



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103060282 A

(43) 申请公布日 2013. 04. 24

(21) 申请号 201210582990. 5

(22) 申请日 2013. 02. 25

(71) 申请人 威海东宝制药有限公司

地址 264200 山东省威海市高新技术产业开  
发区火炬四街 7 号

(72) 发明人 赵艳 高丹丹

(74) 专利代理机构 威海科星专利事务所 37202

代理人 鲍光明

(51) Int. Cl.

C12N 9/08 (2006. 01)

C12Q 1/28 (2006. 01)

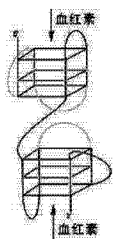
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

DNA 过氧化物酶及其制备方法、用途

(57) 摘要

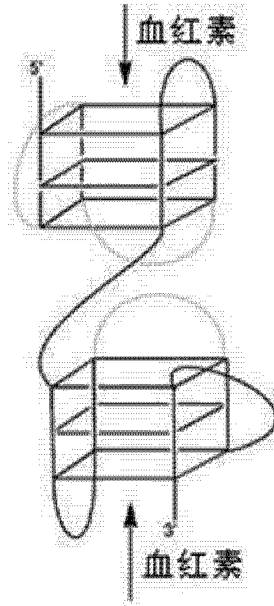
本发明涉及一种酶学领域, 具体地说是一种 DNA 过氧化物酶, 其分子结构如下述通式 ( I ):



( I ), 本发明二重复单元 DNAG- 四链

体- 血红素 DNA 过氧化物酶具有更高的催化活性, 从而在检测中可以扩大反应信号, 提高检测灵敏度, 降低最低检测下限的范围, 可以实现多重复单元 DNAG- 四链体稳定剂类抗癌药物的大批量筛选及高灵敏度的分析检测不同类型的靶分子, 利用二重复单元 DNAG- 四链体- 血红素 DNA 过氧化物酶比较出了不同配体与二重复单元 DNAG- 四链体的结合能力。

1. 一种 DNA 过氧化物酶,其特征是:其分子结构如下述通式 ( I ):



( I )。

2. 一种制备权利要求 1 所述 DNA 过氧化物酶的方法,其特征是包括下列步骤:

(1) 试剂和缓冲液

血红素溶解于二甲基亚砜中制备成血红素溶液,2 ~ 8℃保存;

用去离子水配制氯化钾溶液;

用去离子水配制 PH 值为 7.0 ~ 8.0 Tris-HCl 缓冲液;

(2) T8 DNA 的预处理

固体样品 T8 DNA 在 4 °C 经离心机以 12000 r·min<sup>-1</sup> 高速离心 5 ~ 10 min,并在 - 20 °C 保存,使用前用去离子水配制成 T8 DNA 溶液,4 °C 保存,3 天内使用;

(3) 二重复单元 DNA G- 四链体的制备

取步骤(2)配制的 T8 DNA 溶液放入到 5ml 离心管中,加入步骤(1)配制的氯化钾溶液、Tris-HCl 缓冲溶液,使 T8 DNA 处于含 KCl 浓度 100mM、含 Tris-HCl 浓度 25mM、pH 值为 7.0 ~ 8.0 的溶液中,混均,在 90 °C 水浴锅中加热 5 ~ 10min,缓慢冷却至室温;

(4) 二重复单元 DNA G- 四链体 - 血红素 DNA 过氧化物酶的制备

在步骤(3)的离心管中加入步骤(1)配制的血红素溶液,轻轻摇晃使其混均,静置 2 ~ 3h。

3. 一种如权利要求 1 所述 DNA 过氧化物酶,其特征是:作为大批量筛选多重复单元 DNA G- 四链体稳定剂类抗癌药物及高灵敏度的分析检测不同类型靶分子的应用。

## DNA 过氧化物酶及其制备方法、用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及酶学领域,具体地说是一种二重复单元 DNA G-四链体-血红素 DNA 过氧化物酶及其制备方法、用途。

### 背景技术

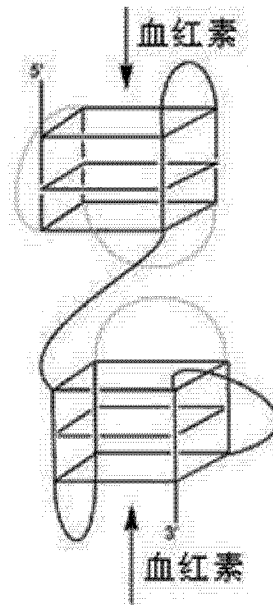
[0002] 众所周知,酶是具有催化功能的生物大分子,它的特点是具有高度的专一性和很高催化活性。过去人们以为酶只能由蛋白质组成,但 1981 年 T. R. Cech 等发现了核酸也具有催化反应的能力,提出了核酶的概念。1994 年 R. R. Breaker 证明了 DNA 也具有酶的活性。1996 年 Dipankar Sen 课题组发现了 DNA 过氧化物酶,它不仅能够催化核酸链上的反应,还能像普通催化剂那样参与催化氧化反应。目前发现了各种各样的 DNA 过氧化物酶具有不同的催化活性。DNA 过氧化物酶能够氧化显色底物发生颜色的变化,在分析检测不同类型的靶分子中表现出十分优良的特性。首先,与蛋白质构成的酶相比,DNA 过氧化物酶稳定性更高,而且 DNA 的合成与纯化过程远比蛋白质容易得多,最重要的是在操作过程中不容易失活;其次,DNA 过氧化物酶的获得比较方便,只需将 DNA 片段在适当的条件下与 Hemin(血红素)混匀即可。

[0003] 随着对 DNA 过氧化物酶深入研究,人们发现能形成 G-四链体的核酸序列就有可能存在 DNA 过氧化物酶活性。2009 年 Chengde Mao 课题组发现很多物种的端粒 DNA 序列与 Hemin 结合后可以具有 DNA 过氧化物酶的活性,其中也包括了能够形成 G-四链体的人类端粒 DNA (TTAGGG)<sub>n</sub> 序列。首先 DNA G-四链体-Hemin DNA 过氧化物酶能够催化 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化 ABTS<sup>2-</sup> 生成绿色 ABTS<sup>·-</sup>,可作为一种新型的颜色反应标签应用于检测之中。其次 DNA G-四链体-Hemin DNA 过氧化物酶具有酶的活性,能够放大反应信号,从而提高检测的灵敏度。研究表明 85% 以上的肿瘤细胞中端粒酶表达呈阳性,而正常细胞中几乎检测不到端粒酶,这说明端粒酶与细胞的恶性转化及维持分裂增殖具有密切的关系。端粒 DNA G-四链体结构的形成能够有效地抑制端粒酶的活性,因而靶向端粒 DNA G-四链体并使其稳定的配体成为抗癌药物研究的新方向。在 G-四链体稳定剂类抗癌药物的开发过程中,建立一种既简便又快速的药物大批量筛选方法是必不可少的。G-四链体可以与 Hemin 结合而显示出较强的酶活性,并且文献报道,Hemin 主要作用于 G-四链体末端的 G-四分体上;G-四链体稳定剂也需要与 G-四链体结合而对该结构起到稳定作用,若两者在 G-四链体的结合位点相同或相接近,G-四链体稳定剂与 G-四链体结合有可能有效的阻碍 Hemin 与 G-四链体结合,导致体系中酶的催化活性降低,并且文献报道,G-四链体稳定剂也主要堆积在 G-四链体末端的 G-四分体上。利用体系中信号强度随时间的变化关系,比较不同药物与 G-四链体的作用能力,可实现 G-四链体稳定剂类抗癌药物的大批量筛选。但过去研究的都是单体 DNA G-四链体稳定剂,这些单体 DNA G-四链体一般由 21-26 个碱基组成,然而 3' 末端单链人类端粒 DNA 实际上由 100-200 碱基组成,很多研究表明其能够形成连续的多重复单元 DNA G-四链体。

## 发明内容

[0004] 本发明的目的就是为了克服上述现有的技术不足,提供一种二重复单元DNA G-四链体-血红素 DNA 过氧化物酶,具有更高的催化活性,从而在检测中可以扩大反应信号,提高检测灵敏度,降低最低检测下限的范围,可以实现多重复单元DNA G-四链体稳定剂类抗癌药物的大批量筛选及高灵敏度的分析检测不同类型的靶分子,利用二重复单元DNA G-四链体-Hemin DNA 过氧化物酶比较出了不同配体与二重复单元DNA G-四链体的结合能力。

[0005] 本发明解决上述技术问题采用的技术方案是:一种DNA过氧化物酶,其特征是:其分子结构如下述通式(I):



(I)

制备前述DNA过氧化物酶的方法,其特征是包括下列步骤:

### (1) 试剂和缓冲液

血红素溶解于二甲基亚砜中制备成血红素溶液,2~8℃保存;

用去离子水配制氯化钾溶液;

用去离子水配制PH值为7.0~8.0Tris-HCl缓冲液;

### (2) T8 DNA的预处理

固体样品T8 DNA在4℃经离心机以12000 r·min<sup>-1</sup>高速离心5~10min,并在-20℃保存,使用前用去离子水配制成T8 DNA溶液,4℃保存,3天内使用;

### (3) 二重复单元DNA G-四链体的制备

取步骤(2)配制的T8 DNA溶液放入到5ml离心管中,加入步骤(1)配制的氯化钾溶液、Tris-HCl缓冲溶液,使T8 DNA处于含KCl浓度100mM、含Tris-HCl浓度25mM、pH值为7.0~8.0的溶液中,混均,在90℃水浴锅中加热5~10min,缓慢冷却至室温;

### (4) DNA过氧化物酶的制备

在步骤(3)的离心管中加入步骤(1)配制的血红素溶液,轻轻摇晃使其混均,静置2~3h。

[0006] 前述DNA过氧化物酶,作为大批量筛选多重复单元DNA G-四链体稳定剂类抗癌药物及高灵敏度的分析检测不同类型靶分子的应用。

[0007] 本发明的有益效果是：二重复单元 DNA G-四链体-血红素 DNA 过氧化物酶具有更高的催化活性，从而在检测中可以扩大反应信号，提高检测灵敏度，降低最低检测下限的范围，可以实现多重复单元 DNA G-四链体稳定剂类抗癌药物的大批量筛选及高灵敏度的分析检测不同类型的靶分子，利用二重复单元 DNA G-四链体-血红素 DNA 过氧化物酶比较出了不同配体与二重复单元 DNA G-四链体的结合能力。

[0008] 下面结合附图和实施例对本发明进一步说明。

[0009] 图 1 为单体 DNA G-四链体和二重复单元 DNA G-四链体的 CD 光谱图。

[0010] 图 2 为单体 DNA G-四链体和二重复单元 DNA G-四链体对血红素催化活性影响的紫外光谱图。

[0011] 图 3 三种化合物分别对二重复单元 DNA G-四链体-血红素 DNA 过氧化物酶催化活性影响，即比较三种化合物与二重复单元 DNA G-四链体的结合能力。

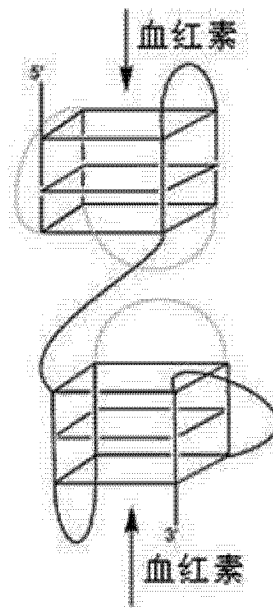
[0012]

### 具体实施方式

[0013] 下面结合实施例对本发明作进一步的描述：

实施例 1：

本实施例二重复单元 DNA G-四链体-血红素 DNA 过氧化物酶的分子结构如下述通式 (I)：



(I)

二重复单元 DNA G-四链体-血红素 DNA 过氧化物酶的制备，其具体过程和步骤如下：

(1) 试剂和缓冲液

0.652mg 血红素溶解于 10ml 二甲基亚砷中制备成浓度 100uM 的溶液，2 ~ 8°C 保存，1 个星期内使用。

[0014] 0.745g 氯化钾，用去离子水配制成浓度 1M 的氯化钾溶液。

[0015] 0.3785g 的 Tris (三羟甲基氨基甲烷)溶解于 20ml 的双蒸水中，待充分溶解后，加入浓盐酸调节 pH 值至 7.0 ~ 8.0，用去离子水定容至 25ml 配制成 Tris-HCl 浓度 125mM 的

缓冲液。

[0016] (2) T8 DNA (5' - (TTAGGG)<sub>8</sub> TT-3')的预处理

固体样品 T8 DNA 在 4℃经离心机以 12000 r·min<sup>-1</sup> 高速离心 8min,以避免打开离心管时 DNA 飞出,影响 DNA 的浓度,向离心后的 T8 DNA 样品中加入去离子水配制成 T8 DNA 浓度 100uM 的 T8 DNA 溶液并保存在 4℃冷柜里,三天内使用。

[0017] (3) 二重复单元 DNA G- 四链体的制备

在 5 ml 的离心管中分别加入 0.6mL 的浓度 125 mM 的 Tris-HCl 缓冲溶液(pH 7.0 ~ 8.0),0.3mL 浓度 1M 的氯化钾溶液及 6uL 浓度 100uM 的 T8 DNA 溶液,混均,在 90 °C 水浴锅中加热 5 ~ 10min,缓慢冷却至室温,在室温中培养 12 ~ 18 小时。

[0018] 阳性对照 :T4 DNA (5' - (TTAGGG)<sub>4</sub>TT-3')形成的单体 DNA G- 四链体。

[0019] (4) 二重复单元 DNA G- 四链体 - 血红素 DNA 过氧化物酶的制备

在步骤(3)中的 EP 管中加入 12uL 浓度 100uM 的血红素,轻轻摇晃混均(不可超声混均),放置 3h。

[0020] 阳性对照 :单体 DNA G- 四链体 - 血红素 DNA 过氧化物酶。

[0021] 该二重复单元 DNA G- 四链体 - 血红素 DNA 过氧化物酶对血红素催化活性的增强幅度大约是单体 DNA G- 四链体 - 血红素 DNA 过氧化物酶的二倍。

[0022] 二重复单元 DNA G- 四链体 - 血红素 DNA 过氧化物酶应用于药物传感器设计,比较四甲基代二氨基三苯甲基盐酸盐(MG)、槲皮素、木犀草素三种不同配体与二重复单元 DNA G- 四链体作用的能力大小,其操作方法如下:

(1) 0.60mg 槲皮素、0.57mg 木犀草素溶于 10ml 甲醇中制备成 200uM 的溶液,3.6mg MG 溶于 100ml 去离子水中制备成 100uM 的溶液,4 °C 保存,并在 1 个月内使用。ABTS 二铵盐,-20 °C 保存,使用前用去离子水配制成 100mM 的溶液。过氧化氢溶液,4℃保存,使用前用去离子水配制成 1M 的储存液。

[0023] (2) 按实施例 1 中的步骤制备二重复单元 DNA G- 四链体 - 血红素 DNA 过氧化物酶。

[0024] (3) 在 4 个装有等摩尔量的二重复单元 DNA G- 四链体 - 血红素 DNA 过氧化物酶的离心管中分别加入 4 倍 DNA 浓度的配体溶液,放置 3h,以使配体与 DNA 过氧化物酶充分反应,三种化合物分别对 DNA 过氧化物酶催化活性的影响如表 1-1。

[0025] 表 1-1 三种化合物分别对 DNA 过氧化物酶催化活性的影响

配体	时间 (t)					
	5s	10s	15s	20s	25s	30s
空白	0.026	0.081	0.176	0.218	0.298	0.367
MG	0.083	0.126	0.135	0.152	0.164	0.176
槲皮素	0.058	0.108	0.143	0.176	0.232	0.258
木犀草素	0.035	0.075	0.149	0.198	0.276	0.345

在室温下,用酶标仪检测每个离心管中二重复单元 DNA G-四链体-血红素 DNA 过氧化物酶催化 ABTS (2,2-连氨基-双-(3-乙基苯并二氢噻唑啉-6-磺酸)二铵盐)的活力。在每个样品测试前加入新鲜配制 60 $\mu$ L 浓度 100mM 的 ABTS 并混均,取 6 $\mu$ L 浓度 1M 的过氧化氢溶液滴在酶标仪样品板的中心,然后加入含有 ABTS 的溶液,波长设置在 421nm,检测时间范围为 0 ~ 30s。

[0026] 分析图 1 的 CD 光谱图可见, T4 DNA 在波长大约 295nm 处有一个正峰, 265nm 处有一个肩峰, 240nm 处有一个负峰, 这显示了杂 2 型单体 DNA G-四链体的特征。 T8 DNA 大约 290nm 处有一个正峰, 250nm 处有一个小的肩峰, 268nm 处有一个大的肩峰, 240nm 处有一个负峰, 并且特征峰的强度与连续 2 个 G-四链体单元的峰强度之和一致, 这显示了混合型(杂 1 型和杂 2 型)二重复单元 DNA G-四链体的特征。

[0027] 分析图 2 的紫外光谱图可见, 在 Hemin (血红素) 中加入单体 DNA G-四链体, 血红素的催化活性明显增强, 而在血红素中加入二重复单元 DNA G-四链体, 血红素的催化活性增强幅度更加明显, 对血红素催化活性的增强幅度大约是单体 DNA G-四链体的 2 倍, 证明了二重复单元 DNA G-四链体-Hemin DNA 过氧化物酶极高的催化活性。

[0028] 分析图 3 可见, 分别加入四甲基代二氨基三苯甲基盐酸盐(MG)、槲皮素、木犀草素三种化合物 30 秒后, 二重复单元 DNA G-四链体-Hemin(血红素)DNA 过氧化物酶的催化活性均降低, 其中活性降低幅度最大的是 MG, 其次是槲皮素, 这说明 MG 与二重复单元 DNA G-四链体结合能力最强, 三种化合物与二重复单元 DNA G-四链体结合能力的大小为 MG > 槲皮素 > 木犀草素。

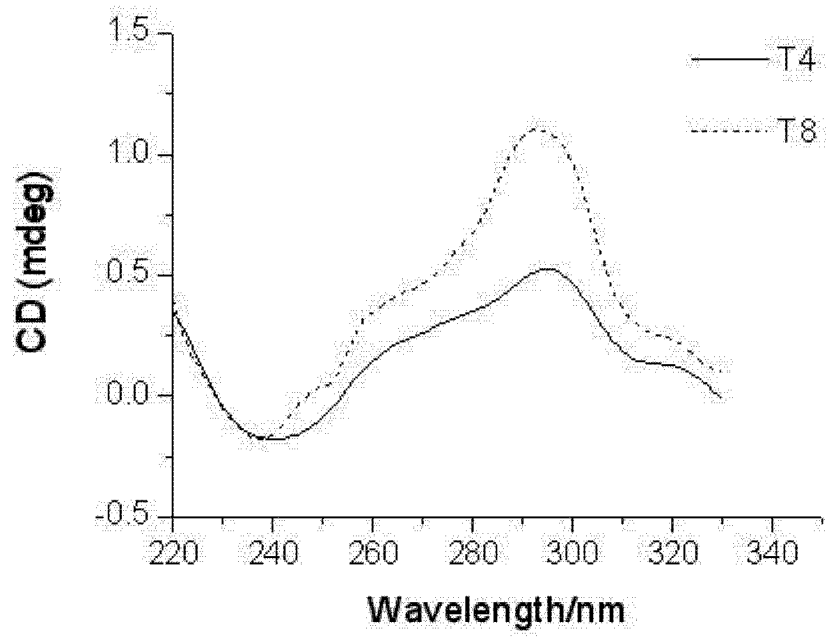


图 1

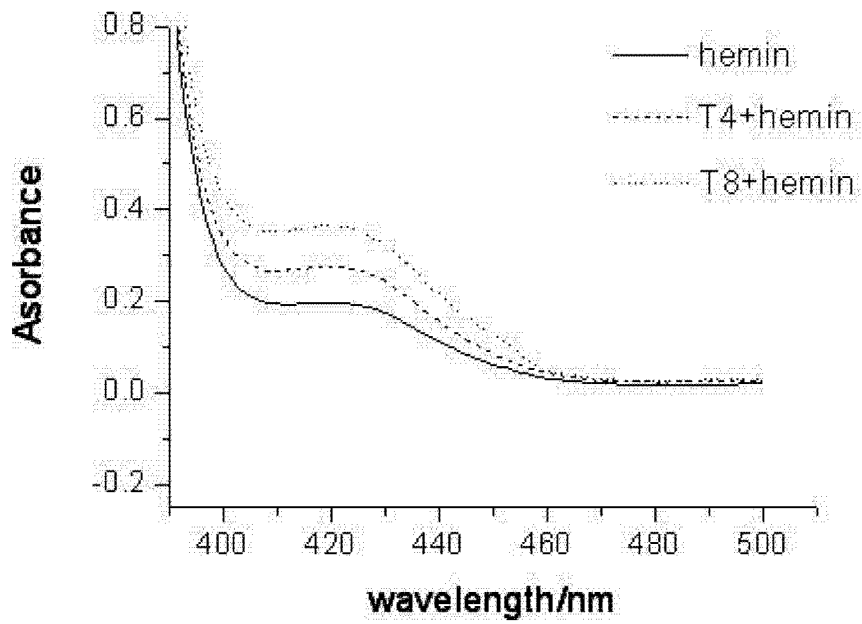


图 2



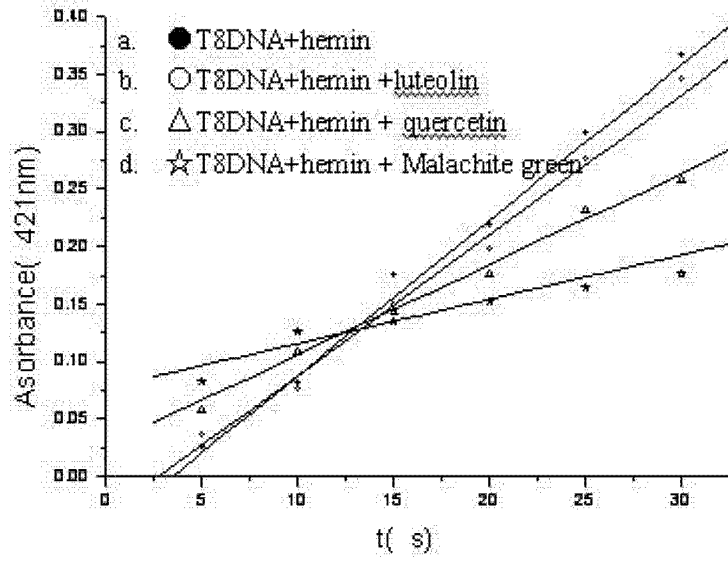


图 3