

偶氮苯修饰的 DNA 对引物延伸的光调控*

季禾茗¹,孔德佳³,莫蒙武²,雷华军³,陈露¹,赵瑞琪²,王威²,何裕建²,
封禄田^{1†},吴丽^{2†}

(1 沈阳化工大学应用化学学院, 沈阳 110142; 2 中国科学院大学化学科学学院, 北京 100049; 3 江西科技师范大学药学院, 南昌 330013)
(2017年11月17日收稿; 2018年3月6日收修改稿)

Ji H M, Kong D J, Mo M W, et al. Photoregulating primer extension using azobenzene linked DNA template [J].
Journal of University of Chinese Academy of Sciences, 2019, 36(1): 38-47.

摘要 研究偶氮苯单元修饰在核酸上控制引物延伸的行为。系统地筛选5、6、7和8个碱基的保护链通过4,4'-二羟甲基偶氮苯连接的25 mer DNA模板,并研究其在紫外光照前后调控的引物延伸效率。结果表明,具有7个保护碱基的C3对Pri.15和6个碱基短链的C2对Pri.17都具有较好的光调控延伸效果。其中C3,在Vent酶作用下紫外光照后引物延伸效率增加1倍以上。而C2,尽管紫外光照前增加了引物延伸的背景,在Vent酶催化下紫外光照射后的延伸产率达到91.4%,比紫外光照前增加84%。本工作为分子水平上研究基因功能、基因表达网络以及疾病的发生和发展提供了一种新的策略和研究手段。

关键词 核酸;偶氮苯;光调控;引物延伸

中图分类号:Q75 文献标志码:A doi:10.7523/j.issn.2095-6134.2019.01.007

Photoregulating primer extension using azobenzene linked DNA template

Ji Heming¹, KONG Dejia³, MO Mengwu², LEI Hua jun³, CHEN Lu¹, ZHAO Ruiqi²,
WANG Wei², HE Yujian², FENG Lutian¹, WU Li²

(1 College of Applied Chemistry, Shenyang University of Chemical Technology, Shenyang 110142, China;

2 College of Chemical Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

3 College of Pharmacy, Jiangxi Science and Technology Normal University, Nanchang 330013, China)

Abstract It has been a hot topic in recent years to carry out a series of life activities by artificial reversible manipulation of specific gene expression. In this work, the photocontrol of primer extension directed by azobenzene modified DNA templates was investigated. DNA templates attached by protective ODNs with 5, 6, 7, and 8 complementary bases through 4,4'-bis(hydroxymethyl) azobenzene were systematically evaluated in photoregulation of the primer extension without or with UV irradiation. The results showed high efficiencies of C3 with 7 protected bases and C2 with 6-base short chains for photoregulating Pri.15 and Pri.17, respectively. Especially, for C3, when catalyzed

* 国家自然科学基金(21778054, 51772289)、国家重点研究发展计划(2016YFF0203703)、校部青年教师科研启动基金(Y55103HY00)、中国科学院大学大学生创新实践训练计划(118900EA12)、北京大学天然药物及仿生药物国家重点实验室开放课题(K20150204)资助
† 通信作者, E-mail: fenglutian@126.com; wuli@ucas.ac.cn

by Vent DNA polymerase, primer extension efficiency had one-fold increase upon UV irradiation. Similarly, for C2, the extension efficiency reached 91.4% with UV irradiation and achieved 84% increase, compared to that without UV irradiation, although the background of primer extension in the dark was a little high. This work provides a new strategy or means for studying the gene function and gene expression network and for exploring the occurrence and development of disease at the molecular level.

Keywords nucleic acid; azobenzene; photoregulation; primer extension

人工操纵特定的生命过程或基因功能一直是生命科学的前沿研究方向^[1-3]。以往报道是利用小分子抑制剂来抑制特定酶的活性从而调控生命过程,即在生命体中引入外源小分子,但外源小分子在一进入生命体后就会立即开始发挥作用,因此很难在时间和空间上实现选择性调控^[4]。近些年来,科研工作者曾尝试多种方法以实现生命过程的多维度调控,例如改变温度、改变 pH、改变电场、施加磁场、给予光照等。与传统的体外刺激相比,光作为刺激手段具有独特的优势^[5]。首先光是一种清洁的、非入侵式的体外刺激,已广泛应用于生物医学领域的光学照明和荧光成像。其次,光可以精确地从时间和空间上进行宏观调控,在光敏物质抵达特定位置后,通过特定波长的光照控制药物的释放。最后,光控释放的效率较高,特定波长的光可激发某些功能基团并发生各种光化学反应(化学键的断裂和异构化等)。

使用光反应变色分子调控生物过程具有极好的发展潜力,在化学生物学、药物研究和医学具有深远的意义。我们和其他研究组曾使用光笼的化合物修饰的核酸,实现生物体内基因表达的光控制^[6-9]。但是这种方法只能单次地增加或降低核酸的活性,不能可逆地控制核酸的功能。偶氮苯是光异构化分子的典型代表^[10-11],化学结构稳定,光照后异构化迅速。母体的反式构型(trans)几乎是平面结构且热力学相对稳定,紫外光(UV < 366 nm)照后形成稳定性较低的具有弯曲构象的顺式形态(cis),而在可见光(>400 nm)光照刺激下又可实现 cis 构象向 trans 构象的转变^[12-14]。基于这一特性,偶氮苯类化合物近年来被广泛地应用在各种材料领域,例如,光控 DNA 自组装^[15-16]、光制动纳米机械^[17]、纳米药物输送材料^[18]等。

近年来,随着偶氮类化合物光控 DNA 动力学的基础研究得到迅速的发展^[19-21],进一步增加了人们使用这一工具调控功能生物大分子(核酸和蛋白质)的信心^[22-23]。这种光响应分子通常被引入到核酸不

同的结构位置上,例如,磷酸骨架、碱基和核糖体部分等,改变核酸的结构和结合性能,从而将其应用于光开关 RNA 沉默、基因转录的可逆控制、适配体的可逆识别、核糖核酸酶的可逆控制等^[24-28]。

新颖的或改进的偶氮苯衍生物的设计对于核酸的化学修饰也是许多化学工作者争相研究的热点^[29-30]。在前期研究中,我们已经设计合成 4,4'-二羟甲基偶氮苯的发夹 DNA 开关,发现 4,4'-二羟甲基偶氮苯的光异构化使得发夹 DNA 的稳定性发生巨大改变($\Delta T_m = 24\text{ }^\circ\text{C}$)^[31-32],并将其置于反义核酸的两端形成哑铃型核酸,成功地光控制靶向 RNA 在 RNase H 酶作用的降解^[33]。从时间和空间上光控制复制^[34-36]、转录^[37-38]和翻译^[3, 33, 39-40]过程使得核酸工具分子的发展越来越引起人们的关注。这里,我们研究 DNA 引物延伸相关的聚合酶链反应的光调控。聚合酶链反应用于特定 DNA 序列的试管分离和指数扩增,引物和模板能否形成适当稳定的双链是反应的关键因素。如示意图 1,我们在 DNA 模板与引物的结合区通过 4,4'-二羟甲基偶氮苯的连接加入一段保护链,由于反式的偶氮苯与邻近的碱基对之间堆积作用, DNA 模板自身形成稳定的发夹结构而使得其与引物不能够互补结合,从而引物延伸不能发生。反之,通过紫外光照偶氮苯分子从反式转变为顺式,这种异构化作用所产生的扭转力使得 DNA 模板的保护链离去,从而 DNA 模板可以结合引物,在聚合酶的作用下能够使得引物延伸进行。对比骨架楔入型偶氮苯的设计^[34],通过偶氮苯共价键连接模板的保护链具有可逆性,并且单一位点的修饰不影响正常的生理活动。考虑到发夹 DNA 的模板与引物和茎短链之间存在结合的竞争,我们使用 25 mer 长度的 DNA 模板和不同长度的保护链组成的发夹 DNA,通过筛选发夹 DNA 的长度分别为 5、6、7 和 8 个碱基长度的保护链,以及长度为 12、15 和 17 mer 的引物,发现能够高效调控引物延伸的发夹 DNA 和引物组合,

为从时间和空间上动力学控制生理条件下生物活性分子提供非常有用的工具,也将为分子水平上

研究基因功能、基因表达网络以及疾病的发生和发展提供一种新的策略和研究手段。

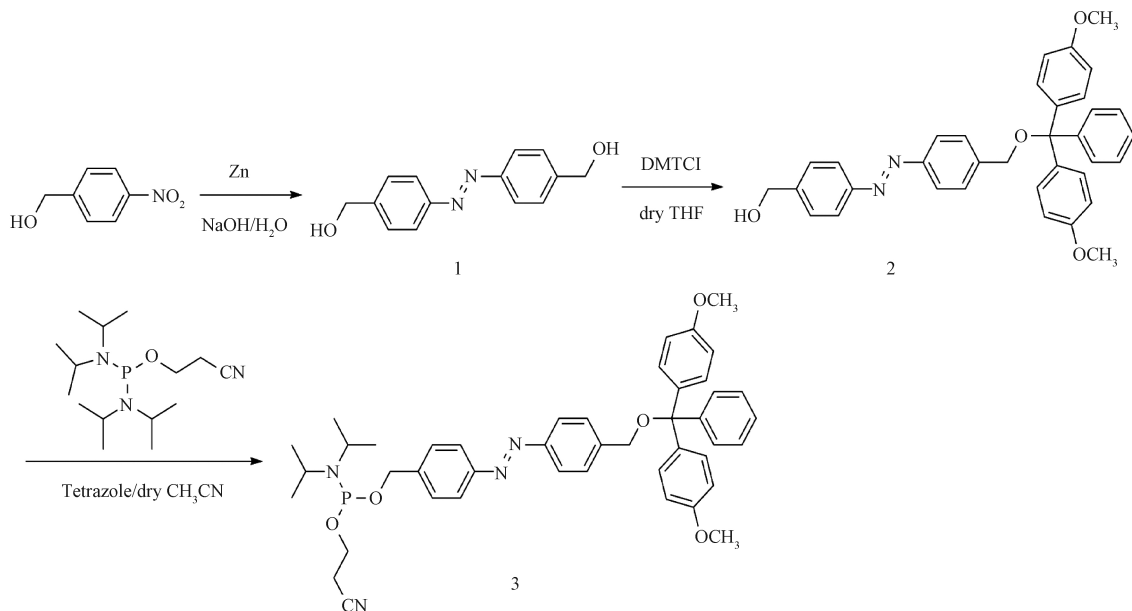


图 1 偶氮苯亚磷酰胺单体的合成

Fig.1 Synthetic procedure of azobenzene phosphoramidite

1 实验部分

1.1 材料与试剂

实验所用的药品是分析纯。所有溶液用超纯水配制。对硝基苯甲醇,4,4'-二甲氧基三苯基氯甲烷,四氮唑,双(二异丙基氨基)(2-氰基乙氧基)膦均购自偶合公司;锌粉,冰醋酸,四氢呋喃购自 Macklin 公司;色谱级乙腈购自阿拉丁公司;4种脱氧核苷购自芜湖华仁科技有限公司。引物订购自生工公司;DNA 聚合酶订购自 NEB。

1.2 主要仪器设备

仪器使用 AVANCE 的 III 型 400 M 核磁共振仪;Applied Biosystems 的 ABI 394 型 DNA 合成仪;安捷伦 1260 高效液相色谱系统;岛津 UV1800 紫外分光光度计和 BIO-RAD 的 ChemiDoc XRS 高灵敏化学发光成像系统。

1.3 偶氮苯衍生物的合成

1.3.1 合成 4,4'-二羟甲基偶氮苯

参考前期的工作^[31]。称取 6.0 g(26 mmol)对硝基苯甲醇,配制并加入 70 mL(5.7 mol/L)的氢氧化钠水溶液,升温至 100 °C,再缓慢投入 7.0 g(100 mmol)锌粉,回流搅拌 1 h,过滤得到橙色滤渣。再用甲醇溶解滤渣,在空气下加热至回流反应 8 h。最后用旋转蒸发器除去甲醇,得到

3.4 g 橙色固体,收率为 56.6%。

1.3.2 合成 4-羟甲基-4'-羟甲基-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-偶氮苯

称取 4,4'-二羟甲基偶氮苯 1.5 g(6.5 mmol)溶解在 40 mL 无水四氢呋喃中,分 3 批次,按每次投料间隔 3 h 的方法共加入 4,4'-二甲氧基三苯基氯甲烷(DMT-Cl) 2.1 g(6.5 mmol),反应全程通氮气保护,TLC 板监测进程。最后得到原料,DMT 一取代,DMT 二取代的混合粗产品。湿法上样过柱层析分离,最后得到 4-羟甲基-4'-羟甲基-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-偶氮苯 2.0 g,收率为 55.5%。

1.3.3 合成 4-羟甲基-(β-氰乙基-N,N'-二异丙基亚磷酰胺)-4'-羟甲基-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-偶氮苯

称取上一步得到的产物 0.160 g(0.290 mmol),加入四氮唑 0.021 g(0.30 mmol),干燥过夜。抽真空后氮气保护,加入磷试剂 0.120 g,最后用针筒打入 2 mL 重蒸后的乙腈使产物的浓度为 0.15 mmol/mL 左右,随后冰浴下搅拌反应 30 min,TLC 板监测,反应完成后,用 0.22 μm 有机系滤膜过滤,待下一步 DNA 合成使用。

1.4 偶氮苯衍生物修饰 DNA 的固相合成

用 DNA 固相合成仪按照常规合成的方法经

过脱 DMT、ETT 活化、偶联、盖帽、氧化的步骤将 DNA 核苷亚磷酸胺单体由 3' 端向 5' 端连接到固相。其中普通 DNA 单体的偶联时间为 120 s, 偶氮苯衍生物单体的偶联时间增加到 600 s。直到所有的亚磷酸胺单体依次偶联到 CPG 的寡聚核酸上, 即可得到目标序列的固相。

1.5 纯化偶氮苯衍生物修饰的 DNA

将得到的固相加入 1 mL 的浓氨水, 50 °C 下氨解 8 h 后离心, 取上清液浓缩后过滤, HPLC 提纯制备。液相色谱条件: 紫外检测波长 260 nm, 流动性 A 为 TEAA, B 为乙腈; 梯度洗脱程序: 0~40 min, 0~40% B; 40~45 min, 40%~100% B; 45~50 min, 100% B; 50~55 min, 100%~0 B; 55~60 min, 0 B; 流速 1.0 mL/min; 柱温: 40 °C。最后取得目标峰溶液加乙酸做脱 DMT 处理, 浓缩旋干后加 25 μ L NaCl 溶液 (3 mol/L), 涡旋溶解, 最后加入 1 mL 无水乙醇溶液。置于 -20 °C 冰箱过夜, 然后离心 (1 000~13 000 rpm), 固体保存标记, 上清液移至另外的 EP 管中, 取 400 pmol DNA 的量做 ESI-MS 质谱鉴定。

1.6 偶氮苯修饰 DNA 的光异构化

将 C1 到 C4 序列溶解在 1 \times PBS 中配成 2.5 μ mol/L 的溶液, 退火后转移至石英比色皿先用紫外灯 (365 nm, 7 mW/cm², 反式到顺式) 照射, 用岛津 UV 1800 紫外分光光度计每间隔 20 s 测一次吸光度, 120 s 后再用白光灯 (> 400 nm, 11 W, 顺式到反式) 照射, 每间隔 20 s 测一次吸光度, 记录并用软件 Origin 8.0 作图分析。

1.7 T_m 值测定

将样品溶解在 1 \times PBS 样品溶解标准缓冲液中退火后进行实验, 测定梯度温度下的 260 nm 紫外吸收 (Beckman DU 800 Nucleic Acid/Protein Analyzer 程序升温 1 °C/min) 得到溶解曲线, 根据 dA/dT 作图得知 T_m 值。同样, 我们将样品紫外光照 10 min (365 nm, 11 mW/cm²) 再测定溶解温度曲线。记录并用软件 Origin 8.0 作图分析。

1.8 修饰后的 DNA 引导引物延伸

将引物和模板等比例的溶解于 2 μ L 10 \times Thermopol 反应溶液 (20 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L KCl, 10 mmol/L (NH₄)₂SO₄, 2 mmol/L MgSO₄, pH 8.8) 中, 再加入过量的 dNTP, 95 °C 下高温退火 5 min, 降温至室温后, 进行平行实验, 一组不光照, 一组用紫外灯 (365 nm) 照射 5 min, 然后在黑

暗条件下分别孵育 10 min 使引物和模板链充分结合。最后均加入 1 U 的 DNA 聚合酶 37 °C 下分别孵育 1 h。终反应体积为 20 μ L。通过 20% 的变性聚丙烯酰胺凝胶在 150 V 电压条件下电泳 2 h, 最后应用化学发光凝胶成像系统进行表征, 条带分析。

2 结果与讨论

2.1 偶氮苯修饰 DNA 的合成

参照我们以前的报道^[33], 以对硝基苯甲醇为原料, 在浓 NaOH 水溶液中, Zn 作催化剂合成 4, 4'-二羟甲基偶氮苯。偶氮苯一端羟基与 4, 4'-二甲氧基三苯基氯甲烷 (DMT-Cl) 反应进行保护, 另一端羟基与 2-氰乙基-N, N, N', N'-四异丙基亚磷酸二胺 (磷试剂) 反应合成偶氮苯的亚磷酸胺单体 (图 1)。值得注意的是最后一步与磷试剂反应, 偶氮苯衍生物的投料比例较少有利于 DNA 的偶联, 否则可能剩余部分的磷试剂首先与固相上裸露的羟基反应, 从而导致偶氮苯偶联效率下降。这里, 直接以重蒸的乙腈为溶剂, 4, 4'-二羟甲基偶氮苯: 四氮唑: 磷试剂的投料比例为 1:0.8:0.8, 通过薄层层析硅胶色谱监控偶氮苯原料不再减少, 反应 30 min 以上, 使得磷试剂反应完全, 然后将反应液过滤, 待用于 DNA 偶联。

偶氮苯修饰 DNA 合成使用 ABI 394 DNA 合成仪按照常规的亚磷酸胺固相合成的方法进行。在偶联偶氮苯的亚磷酸胺单体时, 将 DNA 核苷亚磷酸胺单体偶联时间从通常的 120 s 增加到 1 200 s, 偶联效率几乎与标准的 DNA 亚磷酸胺单体相当。取下装有固载相的柱子, 再用浓氨水将寡核苷酸从固相上切除并脱保护, 最后进行 HPLC 分离。制备提纯后的样品进行 ESI-MS 质谱鉴定, 结果如表 1, 其实际测得的分子量和理论值相符。

表 1 偶氮苯修饰的 DNA 的 ESI-MS 鉴定

Table 1 ESI-MS spectra of azobenzene linked DNA

DNA	序列	理论值	实测值
C1	5'-GACACGCTCTATAGTGAGTCGTATT 3'-CATAA ^{azo}	9 510.3	9 510.0
C2	5'-GACACGCTCTATAGTGAGTCGTATT 3'-GCATAA ^{azo}	9 839.5	9 839.1
C3	5'-GACACGCTCTATAGTGAGTCGTATT 3'-AGCATAA ^{azo}	10 152.7	10 152.0
C4	5'-GACACGCTCTATAGTGAGTCGTATT 3'-CAGCATAA ^{azo}	10 441.9	10 441.6

2.2 偶氮苯修饰 DNA 的光异构化

将偶氮苯修饰的 DNA (C1、C2、C3 和 C4) 溶解在 $1\times$ PBS 中配成 $2.5\ \mu\text{mol/L}$ 的溶液, $95\ ^\circ\text{C}$ 下退火形成稳定的结构。反式是偶氮苯的热稳定形式, 其紫外光谱在 $335\ \text{nm}$ ($\pi-\pi^*$) 处呈现明显的肩峰。对于 C1 溶液, 通过 $365\ \text{nm}$ 紫外灯照, 可以明显观察到 $335\ \text{nm}$ 处的峰强随着光照时间增加而降低, 直到照射 $80\ \text{s}$, 此肩峰基本消失, 而 $430\ \text{nm}$ ($n-\pi^*$) 处的峰强略有升高 (图 2(a))。此外, 再用白光光照, $335\ \text{nm}$ 处的峰强随着光照

时间增加而增强, $430\ \text{nm}$ 处峰强略有下降 (图 2(b))。同样, C2、C3 和 C4 的溶液通过紫外和可见光照均呈现 $335\ \text{nm}$ 和 $430\ \text{nm}$ 处峰强的类似变化 (图 2(c)、2(d), 图 2(e)、2(f) 和图 2(g)、2(h))。说明偶氮苯被修饰到设计的寡核苷酸中, 并且能起到光异构化的作用。此外, $260\ \text{nm}$ 是核酸的特征吸收峰, 在 DNA 变性时吸光度升高表现出增色效应, 说明偶氮苯光异构化可能影响 DNA 双链的结构, 将进一步通过进行热力学稳定性的研究加以佐证。

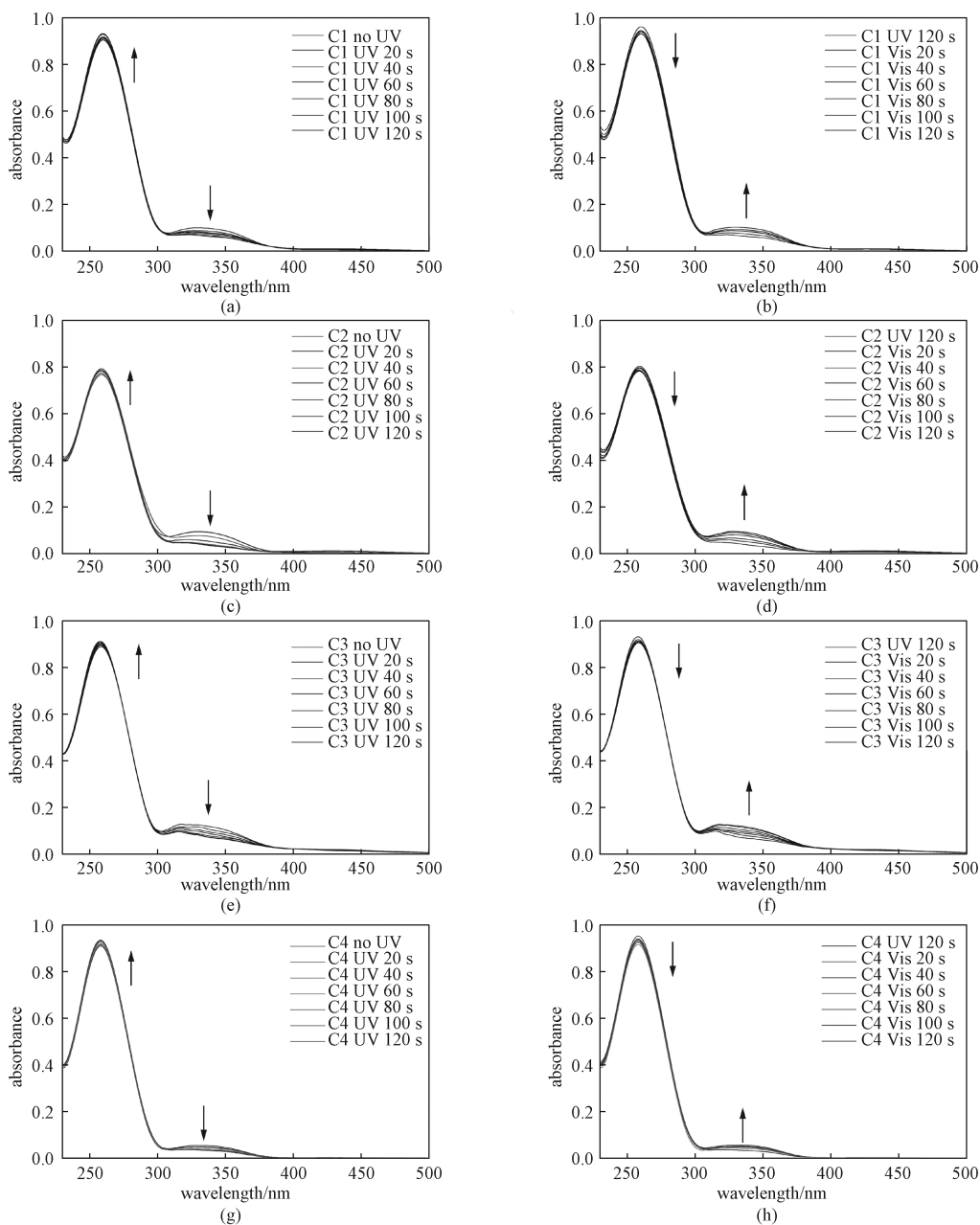


图 2 偶氮苯修饰的 DNA 在不同时间的紫外和可见光照下紫外光谱的变化

Fig.2 UV/Vis absorbance spectra of the C1, C2, C3, and C4 forms of azobenzene linked DNA before and after light illumination

2.3 偶氮苯修饰 DNA 的热力学稳定性

我们前期研究^[29,31]发现,当 4,4'-羟甲基偶氮苯代替 4,5 和 6 个碱基对的发夹 DNA 的环状结构,偶氮苯的光异构化能够使得发夹 DNA 的稳定性发生巨大改变($\Delta T_m = 24\text{ }^\circ\text{C}$)。这里进一步研究不改变发夹 DNA 的环状结构上 4,4'-羟甲基偶氮苯,仅仅增加一边茎碱基数目,偶氮苯的光异构化是否仍然可能开关发夹 DNA 的稳定性。图 3 展示紫外光照前后 C1、C2、C3 和 C4 的熔点曲线,很明显发现 C1 和 C2 光照前后的熔链曲线有着较大差异(图 3(a)和 3(b)),熔点温度分别从光照前 60.2 和 67.7 $^\circ\text{C}$,光照后降低到 49.8 和

53.5 $^\circ\text{C}$,它们熔点温度的变化分别为 10.4 和 14.2 $^\circ\text{C}$ (表 2)。这主要因为偶氮苯的异构化影响其与邻位碱基之间堆积作用以及邻位碱基对的氢键作用,导致寡聚核酸的稳定性降低。尤其是 C2,具有 6 个碱基对,紫外光照后的稳定性降低($\Delta T_m = 14.2\text{ }^\circ\text{C}$)最多。然而,随着茎碱基数目的增多,偶氮修饰的 DNA 通过紫外光照后的稳定性降低的程度变小,C3 的 ΔT_m 仅是 6.9 $^\circ\text{C}$ 而茎碱基数目增加到 8 个碱基对(C4)时光照后的 T_m 值几乎没有变化。这可能是偶氮苯两端互补配对的序列太长($\geq 8\text{ bp}$),偶氮苯异构化所产生的扭转力不足以影响双链的结合。

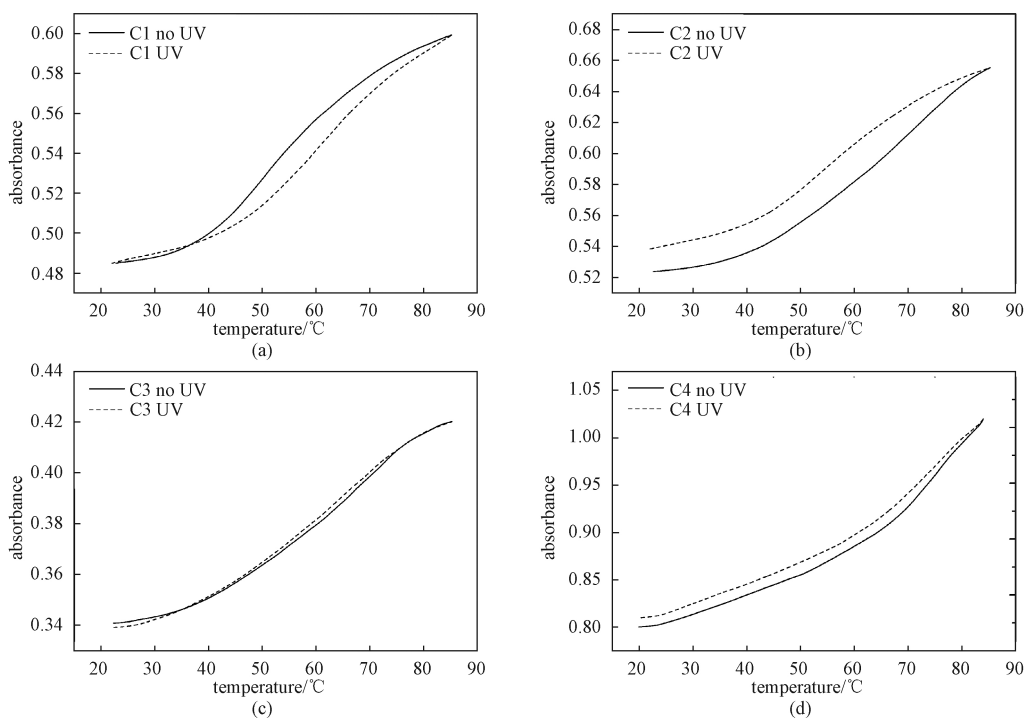


图 3 偶氮苯修饰的 DNA 光照前后的熔点曲线

Fig.3 Typical melting curves of the C1, C2, C3, and C4 forms of azobenzene linked DNA before and after UV irradiation

表 2 偶氮苯修饰的 DNA 光照前后的熔点温度

Table 2 T_m comparison of azobenzene linked DNA before and after UV irradiation

DNA	$T_m/^\circ\text{C}$		$\Delta T_m/^\circ\text{C}$
	- UV	+UV	
C1	60.2	49.8	10.4
C2	67.7	53.5	14.2
C3	70.2	63.3	6.9
C4	74.4	73.8	0.6

2.4 偶氮苯修饰 DNA 与引物结合的光控制

引物延伸的基本原则之一是引物与模板序列要紧密互补结合,因而偶氮苯修饰的 DNA 作为模板能否和引物形成适当稳定的双链是引物延伸的

关键因素。在偶氮苯修饰的 DNA 中较长的茎碱基链原则上与引物互补结合,但是短链与长链形成的茎碱基对的稳定性可能影响长茎碱基链与引物的结合,而偶氮苯异构化可能影响茎碱基对的稳定性。因此,考虑到发夹 DNA 的长链茎与引物和短链茎之间存在结合的竞争,我们通过筛选发夹 DNA 的短链长度分别为 5、6、7 和 8 个碱基长度的 C1、C2、C3 和 C4,以及长度为 12 mer (Pri. 12), 15 mer (Pri. 15) 和 17 mer (Pri. 17) 的引物,评价偶氮苯修饰的 DNA 与引物结合的光调控。

图 4(a) 显示 Pri. 12 和模板序列光照前后都没有很好的结合,可能因为本身引物链就比较短,

模板链自身能形成双链结构的部分较引物长,即使是偶氮苯在顺式形态下,影响模板的双链结构,但 C1、C2、C3、C4 模板单链部分和引物能互补配对的长度为 7、6、5 和 4 bp,仍然是不稳定结合,所以在凝胶电泳上无法看到 Pri.12 和模板的结合。当 Pri.15 和 C1、C2、C3、C4 模板单链部分能互补配对的长度增加为 10、9、8 和 7 bp,引物依旧无法很好的参与模板链自身形成的双链结构进行竞争。图 4(b) 显示 Pri.15 和 C1 只有微弱的结合,而其和 C2、C3、C4 都不稳定结合。不同的是当 Pri.17 和 C1、C2、C3、C4 模板单链部分能互补配对的长度增加为 12、11、10 和 9 bp 时,C1 和 Pri.17 可以形成较为稳定的双链结构,这意味引物和模板长链部分互补配对的长度为 12 bp 时,引物和模板能够有相对稳定的结合,而光照前后这种结合力的变化不是很明显。正如所期望的,C2 和 Pri.17 孵育后在光照前几乎没有结合,而在光照后它们有明显的结合条带,结合部分增加 7% 左右。由于保护链的增长,C3、C4 和 Pri.17 在光照前后变化也不太明显。

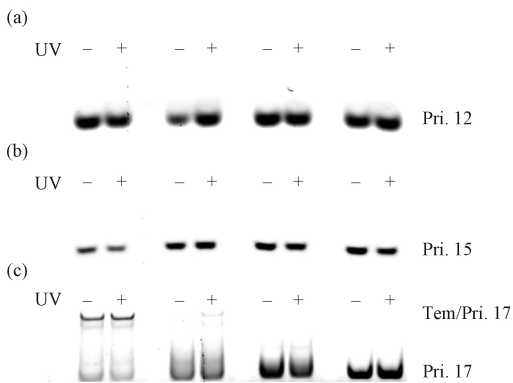


图 4 偶氮苯修饰的 DNA 和引物结合的光调控

Fig.4 Photoregulation of the binding of azobenzene linked DNA with the primer

2.5 偶氮苯修饰的 DNA 指导引物延伸的光调控

反式是偶氮苯的热稳定形式,起到稳定模板链自身双链结构的作用,所以引物链不能很好与模板链紧密结合,降低了引物的延伸产率。当受外界的紫外光刺激时,偶氮苯能在比较短的时间发生异构化转变为顺式结构,破坏模板链自身双链的碱基堆叠与配对作用,导致双链不稳定,结合力降低。同时引物与模板链不仅存在着配对关系,还会与模板的茎短链存在着竞争配对,从而彻底打开模板自身的双链结构,引物和模板紧密结

合,进行 DNA 的复制。虽然影响引物延伸的因素有很多,但是我们主要从 DNA 模板、不同长度的引物和不同的酶这三方面来研究并筛选光控引物延伸最佳效率的条件。

由图 5 可见,胶图中最下方的条带为起始引物条带,最上面的条带为延伸全长产物,中间的片段为反应过程中未完全延伸的产物。在以 Pri.12 作为引物时,其与 C1、C2、C3 和 C4 配对区的碱基对分别为 7、6、5 和 4 bp。由图 5(a) 和 6(a) 可知,C1 作为模板,紫外光照前,在 Taq、Vent、Deep Vent 酶的作用下引物延伸产率分别为 37.5%、26.7% 和 31.7%,而紫外光照后,引物延伸产率存在不同程度增加(48.6%、40.7% 和 37.2%)。与 C1 相比,C2 和 C3,模板链的保护短链分别从 5 个碱基增加到 6 和 7 个碱基,与引物配对的碱基对也相应从 7 bp 减少到 6 和 5 bp,引物延伸的效率通常有所下降。且它们自身经紫外光照后,引物延伸产率比光照前也存在不同程度增加。这是因为随着模板链自身的双链长度增加,配对区长度逐渐减短,结合力变弱,引物在竞争位置逐渐处在劣势,大大降低了模板和引物的结合,所以延伸的产率逐渐减少。C1、C2 和 C3 光照前后指导的引物延伸都有 5% ~ 15% 的差异,正如我们所预期的,偶氮苯的顺式形态影响了模板自身双链的稳定性,通过配对区的结合,引物“挤走”竞争区的干扰碱基从而自身参与模板链的结合,从而增加延伸效率。而 C4 光照前后引物的延伸几乎都不明显,这也与光照前后 T_m 值无明显变化的结果相一致,偶氮苯开关不足以使得 12 mer 引物对 8 bp 长度的茎碱基对有所影响。

在以 Pri.15 作为引物时,其与 C1、C2、C3 和 C4 配对区的碱基对增加为 10、9、8 和 7 bp,因而较 Pri.12 表现出更强的结合力,提高了“挤走”竞争区模板端位短链的可能性。图 5(b) 和 6(b) 显示,Pri.15 作为引物表现出比 Pri.12 更多量的聚合物链反应产物。此外,光照前后引物延伸效率差异比较明显,其中 C3,在 Vent 酶作用下引物延伸效率仅为 28.4%,而紫外光照后引物延伸效率达到 57.8%,光照前后的 PCR 产率增加超过 1 倍。在 Deep Vent 酶的作用下 C3 光照前后指导的 PCR 产率也增加 73%。C2 在 Vent 作用下光照后指导的 PCR 产率很高(91.8%),但光照前指导 PCR 反应产率也较高(63.1%),因而光照前后的产率也表现出差异,仅为 28.7%。对于 C4,不

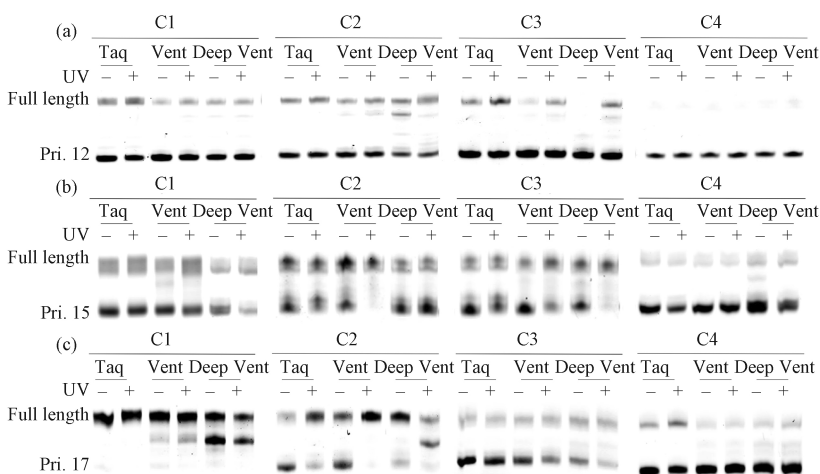


图 5 偶氮苯修饰的 DNA 指导引物延伸

Fig.5 Photomodulation of the DNA primer extension using azobenzene linked DNA template

管是光照前还是光照后,其指导的引物延伸产率都比较低,偶氮苯开关仍不足以使得 15 mer 引物对 8 bp 长度的茎碱基对有所影响。

在以 Pri.17 作为引物时,其与 C1、C2、C3 和 C4 配对区的碱基对增加为 12、11、10 和 9 bp,因而较 Pri.12 和 Pri.15 表现出更强的结合力,“挤走”竞争区模板端位短链的可能性更大。图 5(c) 和图 6(c) 均显示, C1 光照前引物延伸的效率已经很大(83.2% 以上),紫外光照后引物延伸的效率 96.0% 以上,由于光照前的背景较高,所以光照前后 PCR 效率没有明显的变化。说明偶氮苯开关调控的影响不大,原因是配对区的双链较长,即使是竞争区引物不能和模板链紧密结合,配对区也能够指导引物继续延伸。然而, C2, 由于配对区的碱基对增加,紫外光照前降低了引物延伸效率的背景, Vent 催化下延伸产率仅为 49.6%, 紫外光照射后的延伸产率达到 91.4%, 增加了 84%。C3 的调控比 C2 的调控略有不足,而 C4 受到偶氮苯自身调控能力和配对区结合力的限制延伸结果也不够理想。

此外,使用同一种 DNA 模板,在不同酶的作用下,引物延伸的调控效果只有略微的区别,其中 Vent 酶表现略好的调控效果。更多的影响调控效果的是 DNA 模板和引物的组合,这是由于发夹 DNA 的模板与短保护链和引物之间存在结合的竞争。我们发现,具有 7 个保护碱基的 C3 对 Pri.15 及 6 个碱基短链的 C2 对 Pri.17 具有普遍较好的光调控延伸效果。其中 C3, 在 Vent 酶作用下紫外光照前后引物延伸效率增加超过 1 倍。而 C2, 由于引物长度增加,尽管紫外光照前增加了

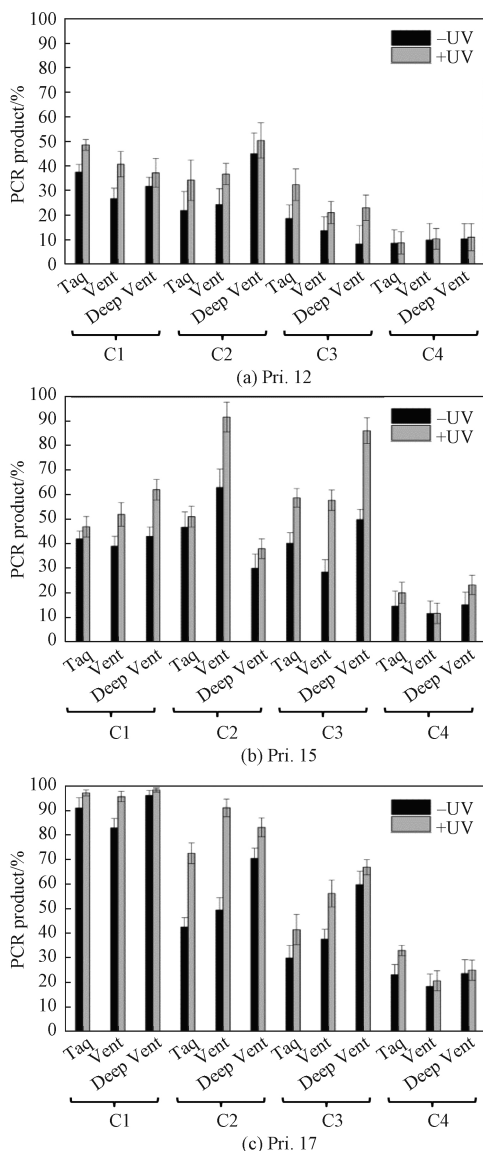


图 6 偶氮苯修饰的 DNA 指导引物延伸的定量分析

Fig.6 Quantitative analysis for primer extension

引物延伸的背景,但 Vent 催化下紫外光照射后的延伸产率达到 91.4%,也增加了 84%,这也与 DNA 与引物的结合实验中光照前后具有不同的结合力相一致。

2.6 偶氮苯修饰的 DNA 指导引物延伸的可逆研究

为评价偶氮苯引入到核酸分子中对引物延伸的可逆调控,我们选择 C2 序列与 Pri.15 在 Vent 酶作用下,通过紫外光和可见光交替照射来研究引物延伸的可逆行为。图 7(a) 表示溶液退火后 37 °C 下共孵育 58 min,18 和 38 min 分别用 UV 光和可见光照射 2 min,每隔 9 min 取等量溶液电泳表征(光照时间除外)。线性结果如图 7(b),前 18 min 反应速率线性拟合为 1.22,UV 光照射后反应加快,斜率为 2.17,增加 1.7 倍,可见光照后反应速率又下降到较低水平,仅为 0.4。证明偶氮苯修饰的模板能够可逆的控制引物延伸速率。

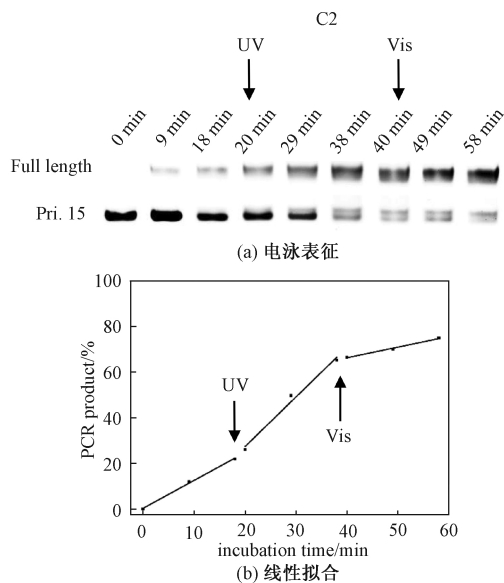


图 7 偶氮苯修饰的 DNA (C2) 指导引物延伸的可逆光调控

Fig.7 Reversible photoregulation of primer extension using C2 with UV and visible light

3 结论

本文研究偶氮苯单元修饰在 DNA 模板上对引物延伸的光控制行为,筛选 5、6、7 和 8 个碱基的保护链通过 4,4'-二羟甲基偶氮苯连接的 25 mer DNA 模板,在紫外光照前后调控的引物延伸效率。结果表明具有 7 个保护碱基的 C3 对 Pri.15 及 6 个碱基短链的 C2 对 Pri.17 具有普遍

较好的光调控延伸效果,并且因聚合酶的改变而对引物的调控效果只有略微不同。因而我们断定偶氮苯修饰的 DNA 模板对引物延伸的光控制行为的主要影响是因为偶氮苯单元修饰模板所形成的竞争区和引物与模板形成的配对区之间的相互竞争。

参考文献

- [1] Wang R W, Jin C, Zhu X Y, et al. Artificial base zT as functional "element" for constructing photoresponsive DNA nanomolecules[J]. Journal of the American Chemical Society, 2017, 139(27): 9 104-9 107.
- [2] Gorbea C, Mosbrugger T, Cazalla D. A viral Sm-class RNA base-pairs with mRNAs and recruits microRNAs to inhibit apoptosis[J]. Nature, 2017, 550(7 675): 275-279.
- [3] Gomez-Santacana X, Pittolo S, Rovira X, et al. Illuminating phenylazopyridines to photoswitch metabotropic glutamate receptors; from the flask to the animals [J]. ACS Central Science, 2017, 3(1): 81-91.
- [4] Adedeji A O, Singh K, Calcatera N E, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus replication inhibitor that interferes with the nucleic acid unwinding of the viral helicase [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2012, 56(9): 4 718-4 728.
- [5] Velema W A, Szymanski W, Feringa B L. Photopharmacology: beyond proof of principle[J]. Journal of the American Chemical Society, 2014, 136(6): 2 178-2 191.
- [6] Wu L, Pei F, Zhang J H, et al. Synthesis of site-specifically phosphate-caged siRNAs and evaluation of their RNAi activity and stability [J]. Chemistry-A European Journal, 2014, 20(38): 12 114-12 122.
- [7] Hemphill J, Govan J, Uprety R, et al. Site-specific promoter caging enables optochemical gene activation in cells and animals [J]. Journal of the American Chemical Society, 2014, 136(19): 7 152-7 158.
- [8] Wu L, Wang Y, Wu J Z, et al. Caged circular antisense oligonucleotides for photomodulation of RNA digestion and gene expression in cells [J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41(1): 677-686.
- [9] Wang Y, Wu L, Wang P F, et al. Manipulation of gene expression in zebrafish using caged circular morpholino oligomers [J]. Nucleic Acids Research, 2012, 40(21): 11 155-11 162.
- [10] Szymanski W, Beierle J M, Kistemaker H A, et al. Reversible photocontrol of biological systems by the incorporation of molecular photoswitches [J]. Chemical Reviews, 2013, 113(8): 6 114-6 178.
- [11] Beharry A A, Woolley G A. Azobenzene photoswitches for biomolecules [J]. Chemical Society Reviews, 2011, 40(8): 4 422-4 437.

- [12] Liu Z F, Hashimoto K, Fujishima A. Photoelectrochemical information-storage using an azobenzene derivative [J]. *Nature*, 1990, 347(6 294): 658-660.
- [13] Kumar G S, Neckers D C. Photochemistry of azobenzene-containing polymers[J]. *Chemical Reviews*, 1989, 89(8): 1 915-1 925.
- [14] Zimmerman G, Chow L Y, Paik U J. The photochemical isomerization of azobenzene [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1958, 80(14): 3 528-3 531.
- [15] Yang Y Y, Endo M, Hidaka K, et al. Photo-controllable DNA origami nanostructures assembling into predesigned multiorientational patterns [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134(51): 20 645-20 653.
- [16] Yan Y Q, Chen J I, Ginger D S. Photoswitchable oligonucleotide-modified gold nanoparticles; controlling hybridization stringency with photon dose[J]. *Nano Letters*, 2012, 12(5): 2 530-2 536.
- [17] Lohmann F, Ackermann D, Famulok M. Reversible light switch for macrocycle mobility in a DNA rotaxane[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134(29): 11 884-11 887.
- [18] Tunitskaya V L, Kochetkov S N. Structural-functional analysis of bacteriophage T7 RNA polymerase [J]. *Biochemistry-Moscow*, 2002, 67(10): 1 124-1 135.
- [19] Nakasone Y, Ooi H, Kamiya Y, et al. Dynamics of inter-DNA chain interaction of photoresponsive dNA[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2016, 138(29): 9 001-9 004.
- [20] Kingsland A, Samai S, Yan Y Q, et al. Local density fluctuations predict photoisomerization quantum yield of azobenzene-modified DNA [J]. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 2016, 7(15): 3 027-3 031.
- [21] Yan Y Q, Wang X, Chen J L, et al. Photoisomerization quantum yield of azobenzene-modified DNA depends on local sequence [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, 135(22): 8 382-8 387.
- [22] Lubbe A S, Szymanski W, Feringa B L. Recent developments in reversible photoregulation of oligonucleotide structure and function [J]. *Chemical Society Reviews*, 2017, 46(4): 1 052-1 079.
- [23] Chen H R, Zhang, H Y, Pan, J, et al. Dynamic and progressive control of DNA origami conformation by modulating DNA helicity with chemical adducts [J]. *ACS Nano*, 2017, 10(5): 4 989-4 996.
- [24] Liu M Z, Asanuma H, Komiyama M. Azobenzene-tethered T7 promoter for efficient photoregulation of transcription [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128(3): 1 009-1 015.
- [25] Wang X L, Huang J, Zhou Y Y, et al. Conformational switching of G-quadruplex DNA by photoregulation [J]. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2010, 49(31): 5 305-5 309.
- [26] Matsunaga D, Asanuma H, Komiyama M. Photoregulation of RNA digestion by RNase H with azobenzene-tethered DNA [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126(37): 11 452-11 453.
- [27] Liang X G, Asanuma H, Komiyama M. Photoregulation of DNA triplex formation by azobenzene [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2002, 124(9): 1 877-1 883.
- [28] Chaulk S G, MacMillan A M. Caged RNA: photo-control of a ribozyme reaction [J]. *Nucleic Acids Research*, 1998, 26(13): 3 173-3 178.
- [29] Dong M X, Babalhavaeji A, Samanta S, et al. Red-shifting azobenzene photoswitches for in vivo use [J]. *Accounts of Chemical Research*, 2015, 48(10): 2 662-2 670.
- [30] Nishioka H, Liang X G, Asanuma H. Effect of the ortho modification of azobenzene on the photoregulatory efficiency of DNA hybridization and the thermal stability of its cis form [J]. *Chemistry-A European Journal*, 2010, 16(7): 2 054-2 062.
- [31] Wu L, Wu Y, Jin H W, et al. Photoswitching properties of hairpin ODNs with azobenzene derivatives at the loop position [J]. *MedChemCommun*, 2015, 6(3): 461-468.
- [32] Wu L, Koumoto K, Sugimoto N. Reversible stability switching of a hairpin DNA via a photo-responsive linker unit [J]. *Chem Commun*, 2009, 14(14): 1 915-1 917.
- [33] Wu L, He Y J, Tang X J. Photoregulating RNA digestion using azobenzene linked dumbbell antisense oligodeoxynucleotides [J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2015, 26(6): 1 070-1 079.
- [34] Young D D, Edwards W F, Lusic H, et al. Light-triggered polymerase chain reaction [J]. *Chemical Communications*, 2008, (4): 462-464.
- [35] Wang Q, Yi L, Liu L L, et al. A thermostable azo-linker for reversible photoregulation of DNA replication [J]. *Tetrahedron Letters*, 2008, 49(34): 5 087-5 089.
- [36] Yamazawa A, Liang X G, Asanuma H, et al. Photoregulation of the DNA polymerase reaction by oligonucleotides bearing an azobenzene [J]. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2000, 39(13): 2 356-2 357.
- [37] Kamiya Y, Takagi T, Ooi H, et al. Synthetic gene involving azobenzene-tethered T7 promoter for the photocontrol of gene expression by visible light [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2015, 4(4): 365-370.
- [38] Asanuma H, Tamaru D, Yamazawa A, et al. Photoregulation of the transcription reaction of T7 RNA polymerase by tethering an azobenzene to the promoter [J]. *Chembiochem*, 2002, 3(8): 786-789.
- [39] Wang X Y, Liang X G. Azobenzene-modified antisense oligonucleotides for site-specific cleavage of RNA with photocontrollable property [J]. *RSC Advances*, 2016, 6(96): 93 398-93 402.
- [40] Tian T, Song Y Y, Wang J Q, et al. Small-molecule-triggered and light-controlled reversible regulation of enzymatic activity [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2016, 138(3): 955-961.