

圆二色谱法研究碱基错配对 G-quadruplex 稳定性的影响^{*}

王文星^{1,2} 柳华杰² 王一丁^{1**} 杨 洋² 刘冬生^{2**}

(¹四川师范大学生命科学学院 成都 610068) (²国家纳米科学中心 北京 100080)

摘 要 通过将参与形成四链结构 G-quadruplex 的 G(鸟嘌呤)碱基分别替换为 T(胸腺嘧啶), C(胞嘧啶)和 A(腺嘌呤), 用圆二色谱系统地研究了不同位置的 G 对 G-quadruplex 结构稳定性的贡献. 结果表明, (1) 替换 G-quadruplex 结构中间层的 G 对其稳定性的影响最大; (2) 该序列及其错配序列大多数情况下在钾离子溶液中比钠离子溶液中稳定; (3) 某些特定位置的 G 被替换为 C 或 A 后序列的熔点与原始序列接近甚至高于原始序列.

关键词 G-quadruplex, 圆二色谱, 端粒, DNA

DNA 一般以双链形式存在, 同时也存在三链和四链结构. G-quadruplex 是四链结构的一种, 该结构是由富含 G(鸟嘌呤)的序列在 Na^+ 或 K^+ 溶液中形成, 其中每一层是 G 与 G 之间通过氢键形成 G-quartet 结构^[1] (见图 1). 此结构可以由 4 条, 2 条或 1 条核酸构成^[2-4].

为了进一步了解该结构, 我们系统也将 d[AGGG(TTAGGG)]_3 中的 G 替换为 T(胸腺嘧啶), A(腺嘌呤)或 C(胞嘧啶), 通过对圆二光谱^[5,6] 谱及热力学数据进行分析, 发现 (1) 中间层的 G 对 G-quadruplex 结构的稳定性起着重要作用; (2) 该序列的错配序列大多数情况下在钾离子溶液中比钠离子溶液中稳定; (3) 有些位置的 G 被替换为 C 或 A 后序列的熔点与原始序列接近甚至高于原始序列. 此结果与 G-quadruplex 在钾离子溶液中成平行和反平行的混合结构的观点一致. 此研究有利于我们对该结构的进一步了解从而对以四链结构为基础的核酸纳米线、纳米器件构建以及基因调控, 细胞凋亡, 癌症治疗有着重要意义.

1 实验部分

1.1 方法和材料

实验所用的 DNA 购于北京赛百盛基因技术有限公司 (序列见表 1). M-OS 是原始序列 [AGGG(TTAGGG)]_3 (见图 1b), 命名时兼顾其所在溶液和第几位被替换, 如 MNa-2T 表示在钠离子溶液中

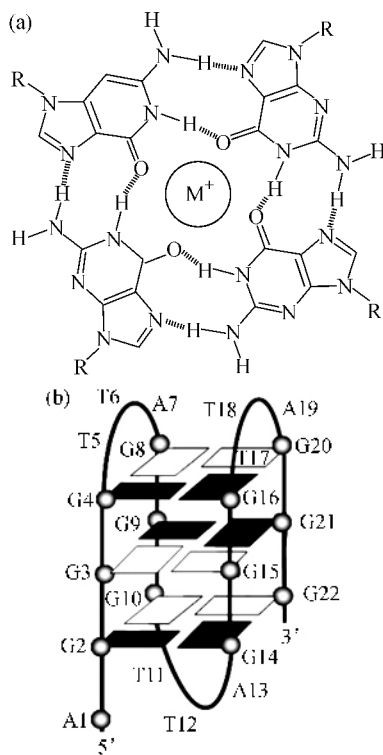


Fig. 1 The structure of the G-quartet and G-quadruplex
a) The G-quartet; b) A unimolecular G-quadruplex in Na^+ solution;
Black and white boxes represent guanine bases in the anti and syn conformations, respectively.

从 5' 端起第二个位点被替换为 T. 样品溶于含 100 mmol/L NaCl/KCl , $\text{pH} = 7$ 的 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液得到样品终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的溶液, 之后加热至 95 $^{\circ}\text{C}$ 保持 5 min 然后缓慢降至室温.

^{*} 2007-04-04 收稿, 2007-06-27 修稿. 国家自然科学基金 (基金号 20573027, 30670218, 50625312) 和国家重点基础研究发展计划 (973 计划, 项目号 2005CB724701, 2006CB705601) 资助项目; ** 通讯联系人, E-mail: wwyiding@163.net; liuds@nanoctr.cn

Table 1 Names of G-quadruplex forming oligonucleotides and their mismatched analogs

Oligo series	Sequence(5'→ 3')	Oligo series	Sequence(5'→ 3')
M-OS	AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG	M-8C	AGGGTTACGGTTAGGGTTAGGG
M-2T	ATGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG	M-9C	AGGGTTAGCCTTAGGGTTAGGG
M-3T	AGTGTTAGGGTTAGGGTTAGGG	M-10C	AGGGTTAGGCCTTAGGGTTAGGG
M-4T	AGGTTTAGGGTTAGGGTTAGGG	M-2A	AAGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG
M-8T	AGGGTTATGGTTAGGGTTAGGG	M-3A	AGAGTTAGGGTTAGGGTTAGGG
M-9T	AGGGTTAGTGTTAGGGTTAGGG	M-4A	AGGATTAGGGTTAGGGTTAGGG
M-10T	AGGGTTAGCTTAGGGTTAGGG	M-8A	AGGGTTAAGGTTAGGGTTAGGG
M-2C	ACGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG	M-9A	AGGGTTAGAGTTAGGGTTAGGG
M-3C	AGCGTTAGGGTTAGGGTTAGGG	M-10A	AGGGTTAGGATTAGGGTTAGGG
M-4C	AGGCTTAGGGTTAGGGTTAGGG		

[AGGG(TTAGGG)₃] is the original sequence.

1.2 圆二色光谱

圆二色谱在 Jasco-810 型 CD 光谱仪(配备变温度附件)上进行测定,采用 1 mm 样品池,在 220 ~ 320 nm 范围内扫描,扫描速度是 500 nm/s,温度为 5℃,扫描 5 次.变温处理时以每分钟 0.5℃的速度从 5℃加热到 95℃.变温过程是在 290 nm 附近的吸收峰对应的波长下进行^[7].

1.3 圆二色光谱的热力学分析

我们设一条序列全部形成 G-quadruplex 时其 CD 信号(mdeg 即 deg·cm²/dmol)为 C',当全部为单链时其 CD 信号为 A',其间任何一点其 CD 信号为 X,则平衡常数 K 可表示为:

$$K = \frac{C' - X}{X - A'}$$
 (1)

根据热力学第二定律:

$$\Delta G = - RT\ln K = \Delta H - T\Delta S$$
 (2)

得
$$X = C' + \frac{A' - C'}{1 + \exp(\Delta H/RT - \Delta S/R)}$$
 (3)

另 C' = C, A' - C = A 得:

$$X = C + \frac{A}{1 + \exp(\Delta H/RT - \Delta S/R)}$$
 (4)

由公式(4)通过 Origin 软件对变温曲线拟合之后进行分析,得到相应的 ΔH,ΔS 从而得到 ΔG^[8],以 MNa-8A 为例求出对应的 ΔS,ΔH 从而求出 ΔG(见图 2).

2 结果与讨论

2.1 d [AGGG(TTAGGG)₃]序列(M 序列)钠离子条件下将 G 换成 T,A 或 C

圆二色光谱可用于区分平行和反平行的 G-quadruplex 结构.前者在 260 nm 处有一个正的吸收峰在 240 nm 附近有一个负的吸收峰^[7,9].而后者在 290 nm 附近存在一个正的吸收峰在 265 nm

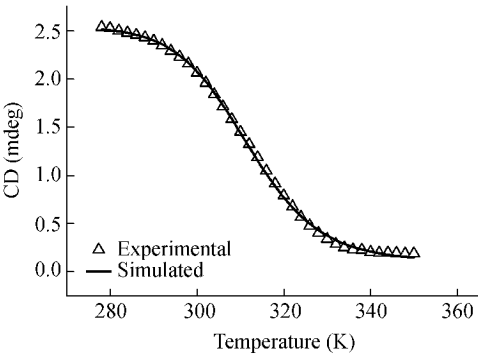


Fig. 2 Temperature dependence of CD measurements
ΔH and ΔS of the G-quadruplex are (− 97.1 ± 0.4) kJ/mol and (− 311.5 ± 1.4) J/(K·mol) giving a ΔG at 5℃ of − 10.4 kJ/mol ; The oligos were prepared at 10 mmol/L strand concentration in 10 mmol/L tris-HCl buffer at pH 7.0 containing 100 mmol/L NaCl ;The G-quadruplex solutions were recorded in the 5℃ to 95℃ temperature range, using a scan rate of 0.5 K/min and following the variation of CD absorption at its peak 295 nm.

附近存在一个负的吸收峰^[10].以下是我们的试验结果.

将 G 换成 T,A 或 C 后多数结构仍然具有 G-quadruplex 在钠离子溶液下的特征谱线,即在 290 nm 附近有正的吸收峰在 265 nm 附近有负的吸收峰(图 3a,3b,3c),但 MNa-9C 其一个吸收峰在 282 nm 附近(图 3c).相对于其他序列此序列在 245 nm 处的吸收峰较低一些.以该序列将 G 换成 T 的变温曲线为例(图 3d),对应的 T_m 值见表 2(对于将序列中的 G 换成其它碱基的图像与此类似,升降温曲线的熔点一致图中是升温曲线).

为了表述方便,把 ΔT_m ≤ 3 的用“ ≈ ”表示;把 3 < ΔT_m ≤ 7 用“ < ”表示;将 7 < ΔT_m 的用“ < < ”表示.

将 G 换成 T 结果如下:

MNa-3T ≈ MNa-8T < < MNa-4T ≈ MNa-10T ≈ MNa-2T < < MNa-OS

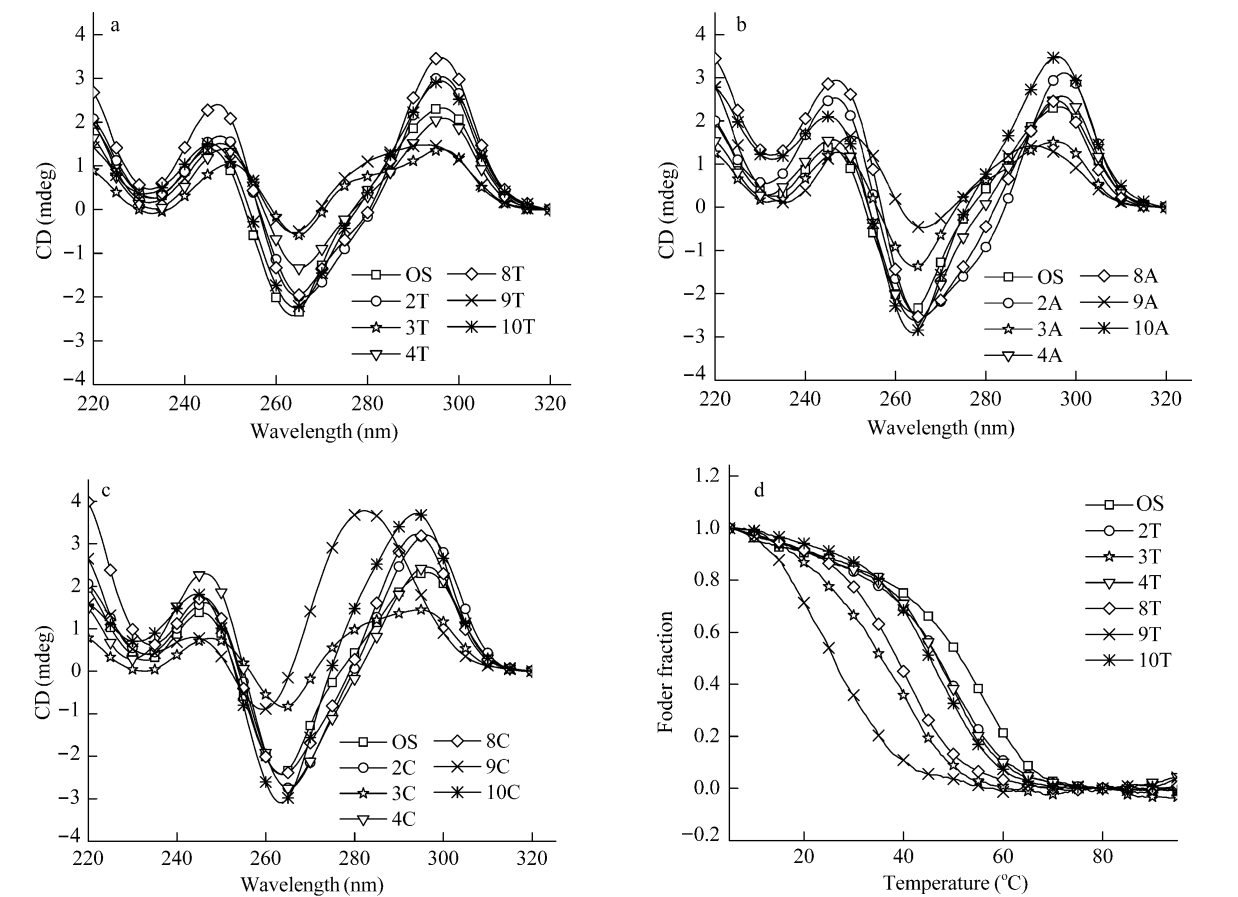


Fig. 3 The variation of CD spectra for G-quadruplex in Na⁺ buffer with substitution of (a) T for G, (b) A for G, (c) C for G and (d) temperature dependence of foder fraction for G-quadruplex with substitution of T for G

Table 2 Names and melting temperatures (T_m or $T_{1/2}$) of G-quadruplex forming oligonucleotides and their mismatched analogs

Oligo series	T_m (Na ⁺) (°C)	ΔG (Na ⁺) (J/mol)	T_m (K ⁺) (°C)	ΔG (K ⁺) (J/mol)
M-OS	56.0	-19513.5	65.0	-30352.4
M-2T	49.0	-16692.0	55.5	-24521.7
M-3T	38.5	-10805.0	35.0	-12103.9
M-4T	50.0	-21015.8	54.5	-26304.0
M-8T	41.5	-15160.2	51.5	-26129.9
M-9T	25.0	-6733.3	35.5	-12731.1
M-10T	48.0	-18823.8	59.0	-29585.5
M-2C	54.5	-19830.9	56.0	-24515.6
M-3C	35.0	-7677.6	32.2	-7422.8
M-4C	57.0	-23416.8	58.8	-28083.0
M-8C	42.5	-16058.7	55.5	-25270.1
M-9C	22.5	-4899.7	40.5	-6443.9
M-10C	61.0	-29072.1	60.5	-28621.1
M-2A	57.5	-22015.1	55.5	-29900.4
M-3A	29.0	-7775.7	30.0	-9084.6
M-4A	43.5	-14855.4	52.2	-25355.1
M-8A	39.0	-10423.7	54.5	-29129.3
M-9A	20.0	-4390.8	35.5	-8752.4
M-10A	43.0	-10501.1	56.0	-30673.9

* The oligos were prepared at 10 mmol/L strand concentration in 10 mmol/L tris-HCl buffer at pH 7.0 containing 100 mmol/L NaCl or 100 mmol/L KCl ;The G-quadruplex solutions were recorded in the 5°C to 95°C temperature range, using a scan rate of 0.5 K/min and following the variation of CD absorption at its peak 295 nm.

将 G 换成 A 结果如下：

$MNa-3A < < MNa-8A < MNa-4A \approx MNa-10A < < MNa-2A \approx MNa-OS$

G 换成 C 后结果如下：

$MNa-3C < < MNa-8C < < MNa-4C \approx MNa-2C \approx MNa-OS < MNa-10C$

2.2 d[AGGG(TTAGGG)₃] 序列钾离子条件下将 G 换成 T,A 或 C

在钾离子溶液中将 G 换成 T,A 或 C 后同样大多数谱线仍然具有 G-quadruplex 谱线的特征,而且 2,4,8,10 位替换后谱线在 265 nm 处的负峰更为明显(见图 4)。

其中 M 序列的第 9 位被替换后谱线较为异常 MK-9T,MK-9A ,MK-9C 在 245 nm 附近的吸收峰消失.MK-9C 在 282 nm 处有一个正的吸收峰.其 T_m 值(见表 2)呈现如下特点：

将 G 换成 T 后结果如下：

$MK-3T < < MK-8T < MK-2T \approx MK-4T < MK-10T < MK-OS$

将 G 换成 A 后结果如下：

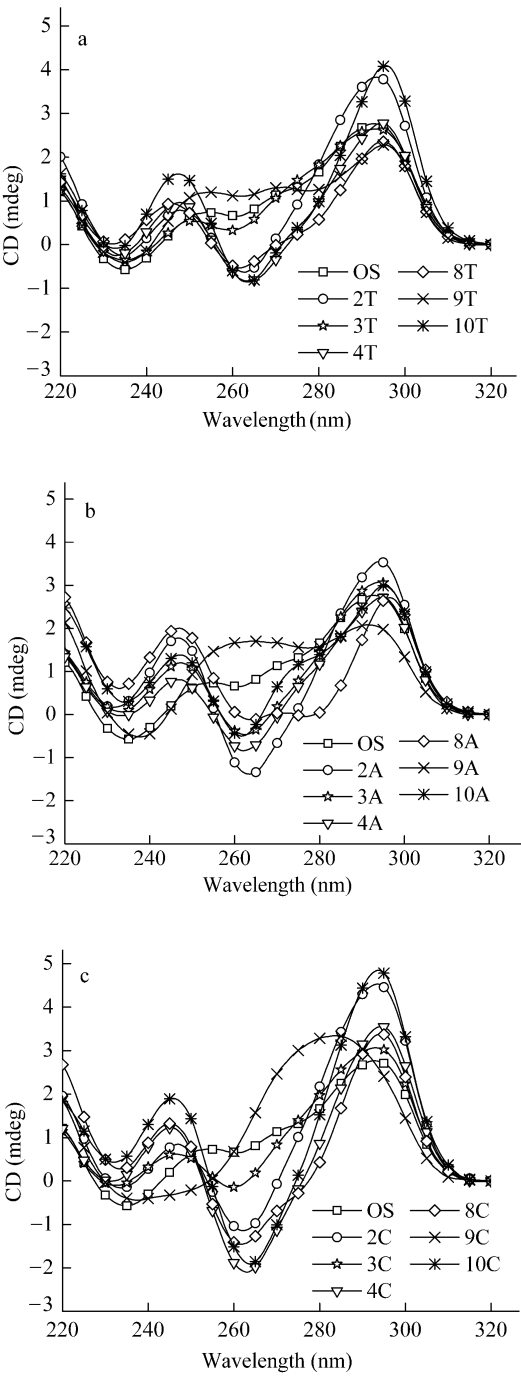


Fig. 4 The variation of CD spectra for G-quadruplex in K⁺ buffer with substitution of (a) T for G, (b) A for G and (c) C for G

MK-3A < < MK-8A ≈ MK-2A ≈ MK-4A ≈ MK-10A < MK-OS

将 G 换成 C 后结果如下：

MK-3C < < MK-8C ≈ MK-2C ≈ MK-4C ≈ MK-10C < < MK-OS

2.3 第 9 位被替换的序列

在钠离子溶液中第 9 位被替换后 MNa-9C 的

谱线形状和原始序列差异较大, MNa-9T 和 MNa-9A 谱线和原始序列谱线接近, 替换后熔点下降最多. 在钾离子溶液中第 9 位被替换后谱线和原始序列的谱线差异很大基本不具备 G-quadruplex 谱线的特征, 同时熔点下降也较多. 由此可见 9 位对稳定其结构有着非常重要的作用, 其被替换后多数序列不能形成的标准的 G-quadruplex 结构.

2.4 第 3 位被替换的序列

无论在钠离子还是在钾离子溶液中第 3 位被替换后, 序列的熔点都有较大程度的下降, 但仍然具有 G-quadruplex 的特征谱线. 当其被替换其可能形成了稳定性比较差的 G-quadruplex 结构.

由于这 9 位点和 3 位点恰好位于原始序列形成 G-quadruplex 的中间层, 我们推测可能是由于这个位置的 G 被替换后, 不仅破坏了氢键而且破坏了层与层之间的碱基堆积力.

2.5 熔点分析

在钠离子溶液中, 第 8 位被替换熔点较一、三层其他位点被替换降低较多, 甚至接近 3 位点被替换后的熔点. 将 2, 4, 10 位替换成 C 和原始序列熔点接近.

对于钠离子溶液中序列的 8 位替换后熔点较低接近 3 位替换后的熔点, 其原因可能是, 当温度升高时 G-quadruplex 结构解体可能有 3 种方式, 第一种方式 5' 端氢键被破坏; 第二种方式 3' 端氢键被破坏; 第三种方式 4, 5, 6, 7, 8 位点构成的平面和 17, 18, 19, 20, 21 位点构成的平面间的氢键破坏. 当 8 位和 10 位被替换后, 这三种解体方式得到了不同程度的促进, 8 位被替换后比 10 位被替换使第三种解体方式更容易发生, 我们推测很可能是由于 8 位替换后这种对结构影响的综合效应大于 10 位被替换的情况使得 8 位被替换后的结构熔点更低. 至于 8 位在维持结构稳定性比 4 位更重要的原因和 9 位比 3 位更重要的原因可能很相似, 即 8 位和 3 位更靠近内侧.

将 2, 4, 10 位替换为 T 熔点接近, 将 4, 10 位替换为 A 熔点接近且都低于原始序列熔点. 主要原因可能是由于这些位点被替换后, 使得相应氢键被破坏从而导致熔点降低. 而它们熔点接近也可能反映了它们在维持结构稳定性上的地位相近.

将 G 替换为 C 的时 2, 4, 10 与原始序列熔点接近甚至高于原始序列的熔点, 已有报道过 G·C·G·C 可以形成稳定的 quartet^[11-13]. 我们推测将一

个位点替换成 C 后可能形成稳定的 G·C·G·G quartet 平面. 由于其中的 C 仍可以和附近的 G 形成氢键并且和 G-quartet 中的 G·G 之间的氢数量一样. 很可能仍然形成一个稳定的平面 (见图 5).

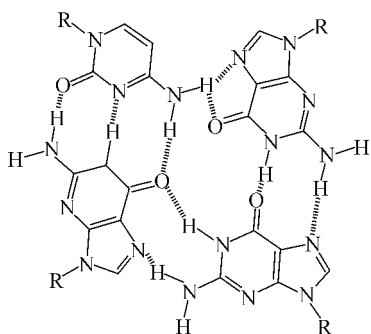


Fig. 5 The structure of G·C·G·G quartet

在钾离子溶液中, 总体上看, 三层位点被替换后各位点的熔点要比在钠离子溶液下更接近, 一, 三层上的位点对结构稳定性贡献比钠离子溶液中更均一, 它们在结构中的地位也很可能更接近.

2.6 钾离子溶液中 G-quadruplex 的结构

已有报道发现人体内端粒区核酸序列 $d[AGGG(TTAGGG)_3]$ 在钠离子和钾离子的作用下形成不同的结构, NMR 研究表明在钠离子溶液状态下会形成如图 1 (b) 的反平行结构, X-ray 衍射研究表明在钾离子存在的晶体结构中其形成平行结构^[14], 但在钾离子溶液中的结构却一直没有定论, 通过荧光和沉降系数等方法研究表明其结构和晶体状态的结构不同^[15]. 最近, NMR 等方法研究表明其是平行和反平行的混合结构^[16~18]. 而我们通过简单的替换也得到与此相同的结论.

在钾离子溶液中, 2, 4, 8, 10 位替换后谱线在 265 nm 处的负峰更为明显, 其谱线更接近于反平行结构的谱线. 而 3 位替换后其谱线与原始序列的谱线更接近. 因此我们推测在钾离子溶液中将 2, 4, 8, 10 位替换后图 6 (b) 中平衡有向右移动的趋势, 而将 3 位替换后该平衡基本没被打破. 其原因可能是平衡左侧的 5, 6, 7 位点形成的 loop 所承受较大的张力. 如图 6 (b) 当 2 位点被替换后第一片层被破坏 8 位点由于没有形成 quartet 结构很容易受张力影响使得图 6 (a) 左侧结构不稳定, 而其右侧结构受到的影响很小. 4, 8, 10 位点被替换的情况与此相同. 然而图 6 (c) 中当 3 位点被替换后, 虽然 5, 6, 7 形成的 loop 承受很大的张力但 4, 8 位

点所在的 G-quartet 没有被破坏使得该平衡仍然存在. 另外 2, 4, 8, 10 位替换后平衡右侧的顺式结构比左侧的多, 而 3 位替换后右侧和左侧的顺式结构数量相同. 虽然没有找到顺式结构和稳定性相关的证据, 但这种顺反结构的不对称可能是造成这一结果的一个原因. 这和近期发现的钾离子溶液中 G-quadruplex 结构为平行和反平行混合结构^[18]相一致.

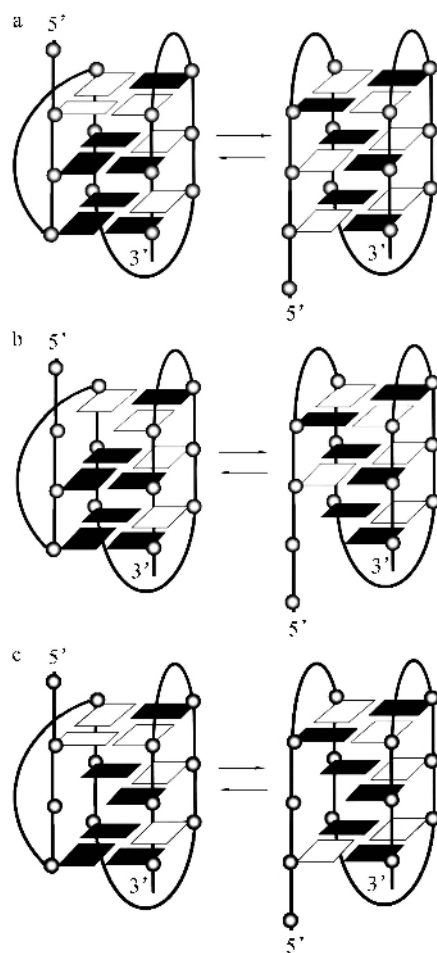


Fig. 6 The mismatch G-quadruplex in K^+ , X is the substituted base
a) G-quadruplex in K^+ + buffer; b) $d[AXGG(TTAGGG)_3]$ in K^+ + buffer; c) $d[ACXG(TTAGGG)_3]$ in K^+ + buffer

从整体上看大多数序列, 对应位点替换后的在钾离子溶液中序列的熔点高于钠离子溶液中序列的熔点. 其原因可能和原始序列在钾离子溶液中熔点大于在钠离子溶液中熔点相同. 即和离子的水合能有一定关系^[10, 19~21].

综上所述, 通过错配的方式对 G-quadruplex 进行了研究, 用圆二色谱系统地研究了不同位置的 G 对 G-quadruplex 结构稳定性的贡献, 得到以下结论 (1) 替换 G-quadruplex 结构中间中间层

的 G 对其稳定性的影响最大 ;(2) 该序列及其错配序列大多数情况下在钾离子溶液中比钠离子溶液中稳定 ;(3) 某些特定位置的 G 被替换为 C 或 A 后序列的熔点与原始序列接近甚至高于原始序

列 . 此研究有利于人们对该结构的进一步了解, 而对以四链结构为基础的核酸纳米线、纳米器件构建以及基因调控, 细胞凋亡, 癌症治疗有着重要意义 .

REFERENCES

1 Gellert M,Lipsett M N,Davies D R.Proc Natl Acad Sci USA,1962,48 2013 ~ 2018
2 Wang Y,Patel D J.Biochemistry,1992,31 8112 ~ 8119
3 Frank-Kamenetskii M,Nature,1992,356 105 ~ 105
4 Wang Y,Patel D J.Structure,1993,1 263 ~ 282
5 Song Jinfeng(宋金峰),Zou Xiaowei(邹小伟) . Acta Polymerica Sinica(高分子学报),2006,(8) 1007 ~ 1012
6 Li M Y,Bidez P,Guterman-Tretter E,Guo Y,MacDiarmid A G,Lelkes P I,Yuan X B,Yuan X Y,Sheng J,Li H,Song C X,Wei Y. Chinese J Polym Scie,2007,25(4) 331 ~ 339
7 Balagurumoorthy P,Mohanty D,Bansal M.Nucleic Acids Res,1992,20 4061 ~ 4067
8 MergnyJ L,Lacroix L. Oligonucleotides,2003,13 515 ~ 537
9 Lu M,Guo Q,Kallenbach N R.Biochemistry,1992,31 2455 ~ 2459
10 Sen D,Gilbert W. Nature,1990,344 410 ~ 414
11 Leonard G A,Peterson M R. Structure,1995,3 335 ~ 340
12 Kettani A,Patel D J.J Mol Biol,1995,254 638 ~ 656
13 Abdelali K,Serge B. J Mol Biol,1998,282 619 ~ 636
14 Parkinson G N, Lee M P H, Neidle S. Nature,2002,417 876 ~ 880
15 Li J,Correia J J,Wang L,John O. Nucleic Acids Research,2005,33 4649 ~ 4659
16 Ambrus A,Chen D,Dai J X,Yang D Z. Nucleic Acids Res,2006,34 2723 ~ 2735
17 Kim N L,Anh T P,Dinshaw J P. J Am Chem Soc,2006,128 9963 ~ 9970
18 Yan X,Yuki N,Hiroshi S. Bioorg Med Chem,2006,14 5584 ~ 5591
19 Ross W S,Hardin C C. J Am Chem Soc,1994,116 6070 ~ 6080
20 Hud N V,Smith F W,Feigon J. Biochemistry,1996,35 15383 ~ 15390
21 Gu J D,Leschczynski J. J Phys Chem A,2002,106 529 ~ 532

CIRCULAR DICHROISM STUDY ON THE STABILITY OF MISMATCHED G-QUADRUPLIX

WANG Wenxing^{1,2}, LIU Huajie², WANG Yiding¹, YANG Yang², LIU Dongsheng²

(¹ College of Life Sciences, Sichuan Normal University, Chengdu 610068)

(² National Center for Nanoscience and Technology, Beijing 100080)

Abstract It is well reported that human telomeric DNA sequence [AGGG(TTAGGG)₃] can form a well-defined quadruplex structure with the hydrogen bonds between guanine bases in the appearance of K⁺ and Na⁺. It was reported that the formation and stability of the structure was meaningful for both gene regulation and apoptosis. In this study, the replacement of guanine bases in this sequence with thymine, adenine and cytosine at different position was carried out respectively. Their ability to form G-quadruplex as well as the G-quadruplex stability has been studied by circular dichroism (CD) spectroscopy.

All oligonucleotides were synthesized and purified by Saibaisheng company. The concentrations of the oligonucleotides, expressed in single strand molarity, were determined by UV absorption at 260 nm using a 'nearest-neighbor' approximation.

Circular dichroism experiments were performed on a JASCO model J-810 circular dichroism spectropolarimeter equipped with a Peltier temperature controller. All samples (10 μmol/L in 10 mmol/L Tris-HCl buffer containing 100 mmol/L NaCl at pH 7) were preheated to 95°C for 5 min and slowly cooled to room temperature prior to measurements. A 1 mm path length cell was used for all measurements, and each spectrum was an average of five scans at 5°C. The G-quadruplex solutions were recorded in the 5°C to 95°C temperature range, using a scan rate of 0.5 K min⁻¹ and following the variation of CD absorption at its peak around 295 nm.

Analysis of the thermal curves was performed by using the software origin. Van't Hoff thermodynamic analysis was carried out for the intramolecular G-quadruplex oligonucleotides. Their thermal reversibility (superimposable heating and cooling profiles) allowed the calculation of the value of the equilibrium constant (*K*) assuming a two-state model. Application of the Van't Hoff equation ($\ln K = -\Delta H/RT + \Delta S/R$) yielded to the determination of the enthalpy (ΔH) and entropy (ΔS) of the process, as described elsewhere.

Results show that the replacement of guanine bases in the middle of the three stacking quartets brings the biggest influence on the stability of the formed G-quadruplex. Data also show that potassium ions bring more stability than sodium ions to the formed G-quadruplex in most cases. It is very interesting to find that, when guanine base is replaced by cytosine or adenine at specific sites, the formed structure has comparable or even higher stability as the original sequence.

Keywords G-quadruplex, Circular Dichroism, Telomere, DNA