

现代生物技术前沿

张 今 施 维 姜大志
盛永杰 李 爽 孙妍红 编著

核酸酶学

——基础与应用



科学出版社
www.sciencep.com

现代生物科学丛书

主编 陈 桢 副主编 周光宇 王德林
编委 周光宇 李 强 周光宇 王德林

核酸酶学

——基础与应用

科学出版社

Q556
Z125

现代生物技术前沿

张 今 施 维 姜大志
盛永杰 李 爽 孙妍红 编著

核酸酶学 ——基础与应用

科学出版社

北 京

Q556
Z125

内 容 简 介

核酸酶学不仅是核酸科学的重要组成部分,而且是酶学的一个独特分支。本书是国内首部全面、系统介绍核酸酶学的基础、应用及发展趋势的专著。内容涵盖核酸酶的结构原理和催化基础、自身剪切类核酶、自身剪接类核酶、RNP类核酶、脱氧核酶、核酶和脱氧核酶的设计、核酶编码核肽酶和蛋白质酶以及核酶与脱氧核酶的应用等。

本书可供从事生命科学研究与教学的人员参考,也可用作生命科学专业高年级本科生及研究生的教材和参考用书。

图书在版编目(CIP)数据

核酸酶学:基础与应用/张今等编著. —北京:科学出版社,2010

(现代生物技术前沿)

ISBN 978-7-03-026345-2

I. 核… II. 张… III. 核酸酶-研究 IV. Q556

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2009)第 243698 号

责任编辑:李 晓 马学海 陈珊珊/责任校对:李奕莹

责任印制:钱玉芬/封面设计:陈 敬

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

源海印刷有限责任公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2010 年 1 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2010 年 1 月第一次印刷 印张:12 1/2

印数:1—2 000 字数:277 000

定价:46.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

《核酸酶学——基础与应用》是国内首部介绍核酶 (ribozyme) 和脱氧核酶 (deoxyribozyme) 的专著。它是在张今教授等编著的三部曲 (《核酸结构与动力学导论》, 科学出版社, 1995; 《分子酶学工程导论》, 科学出版社, 2003; 《进化生物技术——酶定向分子进化》, 科学出版社, 2004) 的基础之上, 又广泛收集国内外最新的文献资料, 结合多年的实践经验编写而成。在编写过程中, 编者力求最大限度地反映近年来核酸酶学在基础与应用方面的进展; 在内容取舍方面既避免与相关著作重复, 又尽可能体现整合性和系统性。

我们之所以要编写本书, 是因为以下几点:

(1) 核酸酶在结构上是核酸, 在功能上类似蛋白质酶。核酸酶学不仅是核酸科学的重要组成部分, 而且是酶学的一个独特分支, 是破解生命奥秘不可或缺的学科。该领域内跨学科、跨领域的新思想、新方法和新结果不断涌现, 已经给生物学、医学、药学和化学等众多领域带来深刻的影响, 使其成为生命科学领域中一颗璀璨的明珠。

(2) 某些核酶, 例如, RNase P、核糖体、剪接体等在所有现代生命细胞的蛋白质合成和某些基因表达的过程中起关键作用, 它们所催化的反应是细胞存活的基础。因此, 它们理所应当地成为了“基因组—转录物组—蛋白质组”链条中的重要主题。

(3) 核酶在地球生命起源和进化中可能起关键作用。“RNA 世界”假说曾指出: RNA 曾集信息和功能性质于一身。在进化过程中, 当核酸编码的蛋白质出现后, RNA 逐渐将催化功能传递给蛋白质, 生命进入了 RNA-蛋白质世界。再经过一个漫长的进化过程, RNA 将其信息传递给 DNA, 生命进入了 DNA-蛋白质世界。目前存在的某些核酶 (也许是核糖体) 可能是分子化石。分子进化工程所获得的核酶为“RNA 世界”提供了证据。

(4) 核酸酶是开发理想药物的基础。核酸酶有潜在的专一性和很高的选择性, 可以靶向特异的 mRNA 以干扰基因的表达, 这应当是核酸酶开发为治疗药物的理想基础。

(5) 核酸酶是基础生物催化剂, 可以为不同的应用提供简单且有前景的各种酶制剂。

本书共分 9 章。施维教授编写了第 9 章; 盛永杰副教授编写了第 8 章, 并负责全书的文献统编; 姜大志博士编写了第 7 章, 并负责全书插图的制作; 第 2 章由李爽博士、姜大志博士和盛永杰副教授合编; 其余章节由张今编写并负责书稿统筹、统编。孙妍红高级工程师完成书稿的计算机输入、表格制作和初稿校对。

应当指出本书引论中提出“生物催化功能流”只是一种假说, 但书中提供了这种假说所基于的某些研究工作, 欢迎大家探讨。

本书引用了国内外有关核酸酶学的文献资料, 在此对这些参考文献的作者致以衷心的感谢。科学出版社编辑为本书的出版付出了辛勤劳动, 在此向他们表示诚挚的谢意。

本书的出版得到吉林大学“985 工程”——整合生物学平台的资助及分子酶学工程教育部重点实验室的支持，在此表示深深的谢意。

由于学术水平有限，书中不妥或不足之处，诚恳地希望广大读者批评指正，不胜企盼之至。

张 今

吉林大学分子酶学工程教育部重点实验室

2009 年 6 月

目 录

前言

第 1 章 引论	1
1.1 核酸酶发展简史	1
1.2 核酸酶催化的反应类型和分类	2
1.2.1 天然核酶催化的反应类型和分类	2
1.2.2 工程核酶催化的反应类型和分类	4
1.2.3 脱氧核酶催化的反应类型和分类	6
1.3 “生物催化功能流”假说	7
1.3.1 核酶的“核心地位”	7
1.3.2 生物催化进化的模型	8
1.3.3 生物催化功能可能传递	9
主要参考文献	10
第 2 章 核酸酶的结构原理和催化基础	14
2.1 引言	14
2.2 核酸酶的基本构件	14
2.2.1 含氮碱基及碱基配对	14
2.2.2 糖环的折叠	14
2.2.3 磷酸基团	15
2.2.4 核苷和核苷酸的构象	16
2.3 核酸酶结构的多样性	18
2.3.1 核酸酶的结构元件	18
2.3.2 三向接合结构	19
2.3.3 鸟嘌呤四联体结构	19
2.3.4 假结结构	21
2.4 核酸酶的催化机制	23
2.4.1 质子转移	23
2.4.2 核酸酶催化中质子转移	25
2.4.3 金属离子作为核酸酶催化的重要辅因子	27
主要参考文献	30
第 3 章 自身剪切类核酶	32
3.1 引言	32
3.2 锤头核酶	32
3.2.1 最小锤头核酶	32

3.2.2	全长锤头核酶的二级结构和三级结构	33
3.2.3	锤头核酶的分裂机制	34
3.2.4	哺乳动物 mRNA 中断续的锤头核酶	36
3.3	发夹核酶	37
3.3.1	自然界的发夹核酶	37
3.3.2	发夹核酶的结构	37
3.3.3	发夹核酶的活性部位和催化机制	38
3.4	VS 核酶	40
3.4.1	VS 核酶	40
3.4.2	VS 核酶的结构	40
3.4.3	VS 核酶底物的结构	42
3.4.4	VS 核酶的活性部位和催化机制	42
3.4.5	发夹核酶和 VS 核酶之间的相似性	42
3.5	HDV 核酶	43
3.5.1	HDV 生物学简介	43
3.5.2	HDV 核酶的结构	44
3.5.3	HDV 核酶的活性部位和催化模型	45
3.6	<i>glmS</i> 核酶	47
3.6.1	适体与核开关	47
3.6.2	<i>glmS</i> 核酶的生物化学特性	48
3.6.3	<i>glmS</i> 核酶的结构	50
3.6.4	<i>glmS</i> 核酶自身分裂机制	50
3.6.5	结束语	52
3.7	<i>CPEB3</i> 核酶	52
3.7.1	真核生物存在自身分裂核酶	52
3.7.2	自身分裂核酶的体外选择	52
3.7.3	<i>CPEB3</i> 核酶的结构	53
3.7.4	<i>CPEB3</i> 核酶的催化机制	54
3.7.5	<i>CPEB3</i> 核酶可能的生物学作用	54
3.7.6	结束语	55
	主要参考文献	55
第4章	自身剪接类核酶	57
4.1	引言	57
4.1.1	内含子	57
4.1.2	内含子核酶	58
4.2	I类内含子	59
4.2.1	I类内含子的分布	59
4.2.2	I类内含子的二级结构	59

4.2.3 I类内含子的三级结构	60
4.2.4 I类内含子的自身剪接	62
4.2.5 I类内含子折叠机制	64
4.2.6 I类内含子的进化	67
4.3 II类内含子	67
4.3.1 II类内含子的生物学意义	67
4.3.2 II类内含子的结构	68
4.3.3 II类内含子的活性部位	72
4.3.4 II类内含子催化的反应和化学机制	74
4.3.5 II类内含子的折叠机制	76
4.3.6 II类内含子的进化关系	77
4.4 类-I类内含子——GIR1 核酶	77
4.4.1 GIR 核酶	77
4.4.2 GIR1 核酶的生物化学表征	78
4.4.3 GIR1 核酶的二级结构和三级结构	80
4.4.4 结论	82
4.5 RNA 复制酶的探索	83
4.5.1 自动催化组装途径	83
4.5.2 交叉催化途径	84
4.5.3 体外进化途径	85
4.5.4 搜索天然复制酶核酶	86
4.6 结束语	87
主要参考文献	87
第5章 RNP 类核酶	89
5.1 引言	89
5.1.1 RNP 核酶	89
5.1.2 RNP 蛋白质酶	90
5.1.3 RNP 酶	91
5.2 RNase P	91
5.2.1 RNase P 的特性	91
5.2.2 RNase P RNA 的化学	91
5.2.3 RNase P RNA 的二级结构	93
5.2.4 细菌 RNase P RNA 的晶体结构	93
5.2.5 底物识别的决定因素	96
5.2.6 RNase MRP RNA	96
5.2.7 结束语	98
5.3 剪接体核酶	98
5.3.1 剪接体的组成	98

5.3.2	剪接体 RNA 催化的证据	98
5.3.3	剪接体的活性部位	100
5.3.4	结束语	102
5.4	核糖体核酶	102
5.4.1	核糖体在蛋白质合成中的作用	102
5.4.2	核糖体肽酰基转移酶的活性部位	103
5.4.3	肽键形成的机制	107
5.4.4	结束语	108
	主要参考文献	108
第 6 章	脱氧核酶	110
6.1	引言	110
6.1.1	DNA 作为酶的潜能	110
6.1.2	DNA 酶的体外选择	110
6.1.3	DNA 酶催化功能的改进	112
6.1.4	DNA “催化作用”	113
6.1.5	DNA 酶的结构和催化机制	114
6.2	分裂 RNA 的脱氧核酶	114
6.2.1	DNA 催化 RNA 的分裂	114
6.2.2	8-17 脱氧核酶	115
6.2.3	10-23 脱氧核酶	117
6.2.4	分裂 RNA “二分” 脱氧核酶	119
6.2.5	分裂 RNA 的 DH2 脱氧核酶	119
6.2.6	分裂 RNA 的脱氧核酶活性的调节	119
6.3	分裂 DNA 的脱氧核酶	120
6.3.1	自身分裂脱氧核酶的体外选择	120
6.3.2	II 类脱氧核酶的最小结构域	121
6.3.3	II 类脱氧核酶分裂 DNA 的产物和分裂机制	122
6.3.4	自身分裂 N-糖基化脱氧核酶	123
6.4	连接 RNA 的脱氧核酶	124
6.4.1	连接成线性 RNA 的脱氧核酶	124
6.4.2	连接成分支 RNA 的脱氧核酶	126
6.4.3	连接成套环 RNA 的脱氧核酶	127
6.5	连接 DNA 的脱氧核酶	127
6.5.1	具有连接酶活性的 DNA 金属酶	127
6.5.2	自身连接的脱氧核酶	128
6.6	催化其他底物的脱氧核酶	130
6.6.1	自身磷酸化脱氧核酶	130
6.6.2	光解酶活性的脱氧核酶	132

6.6.3 小分子底物的脱氧核酶	132
6.6.4 催化 Diels-Alder 反应的脱氧核酶	133
6.6.5 DNA 酶催化氨基酸侧链反应	134
6.7 结束语	135
主要参考文献	135
第 7 章 核酶和脱氧核酶的设计	138
7.1 引言	138
7.1.1 脱氧核酶催化活性调控的设计	138
7.1.2 基于脱氧核酶的生物传感器的合理设计	139
7.1.3 基于脱氧核酶的分子逻辑门的设计与构建	144
7.2 环状核酶的设计	144
7.3 环状脱氧核酶的设计	145
7.4 环状核酶-脱氧核酶组合酶的设计	147
7.5 核酶与脱氧核酶转换的设计	149
7.6 双功能别构脱氧核酶的设计	152
7.7 结束语	154
主要参考文献	155
第 8 章 核酶编码核肽酶和蛋白质酶	157
8.1 引言	157
8.2 核酶编码核肽酶	158
8.3 I 类内含子编码内切核酸酶	161
8.4 II 类内含子编码反转录酶	165
8.5 I 类内含子和 II 类内含子编码成熟酶	168
8.6 结束语	170
主要参考文献	170
第 9 章 核酶与脱氧核酶的应用	172
9.1 引言	172
9.2 核酶是基因失活的工具	172
9.2.1 分裂特定靶向 mRNA 核酶的设计	172
9.2.2 核酶进入细胞的途径	173
9.2.3 核酶介导的基因失活	173
9.3 核酶在抗病毒方面的应用	174
9.3.1 抗艾滋病病毒	175
9.3.2 抗肝炎病毒	177
9.3.3 抗其他病毒	177
9.4 脱氧核酶在抗病毒方面的应用	178
9.5 核酶和脱氧核酶在肿瘤治疗研究中的应用	179
9.5.1 脱氧核酶在癌症临床治疗研究中的应用	179

9.5.2 核酶抗乳腺癌细胞的研究	180
9.5.3 核酶对癌细胞生长和癌变的抑制作用	181
9.6 核酶调控糖代谢	182
9.7 结束语	183
主要参考文献	183

第1章 引 论

1.1 核酸酶发展简史

核酶 (ribozyme, catalytic RNA, RNA enzyme 或 RNAzyme) 是作为化学催化剂的 RNA 分子, 是核糖核酸酶 (ribonucleic acid enzyme) 的缩写; 同样, 脱氧核酶 (deoxyribozyme, catalytic DNA, DNA enzyme 或 DNAzyme) 是作为化学催化剂的 DNA 分子, 是脱氧核糖核酸酶 (deoxyribonucleic acid enzyme) 的缩写。核酸酶 (nucleic acid enzyme 或 NAzyme) 是核酶和脱氧核酶的总称, 是具有催化功能的核酸分子^[1~3]。“核酸酶”容易与修饰核酸的蛋白质酶 (protein enzyme) 混淆, 即核酸酶可能指核酶, 也可能指脱氧核酶, 或者指蛋白质酶。因此, 实践中, 核酸酶所指意思必须看上下文。

核酶和脱氧核酶的发现, 丰富和发展了酶的概念。这样, 酶的综合概念应是指具有生物催化功能的蛋白质和核酸。术语“核酶”、“脱氧核酶”和“核酸酶”已广为采用。“核酶酶学” (ribozyme enzymology) 和“蛋白质酶学” (protein enzymology) 术语也比较流行。相对于“蛋白质酶学”, 我们用“核酸酶学” (nucleic acid enzymology) 术语来描述核酶和脱氧核酶。

“核酶”概念发展的源头, 应该首推 Crick。他在 1968 年首先提出 RNA 既携带遗传信息, 又具有催化活性的假设。1981 年, Cech 等发现四膜虫的前体 rRNA 可以在没有蛋白质存在的情况下自身催化切除内含子, 完成加工过程。1983 年, Altman 等在研究细菌 RNase P (ribonuclease P) 时发现, 该酶中的 RNA 分子单独完成前体 tRNA 加工。基于 Cech 和 Altman 的创造性工作, 1989 年两人共同获得了诺贝尔化学奖。随后加入核酶目录的有 II 类内含子、锤头核酶 (hammerhead ribozyme) 和发夹核酶 (hairpin ribozyme) 等。

1981 年前, 人们认为蛋白质是细胞中唯一的大分子催化剂。核酶的发现是酶学一次伟大的变革, 不仅丰富和发展了酶的概念, 而且为“RNA 世界”假说提供了前提, 这对于地球上生命如何出现具有重要意义。1986 年, Gilbert 提出了“RNA 世界”的假说。该假说指出, 在生命起源早期, 生命世界是由 RNA 组成的。RNA 分子具有双重功能, 既像 DNA 一样携带遗传信息, 又像蛋白质一样催化各种化学反应, 包括自身的复制反应。同年, Mullis 发明了聚合酶链反应 (PCR)。科学家用 PCR 技术可以在实验室迅速扩增 DNA 分子。20 世纪 90 年代初, PCR 技术成功地用于体外进化。一些实验室应用体外选择/筛选/进化获得各种催化反应的核酶, 包括在生命起源和进化过程中有重要意义的核酶, 如 RNA 连接酶、tRNA 合成酶和转肽酶等。上述工作表明任何一门学科的诞生都离不开思想和技术的背景。2000 年前后核糖体被证明是一种核酶, 它在所有细胞的蛋白质生物合成过程中起核心作用。核开关核酶等调节细菌和真核生物基因的表达, 前体 mRNA 的剪接是剪接体催化。这些资料似乎表明, 虽然在进化过程中,

RNA 将催化功能传递给蛋白质, 将遗传信息功能传递给 DNA, 但自身仍掌控着生命的关键过程。

DNA 和 RNA 之间的主要区别是 RNA 的戊糖具有 2'-OH。一个自然的问题是: 单链 DNA 是否像 RNA 一样也能作为有效的催化剂。1994 年, Breaker 和 Joyce 通过体外进化获得可以催化 RNA 分裂的单链 DNA 分子, 称为脱氧核酶。这样, 在蛋白质和 RNA 之后, 脱氧核酶成为酶家族的最新成员。此后, 各种催化活性的脱氧核酶相继出现。遗憾的是, 目前为止, 尚未发现天然的脱氧核酶。脱氧核酶也可能是体外技术的再现, 它可能潜在于某些特殊的现代微环境中。随着生物化学途径和基因组序列的生物信息学分析的深入, 新的核酶仍然在发现, 甚至可能发现天然脱氧核酶。今天, 核酸酶可与蛋白质酶相媲美, 几乎涵盖了六大类蛋白质酶催化的反应类型。

核酸酶的研究大多采用常规的酶学方法, 但结构和生物物理方法起了关键作用。目前, 除 VS (varkud satellite) 核酶外, 几乎所有天然发生的核酶的晶体结构都已获知, 包括某些大分子核酶, 如 I 类内含子核酶、RNase P 和核糖体核酶等。

单分子方法 (single-molecule method) 在核酶的结构与功能研究中有独特的优势。单分子方法允许每次对一个分子的性质和反应进行测量。研究核酶单分子所使用的方法有: ①单分子荧光 (single-molecule fluorescence, SMF), 它可以用于实时检测生物化学反应, 并且可以详细解析反应机制。最流行和最普遍的方法是荧光共振能量转移法 (fluorescence resonance energy transfer, FRET)。单分子 FRET (SM-FRET) 已成为一种观测单个分子实时运动的强有力方法。②原子力显微镜 (atomic force microscopy, AFM), 它可以在分子还保持活性的情况下对核酶分子进行成像与机械处理。这些图像可以展现核酶的动态结构。③单分子检测技术, 它正成为开展超高通量筛选强有力的分析工具。单个核酶和脱氧核酶分子的检测将可能成为核酸酶结构与功能研究的一种发展趋势。

1.2 核酸酶催化的反应类型和分类

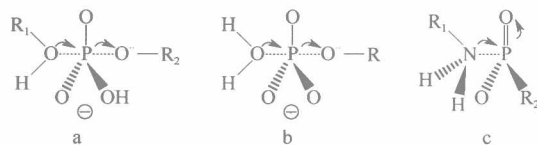
1.2.1 天然核酶催化的反应类型和分类

自 Cech 等发现第一个核酶以来, 现已鉴定了十几种天然核酶。它们分布于生物三界, 包括细菌及噬菌体、古细菌、酵母、真菌及高等真核生物。近年来在人类基因组中发现有锤头核酶、发夹核酶、VS 核酶、肝炎 δ 病毒 (HDV) 核酶、*glmS* (glucosamine-6-phosphate synthase) 核酶和 CPEB3 (cytoplasmic polyadenylation element binding protein 3) 核酶等^[1,3]。

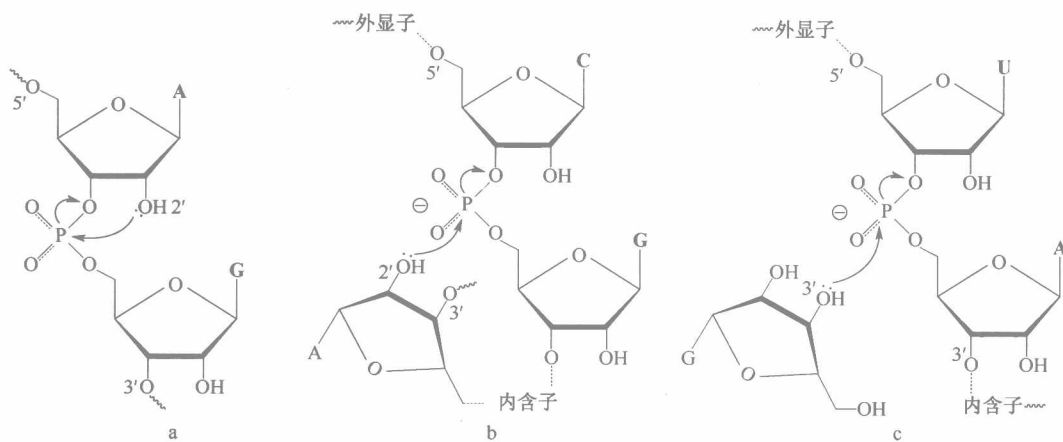
天然核酶可催化各种化学反应, 主要包括转酯反应 (核苷酸转移反应实质也是一种转酯反应)、水解反应和肽酰基转移反应 (表 1.1 和图 1.1)。它们相当于六大类蛋白质酶中的转移酶类、水解酶类和连接酶类。天然核酶所催化的转酯反应类型如图 1.2 所示。

表 1.1 天然核酶催化的反应类型

核酶	催化反应	本书章节
锤头核酶	转酯反应	3.2
发夹核酶	转酯反应	3.3
VS核酶	转酯反应	3.4
HDV核酶	转酯反应	3.5
<i>glmS</i> 核酶	转酯反应	3.6
CPEB3核酶	转酯反应	3.7
I类内含子	核苷酸转移	4.2
II类内含子	核苷酸转移	4.3
类-I类内含子 (GIR1 分支核酶)	核苷酸转移	4.4
类-I类内含子 (3',5'-连接核酶)	核苷酸转移	4.5
剪接体核酶	核苷酸转移	5.3
RNase P核酶	水解反应 (反式作用)	5.2
核糖体核酶	肽酰基转移 (反式作用)	5.4

图 1.1 天然核酶催化的反应^[1]

a. 大多数核酶的催化反应。b. RNaseP 催化前体 tRNA 的水解反应。c. 核糖体核酶催化肽酰基转移反应

图 1.2 天然核酶所催化转酯反应类型^[1]

a. 自身剪切类核酶的分裂反应，其涉及 2'-O 进攻相邻的 3'-P，产生 3'-O 阴离子离去基团。在可逆连接反应中，5'-O 进攻环状磷酸的 P。b. 在 II 类内含子中发生相似的反应，但 2'-O 亲核体是由定位在内含子别处的核苷酸提供。c. I 类内含子第一次反应的亲核体是外源鸟苷酸的 3'-O

蛋白质酶和核酶是两种不同的生物大分子。蛋白质酶有各种功能基团参与催化，并折叠成稳定的复杂结构。相反，核酶仅有 4 种碱基，虽然它可以折叠成复杂的结构，却

很难达到蛋白质酶那样的活性结构。核酶为了行使催化功能,往往采用各种催化策略,有的核酶甚至应用一种以上的催化策略。因此很难像蛋白质酶那样根据催化反应类型来分类。另外,有些核酶的全酶是由蛋白质和 RNA 组成的,即核蛋白酶(ribonucleoprotein enzyme, RNP 酶)。因此,核酶的分类应从结构与功能统一来考虑,既要考虑其催化的反应类型,又要考虑其结构特征。我们建议把天然核酶分为 3 类:自身剪切类核酶(就其活性而言,相当于内切核酸酶,因而习惯称为自身剪切类核酶)、自身剪接类核酶(就其活性而言,具有内切核酸酶活性和连接酶活性,既剪又接,习惯称为自身剪接类核酶)和 RNP 类核酶(包括剪接体、RNase P 和核糖体等核酶)。

1.2.2 工程核酶催化的反应类型和分类

天然核酶的发现激励科学家积极开发工程核酶,体外选择/筛选/进化的核酶相继问世,实现了自然和人工的融合,认识核酶和改造核酶的统一。但尚存在几点遗憾:①用目前的知识,我们还不能通过合理设计来获得全新的核酶;②目前尚未发现和人工制造出“裂解核酶”。

在核酶定向进化方面,有几个术语容易混淆,这里简要予以说明。

1. RNA 和 DNA 适体与核酶和脱氧核酶

核酶和脱氧核酶与它们的底物结合并催化化学反应,而 RNA 和 DNA 适体(aptamer)简单地与它们的配体结合。适体一般用 SELEX(systematic evolution of ligands by exponential enrichment)操作来鉴定。SELEX 是体外选择(*in vitro* selection)的一种形式,但不是所有的体外选择都是 SELEX。特别是 SELEX 一般不用于鉴定核酶和脱氧核酶。因此,除了用 SELEX 选择过渡态类似物外,核酶和脱氧核酶是用体外选择鉴定。

2. 体外选择和体外筛选

选择(selection)和筛选(screening)往往容易混淆。选择是利用所希望的突变体的独有的生存条件,模拟达尔文进化过程,在大的组合库中鉴定突变体;筛选则是检验大的组合库中所有成员来鉴定突变体,是一种主动的搜索过程。

3. 体外选择和体外进化

就体外实验而言,选择和进化(evolution)之间的区别是在实验开始之后,进化要求引入变异。在许多选择操作中,所有变异都存在于实验开头起始库的随机区之内。由于这样的操作仅仅适用于遗弃无活性序列,并且没有引入新的变异活性序列。相反,当变异通过突变的 PCR 或具有部分随机库的起始实验,有意识地引入变异,这就是体外进化。

应用体外选择/筛选/进化,现已经获得数十种自然界不存在的核酶,它们催化各种化学反应(表 1.2)。参照六大类蛋白质酶分类的基本原则,根据工程核酶催化的反应类型,可将它们分为 5 类(表 1.3)。

表 1.2 工程核酶催化的反应

反应	键	速率提高	金属离子	随机长度/nt	参考文献
2',3'-环化磷酸水解	O—P	50	Pb ²⁺	0	4
RNA 分裂	O—P	80	Pb ²⁺	0	5
RNA 分裂	O—P	200	Mg ²⁺	100	6
RNA 分裂	O—P	—	—	30	7
RNA 连接	O—P	7×10 ⁶	Mg ²⁺	220	8
RNA 连接	O—P	8×10 ⁸	Mg ²⁺	220	9
RNA 连接	O—P	5×10 ⁵	Mg ²⁺	210	10
RNA 连接	O—P	250	Mg ²⁺	116	11
RNA 连接 (分支)	O—P	—	Mg ²⁺	80	12
RNA 磷酸化	O—P	1×10 ⁵	Mg ²⁺	100	13
RNA 磷酸化	O—P	6×10 ⁶	Mg ²⁺	0	14
RNA 帽化	O—P	10 ³ ~10 ⁴	Mg ²⁺	90	15
RNA 帽化	O—P	—	Ca ²⁺	50	16
RNA 帽化	O—P	—	Ca ²⁺	0	17
氨基酸腺苷酸化	O—P	—	Ca ²⁺	80	18
辅因子合成	O—P	—	Mn ²⁺	30, 60	19
RNA 聚合	O—P	—	Mg ²⁺	0	20
模板指导的聚合	O—P	—	Mg ²⁺	76	21
RNA-蛋白质缀合	N—P	—	Mg ²⁺	152	22
Diels-Alder 反应	C—C	800	Cu ²⁺	100	23
Diels-Alder 反应	C—C	1×10 ⁴	Cu ²⁺ , Ni ²⁺	0	24
Diels-Alder 反应	C—C	1×10 ⁴	Mg ²⁺	120	25, 26
醛醇反应	C—C	4×10 ³	Zn ²⁺	142	27
乙醇氧化	C—H	1×10 ⁷	Mg ²⁺ , Zn ²⁺	70	28
醛还原	C—H	3×10 ⁶	Mg ²⁺ , Zn ²⁺	0	29
吡啶核苷酸合成	C—N	1×10 ⁸	Mg ²⁺	228	30, 31
嘌呤核苷酸合成	C—N	—	Mg ²⁺	95	32
N ⁷ G 烷基化	C—N	3×10 ⁶	Mg ²⁺	0	33
酰胺合成	C—N	1×10 ⁵	Cu ²⁺	100	34
脲合成	C—N	1×10 ⁶	—	100	35
肽键合成	C—N	1×10 ⁶	Mg ²⁺	142	36
肽酰基-RNA 合成	C—N	100	Ca ²⁺	0	37
酰基转移	C—O	1×10 ¹⁰	Ni ²⁺	90	38, 39
酰基转移	C—O	—	Mg ²⁺	120	40
氨酰基化	C—O	2×10 ⁵	Mg ²⁺ , Ca ²⁺	50	41
氨酰基化	C—O	—	Mg ²⁺	70	42
氨酰基化	C—O	2×10 ⁵	Mg ²⁺	70	43
氨酰基化	C—O	6×10 ⁷	Ca ²⁺	0	44
碳酸酯水解	C—O	100	—	70	45
磷酸硫代烷基化	C—S	2×10 ³	Mg ²⁺	30	46
Michael 反应	C—S	3×10 ⁵	Mg ²⁺	142	47
卟啉金属化	Cu—N	500	Mg ²⁺ , Cu ²⁺	50	48
Pd 纳米粒形成	Pd—Pd	—	—	40	49, 50
双苯基异构化	—	88	Mg ²⁺	28	51

注：随机长度一列中“0”表示从已知适体或核酶序列起始，在某些情况下部分随机化，或者实验应用已知核酶序列的合理设计；nt 代表核苷酸；速率提高= $K_{\text{obs}}/K_{\text{背景}}$ 。