

# 非特异性 DNA 的催化活性( ) ——应用酚试剂及 $\text{FeCl}_3$ 检测 DNA 的酯酶活性\*

王身立 石东乔 刘文珍  
(湖南师范大学生物学系, 中国长沙, 410081)

**摘要** 分别应用酚试剂与  $\text{FeCl}_3$  来检测萘酚, 表明 DNA 能催化乙酸萘酯的水解, 印证了以前关于 DNA 具有酯酶活性的结论.  $\text{FeCl}_3$  法可以作为检测 DNA 酯酶活性的一种定量方法.

**关键词** DNA, 酯酶活性, 酚试剂, 三氯化铁

**分类号** Q556

## Determination of the Esterase-like Activity of DNA by Using Phenol Reagent and $\text{FeCl}_3$

Wang Shenli Shi Dongqiao Liu Wenzhen  
(Department of Biology, Hunan Normal University, Changsha, 410081, PRC)

**Abstract** By using phenol reagent and  $\text{FeCl}_3$  respectively to determinate naphthyl phenol, it showed that naphthyl acetate could be hydrolyzed by DNA. The results corroborated the former conclusion that DNA had esterase-like activity.

**Key words** DNA, esterase-like activity, phenol reagent,  $\text{FeCl}_3$

1994年12月, Breaker 与 Joyce 首先报道某一人工合成的 DNA 具有酶活性, 能催化一个特殊的核糖核苷酸与脱氧核糖核苷酸之间的磷酸二酯键断裂<sup>[1,2]</sup>. 1995年6月, 王身立等报道从绿豆幼苗中提取的总 DNA 能催化乙酸萘酯的水解<sup>[3]</sup>. 同时, Cuenoud 等报道某种人工合成的 DNA 具有连接酶活性<sup>[4]</sup>. 这些工作是继发现 RNA 具有酶活性之后, 人类对酶的化学本质认识的继续深化.

目前已发现 11 种不同来源的 DNA 均具有催化乙酸萘酯的酯酶活性, 提示 DNA 的这种性质并不存在于某一特定的核苷酸顺序之中, 而是一般的 DNA (非特异性 DNA) 的一种性质.

王身立等曾用坚牢蓝作为耦合显色剂检测 DNA 催化萘酯分解后生成萘酚<sup>[3,5]</sup>. 本实验分别应用酚试剂与  $\text{FeCl}_3$  来检测萘酚, 结果同样表明 DNA 能催化乙酸萘酯的分解.

\* 本课题由湖南省科委与省教委资助

收稿日期: 1997-11-25; 修回日期: 1998-02-12. 作者: 王身立, 男, 56岁, 教授, 硕士; 石东乔, 女, 24岁, 硕士, 现为中科院遗传所博士生

# 1 材料与方 法

## 1.1 材 料

1) 鱼精 DNA (上海生化所产品), 母液浓度为 1 g/L. 稀释 20 倍后用 Hitachi U-200 型自动分光光度计测得  $O.D_{260}/O.D_{280} = 1.89$ .

2) 50% 丙酮, 为丙酮加等量的蒸馏水配制.

3) 1% 的  $\alpha$ -萘酯与 1% 的  $\alpha$ -萘酚, 均用 50% 的丙酮配制.

4) 酚试剂, 上海市医学化验所产品.

5) 1% 的  $FeCl_3$  溶液, 用蒸馏水配制.

## 1.2 方 法

分别应用酚试剂及  $FeCl_3$  测酚法检测萘酯的水解产物萘酚. 所用试剂及其浓度、用量、反应温度与时间均见“结果”一项有关表格中所列.

# 2 实验结果

## 2.1 应用酚试剂检测 DNA 的酯酶活性

如表 1 所示, 每组实验取试管 5 支, 分别按表中所列, 加入有关试剂, 在适当的条件下进行反应, 结果如下.

表 1 应用酚试剂检测 DNA 的酯酶活性

Table 1 Determination of the esterase-like activity of DNA using phenol reagent

试管号	DNA (1g/L) / ml	$\alpha$ -萘酯 (1%) / ml	$\alpha$ -萘酚 (1%) / ml	H <sub>2</sub> O / ml	丙酮 (50%) / ml	保温 温度 /	保温 时间 /h	表左侧中 A、B、C、D、 E 各管按所 列温度及 时间处理后 取出, 放入 4 冰箱, 冷 却 20min, 再在各管加 酚试剂 0.5 ml, 20 放 置 2h 结果 如右.	现象与结果 Result
A	0.5	2	-	-	-	37	12		浅绿色, 浑浊, 内有絮状悬浮物, 试管底部有绿色沉淀.
B	-	2	-	0.5	-	37	12		浅黄绿色, 浑浊, 试管底部有较少量的绿色沉淀.
C	0.5	-	-	-	2	37	12		黄色, 内有絮状悬浮物.
D	0.5	2	-	-	-	4	12		黄色, 浑浊, 内有絮状悬浮物.
E	-	-	2	0.5	-	37	12		绿色, 浑浊, 试管底部有大量绿色沉淀.

表 1 中, E 管为参照物  $\alpha$ -萘酚对酚试剂的反应, 特征为溶液绿色, 且有大量绿色沉淀. 酚试剂为磷钨酸与磷钼酸的混和物, 根据有机化学, 酚试剂与酚类物质反应后, 产生蓝色至绿色的钼蓝与钨蓝的混和物<sup>[6]</sup>.

A 管为  $\alpha$ -萘酯加 DNA 的实验管, 其中也有绿色沉淀产生(略少于 E 管), 提示萘酯被 DNA 催化水解而产生了萘酚.

B 管为不加 DNA 的萘酯对照管, 仅有少量绿色沉淀(这是萘酯自发水解的结果), 与 A

管比较,有非常明显的差别。

C 管为加 DNA 但不加萘酯的另一对照管,完全观察不到绿色沉淀。其中的絮状悬浮物为酚试剂使 DNA 沉淀的结果,颜色淡黄(A 管中也有这种淡黄色的絮状悬浮物),与酚试剂对酚类物质产生的反应截然不同。

D 管与 A 管的差别在于温度不同。在 4℃ 放置 20min 时,萘酯几无水解,看不到绿色沉淀(D 管);而 A 管是 37℃ 保温 20min 的,其中产生的绿色沉淀表明,在此温度下 DNA 催化萘酯水解生成萘酚。

以上实验曾重复 9 次,均出现了完全一致的结果

## 2.2 应用 $\text{FeCl}_3$ 检测 DNA 的酯酶活性

如表 2 所示,每组实验包括试管 5 支,分别按表中所列,加入有关试剂,在适当条件下进行反应,结果如下。

表 2 应用  $\text{FeCl}_3$  检测 DNA 的酯酶活性

Table 2 Determination of the esterase-like activity of DNA using  $\text{FeCl}_3$

试管号	DNA (lg/L) /ml	$\alpha$ -萘酯 (1%) /ml	$\alpha$ -萘酚 (1%) /ml	$\text{H}_2\text{O}$ /ml	丙酮 (75%) /ml	反应 温度 /	反应 时间 /h	现象与结果 Result	$O \cdot D_{603\text{nm}}$
A	0.5	2	-	-	-	37	12	深褐色,澄清	0.461
B	-	2	-	0.5	-	37	12	黄棕色,澄清	0.202
C	0.5	-	-	-	2	37	12	极浅黄色,近乎无色,澄清	0.012
D	0.5	2	-	-	-	4	12	黄色,澄清	0.057
E	-	-	2	0.5	-	37	12	蓝色澄清变为蓝色浑浊再变为白色浑浊	0.804

A 管中加有底物  $\alpha$ -萘酯和作为催化剂的 DNA,反应后再加  $\text{FeCl}_3$  显色,测得最大吸收峰在 603nm 处, $O \cdot D_{603} = 0.461$ ;B 管为对照管,仅加底物  $\alpha$ -萘酯而未加 DNA,经同样处理后,测得  $O \cdot D_{603} = 0.202$ ,显著低于 A 管。此结果提示,DNA 催化萘酯的水解而产生了更多的萘酚,对  $\text{FeCl}_3$  显色,导致  $O \cdot D_{603}$  增高。

C 管为仅加 DNA 但不加底物的另一对照管, $O \cdot D_{603}$  仅为 0.012,此结果排除了 DNA 与  $\text{FeCl}_3$  直接反应而显色的可能性。

D 管与 A 管所加物质完全相同,仅反应温度不同(D 管为 4℃),结果 D 管的  $O \cdot D_{603}$  大大低于 A 管,提示 DNA 催化  $\alpha$ -萘酯的水解需要一定的温度。

## 3 讨论

应用酚试剂检测 DNA 催化萘酯水解后生成的萘酚,因产生大量沉淀,与以前所用坚牢蓝耦合显色法一样,不能作为一种定量检测的方法,但仍不失为一种简便快捷的定性检测法,且

从另一角度印证了以前 DNA 具有酯酶活性的结果。

应用  $\text{FeCl}_3$  法时, 当底物( 萘酯) 浓度 0. 8%,  $\text{FeCl}_3$  浓度 0. 1%, 且显色时间( 加  $\text{FeCl}_3$  后) 不长于 1h 时, 不致产生沉淀, 检测反应体系的 O. D<sub>603</sub>, 可以作为 DNA 酯酶活性的一种定量测定方法。对以前的坚牢蓝法因产生沉淀而不能进行定量测定, 是一个改进。

当用 4 种单核苷酸(dNTP) 的等量混和物或分别应用其中任何一种单核苷酸代替 DNA 进行实验时, 未发现 dNTP 催化萘酯生成萘酚的作用( 结果将另文报道)。

禹宽平等曾研究过 pH 值对萘酯水解的影响<sup>[7]</sup>, 发现当  $\text{pH} < 7$  时, 萘酯无自发水解, 当  $\text{pH} > 8$  时, 萘酯才发生水解产生萘酚。本实验中所有反应体系的 pH 值均小于 7, 且加入 DNA 后 pH 值还略低于对照, 故可排除 pH 值对萘酯水解的影响。

## 参 考 文 献

- 1 Breaker RR, Joyce GF. A DNA enzyme that cleaves RNA. Chem Biol, 1994, 1: 223
- 2 Burgstaller P, Famulok M. Synthetic ribozymes and the first deoxyribozyme. Angew Chem Int Ed Engl, 1995, 34: 1189
- 3 王身立. 发现酶性 DNA. 湖南师范大学自然科学学报, 1995, (2): 53
- 4 Cuenoud B, Szostak J W. A DNA metalloenzyme with DNA ligase activity. Nature, 1995, 375: 611
- 5 王身立, 陈嘉勤, 禹宽平等. 酶性 DNA( )——发现绿豆 DNA 具有酯酶活性. 湖南师范大学自然科学学报, 1995, (3): 59
- 6 蒋传葵等. 工具酶的活力测定. 上海科学技术出版社, 1982. 115
- 7 禹宽平, 陈嘉勤, 王身立等. 酶性 DNA( )——鱼精 DNA 酯酶活性的初步研究. 湖南师范大学自然科学学报, 1995, (4): 65

## 新书评介

### 《中国动物志·蛛形纲·蜘蛛目·园蛛科》评介

由湖南师范大学生物系尹长民教授等编著的《中国动物志·蛛形纲·蜘蛛目·园蛛科》已由科学出版社于 1997 年 10 月出版(67. 3 万字)。该志为国家自然科学基金八五重大项目。全书共记述了中国园蛛 286 种、1 亚种、5 未定种, 全面介绍了我国园蛛科的研究简史、形态特征、生物学特点、生活史、经济意义、地理分布及分类系统等。该书最突出的特点是内容丰富, 且绝大多数种是依据作者采集、观察到的实物标本描记绘图的。该书共附有插图 1 800 余幅, 图版科学、美观、鉴别特征突出, 便于读者使用时参考。此外, 在中国园蛛科地理分布及演化起源研究方面提出了作者新的见解。这是一部优秀的分类学专著, 不仅对研究中国园蛛有直接的指导作用, 同时对研究东洋界、古北界, 尤其是我国周边国家和地区的园蛛也有较高的参考价值。

( 梁宋平)