

# 脱氧核酶研究进展\*

毛华伟\*\* 赵晓东 杨锡强

(重庆医科大学附属儿童医院免疫研究室 重庆 400014)

**摘要** 运用体外分子进化技术,从人工合成的随机序列 DNA 库中筛选出多种不同结构的脱氧核酶,其催化活性已扩展到 RNA 切割、DNA 激酶、DNA 连接、DNA 切割、DNA 过氧化、金属螯合等多种酶活性。主要论述脱氧核酶的体外筛选,催化特性和影响因素,以及应用研究等。

**关键词** 脱氧核酶 分子结构 体外筛选 催化特性

现在的基因药理学中,反义寡聚核苷酸药物的发展开拓了一个新的领域,包括反义 NDA、反义 RNA 及核酶。随后又出现具有催化功能的 DNA 分子,称为脱氧核酶(deoxyribozyme, DNAzyme/ Dz)。实质上,Dz 也是一种反义寡聚核苷酸,它完善和补充了反义寡聚核苷酸药物的范围。自 Breaker 等<sup>[1]</sup>和 Cuenoud 等<sup>[2]</sup>首先报道 Dz 功能以来,Dz 的结构和催化活性已扩展到多样化,而研究的热点及应用最多的还是 Dz10~23 和 Dz8~17 两种。本文就 Dz 的优点、结构、特性和应用展望等进行简要介绍。

## 1 脱氧核酶的优点

根据核酸杂交原理,反义寡聚核苷酸药物与靶序列杂交,在基因水平抑制 mRNA 的翻译与转录,从而干扰病毒蛋白的产生,达到治疗的目的。但下面一些问题却制约着它的发展:分子太大影响其进入细胞的效率,致细胞内浓度未达治疗水平;未经改造的寡聚核苷酸对核酸酶不稳定,透膜能力差;而结构改造或衍生化常常会导致专一性和亲和性下降;以及寡聚核苷酸的合成成本高、非反义作用等。相比较而言,Dz 为 DNA 片段,非蛋白质,仅能由人工合成,非生物体组成成分,分子量小,易于合成,稳定性高,不仅与 RNA 底物配对的精确性高,RNA 分解酶活性强,而且不需要胞内酶类的参与。此外,Dz 具有与一般药物相似的动力学特点,对靶 RNA 水平的抑制程度及时间容易控制,这就决定

了 Dz 在医药和生物学上的不可取代性和开发的必要性。

## 2 脱氧核酶的结构

不同催化活性的 Dz 具有不同的结构,但基本上都由催化部位和臂所构成。Santoro 等<sup>[3]</sup>通过体外筛选,获得 2 种在模拟生理浓度下能切割所有 RNA 的  $Mg^{2+}$  依赖型 Dz,即 Dz8~17 和 Dz10~23 (图 1),是目前最常应用的两种结构。此两种 Dz 由催化核心和两侧的底物识别结构域构成。Dz8~17 的核心含 13 个脱氧核苷酸,由一短的茎2环结构和下游未配对的 4~5nt 区域构成,茎多数由 3 个碱基对构成,至少 2 个为 G) C。环是不变的,序列为 5'2AGC23',加长茎的长度或改变环的序列,即丧失催化活性,未配对区连接茎2环的 3'端与下游底物结合臂,序列为 5'2WCGR23'或 5'2WCGAA23'。(W= A 或 T, R= A 或 G)。Dz10~23 的底物结合臂由 7~8 个脱氧核苷酸构成,催化核心含 15 个脱氧核苷酸,第 8 个核苷酸可为 T、C 或 A,但为 T 时,酶活性最高。无论 Dz8~17 或 Dz10~23,底物序列改变,只要酶的底物结合臂以互补的方式改变,并不

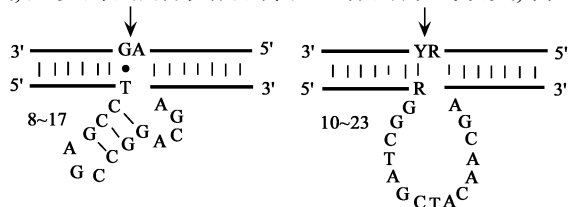


图1 脱氧核酶 8~17 和脱氧核酶 10~23

R= A 或 G, Y= U 或 C

收稿日期: 20020624, 修回日期: 20021226

\* 国家自然科学基金资助项目(30070331)

\*\* 电子信箱: hen2003m@yahoo.com.cn

影响酶活性。Dz8~17要求在切割位点的紧邻下游为 rG2dT 摆动配对,若替以 WatsonCrick 配对,催化活性将损失。而 Dz10~23,其底物结合臂与底物间的作用,则完全是通过标准的 WatsonCrick 配对。改变底物识别结构域的序列,Dz 便能识别不同的 RNA 底物。

### 3 脱氧核酶的体外筛选

Santoro 等<sup>[3]</sup>根据体外分子进化技术建立了一个 Dz 的筛选系统。首先构建一个含  $10^{14}$  个嵌合分子的随机 DNA 序列库,每个分子含 5c2 生物素基团、一个短寡聚脱氧核苷酸间隔区、12 个靶核糖核苷酸、50 个随机脱氧核苷酸及两侧的混合序列脱氧核苷酸。这些分子上链亲和素柱,用一含 10mmol/L MgCl<sub>2</sub> 的溶液于 pH7.5, 37℃ 下进行洗脱。结合的分子中,一个 RNA 磷酸酯发生切割,释放 3c 切割产物入洗脱液。回收洗脱物,以随机区域两侧的固定区域为引物杂交的位点,进行 PCR 扩增,得到一个子代 0 库,且恢复了 5c2 生物素、脱氧核苷酸间隔区及植入的靶核糖核苷酸。重复选择性扩增程序,逐步富集能很好切割 RNA 磷酸酯的 DNA 序列库。在第 8 轮的 17 克隆和第 10 轮的 23 克隆,分别得到了 Dz8~17 和 Dz10~23。

### 4 脱氧核酶的催化特性及影响因素

#### 4.1 催化特性

自发现 Dz 具有催化功能以来,其催化活性已扩展到 RNA 切割、DNA 激酶、DNA 连接、DNA 切割、DNA 过氧化及金属螯合等多种酶活性,且 Breaker 认为 Dz 可能有作用于蛋白质的潜力。

4.1.1.1 RNA 切割活性 切割 RNA 是 Dz 最重要也即应用最多的性质。Santoro 等<sup>[3]</sup>筛选的 Dz10~23,底物 RNA 通过 WatsonCrick 碱基配对与 Dz 结合,在未配对嘌呤与配对嘧啶残基间磷酸二酯键处被切割,其催化效率  $K_{cat}/K_m$  可达到  $10^9$  (mol/L)<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> 以上,比锤头状核酶和发夹型核酶高。而一种同 Dz8~17 有共同活性基序的 Dz,能高效切割任何含 rNG 的 RAN 和 DNA/RNA 嵌合底物(rN 为任一种核糖核苷酸碱基,G 为核糖或脱氧核糖 G),反应产物同锤头状核酶的相似<sup>[4]</sup>。Sugimoto 等<sup>[5]</sup>筛选获得的 Dz,含 11mer 催化结构域 (dGGCTACAACGA),在 rA 和 rU 间特异切割 RNA,

其二级速率常数在 37℃ 时为  $117 \times 10^7$  (mol/L)<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>,与 Dz10~23 在 Ca<sup>2+</sup> 存在下的速率相似。Roth 等<sup>[6]</sup>获得的 Dz 通过成环机制切割 RNA,得到游离的 5c2OH 和 2c, 3c 环磷酸基团。在 RNA 切割效率方面,蛋白质酶最高,Dz 次之,核酶最低。通过 Dz 特异型地切割 mRNA,可以改变细胞内基因表达,以及破坏致病基因的表达,从而达到基因治疗的目的。

4.1.1.2 其它活性 尽管 Dz 最重要的性质是 RNA 切割,但 DNA 激酶、DNA 连接、DNA 切割、DNA 过氧化及金属螯合等特性也具有潜在的应用价值。Li 等<sup>[7]</sup>筛选获得的 DNA 激酶性 Dz,以核苷三磷酸 (NTPs) 或脱氧核苷三磷酸 (dNTPs) 作为活性磷酸的来源催化自我磷酸化,转移 ATP 的  $\gamma$  磷酸到 DNA 的 5c2OH 上。经过优化反应条件,Dz 能区分 NTPs 和 dNTPs,其中一种优化的 ATP 依赖的 Dz 能高效选择 ATP 作为活性磷酸的来源,超过胞苷三磷酸、鸟苷三磷酸或尿苷三磷酸约 40000 倍,比非催化的 ATP 水解,催化效率加强近  $10^9$  倍。在催化效率上,Dz 和核酶几乎相等,而 T4 蛋白质激酶比 Dz 强约 5 个数量级。

Cuenoud 等<sup>[2]</sup>筛选获得一个 47nt 单链 DNA2 E47,分别使两个 DNA 底物的 3c 磷酸咪唑基和 5c2 羟基在空间上接近,通过酸碱催化机制促成两个底物的连接,其比无模板的情况至少快  $10^5$  倍。而 Li 等<sup>[8]</sup>从 DNA 随机序列库中筛选到一系列 Dz,能催化 ATP 依赖的自我加帽反应,将 ATP 的 AMP 转移到 5c 端的磷酸基团上,形成 5c, 5c2 焦磷酸连接,与 T4DNA 连接酶活性相似,其中一个 Dz 催化效率可达  $10^4$  (mmol/L)<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>。

Dz 不仅具有 DNA 连接酶活性,也具有 DNA 切割活性。一种含最小活性结构域的 46ntDz<sup>[9]</sup>,具有自我切割活性。其形成内含高度保守的催化核心的双链体和三链体结构,通过对切割位置特异的氧化切割机制,识别两个相邻核苷酸中之一,对底物进行切割,即 Dz 可作为限制性内切酶,位点特异地切割单链 DNA 分子。Dz 有 DNA 连接和切割活性,因此,其在基因工程中有较强的应用潜力。

Travascio 等<sup>[10]</sup>发现 18nt 寡聚体 PS21M 以较高亲和力结合氯高铁原卟啉,其复合物显示了 DNA 过氧化活性。富含鸟嘌呤的 33ntDNA 寡聚体, PSS1 ST1,通过铜、锌离子能催化中卟啉 IX (MPIX) 金属化,经过优化 DNA 序列和反应参数,得到最小

的催化单位 PSS1M, 其酶性参数能与自然界存在的亚铁螯合酶及由蛋白质和核糖核酸组成的人工螯合酶的参数相比<sup>[11]</sup>。

#### 412 影响因素

像化学催化剂一样, Dz 催化功能的发挥, 有的需要辅因子, 而有的则不。其催化效率受辅因子、环境因素、底物、酶本身和调节物的影响。

41211 辅因子 Santoro 等<sup>[3]</sup>筛选的 Dz10~23 以  $Mg^{2+}$  为辅因子。现在, 金属离子的范围已扩展到  $Zn^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Pb^{2+}$ 、 $Cd^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $K^{+}$ 。铜系金属离子也可作为具有磷酸二酯切割活性的 Dz 的辅因子, 但是, 小的金属离子 (Tb, Tm, Lu) 最有效<sup>[12]</sup>。Faulhammer 等<sup>[13]</sup>筛选的依赖  $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$  的 Dz 结合  $Ca^{2+}$  具有协同性, 而  $Mg^{2+}$  则无, 比较催化剂与  $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$  的二级结构, 发现有一个特殊的  $Ca^{2+}$  结合隐穴。金属离子的特异性表明, 存在着一个或多个对几何形状和大小有着严格要求的金属离子结合位点。

氨基酸也是一种辅因子, Roth 等<sup>[6]</sup>筛选得到一种 Dz, 以 L2 组胺酸作为 RNA 切割反应的活性成分, 催化效率约为底物非酶促切割的  $10^6$  倍, 反应与 RNase A 的催化机制的第一步类似, 组胺酸的咪唑基团作为一般的碱催化剂, 引导  $2\omega OH$  的去质子化。其不以 D2 组胺酸作为辅因子, 表明 Dz 形成一个立体选择性的氨基酸结合位点, 对组胺酸有立体特异性识别。另外, 精胺也可以作为辅因子, 依赖精胺的 Dz, 其催化效率与锤头状核酶呈同一数量级<sup>[13]</sup>。

Geyer 等<sup>[14]</sup>经过选择性扩增获得一种 Dz, 命名为 G3, 用不同的螯合剂和核糖核酸酶抑制剂排除辅因子的干扰, 并经微量金属分析所证实。其催化 RNA 切割, 效率比非酶促反应增强  $10^8$  倍, 表明 Dz 的自身结构也能催化 RNA 的切割反应。

41212 环境因素 Li 等<sup>[11]</sup>研究了金属离子、温度及 pH 对脱氧核酶 PSS1M 催化效率的影响。发现 1mmol/L 钾就能维持强大的催化活性, 而高到 015mol/L 时却不能。温度、pH 与 PSS1M 的关系呈现为钟形反应曲线, 最适数值分别为 40℃ 和 pH6.12。Cuenoud 等<sup>[2]</sup>也发现 DNA 连接酶 DNA2E47 的催化活性高度依赖二价金属离子的浓度, 但浓度过高, 则酶的活性急剧下降。Li 等<sup>[4]</sup>获得的具有 RNA 切割作用的 Dz, 在过渡金属离子中的活性高于在碱土金属离子中。

41213 底物和酶的影响 靶位点在 A 和 U 旁时, Dz10~23 的切割效率最高, 在生理条件下速率为  $011min^{-1}$ , 且 Dz10~23 的  $K_m$  值对底物结合臂的构成与长度相当敏感<sup>[3]</sup>。Sun 等<sup>[15]</sup>也发现针对 cmyc RNA 翻译起始区段的 Dz, 抑制平滑肌细胞的程度受底物结合臂的长度的影响, 每条臂为 9 碱基时, 催化效率最强。Okumoto 等<sup>[16]</sup>将 Dz 的催化环从 15mer 缩小到 11mer, 应用 SRP 技术观察到 D2RNA 复合物的结合及离解常数 ( $K_a$  和  $K_d$ ) 都取决于金属离子和 Dz 环的大小, 高 RNA 切割活性时的金属离子, 导致  $K_a$  的升高, 而  $K_d$  下降。Ota 等<sup>[17]</sup>合成了不同的底物嵌和体, 包括 RNAPRNA, RNAPDNA, DNAPDNA, 观察到 Dz 的结合臂与底物间形成螺旋结构。在所有的例子中, DNA 引入结合螺旋, B 型样螺旋水平增高, 加强了切割速率。此机制与在锤头状核酶中观察到的相似。

41214 调节物 Wang 等<sup>[18]</sup>把 DNA 调节物结合在酶和底物两者之上, 形成酶-底物-调节物复合体, 利用核酸形成分支连接的能力来调节酶的活性。它比传统的酶-底物复合体更稳定, 催化能力更强, 对 Dz10~23 的 RNA 切割活性的调节达 3 个数量级。

### 5 脱氧核酶的生物医学意义和应用展望

Dz10~23 能切割几乎所有含嘌呤-嘧啶连接的 RNA, 原则上, 能切割任何 mRNA 起始密码子 (A#UG)<sup>[3]</sup>。但 Dz10~23 对底物的作用具有高度的专一性, Dz10~23 与底物的作用完全是通过 Watson-Crick 配对, 改变结合部位和催化部位的序列, Dz 便能识别不同的底物。故将人工合成的底物结合臂添加到酶核心序列的两端, 可使其成为针对某一特定靶 RNA 的 Dz, 由于 Dz 的 RNA 分解酶活性建立在序列识别的基础上, 因此特异性极高, 对除靶 RNA 以外的其他 RNA 水平几无影响<sup>[2]</sup>。Dz10~23 作为一种强有力的 RNA 特异性切割工具, 无论是在体外作为 RNA 限制性内切酶用于 RNA 转录, 还是在生物系统内作为 RNA 水平上的基因失活剂, Dz 都有很好的应用前景, 在生物医学中有着广泛的应用潜力。

#### 511 生物学方面

Dz 作为一种工具酶, 应用它可以在细胞水平从事基因敲除实验, 即特异性地失活某一基因, 借以观察该基因在细胞生理、生化中的作用, 探测基

因功能<sup>[9]</sup>。由于 Dz 对 DNA 和 RNA 具有多重作用,它将在基因工程和 DNA 的直接修饰中作为一种有力的分子生物学工具。在生物进化上,Dz 和核酶催化功能的发现,改变了核酸是一种被动分子,仅适合于编码和携带遗传信息这一观念。由于 RNA 具有催化反应和储存信息双重功能,故当前生命起源理论强调 RNA 的原始作用。然而,现在很清楚,DNA、可能还有其他的多聚核苷酸,也能完成此两项功能,由于 DNA 的相对稳定性,所以了解脱氧核苷酸的生物前合成途径在生物进化上显得较为重要,即使非高效的途径,经过一定时间,也可引起高浓度的寡聚脱氧核苷酸聚集<sup>[2]</sup>。

## 512 医药方面

由于 Dz 的众多优点,其已成为分子生物医学和新药开发的热门话题。在已知靶基因序列,且了解该基因在致病过程中的作用的前提下,设计出相应的 Dz,可以对疾病进行基因治疗。现 Dz 已用于病毒性疾病、肿瘤、遗传性疾病和血管疾病的研究中。以 HIV21V3 环区为靶位点的 Dz 能在体外转录系统中有效切割靶 RNA 保守序列,抑制病毒在细胞内的复制<sup>[20]</sup>; Toyoda 等<sup>[21]</sup>用 Dz 在培养细胞中有效地抑制流感病毒的复制,其作用明显优于反义寡聚核苷酸且毒性较小; Cairns 等<sup>[22]</sup>合成的 Dz 在体外实验中有效抑制人乳头瘤病毒的基因表达;以原癌基因 *c-myc*RNA 翻译起始区为靶序列的 Dz 在体外能有效切割其全长底物,下调 *c-myc* 在平滑肌细胞内的基因表达,抑制细胞的增殖<sup>[15]</sup>; Yen 等<sup>[23]</sup>设计的 Dz 在细胞内以序列特异性的方式切割亨廷顿舞蹈病基因,降低蛋白的表达;针对一种早期生长反应因子(EGR21)mRNA 的特定序列设计的 Dz,在猪模型中能选择性抑制 EGR21 的表达和猪冠状动脉平滑肌细胞的增殖,有效地抑制了冠脉血管成型术后的再狭窄<sup>[24]</sup>。这些体外实验及动物实验,为 Dz 进一步到达临床实验奠定了基础。5Science6 评论 Dz 有可能在不久的将来走向临床,被制成多种特异性极强的核酸药物,控制与疾病相关的 RNA 表达水平,为众多疾病的治疗提供崭新的手段<sup>[25]</sup>。

## 513 展望

尽管 Dz 在生物医药方面已显示出强大的生命力,但是,Dz 要发挥催化作用,底物与 Dz 的相互接近,Dz 对细胞的转染,Dz 在细胞内的稳定性等,这些课题还需进一步研究,目前已有一些进展:

Dz10~23 能在嘌呤和嘧啶连接处高效水解

RNA,但其切割位点往往被 RNA 二级结构所保护,以抵抗 Dz 的活性。Cairns 等<sup>[2]</sup>发展了一种切割系统,用于筛选靶 RNA 分子的整个长度,而其切割位点在动力学及可接近性方面都是高效的。此系统为杂交试剂的位点选择提供了有用数据。

运用 Dz10~23 已对 HIV21 基因组的许多区域进行过研究,都是用脂质介导 Dz 进入哺乳动物细胞,此严重地限制了 Dz 在体内的实际应用。重庆医科大学附属儿童医院免疫研究室用胆固醇连接转染 Dz 入靶细胞,效率提高了 3~4 倍。由于 G 残基能直接与巨噬细胞上清道夫受体相互作用,Unwalla 等<sup>[26]</sup>合成了一种 3c 末端含 10 个 G 残基的 Dz5970,其在缺乏脂质转染的情况下,能直接特异地被人类巨噬细胞提取,也能在瞬时表达系统和病毒感染时抑制 HIV21 基因表达,而切割效率轻微受影响。这些亲巨噬细胞的新型 Dz 具有潜在的应用价值。

为了提高 Dz5970 在细胞内的稳定性,Unwalla 等<sup>[26]</sup>在 Dz5970 两端各添加了长 12 个碱基的茎环结构,但切割效率显著降低。Liu 等<sup>[27]</sup>也报道,Dz 的磷酸硫酯修饰在体外显著地提高了 Dz 的胞内稳定性,但其动力学效率下降。

总之,Dz 和核酶都催化一套相似的自我修饰反应。如果此功能上的相似性可以延伸,那么,还有很多目前尚未发现的 Dz。目前已知 Dz 的变体可用来产生自我标记 DNA 探针,别构 Dz 将有可能用作构建高级生物传感器的精确分子开关,甚至 DNA 计算器件。但是,简单的 Dz 能与细胞内的靶蛋白共价融合吗?能够获得更多的改变细胞遗传组成的高级结构域的 Dz 吗<sup>[28]</sup>? 这些任务对生物体中不存在的 Dz 来说,很具有挑战性,还需要进一步探讨。

## 参考文献

- [1] Breaker RR, Joyce GF. A DNA enzyme that cleaves RNA. *Chem Biol*, 1994, 1(4): 223~229
- [2] Cuenoud B, Szostak JW. A DNA metalloenzyme with DNA ligase activity. *Nature*, 1995, 375: 611~614
- [3] Santoro SW, Joyce GF. A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(9): 4262~4266
- [4] Li J, Zheng W, Kwon AH, et al. In vitro selection and characterization of a highly efficient Zn(II)-dependent RNA-cleaving deoxyribozyme. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(2): 481~488

- [ 5 ] Sugimoto N, Okumoto Y. Development of a short  $\text{Ca}^{2+}$  dependent deoxyribozyme with RNA cleaving activity. *Nucleic Acids Symp Ser*, 1999, ( 42 ): 281~ 281
- [ 6 ] Roth A, Breaker RR. An amino acid as a cofactor for a catalytic polynucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95 ( 11 ): 6027~ 6031
- [ 7 ] Li Y, Breaker RR. Phosphorylating DNA with DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96( 6 ): 2746~ 2751
- [ 8 ] Li Y, Liu Y, Breaker RR. Capping DNA with DNA. *Biochemistry*, 2000, 39( 1 ): 3106~ 3114
- [ 9 ] Carmi N, Breaker RR. Characterization of DNA cleaving deoxyribozyme. *Bioorg Med Chem*, 2001, 9( 10 ): 2589~ 2600
- [ 10 ] Travascio P, Bennet AJ, Wang DY, et al. A ribozyme and a catalytic DNA with peroxidase activity: active sites versus cofactor binding sites. *Chem Biol*, 1999, 6(11):779~ 787
- [ 11 ] Li Y, Sen D. Toward an efficient DNAzyme. *Biochemistry*, 1997, 36 ( 18 ): 5589~ 5599
- [ 12 ] Geyer CR, Sen D. Lanthanide probes for a phosphodiester cleaving, lead dependent, DNAzyme. *J Mol Biol*, 1998, 275( 3 ): 483~ 489
- [ 13 ] Faulhammer D, Famulok M. Characterization and divalent metal ion dependence of in vitro selected deoxyribozymes which cleave DNA/RNA chimeric oligonucleotides. *J Mol Biol*, 1997, 269( 2 ): 188~ 202
- [ 14 ] Geyer CR, Sen D. Evidence for the metal cofactor independence of an RNA phosphodiester cleaving DNA enzyme. *Chem Biol*, 1997, 4 ( 8 ): 579~ 593
- [ 15 ] Sun LQ, Cairns MJ, Gerlach WL, et al. Suppression of smooth muscle cell proliferation by a c-myc RNA cleaving deoxyribozyme. *J Biol Chem*, 1999, 274( 24 ): 17236~ 17241
- [ 16 ] Okumoto Y, Sugimoto N. Effects of metal ions and catalytic loop sequences on the complex formation of a deoxyribozyme and its RNA substrate. *J Inorg Biochem*, 2000, 82( 1- 4 ): 189~ 195
- [ 17 ] Ota N, Warashina M, Hirano K, et al. Effects of helical structures formed by the binding arms of DNAzymes and their substrate on catalytic activity. *Nucleic Acids Res*, 1998, 26( 14 ): 3385~ 3391
- [ 18 ] Wang DY, Sen D. A novel mode of regulation of an RNA cleaving DNAzyme by effectors that bind to both enzyme and substrate. *J Mol Biol*, 2001, 310( 4 ): 723~ 734
- [ 19 ] Li Y, Breaker RR. Deoxyribozymes: new players in the ancient game of biocatalysis. *Curr Opin Struct Biol*, 1999, 9( 3 ): 315~ 323
- [ 20 ] Zhang X, Xu Y, Ling H, et al. Inhibition of infection of incoming HIV21 virus by RNA cleaving DNA enzyme. *FEBS Lett*, 1999, 458 ( 2 ): 151~ 156
- [ 21 ] Toyoda T, Imamura Y, Takaku H, et al. Inhibition of influenza virus replication in cultured cells by RNA cleaving DNA enzyme. *FEBS Lett*, 2000, 481: 113~ 116
- [ 22 ] Cairns MJ, Hopkins TM, Witherington C, et al. Target site selection for an RNA cleaving catalytic DNA. *Nat Biotechnol*, 1999, 17( 5 ): 480~ 486
- [ 23 ] Yen L, Strittmatter SM, Kalb RG. Sequence specific cleavage of Huntingtin mRNA by catalytic DNA. *Ann Neurol*, 1999, 46( 3 ): 366~ 373
- [ 24 ] Low HC, Fahmy RG, Kavuma MM, et al. Catalytic oligodeoxynucleotides define a key regulatory role for early growth response factor in the porcine model of coronary intimal restenosis. *Circ Res*, 2001, 89( 8 ): 670~ 677
- [ 25 ] Finkle E. DNA cuts its teeth as an enzyme. *Science*, 1999, 286: 2441~ 2442
- [ 26 ] Unwalla H, Banerjee AC. Inhibition of HIV21 gene expression by novel macrophage tropic DNA enzymes targeted to cleave HIV21 TAT/Rev RNA. *Biochem J*, 2001, 357( Pt 1 ): 147~ 155
- [ 27 ] Liu C, Cheng R, Sun LQ, et al. Suppression of platelet type 12 lipoygenase activity in human erythroleukemia cells by an RNA cleaving DNAzyme. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 283( 4 ): 1077~ 1082
- [ 28 ] Breaker RR. Making Catalytic DNAs. *Science*, 2000, 290: 2095~ 2096

## Progress in the Research of Deoxyribozyme

Mao Huawei Zhao Xiaodong Yang Xiqiang

(Department of Immunology Children's Hospital Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400014)

**Abstract** Deoxyribozymes (DNAzymes) of different structures isolated from a synthetic single stranded DNA pool with random sequence in vitro selection, exhibit the capacity of RNA cleaving, DNA phosphorylating, DNA ligating, DNA cleaving, DNA peroxidizing and porphyrin metalating. This review focuses on DNAzyme's in vitro selection, its catalytic characters and factors interfering with them, and its future applications.

**Key words** Deoxyribozyme Molecular structure in vitro selection Catalytic characters