



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 105960410 B

(45) 授权公告日 2020.12.04

(21) 申请号 201480073370.6

(72) 发明人 黄震

(22) 申请日 2014.11.21

(74) 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105960410 A

代理人 韩蕾 姚亮

(43) 申请公布日 2016.09.21

(51) Int.Cl.

(30) 优先权数据

C07K 1/14 (2006.01)

61/907,284 2013.11.21 US

C07K 1/30 (2006.01)

61/909,732 2013.11.27 US

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2016.07.15

(56) 对比文件

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/066823 2014.11.21

Jozef Salon et al.. "Derivatization of DNAs with selenium at 6-position of guanine for function and crystal structure studies".《Nucleic Acids Research》.2008,第36卷(第22期),摘要,第7009页右栏第1段-第7016页右栏第2段.

(87) PCT国际申请的公布数据

W02015/077566 EN 2015.05.28

审查员 刘婷

(73) 专利权人 硒瑞恩生物科技有限公司
地址 美国佐治亚州

权利要求书1页 说明书16页 附图11页

(54) 发明名称

硒衍生的核酸复合物的结构测定方法

(57) 摘要

本发明提供使与核酸复合的所关注的分子,如多肽结晶的方法,其包括使该所关注的分子与硒衍生的核酸接触和使该所关注的分子/硒衍生的核酸复合物结晶。还提供测定所关注的分子/硒衍生的核酸复合物的X射线晶体结构的方法。通常,X射线晶体结构测定的方法包括该硒衍生的核酸的硒单波长异常定相。在一些实施例中,不从另一晶体提供用于该所关注的分子的该X射线晶体结构的各相。还公开通过向细胞或个体投予功能性核酸和/或通过使核酸酶与功能性核酸接触影响生物过程的方法,其中该功能性核酸为硒衍生的核酸。

1. 一种针对所关注的分子的晶体分析方法,其包含以下步骤:

(a) 使所述所关注的分子与硒衍生的核酸接触形成所关注的分子/硒衍生的核酸复合物,其中,所述所关注的分子为多肽,所述硒衍生的核酸为位置6的鸟苷处经硒修饰的核酸;
和

(b) 使所述所关注的分子/硒衍生的核酸复合物结晶;和

(c) 测定所述所关注的分子/硒衍生的核酸复合物的三维X射线晶体结构;其中所述X射线晶体结构测定方法为所述硒衍生的核酸的硒单波长异常定相和多波长异常定相相结合的方法;

该分析方法还进一步包括识别所述所关注的分子/硒衍生的核酸复合物的所述三维X射线晶体结构中的所述所关注的分子与硒衍生的核酸之间的联接元件;

选择干扰所述所关注的分子与所述核酸之间的相互作用的候选分子,其中所述候选分子通过以下来选择:

(a) 在数字计算机上提供所述所关注的分子/硒衍生的核酸复合物的所述三维X射线晶体结构;和

(b) 选择预测结合所述多肽/硒衍生的核酸复合结构中识别的核酸界面的候选分子;

设计结合到所述所关注的分子的候选分子,其中所述候选分子通过以下来设计:

(a) 在数字计算机上提供所述所关注的分子/硒衍生的核酸复合物的所述三维晶体结构;和

(b) 使用所述数字计算机包含的软件来设计预测结合到所述多肽的候选分子;

其进一步包含:

(a) 合成所述候选分子;和

(b) 评估所述候选分子改变所述所关注的分子的活性的能力。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中在所述硒衍生的核酸复合物的情况下获得的所述X射线晶体学数据的衍射的分辨率大于在不存在硒衍生的核酸的情况下获得的晶体学数据。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述所关注的分子在不存在硒衍生的核酸的情况下不结晶。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中用于所述所关注的分子的所述X射线晶体结构的相不提供自另一晶体。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述所关注的分子不是核酸结合蛋白。

6. 根据权利要求1所述的方法,其中所述所关注的分子为多肽。

7. 根据权利要求1所述的方法,其中所述硒衍生的核酸为硒衍生的RNA。

8. 根据权利要求1所述的方法,其中所述硒衍生的核酸以与并非硒衍生的核酸至少相同的亲和力结合到所述所关注的分子。

9. 根据权利要求1所述的方法,其中所述硒衍生的核酸与并非硒衍生的核酸结合所述所关注的分子的相同区域。

硒衍生的核酸复合物的结构测定方法

[0001] 关于联邦赞助的研究或开发的声明

[0002] 本发明在美国国家卫生研究院 (National Institutes of Health) 授予的拨款号 R01GM095881 和美国国家科学基金会 (National Science Foundation) 授予的拨款号 MCB-0824837 和 CHE-0750235 的政府支持下进行。政府在本发明中享有一定权利。

技术领域

[0003] 本发明一般为 X 射线晶体学和药物发现的领域；且更确切地说，包括具有核酸的蛋白质和/或小分子 (配体) 复合物的分子-核酸结构的晶体学，其通过硒衍生的核酸测定。获得的结构信息可用于基于核酸的药物的发现。

背景技术

[0004] X 射线晶体学为用于提供晶体中的分子的外观的三维表示的已建立、充分研究的技术。此技术仍为用于分子结构的原子分辨测定的最强大工具中的一个。结构中的结晶原子导致 X 射线束衍射到许多特定方向。通过测量这些衍射束的角度和强度，检晶器可产生晶体内的电子密度的三维图像。由此电子密度，可测定晶体中的原子的平均位置，以及其化学键、其无序性和各种其它信息。

[0005] 由于许多材料可形成晶体-如盐、金属、矿物质、半导体以及各种无机、有机和生物分子-科学家已采用 X 射线晶体学来测定许多分子的晶体结构。方法展现许多生物分子，包括维生素、药物、小分子、配位体、蛋白质多肽和核酸的结构和功能。X 射线晶体结构也可解释材料的不寻常的电子或弹性特性、阐明化学相互作用和方法或充当设计针对疾病的药物的基础。

[0006] 为了进行 X 射线晶体学分析，X 射线束撞击单一晶体，产生散射光束。当这些光束落在一片膜或其它检测器上时，其产生点的衍射图案；随着晶体逐渐旋转而记录这些光束的强度和角度。每一点称作反射，因为其对应于来自晶体内的一组均匀间隔开的平面的 X 射线的反射。晶体中的原子并非静态的，而是通常以一埃的小于十分之几在其平均位置周围振荡。X 射线晶体学允许测量这些振荡的尺寸。

[0007] 衍射自分子的晶体的 X 射线产生衍射“点”的图案，其中每一点对应于互逆晶格中的一点，表示具有幅度和相对相的波。对应于互逆晶格的结构因子也对应于晶体学“单位晶胞”内的电子密度分布。对应于结构因子的电子密度可通过逆傅立叶变换 (inverse Fourier transformation) 测定。适用电子密度图的计算需要组合观测的幅度与适当的相。

[0008] 测定用于结构因子的相仍为分子，如蛋白质和复合物的晶体学分析的最具挑战性的障碍。寻求使得能够测定待用于结构分析中的 X 射线衍射数据的相的新方法。

[0009] 核酸在生物系统中起多种重要作用，包括转移和调节基因信息 (巴尼 (Ban) 等人，科学，289:905-920 (2000))。此外，核酸 (尤其 RNA) 可折叠到界限分明的三维结构中且催化如蛋白质合成的方法和一些病毒的生命周期中的生化反应。也已经由体外选择识别具有催化和结合功能的 RNA 和 DNA。此外，不同生物中的非编码小 RNA 的近来发现已大大扩展核酸的

功能谱(史托斯(Storz),科学,296:1260-1263(2002);李(Lee)等人,科学,294:862-864(2001))。此大量的生物活性RNA和DNA已促进阐明其三维结构和功能关系的结构分析领域中的研究新前沿。

[0010] 作为所有生命系统中普遍存在的生物分子,核酸为重要药物靶,且其也可用于诊断学和治疗学。

[0011] 由于含有分子/核酸复合物的晶体的产生和衍射质量的问题,核酸和其结合到的分子的X射线晶体学分析通常困难且可为时间和劳力密集型的。

[0012] 因此,本发明的目标为提供产生晶体和测定与核酸复合的所关注的分子,如蛋白质的X射线晶体结构的组合物和方法。

[0013] 本发明的另一目标为提供选择和设计可结合到与或可与核酸复合的所关注的分子,如蛋白质的分子的组合物和方法。

[0014] 本发明的另一目标为提供所关注的分子,如蛋白质与硒衍生的核酸的复合物。

发明内容

[0015] 提供使与核酸复合的所关注的分子(如多肽)结晶的方法,其包括使所关注的分子与硒衍生的核酸接触和使所关注的分子/硒衍生的核酸复合物结晶。还提供测定所关注的分子/硒衍生的核酸复合物的X射线晶体结构的方法。通常,X射线晶体结构测定的方法包括硒衍生的核酸的硒单波长异常定相。在一些实施例中,不从另一晶体提供用于所关注的分子的X射线晶体结构的各相。

[0016] 在一些实施例中,复合物可包括一种或多种额外组分。举例来说,复合物可包含所关注的分子、硒衍生的核酸和配位体或结合分子。举例来说,可使用结合到所关注的分子和硒衍生的核酸中的任一个或这两个的化合物。小分子配位体和候选药物为可使用的额外组分的实例。

[0017] 在一些实施例中,在含有硒衍生的核酸复合物的晶体的情况下获得的X射线晶体学数据的衍射的分辨率大于在不含硒衍生的核酸的晶体的情况下获得的晶体学数据。在其它实施例中,所关注的分子在不存在硒衍生的核酸的情况下不结晶。通常,硒衍生的核酸为硒衍生的RNA。在一些实施例中,硒衍生的核酸以与并非硒衍生的核酸至少相同的亲和力结合到目标分子,如多肽。在一个实施例中,硒衍生的核酸与并非硒衍生的核酸结合目标分子的相同区域。在一些实施例中,所关注的分子为核酸结合蛋白。

[0018] 测定与硒衍生的核酸复合的所关注的分子(如蛋白质)的结构的方法包括从含有有所关注的分子/硒衍生的核酸的复合物的一种或多种晶体获得衍射数据集和通过硒衍生的核酸的硒单波长异常定相测定所关注的分子/硒衍生的核酸复合物的三维X射线晶体结构。还提供识别所关注的分子/硒衍生的核酸复合物的三维X射线晶体结构中的所关注的分子与硒衍生的核酸之间的联接元件的方法。方法也可包括通过在数字计算机上提供所关注的分子/硒-衍生的核酸复合物的三维X射线晶体结构选择分子,如候选药物,其干扰所关注的分子与核酸之间的相互作用,和选择预测结合所关注的分子/硒衍生的核酸复合结构中识别的核酸界面的化合物。

[0019] 还提供设计结合到所关注的分子(如核酸结合蛋白)的分子(如候选药物)的方法。通常,方法包括在数字计算机上提供所关注的分子/硒衍生的核酸复合物的三维晶体结构

和使用数字计算机包含的软件设计预测结合到所关注的分子的分子,如候选药物。在一些实施例中,方法包括合成分子和评估分子改变所关注的分子的活性的能力。

[0020] 还提供选择含有硒衍生的核酸的晶体的方法,其包括在含有硒衍生的核酸的溶液中生长期晶体和选择明显不同于对照晶体的晶体,指示存在硒衍生的核酸。

[0021] 还提供所关注的分子和硒衍生的核酸的复合物。还提供多肽和硒衍生的核酸的复合物。

[0022] 还公开影响生物过程的方法,该方法包含向细胞或个体授予功能性核酸,其中功能性核酸为硒衍生的核酸。还公开通过使核酸酶与功能性核酸接触而影响生物过程的方法,其中功能性核酸为硒衍生的核酸。

[0023] 在方法的一些形式中,功能性核酸可为适体、反义核酸、siRNA、shRNA或crRNA。在方法的一些形式中,功能性核酸可结合到或影响所关注的分子。在一些形式中,功能性核酸可为核酸酶的底物或辅因子。在一些形式中,辅因子可为底物引导序列(或引导物),其引导核酸酶以裂解底物(RNA或DNA)。在一些形式中,相比于在存在并非硒衍生的对应核酸的情况下,核酸酶的催化活性在存在硒衍生的核酸的情况下增加。举例来说,比较催化活性可为在存在对应天然核酸的情况下的核酸酶的催化活性。核酸酶可为任何类型或形式的核酸酶。

附图说明

[0024] 图1A、图1B和图1C显示与硒修饰的DNA和RNA双螺旋体复合的RNA酶H的晶体结构。

(A) 在1.80 Å分辨率下测定的硒-DNA/RNA/RNA酶H三元复合物的总体结构(D132N突变体; PDB ID:3TWH)。蛋白质显示为带状图;RNA链以球棍型式显示于左侧,与蛋白质结构重叠;且DNA链以球棍型式显示于右侧,从结构突出。球体表示如所指示的Mg²⁺离子和Se原子。裂解位点通过箭头指示。(B) 天然和修饰DNA和RNA的序列。^{Se}G和^SG分别表示6-Se-G和6-S-G。(C) 6-Se-脱氧鸟苷衍生的Se-DNA。

[0025] 图2A和图2B显示与DNA/RNA双螺旋体(具有相同序列)复合的RNA酶H(D132N突变体)的结构。(A) Se-DNA/RNA/RNA酶H结构(PDB ID:3TWH; 1.80 Å分辨率,从这项工作)。Se结构(3TWH)中的裂解位点在这两个Mg²⁺离子之间,通过箭头指示。RNA链以球棍型式显示于图式中心,与蛋白质结构重叠。DNA链以球棍型式显示于底部。(B) 天然DNA/RNA/RNA酶H结构(PDB ID:2G8U; 2.70 Å分辨率)(诺沃特尼(Nowotny)和杨,2006)。DNA(5'-ATGTCG-3')和RNA(5'-UCGACA-3')的序列在所有结构中相同。RNA链以球棍型式显示,与蛋白质重叠且突出到图式的右下方。DNA链以球棍型式显示,与RNA结构重叠且突出到图式的左下方。在两种结构中,蛋白质均显示为带状图。球体表示如所指示的Mg²⁺离子和Se原子。

[0026] 图3A、图3B和图3C显示与RNA酶H复合的Se-DNA/RNA双螺旋体的细微构形改变(或局部细微解旋)。(A) 经由RNA酶H的活性位点处的Se-dG3/rC5碱基对(在3TWH中)与dA3/rU10(在1ZBI中)的比较显示的双螺旋体的局部细微解旋。(B) 显示局部主链移动的结构比较。结构以与图3A中相同的定向显示。两种结构(1ZBI和3TWH)中紧邻易裂开的磷酸盐的rA/T碱基对(标记为与T4/T4配对的A4/A9)几乎一致。(C) C/^{Se}G碱基对(rC5/dG3)的电子密度图;2Fo-Fc图在1.5σ层级成形。

[0027] 图4A和图4B显示Se-DNA/RNA底物的易裂开的磷酸盐朝向RNA酶H活性位点的移动。水和 Mg^{2+} 离子显示为球形。(A) D132N突变体·Se-DNA/RNA和D132N突变体·DNA/RNA的叠加显示裂解位点相互作用随着距离而突显。(B) 提出的引导依赖性RNA裂解通过易裂开的磷酸盐和局部细微解旋促进。易裂开的磷酸盐的Rp-氧原子与亲核水分子形成氢键。如所示,Se修饰的复合结构的氢键值为3.1 Å和2.9 Å。

[0028] 图5显示RNA底物通过RNA酶H的“假特异性”裂解。短天然和修饰的RNA底物在存在短天然和修饰的DNA引导物的情况下的RNA酶H裂解(参见图1中的序列)。在反应物中,RNA底物的浓度等于天然、单Se、双Se、单S或双S修饰的DNA的浓度。截短RNA酶H(59-196)也用于这些实验,且获得类似结果。(图A)天然RNA在存在天然和修饰的DNA的情况下通过RNA酶H的裂解。(图B)通过RNA底物(RNA-S1,Sp非对映异构体)的Sp-硫修饰的裂解抑制。(图C)通过RNA底物(RNA-S2,Rp非对映异构体)的Rp-硫修饰的裂解抑制。(图D)通过用 Mn^{2+} 阳离子置换 Mg^{2+} 的Sp-RNA裂解的恢复。(图E)在存在DNA引导物,包括天然DNA-N、DNA-S和DNA-Se的情况下通过RNA酶H的RNA水解。使用这些模板的反应速率的相对值为:DNA-N(1)、DNA-S(1.6)和DNA-Se(6.2)。

具体实施方式

[0029] 蛋白质和蛋白质-核酸复合物的X射线晶体结构通常通过硒衍生的(即硒代甲硫氨酸)蛋白质,经由多波长或单波长异常衍射(MAD或SAD)定相测定。MAD定相为经由解决相关问题促进生物巨分子(如DNA或药物受体)的三维结构的测定的用于X射线晶体学的技术。已发现用硒原子取代核酸碱基中的羰基氧的方法。亦已发现硒衍生的核酸保留非衍生核酸的结合特征。亦已发现与所关注的分子(如多肽)复合的硒衍生的核酸可帮助结晶和此类复合物的结构的X射线晶体学测定。公开使与核酸复合的所关注的分子(如多肽)结晶的方法,其包含以下步骤:(a)使所关注的分子与硒衍生的核酸接触,和(b)使所关注的分子/硒衍生的核酸复合物结晶。方法可进一步包含测定所关注的分子/硒衍生的核酸复合物的X射线晶体结构的步骤。X射线晶体结构测定可包含硒衍生的核酸的硒单波长异常定相。

[0030] 亦公开测定所关注的分子(如多肽)与核酸之间的相互作用的方法,其包含以下步骤:(a)使所关注的分子与硒衍生的核酸接触;(b)使所关注的分子/硒衍生的核酸复合物结晶;(c)测定所关注的分子/硒衍生的核酸复合物的三维X射线晶体结构,其中X射线晶体结构测定的方法包含硒衍生的核酸的硒单波长异常定相;和(d)识别所关注的分子/硒衍生的核酸复合物的三维X射线晶体结构中的所关注的分子与硒衍生的核酸之间的联接元件。

[0031] 方法可进一步包含选择分子,如候选药物,其干扰所关注的分子与核酸之间的相互作用。分子可通过(a)在数字计算机上提供所关注的分子/硒衍生的核酸复合物的三维X射线晶体结构;和(b)选择预测结合所关注的分子/硒衍生的核酸复合结构中识别的核酸界面的化合物来选择。

[0032] 方法可进一步包含设计分子,如候选药物,其结合到所关注的分子。分子可通过(a)在数字计算机上提供所关注的分子/硒衍生的核酸复合物的三维晶体结构;和(b)使用数字计算机包含的软件设计预测结合到所关注的分子的分子来设计。

[0033] 方法可进一步包含(a)合成分子;和(b)评估分子改变所关注的分子的活性的能力。

[0034] 在方法的一些形式中,在硒衍生的核酸复合物的情况下获得的X射线晶体学数据的衍射的分辨率可大于在不存在硒衍生的核酸的情况下获得的晶体学数据。在方法的一些形式中,所关注的分子在不存在硒衍生的核酸的情况下不结晶。在方法的一些形式中,不从另一晶体提供用于所关注的分子的X射线晶体结构的各相。在方法的一些形式中,所关注的分子不是核酸结合蛋白。

[0035] 还公开选择含有硒衍生的核酸的晶体的方法,其包含以下步骤:(a)在含有硒衍生的核酸的溶液中生长晶体;和(b)选择着色为黄色,指示存在硒衍生的核酸的晶体。在方法的一些形式中,含有硒衍生的核酸的晶体的颜色相比于不含硒衍生的核酸的对照晶体的颜色。在方法的一些形式中,硒衍生的核酸可与所关注的分子复合。在方法的一些形式中,硒衍生的核酸可与多肽复合。

[0036] 在方法的一些形式中,硒衍生的核酸可为硒衍生的RNA。在方法的一些形式中,硒衍生的核酸可以与并非硒衍生的核酸至少相同的亲和力结合到所关注的分子。在方法的一些形式中,硒衍生的核酸可与并非硒衍生的核酸结合所关注的分子的不同区域。

[0037] 还公开所关注的分子与硒衍生的核酸的复合物。还公开多肽和硒衍生的核酸的复合物。

[0038] I. 定义.

[0039] 除非另外规定,否则本文中所有的技术和科学术语具有与所公开的本发明所属领域的技术人员通常所了解相同的含义。本文中所引用的公开案和其所针对引用的材料专门以引用的方式并入。

[0040] 术语DNA结合蛋白是指包含DNA结合域且因此对于单链或双链DNA具有特异性或一般亲和力的蛋白质。示例性DNA结合蛋白为调节转录过程的转录因子、各种聚合酶、裂解晶体内的DNA分子的核酸酶和参与细胞核中的染色体包装和转录的组蛋白。

[0041] 术语联接元件是指硒衍生的核酸与其结合的蛋白质之间的相互作用可能需要的元件。

[0042] 术语多波长异常衍射(MAD)定相是指促进生物巨分子(例如DNA、药物受体)的三维结构的测定的技术。此方法不需要用于独特相求解的两种晶体结构(一种天然且一种具有重原子)。取而代之,在同步加速器设施处记录相干X射线光的不同波长下的异常衍射。

[0043] 术语核酸结合蛋白是指含有核酸、DNA或RNA结合域且因此对于核酸、DNA或RNA具有特异性或一般亲和力的蛋白质。示例性核酸结合蛋白为DNA结合蛋白和RNA结合蛋白。

[0044] 术语相是指相对于起点的波的最大值的位置。

[0045] 术语所关注的分子是指任何化合物或分子,包括生物分子,如维生素、药物、小分子、配位体、蛋白质、多肽和核酸。

[0046] 术语所关注的分子/硒衍生的RNA复合物是指形成于硒衍生的RNA和所关注的分子之间的复合物。

[0047] 术语多肽/硒衍生的RNA复合物是指形成于硒衍生的RNA和所关注的多肽之间的复合物。

[0048] 术语衍射的分辨率是指分子的电子密度中的特征的清晰度,以及关于原子位置的确定性。分辨率越大,图像质量越好。

[0049] 术语RNA结合蛋白是指含有RNA结合域且因此对于RNA具有特异性或一般亲和力的

蛋白质。示例性RNA结合蛋白为参与替代性拼接、RNA编辑、聚腺苷酸化、核输出、mRNA定位和翻译的控制的蛋白质。

[0050] 术语硒衍生化是指使用硒置换甲硫氨酸中的硫或核苷酸中的氧以分别模拟甲硫氨酸或天然核苷酸。硒可因此用作核酸的结构和功能研究的原子探针。

[0051] 术语硒衍生的核酸是指含有硒而不是氧的核酸。

[0052] 术语硒衍生的DNA是指含有硒而不是氧的DNA。

[0053] 术语硒衍生的RNA是指含有硒而不是氧的RNA。

[0054] 术语shRNA是指短发夹RNA,形成紧密发夹环的RNA结构,其也可用于经由RNA干扰使基因表达沉默。shRNA发夹结构通过细胞机制裂解为小干扰RNA(siRNA),其接着结合到RNA诱导的沉默复合物(RISC)。此复合物结合到且裂解mRNA,其匹配结合到其的siRNA。

[0055] 术语单波长异常衍射(SAD)定相是指促进所关注的分子,如蛋白质或其它生物巨分子的结构的测定的技术。相比于多波长异常衍射(MAD),SAD使用单一适当波长下的单一数据集。该技术的一个优势为使通过晶体而在射束中花费的时间最小化,因此减少收集数据时对分子的潜在辐射损害。

[0056] 术语siRNA是指小干扰RNA,通常18到30个核苷酸,优选地20到25个、更优选地21到23个或大致22个核苷酸双链RNA。优选地,至少一个链具有1到5个、优选地1到3个或2个核苷酸的5'和/或3'突出端。siRNA参与RNA干扰路径,其中siRNA干扰特定基因的表达。

[0057] 术语三维X射线晶体结构是指由X射线晶体学产生的结构(与上文的“晶体”同义)。

[0058] 术语X射线晶体学是指用于测定晶体的原子和分子结构的方法,其中结晶原子导致X射线束衍射到许多特定方向。通过测量这些衍射束的角度和强度,检晶器可产生晶体内的电子密度的三维图像。

[0059] 术语X射线衍射是指涉及在遇到晶体内的分子的原子时衍射且散射的来自X射线源的X射线流的技术。

[0060] II. 组合物

[0061] A. 硒衍生的核酸

[0062] 公开的组合物和方法利用硒衍生的核酸。选择性置换核酸的核苷酸残基中的氧原子产生硒衍生的核酸。此类硒衍生的核酸的用途和优点描述于本文中。

[0063] 核碱基上的硒原子特异性置换(哈桑(Hassan)等人,美国化学学会志(J. Am. Chem. Soc), 132:2120-2121 (2010);林(Lin)等人,化学会评论(Chem. Soc. Rev.), 40:4591-4602 (2011);沙龙(Salon)等人,核酸研究(Nucleic Acids Res.), 36:7009-7018 (2008);沙龙等人,美国化学学会志, 129:4862-4863 (2007);盛(Sheng)等人,核酸研究, 40:8111-8118 (2012);孙(Sun)等人,核酸研究, 40:5171-5179 (2012);张(Zhang)等人,亚洲化学杂志(Chem. Asian J.), 7:476-479 (2012))可用于产生硒衍生的核酸。

[0064] B. 功能性核酸

[0065] 硒衍生化和硒衍生的核酸可体现在功能性核酸中。用硒取代核酸中的一个或多个氧原子或核酸中的一个或多个核苷酸残基可提供具有适用特性,如改进的杂交精确性、热稳定性、化学、生物化学和生物稳定性、活性效率、促进的结晶、促进的相测定和增强的高分辨率晶体结构测定的核酸。

[0066] 功能性核酸为具有特定功能,如结合目标分子、充当酶底物或辅因子或催化特定

反应的核酸分子。举例来说,功能性核酸可结合靶核酸(RNA或DNA)或可充当酶底物引导序列(或引导物)。功能性核酸分子可分成以下类别,其不打算限制性的。举例来说,功能性核酸包括反义分子、适体、核酶、三链形成分子、RNA干扰(RNAi)、CRISPR(成簇的规律间隔的短回文重复序列)RNA(crRNA)和外部引导序列。功能性核酸分子可充当目标分子具有的比活性的效应剂、抑制剂、调节剂和刺激剂,或功能性核酸分子可具有独立于任何其它分子的重新(de novo)活性。

[0067] 功能性核酸分子可与任何巨分子,如DNA、RNA、多肽或碳水化合物链相互作用。通常,功能性核酸经设计以基于目标分子与功能性核酸分子之间的序列互补性与其它核酸相互作用。在其它情况下,功能性核酸分子与目标分子之间的特异性识别不是基于功能性核酸分子与目标分子之间的序列互补性,而更确切地是基于形成允许特异性识别发生的三级结构。

[0068] 反义分子经设计以经由典型或非典型碱基配对与目标核酸分子相互作用。反义分子与目标分子的相互作用经设计以经由例如RNA酶H介导的RNA-DNA混合降解促进目标分子的破坏。或者,反义分子经设计以中断通常将发生于目标分子上的处理功能,如转录或复制。反义分子可基于目标分子的序列设计。存在许多通过发现目标分子的最可及区域而使反义效率最佳化的方法。示例性方法将为使用DMS和DEPC的体外选择实验和DNA修饰研究。优选的是反义分子以小于或等于 10^{-6} 、 10^{-8} 、 10^{-10} 或 10^{-12} 的解离常数(K_d)结合目标分子。帮助反义分子的设计和使用的方法和技术的代表样品可见于美国专利第5,135,917、5,294,533、5,627,158、5,641,754、5,691,317、5,780,607、5,786,138、5,849,903、5,856,103、5,919,772、5,955,590、5,990,088、5,994,320、5,998,602、6,005,095、6,007,995、6,013,522、6,017,898、6,018,042、6,025,198、6,033,910、6,040,296、6,046,004、6,046,319和6,057,437号中。

[0069] 三链形成功能性核酸分子为可与双链或单链核酸相互作用的分子。当三链分子与目标区域相互作用时,形成称作三链的结构,其中存在取决于沃森-克里克(Watson-Crick)和胡斯坦(Hoogsteen)碱基配对而形成复合物的DNA的三条链。三链分子由于其可以高亲和力和特异性结合目标区域而为优选的。优选的是三链形成分子以小于 10^{-6} 、 10^{-8} 、 10^{-10} 或 10^{-12} 的 K_d 结合目标分子。如何制造和使用三链形成分子以结合多种不同目标分子的代表性实例可见于美国专利第5,176,996、5,645,985、5,650,316、5,683,874、5,693,773、5,834,185、5,869,246、5,874,566和5,962,426号中。

[0070] 基因表达也可经由RNA干扰(RNAi)以高度特异性方式有效地沉默。此沉默最初在添加双链RNA(dsRNA)的情况下观测到(费尔,A.(Fire,A.)等人,自然(Nature),391:806-11(1998);那波利,C(Napoli,C)等人,植物细胞(Plant Cell),2:279-89(1990);汉农,G.J.(Hannon,G.J.),自然,418:244-51(2002))。一旦dsRNA进入细胞,其通过RNA酶III样酶Dicer裂解成为在3'末端上含有2个核苷酸突出物且长度为21-23个核苷酸的双链小干扰RNA(siRNA)(艾尔巴希尔,S.M.(Elbashir,S.M.)等人,基因与发育(Genes Dev.),15:188-200(2001);伯恩斯坦,E.(Bernstein,E.)等人,自然,409:363-6(2001);哈蒙德,S.M.(Hammond,S.M.)等人,自然,404:293-6(2000))。在ATP依赖性步骤中,siRNA变得整合到通常称为RNAi诱导沉默复合物(RNAi induced silencing complex;RISC)的多亚单位蛋白质复合物中,其将siRNA引导到目标RNA序列(尼卡宁,A.(Nykanen,A.)等人,细胞(Cell),107:

309-21 (2001))。在一些点, siRNA双螺旋解旋, 且看起来反义链通过核酸内切酶和核酸外切酶的组合保持结合到RISC且引导互补mRNA序列的降解(马丁尼兹, J. (Martinez, J.) 等人, 细胞, 110:563-74 (2002))。但是, RNAi或siRNA的效应或其用途不限于任何类型的机制。

[0071] 小干扰RNA (siRNA) 为可诱导序列特异性转录后基因沉默, 进而减少或甚至抑制基因表达的双链RNA。在一个实例中, siRNA在siRNA与目标RNA两者之间的序列一致性区域内触发同源RNA分子, 如mRNA的特异性降解。举例来说, WO 02/44321公开当与3'突出末端碱基配对时能够序列特异性降解目标mRNA的siRNA, 制造这些siRNA的方法以引用的方式并入本文中。序列特异性基因沉默可使用模拟通过酶dicer产生的siRNA的合成短双链RNA在哺乳动物细胞中实现(艾尔巴希尔, S.M. 等人, 自然, 411:494-498 (2001); Ui-Tei, K. 等人, 欧洲生物化学学会联合会快报 (FEBS Lett), 479:79-82 (2000))。siRNA可为化学或体外合成的或可为细胞内部中的短双链发夹样RNA (shRNA) 被处理成为siRNA的结果。合成siRNA一般使用算法和常规DNA/RNA合成器设计。供应商包括安必逊 (Ambion) (德克萨斯州奥斯汀 (Austin, Texas))、化学基因 (ChemGenes) (马萨诸塞州亚什兰 (Ashland, Massachusetts))、达尔马肯 (Dharmacon) (科罗拉多州拉斐特 (Lafayette, Colorado))、格伦研究 (Glen Research) (弗吉尼亚州斯特林 (Sterling, Virginia))、MWB生物技术 (MWB Biotech) (德国埃伯斯贝格 (Esbersberg, Germany))、普罗丽格 (Proligo) (科罗拉多州博尔德 (Boulder, Colorado)) 和凯杰 (Qiagen) (荷兰文托 (Vento, The Netherlands))。siRNA也可使用试剂盒, 如安必逊SILENCER® siRNA构筑试剂盒于体外合成。

[0072] 与RNAi类似, CRISPR (成簇的规律间隔的短回文重复序列) 干扰为经由选择性DNA裂解用于减少内源性表达的蛋白质的基因表达的有效方法。

[0073] CRISPR为含有由独特间隔子分离的直接重复序列的基因元件, 该等间隔子中的许多个与噬菌体和其它外来基因元件中发现的序列相同。近来的工作已展示CRISPR在适应性免疫中的作用且显示衍生自CRISPR的小RNA (crRNA) 实施为用于外来DNA的靶向干扰的归巢寡核苷酸(季聂克 (Jinek) 等人, 科学 (Science), 337:816-821 (2012))。crRNA用于在基因级选择性地裂解DNA。

[0074] 当功能性核酸充当酶辅因子时, 辅因子可例如为底物引导序列 (或引导物), 其引导核酸酶以裂解底物 (RNA或DNA)。

[0075] III. 使用方法

[0076] A. X射线晶体学的方法

[0077] 已发现硒 (Se) 衍生的核酸可用于经由Se-核酸多重异常衍射 (MAD) 定相测定核酸和其与所关注的分子 (如蛋白质和配位体) 的复合物的X射线晶体结构。描述使用硒衍生的核酸和其与所关注的分子的复合物的X射线晶体结构的增强结晶和结构测定的方法。

[0078] 硒衍生的核酸可用于提供测定其结合到的所关注的分子 (如蛋白质) 的晶体结构的相位信息。提供使用硒衍生的核酸以提供RNA/DNA-分子复合物的定相信息的方法。

[0079] 此外, 通过获自硒衍生的核酸的相测定的X射线晶体结构可用于基于结构的药物设计和候选药物选择。

[0080] 1. 结晶

[0081] X射线晶体学的技术具有三个基本步骤。第一和通常最困难的为获得研究中的材料的足够晶体。晶体应足够大 (通常在所有尺寸中大于0.1mm)、组成为纯的且结构为常规

的、不具有显著内部缺陷。

[0082] 在第二步中,晶体置于通常单波长的强X射线束中,产生规则反射图案。随着晶体逐渐旋转,前述反射消失且出现新反射;在晶体的每一定向记录每一点的强度。可能必须收集多个数据集,其中每一集合覆盖略微大于晶体的完全旋转的一半且通常含有数万反射。

[0083] 在第三步中,这些数据与互补化学信息在计算上组合以产生和细化晶体内的原子的布置的模型。原子布置的最终、经细化的模型-现称作晶体结构-通常存储在公共数据库中。

[0084] 本文所公开的方法和组合物可用于实现、增强或优化结晶过程。蛋白质结晶为用于获得蛋白质的原子三维结构的广泛使用的技术。但是,不可能预测最优结晶条件,且必须对于每一蛋白质独立地测定以产生经受高分辨率X射线衍射的晶体。因此,结晶通常代表对巨分子,如蛋白质和蛋白质复合物的结构测定的阻碍。

[0085] 因此,在一些实施例中,公开的硒衍生的核酸用于促进其所连接的所关注的分子,如蛋白质或配位体的结晶。核酸可与蛋白质、多肽和其它配位体相互作用以形成具有改变的结构特征和特性的复合物。核酸可引起与其相互作用的肽、蛋白质或其它配位体的构形变化。因此,如果硒衍生的核酸诱导或另外赋予对于与其相互作用的肽、蛋白质或其它配位体的结晶有利的结构特性,那么出于结晶的目的,期望与硒衍生的核酸形成复合物。帮助结晶过程的结构特性可包括寡聚状态;分子、肽、蛋白质或其它配位体的区域的增加或减少的灵活性;分子、肽、蛋白质或其它配位体的区域的增加或减少的刚度;改变的溶解性;改变的疏水性或结合到其它分子、肽、蛋白质或配位体的能力。

[0086] 与分子、蛋白质、多肽或其它配位体复合的硒衍生的核酸的结晶可相比于对照物。典型对照物包括具有并非硒衍生的等效核酸的相同分子、蛋白质、多肽或其它配位体的复合物。

[0087] 在一些实施例中,与硒衍生的核酸的复合物形成对照物不形成的晶体。在一些实施例中,与硒衍生的核酸的复合物提供相比于对照物增强的晶体成核。在其它实施例中,含有硒衍生的核酸的晶体提供相比于对照物较大的X射线衍射的分辨率。

[0088] 蛋白质的结晶中的另一挑战为识别含有所需靶蛋白质或蛋白质复合物的晶体。含有复合物的蛋白质盐、污染物、降解产物或单一底物的晶体可延迟或阻止靶蛋白质的晶体学测定。上述情况可适用于其它目标分子。因此,视觉识别含有硒衍生的核酸的晶体的能力可帮助选择和筛选含有衍生RNA或DNA的复合物。硒衍生的核酸可例如通过具有不同颜色而视觉上不同于并非硒衍生的核酸。在一些实施例中,具有硒衍生的核酸的复合物的晶体视觉上不同于对照物的晶体。在一些实施例中,含有硒衍生的核酸的晶体的颜色差异使得能够快速选择含有硒衍生的核酸的晶体。

[0089] 含有硒衍生的核酸的晶体可通过包括(但不限于)以下的方法产生:核酸与所关注的分子(如蛋白质)的共结晶、纯化核酸/分子复合物的结晶或通过将所关注的分子的晶体浸泡到含有硒衍生的核酸的溶液中。

[0090] 2. 结构测定

[0091] 本文所公开的方法和组合物可用于实现、增强或优化结构测定。测定硒基-甲硫氨酸衍生的蛋白质的X射线晶体结构的方法为所属领域中众所周知的。在从单一晶体收集SAD或MAD数据集之后,硒原子可通过直接方法定位且相可类似于得到确认的蛋白质策略进行

测定(埃尔卡亚姆(Elkayam)等人,细胞,150:100-110(2012);费雷-德阿玛雷(Ferre-D'Amare)等人,自然,395:567-574(1998);亨德里克森,科学(Science),254:51-58(1991);亨德里克森,生物化学科学趋势(Trends Biochem.Sci.),25:637-643(2000);西尔勒(Schirle)和麦克雷(MacRae),科学,336:1037-1040(2012);杨(Yang)等人,科学,249:1398-1405(1990))。

[0092] 与蛋白质中的硫原子的硒取代类似,核酸中的氧原子可经硒原子置换,因为硒和氧也在相同元素家族中。此Se原子特异性衍生化也被称为Se原子特异性突变诱发(Se atom-specific mutagenesis;SAM)。SAM可用于提供对蛋白质和蛋白质复合物的结构和功能两者的新洞察。

[0093] 测定相的方法为所属领域中已知的且包括使用类似分子的先前结构信息和同形置换的分子置换来以已知方式,例如通过包括具有大原子数的重原子改变结构因子。在分子内包括重原子将显著增加X射线的散射。散射强度的差异将很大程度上反映重原子的散射贡献,且这些差异可用于测定重原子在电子密度图内所位于的位置。重要的是包括重原子不另外改变分子结构,以使得能够同形置换。

[0094] 提供测定与硒衍生的核酸的复合的目标分子结构的三维结构的方法,其中目标分子的三维结构并非已知的。在一些实施例中,方法适用于仅基于衍生核酸内的硒原子的识别测定结合核酸的分子的X射线晶体结构。

[0095] 因此,提供使用硒衍生的核酸以提供用于结合到硒衍生的核酸的分子复合物的晶体学测定的定相信息的方法。方法可涉及记录来自含有硒衍生的核酸的晶体的相干X射线的不同波长下的X射线的异常衍射和定位硒原子以测定结合到核酸的分子的相位信息。在一些实施例中,分子为酶。此类酶可包括(但不限于)RNA和DNA结合酶。示例性RNA结合酶为RNA酶H。在某些实施例中,目标分子的结构并非已知。在一些实施例中,目标分子为靶蛋白质。在一些实施例中,靶蛋白质的氨基酸序列不含氨基酸甲硫氨酸。在其它实施例中,靶蛋白质的氨基酸序列含有小于5%、小于3%或小于1%甲硫氨酸。在一些实施例中,靶蛋白质的氨基酸序列与晶体结构存在的最类似蛋白质的氨基酸序列的一致性为小于60%、小于50%、小于40%、小于30%、小于20%或小于10%。

[0096] 在一些实施例中,含有硒衍生的核酸的复合物的X射线晶体结构用于例如基于结构的药物设计的方法中。在一些实施例中,X射线晶体结构用于测定复合物的生物功能。通过这些方法识别的分子的结构信息可用于例如用于治疗组合物中的药物的设计、识别或选择。在一些实施例中,方法使得能够较快处理和增加三维结构的发现的通量(出于药物设计的目的)。

[0097] 产生和测定含有硒衍生的核酸的晶体的三维坐标的所述方法具有使用衍生核酸内的硒方便地测定相的优势。在一些实施例中,方法使得能够测定与DNA或RNA相互作用的所关注的分子(如蛋白质)的晶体结构。在某些实施例中,在同步加速器设施处进行晶体学数据收集。数据收集可在冷冻温度以上进行。数据收集也可在0°C温度,如在液氮(在大致-190°C下),或在液氦(在大致-270°C下)的温度下进行。

[0098] B. 使用经改变核酸的方法

[0099] 硒原子除其在结构研究中的效用以外,也可为经由选择性氧置换特异性并入核酸中以用于功能研究的原子。

[0100] 核酸为对于所有已知生命形式必需的的聚合巨分子。包括脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA)的核酸由称为核苷酸的单体制得。每一核苷酸具有三种组分:5个碳的糖、磷酸基和含氮碱基。如果糖为脱氧核糖,那么聚合物为DNA。如果糖为核糖,那么聚合物为RNA。

[0101] RNA也可包括非编码RNA(ncRNA),尤其为如小干扰RNA(siRNA)、微RNA(miRNA)、核糖体RNA(rRNA)、转移RNA(tRNA)、小核仁RNA(snoRNA)、短发夹RNA(shRNA)和小核RNA(snRNA)。

[0102] 已测定硒衍生的核酸可改变核酸相互作用的蛋白质的活性。通常,蛋白质为催化核酸的结构变化的酶。在一些实施例中,在硒衍生的核酸内硒的存在不改变与核酸的三级结构相关的生物功能。

[0103] 与核酸的三级结构相关的生物功能可包括(但不限于)与核酸或蛋白质(如酶)的相互作用。在一些实施例中,硒的存在赋予增加核酸的半衰期或结构刚度的核酸的三级结构的变化。通常,衍生聚核苷酸内的硒的存在不抑制、阻止或减少衍生核酸与蛋白质,如RNA或DNA结合酶的相互作用。在某些实施例中,硒衍生的核酸增加如RNA或DNA结合酶的蛋白质的催化速率。在一个实施例中,硒衍生的核酸的酶催化通过DNA/RNA双螺旋的局部细微解旋促进。细微结构变化可例如将RNA易裂开的磷酸盐移动到较接近酶活性位点。

[0104] 因此,提供在改变核酸结合蛋白的活性中使用硒衍生的核酸的方法。举例来说,可通过向细胞或个体授予功能性核酸影响生物过程,其中功能性核酸为硒衍生的核酸。作为另一实例,可通过使核酸酶与功能性核酸接触影响生物过程,其中功能性核酸为硒衍生的核酸。

[0105] 在方法的一些形式中,功能性核酸可为适体、反义核酸、siRNA、shRNA或crRNA。在方法的一些形式中,功能性核酸可结合到或影响所关注的分子。在一些形式中,功能性核酸可为核酸酶的底物或辅因子。在一些形式中,辅因子可为底物引导序列(或引导物),其引导核酸酶以裂解底物(RNA或DNA)。在一些形式中,相比于在存在并非硒衍生的对应核酸的情况下,核酸酶的催化活性在存在硒衍生的核酸的情况下增加。举例来说,比较催化活性可为在存在对应天然核酸的情况下的核酸酶的催化活性。核酸酶可为任何类型或形式的核酸酶。因此,公开的硒衍生的核酸可用于影响或改变核酸酶的活性,如通过增加核酸酶的催化活性。在功能性核酸,如siRNA、shRNA、miRNA、crRNA、tracrRNA和引导序列的情况下,硒衍生形式可影响或改变功能性核酸的核酸调节、编辑等。

[0106] 核酸酶可为任何类型或形式的核酸酶。举例来说,核酸酶可为核酸内切酶、核酸外切酶、核糖核酸酶、去氧核糖核酸酶、核糖核酸酶、转录活化子样效应核酸酶(transcription activation-like effector nuclease;TALEN)、锌指核酸酶、RNA诱导的沉默复合物(RISC)、船蛸酶(Argonaute)、Dicer酶、CRISPR相关(CRISPR-associated;Cas)核酸酶、限制酶、大范围核酸酶、RNA酶A、RNA酶H、RNA酶I、RNA酶III、RNA酶L、RNA酶P、RNA酶T1、RNA酶T2、RNA酶U2、RNA酶V、RNA酶V1、RNA酶PhyM、RNA酶II、RNA酶R、RNA酶PH、RNA酶D、RNA酶T、多核苷酸磷酸化酶(RNPase)、寡核糖核酸酶、核糖核酸外切酶I、核糖核酸外切酶II、微生物核酸酶、S1核酸酶、P1核酸酶、肽基转移酶23S rRNA、第I族内含子、第II族内含子、GIR1分支酶、先导酶、发夹核糖核酸酶、缠绕核糖核酸酶、锤头状核糖核酸酶、HDV核糖核酸酶、哺乳动物CPEB3核糖核酸酶、VS核糖核酸酶、glmS核糖核酸酶或CoTC核糖核酸酶。核酸酶的组合可经靶向。核酸酶的组合可用硒衍生的核酸引导。

[0107] 实例

[0108] 材料和方法.

[0109] A.寡核苷酸和蛋白质制备和结晶.

[0110] 天然和实验室中合成的修饰DNA或RNA寡核苷酸(沙龙等人,核酸研究,36:7009-7018(2008))在具有和不具有DMTr保护基团的情况下通过HPLC纯化两次以保证高纯度。蛋白质表达(诺沃特尼(Nowotny)等人,细胞,121:1005-1016(2005);诺沃特尼和杨,欧洲分子生物学杂志(Embo J.),25:1924-1933(2006))是在BL21(DE3;pLys E.coli;购自茵维特罗根(Invitrogen))中进行。通过热休克方法实现转型。DNA/RNA双螺旋体(5'-ATGTCGp-3'/5'-UCGACA-3':两个末端处的单碱基突出物)的DNA部分经衍生。在与RNA酶H共结晶之前,经纯化Se-DNA(5'-AT-^{Se}G-TC-^{Se}Gp-3')和RNA(5'-UCGACA-3')通过加热混合物到90°C后维持1min,接着使其缓慢冷却到25°C而以1:1摩尔比结合。所得Se-DNA/RNA双螺旋体与蛋白质(最终浓度:8mg/mL)在存在5mM MgCl₂的情况下以1:1摩尔比混合。Se-DNA/RNA双螺旋体与RNA酶H的共结晶通过用凯杰经典套件试剂盒(QIAGEN Classics Suite Kit)(www..com)筛选实现。通过在25°C下使用沉滴式蒸气扩散方法,晶体易于获自结晶筛选的混合物[缓冲液:0.1M MES,pH 6.5;沉淀剂:12%(w/v),PEG 20000]。

[0111] B.MAD数据收集、定相和结构测定.

[0112] Se-DNA/RNA/RNA酶H复合物的晶体衍射数据采集于布鲁克海文国家实验室(Brookhaven National Laboratory)的国家同步加速器光源(NSLS)中的光束线X25和X29。多种晶体经扫描以发现在硒的K边缘吸收处具有强异常散射的晶体。25%甘油用作低温保护剂,而X射线数据在99°K下在液氮流下收集。每一晶体在一度旋转下每图像暴露15秒,且每一数据集获取总共180个图像。两个晶体用于收集MAD/SAD数据集。所有数据使用HKL2000和DENZO/SCALEPACK处理(奥汀诺夫斯基(Otwinowski)和迈纳(Minor),酶学方法(Meth.Enzymol),276:307-326(1997))。结构通过使用程序Solve/Resolve的MAD方法解析(特维莱格(Terwilliger),酶学方法,374:22-37(2003);王(Wang)等人,结晶学报,D辑-生物晶体学(Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.),60:1244-1253(2004))。所得模型使用CCP4i内的Refmac5细化。DNA/RNA双螺旋体使用Coot模型化为结构。使用Coot自动或手动添加金属离子和水分子。

[0113] C.通过RNA酶H的催化水解.

[0114] DNA与其互补RNA允许通过加热和后续冷却形成双螺旋体。每一RNA酶H水解反应物(体积5μL)含有DNA模板(150nM最终浓度;DNA-N、DNA-S或DNA-Se)和³²P标记的RNA底物(冷和热RNA的混合物;150nM最终浓度)。向每一水解反应物添加WT或TR RNA酶H酶(10nM,最终)和反应缓冲液(最终条件:75mM KCl,50mM Tris-HCl,pH 7.8,3mM MgCl₂和1mM二硼烷)。除非另外提及,否则反应物在37°C下培育30min。

[0115] 实例1:Se-DNA/RNA/RNA酶H复合物的结晶、Se异常定相和结构测定。

[0116] 我们已合成Se修饰的DNA以研究DNA/RNA/RNA酶H复合物。天然和Se修饰的寡核苷酸的双螺旋体(沙龙等人,核酸研究,36:7009-7018(2008))与RNA酶H(具有单一D132N突变的非活性突变体)复合。RNA酶H/RNA/Se-DNA的复合物(5'-UCGACA-3'/5'-AT-^{Se}G-TC-^{Se}Gp-3')在含有0.1M MES(pH 6.5)和沉淀剂(12%w/v,PEG 20000)的缓冲液中结晶。晶体也使用沉滴式蒸气扩散方法生长。晶体在一周内出现且在一个月达到其最大尺寸。两个晶体用

于收集MAD/SAD数据集。个别SAD定相数据的优值相对低,其可能不产生用于模型的良好电子密度图。一个SAD数据组用作其它衍射数据集的MAD定相的参考。初始相的总优值(FOM)为0.630,其产生可解译的电子密度图。来自含有Se-寡核苷酸的蛋白质复合晶体的异常衍射数据可在硒K边缘处收集。在从单一晶体收集SAD或MAD数据集之后,硒原子可通过直接方法定位且相可类似于得到确认的蛋白质策略进行测定(埃尔卡亚姆等人,细胞,150:100-110(2012);弗雷-德阿玛雷(Ferre-D'Amare)等人,自然,395:567-574(1998);亨德里克森,科学,254:51-58(1991);亨德里克森,生物化学科学趋势,25:637-643(2000);西尔勒和麦克雷,科学,336:1037-1040(2012);杨等人,科学,249:1398-1405(1990))。

[0117] Se-复合物结构最后经由硒异常信号和MAD定相测定(3TWH;1.80 Å分辨率;图1)。由于使用非活性突变酶,RNA底物不在结晶期间裂解,其通过晶体的MS分析确认。此外,Se-复合物结构已通过MAD定相和分子置换两者测定。通过MAD定相技术测定的Se-复合物结构与通过分子置换测定的相同复合物结构相同。相比于具有相同序列的对应天然结构(具有2.70 Å分辨率的2G8U),含Se结构具有较高结构分辨率。

[0118] 实例2:通过核碱基上的硒原子的RNA/DNA底物双螺旋体的细微构形改变。

[0119] 通过利用核碱基上的硒原子特异性置换(哈桑(Hassan)等人,美国化学学会志(J. Am. Chem. Soc),132:2120-2121(2010);林(Lin)等人,化学会评论(Chem. Soc. Rev.),40:4591-4602(2011);沙龙(Salon)等人,核酸研究(Nucleic Acids Res.),36:7009-7018(2008);沙龙等人,美国化学学会志,129:4862-4863(2007);盛(Sheng)等人,核酸研究,40:8111-8118(2012);孙(Sun)等人,核酸研究,40:5171-5179(2012);张(Zhang)等人,亚洲化学杂志(Chem. Asian J.),7:476-479(2012)),研究RNA/DNA双螺旋体和构形改变对催化水解的影响。与在位置6的鸟苷处经硒修饰的RNA/DNA复合的耐盐杆菌(*Bacillus halodurans*)RNA酶H的晶体结构(图1)测定于1.80 Å分辨率下。RNA酶H为序列非特异性酶,且其在不同位置处结合RNA为可能的。除了通过就天然双螺旋而言的两个核苷酸移动结合到Se修饰的双螺旋的RNA酶H,Se衍生的复合结构几乎与具有相同RNA/DNA序列的对应天然复合结构相同(图2)(诺沃特尼等人,欧洲分子生物学杂志,27:1172-1181(2008);诺沃特尼等人,细胞,121:1005-1016(2005))。RNA酶H的活性位点位于Se修饰的双螺旋体中的RNA分子的A4与C5之间的磷酸盐键处,其中C5与DNA序列的^{Se}G3配对(图1A和图1B)。C5 5'-磷酸盐明显为易裂开的磷酸盐。相反,与对应天然RNA/DNA双螺旋体(PDB ID:2G8V和2G8U)复合的RNA酶H的活性位点(诺沃特尼等人,细胞,121:1005-1016(2005);诺沃特尼和杨,欧洲分子生物学杂志,25:1924-1933(2006))位于经由多个RNA/DNA双螺旋体的堆叠形成的假纤维中的两种不同RNA分子中的A6与U1之间的界面处。

[0120] 晶体结构指示Se修饰的短RNA/DNA双螺旋体(3'-ACAGCU-575'-AT-^{Se}G-TC-^{Se}Gp-3')导致形成底物-RNA酶H复合物(图1A和图2A),而非最初经设计且由对应天然RNA/DNA底物双螺旋体(2G8V和2G8U)形成的产物-RNA酶H复合物。底物-RNA酶H复合物(PDB ID:1ZBI;1.85 Å分辨率)的结构用较长RNA/DNA双螺旋底物(诺沃特尼等人,细胞,121:1005-1016(2005);诺沃特尼和杨,欧洲分子生物学杂志,25:1924-1933(2006))测定,如12-bp RNA/DNA双螺旋体(5'-GAATCAGGTGTC-3'/3'-CUUAGUCCACAG-5'),其中两个RNA酶H分子经结合。不管RNA酶H结合位点的移动,Se-DNA/RNA双螺旋体保持与对应天然双螺旋体极类似的总体

结构。但是,当比较Se修饰的底物-酶复合物(PDB ID:3TWH)与天然底物-RNA酶H复合物(图3A,PDB ID:1ZBI)时,已观测到Se-dG3/rC5碱基对的细微构形改变(改变0.5-0.7Å)。这两种结构中紧邻易裂开的磷酸盐的rA/T碱基对几乎一致(图3B)。

[0121] 实例3:底物将其易裂开的磷酸盐移动到RNA酶H活性位点。

[0122] 通过核碱基上的硒原子的小构形改变造成DNA/RNA双螺旋体的局部细微解旋。一致地,晶体结构研究(图4)指示细微解旋导致较接近RNA酶H活性位点的易裂开的磷酸盐的小移动。Se修饰的复合物中的rC5的5'-磷酸盐(易裂开的磷酸盐)由于DNA/RNA双螺旋体的局部细微解旋而朝向RNA酶H的活性中心移动大致0.3 Å。在高分辨率(1.80 Å)下测定Se-DNA/RNA/RNA酶H复合物(PDB ID:3TWH),且估计的总体座标误差为大致0.1 Å。此复合物(3TWH)视为底物-酶复合物(Se-复合物),其与在高分辨率下测定的另一底物-酶复合物(天然复合物,含有D132N突变)(PDB ID:1ZBI;1.85 Å分辨率)相关(诺沃特尼等人,细胞,121:1005-1016(2005);诺沃特尼和杨,欧洲分子生物学杂志,25:1924-1933(2006))。因此,比较这两种结构允许观测Se-复合物相对于天然复合物的主链移动。底物结构的细小改变(如1 Å的几分之一)对于催化足够且可促进反应的加速,其已在异柠檬酸脱氢酶催化的情况下观测到(梅塞卡尔(Mesecar)等人,科学,277:202-206(1997))。

[0123] 实例4:易裂开的磷酸盐与亲核水形成氢键。

[0124] Mg^{2+} -A与易裂开的磷酸盐的pro-Sp氧的距离在天然和Se修饰的结构两者中保持相同(2.3 Å)(图4A)。相比之下, Mg^{2+} -B与易裂开的磷酸盐的pro-Sp和3'氧原子的距离(分别为2.6和2.8 Å)相比于天然复合物中的距离在Se修饰的结构中缩短0.2 Å(图4A)。 Mg^{2+} -B与这两种氧原子之间缩短的距离指示其较强相互作用,这与催化的RNA裂解一致。距离的变化也与 Mg^{2+} -B的B-因数一致,其高于天然和Se修饰的结构两者中的 Mg^{2+} -A的B-因数。这指示 Mg^{2+} -B在结构和催化中均比 Mg^{2+} -A更动态。

[0125] 类似地,亲核水与紧邻易裂开的磷酸盐的3'-磷酸盐的pro-Rp氧之间的氢键(长度为2.9 Å)相比于天然系统中的氢键较强且较短(0.2 Å)。相反,此亲核水分子与 Mg^{2+} -A之间的距离(2.4 Å)长0.3 Å。减弱与 Mg^{2+} -A结合的亲核试剂且增强与紧邻易裂开的磷酸盐的3'-磷酸盐的去质子化pro-Rp氧的H键与易裂开的磷中心上的亲核水的“线上”攻击一致(图4)。亲核水分子极为接近(3.4 Å)易裂开的磷中心。有趣的是,此亲核水分子也接近易裂开的磷酸盐的pro-Rp氧(3.10 Å),且其形成真氢键。此H键可帮助定位结构中的亲核水分子。

[0126] 实例5:用于RNA酶H催化裂解的RNA/DNA最小底物。

[0127] 不同于使用12bp RNA/DNA双螺旋体的天然底物-酶复合物(PDB ID:1ZBI),其中RNA酶H可结合大于一个位点,短Se-DNA/RNA底物(具有5个碱基对;图1)由于其最小尺寸而仅允许一个RNA酶H分子结合。有趣的是,具有小尺寸的此双螺旋底物迫使RNA酶H以“假特异性”方式与RNA/DNA双螺旋体相互作用。基于晶体结构,预测RNA酶H在C5的5'-磷酸盐处裂解RNA底物且仅提供两个片段,即5'-产物(5'-UCGA-3')和3'-产物(5'-pCA-3')。这通过RNA底物消化确认。RNA酶H产生一个5'-产物(图5A),且裂解产物的放射强度等于起始物质的强度。

[0128] 基于晶体结构(图4),也预测C5 5'-磷酸盐处的硫修饰(如非桥联氧原子的硫置

换)可显著抑制RNA裂解。正如所料,C5' 5'-磷酸盐的S-修饰(置换pro-Sp或pro-Rp氧原子)的确阻止RNA底物裂解(图5B和图5C)。易裂开的磷酸盐的pro-Sp氧的硫取代破坏与两种 Mg^{2+} 离子的相互作用(图5B),而易裂开的磷酸盐的pro-Rp氧的硫置换破坏易裂开的磷酸盐与亲核水分子之间的相互作用。因此,两种硫修饰均抑制RNA裂解(图5B和图5C)。

[0129] 值得注意的是,通过从 Mg^{2+} 转变为 Mn^{2+} 阳离子的补偿实验由于重新建立阳离子(Mn^{2+})与Sp-硫原子之间的相互作用(图4和图5D)而可有效地恢复Sp修饰的RNA的裂解(图5D)。这些结果证实晶体结构结论:C5' 5'-磷酸盐的确为裂解位点。此最小底物为解决双螺旋构形对引导物依赖性RNA裂解的影响的原子特异性取代和动态研究提供了机会。RNA硫修饰的实验结果已展示易裂开的磷酸盐的pro-Sp和pro-Rp氧原子均在RNA裂解中起重要作用,其与计算研究和预测一致(德维沃(De Vivo)等人,美国化学学会志,130:10955-10962(2008);埃尔萨塞(Elsasser)和费尔斯(Fels),物理化学化学物理(Phys.Chem.Chem.Phys.)12:11081-11088(2010);罗斯塔(Rosta)等人,美国化学学会志,133:8934-8941(2011))。

[0130] RNA酶H为选择性地消化RNA/DNA双螺旋体的RNA部分的序列非特异性核酸内切酶(施泰因(Stein)和哈森(Hausen),科学,166:393-395(1969))。RNA酶H参与许多重要生物过程(阿诺德(Arnold)等人,自然,357:85-89(1992);格林(Green)等人,冷泉港定量生物学座谈会(Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol),39:975-985(1975);哈普迈尔(Hippenmeyer)和格兰金特(Grandgenett),生物化学杂志(J.Biol.Chem.),260:8250-8256(1985);翁特贝格尔(Wintersberger),药理学与治疗学(Pharmacol.Ther.),48:259-280(1990)),包括从复制中的冈崎片段(Okazaki fragment)去除RNA引物。其也可直接经由反义机制沉默基因表达(维尔(Veal)等人,核酸研究,26:5670-5675(1998);维科斯(Vickers)等人,生物化学杂志,278:7108-7118(2003);瓦尔德(Walder)和瓦尔德,美国国家科学院院刊,85:5011-5015(1988);吴(Wu)等人,生物化学杂志,279:17181-17189(2004))。已广泛地进行对RNA酶H的催化研究,尤其为接近易裂开的磷酸盐的金属阳离子的作用的研究。最近,与RNA/DNA双螺旋底物复合的耐盐杆菌RNA酶H和人类RNA酶H1的晶体结构分别在1.5和2.2 Å分辨率下测定。这些结构提供对阳离子辅助的RNA水解的洞察(诺沃特尼等人,分子细胞(Mol.Cell),28:264-276(2007);杨等人,分子细胞,22:5-13(2006))。

[0131] 描述经由Se-核酸MAD定相测定的RNA酶H/RNA/Se-DNA的复合结构。RNA酶H/RNA/DNA复合物用作使用Se衍生的核酸而非蛋白质展示晶体结构测定的原理论证的模型系统。通过RNA酶H的RNA裂解通过DNA/RNA双螺旋体的局部细微解旋促进,进而将RNA易裂开的磷酸盐移动到较接近酶活性位点。此外,以实验方式观测到在存在RNA酶H的情况下,易裂开的磷酸盐与水亲核试剂形成氢键,因此帮助定位结构中的水分子。

[0132] 实例6:Se修饰的DNA加速通过RNA酶H催化的RNA底物水解

[0133] 基于结构研究,假设由于促进的构形细微改变(或DNA/RNA双螺旋体的局部细微解旋),Se-DNA引导物可比对应天然DNA引导物较好地催化RNA水解中帮助RNA酶H。因此,通过在存在天然和S-和Se-核碱基修饰的DNA的情况下的RNA酶H进行RNA水解(图1B和图5E)。测量在存在天然(DNA-N)和修饰的DNA的情况下的相对反应速率。与此假设一致,RNA裂解中的Se-DNA引导物(DNA-Se)比对应天然DNA有效得多(快6.2倍),同时S-DNA(DNA-S)比天然形式有效1.6倍。实验结果指示经由单原子核碱基修饰的细微构形改变可将易裂开的磷酸盐

推向酶活性位点,进而显著加快RNA裂解。

[0134] 除非另外规定,否则本文中所用的所有技术和科学术语具有与所公开的本发明所属领域的技术人员通常所了解相同的含义。本文中所引用的公开案和其所针对引用的材料专门以引用的方式并入。

[0135] 所属领域的技术人员顶多使用常规实验即可识别或能够确定本文中所述的本发明的特定实施例的许多等效物。此类等效物意图由以下权利要求书涵盖。

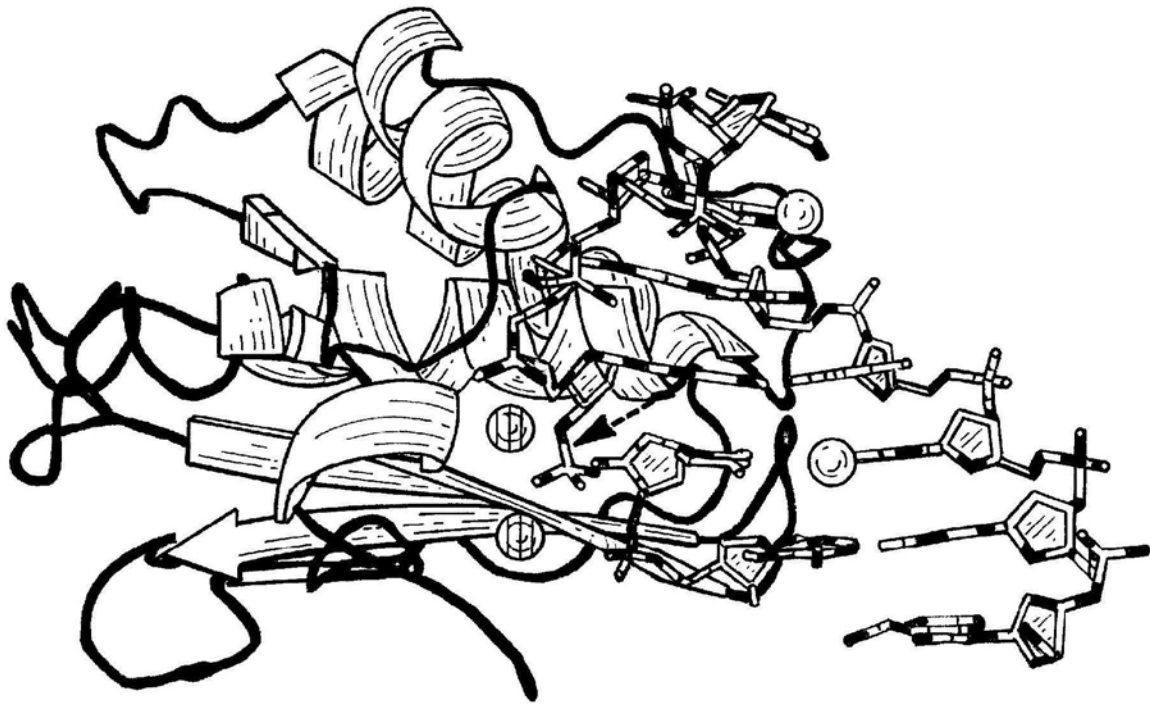


图1A

RNA-N: 3'-ACpAGCU-5'
 DNA-N: 5'-ATG-TCGp-3'

裂解位点

6 5 ↓ 4 3 2 1
 RNA-N: 3'-A-C-p-AGCU-5'
 DNA-Se: 5'-AT-^{Se}G--TCGp-3'
 1 2 3 4 5 6

DNA-S: 5'-AT-^SG---TCGp-3'

RNA-S1: 3'-AC-Sp-AGCU-5'
 RNA-S2: 3'-AC-Rp-AGCU-5'

图1B

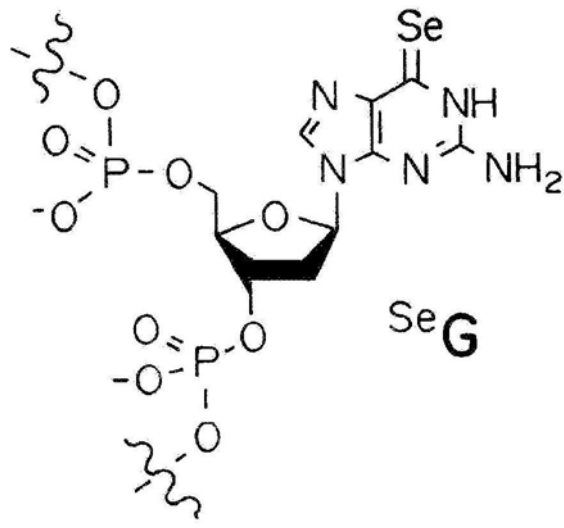


图1C

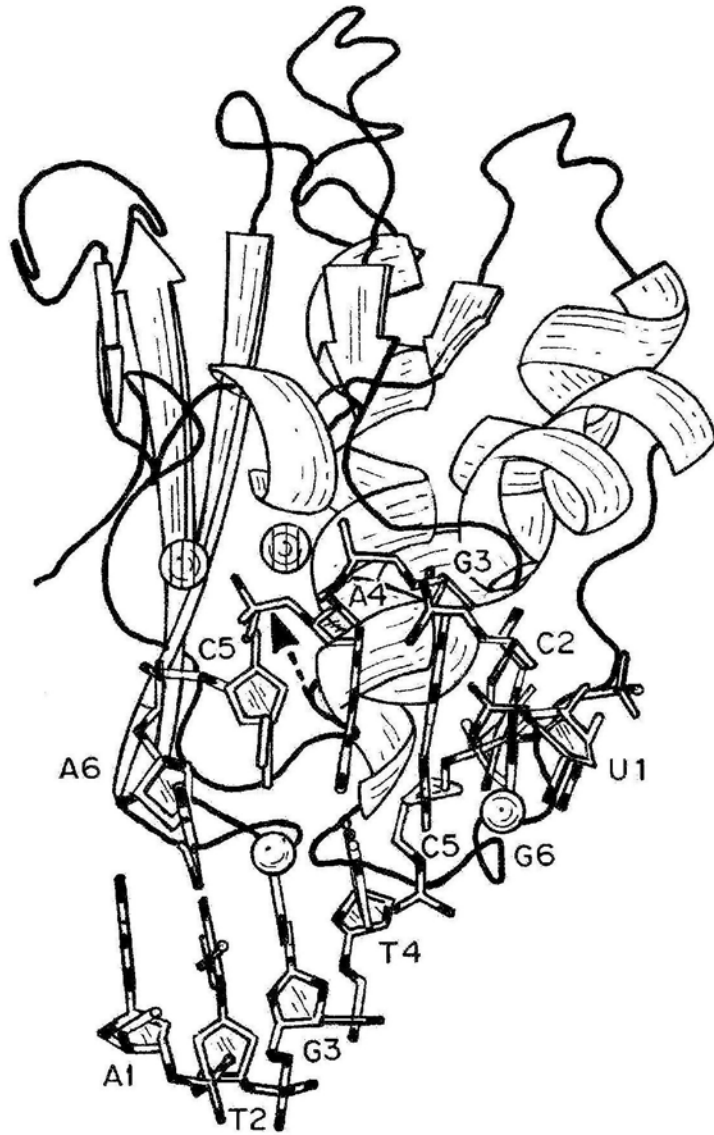


图2A

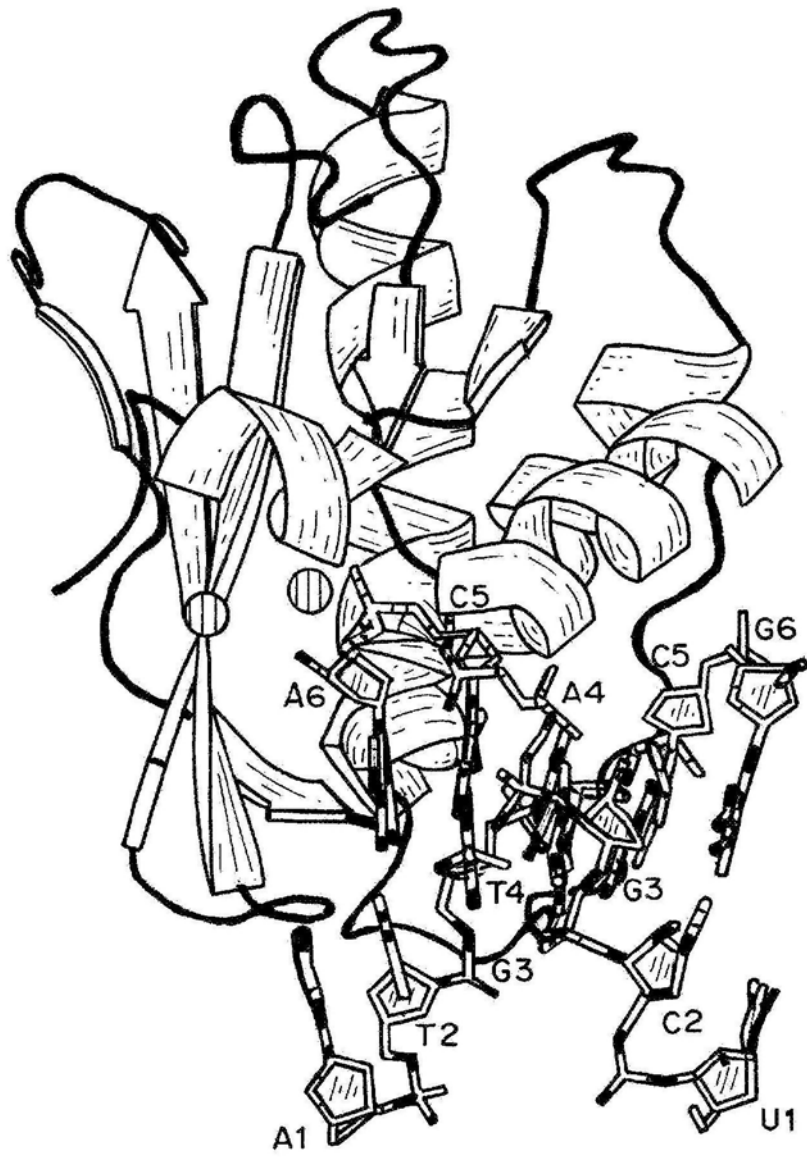


图2B

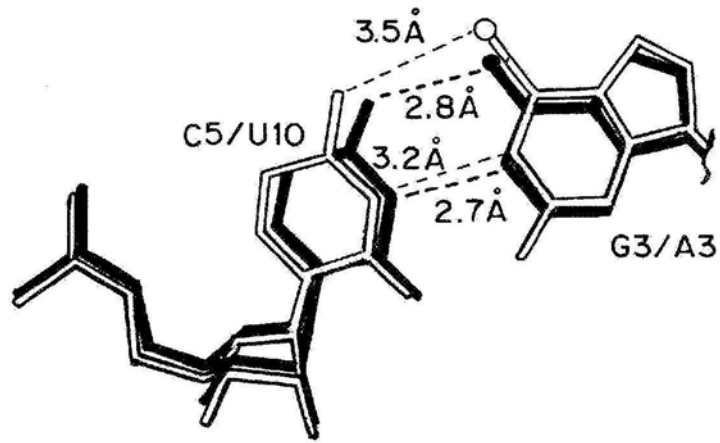


图3A

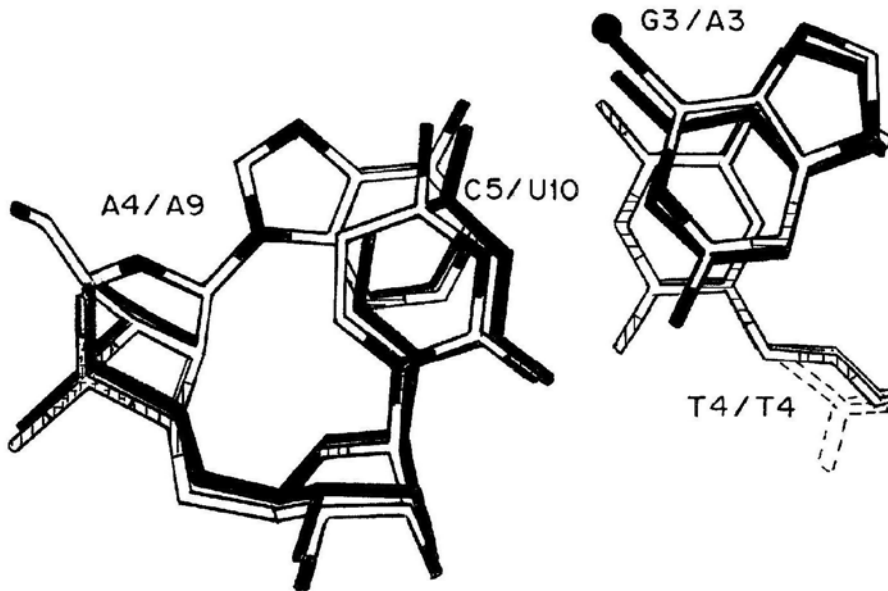


图3B

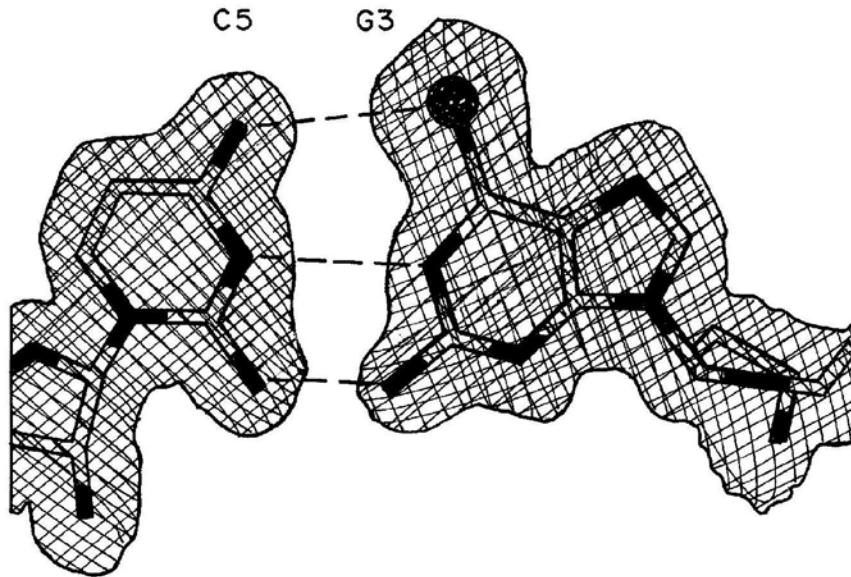


图3C

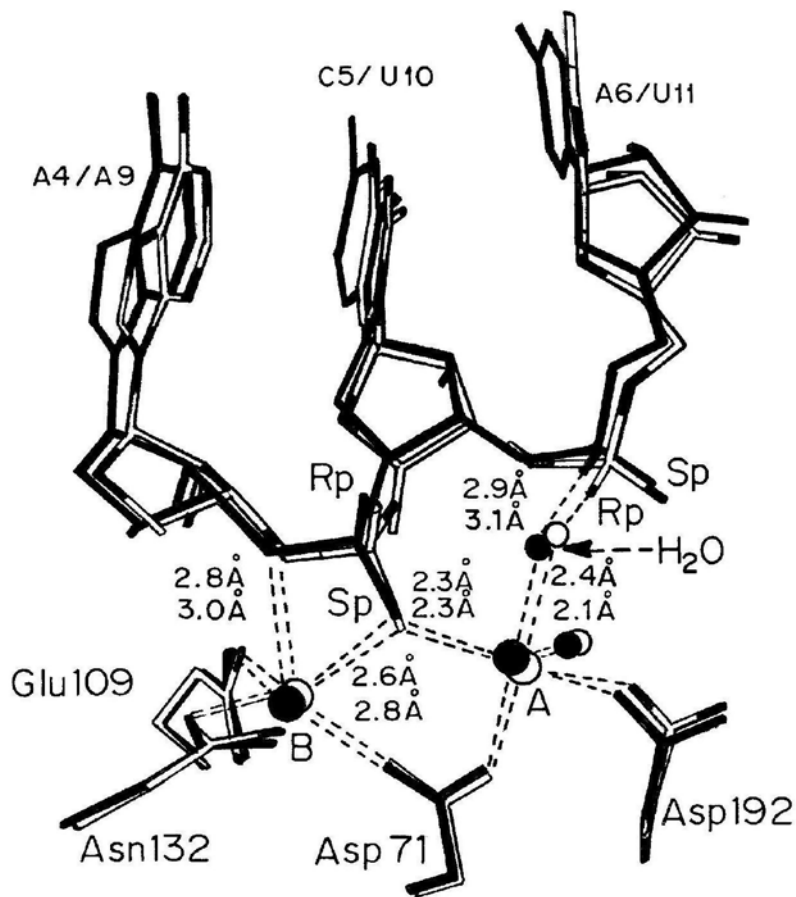


图4A

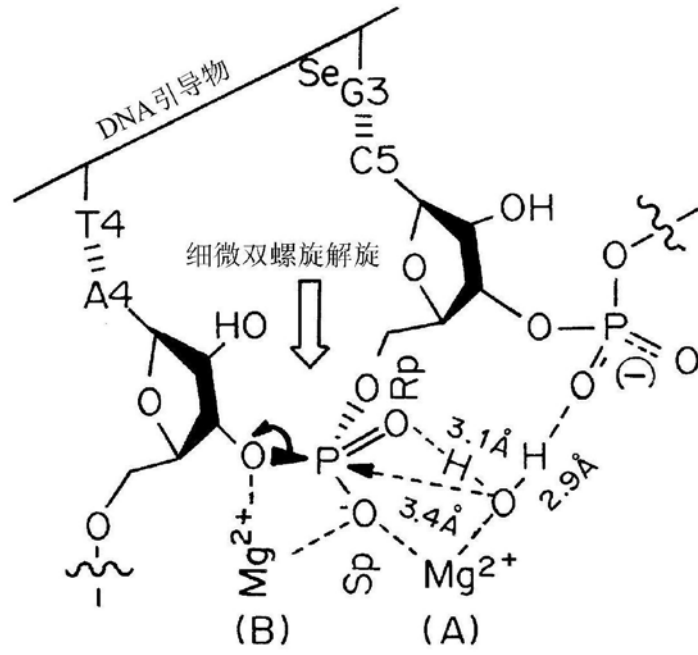


图4B

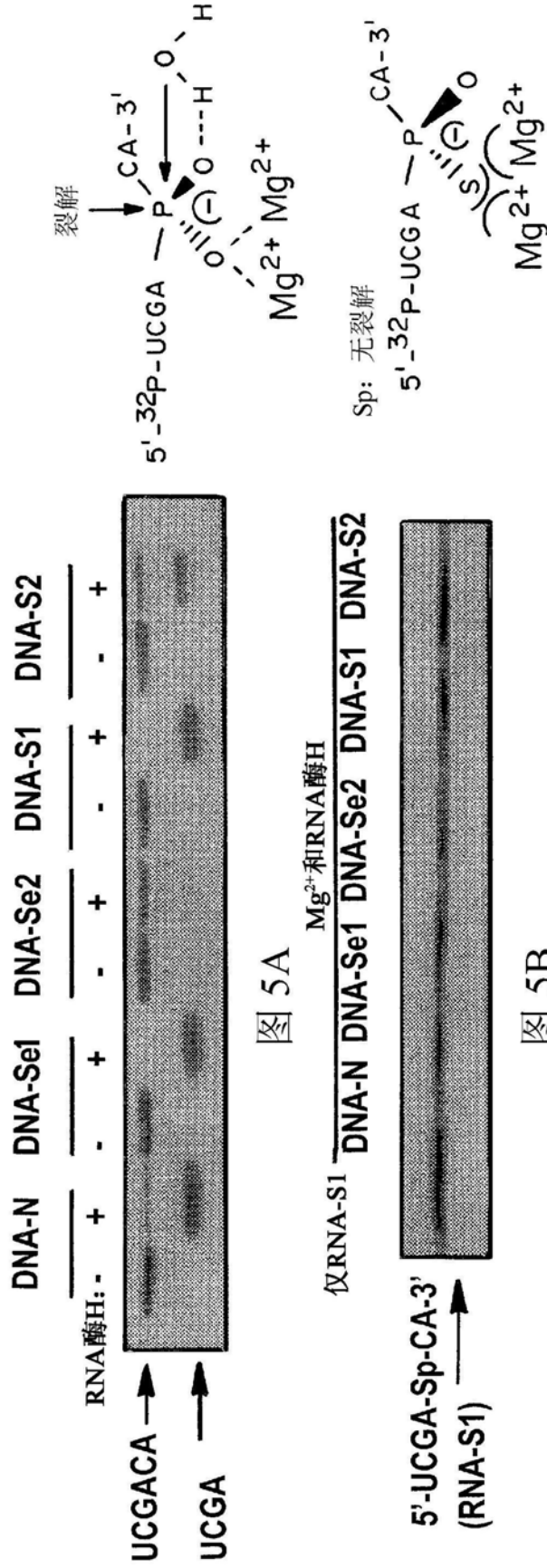


图 5A

Mg²⁺和RNAseH

仅RNA-S1 DNA-N DNA-Se1 DNA-Se2 DNA-S1 DNA-S2

图 5B

5'-UCGA-Sp-CA-3' →
(RNA-S1)

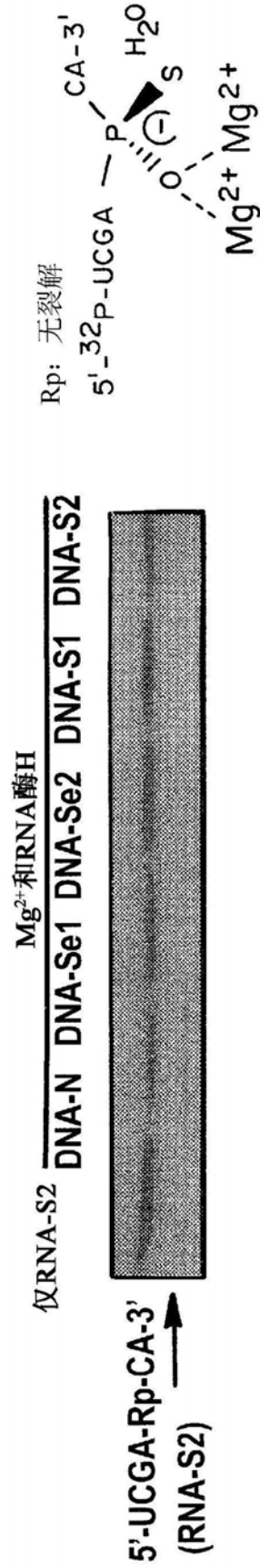


图5C

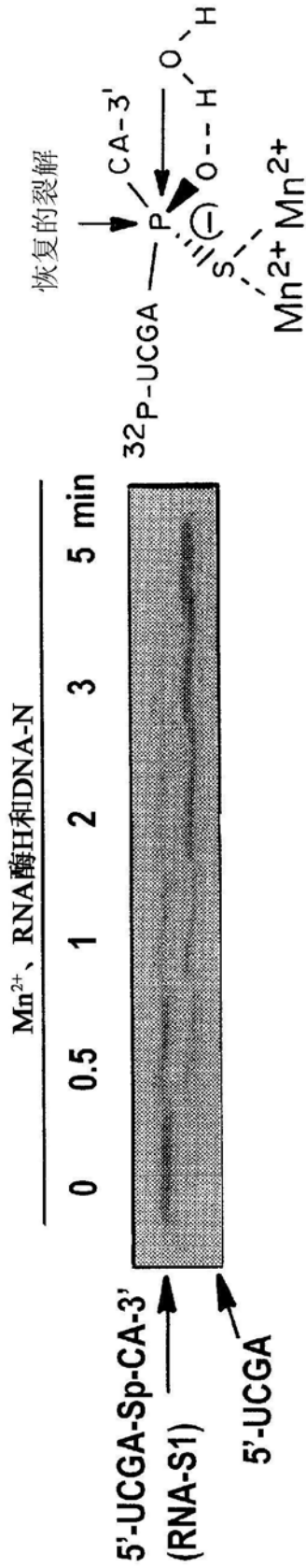


图5D

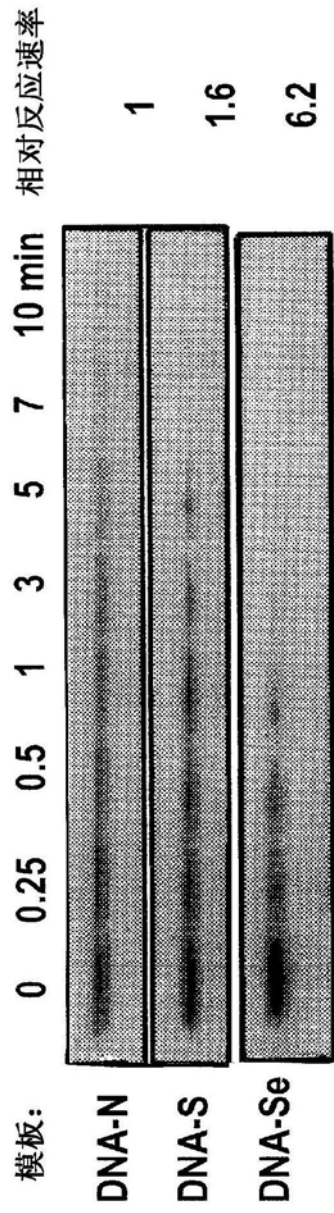


图5E