用, 这是因为在研究中他们

使用的是ssDNA和尿素的混合物,很可能是尿素抑制ssDNA的催化作用。但张学文^[8]指出,Poly A这一单链寡核苷酸具有催化作用,这与本研究中采用的6个寡聚核苷酸具有催化作用结果是一致的。

本研究发现,双链DNA的催化活性较强,如反应中鲑鱼精DNA实际浓度为0.0034 mg/mL时,DNA仍有分解 α -萘酯的活性。单链寡聚核苷酸具有催化活性,而单个4种脱氧核苷酸却无此功能,这意味着3',5'-磷酸二酯键的形成是DNA行使功能所必要的条件,而不是充分条件,因为Poly U这一单链多聚核苷酸就无催化活性^[8]。DNA具有催化活性与其一级结构有关。DNA一级结构相同时,单链DNA、双链DNA的催化活性强弱问题尚待研究。

测定过程中,由于目前对DNA催化性质认识尚不清楚,没有终止反应,且反应时间长达2~5 h,使得酶的反应仍在进行,因而导致了下面两种现象的产生:①实验中虽然设置了反应时间为0的处理,但实验测出的数值却是反应0.5~1 min后的结果。②温浴0.5或1 h后,随着反应时间的增加,DNA催化活性却下降,这可能是反应中底物已被DNA完全水解所致。另外,从表4可以看出,仅用OD₂₆₀不能反映出DNA的催化活性,而必须辅之以颜色反应。DNA的催化作用较强,因而在进一步研究中,反应混合物温浴0.5~1 h即可测定OD₂₆₀及观测颜色反应,用以表示DNA的酯酶催化活性。

DNA既能催化反应又可以储存信息,因此生命起源的最新理论强调RNA的原始作用。然而,从已有的研究与本研究看,DNA也具有上述双重功能,因此,进一步深入开展DNA的生物催化作用研究对于分析其在生命代谢活动中的功能、探讨生命起源与演化等具有重要意义。

参考文献

- 1 Cech T R, Bass B L. Biological catalysis by RNA. *Ann. Rev. Biochem.*, 1986, 55: 599~629
- 2 Chartrand P, Harvey S C, Ferbeyre G et al. An oligodeoxynucleotide that supports catalytic activity in the hammer head ribozyme domain. *Nucleic Acids Research*, 1995, 23(20): 4092~4096
- 3 Cuenoud B, Szostak J W. A DNA metalloenzyme with DNA ligase activity. *Nature*, 1995, 375: 611~614
- 4 胡能书, 万贤国. 同工酶技术及其应用. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1985. 96~104
- 5 王身立, 陈嘉勤, 禹宽平等. 酶性DNA I 发现绿豆DNA具有酯酶活性. *湖南师范大学自然科学学报*, 1995, 18(3): 59~62
- 6 戴君惕, 张学文. DNA催化活性的研究 I 裸露DNA分解萘酯活性的检测. *湖南农业大学学报*, 1995, 21(6): 531~534
- 7 张学文, 戴君惕, 董廷瑜. DNA催化活性的研究 I DNA分子催化机理探讨. *湖南农业大学学报*, 1995, 21(6): 535~537
- 8 张学文, 戴君惕, 董廷瑜. DNA催化活性的研究 II 多聚核苷酸的催化作用. *湖南农业大学学报*, 1996, 22(2): 103~105
- 9 王得元. 辣椒抗烟草花叶病毒基因工程和杂种优势分子机理研究[学位论文]. 陕西杨陵: 西北农业大学园艺系, 1997
- 10 Pich U, Schubert I. Miniprep method for isolation of DNA from plants with a high content of polyphenolics. *Nucleic Acids Research*, 1993, 21(14): 3328
- 11 施特马赫 B 著, 钱嘉洲译. 酶的测定方法. 北京: 中国轻工业出版社, 1992

Studies on the Esterase Catalytic Activity of DNA Molecules

Wang Deyuan¹ Han Xinmin² Liu Zhixin³

Peng Shiqing³ Wang Ming² Zheng Xueqin³

(1 Department of Horticulture, Northwestern Agricultural University, Yangling, Shaanxi 712100)

(2 Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Xianyang, Shaanxi 712039)

(3 National Key Biotechnology Lab. of Tropical Crops, Danzhou, Hainan 571737)

Abstract The esterase catalytic activity of DNA molecules was studied using the coloring-reaction of α -naphthyl acetate and fast blue RR. The results indicated that DNA extracted from hot pepper, *Capsicum annuum* L., and DNA from herring sperm had the activity of decomposing naphthyl acetate. When the concentration of herring sperm DNA was 0.0034 mg/mL, DNA still possessed the catalytic activity. The esterase activity of DNA increased along with the concentration of DNA. 6 kinds of oligonucleotide also showed catalytic activity to hydrolyze naphthyl acetate, but differed in the intensity of activity. 4 kinds of dNTP could not catalyze the hydrolysis of naphthyl acetate at all. The coloring-reaction of dsDNA and ssDNA in the reaction mixtures resulted wholly from the hydrolysis, catalyzed by DNA, of naphthyl acetate.

Key words DNA, α -naphthyl acetate, catalytic activity

• 简 讯 •

《西北农业大学学报》1996 年荣获 4 项奖

1. 在国家科委、中宣部、新闻出版署联合组织的第二届全国科技期刊评比中本刊获得全国优秀科技期刊二等奖；
2. 在中国农学会农业科技期刊分会组织的全国农口学会第二届科技期刊评比中本刊获全国农口学术类期刊优秀奖；
3. 在陕西省科技期刊编辑学会组织的全省优秀科技期刊评比中本刊获陕西省优秀科技期刊一等奖；
4. 在陕西省教委、陕西省新闻出版局组织的全省高校期刊评比中本刊获陕西省高校优秀期刊一等奖。

(李汉章)