

• 研究简报 •

溶液 pH 和阳离子对端粒 G-四链体 DNA 形成和结构的影响

周 江 袁 谷*

(北京大学化学与分子工程学院化学生物学系 北京分子科学国家实验室 生物有机与分子工程教育部重点实验室
北京 100871)

摘要 采用电喷雾质谱和圆二色谱研究了溶液 pH 和阳离子对人类端粒 G-四链体 DNA 的影响. ESI-MS 和 CD 谱图表明, pH 可以引起 G-四链体 DNA 的构象转变和解离, 而 K^+ , NH_4^+ 阳离子对 G-四链体 DNA 的形成有着重要的促进作用.
关键词 端粒; G-四链体 DNA; ESI-质谱法; 圆二色谱

Effect of pH and Cations on the Formation and Structure of Human Telomeric G-Quadruplex DNA

ZHOU, Jiang YUAN, Gu*

(Beijing National Laboratory for Molecular Sciences and Key Laboratory of Bioorganic Chemistry and Molecular Engineering of Ministry of Education, Department of Chemical Biology, College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871)

Abstract Electrospray ionization mass spectrometry and circular dichroism were used to investigate the factors which affect the motif of the human telomeric quadruplex, such as pH and cations. ESI-MS and CD spectra indicated that pH could induce both the conformational transition and the dissociation of the quadruplex. Moreover, K^+ and NH_4^+ cations play an important role in the formation of the quadruplex.

Keywords telomere; G-quadruplex DNA; ESI mass spectrometry; circular dichroism

端粒是染色体末端一类特殊的结构, 它是由富含鸟嘌呤的重复序列构成. 人类端粒 DNA 含有大量 TTAGGG 重复单元, 除了其 2~10 kb 的双链部分外, 还有约 200 b 的单链部分^[1,2], 这部分单链富 G 序列可以缠绕折叠形成 G-四链体的结构^[3,4]. G-四链体是由 G-四分体堆积形成的, 每个 G-四分体则是由一个平面上的四个鸟嘌呤所构成, 每个鸟嘌呤都同时作为氢键的给体和受体(图 1A). 端粒酶的活性与细胞的恶性转化具有密切关系, 近年发现端粒富 G 序列形成的 G-四链体能够抑制端粒酶的活性, 说明 G-四链体对控制癌细胞可起重要作用. 探讨人体端粒 DNA G-四链体的形成、性质及小分子特异性的结合对抑制端粒酶活性的研究有着重要的意义^[5~7].

近年来, 电喷雾质谱(ESI-MS)被广泛地用来研究各类生物分子的结构和性质, 如蛋白质、双链 DNA、RNA 等^[8~16]; 但是用质谱研究 G-四链体 DNA 的报道^[17,18]很少, 对 G-四链体的形成、结构变化及影响因素用质谱法研究的更少. 我们报道了质谱法研究 XGGGGX 序列 G-四链体特殊的“自组装”现象及小分子与 G-四链体的相互作用^[19,20]. 然而, 在液相中影响 G-四链体形成和构象的因素不仅只有小分子, 溶液的 pH 以及阳离子都可能参与并影响 G-四链体的结构. 为此, 本研究选取人类端粒单链部分的 24 个碱基序列(5'-AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTT-3')探讨 G-四链体的性质, 目的是找出最能稳定化 G-四链体结构的溶液条件, 包括 pH 和

* E-mail: guyuan@pku.edu.cn

Received March 29, 2007; revised May 24, 2007; accepted June 21, 2007.

国家自然科学基金(Nos. 20272005, 20472009)资助项目.

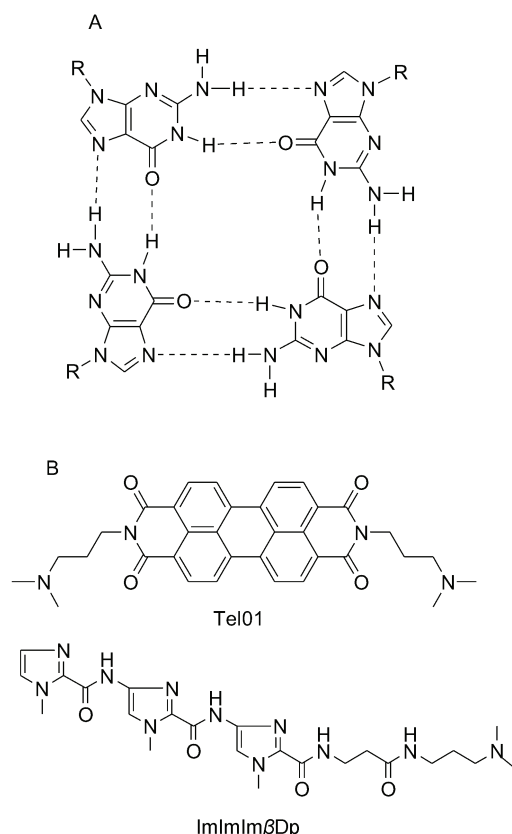


图 1 G-四分体平面(A)及识别分子(B)的结构(Tel01 和 ImImImβDp)

Figure 1 Structures of the G-quartet (A) and the ligands (B) (Tel01 and ImImImβDp)

阳离子;为了更好地研究端粒 DNA G-四链体构象的变化,使用聚酰胺(ImImImβDp)和二萘嵌苯的衍生物(Tel01)作为 DNA G-四链体的结合分子(ImImImβDp 分子对 G 碱基具有识别功能^[21],而 Tel01 分子的共轭芳环能以 π 堆积的方式与 G 平面有较强的亲和力^[22],图 1B)。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

质谱由 Thermo Finnigan 公司的 LCQ DECA XP plus 质谱仪(ESI-MS)测定。CD 谱是由 JASCO 公司的 J-810 圆二色谱仪测定。

寡聚酰胺分子(ImImImβDp)和二萘嵌苯的衍生物(Tel01)由本实验室合成^[23-25]。DNA 单链购自上海生工(Sangon)公司及北京奥科(Augct)公司。甲醇为色谱纯,醋酸和醋酸铵均为分析纯,水为二次去离子水。

1.2 试样的准备

DNA 单链经过在 90 °C 保持 10 min,然后缓慢冷却至室温(超过 4 h)退火,形成 G-四链体 DNA。G-四链体

DNA 试样是用 500 mmol·L⁻¹ NH₄OAc 溶液稀释制成 500 μmol·L⁻¹ 的溶液(NH₄OAc 最终浓度为 100 mmol·L⁻¹)。

小分子 ImImImβDp 和 Tel01 溶于甲醇/水(*V*:*V*=1:1)混合液中(Tel01 加入 0.1% HOAc 助溶),配制成 500 μmol/L 的溶液。

实验中将小分子的甲醇/水溶液和 DNA 的溶液等体积(各 2 μL)混合,用 MeOH 与 100 mmol·L⁻¹ 的 NH₄OAc (*V*:*V*=20:80)混合溶液稀释到 40 μL,稀释后保持醋酸铵的浓度约为 100 mmol·L⁻¹,同时 DNA 的浓度为 25 μmol·L⁻¹。

1.3 质谱条件

质谱的测试是用 Finnigan LCQ DECA XP plus 离子阱质谱仪(ESI-MS)进行测定,均采用负离子模式检测。样品以 2 μL/min 的速度直接喷雾。ESI 源的各项参数如下:喷雾电压 2~2.5 kV,加热毛细管温度 120 °C, N₂ 气流 20 arb。数据的采集和处理使用 Thermo Finnigan 公司的 Xcalibur 软件,每张谱图由 10 次扫描平均所得。

1.4 圆二色谱条件

圆二色谱的测试是用 JASCO J-810 圆二色谱仪进行测定的。采用的是 1 mm 样品池,扫描范围 200~350 nm,步长 0.1 nm,速度 100 nm/min,每张谱图由 3 次扫描平均所得。

2 结果与讨论

2.1 溶液 pH 对人类端粒 G-四链体 DNA 的影响

研究 DNA 在水溶液中的行为离不开溶液 pH 的影响,利用不同 pH 的缓冲溶液(由 NH₃/NH₄OAc/HOAc 配制, pH 由 3.5 到 12)可以研究溶液 pH 对 G-四链体形成及构象的影响。在不同 pH 下 G-四链体与小分子 Tel01 相互作用的质谱图如图 2 所示。从图 2 可看出,在 pH=6.5 的条件下,谱图的峰形较好, G-四链体 DNA 较为稳定;而在 pH=3.5 时,质谱图上加合峰较多,信噪比下降明显,但与小分子 Tel01 的结合峰较强(即使是退火以后的 G-四链体 DNA,仍然可以看到很强的结合峰);在较碱性的条件下(pH=12),质谱图信噪比很好,但几乎观察不到与小分子 Tel01 的结合峰。

图 3 显示了 G-四链体 DNA 在不同 pH 下与 ImImImβDp 的相互作用质谱图。对比 DNA 与 Tel01 结合峰的明显变化, G-四链体与寡聚酰胺分子(ImImImβDp)在不同 pH 下的结合峰(图 3)没有明显的变化,只是在 pH=6.5 时质谱图信噪比更好些;这是因为 ImImImβDp 不仅可以与 G-四链体结合,还可以与双链甚至单链 DNA 结合^[10],因此 pH 引起的 G-四链体解链

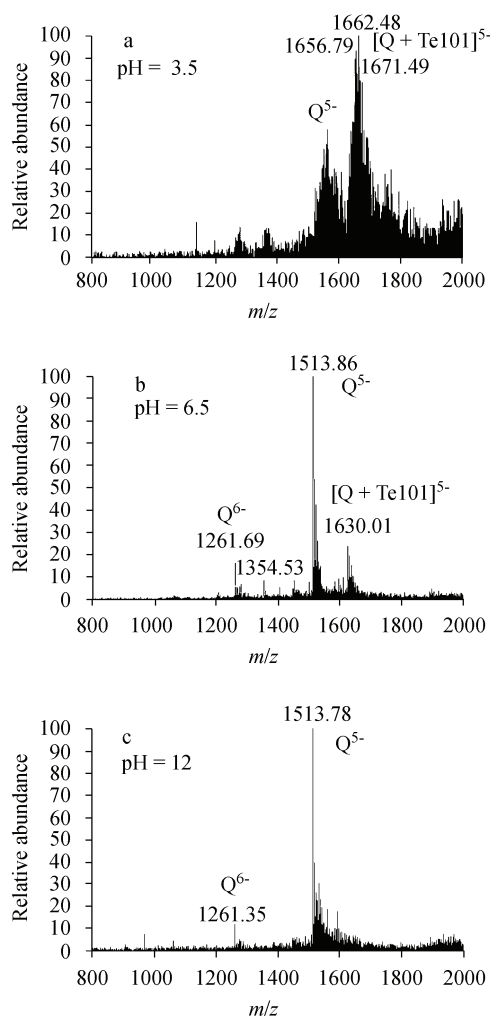


图2 G-四链体 DNA 在不同 pH 下与 Tel01 相互作用的质谱图

Q^{5-} 表示五电荷的 G-四链体离子, $[Q + \text{Tel01}]^{5-}$ 表示 G-四链体和 Tel01 的五电荷复合离子

Figure 2 ESI-MS spectra of Tel01 with G-quadruplex DNA at different pH

对于 ImImIm β Dp 与 DNA 的结合影响不大。

图 2, 3 显示的结果都说明 pH=6.5 时有利于 DNA G-四链体的形成. 为了验证质谱的结果, 利用圆二色谱对不同 pH 下的 G-quadruplex DNA 进行了测定。

CD 结果(图 4)显示, 当 pH=6.5 时, G-quadruplex DNA 在 260 nm 处有很强的正峰; 而 pH=3.5 时, 正峰出现在 295 nm 处. 295 nm 处的正峰对应于反向平行的 G-四链体构象; 而 260 nm 处的正峰则对应于正向平行的 G-四链体构象. 因此 CD 谱图指出, G-quadruplex DNA 在 pH=6.5 时主要是以正向平行的结构存在; 而 pH=3.5 时 G-quadruplex DNA 转化为反向平行的构象^[20]; 当 pH=12 时, 260 nm 处原来强的正峰变成了弱峰, 说明 G-四链体受到破坏, 因此 G-四链体与 Tel01 的结合峰也相应减弱或消失。

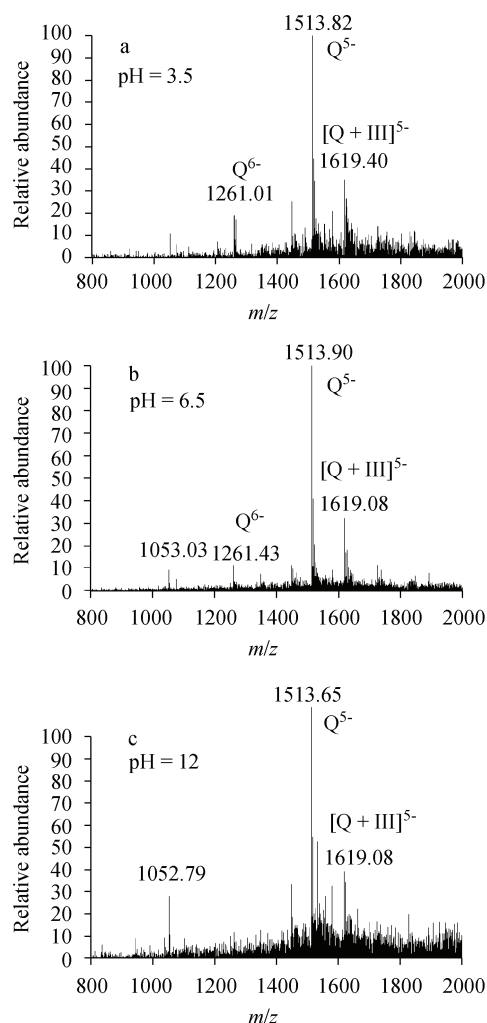


图3 G-四链体 DNA 在不同 pH 下与 ImImIm β Dp(标注为 III) 的相互作用质谱图

Figure 3 ESI-MS spectra of ImImIm β Dp (marked as III) with G-quadruplex DNA at different pH

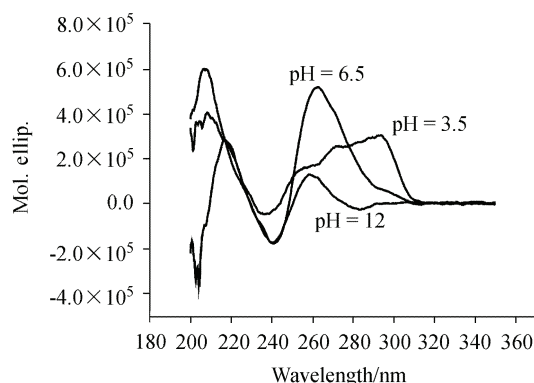


图4 G-四链体 DNA 在不同 pH 下的 CD 谱图

Figure 4 CD spectra of G-quadruplex DNA at different pH

2.2 阳离子对人类端粒 G-四链体 DNA 的影响

对于 5'-AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTT-3'序列, 图 5a 和 5b 列出了加入 NH_4^+ 和 K^+ 后的质谱图. 与

纯水中质谱图(图 5c)相比不难看出,在纯水中 5'-AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTT-3'序列主要是以 6-和 7-电荷峰为主,加合峰、电荷较多,这说明该构象的表面积较大,应该以伸展的单链形式为主;而引入阳离子后,7-和 8-电荷峰几乎不见,6-电荷峰也明显减弱,谱图以 5-电荷峰为主,且峰形锐利,说明此时的构象表面积减少,以收敛的 G-四链体为主.从 G-四链体本身结构考虑,2.1 节中 pH 变化引起的直接后果就是对阳离子 NH_4^+ 的影响,在较高的 pH 下,体系里的 NH_4^+ 都转化为 NH_3 ,失去了在 G-四链体中心参与 G 平面形成的作用;因此在 $\text{pH}=12$ 时 G-四链体的结构不稳定,小分子 Tel01 与 G-四链体的结合更加弱了.NMR 和分子模拟计算的结果也指出, G-四链体结构中 G 平面的形成需要阳离子的络合作用稳定其结构,因此阳离子对 G-四链体形成的影响是不可忽视的.

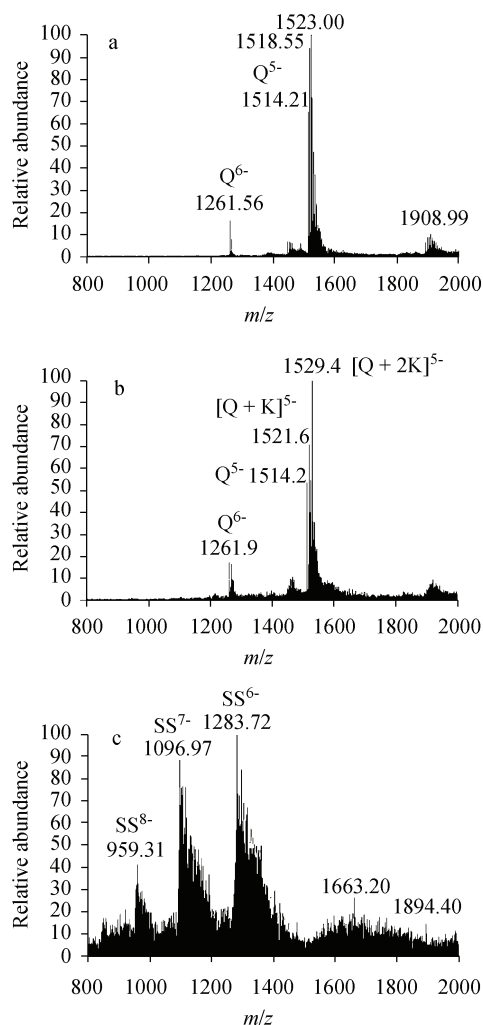


图5 端粒DNA在加入 NH_4^+ (a)和 K^+ (b)及纯水中(c)的质谱图

Figure 5 ESI-MS spectra of G-quadruplex DNA after adding NH_4^+ (a) and K^+ (b) cations, and in water without adding cations (c)

CD 谱图(图 6)也显示引入 NH_4^+ 和 K^+ 离子后, 260 nm 处的正峰增强, 说明此时以正向平行的 G-四链体 DNA 增加; 而纯水中 260 nm 处正峰很弱, 说明纯水中 G-四链体 DNA 较少, 以单链为主.

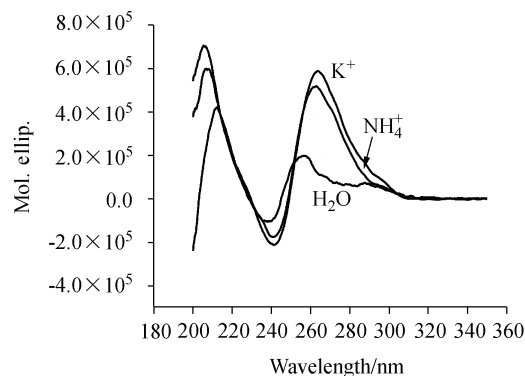


图6 不同阳离子下 G-四链体 DNA 的 CD 谱图

Figure 6 CD spectra of G-quadruplex DNA with different central cations after annealing

为了验证中心阳离子对于 G-四链体结构的作用, 对其它相似序列 DNA (TAGGGT)₄ 也进行了研究. 同样 NH_4^+ 和 K^+ 离子的引入使得质谱图相比于纯水中电荷数、加合峰都大大减少, 也说明阳离子使得 DNA 的构象更加收敛聚拢, 以 G-四链体的构象为主.

综上所述, ESI 质谱和 CD 谱的结果均表明 NH_4^+ 和 K^+ 对于稳定 G-四链体结构具有重要的作用.

3 结论

利用电喷雾质谱和圆二色谱研究了溶液 pH 和阳离子 (NH_4^+ 和 K^+) 对人类端粒 G-四链体 DNA 形成和结构的影响. 质谱和 CD 谱的结果指出, $\text{pH}=3.5$ 时, 构象转化为反向平行 G-四链体, 与 Tel01 结合较强; 而 $\text{pH}=12$ 时, 体系里的 NH_4^+ 都转化为 NH_3 , G-四链体的结构受到破坏, 与 Tel01 结合峰消失; 而在 $\text{pH}=6.5$ 的条件下有利于 G-四链体 DNA 的形成. 此外, 在纯水中引入 NH_4^+ 和 K^+ 离子后, DNA G-四链体极大增加, 说明阳离子对于稳定和维持 G-四链体结构具有重要的作用.

谨以此文敬贺张滂先生九十华诞.

References

- 1 Zakian, V. A. *Science* **1995**, 270, 1601.
- 2 Collins, K. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2000**, 12, 378.
- 3 Parkinson, G. N.; Lee, M. P. H.; Neidle, S. *Nature* **2002**, 417, 876.
- 4 Lavelle, F.; Riou, J. F.; Laoui, A.; Mailliet, P. *Crit. Rev.*

- Oncol. Hematol.* **2000**, *34*, 111.
- 5 Fletcher, T. M.; Sun, D. K.; Salazar, M.; Hurley, L. H. *Biochemistry* **1998**, *37*, 5536.
- 6 Hanahan, D.; Weinberg, R. A. *Cell* **2000**, *100*, 57.
- 7 Rezler, E. M.; Bearss, D. J.; Hurley, L. H. *Annu. Rev. Pharmac. Toxicol.* **2003**, *43*, 359.
- 8 Wan, K. X.; Shibue, T.; Gross, M. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 300.
- 9 Gabelica, V.; De Pauw, E.; Rosu, F. *J. Mass Spectrom.* **1999**, *34*, 1328.
- 10 Zhou, J.; Yuan, G. *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 1157.
- 11 Zhou, J.; Yuan, G.; Tang, F.-L. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, *20*, 2365.
- 12 Yamaguchi, K.; Sakamoto, S. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42*, 905.
- 13 Light-Wahl, K. J.; Springer, D. L.; Winger, B. E.; Edmonds, C. G.; Camp, D. G.; Thrall, B. D.; Smith, R. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 803.
- 14 Rosu, F.; Gabelica, V.; Houssier, C.; De Pauw, E. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, e82.
- 15 Smith, R. D.; Bruce, J. E.; Wu, Q. Y.; Lei, Q. P. *Chem. Soc. Rev.* **1997**, *26*, 191.
- 16 Loo, J. A. *Mass Spectrom. Rev.* **1997**, *16*, 1.
- 17 David, W. M.; Brodbelt, J.; Kerwin, S. M.; Thomas, P. W. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 2029.
- 18 Rosu, F.; Gabelica, V.; Houssier, C.; Colson, P.; De Pauw, E. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2002**, *16*, 1729.
- 19 Zhou, J.; Yuan, G.; Liu, J.; Zhan, C.-G. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 945.
- 20 Zhou, J.; Yuan, G. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 5018.
- 21 Dervan, P. B.; Burli, R. W. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 688.
- 22 Kern, J. T.; Thomas, P. W.; Kerwin, S. M. *Biochemistry* **2002**, *41*, 11379.
- 23 Xiao, J. H.; Yuan, G.; Huang, W. Q.; Chan, A. S. C.; Lee, K. L. D. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 5506.
- 24 Zhou, J.; Yuan, G. *Chin. J. Org. Chem.* **2003**, *23*, 526 (in Chinese).
(周江, 袁谷, 有机化学, **2003**, *23*, 526.)
- 25 Li, Q.-L.; Zhou, J.; Tang, F.-L.; Yuan, G. *Acta Chim. Sinica* **2005**, *63*, 834 (in Chinese).
(李钦玲, 周江, 汤菲力, 袁谷, 化学学报, **2005**, *63*, 834.)

(A0703297 ZHAO, C. H.)