

[研究快报]

i-Motif 在分子拥挤条件下的性质

周俊^{1,2}, 贾国卿^{1,2}, 冯兆池¹, 李灿¹

(1. 中国科学院大连化学物理研究所, 催化基础国家重点实验室, 大连 116023;

2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

关键词 *i*-Motif; 分子拥挤; 聚乙二醇

中图分类号 O643

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2010)02-0309-03

DNA 分子除了通常的反平行双螺旋结构之外, 某些特定的 DNA 序列还能够形成三链、四链或 Holliday 十字等核酸的空间特异结构. 富含 C 的单链 DNA 分子可以在酸性条件下通过 C 碱基的半质子化 $C^+ \cdot C$ 碱基对形成稳定的平行双螺旋, 两个平行双螺旋上的 $C^+ \cdot C$ 碱基对可以以交替排列和互相嵌入 (Intercalate) 的形式形成四螺旋结构, 这种四螺旋结构即为 *i*-Motif (图 1)^[1]. 目前在体外研究中已经证实了 *i*-Motif 结构可能具有一定的生物功能^[2], 与其它的 DNA 序列一样, 成为抗癌药物作用的靶点^[3,4]. 关于 *i*-Motif 的绝大多数研究都是在稀的缓冲液中进行的. 然而所有细胞中都存在大量的蛋白质、核酸及多糖等生物大分子, 它们占据了细胞容积的 20%~30%, 总浓度高达 80~200 g/L, 这一现象被称作分子拥挤效应 (Molecular crowding effect)^[5]. 有研究表明, 在体系中加入拥挤试剂 (Crowding agent, 如聚乙二醇, PEG) 后, 可诱导另一种四螺旋结构 G-Quadruplex 的结构变化^[6-8], 提高其热稳定性^[9]. 目前关于 *i*-Motif 在分子拥挤条件下的性质研究报道还比较少.

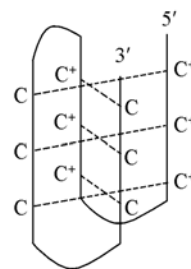


Fig. 1 Structure of *i*-Motif

本文用人端粒富含 C 的序列 $[C_3TA_2]_3C_3$ 作为模型, 利用惰性分子 PEG 200 作为模拟体内分子的拥挤试剂, 通过圆二色光谱和紫外吸收光谱研究了 *i*-Motif 在分子拥挤条件下的性质. 结果表明, PEG 的存在对 *i*-Motif 的结构没有明显影响, 但是可以提高 *i*-Motif 的热稳定性.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器 $[C_3TA_2]_3C_3$ (上海生工公司, 电泳纯); PEG (分析纯, Alfa Aesar 公司); 二甲基胍酸钠 (分析纯, Amresco 公司); 实验用水为 Milli-Q A10 制备的超纯水.

OLIS 双光束 DSM 1000 圆二色光谱仪 (美国 OLIS 公司); 岛津 UV2450 紫外-可见吸收光谱仪 (日本 Shimadzu 公司); 雷磁 PHS-3B 型精密 pH 计 (上海精密科学仪器有限公司).

1.2 实验过程 圆二色 (CD) 光谱采集条件: 波长 320~220 nm, 样品池厚度为 1 cm, 采集 5 次, 取平均值, 室温采集谱图. CD 热变性实验: 从 15 °C 起每间隔 5 °C 升温, 在各温度下稳定约 10 min 后, 采集 CD 谱图, 至 CD 光谱不再发生变化为止. CD 热变性实验数据是在 286 nm 下以最大正峰强度与温度的关系进行处理的. UV 热变性实验分别在波长 265 和 295 nm 下进行, 从 15 °C 起, 以 0.5 °C/min 的速度逐渐升温, 样品池厚度为 1 cm. CD 和 UV 实验中温度的控制均通过 Peltier 温度控制器实现. 核酸样品的浓度为 4 μ mol/L, 所用缓冲液为 10 mmol/L 二甲基胍酸钠缓冲液, 用 HCl 调节至相应的 pH 值.

收稿日期: 2009-07-15.

基金项目: 国家自然科学基金 (批准号: 20673110 和 20621063) 资助.

联系人简介: 李 灿, 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 中国科学院院士, 主要从事物理化学、催化和应用光谱研究.

E-mail: canli@dicp.ac.cn

2 结果与讨论

2.1 PEG 对 *i*-Motif 结构的影响 核酸序列 $[C_3TA_2]_3C_3$ 在不含 PEG 的不同 pH 值下的 CD 光谱如图 2(A) 所示. 在 pH = 5.8 ~ 6.8 时, CD 谱图在 286 nm 处有一个正峰, 在 255 nm 处有一个负峰, 这是典型的 *i*-Motif 的 CD 谱图^[10,11]. 说明在此条件下形成了 *i*-Motif 的结构. 随着 pH 值的增加, 286 nm 处正峰的强度逐渐降低. 当 pH = 7.0 时, 286 nm 处的特征谱峰消失, 且正峰最大位置在 270 nm 附近, 255 nm 处的负峰蓝移至 245 nm 附近, 这说明 *i*-Motif 的结构消失, 形成了无规则的结构. 这与文献 [10 ~ 12] 报道的结果一致. 当缓冲液中含有 400 g/L PEG 200 时, CD 谱图与不含 PEG 的谱图相比, 没有发生变化[图 2(B)]. 在 pH = 5.8 ~ 6.8 时为 *i*-Motif 的结构, 当 pH > 7.0 时, 形成无规则的单链结构. 说明 PEG 的存在对 *i*-Motif 的结构没有影响, *i*-Motif 的存在更依赖于 pH 值.

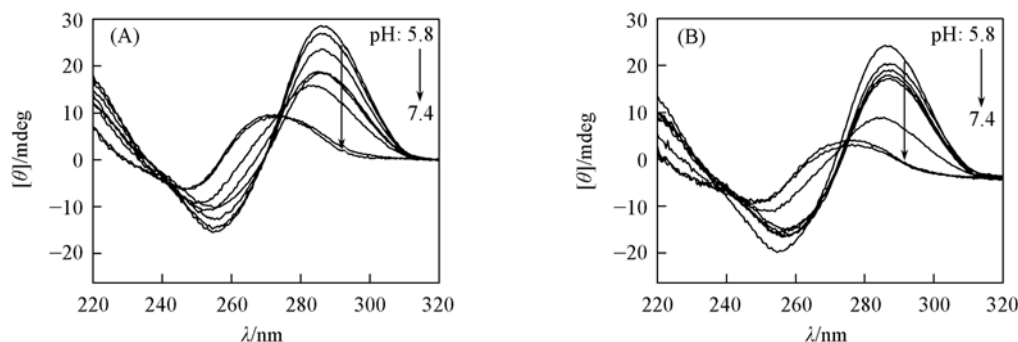


Fig. 2 CD spectra of $[C_3TA_2]_3C_3$ recorded at room temperature in sodium cacodylate buffer at different pH (5.8, 6.0, 6.2, 6.4, 6.6, 7.0, 7.4) in the absence of PEG (A) or presence of 400 g/L PEG (B)

2.2 PEG 对 *i*-Motif 稳定性的影响 *i*-Motif 在稀缓冲液和分子拥挤环境中不同 pH 值条件下的 CD 光谱和 UV 吸收光谱如图 3 和图 4 所示.

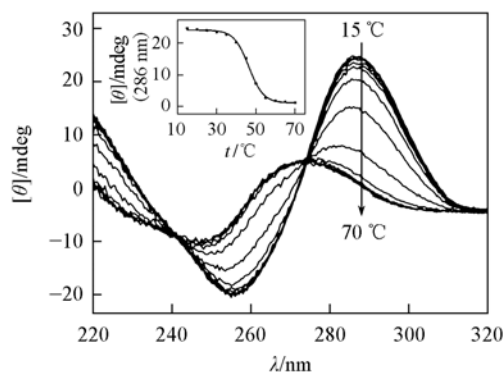


Fig. 3 CD spectra of $[C_3TA_2]_3C_3$ at different temperatures in sodium cacodylate buffer (pH = 5.8)

Inset: variation of CD signal at 286 nm as a function of the temperature.

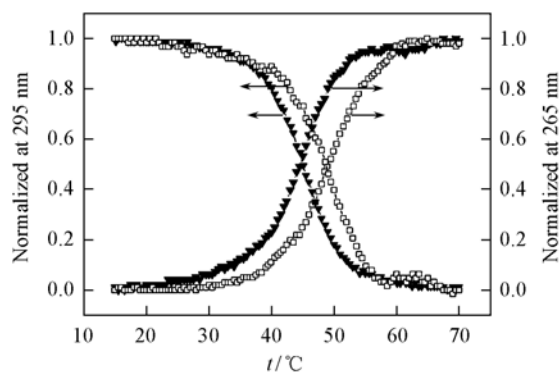


Fig. 4 Temperature-induced melting curves of $[C_3TA_2]_3C_3$ recorded by UV at 265 and 295 nm in the presence (□) or absence (▼) of PEG (400 g/L) in sodium cacodylate buffer (pH = 5.8)

图 3 的插图给出了 286 nm 处的 CD 值与温度的关系, 得到 *i*-Motif 在 pH = 5.8 和不含 PEG 的条件下的 T_m 值为 46.5 °C (表 1). 从表 1 中可以看出, 在 pH = 5.8 及 400 g/L PEG 条件下, T_m 值为 50 °C. 说明 PEG 的存在可以提高 *i*-Motif 的稳定性. 表 1 中列举了 CD 光谱获得的 *i*-Motif 在其它 pH 值条件下的 T_m 值. 可以看出, 随着 pH 值的提高, 无论是在稀缓冲液中还是在分子拥挤环境中, *i*-Motif 的稳定性都是下降的. 在相同 pH 及分子拥挤条件下 *i*-Motif 的稳定性要强于在稀缓冲液中的 *i*-Motif 的稳定性. UV 光谱分别在 265 和 295 nm 检测了 *i*-Motif 在上述缓冲液中的 T_m 值, 图 4 给出了 *i*-Motif 在 pH = 5.8 时的热变性图. 可以看出, 无论在 265 nm 还是 295 nm 处, 都显示 PEG 可以提高 *i*-Motif 的热稳定性, 这与 CD 结果是一致的. UV 检测的 *i*-Motif 在其它 pH 值中的 T_m 值列于表 1, 结果表明, PEG 的存在可以提高 *i*-Motif 的热稳定性.

Table 1 T_m of *i*-Motif determined by UV and CD melting at different pH in the presence or absence of PEG

pH	CD		UV(265 nm)		UV(295 nm)		Average	
	No PEG	400 g/L PEG	No PEG	400 g/L PEG	No PEG	400 g/L PEG	No PEG	400 g/L PEG
5.8	46.5	50	44.5	50.5	45	50	45.3 ± 0.6	50.1 ± 0.1
6.0	42	45	41	43.5	40	43.5	41 ± 0.6	44 ± 0.5
6.2	38	39	37	37.5	36	38	37 ± 0.6	38.2 ± 0.4
6.4	33	38	35.5	38.5	32.5	38.5	33.7 ± 0.9	38.3 ± 0.2
6.6	30	34	32	33	32	33	31.3 ± 0.7	33.3 ± 0.3
6.8	27	27	24	26	22.5	26	24.5 ± 1.3	26.3 ± 0.3

综上所述, *i*-Motif 的结构取决于溶液的 pH 值, PEG 的存在对 *i*-Motif 的结构没有明显影响, 但是 PEG 的存在可以提高 *i*-Motif 的热稳定性.

参 考 文 献

- [1] Gehring K., Leroy J. L., Gueron M.. Nature[J], 1993, **363**: 561—565
- [2] Ahmed S., Kintanar A., Henderson E.. Nat. Struct. Biol.[J], 1994, **1**: 83—88
- [3] DONG Xiao-Chun(董肖椿), XU Ying(胥颖), Carlos A., *et al.*. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2008, **29**(8): 1578—1582
- [4] HAO Lan(郝兰), ZHANG Yong(张勇), TAN Hong-Wei(谭宏伟), *et al.*. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2007, **28**(6): 1160—1164
- [5] Minton A. P.. J. Biol. Chem. [J], 2001, **276**: 10577—10580
- [6] Xue Y., Kan Z., Tan Z., *et al.*. J. Am. Chem. Soc. [J], 2007, **129**: 11185—11191
- [7] Miyoshi D., Karimata H., Sugimoto N.. Angew. Chem. Int. Ed. [J], 2005, **44**: 3740—3744
- [8] Zhou J., Wei C., Li C.. Biophys. Chem. [J], 2008, **136**: 124—127
- [9] Miyoshi D., Karimata H., Sugimoto N.. J. Am. Chem. Soc. [J], 2006, **128**: 7957—7963
- [10] Xu Y., Sugiyama H.. Nucleic Acids Res. [J], 2006, **34**: 949—954
- [11] Guo K., Gokhale V., Hurley L. H., *et al.*. Nucleic Acids Res. [J], 2008, **36**: 4598—4608
- [12] Manzini G., Yathindra N., Xodo L. E.. Nucleic Acids Res. [J], 1994, **22**: 4634—4640

Properties of *i*-Motif Under Molecular Crowding Conditions

ZHOU Jun^{1,2}, JIA Guo-Qing^{1,2}, FENG Zhao-Chi¹, LI Can^{1*}

(1. State Key Laboratory of Catalysis, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China; 2. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract *i*-Motif is formed from two parallel duplexes by intercalating with each other in an antiparallel orientation and each duplex is held together *via* hemiprotonated cytosine⁺-cytosine base pairs. However, a cell is crowded with various biomolecules and little is known about the properties of *i*-Motif under molecular crowding conditions until now. In the present study, we used human telomeric DNA sequence, [C₃TA₂]₃C₃, as a model system to investigate such problem by circular dichroism(CD) and UV absorbance spectroscopy. Based on the CD spectra, we found that there were no changes about the structure of *i*-Motif in the presence of polyethylene glycol(PEG). CD melting results showed that the thermal stability of *i*-Motif was increased under molecular crowding conditions compare to that in dilute buffer, which was further demonstrated by UV-melting results. This work suggests that molecular crowding could not affect the structure of *i*-Motif, which may depend on pH, while could enhance the thermal stability of *i*-Motif.

Keywords *i*-Motif; Molecular crowding; Polyethylene glycol(PEG)

(Ed.: H, J, Z)