

## 研究报告



## RNA 适配体作为类抗性基因的可行性

邬丽娜<sup>1,2</sup> 唐卓<sup>\*1</sup>

1 中国科学院成都生物研究所 四川 成都 610041

2 中国科学院大学 北京 100049

**摘要:**【背景】抗性基因(Resistance Gene)在分子生物学研究具有重要作用,但其基因片段较大,限制了载体中插入目的序列的长度。【目的】探究分子量较小的 RNA 适配体的类抗性基因作用,用于优化载体容量和扩展目的基因片段。【方法】基于 tRNA 支架在体内富集表达 RNA 适配体,筛选验证氨基糖苷类抗生素新霉素 B 的 RNA 适配体的抗性作用。【结果】构建 tRNA 支架重组 RNA 表达载体并进行体内筛选,得到 A Site 和 Avirus 这 2 个 RNA 适配体分子,能够耐受新霉素 B 浓度为 19  $\mu\text{g/mL}$  (固体培养基)和 30  $\mu\text{g/mL}$  (液体培养基)。【结论】RNA 适配体可发挥类抗性基因的功能,本文策略有望用于抗性基因的优化,缩小质粒载体容量,为分子克隆技术提供新的手段。

**关键词:** RNA 适配体, 抗生素, 新霉素 B, 抗性, 抗性基因

## A feasibility study into ribonucleic acid aptamer being antibiotic resistance gene

WU Lina<sup>1,2</sup> TANG Zhuo<sup>\*1</sup>

1 Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu, Sichuan 610041, China

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract:** [Background] Resistance gene is critical to molecular biology research, however, containing the massive size always restricts its usage like limiting the length of the target sequence inserted into the vector. [Objective] Exploring resistance gene similar function of RNA aptamer simple molecules to optimize capacity of the vector and enlarge the target gene expressing section. [Methods] The tRNA scaffold recombinant RNA expressing strategy was used to enrich ribonucleic acid aptamer of antibiotic *in vivo*. Screening and verifying resistance of the RNA aptamer of the aminoglycosides antibiotic neomycin B. [Results] The tRNA scaffold recombinant RNA expressing vector was constructed and successfully applied to select *in vivo*. The two RNA aptamers, A Site and Avirus, were proved that could resist neomycin B with 19  $\mu\text{g/mL}$  on LB plate and 30  $\mu\text{g/mL}$  in liquid culture. [Conclusion] RNA aptamer could bind with antibiotic, leading to being a new kind of resistance gene. This strategy is expected to optimize the resistance gene, reduce plasmid vector capacity, which provides a new method

**Foundation item:** Innovative Team of Science and Technology Department of Sichuan Province (2017TD0021)

**\*Corresponding author:** Tel: 86-24-82890898; E-mail: tangzhuo@cib.ac.cn

**Received:** 24-03-2020; **Accepted:** 06-05-2020; **Published online:** 23-07-2020

**基金项目:** 四川省科技厅青年科技创新研究团队项目(2017TD0021)

**\*通信作者:** Tel: 024-82890898; E-mail: tangzhuo@cib.ac.cn

**收稿日期:** 2020-03-24; **接受日期:** 2020-05-06; **网络首发日期:** 2020-07-23

for molecular biology research.

**Keywords:** ribonucleic acid aptamer, antibiotic, neomycin B, resistance, resistance gene

分子克隆是分子生物学研究领域极其重要的一项研究技术,质粒载体的构建是其中关键的一环。在质粒载体构建过程中,抗性基因(Resistance Gene)通过编码特异性蛋白干扰抗生素的作用,使抗生素失去抑菌功能。含抗性基因的质粒载体转入菌株使其耐受一定浓度的抗生素而存活,而没有转入该质粒载体的菌株不能存活,所以绝大多数载体都把抗性基因作为选择标记基因,在含有抗生素的培养基上进行目的菌株的培养、筛选和鉴定<sup>[1-2]</sup>,基因重组成为分子生物学中的一项基础研究技术。但是,抗性基因是一段约 800 bp 的片段,相对较长,占据质粒载体比较大的载量,不利于构建含有长片段基因或多基因表达载体。因此,在实际应用中抗性基因的优化精简是分子克隆技术发展的重要方向。

RNA 适配体是一类能够与靶标分子特异性结合的功能性 RNA,大多数 RNA 适配体是通过体外筛选[Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX) or *in vitro* Selection]的方式获得,体外筛选技术是指指数富集的配体系统进化技术,分别由哈佛大学的 Jack Szostak 教授<sup>[3]</sup>、美国 Scripps 研究所的 Gerald Joyce 教授<sup>[4]</sup>以及科罗拉多大学的 Larry Gold 教授<sup>[5]</sup>他们 3 个不同的课题组在同一时期报道。适配体可以折叠形成多种二级结构和三级结构,通过疏水、氢键等作用与小分子化合物、金属离子、蛋白质和细胞等靶标分子结合而具有较高的特异性<sup>[6-8]</sup>,已经成为一个全新的分子工具,在生物分析、医学诊断、纳米技术以及基因治疗等方面发挥着越来越大的作用,相关的工作<sup>[9-15]</sup>近年来也不断增加。

1998 年马里兰大学的 Green 教授课题组关于小分子化合物与 RNA 适配体相互结合控制活细胞内基因表达的研究,发现在大肠杆菌体内表达经

过体外筛选得到的卡那霉素的 RNA 适配体(bl-kan),可使大肠杆菌对低浓度(11.65  $\mu\text{g/mL}$ )的卡那霉素产生耐受作用而存活<sup>[16]</sup>。基于此,我们推测 RNA 适配体能够在体内表达并与抗生素结合帮助细菌耐受抗生素,使细菌能够在没有抗性基因时发挥类抗性基因的作用。为了验证这一猜想,我们采用新霉素 B 的 RNA 适配体为研究对象,使其在大肠杆菌体内表达,观察大肠杆菌在含有新霉素 B 的培养基上的生长状态,探究 RNA 适配体作为类抗性基因的可行性。

本研究选择新霉素 B 的 RNA 适配体为研究对象,是因为当前已有较多新霉素 B 的 RNA 适配体被报道<sup>[16-26]</sup>。其中除 A Site 和 Avirus 等少数源于体内的生物活性分子外,大多数新霉素 B 的 RNA 适配体是通过体外筛选获得。由于体外筛选条件相比体内环境比较简单,通过该方式获得的 RNA 适配体在体内的适用性、与抗生素分子结合后能否产生抗性作用仍有待考证;此外, RNA 适配体是单链 RNA 分子,本质上化学稳定性差,其与抗生素的结合可能会受影响,如何稳定 RNA 适配体在体内的结构也是本文的难点。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和仪器

EasyTaq<sup>®</sup> DNA 聚合酶、I 型核酸染料、DNA Marker、大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞、大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞,TransGen Biotech 公司;PCR 产物纯化试剂盒,北京康为世纪生物科技有限公司;质粒提取试剂盒,Axygen 公司;胶回收试剂盒,Omega 公司;T4 DNA 连接酶、DNA 限制性内切酶,New England Biolabs 公司;DNA 引物合成及测序,生工生物工程(上海)股份有限公司。PCR 仪,Bio-Rad 公司;MAPADA 紫外-可见光分光光度计,上海美谱达仪器有限公司;酶标

仪, Thermo Fisher Scientific 公司; 酶标板, 广州杰特生物过滤制品有限公司; 琼脂糖凝胶电泳仪, 北京六一生物科技有限公司。

## 1.2 DNA 引物序列

构建重组质粒 pET21O<sup>-</sup>及含 tRNA-RNA 适配体重组质粒的引物序列见表 1。

## 1.3 重组质粒 pET21O<sup>-</sup>的构建

构建无 *lac* O 调节基因的载体 pET21O<sup>-</sup>, 通过 T7 启动子(T7P)和 T7 终止子(T7T)调控转录, 开放表达 RNA, 实现 RNA 适配体的富集, 达到发挥抗性作用的有效浓度。首先用 21a-T7F 与 21a-T7R 2 个引物 PCR 扩增 21a-T7 DNA 片段。PCR 反应体系: 21a-T7F (100 μmol/L) 1 μL, 21a-T7R (100 μmol/L) 1 μL, dNTPs (10 mmol/L) 1 μL, 10×*EasyTaq* Buffer 5 μL, *EasyTaq* DNA Polymerase

(5 U/μL) 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 补充至 50 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 10 个循环; 72 °C 5 min。PCR 扩增产物加入乙醇后-20 °C 沉淀过夜; 21a-T7 DNA 片段纯化产物和 pET21a 质粒同时加入 *Bgl* II 和 *Blp* I 限制性内切酶, 37 °C 反应 3 h, 按胶回收试剂盒说明书回收载体片段, 按 PCR 产物回收试剂盒说明书回收 RNA 片段, 加入 T4 DNA 连接酶进行连接; 将连接产物转入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, 加入无抗 LB 培养基 800 μL, 37 °C、150 r/min 摇床培养 1 h; 将培养后的菌液以 5 000 r/min 离心 5 min 后, 留取约 200 μL 培养基重悬菌体, 涂布于含 100 μg/mL 氨苄青霉素培养基的平板, 37 °C 培养过夜。挑取单克隆培养测序鉴定, 构建载体 pET21O<sup>-</sup>。

表 1 引物序列

Table 1 Primers sequence

引物名称 Primers name	序列 Sequence (5'→3')	扩增片段 Amplicon product
21a-T7F	cgagatctcgatcccgcgaaattaatacgactcactataggtctagagcccgatagct	21a-T7
21a-T7R	ctagctcagctggggatccccgctgctctaccgactgagctatccgggctc	21a-T7
Trna-F	gctctagagcccgatagctcagtcggtagagcagcgg	
Trna-R	ctagctcagctggcgcccgaacagggactgaacctggaccgcgg	
A Site-2F	cggtagagcagcggggcggtcacaccttcgggtgaagtcgccccgcgggtccaggg	A Site
Avirus-2F	ggtagagcagcggggagta gaaacaaggcttcggcctgtttgtccgcgggtccaggg	Avirus
HH-2F	cggtagagcagcgggggtgctgatgagccggccgaaactcgaagatcaccacccgcgggtccaggg	HH
Neo5-2F	cggtagagcagcgggcactgcagtcggaag agggccagtcgcccgggtccaggg	Neo5
Neo9-2F	cggtagagcagcgggtcgtgtggcgacagtttgccgaccgcgggtccaggg	Neo9
Neo16-2F	cggtagagcagcggcgtagcctggcgagaaagtttagatgccgcgggtccaggg	Neo16
Neo61-2F	cggtagagcagcgggtgtaggcgaaaagttttacatccgcgggtccaggg	Neo61
N1-2F	cggtagagcagcggggcatagctgtcctttaatggtcctacgtcccgcgggtccaggg	N1
M1-2F	cggtagagcagcggggcaccagcatagctgtcctttaatggtcctatgtagaccgcgggtccaggg	M1
M4-2F	ggtagagcagcggggcatagctgtcctttaatggtcctatgtagccgcgggtccaggg	M4
M5-2F	ggtagagcagcgggtgcatagtgctccttaatggtcctatgtagccgcgggtccaggg	M5
M13-2F	ggtagagcagcgggggctaagctgtcctttaatggtcctatgtagccgcgggtccaggg	M13
J6s-2F	gtagagcagcgggggacgaggttttagctacactcgtccccgcgggtccag	J6s
Tk81t-2F	gtagagcagcgggggagctcgtaccgaattctcccgcgggtccag	Tk81t
Neoeco-2F	cggtagagcagcggggcggtcacaccttcgggtgaagtcgccccgcgggtccaggg	Neoeco
kA1t6-2F	gtagagcagcgggagtagtggtggcaaaagacatcttgcgcgggtccag	kA1t6
Tbox-2F	cggtagagcagcgggaggtggaaccgcgttcggtccctccccgcgggtccaggg	Tbox
Neo1A-2F	cggtagagcagcggggactggcgagaaagtttagtccccgcgggtccaggg	Neo1A
Neo4A-2F	cggtagagcagcggcttgcatgtcctttaatggtccgcgagggccgcgggtccaggg	Neo4A

### 1.4 RNA 适配体 tRNA 重组质粒的构建

将待研究 RNA 适配体序列插入 tRNA 反密码子环序列, 用限制性内切酶 *Xba* I 和 *Bam*HI 处理所得含有新霉素 B 的 RNA 适配体 DNA 序列的片段以及 pET21O<sup>-</sup> 质粒 DNA 片段。经纯化、连接、转化后, 加入 T4 DNA 连接酶连接过夜, 转化、培养后测序验证, 构建含同名 RNA 适配体基因的重组质粒。

除了 PCR 扩增反应中 Primer1 (Trna-F, 100 μmol/L) 1 μL, Primer2 (RNA 适配体同名引物, 100 μmol/L) 1 μL, Primer3 (Trna-R, 100 μmol/L) 1 μL 以及质粒载体 pET21O<sup>-</sup>, PCR 反应条件、体系以及构建克隆的条件同 1.3 节。

### 1.5 RNA 适配体的体内验证筛选

含新霉素 B 的 RNA 适配体的重组质粒转入大肠杆菌表达菌 BL21(DE3)感受态细胞, 涂布于含 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 平板, 37 °C 培养过夜; 挑取单克隆于含 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基, 37 °C、250 r/min 摇床培养至  $OD_{600}$  为 0.5 时, 将菌液分区域划线涂布于含有不同浓度 (10–20 μg/mL) 新霉素 B 的 LB 平板上, 37 °C 培养过夜, 观察并计算菌落数量。新霉素 B 平板筛选实验独立重复 3 次以上。

### 1.6 重组质粒的生长分析

提前挑取大肠杆菌单克隆于含有 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基中, 37 °C、250 r/min 摇床培养过夜, 然后以菌原液与液体培养基的比例为 1:100 将菌液进行培养, 到菌液浓度  $OD_{600}$  为 0.1 时, 加入 100 μmol/L 的 IPTG 和 30 μg/mL 新霉素 B, 然后将菌液分装到 5 mL 试管里, 37 °C、150 r/min 培养, 每 1 h 检测菌液的  $OD_{600}$ , 记录并拟合曲线分析。独立重复实验 3 次, 每组设置 3 个平行对照。

## 2 结果与分析

### 2.1 体内验证策略的建立

首先通过质粒将不同新霉素 B 的 RNA 适配体

(图 1A) 在大肠杆菌中表达, 由于细菌是原核生物, RNA 的转录和降解同步进行, 导致 RNA 的半衰期极短, 在体内浓度很低, 因此需要提高其在大肠杆菌体内的稳定性和浓度。Ponchon 等报道了将 RNA 序列插入 tRNA 支架可使其逃逸 RNase 的降解, 从而增加 RNA 的体内稳定性和半衰期并实现富集<sup>[27–30]</sup>, 该方法已成功用于增强 RNA 分子的体内反应效率<sup>[31]</sup>。因此, 本研究采用 tRNA 支架组合表达 RNA 适配体的策略, 考察稳定表达新霉素 B 的 RNA 适配体的大肠杆菌对不同浓度新霉素 B 的耐受能力。通过转入含有 RNA 适配体重组质粒的大肠杆菌在新霉素 B 培养皿上的生长情况判断 RNA 适配体是否具有抗性基因功能(图 1B), 即大肠杆菌在含新霉素 B 的平板上生长, 表明 RNA 适配体能与新霉素 B 结合产生抗性而耐受抗生素, RNA 适配体有抗性基因的功能; 反之, 若大肠杆菌无法正常生长, 表明 RNA 适配体不含抗性基因的功能。

### 2.2 RNA 适配体类抗性作用的验证筛选

基于本研究建立的 RNA 适配体体内验证策略, 将含不同 RNA 适配体序列重组质粒的大肠杆菌涂布培养基, 如图 2A 所示, 实验结果显示, 不同分组的大肠杆菌均能在不含新霉素 B 的培养基中正常生长, 而且菌落数量接近; 如图 2B 所示, 当将新霉素 B 浓度增大到 12 μg/mL 后, 阴性对照组 (NC) 不再生长, 而含有 RNA 适配体重组质粒的实验组细菌大部分 (17/18) 能正常生长, 表明含有 RNA 适配体的大肠杆菌大多数可耐受 >12 μg/mL 的新霉素 B。随着新霉素 B 浓度的增大 (10–20 μg/mL), 最终统计得到 RNA 适配体耐受浓度, 如图 2B 所示, Tbox<sup>[25]</sup>、Neo1A<sup>[26]</sup>、Neo9、Neo61<sup>[20]</sup>、Tk81t<sup>[23]</sup> 最高耐受 12 μg/mL 的新霉素 B; M4<sup>[21]</sup>、kA1t6<sup>[16]</sup> 最高耐受 13 μg/mL 的新霉素 B; J6s<sup>[22]</sup>、Neoeco<sup>[24]</sup>、HH<sup>[19]</sup> 最高耐受 14 μg/mL 的新霉素 B; N1<sup>[21]</sup>、Neo5<sup>[20]</sup>、Neo4A<sup>[26]</sup> 最高耐受 15 μg/mL 的新霉素 B; M5<sup>[21]</sup>、Neo16<sup>[20]</sup> 最高耐受 18 μg/mL

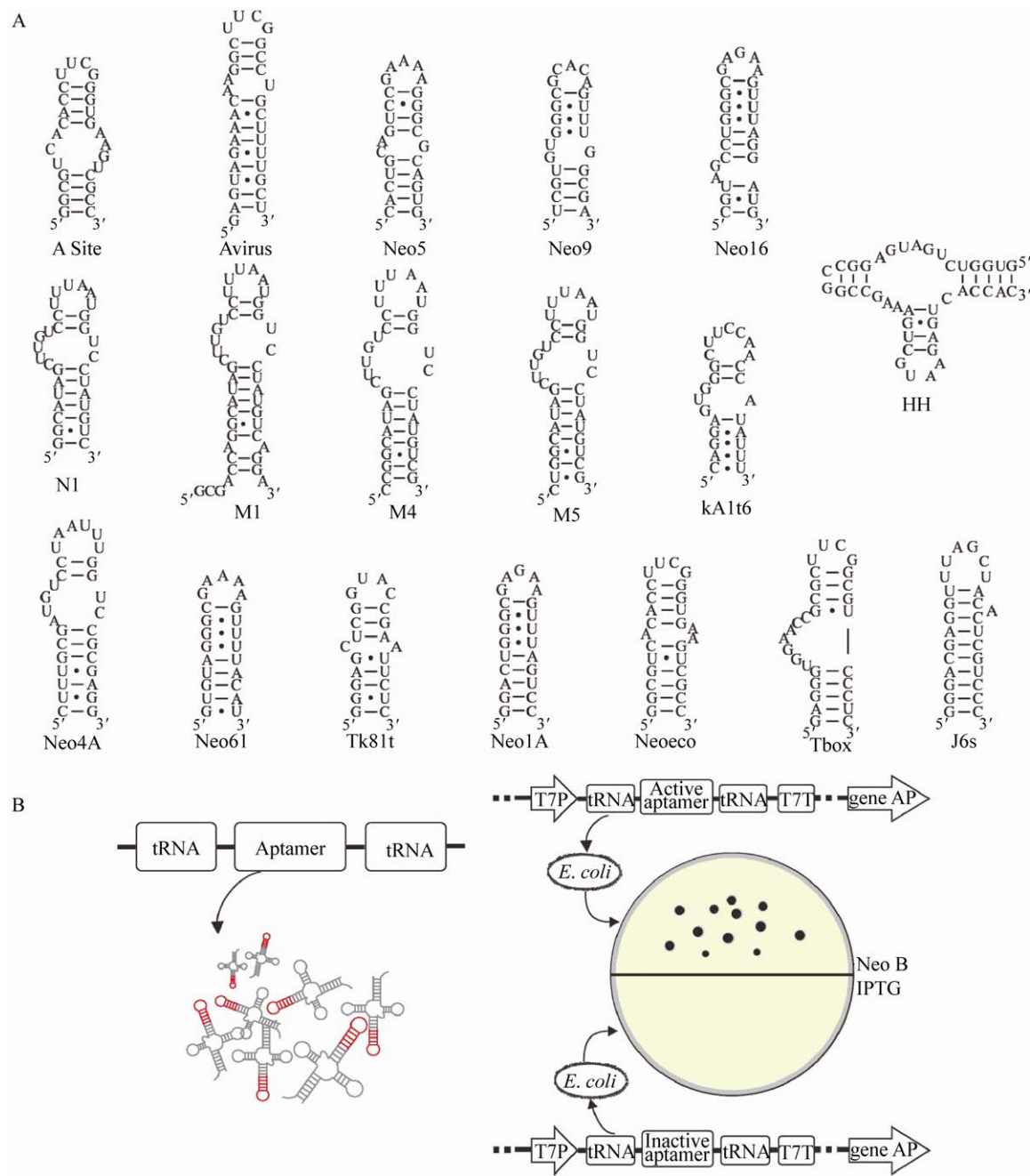


图 1 RNA 适配体体内筛选策略图

**Figure 1 Strategy of opening selection of RNA aptamer *in vivo***

注: A: 已报道的新霉素 B RNA 适配体二级结构; B: tRNA 支架组合 RNA 适配体及体内筛选策略。A Site<sup>[17]</sup>, Avirus<sup>[18]</sup>, HH<sup>[19]</sup>, Neo5、Neo9、Neo16、Neo61<sup>[20]</sup>, N1、M1、M4、M5<sup>[21]</sup>, J6s<sup>[22]</sup>, Tk81t<sup>[23]</sup>, Neoeco<sup>[24]</sup>, kA1t6<sup>[16]</sup>, Tbox<sup>[25]</sup>, Neo1A、Neo4A<sup>[26]</sup>为转入了含同名 RNA 适配体基因的重组质粒

Note: A: The reported aptamers of neomycin B; B: The schematic of tRNA strategy enriching RNA aptamer and schematic diagrams of intracellular selection of RNA aptamer being resistance gene. A Site<sup>[17]</sup>, Avirus<sup>[18]</sup>, HH<sup>[19]</sup>, Neo5, Neo9, Neo16, Neo61<sup>[20]</sup>, N1, M1, M4, M5<sup>[21]</sup>, J6s<sup>[22]</sup>, Tk81t<sup>[23]</sup>, Neoeco<sup>[24]</sup>, kA1t6<sup>[16]</sup>, Tbox<sup>[25]</sup>, Neo1A、Neo4A<sup>[26]</sup>, those were vectors with selected RNA aptamers expressed in *E. coli*

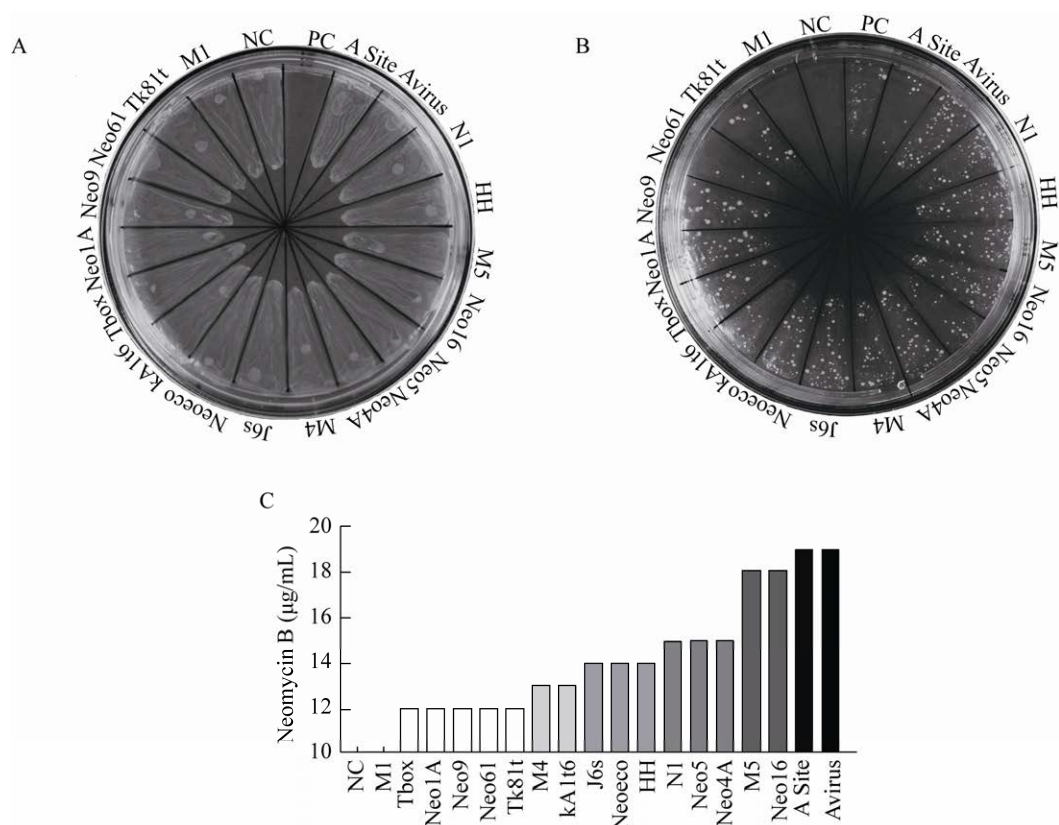


图2 RNA适配体的体内筛选及其类抗性基因功能的可行性验证

Figure 2 Validation of RNA aptamers tolerating neomycin B *in vivo*

注: A: 100 µg/mL 氨苄青霉素平板上大肠杆菌生长情况, 除 PC 组外的所有组别均正常生长, PC 不含氨苄抗性基因, 不能存活; B: 含有 12 µg/mL 的新霉素 B 平板验证筛选体内具有活性功能的 RNA 适配体, 考察其重组质粒的新霉素 B 耐受情况, 不能生长的组别即不耐受该浓度的新霉素 B; C: RNA 适配体重组克隆耐受新霉素 B 的浓度考察(10–20 µg/mL)。NC: 仅含 tRNA 但不含 RNA 适配体基因的阴性对照质粒; PC: pET-28a; A Site、Avirus、HH、Neo5、Neo9、Neo16、Neo61、N1、M1、M4、M5、J6s、Tk81t、Neoeco、kA1t6、Tbox、Neo1A、Neo4A 为转入了含同名 RNA 适配体基因的重组质粒

Note: A: The growth of different *E. coli* groups, each group could grow normally except PC group which did not contain gene AP; B: Validation of RNA aptamers tolerating neomycin B on plate with 12 µg/mL, *E. coli* couldn't survive indicated the group can't tolerate with 12 µg/mL neomycin B; C: Effective concentration of RNA aptamers tolerating neomycin B (10–20 µg/mL). NC represented the vector without aptamer; PC: pET-28a; A Site, Avirus, HH, Neo5, Neo9, Neo16, Neo61, N1, M1, M4, M5, J6s, Tk81t, Neoeco, kA1t6, Tbox, Neo1A, Neo4A, those were vectors with selected RNA aptamers expressed in *E. coli*

的新霉素 B; 其中具有最大抗性作用的 RNA 适配体为 A Site<sup>[17]</sup>和 Avirus<sup>[18]</sup>, 其耐受浓度均为 19 µg/mL (图 2C), 所有组别大肠杆菌在新霉素 B 为 20 µg/mL 时均不能够正常生长。

### 2.3 A Site、Avirus 重组质粒的细菌生长曲线

进一步考察了 A Site、Avirus 对大肠杆菌生长的影响。生长曲线显示, 转化 A Site 和 Avirus 的重组质粒表现出良好的耐受能力和生长情况(图 3B、3C), 而未转入新霉素 B 的 RNA 适配体的阴性对照

组在高浓度新霉素 B (30 µg/mL)培养基中不能生长, 进一步验证了本研究建立的 RNA 适配体体内筛选策略的有效性及 RNA 适配体作为类抗性基因的可行性。根据文献报道, A Site 序列包含核糖体 16S rRNA 基因的药物结合 A 位点的保守碱基序列, A Site 经折叠后形成空腔, 与新霉素 B 的 I 和 II 糖苷环(图 3A)相互作用<sup>[17,32-33]</sup>; 另外, Avirus 折叠后形成的空腔可与新霉素 B 的 4 个环形成相互作用<sup>[18]</sup>。基于本文实验结果, 推测在体内 A Site 和



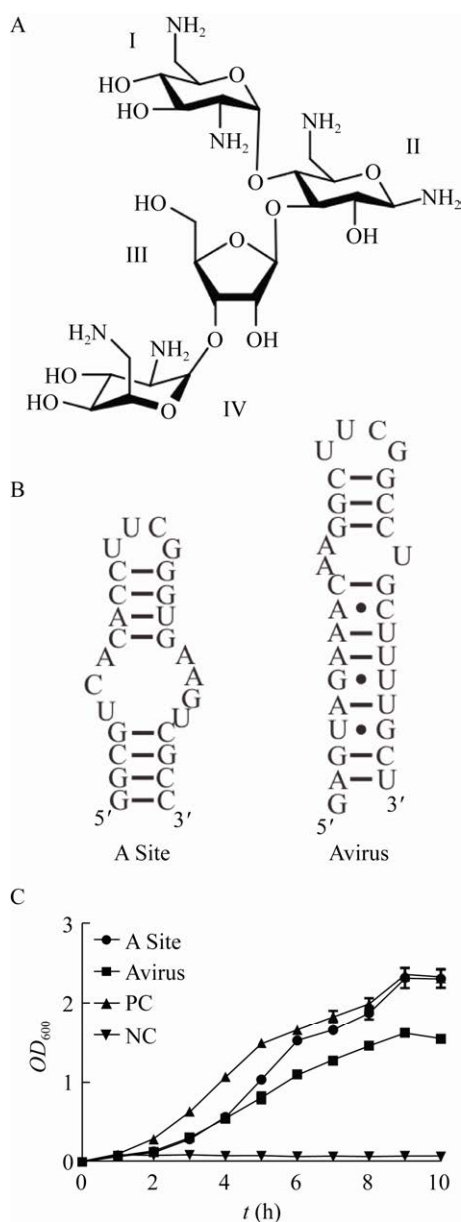


图3 生长曲线

Figure 3 Growth curve

注: A: 新霉素 B 化学结构; B: A Site 以及 Avirus 的二级结构; C: 30  $\mu\text{g/mL}$  新霉素 B 条件下含 RNA 适配体的重组质粒的生长曲线。误差线表示 3 个测量值的标准偏差。NC: 不含 RNA 适配体基因的阴性对照质粒; PC: pET-28a; A Site、Avirus 为转入了含同名 RNA 适配体基因的重转化子

Note: A: The structure of neomycin B; B: Structure of A Site and Avirus; C: Growth curves of *E. coli* in the presence of RNA aptamers with 30  $\mu\text{g/mL}$  neomycin B. The error bar represented the standard deviation of three data. NC represented the vector without aptamer; PC: pET-28a; A Site and Avirus were vectors with selected RNA aptamers expressed in *E. coli*

Avirus 与新霉素 B 具有更强的亲和力,可能是 A Site 和 Avirus 耐受新霉素 B 的能力高于其他 RNA 适配体的原因,以及新霉素 B 的 I 和 II 糖苷环可能为其与 RNA 适配体结合发挥抗性作用的关键结构。

### 3 讨论与结论

本研究中大多数含有 RNA 适配体的重组转化细菌能耐受浓度超过 12  $\mu\text{g/mL}$  的新霉素 B, 证明大部分抗生素的 RNA 适配体具有耐受一定浓度抗生素的能力, 然而不同抗生素 RNA 适配体耐受抗生素的能力却存在较大的差异。与源于体内、耐受抗生素作用最好的 A Site 和 Avirus 相比, 研究中通过体外筛选得到的 RNA 适配体均与 A Site 和 Avirus 存在着一定的差距, 因此造成不同 RNA 适配体的耐受能力差异可能是获取方法不同所致。核酸适配体作为功能核酸的另一大类, 绝大多数通过体外筛选得到的 RNA 适配体在应用于体内环境时, 其特异性与结合能力通常会大大地降低, 造成这种结果的主要原因是体外筛选条件不能充分地模拟体内复杂环境, 不同的离子环境、酶、细胞器等均可能会破坏体外筛选得到的适配体序列结构, 对 RNA 适配体的共存、折叠及相互结合产生影响, 影响 RNA 适配体在体内环境正常工作<sup>[34-35]</sup>。我们认为相对于体内存在的分子, 体外筛选获得的抗生素 RNA 适配体的类抗性基因功能会有所限制, 体内存在的 RNA 适配体会更适合其发挥抗性基因的类似作用, 体内筛选无疑是筛选抗生素适配体更好的方法。

经过本研究验证具有最优耐受抗生素能力的 A Site 和 Avirus 适配体分别来源于细菌 16S rRNA 基因和病毒 RNA 序列, 并且经过体外验证具有较好的特异性和结合力<sup>[17-18]</sup>。因此, 我们推测 A Site 和 Avirus 均能够承受 19  $\mu\text{g/mL}$  新霉素 B 的原因可能是: 两者具有耐受体内环境中各种干扰性因素和体内应用的结构基础, 显示出抗性基因的应用潜力。然而, 由于新霉素 B 抗性基因能够编码氨基糖苷磷酸转移酶使得新霉素 B 磷酸化, 该酶催

化多个新霉素 B 分子反应, 干扰抗生素的抗性作用; 而适配体空腔与新霉素 B 通过氢键等相互结合实现抗性作用, 仅结合单个新霉素 B 分子且该过程可逆, 不能够达到与抗性基因同等的效果, 二者机理不相同, 产生的抑制程度也存在差异。Werstuck 等<sup>[16]</sup>将 3 个 RNA 适配体分子串联, 最终达到 11.65  $\mu\text{g/mL}$  卡那霉素的耐受浓度。依照该思路将多个 RNA 适配体分子串联在 tRNA 支架上, 将会增加对新霉素 B 的抗性作用, 或许能够加大 RNA 适配体的抗性作用。尽管 RNA 适配体能够耐受一定浓度的新霉素 B, 但与基于酶的新霉素抗性基因耐受程度依然存在着不小的差距。

本文主要讨论了抗生素的 RNA 适配体作为类抗性基因的可行性, 得到以下结果: (1) 首次基于 tRNA 组装 RNA 适配体的方法成功建立了新霉素 B RNA 适配体的体内验证策略。含 RNA 适配体质粒的生长情况证实了 RNA 适配体可发挥类抗性基因的作用。(2) 经验证筛选得到的 2 种新霉素 B 的 RNA 适配体 A Site 和 Avirus 均能够体内发挥类抗性作用, 含上述 2 个 RNA 适配体重组质粒的细菌在固体培养基对新霉素 B 的最高耐受浓度为 19  $\mu\text{g/mL}$ 、液体培养基最高耐受浓度 30  $\mu\text{g/mL}$ 。本文首次提出并证实 RNA 适配体具有类抗性基因应用的潜力。通常, 原核质粒载体可载入外源基因大小为 1–10 kb, 而常用抗生素的抗性基因片段大小约为 800 bp, 可能会对载入大片段的基因有限制。因此, 实际应用中需要进行大片段外源表达基因载入质粒时, RNA 适配体作为类抗性基因可发挥重要作用。

综上所述, RNA 适配体可以作为类抗性基因, 其基因长度小的优势将有利于载入更长的表达基因片段或者多基因片段。本研究讨论了新霉素 B 的 RNA 适配体的类抗性基因功能, 所用研究策略可延伸用于其他抗生素分子的相关研究, 相信将有助于筛选更多具有类抗性基因功能的 RNA 适配体应用于分子克隆技术。

## REFERENCES

- [1] Mehlhorn A, Rahimi P, Joseph Y. Aptamer-based biosensors for antibiotic detection: a review[J]. *Biosensors*, 2018, 8(2): 54
- [2] Klauser B, Atanasov J, Siewert LK, Hartig JS. Ribozyme-based aminoglycoside switches of gene expression engineered by genetic selection in *S. cerevisiae*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2015, 4(5): 516-525
- [3] Ellington AD, Szostak JW. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands[J]. *Nature*, 1990, 346(6287): 818-822
- [4] Robertson DL, Joyce GF. Selection *in vitro* of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA[J]. *Nature*, 1990, 344(6265): 467-468
- [5] Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase[J]. *Science*, 1990, 249(4968): 505-510
- [6] Warner KD, Chen MC, Song WJ, Strack RL, Thorn A, Jaffrey S, Ferré-D'Amaré AR. Structural basis for activity of highly efficient RNA mimics of green fluorescent protein[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2014, 21(8): 658-663
- [7] Virgilio A, Amato T, Petraccone L, Esposito F, Grandi N, Tramontano E, Romero R, Haider S, Gomez-Monterrey I, Novellino E, et al. Improvement of the activity of the anti-HIV-1 integrase aptamer T30175 by introducing a modified thymidine into the loops[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 7447
- [8] Wang ZJ, Luo Y, Xie XD, Hu XJ, Song HY, Zhao Y, Shi JY, Wang LH, Glinsky G, Chen N, et al. *In situ* spatial complementation of aptamer-mediated recognition enables live-cell imaging of native RNA transcripts in real time[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2018, 57(4): 972-976
- [9] McCown PJ, Corbino KA, Stav S, Sherlock ME, Breaker RR. Riboswitch diversity and distribution[J]. *RNA*, 2017, 23(7): 995-1011
- [10] Howe JA, Wang H, Fischmann TO, Balibar CJ, Xiao L, Galgoci AM, Malinverni JC, Mayhood T, Villafania A, Nahvi A, et al. Selective small-molecule inhibition of an RNA structural element[J]. *Nature*, 2015, 526(7575): 672-677
- [11] Sun HG, Zhu X, Lu PY, Rosato RR, Tan W, Zu YL. Oligonucleotide aptamers: new tools for targeted cancer therapy[J]. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 2014, 3: e182
- [12] Song KM, Lee S, Ban C. Aptamers and their biological applications[J]. *Sensors*, 2012, 12(1): 612-631
- [13] Jayasena SD. Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics[J]. *Clinical Chemistry*, 1999, 45(9): 1628-1650
- [14] Charlton J, Sennello J, Smith D. *In vivo* imaging of inflammation using an aptamer inhibitor of human



- neutrophil elastase[J]. *Chemistry & Biology*, 1997, 4(11): 809-816
- [15] Ng EWM, Adamis AP. Anti-VEGF aptamer (Pegaptanib) therapy for ocular vascular diseases[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2006, 1082(1): 151-171
- [16] Werstuck G, Green MR. Controlling gene expression in living cells through small molecule-RNA interactions[J]. *Science*, 1998, 282(5387): 296-298
- [17] Fourmy D, Recht MI, Puglisi JD. Binding of neomycin-class aminoglycoside antibiotics to the A-site of 16S rRNA[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1998, 277(2): 347-362
- [18] Kim H, Lee MK, Ko J, Park CJ, Kim M, Jeong Y, Hong S, Varani G, Choi BS. Aminoglycoside antibiotics bind to the influenza RNA promoter[J]. *Molecular Bio Systems*, 2012, 8(11): 2857-2859
- [19] Hermann T, Westhof E. Aminoglycoside binding to the hammerhead ribozyme: a general model for the interaction of cationic antibiotics with RNA[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1998, 276(5): 903-912
- [20] Wallis MG, Von Ahsen U, Schroeder R, Famulok M. A novel RNA motif for neomycin recognition[J]. *Chemistry & Biology*, 1995, 2(8): 543-552
- [21] Weigand JE, Sanchez M, Gunnesch EB, Zeiher S, Schroeder R, Suess B. Screening for engineered neomycin riboswitches that control translation initiation[J]. *RNA*, 2008, 14(1): 89-97
- [22] Wang Y, Rando RR. Specific binding of aminoglycoside antibiotics to RNA[J]. *Chemistry & Biology*, 1995, 2(5): 281-290
- [23] Kwon M, Chun SM, Jeong S, Yu J. *In vitro* selection of RNA against kanamycin B[J]. *Molecules and Cells*, 2001, 11(3): 303-311
- [24] Story S, Skriba MJ, Maiti K, Nihar R, Degtyareva NN, Green KD, Khodaverdian V, Oyelere AK, Garneau-Tsodikova S, Arya DP. Synthesis, antimicrobial activity, attenuation of aminoglycoside resistance in MRSA, and ribosomal A-site binding of pyrene-neomycin conjugates[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2019, 163: 381-393
- [25] Anupam R, Denapoli L, Muchenditsi A, Hines JV. Identification of neomycin B-binding site in T box antiterminator model RNA[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2008, 16(8): 4466-4470
- [26] Auwardt SL, Seo YJ, Ilgu M, Ray J, Feldges RR, Shubham S, Bendickson L, Levine HA, Nilsen-Hamilton M. Aptamer-enabled uptake of small molecule ligands[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 15712
- [27] Ponchon L, Dardel F. Recombinant RNA technology: the tRNA scaffold[J]. *Nature Methods*, 2007, 4(7): 571-576
- [28] Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes[J]. *Methods in Enzymology*, 1990, 185: 60-89
- [29] Tisné C, Rigourd M, Marquet R, Ehresmann C, Dardel F. NMR and biochemical characterization of recombinant human tRNA<sub>3<sup>Lys</sup></sub> expressed in *Escherichia coli*: identification of posttranscriptional nucleotide modifications required for efficient initiation of HIV-1 reverse transcription[J]. *RNA*, 2000, 6(10): 1403-1412
- [30] Meinel T, Mechulam Y, Fayat G. Fast purification of a functional elongator tRNA<sup>met</sup> expressed from a synthetic gene *in vivo*[J]. *Nucleic Acids Research*, 1988, 16(16): 8095-8112
- [31] Li N, Huang X, Zou JW, Chen GY, Liu GT, Li M, Dong J, Du F, Cui X, Tang Z. Evolution of microbial biosensor based on functional RNA through fluorescence-activated cell sorting[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2018, 258: 550-557
- [32] Jiang LC, Majumdar A, Hu WD, Jaishree TJ, Xu WJ, Patel DJ. Saccharide-RNA recognition in a complex formed between neomycin B and an RNA aptamer[J]. *Structure*, 1999, 7(7): S1-S7
- [33] Zhao F, Zhao Q, Blount KF, Han Q, Tor Y, Hermann T. Molecular recognition of RNA by neomycin and a restricted neomycin derivative[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2005, 44(33): 5329-5334
- [34] Porter EB, Polaski JT, Morck MM, Batey RT. Recurrent RNA motifs as scaffolds for genetically encodable small-molecule biosensors[J]. *Nature Chemical Biology*, 2017, 13(3): 295-301
- [35] Shaw JP, Kent K, Bird J, Fishback J, Froehler B. Modified deoxyoligonucleotides stable to exonuclease degradation in serum[J]. *Nucleic Acids Research*, 1991, 19(4): 747-750