高等学校化学学报
CHEMICAL JOURNAL OF CHINESE UNIVERSITIES
研究论文

有机溶剂体系中刺激响应性RNA切割型脱氧核酶的工程化

贺荣荣, 游　昕, 郑　星, 杨梦晗, 常天俊
(河南理工大学资源环境学院, 焦作 454003)

摘要　引入新的识别元件对脱氧核酶(DNAzyme)进行工程化是拓展其应用范围的重要途径, 但这依赖于对其可工程化位点的系统表征. 为此, 本文对前期发现的需要有机溶剂的RNA切割型脱氧核酶(RNA-cleaving DNAzyme, RCD, 名为E3)进行工程化改造, 在其不同区域发现了多个可工程化位点, 并构建了多种刺激响应性RCD. 首先, 在可变区域将E3劈成两半, 通过设计"DNA拉链"构建多组分酶(Multiple component DNAzyme, MNAzyme)的策略, 在可变区鉴别了6个可用于工程化的位点; 接着在可变区成功设计了由单个外加的DNA序列激活的MNAzyme系统; 进一步在E3的底物结合臂发现了另一个可用于设计MNAzyme的区域, 并设计了一系列需2个DNA引发剂同时存在才能激活的三组分酶系统. 所有MNAzyme系统在35%(体积分数) DMSO和30%(体积分数)乙醇溶液中都有极高的选择性和极低的背景值, 多种MNAzyme和引发剂共存体系中的反应信号接近单个引发剂产生信号的加和. 本研究为在含有机溶剂的应用场景中构建响应性RCD探针提供了平台.

关键词　脱氧核酶; 刺激响应性; 有机溶剂; 分子工程; 多组分酶
中图分类号　O629.8　　**文献标志码**　A　　doi: 10.7503/cjcu20250010

Engineering Stimuli-responsive RNA-cleaving DNAzymes in Organic Cosolvents

HE Rongrong, YOU Xin, ZHENG Xing, YANG Menghan, CHANG Tianjun*
(*Institute of Resources and Environment*, *Henan Polytechnic University*, *Jiaozuo* 454003, *China*)

Abstract　Engineering deoxyribozyme (DNAzyme) by the introduction of new recognition elements is an important approach for expanding its applications, however, this depends on the systematic characterization of the engineerable sites in the DNAzyme. In this work, we investigated the engineerable sites of an organic solvent-needing RNA-cleaving DNAzyme (RCD, named E3) previously reported by our group. We first split E3 into two parts at its variable region, and added two DNA sequences on the 5′-end of one part and 3′-end of the other part to form duplex to activate the DNAzyme. By construction of the zipper-like Multiple Component DNAzyme (MNAzyme), we were able to identify 6 splitting sites that could be utilized for DNAzyme engineering. Based on this discovery, a DNAzyme system that was activated by an external DNA initiator was constructed by splitting E3 at its variable region and introducing two oligonucleotides at the split sites for the binding of the initiator. Furthermore, we identified several splitting sites on the substrate-binding arm of E3 as an alternative region for the design of MNAzyme. Application in both regions, an intricate three component DNAzyme system was designed to be activated only in the presence of the two specific initiators. All the MNAzyme systems exhibited extremely high selectivity and very low background both in 35% (volume fraction) DMSO and 30% (volume fraction) ethanol solvents. Moreover, in mixing of various

收稿日期: 2025-01-19. 网络首发日期: 2025-02-20.
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
基金项目: 国家自然科学基金(批准号: U1704241)和河南省科技攻关项目(批准号: 242102321046)资助.
Supported by the National Natural Science Foundation of China(No. U1704241) and the Science and Technology Research Project of Henan Province, China(No.242102321046).

MNAzyme systems and all the relative initiators, the cleavage products were almost the sum of that in mixing these MNAzymes in the presence of individual initiator. These results demonstrate that E3 is an excellent scaffold for constructing responsive RCD probes in applications in organic solvents-containing scenarios.

Keywords DNAzyme; Stimuli-responsive; Organic solvent; Molecular engineering; Multiple component DNAzyme

1994年，Breaker与Joyce团队[1]通过体外筛选(*In vitro* selection)的方法获得了第一个具有催化功能的DNA分子，即RNA切割型脱氧核酶(RNA-Cleaving DNAzyme，RCD)，证明核酸不仅是遗传信息的载体，而且是具有催化功能的高分子化合物，开启了核酸功能研究的新篇章. 随后，科学家发现了多种具有催化功能的DNA，包括催化RNA和DNA切割、磷酸化、过氧化或金属螯合作用等化学反应[2,3]，展示了DNA作为新型生物催化剂的能力. RCD是其中研究最广泛、种类最多的一类，其通常以两端的结合臂识别、捕获底物(含RNA单元的DNA-RNA嵌合分子)，在辅因子作用下折叠成特定结构，进而催化切割底物中的磷酸二酯键[4~7]. 该特性使其既具有分子识别元件，又具有信号发生单元，是理想的下一代生物传感器[3,8~10]. 然而，目前RCD可直接探测的对象主要为金属离子[11]与细胞外混合物[12~15]，限制了其分析应用范围. 引入新的分子识别单元，构建对引发剂刺激响应的RCD是拓展其应用范围的重要策略. 将RCD改造为对核酸序列刺激响应的多组分酶(Multiple component DNAzyme，MNAzyme)是目前取得成功案例最多的一种方式[16~19]. 此类研究经常使用的RCD母体是8-17和10-23 RCD，二者有很高的催化反应速度，其催化核心和可工程化位点也得到了系统表征[20~23]. 而众多已报道的其它RCD很少涉及工程化位点研究，因此限制了用其来设计和发展新的分子探针.

DNA是高水溶性的多聚阴离子化合物，迄今为止绝大多数DNAzyme都是在纯水溶液中发现和应用的. 而实际上很多反应体系或检测场景离不开有机溶剂. 因此，分离能在有机溶剂体系工作的DNAzyme将有助于拓展其应用范围[24]. 为此，本课题组发展了“强制体外进化”的策略，获得了在35%(体积分数)二甲亚砜(DMSO)中有高催化活性的RCD(即E3)[25,26]. 进一步在E3的一端引入ATP适配体，通过寡核苷酸链调节其活性，构建了ATP响应性适体酶系统，初步实现了有机溶剂体系中对靶分子刺激的响应. 然而该策略的分子识别元件与催化单元缺少直接作用，需借助外加寡核苷酸链来实现二者的通讯，易导致背景信号高和响应速度低等问题. 因此，本文希望在E3的内部寻找可工程化的位点，为在有机溶剂体系构建具有低背景、快反应的刺激响应性分子提供基础.

本文采用碱基互补配对的方式构建刺激响应性RCD，对E3的可工程化位点进行研究. 首先将RCD在潜在的工程化位点劈开，分别引入可互补的两条链，通过形成DNA“拉链”将其复活，研究这些位点的可及性；基于此，在35%(体积分数)DMSO和30%(体积分数)乙醇2种有机溶剂体系中构建了对单个DNA序列刺激响应的两组分酶系统；进一步在E3的底物结合臂中发现了另一个可工程化的区域，接着在这两个区域的不同位点构建了只有2个DNA序列同时存在才响应的三组分酶系统. 这些MNAzyme系统对目标序列有高选择性和高响应能力，可在多种MNAzyme共存的体系中专一性响应各自的引发剂，互不干扰. 本文在E3内发现了多个高质量的可被工程化位点，并设计了多种高选择性、低背景反应的MNAzyme系统，为后续设计多样化的响应性RCD奠定了基础.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

二甲基亚砜(DMSO)、溴酚蓝、丙烯酰胺、无水乙醇、蔗糖、二甲苯青FF、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、尿素(Urea)和十二烷基硫酸钠(SDS)，分析纯，北京百灵威科技有限公司；过硫酸铵、*N*,*N*,*N*′,*N*′-四甲基乙二胺(*N*,*N*,*N*′,*N*′-TEMED)、无水乙酸钠、乙二胺四乙酸(EDTA)、氯化镁和硼酸，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，具体序列见本文支持信息表S1~S5.

UV-2550型紫外-可见分光光度计，日本Shimadzu公司；Allegra-64R型高速冷冻离心机，美国

Beckman公司；Gel Doc™ XR⁺型凝胶成像仪，美国Bio-RAD公司；DYY-7 C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；Millipak Express 40型超纯水系统，德国默克公司；PB-21型酸度计，德国赛多利斯公司.

1.2 实验过程

1.2.1 DNA样品准备 将DNA样品用超纯水溶解，通过260 nm处的吸光度值和对应序列的摩尔消光系数计算浓度. 所有DNA样品在反应开始前经90 ℃变性1 min，然后室温冷却复性后使用.

1.2.2 DNAzyme催化底物切割反应 除特殊说明外，本文涉及的DNAzyme反应都在单转换条件下进行，即DNAzyme(或MNAzyme的每一组分)与底物(5′FRQ30)的浓度比([E]/[S])为10∶1. 典型的反应体系包括2500 nmol/L DNAzyme，250 nmol/L 5′FRQ30，50 mmol/L Tris-HCl缓冲液(pH=7.5)，300 mmol/L NH_4Cl，30 mmol/L $MgCl_2$和35% DMSO. 反应开始前，将DNAzyme和底物于90 ℃加热变性1 min，在室温复性后加入到反应体系中，于23 ℃反应1 h. 接着向体系中加入终浓度为50 mmol/L的EDTA(pH=8.0)溶液终止反应，再加入终浓度为300 mmol/L的NaOAc溶液(pH=5.2)和预冷无水乙醇(无水乙醇与反应体系的体积比为4∶1)于−20 ℃沉淀反应产物. 在4 ℃、15000 r/min的条件下离心20 min，经真空离心浓缩、干燥回收反应产物.

1.2.3 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(dPAGE)分析反应产物 反应产物在200 g/L dPAGE[1 L溶液中含有420.0 g尿素、100 mL 10×TBE缓冲液(1 L溶液中含有108.0 g Tris、55.0 g硼酸和20 mL 0.5 mol/L EDTA，使用时加入9倍体积纯水稀释成1×TBE)、500 mL 40%(质量分数)丙烯酰胺-亚甲基双丙烯酰胺(质量比29∶1)]中进行分析. 电泳缓冲液为1×TBE缓冲液，于室温、300 V恒压下电泳. 样品在分析前溶于超纯水，加入尿素变性加样缓冲液[100 mL溶液中含有20 g蔗糖、28 mg二甲苯青FF、1 mL 100 g/L SDS、10 mL 10×TBE和110 g尿素]，于90 ℃变性1 min. 用凝胶成像仪成像系统获取电泳条带，用ImageJ软件分析电泳条带的荧光强度(以灰度值表示)，根据下式计算底物的切割产率(Clv yield，%)：

$$\text{Clv yield} = [I_{\text{Clv}}/(I_{\text{Clv}} + I_{\text{Unclv}})] \times 100\% \quad (1)$$

式中：I_{Clv}表示切割产物条带的荧光强度；I_{Unclv}表示未被切割的完整底物的荧光强度.

1.2.4 DNAzyme催化底物切割的动力学 DNAzyme催化底物切割的表观速率常数(k_{obs})在单转换条件下([E]/[S]=10∶1)测得. DNAzyme催化5′FRQ30切割的反应按1.2.2节中所描述的方法进行，反应时间点设定为0，5，10，30，60和120 min. 采取与1.2.2节中同样的方法终止反应、沉淀产物并进行电泳分析. 以底物的切割产率对反应时间作图，利用GraphPad Prism 8软件根据单相指数方程(One-phase exponential equation)拟合，公式如下：

$$Y = Y_0 + (Y_{\text{M}} - Y_0) \times (1 - e^{-kt}) \quad (2)$$

式中：Y是特定反应时间酶催化底物的切割产率(Y=Clv yield)；Y_0为t=0时的背景切割产率；Y_{M}为最大底物切割产率；k为表观速率常数k_{obs}(h^{-1}). 文中所有动力学数据为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 构建DNA“拉链”研究E3内部的可工程化位点

E3是在全长RCD(DR11-4)去掉了两端引物区序列后，再截去中间24-nt序列所得的精简版本[25]. 其采用一个11-nt的结合臂捕获底物，位于5′端的茎环结构和富G序列构成催化核心，再用一段7-nt的可变序列将催化核心和底物结合臂连接起来[图1(A)]. 将E3的可变区序列(T20~A26)突变或删除，其活性并未完全丧失，因此推测该区域是潜在的可工程化位点.

本文采取了一种简单的策略来构建响应性RCD，研究以上潜在的工程化位点. 在潜在位点处将E3劈开成两半，使其失去活性；再在劈开位点分别引入一段序列，通过碱基互补配对将E3的两部分连接，类似DNA“拉链”，恢复其活性. T20到A26之间有6个潜在的可劈开位点，命名为a，b，c，d，e和f[图1(A)和(B)]. 首先在这些位点引入7-nt长的序列以形成DNA“拉链”. 发现在位于中间的劈开位点

(c和d)处，7-nt的DNA“拉链”能很好地恢复被劈开成两组分的E3的活性，其底物切割率与完整E3相同．但离中间越远的位点，DNA拉链的活性恢复能力越低，例如在紧邻底物结合臂的f位点和紧邻催化核心的a位点，几乎看不到切割产物．考虑到两侧功能区的结构对DNA拉链的形成可能有位阻效应，而增加碱基互补配对的个数有助于稳定DNA拉链的形成，进而利于恢复MNAzyme的活性．因此，接着将DNA拉链延长至20-nt，发现在b，c和d位点构建MNAzyme对底物的切割产率改变不大，但在a，e和f位点构建MNAzyme切割底物的产率有大幅度提升，表明延长互补链长度可避免空间位阻效应的不利影响[图1(C)]．因此，以上位点均可以用来工程化对碱基互补响应的MNAzyme，为构建响应性MNAzyme提供了多种选择．

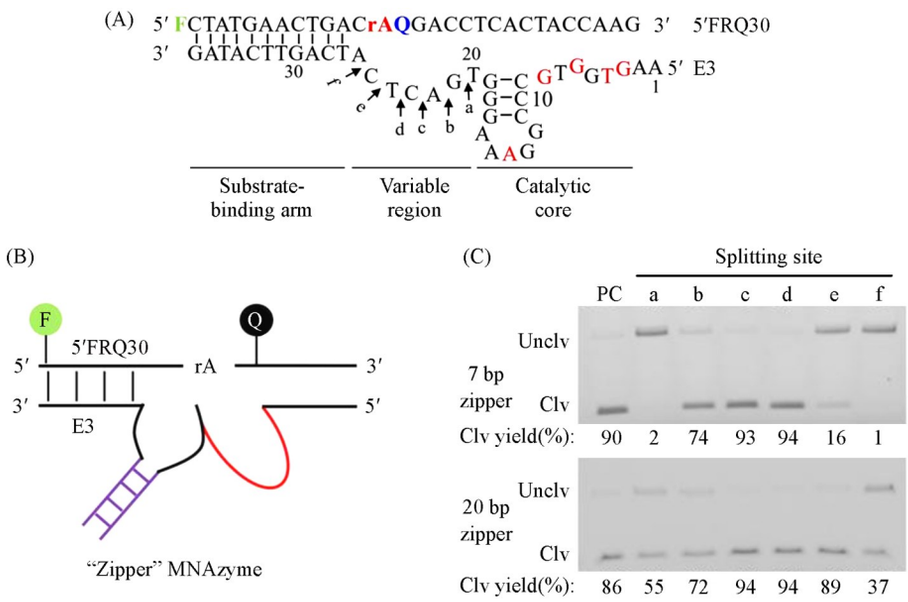


Fig. 1 Investigation of the engineering sites of E3 by construction of a DNA “zipper” initiated MNAzyme

(A) The secondary structure of E3. The potentially engineering sites are pointed out by arrows; a DNA sequence embedded with an RNA base (rA) was used as the substrate (5′FRQ30); 5′FRQ30 was modified with a quencher (Q) neighboring the cleavage site and a fluorophore (F) at the 5′ end for tracking the cleavage products. (B) Schematic diagram of the DNA "zipper"-activated MNAzyme. (C) Cleavage yields of 5′FRQ30 by the DNA "zipper" activated MNAzymes which were constructed at different splitting sites. PC indicates the positive control, *i. e.* the cleavage of the substrate by the intact DNAzyme E3; the concentration of each component of the MNAzyme is 2500 nmol/L, and 5′FRQ30 is 250 nmol/L; the cleavage reaction was carried out at 23 ℃ for 1 h; Unclv and Clv indicate the uncleaved and the cleaved substrates, respectively; the DNA sequences used in this section are shown in Table S2 in Supporting Information of this paper.

2.2 构建单个DNA刺激响应的“胶带式”MNAzyme系统

鉴于前文所设计的DNA拉链不响应外界刺激，接着尝试采取DNA“胶带”的方式将其工程化为可对外界刺激响应的酶系统．设计原理如下：将E3分成2个部分，并在劈开位点两端分别引入一段序列，形成2个无催化活性的半酶；当劈开位点引入的两部分序列与外加序列(引发剂)互补时，2个半酶被DNA“胶带”粘成具有活性的酶，进而催化底物切割[图2(A)]．根据前文结果，本文在E3可变区中间的d位点和边缘的e，f位点分别设计MNAzyme，比较其被引发剂序列激活的反应效果．

首先，随机设计了一段30-nt长的单链DNA(T1)作为引发剂，将与其互补的序列(15-nt)分别加入到E3被劈开位点的两端构成2个半酶．发现在含35% DMSO的反应体系中，T1能很好地恢复E3 MNAzyme的活性，60 min内几乎可完全切割底物；而无引发剂时，反应120 min仍无任何切割产物被检出，表明该系统具有很高的选择性和很低的背景值(见本文支持信息图S1)．此外，发现由E3构建的“胶带”MNAzyme对有机溶剂浓度的要求与其母体一样[25]，即劈开位点为f位点时，在35% DMSO或30%乙醇中具有最佳的响应能力(见本文支持信息图S2)．前文发现e和f位点相对于d位点对碱基互补

长度的要求更高，推测其对碱基突变的敏感性可能不同．因此，将引发剂序列分别突变1~3个碱基（命名为M1，M2和M3），比较了在上述3个位点构建的MNAzyme响应突变序列的动力学（见本文支持信息图S1）．发现MNAzyme在d位点对T1及其突变的响应速度变化很小，e位点次之；但在f位点，仅一个碱基突变即导致MNAzyme反应速度降低2倍，提示在该位点设计MNAzyme具有识别单碱基突变的潜力．鉴于在f位点设计MNAzyme对碱基配对的长度要求高，且对引发剂突变更敏感，因此该处是用来设计响应序列长、信息泄漏少的MNAzyme的理想位点．

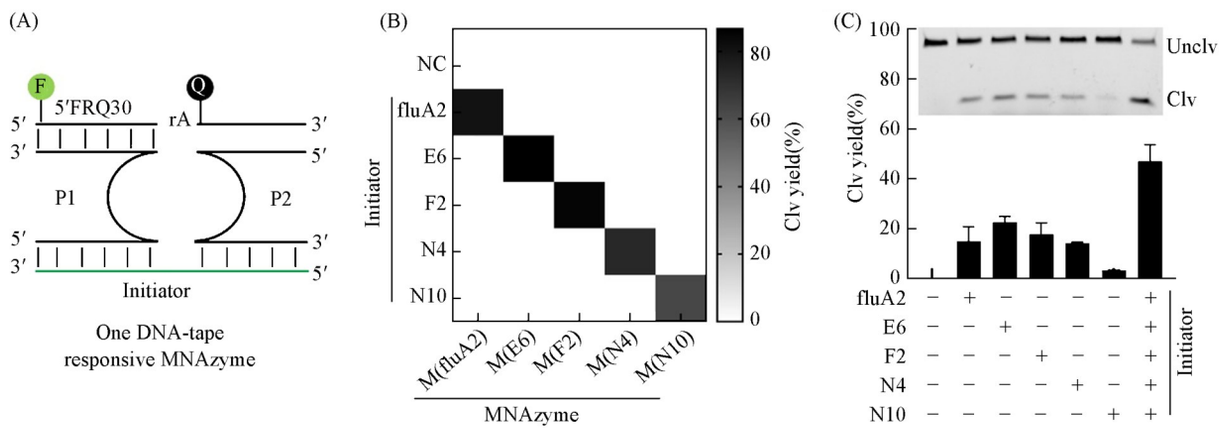


Fig. 2　Engineering of a one-DNA-tape responsive MNAzyme system

（A）Schematic diagram of the one-DNA-tape responsive MNAzyme. P1 and P2 indicate the two parts of the MNAzyme.（B）The selective response of the MNAzyme to a DNA initiator. M(X) indicates a MNAzyme that is corresponding to a certain initiator(X); NC indicate the cleavage of 5′FRQ30 by the MNAzyme without the presence of initiator; the concentration of the substrate is 250 nmol/L; the initiator and the relative MNAzyme system are set at 2500 nmol/L.（C）The cleavage of 5′FRQ30 by a mixture of 5 MNAzymes in the presence of various initiators. "+" indicates the addition of the initiator, and " − " indicates without the addition of the initiator; the insertion was the dPAGE image of (C); the cleavage reaction was carried out by the addition of 5 MNAzymes (each of 50 nmol/L) in the presence of the individual initiator at 50 nmol/L or all the 5 initiators at each of 50 nmol/L at 23 ℃ for 1 h; these DNA sequences are shown in Table S4 in Supporting Information of this paper.

针对真实序列环境设计MNAzyme的成功率及其在干扰序列存在下对引发剂响应的专一性，是评价MNAzyme性能的重要方面．为此，从新型冠状病毒和流感病毒的基因组中筛选部分序列作为引发剂，共设计了16个“胶带”MNAzyme（序列见本文支持信息表S4）．其中4个几乎不响应[Clv yield<1%]，6个中等响应[20%<Clv yield<50%]，6个高响应[Clv yield>60%]（见本文支持信息图S3）．随后研究了几个高响应的MNAzyme对引发剂序列（fluA2，E6，F2，N4和N10）的选择性，发现“胶带”MNAzyme仅在其对应的引发剂存在时才显示出催化活性[图2(B)和本文支持信息图S4(A)]．为了研究MNAzyme在更复杂的体系中选择性响应引发剂的能力，将响应5个不同引发剂的MNAzyme混合，分别加入等浓度的一种引发剂或多种引发剂，测试其在35% DMSO[图2(C)]和30%乙醇[见本文支持信息图S4(B)]中切割底物的产率．发现在2种溶剂体系中，MNAzyme均能响应对应的引发剂；而且在5种引发剂均存在时，这些MNAzyme切割底物的产率接近只有单个引发剂存在时的总和．表明这些MNAzyme在复杂体系也能主动识别引发剂，很少有信号泄露或受干扰．本文进一步评估了“胶带”MNAzyme系统对单链RNA和双链DNA作为引发剂的响应能力，发现在相同实验条件下，其对单链RNA的响应与同序列单链DNA相当，但对双链DNA的响应明显降低[见本文支持信息图S5(A)]．虽然MNAzyme初步显示了响应病毒RNA的能力，但长链RNA基因组实际存在的复杂高级结构可能限制MNAzyme对靶的识别，因此应避免选择形成复杂结构的RNA序列作引发剂，或者采取合适的方法破坏长链RNA的结构．另外，实际生物体液含有的RNase和DNase可能导致核酸序列的快速降解．考虑到乙醇是核酸提取和富集浓缩的常用溶剂，高浓度乙醇还可抑制核酸酶的活性，因此本文发展的MNAzyme有直接应用于乙醇沉淀或浓缩的生物样品中的潜在价值．然而，本文发展的MNAzyme与经典的10-23和8-17 DNAzyme（k_{obs}≈10 min^{-1}）相比，反应速度低了约3个数量级，严重限制了其对核酸序列响应的速度和信号放大能

力．例如在35% DMSO或30%乙醇溶液中，在1 h内需要5 nmol/L引发剂才能使MNAzyme产生明显的产物切割[见本文支持信息图S5(B)]．进化得到速度更快的RCD，使其能够用于真实核酸序列的快速、灵敏检测，是本课题组接下来努力的目标．

2.3 构建多DNA刺激响应的“胶带”MNAzyme系统

RCD的底物结合臂也常被用来构建MNAzyme[27]．E3与底物之间只有一个11-nt长的结合臂，其中3′端6-nt碱基(5′-TCATAG-3′)是将顺式作用的E3工程化为反式作用形式所引入的，在引入这些碱基之前其反式切割底物的能力非常弱．推测从该位置(T31)向5′方向设计劈开位点，将有可能导致E3的两部分失去活性；如果再在劈开位点引入DNA“胶带”，将可能使E3恢复活性．因此，本文尝试在E3的底物结合臂寻找到新的工程化位点．首先在底物结合臂的C28~T31之间设计了3个劈开位点[I，II和III，见图3(A)]，比较了在这些位点构建的MNAzyme对引发剂响应的动力学．结果表明，在这3个位点构建的MNAzyme均能很好地响应引发剂(60 min内即可完全切割底物)，且响应速度并没有明显区别．然而无引发剂时240 min内无任何切割产物被检出[图3(B)]，表明这几个位点都能用来构建响应性MNAzyme.

以上研究在E3内部发现了2个可工程化的区域．接下来尝试将E3劈开成3部分，构建更复杂的响应性三组分酶[图3(C)]．为了尽可能降低背景反应，选择底物结合臂的III位点将E3劈开．另外，考虑到2个DNA“胶带”如果距离过近，可能存在较大空间位阻效应，从而影响三组分酶的响应性，因此对另一个劈开位点进行了再筛选．选择距离催化核心较远的b，c和f位点将从III位点劈开的5′端半酶再劈成两半，在[E]/[S]=10∶1的条件下比较了三组分酶系统在2个引发剂同时存在下的响应速率，发现IIIc位点组合的响应速率略高于其它两种组合(见本文支持信息图S6)．接着使用[E]/[S]=2∶1的反应比例，发现在IIIc位点构建酶系统的响应速率是另外两个组合的2~3倍[图3(D)]，表明IIIc位点组合在较

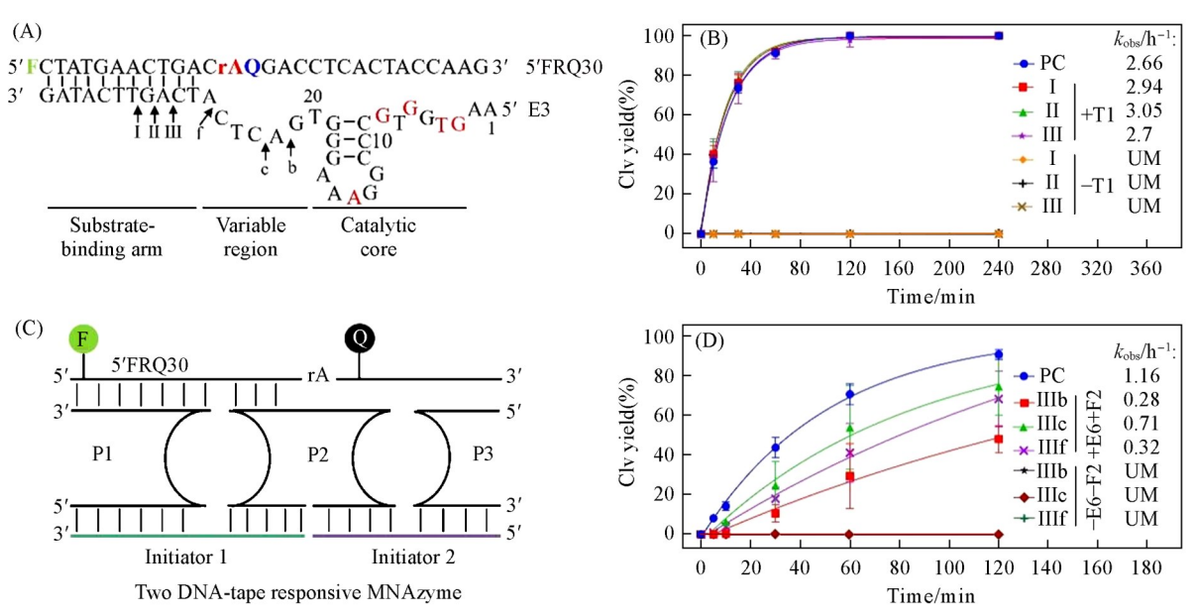


Fig. 3 Engineering a two-DNA-tape responsive MNAzyme system

(A) The potential engineering sites on the substrate-binding arm of E3. The signatures of I, III, and III between C28 and T31 indicate the tested splitting sites. (B) The kinetics of the MNAzyme system constructed by splitting of E3 at its substrate-binding arm. A DNA sequence T1 was employed as the initiator; 2500 nmol/L of T1 and the MNAzyme and 250 nmol/L of 5′FRQ30 were used in the cleavage reaction. (C) Illustration of a two-DNA-tape responsive MNAzyme system. E3 was split into three parts at the binding-arm and the variable region, and the complimentary sequences of the initiators were introduced on the terminus for construction of three partzymes (P1, P2 and P3). (D) Kinetics of the two-DNA-tape responsive MNAzymes constructed at the combination of various spitting sites. Two DNA sequences E6 and F2 were used as initiators; the MNAzyme and the initiators were set at 250 nmol/L, and 5′FRQ30 was 125 nmol/L for the cleavage reactions; UM: unmeasurable; the specific sequences of NA are shown in Table S3 and in Supporting Information S5 of this paper.

低浓度的引发剂和酶系统中具有更强的响应能力，因此在接下来采取在IIIc位点将E3劈开成3部分.

分别以E6+F2和N4+N10的序列组合作为引发剂构建了双DNA“胶带”响应的三组分MNAzyme. 在35% DMSO和30%乙醇体系中，只有组合中的2个序列同时存在时，三组分MNAzyme才能切割底物，而组合中任意一个序列单独存在都没有切割产物被检出(见本文支持信息图S7). 此外，三组分酶响应时的底物切割率接近E3全酶. 前面构建单个DNA胶带响应的MNAzyme时，虽然设计的成功率高达75%，但仍有不少序列响应活性低. 考虑到三组分MNAzyme系统更复杂，需要2个序列同时存在才能响应，起初认为设计出这种高响应的MNAzyme的成功率可能更低. 然而，实验结果显示，针对强响应的引发剂组合或一强一弱的引发剂组合构建的三组分MNAzyme均有高响应性，说明较差的引发剂并未削弱新MNAzyme系统的响应能力. 从H3N2型流感病毒的NA基因和H7N9型流感病毒的HA基因中分别筛选了4个序列(NA2，NA3，HA2和HA4)，构建了单个DNA响应的“胶带式”MNAzyme，发现响应均较差. 接着尝试将这些序列组合起来构建三组分MNAzyme系统，发现三组分MNAzyme系统的响应能力明显优于响应单个DNA的MNAzyme系统(见本文支持信息图S8). 此外，还发现三组分MNAzyme对引发剂响应的位置可以互换，不影响其切割底物的产率(见本文支持信息图S9). 以上结果表明，虽然响应双引发剂的三组分酶体系较复杂，但设计简单，成功率高. 再者，双DNA“胶带”响应性MNAzyme对引发剂有很强的专一性，只有在对应引发剂组合同时存在时才有切割活性，其它任何引发剂都不能使其恢复活性[图4(A)]. 进一步研究还发现，在4种引发剂组合和对应MNAzyme混合的体系中(含12种半酶、8种引发剂和1种底物)，对底物的切割产率与一种引发剂组合的切割产率之和接近[图4(B)]. 考虑到这些复杂反应物种需要在含35%DMSO的溶剂体系中精准识别各自的反应物，再组装成有活性的酶，进而捕获底物和执行催化反应，说明这些反应物种之间很少有交叉响应，反应具有高度的选择性和自主性.

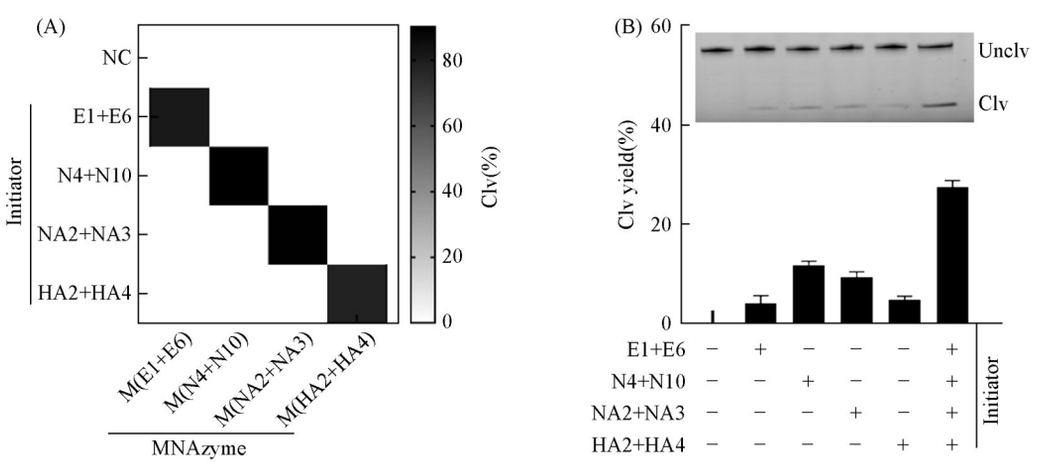


Fig. 4　Selectivity of the two-DNA-tape-responsive DNAzyme systems

(A) Selectivity of the two-DNA-tape-responsive MNAzymes. The initiator groups used in the MNAzyme systems were E1+E6 (from the E gene of SARS-Cov-2), N4+N10 (from the N gene of SARS-Cov-2), NA2+NA3 (from the genome of influenza H3N2), and HA2+HA4 (from the genome of influenza H7N9); NC indicate the cleavage of 5′FRQ30 by the MNAzyme without the addition of any initiator; 2500 nmol/L initiators and MNAzymes and 250 mol/L 5′FRQ30 were used in the cleavage reactions. (B) The cleavage of 5′FRQ30 by a mixture of 4 MNAzymes in the presence of various initiator groups. "+" indicates the addition of the initiator group, and "−" indicates without the addition of the initiator; the insertion was the dPAGE image of (B); the cleavage reaction was carried out by the addition of the 4 MNAzymes (each of 50 nmol/L) in the presence of the individual initiator group at 50 nmol/L or all the 4 initiator groups at each of 50 nmol/L at 23 ℃ for 1 h; see Table S5 in Supporting Information of this paper for these sequences.

目前已报道的很多RCD有2个结合臂，如10-23，将其劈开的2个半酶仍可结合底物，保留一定活性，因而背景切割较高[28]. 然而E3只有一个底物结合臂，其中一个半酶不能直接结合底物，只能由引发剂介导与另一半酶形成活性结构，因此由其构建的MNAzyme具有非常低的背景响应，这使得E3在

设计高响应、低背景的MNAzyme中有突出优势. 其次, E3的催化反应依赖DMSO和乙醇等有机溶剂, 而DNA碱基互补配对的能力在高浓度DMSO或乙醇中被削弱, 需要更多碱基对才能维持稳定, 这也使得用E3设计的MNAzyme对引发剂序列的长度要求高、对碱基突变的敏感性高. 此外, 本文在E3的不同结构域发现了可工程化的位点, 可用于构建响应2种引发剂的三组分酶. 虽然反应体系极其复杂, 但这些反应物种具有很高的反应自主性, 其选择性和抗干扰能力很强. 如果将底物与MNAzyme的一部分通过化学键连接起来, 再在底物上修饰不同的信号分子, 将可能构筑在同一体系同时响应多目标的无干扰、无泄漏的多通路电路. 再者, 文中设计的引发剂序列不少来自于相同基因的不同片段, 理论上对其的响应都能指示同一个基因, 因此将多个这样的MNAzyme混合, 将能显著提升对该基因的响应信号. 这种策略已用于基于CRISPR/Cas的新冠病毒检测, 有效降低了靶基因的检测限[29]. 与常规的CRISPR/Cas系统被一个核酸序列激活不同, 利用E3可构建由同一个基因的2个片段激活的三组分酶, 用该系统识别基因将更加精准.

3 结　　论

通过"劈开-引入DNA拉链"的方式构建了MNAzyme, 在E3的可变区发现了6个可工程化位点, 其中位于中间的位点对拉链长度要求低, 而两侧的位点则需要更长的拉链才能有效恢复其活性. 在E3可变区设计了由单个DNA引发剂将2个半酶激活的系统, 发现在两侧位点设计的MNAzyme对碱基突变更敏感. 利用该策略, 进一步在E3的底物结合臂发现了另一个可用来设计MNAzyme的区域, 并用这2个区域设计了只有2个引发剂同时存在才能将三组分酶激活的系统. 这些MNAzyme在35% DMSO和30%乙醇的有机溶剂中有很高的选择性和很低的背景反应, 且在多种MNAzyme共存的体系中能专一性响应各自的引发剂, 产生可叠加的反应信号. 总之, 本文在E3内发现了多个高质量的可被工程化位点, 为后续设计满足不同需求的刺激响应性RCD奠定了基础, 为在含有机溶剂的应用场景构建响应性探针提供了可工程化的平台.

支持信息见 http://www.cjcu.jlu.edu.cn/CN/10.7503/cjcu20250010.

参　考　文　献

[1] Breaker R. R., Joyce G. F., *Chem. Biol.*, **1994**, *1*(4), 223—229
[2] Sreedhara A., Li Y. F., Breaker R. R., *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*(11), 3454—3460
[3] Mcconnell E. M., Cozma I., Mou Q. B., Brennan J. D., Li Y. F., *Chem. Soc. Rev.*, **2021**, *50*(16), 8954—8994
[4] Borggräfe 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., Etzkorn M., *Nature*, **2022**, *601*(7891), 144—149
[5] 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*(1), 2006
[6] 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)
[7] 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)
[8] 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)
[9] Huang Z. M., Wang X. N., Wu Z. K., Jiang J. H., *Chem. Asian J.*, **2022**, *17*(6), e202101414
[10] Safdar S., Lammertyn J., Spasic D., *Trends Biotechnol.*, **2020**, *38*(12), 1343—1359
[11] Guerrier-Takada C., Gardiner K., Marsh T., Pace N., Altman S., *Cell*, **1983**, *35*(3), 849—857
[12] 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
[13] Chang D. R., Zakaria S., Samani S. E., Chang Y. Y., Filipe C. D. M., Soleymani L., Brennan J. D., Liu M., Li Y. F., *Acc. Chem. Res.*, **2021**, *54*(18), 3540—3549
[14] Liu M., Chang D. R., Li Y. F., *Acc. Chem. Res.*, **2017**, *50*(9), 2273—2283
[15] 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
[16] Gerasimova Y. V., Kolpashchikov D. M., *Chem. Biol.*, **2010**, *17*(2), 104—106

[17] Yang K. F., Schuder D. N., Ngor A. K., Chaput J. C., *J. Am. Chem. Soc.*, **2022**, *144*(26), 11685—11692
[18] Kozlowski H. N., Mohamed M. A. A., Kim J., Bell N. G., Zagorovsky K., Mubareka S., Chan W. C. W., *Small Struct.*, **2021**, *2*(8), 2100034
[19] 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
[20] Fokina A. A., Stetsenko D. A, François J. C., *Expert Opin. Biol. Ther.*, **2015**, *15*(5), 689—711
[21] Cao Y. R., Zhang H. Q., Le X. C., *Anal. Chem.*, **2021**, *93*(47), 15712—15719
[22] Mokany E., Bone S. M., Young P. E., Doan T. B., Todd A. V., *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*(3), 1051—1059
[23] Yang M., Xie Y. S., Zhu L. J., Li X. Y., Xu W. T., *ACS Catal.*, **2024**, *14*(21), 16392—16422
[24] Chang T. J., He S. S., Amini R., Li Y. F., *ChemBioChem*, **2021**, *22*(14), 2368—2383
[25] 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
[26] Cui L., Li S. H., Zheng X., Chang T. J., Bing T., *Chem. J. Chinese Universities*, **2024**, *45*(4), 20240004(崔力, 李素慧, 郑星, 常天俊, 邢涛. 高等学校化学学报, **2024**, *45*(4), 20240004)
[27] Wang D. Y., Lai B. H. Y., Feldman A. R., Sen D., *Nucleic Acids Res.*, **2002**, *30*(8), 1735—1742
[28] Ruble B. K., Richards J. L., Cheung-Lau J. C., Dmochowski I. J., *Inorg. Chim. Acta*, **2012**, *380*, 386—391
[29] Fozouni P., Son S. M., Derby M. D. D., Knott G. J., Gray C. N., D′Ambrosio M. V., Zhao C. Y., Switz N. A., Kumar G. R., Stephens S. I., Boehm D., Tsou C. L., Shu J., Bhuiya A., Armstrong M., Harris A. R., Chen P. Y., Osterloh J. M., Meyer-Franke A., Joehnk B., Walcott K., Sil A., Langelier C., Pollard K. S., Crawford E. D., Puschnik A. S., Phelps M., Kistler A., DeRisi J. L., Doudna J. A., Fletcher D. A., Ott M., *Cell*, **2021**, *184*(2), 323—333

(Ed.: L, V, K, M)