

• 研究论文 •

电喷雾电离质谱法研究环肽对 HIV-1 调控区 DNA 的识别及其相关碎裂机理和稳定性

李卉卉^{a,b} 郑波^a 叶蕴华^a 袁谷^{*,a}

(^a 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)

(^b 南京师范大学化学与环境科学学院 江苏省生物功能材料重点实验室 南京 210097)

摘要 利用电喷雾电离质谱(ESI-MS)和二级质谱(MS/MS)研究了六种结构不同的环五肽, 环七肽以及环十肽与 HIV-1 调控区 DNA 的非共价键相互作用. 在研究中比较了不同识别分子与靶序列 DNA 结合的强弱, 发现环七肽 CP5 对靶点 DNA 具有高亲和性的结合. 用 MS/MS 法研究了环肽与 DNA 复合物的碎裂机理; 用升温实验研究了其热稳定性, 发现与 CP5 结合后能提高 HIV-1 双螺旋 DNA 的热稳定性.

关键词 HIV-1 基因; ESI-质谱法; DNA 识别; 环肽

DNA-Recognition of Cyclic Peptides in Regulatory Region of HIV-1 Gene by Electrospray Ionization Mass Spectrometry

Li, Huihui^{a,b} Zheng, Bo^a Ye, Yunhua^a Yuan, Gu^{*,a}

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

(^b Jiangsu Key Laboratory of Biofunctional Materials, School of Chemistry and Environmental Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097)

Abstract Electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) was utilized to investigate the recognition of six cyclopeptides (cyclopentapeptides, cycloheptapeptides and cyclodecapeptide) in the regulatory region of HIV-1 gene. It was found that cyclic peptide CP5 had the higher binding affinity with the HIV-1 DNA, and ESI MS/MS data revealed that the CP5 stabilized the target duplex DNA.

Keywords HIV-1 gene; ESI-MS; DNA-recognition; cyclic peptide

在全球范围内艾滋病(AIDS)对人类危害极大, 因此关于艾滋病新药的研究和开发受到广泛的关注. 目前, 临床上治疗艾滋病的药物以逆转录酶抑制剂和蛋白酶抑制剂为主, 两者联合使用可有效抑制病毒的复制. 但是长期用药可产生多重耐药性、毒副作用等问题^[1]. 因此, 需要不断探索治疗艾滋病的新靶点、新药和新的治疗方案, 以发展更有效的防治措施. HIV-1 作为艾滋病流行的主要病毒, 其基因的调控区存在一些特征活性蛋

白质的结合位点, 可以作为药物作用的新靶点. 因此, 如果能发现具有特异性识别能力的生物活性分子结合该调控区的 DNA, 进而影响 DNA 结构的稳定性, 阻断活性蛋白质的结合, 就有可能抑制病毒基因的转录与表达过程, 起到抑制病毒增殖的作用^[2].

许多环肽具有重要的生物活性, 如抗病毒、抗肿瘤活性. 环肽分子的环状骨架能够有效地插入双螺旋 DNA 沟区中, 与特定靶点进行高亲和性的结合^[3~5]. 本

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

Received March 10, 2009; revised April 1, 2009; accepted April 28, 2009.

国家自然科学基金(No. 20472009)资助项目.

研究选择了六种结构不同的环五肽, 环七肽与环十肽 CP1~CP6(表 1 和图 1), 以 HIV-1 基因调控区 12 个碱基对(5'-AAGCAGCTGCTT-3')为靶点^[2], 使用电喷雾电离质谱(ESI-MS)和二级质谱(MS/MS)研究环肽与 HIV-1 DNA 的相互作用, 比较不同结构的环肽对此 12 个碱基对 DNA 亲和能力的大小, 探讨结合模式, 寻找能够识别靶点 DNA 的生物活性小分子。

表 1 环肽分子的结构式
Table 1 Structures of the cyclic peptides

CP _n	Structure (MW)
CP1	c(Ala-Tyr-Leu-Ala-Gly) (475)
CP2	c(Ala-Tyr-Leu-Ala-Gly) ₂ (950)
CP3	c(Pro-Tyr-Leu-Ala-Gly) (501)
CP4	c(Pro-D-Tyr-Leu-D-Ala-Gly) (501)
CP5	c(Gly-Ile-Pro-Tyr-Ile-Ala-Ala) (685)
CP6	c(Gly-Tyr-Leu-Phe-Pro-Ile-Pro) (787)

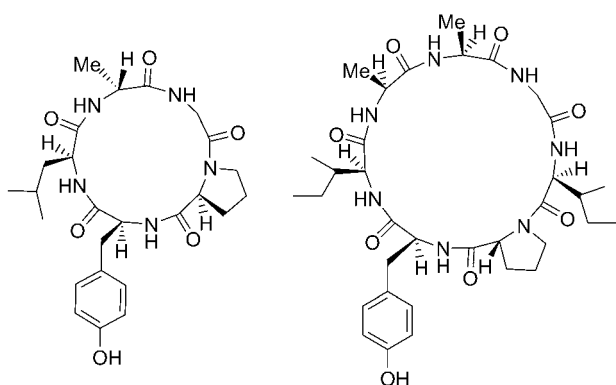


图 1 环肽 CP3 和 CP5 的结构式

Figure 1 Structures of the cyclic peptides (CP3 and CP5)

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。

环肽化合物 CP1~CP6 由叶蕴华实验室唐艳春, 刘勉合成, 经高效液相色谱纯化^[6-8]。

DNA 单链(ss: 5'-AAGCAGCTGCTT-3')购自北京奥科(Augct)公司。

甲醇为色谱纯, 乙酸和乙酸铵均为分析纯, 水为二次去离子水。

1.2 试样的制备

将 5'-AAGCAGCTGCTT-3' DNA (1.0 mmol/L)的乙酸铵(500 mmol/L)溶液, 经过退火, 即在 85 °C 保持 10 min, 然后缓慢冷却至室温(超过 4 h), 得到 500 μmol/L

的双螺旋 DNA 溶液。

环肽 CP1~CP6 分别配制成 500 μmol/L 的 1:1 甲醇-水溶液。将 2.0 μL 制备好的 500 μmol/L 双螺旋 DNA 溶液分别与 8.0 μL 的环肽溶液混合, 用 100 mmol/L 乙酸钠的 20:80 甲醇-水稀释至 40 μL, 直接进样分析(其中含有 25 μmol/L 的双螺旋 DNA)。

竞争实验是将 2.0 μL 的 500 μmol/L 双螺旋 DNA 溶液与 2.0 μL 的环肽分子 CP5 溶液和 2.0 μL 的 500 μmol/L 聚酰胺分子 P 的 1:1 甲醇-水溶液混合, 用 100 mmol/L 乙酸钠的 20:80 甲醇-水稀释至 40 μL, 直接进样分析。

1.3 质谱条件

电喷雾电离质谱(ESI-MS)和二级质谱(MS/MS)都是在负离子模式下完成。混合溶液是在 2.0 μL/min 的流速下直接注入到 ESI 离子源。ESI-MS 分析条件优化后为: 喷雾电压 2.0 kV, 离子传输管温度 120 °C, N₂ 气流 20 arb. 数据是在 Xcalibur 软件下收集和分析, 每张谱图由 10 次扫描平均所得。

2 结果与讨论

2.1 HIV-1 调控区 DNA 及其与环肽分子形成非共价复合物的质谱特征

经质谱分析证实, 12 个碱基单链 DNA 的水溶液经过退火后形成了双螺旋 DNA, 质谱中基峰是双螺旋 DNA 的五电荷离子峰[ds]⁵⁻ (*m/z* 1457), 因此选择带五个负电荷的双螺旋 DNA 为靶点([ds]⁵⁻)研究环肽与其的非共价相互作用^[9]。本研究用 ESI-MS 分析了 HIV-1 调控区 12 个碱基对(5'-AAGCAGCTGCTT-3')双螺旋 DNA 与环肽 CP1~CP6 的非共价相互作用。下面以 CP5 识别双螺旋 DNA 的 ESI 质谱作为例子(图 2), 分析环肽对 DNA 的识别与结合性能。质谱图显示 DNA 与环肽 CP5 可以按 1: *m* (*m*=1~3)的比例结合生成非共价复合物离子([ds+*m*CP_n]⁵⁻), 其中以 1:1 结合的复合物离子为主。在此 ESI-MS 谱图中, DNA 与 CP5 结合形成的[ds+CP5]⁵⁻

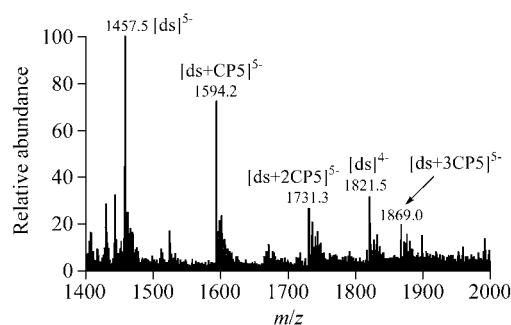


图 2 DNA 与 CP5 混合后的 ESI-MS 谱图

Figure 2 ESI-MS spectrum of the duplex DNA with CP5

(m/z 1594)离子相对强度达到 72%, 而以 1:2 比例结合的复合物离子 $[\text{ds}+2\text{CP5}]^{5-}$ (m/z 1731)和 1:3 比例的 $[\text{ds}+3\text{CP5}]^{5-}$ (m/z 1869), 相对强度分别达到 26%和 20%.

六个环肽分子(CP1~CP6)与 DNA 相互作用的 ESI-MS 质谱数据总结在表 2 中. 表 2 数据显示双螺旋 DNA 与环肽 CP1 形成的 1:1 非共价复合物离子 $[\text{ds}+\text{CP1}]^{5-}$ (m/z 1552)相对强度达到 41%, 而 1:2 结合的离子 $[\text{ds}+2\text{CP1}]^{5-}$ (m/z 1647)则较弱, 相对强度为 21%. DNA 分别与环肽分子 CP3, CP4(互为非对映异构体)结合形成的复合物都以 1:1 结合为主, 离子峰 $[\text{ds}+\text{CP3}]^{5-}$ 和 $[\text{ds}+\text{CP4}]^{5-}$ (m/z 1557)的相对强度相近, 分别达到 42%和 46%. 对于 CP4 形成的复合物来说, 同时存在明显的 1:2 和 1:3 结合的离子 $[\text{ds}+2\text{CP4}]^{5-}$ (m/z 1657)和 $[\text{ds}+3\text{CP4}]^{5-}$ (m/z 1758), 相对强度分别达到 23%和 15%; 而 DNA 与 CP3 以 1:2 和 1:3 比例结合的能力较弱, 相应复合物离子相对强度仅为 14%和 6%. 此外, 对于 DNA 与环十肽 CP2、环七肽 CP6 结合而言, 以 1:1 结合形成的复合物为主, 但是相对强度都较弱(<20%).

表 2 HIV-1 DNA 与环肽化合物结合的非共价复合物离子强度

Table 2 Relative abundance of the complex ions of the HIV-1 DNA with the cyclic peptides

CP n	Relative abundance/%		
	$[\text{ds}+\text{CP}n]^{5-}$	$[\text{ds}+2\text{CP}n]^{5-}$	$[\text{ds}+3\text{CP}n]^{5-}$
CP1	41	21	12
CP2	9	N.D. ^a	N.D.
CP3	42	14	6
CP4	46	23	15
CP5	72	26	20
CP6	16	9	N.D.

^a No detected.

ESI-MS 结果表明, 环肽(CP1~CP6)与 DNA 混合后存在明显的双链 DNA 和环肽的复合物离子峰, 并没有发现与单链 DNA 结合的复合物离子, 说明环肽化合物能够选择性与双链 DNA 结合. 本研究选择以复合物离子 $[(\text{ds}+m\text{CP}n)]^{5-}$, $m=1\sim 3$, $n=1\sim 6$ 的相对强度评价环肽与 DNA 亲合力的大小, 结果发现它们主要是通过 1:1 的结合方式与双链 DNA 形成非共价复合物, 其中 CP5 的结合能力最强, 其次是 CP4, CP1 和 CP3; 此外, CP2 和 CP6 与 DNA 以 1:1 比例结合的复合物离子强度<20%, 表明这二个环肽与 DNA 的结合能力很弱.

2.2 HIV-1 调控区 DNA 与环肽分子非共价复合物的二级质谱特征和碎裂机理

通过研究双螺旋 DNA 与环肽化合物 1:1 复合物离

子 $[\text{ds}+\text{CP}n]^{5-}$ 的二级质谱, 可以分析其碰撞解离的碎裂途径和碎片离子, 比较靶点 DNA 在结合前后性质的变化, 判断复合物离子的稳定性. 二级质谱的分析发现, 不同环肽结合的复合物离子存在多种碎裂途径, 其主要碎裂途径和碎片离子包括: 丢失小分子的双螺旋 DNA 离子 $[\text{ds}]^{5-}$ 、丢失 DNA 骨架上 A 碱基的碎片离子 $[\text{ds}+\text{CP}n-\text{A}]^{5-}$ 以及双螺旋 DNA 解链后得到的离子 $[\text{ss}]^{2-}$ 和 $[\text{ss}+\text{CP}n]^{3-}$ (图 3).

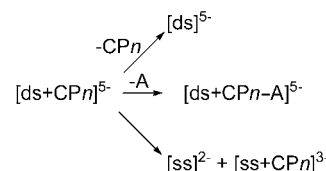


图 3 双螺旋 DNA 与环肽化合物 1:1 结合的复合物离子 $[\text{ds}+\text{CP}n]^{5-}$ 的碎裂途径

Figure 3 The dissociation pathway of the complex ion ($[\text{ds}+\text{CP}n]^{5-}$)

对于环五肽 CP1(图 4A), 1:1 结合的复合物离子 $[\text{ds}+\text{CP1}]^{5-}$ (m/z 1552)丢失一个 A 碱基而得到 $[\text{ds}+\text{CP1}-\text{A}]^{5-}$ (m/z 1525)离子, 相对强度达到 100%. 同时也观察到丢失结合分子的碎片离子 $[\text{ds}]^{5-}$ (m/z 1457), 但相对强度不到 30%. 与 CP1 不同, CP3 和 CP4 与 DNA 的复合物离子 $[\text{ds}+\text{CP3}]^{5-}$ 和 $[\text{ds}+\text{CP4}]^{5-}$ (m/z 1557)更易丢失结合分子, 碎片离子以 $[\text{ds}]^{5-}$ (m/z 1457)为主(图 4B 和 C). 此外, 对于 CP3 与 DNA 的复合物离子还存在丢失 A 碱基得到碎片离子 $[\text{ds}+\text{CP3}-\text{A}]^{5-}$ (m/z 1530). 图 4D 显示环七肽分子 CP5 与 DNA 的复合物离子 $[\text{ds}+\text{CP5}]^{5-}$ (m/z 1594)的主要碎片离子与 CP1 的类似, 以丢失一个 A 碱基的 $[\text{ds}+\text{CP5}-\text{A}]^{5-}$ (m/z 1567)为主; 但与 CP1 不同的是, CP5 的复合物离子同时存在双螺旋 DNA 解链的碎裂途径, 得到 $[\text{ss}]^{2-}$ (m/z 1821)和 $[\text{ss}+\text{CP5}]^{3-}$ (m/z 1442)碎片离子.

MS/MS 研究结果表明, 虽然环肽 CP1, CP3, CP4 和 CP5 对 DNA 都具有明显的亲和能力, 但是生成的复合物离子却存在不同的碎裂途径. 这里选择以丢失结合分子得到的双螺旋 DNA 碎片离子 $[\text{ds}]^{5-}$ 的相对强度来评价不同结构的环肽与 DNA 结合的稳定性. 结果发现 CP5 的复合物离子不存在丢失结合分子的碎裂途径, 说明其结合力强于其它环肽, 不容易被碰撞解离, 其主要的碎片离子对应于丢失 DNA 骨架上 A 碱基的 $[\text{ds}+\text{CP5}-\text{A}]^{5-}$. 其次是 CP1, 双螺旋 DNA 碎片离子 $[\text{ds}]^{5-}$ 相对强度为 26%; CP3 和 CP4 最容易丢失, 得到的 $[\text{ds}]^{5-}$ 成为其 MS/MS 谱图中的最强峰; 因此 CP3 和 CP4 最容易在碰撞诱导解离过程中从复合物离子上解离. 此外, 对于 CP3

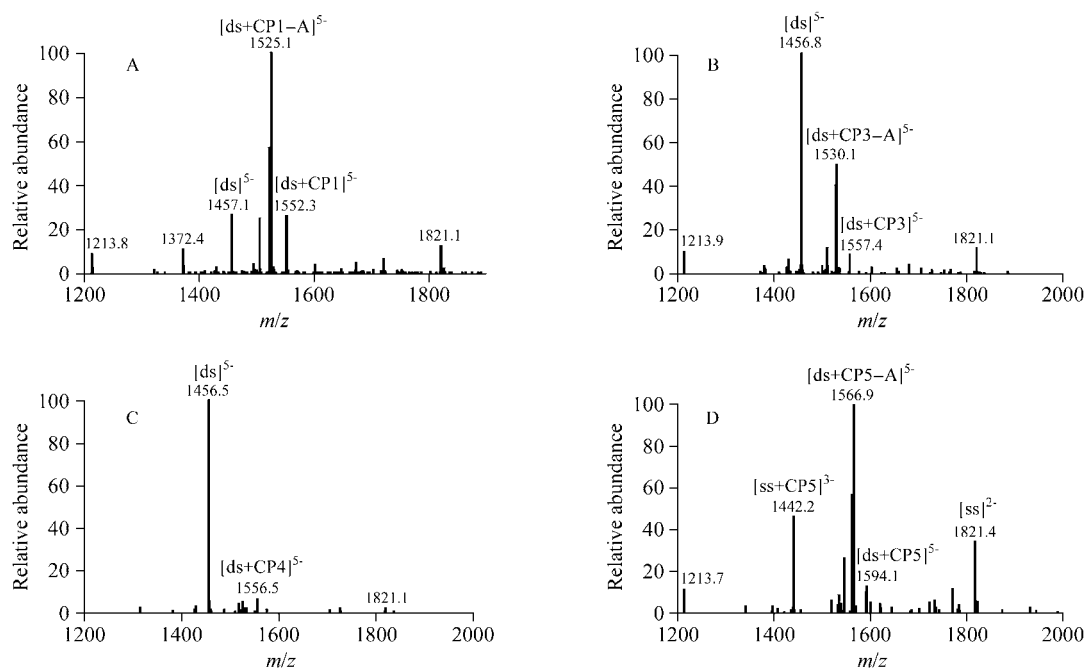


图4 双螺旋DNA与CP_n ($n=1, 3\sim 5$)的1:1复合物离子 $[\text{ds}+\text{CP}_n]^{5-}$ 的MS/MS谱图

Figure 4 MS/MS spectra of the 1:1 complex ions $[\text{ds}+\text{CP}_n]^{5-}$ of the duplex DNA with CP_n ($n=1, 3\sim 5$)

的复合物还存在较弱的丢失 A 碱基得到的 $[\text{ds}+\text{CP}3-\text{A}]^{5-}$, 说明 CP4 与 CP3 构象上的差异对与靶点 DNA 的结合存在一定的影响. 值得一提的是, CP5 的复合物离子同时存在双螺旋 DNA 解链的碎裂途径, 得到 $[\text{ss}]^{2-}$ 和 $[\text{ss}+\text{CP}5]^{3-}$ 碎片离子; 由此可见, 环肽分子 CP5 与靶点 DNA 的结合最为稳定, 且在一定程度上影响了双螺旋 DNA 自身的稳定性, 这很可能是由于其结合于 DNA 的沟区内部, 导致在碰撞诱导解离过程中不易被丢失.

同时研究了 DNA 与同一环肽分子以不同比例结合的复合物离子 $[\text{ds}+m\text{CP}_n]^{5-}$ ($m=2, 3$)的碎裂机理. 结果发现, 对于 CP6 来说, 复合物离子的主要碎裂途径都是通过丢失碱基, 得到碎片离子 $[\text{ds}+m\text{CP}6-\text{A}]^{5-}$. 而对于 CP3 来说, 主要是通过丢失 1 个结合分子, 得到碎片离子 $[\text{ds}+(m-1)\text{CP}3]^{5-}$. 在质谱中 DNA 与 CP1 以 1:1 比例结合的复合物离子 $[\text{ds}+\text{CP}1]^{5-}$ 以丢失一个 A 碱基而得到 $[\text{ds}+\text{CP}1-\text{A}]^{5-}$ 离子为主, 而 1:2 和 1:3 比例结合的复合物离子则以丢失一个 CP1 的碎裂途径为主.

表3 非共价复合物离子 $[\text{ds}+m\text{CP}_n]^{5-}$ 丢失一个 CP_n 的碎片离子强度($m=1\sim 3, n=1, 3, 6$)

Table 3 Relative abundance of the fragment ion with the loss of the CP_n in the MS/MS spectra of $[\text{ds}+m\text{CP}_n]^{5-}$ ($m=1\sim 3, n=1, 3, 6$)

CP _n	Relative abundance/%		
	$[\text{ds}+\text{CP}_n]^{5-} \rightarrow [\text{ds}]^{5-}$	$[\text{ds}+2\text{CP}_n]^{5-} \rightarrow [\text{ds}+\text{CP}_n]^{5-}$	$[\text{ds}+3\text{CP}_n]^{5-} \rightarrow [\text{ds}+2\text{CP}_n]^{5-}$
CP1	26	100	100
CP3	100	100	100
CP6	4	46	— ^a

^a There is no 1:3 complex ions with CP6.

这里通过比较丢失一个结合分子得到的碎片离子的相对强度(表 3), 发现对于同一环肽分子形成的复合物离子来说, 随着结合环肽数目的增多, 相应的丢失一个结合分子而得到的碎片离子强度逐渐增大, 说明结合的稳定性逐渐降低.

2.3 竞争模式下环肽分子与 HIV-1 DNA 的相互作用

为了深入研究环肽与靶点 DNA 的结合能力和结合模式, 以 CP5 作为例子进行竞争识别分析(图 5). 这里引入了之前作者合成、发现的具有高亲合性的聚酰胺分子(PyPyPyβDp, 简称 P)进行竞争识别研究^[10]. 如图 5A 所示, 在 CP5 和 P 与双螺旋 DNA 的竞争识别中, 以 DNA 离子 $[\text{ds}]^{5-}$ 为基峰, 存在强度近似 10%的 CP5 以 1:1 比例结合的复合物离子 $[\text{ds}+\text{CP}5]^{5-}$ (m/z 1594)和 P 的 1:1 比例的复合物离子 $[\text{ds}+\text{P}]^{5-}$ (m/z 1562), 并且同时存在结合两个不同小分子的复合物离子 $[\text{ds}+\text{CP}5+\text{P}]^{5-}$ (m/z 1699), 但强度明显弱于只结合一个小分子的 1:1

复合物离子. ESI-MS 分析结果显示: 竞争模式下环肽分子与聚酰胺识别分子互相影响, 降低了它们与靶点 DNA 的亲合性. 而复合物离子 $[\text{ds} + \text{CP5} + \text{P}]^{5-}$ (m/z 1699) 的 MS/MS 谱显示(图 5B), 主要以丢失一个 A 碱基而得到 $[\text{ds} + \text{CP5} + \text{P} - \text{A}]^{5-}$ (m/z 1672) 离子为主, 相对强度达到 100%, 同时也观察到丢失聚酰胺分子 P 的碎片离子 $[\text{ds} + \text{CP5}]^{5-}$ (m/z 1594), 相对强度接近 40%.

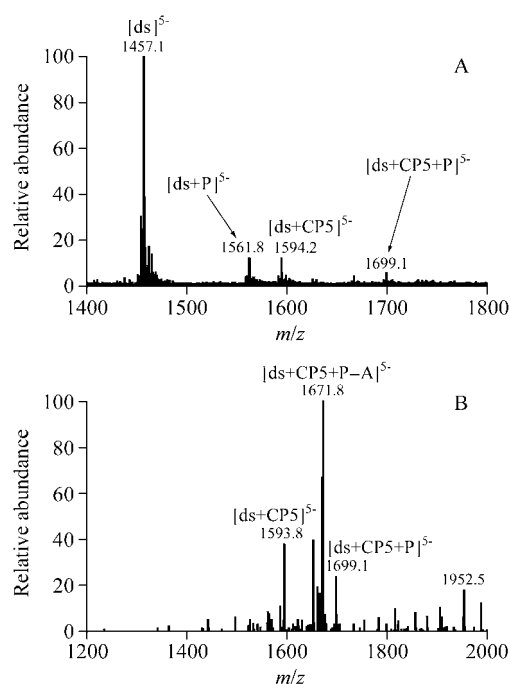


图 5 (A) CP5 和 P 竞争识别双螺旋 DNA 的 ESI 质谱; (B) 复合物离子 $[\text{ds} + \text{CP5} + \text{P}]^{5-}$ 的 MS/MS 谱

Figure 5 (A) ESI mass spectrum of the duplex DNA with molecules (CP5 and P); (B) MS/MS spectrum of the complex ion $[\text{ds} + \text{CP5} + \text{P}]^{5-}$

由此可见, 环七肽 CP5 作为靶点 DNA 高亲合性的识别分子, 其亲合能力与聚酰胺分子(P)近似, 并且与聚酰胺分子(P)之间存在竞争结合的关系. 因此, CP5 的结合模式与聚酰胺分子 P 相同, 而聚酰胺分子的结合已被证实位于双螺旋 DNA 的沟区中^[11], 故初步判断环肽分子 CP5 的结合位于 DNA 沟区之中. 此外, 在复合物离子 $[\text{ds} + \text{CP5} + \text{P}]^{5-}$ 的 MS/MS 谱图中发现丢失聚酰胺分子 P 的碎片离子 $[\text{ds} + \text{CP5}]^{5-}$, 而未发现丢失 CP5 的碎片离子, 说明 CP5 与靶点 DNA 的结合比 P 更加稳定.

2.4 环肽的结合对 HIV-1 DNA 热稳定性的影响

通过改变质谱仪中离子传输管的温度(120~400 °C), 研究 DNA 与环肽识别分子结合前后热稳定性的变化^[12]. 以 CP5 与双螺旋 DNA 形成非共价复合物作为例子分析环肽的结合对 DNA 热稳定性的影响. 未加环肽 CP5 的 DNA 溶液的 ESI-MS 谱图显示, 当温度由 120 °C

逐渐上升至 320 °C 时, 作为主要离子峰的双螺旋 DNA $[\text{ds}]^{5-}$ (m/z 1457) 的相对峰强逐渐减弱, 而单链 DNA 的离子峰显著增强($[\text{ss}]^{3-}$ 和 $[\text{ss}]^{2-}$, m/z 1214, 1821). 当温度上升至 400 °C 时, DNA 离子的骨架发生断裂, 产生一系列碎片离子. 由此可见, 随着温度上升, 双螺旋 DNA 离子首先发生解链形成单链, 接着发生 DNA 骨架的断裂. 双螺旋 DNA 与环肽 CP5 混合后以形成 1:1 结合的复合物离子 $[\text{ds} + \text{CP5}]^{5-}$ (m/z 1594) 为主, 相应的 ESI-MS 谱图显示, 随着温度的上升(120~320 °C), 复合物离子峰逐渐减弱, 失去 CP5 的离子和双螺旋 DNA 解链形成的单链 DNA 碎片离子峰逐渐增强. 当温度继续上升至 400 °C, 碎裂途径与结合前相似, DNA 离子的骨架发生断裂产生一系列碎片离子. 将双螺旋 DNA 及其复合物离子相对峰强随着离子传输管温度的变化作图^[12], 可得相应离子的解离曲线(图 6), 并将各离子的相对峰强减小到原来的 50% 时对应的温度定义为该离子的解离温度(T_{50}). T_{50} 值越大, 说明该离子在气相状态下的热稳定性越好, 需要更高的温度才能解离. 结果表明, 双螺旋 DNA 在结合前的 T_{50} 值为 188 °C, 与 CP5 结合后的 T_{50} 值上升到 205 °C; 由此可见, 与 CP5 结合能够提高 HIV-1 双螺旋 DNA 的热稳定性.

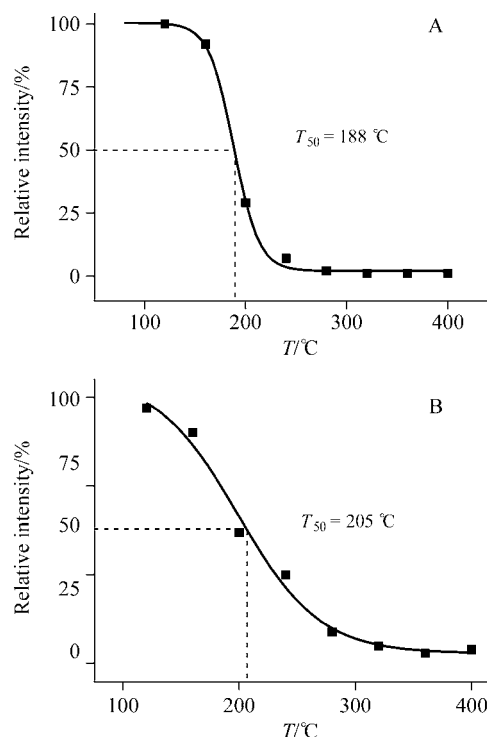


图 6 双螺旋 DNA 与 CP5 结合前后随温度变化的解离曲线

Figure 6 The transition curves for the thermal dissociation (A) $[\text{ds}]^{5-}$; (B) $[\text{ds} + \text{CP5}]^{5-}$

2.5 环肽分子结构与结合能力间的关系

通过 ESI-MS 和 MS/MS 对六种结构不同的环肽

(CP1~CP6)与特定 HIV-1 基因靶点 DNA 的相互作用进行研究,可以总结出几点环肽结构和结合能力间的关系.首先,从环肽的环骨架大小来看,环七肽 CP5 的结合能力最强,其次是环五肽 CP4, CP1 和 CP3,而环十肽 CP2 最弱,表明相比于环五肽和环十肽而言,环七肽的结合能力更强.其中,环十肽 CP2 是环五肽 CP1 的串联重复序列(2 倍),说明排除氨基酸序列的影响,含有 5 个氨基酸的环肽比含有 10 个的结合能力强.其次,从氨基酸残基的种类上来看,同为环七肽的 CP5 和 CP6,前者的结合能力要明显强于后者.通过比较二者间的氨基酸序列可见,环七肽 CP6 含有的 Pro 残基比 CP5 多 1 个,其侧链的五元杂环可能对 CP6 环的扭曲产生影响,同时其 Phe 残基侧链的苯环对于结合可能存在一定的位阻作用,导致了 CP6 的结合能力很弱.最后,从氨基酸残基的构象上来看,环五肽 CP3 和 CP4 互为非对映异构体,但是由于 CP4 结构中含有 2 个 D 型氨基酸残基,这种构象上的差异导致与靶点 DNA 的结合模式有所不同,虽然二者 1:1 结合的强度相近,但 CP4 存在更明显的 1:2 和 1:3 结合.由此可见,环肽分子对特定靶点 DNA 的结合能力取决于多种因素,既与环骨架的大小有关,也与环上氨基酸残基的种类和构象有关.

3 结论

本研究以 HIV-1 基因调控区的双螺旋 DNA 为靶点,利用电喷雾电离质谱(ESI-MS)和二级质谱(MS/MS)研究了六种结构不同的环肽(CP1~CP6)分别与 HIV-1 基因 DNA 的相互作用.ESI-MS 研究结果表明,环七肽 CP5 具有最强的亲合能力,其次是 CP4, CP1 和 CP3;且以 1:1 结合的非共价复合物为主.利用 MS/MS 研究了识别分子与 DNA 复合物的碎裂机理和稳定性,研究结果发现 CP5 与靶点 DNA 的结合最为稳定.复合离子主要的碎裂途径和碎片离子包括:丢失环肽分子产生双螺旋 DNA 离子 $[ds]^{5-}$,丢失 DNA 骨架上 A 碱基产生碎片离子 $[ds+CPn-A]^{5-}$ 以及双螺旋 DNA 解链后得到的离子

$[ss]^{2-}$ 和 $[ss+CPn]^{3-}$.此外,环肽分子 CP5 与靶点 DNA 的结合在一定程度上影响了双螺旋 DNA 自身的稳定性,这很可能是由于其结合于 DNA 的沟区内部,导致在碰撞诱导解离过程中不易被丢失.利用竞争模式分析研究了环七肽 CP5 与靶点 DNA 的结合能力,进一步证实环七肽 CP5 作为靶点 DNA 高亲合性的识别分子,其亲合能力与聚酰胺分子(P)相似,且比 P 的结合更加稳定;使用升温实验研究了其热稳定性,发现与 CP5 的结合能够提高 HIV-1 双螺旋 DNA 的热稳定性.

References

- 1 Jiang, X. H.; Long, Y. Q. *Chin. J. Org. Chem.* **2004**, *24*, 1380 (in Chinese). (姜晓华, 龙亚秋, 有机化学, **2004**, *24*, 1380.)
- 2 Gottesfeld, J. M.; Neely, L.; Trauger, J. W.; Baird, E. E.; Dervan, P. B. *Nature* **1997**, *387*, 202.
- 3 Natarajan, T.; Ikramul, H.; Tariq, M. R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 971.
- 4 Tan, R.; Chen, L.; Buettner, J. A.; Hudson, D.; Frankel, A. D. *Cell* **1993**, *73*, 1031.
- 5 Battiste, J. L.; Mao, H.; Rao, N. S.; Tan, R.; Muhan-diram, D. R.; Kay, L. E.; Frankel, A. D.; Williamson, J. R. *Science* **1996**, *273*, 1547.
- 6 Tang, Y. C.; Xie, H. B.; Tian, G. L.; Ye, Y. H. *J. Peptide Res.* **2002**, *60*, 95.
- 7 Liu, M.; Tian, G.-L.; Ye, Y.-H. *Chin. J. Chem.* **2003**, *21*, 864.
- 8 Liu, M.; Tang, Y. C.; Fan, K. Q.; Jiang, X.; Lai, L. H.; Ye, Y. H. *J. Peptide Res.* **2005**, *65*, 55.
- 9 Liu, Y. Q.; Li, H. H.; Ye, Y. H.; Yuan, G. *Chin. Chem. Lett.* **2009**, *20*, 330.
- 10 Li, H. H.; Han, D. W.; Yuan, G. *Acta Chim. Sinica* **2007**, *65*, 1543 (in Chinese). (李卉卉, 韩德伟, 袁谷, 化学学报, **2007**, *65*, 1543.)
- 11 Dervan, P. B.; Burli, R. W. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 688.
- 12 Li, H. H.; Yuan, G.; Du, D. M. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2008**, *19*, 550.

(A0903104 Cheng, F.; Zheng, G.)