

# 端粒 DNA 形成鸟嘌呤四链体结构

胡晓文<sup>1</sup>, 黄洪章<sup>2</sup>, 傅玉茹<sup>3</sup>

( 1. 中山大学光华口腔医学院·附属口腔医院, 广东 广州 510055; 2. 中山大学附属第二医院口腔颌面外科, 广东 广州 510120; 3. 中山大学附属第二医院研究中心, 广东 广州 510120 )

**摘要:**【目的】在体外观察  $K^+$ 、 $Na^+$  对富含端粒重复序列寡核苷酸二级结构的影响。【方法】在  $K^+$ 、 $Na^+$  存在下, 利用核磁共振光谱仪观察含端粒重复序列的核苷酸 d(TTAGGGT) 光谱的变化; 利用非变性凝胶电泳观察 d(TTAGGG)<sub>3</sub>、d(TTAGGG)<sub>4</sub> 和 d(TTAGGG)<sub>5</sub> 迁移速度的变化。【结果】在含  $K^+$  或  $Na^+$  缓冲液中, d(TTAGGGT) 在化学移位 11~12 区域内出现代表有鸟嘌呤四分体形成的波峰;  $K^+$  比  $Na^+$  具有更强的稳定四链体能力。  $K^+$ 、 $Na^+$  均可加速 d(TTAGGG)<sub>4</sub>、d(TTAGGG)<sub>5</sub> 在凝胶中迁移速度。【结论】在体外,  $K^+$ 、 $Na^+$  可诱导含端粒重复序列的核苷酸形成鸟嘌呤四链体结构。

关键词: 端粒; 鸟嘌呤四链体; 钾离子; 钠离子

中图分类号: R782.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)01-0015-04

## Experimental Study of Guanosine-Quadruplex Formation from Telomeric DNA

HU Xiao-wen<sup>1</sup>, HUANG Hong-zhang<sup>2</sup>, FU Yu-ru<sup>2</sup>

( 1. Guanghua Stomatological Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510055; 2. Department of Stomatology Research Center, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China )

**Abstract:** 【Objective】 To observe the effects of  $K^+$  or  $Na^+$  on the second structure of the oligonucleotides containing telomeric repeats in vitro. 【Methods】 In the presence of  $K^+$  or  $Na^+$ , the spectrum changes of the oligonucleotide d(TTAGGGT) containing telomeric repeats were observed using nuclear magnetic resonance (NMR) spectrometer. The mobility of d(TTAGGG)<sub>3</sub>, d(TTAGGG)<sub>4</sub> and d(TTAGGG)<sub>5</sub> were surveyed using polyacrylamide gel electrophoresis under non-denaturing condition. 【Results】 In the buffers consisting of  $K^+$  or  $Na^+$ , the nucleotide d(TTAGGGT) showed three peaks meaning G-quartet formation within the "chemical shift" field of 11~12 ppm; and the ability that  $K^+$  stabled G-quadruplex structure was more powerful than that of  $Na^+$ . Both  $K^+$  and  $Na^+$  were able to speed mobility of d(TTAGGG)<sub>4</sub> and d(TTAGGG)<sub>5</sub> in the gel electrophoresis. 【Conclusion】 Both  $K^+$  and  $Na^+$  are able to induce the oligonucleotides containing telomeric repeats to form G-quadruplex structure in vitro.

Key words: Telomere; G-quadruplex; potassium cations; sodium cations

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(1):15-18]

端粒是染色体末端一种特殊的富含鸟嘌呤 (guanosine, G) 的结构。国外多项研究发现<sup>[1,2]</sup>在某些离子条件下, 端粒 3 富含 G 的尾链可以在分子内折叠或分子间相互作用形成特殊的二级结构, 即鸟嘌呤四链体 (guanosine-quadruplex structure, G4)。此结构由三个平行排列的平面状四分体堆积而成; 每个四分体由 4 个 G 通过分子间氢键连接

构成。进一步研究发现<sup>[3]</sup>端粒酶对端粒 DNA 引物的识别是其链状结构而非特异的序列。G4 的形成改变了端粒末端 3 单链的链状结构, 并对端粒酶活性产生影响<sup>[4]</sup>。因此, 寻找 G4 在细胞内存在的实验证据有十分重要的意义。国外学者<sup>[1]</sup>通过核磁共振 (nuclear magnetic resonance, NMR) 氢谱、晶体衍射法在体外证实了 G4 结构的存在。为了进一

收稿日期: 2005-07-17

基金项目: 中国博士后基金资助项目 (2003033421)

作者简介: 胡晓文 (1966-), 男, 吉林长春人, 博士, 副教授。E-mail: roberthuxiaowen@21cn.com

步丰富 G4 在细胞内存在的实验证据,本文拟通过两个体外实验观察  $K^+$ 、 $Na^+$  对富含端粒重复序列寡核苷酸的二级结构的影响,以探讨细胞内液中  $K^+$ 、 $Na^+$  是否利于端粒末端形成 G4, 为深入研究端粒维持机制奠定理论基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与主要仪器

NMR 氢谱测试用寡核苷酸(5 - TTAGGGT - 3 ) 和凝胶电泳用寡核苷酸  $d(TTAGGG)_3$ 、 $d(TTAGGG)_4$  及  $d(TTAGGG)_5$  由上海生物工程公司合成。重水、氯化钾(KCl)、氯化钠(NaCl)、乙二胺四乙酸(EDTA)、磷酸二氢钾( $KH_2PO_4$ )、磷酸二氢钠( $NaH_2PO_4$ )、聚丙烯酰胺由 Sigma 公司提供。NMR 氢谱仪 (AVANCE300MHz 型,美国 BRUKER 公司)、恒压电泳仪 (Bio- Rad 型美国)。

### 1.2 配制 NMR 氢谱仪测试缓冲液及测试样品液

用含体积分数 10% 重水的去离子水溶液配制含 100 mmol/L KCl+ 1 mmol/L EDTA+ 50 mmol/L  $KH_2PO_4$  (pH 7.0)及含 100 mmol/L NaCl+ 1 mmol/L EDTA+ 50 mmol/L  $NaH_2PO_4$  (pH 7.0)的两种样品测试缓冲液。取 0.5 mL 上述含  $K^+$ 或  $Na^+$ 的测试缓冲液,溶解约 5 mmol 的  $d(TTAGGGT)$ 寡核苷酸作为试验组测试样品;另设一空白对照管,用 0.5 mL 含体积分数 10%重水的去离子水(不含  $K^+$ 或  $Na^+$ )溶解约 5 mmol 的  $d(TTAGGGT)$ 寡核苷酸。

### 1.3 NMR 氢谱检测

首先在常温(25 )下对经过  $K^+$  或  $Na^+$  缓冲液处理过的测试样品及空白对照管内的样品进行 NMR 氢谱测定,测试条件用 1-1 回声波序列,每个光谱均进行 128 次扫描,扫描间歇期为 2S。通过观察受测试  $d(TTAGGGT)$ 寡核苷酸在相应区域共振频率的变化检测代表有鸟嘌呤四分体形成的氢键波峰。然后分别在 25 、35 、45 、55 、65

下进行连续的 NMR 变温测定,观察  $K^+$  或  $Na^+$  稳定 G4 结构的作用强度。数据处理通过其计算机内置软件程序进行相应处理。

### 1.4 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳

合成含 50 mmol/L KCl 或 50 mmol/L NaCl 的 1  $\times$ TBE 电解缓冲液(40 mmol/L Tris- 硼酸,1 mmol/L EDTA, pH 8.0)。分别将约 10  $\mu$ mol 的 3 种寡核苷酸  $d(TTAGGG)_3$ 、 $d(TTAGGG)_4$  和  $d(TTAGGG)_5$  溶

入上述含  $K^+$  或  $Na^+$  的缓冲液中,于 90 下孵育 5 min,再回复到 4 放置 30 min。分别将上述 3 种样品加样至含  $K^+$  或  $Na^+$  的 150 g/L 非变性聚丙烯酰胺凝胶上,于 4 下,8 ~10 U/cm,10 W 下进行电泳。

## 2 结 果

### 2.1 $K^+$ 、 $Na^+$ 促进维持 G4 结构的氢键形成

25 下,对照管内  $d(TTAGGGT)$ NMR 氢谱表现为在 7 ~9 区域内有一系列高低不平的较锐利波峰存在(图 1A),这是单链  $d(TTAGGGT)$ 碱基结构中氢原子所处化学环境所致,是该寡核苷酸本身固有的 NMR 光谱特性。当经过  $K^+$ 或  $Na^+$ 缓冲液处理的  $d(TTAGGGT)$  进行 NMR 光谱检测时,除了在 7 ~9 区域内有一系列特征性波峰存在外,在 11 ~12 区域内还有 3 个明显的强波峰出现(图 1B),这表明受测试样品  $d(TTAGGGT)$ 内的某些碱基之间形成了氢键。氢键是端粒 G4 主要组成成分四分体内四个鸟嘌呤连结排列形成一个平面结构的主要化学功能键,在  $K^+$ 、 $Na^+$ 存在下  $d(TTAGGGT)$ 分子间有氢键出现,表明其有 G4 结构存在。

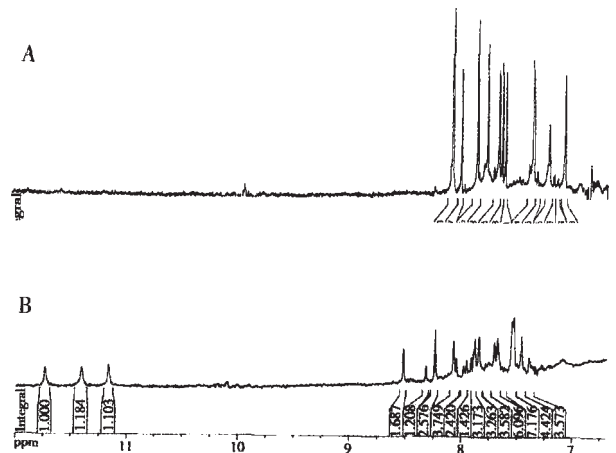


图 1 常温下  $d(TTAGGGT)$ 的 NMR 检测结果  
Fig1 The results of NMR of the oligonucleotide  $d(TTAGGGT)$  at room temperature

A:At the absence of  $Na^+$ , the  $d(TTAGGGT)$  only showed a series of sharp peaks within the " chemical shift " field of 7 ~9 .B: In the presence of  $Na^+$ , the  $d(TTAGGGT)$  showed additional three peaks within the " chemical shift " field of 11 ~12

在 NMR 变温实验中,于 25 、35 、45 、55 时,在  $K^+$ 存在下,在 11 ~12 区域内,d

(TTAGGGT) 均会出现代表有氢键形成的 3 个波峰; 而在  $\text{Na}^+$  条件下, 当变温至 55 时, d(TTAGGGT) 在 11~12 区域内形成的波峰消失。这表明  $\text{K}^+$  比  $\text{Na}^+$  具有更强的诱导、稳定 G4 结构形成的能力。

## 2.2 $\text{K}^+$ 、 $\text{Na}^+$ 促进含有四个端粒重复序列的寡核苷酸形成紧凑的 DNA 二级结构

对含有端粒重复序列不同重复次数的 3 种寡核苷酸进行非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳。正常情况下, 这些寡核苷酸在凝胶中的迁移速度主要依赖于它们自身的长度, 即  $d(\text{TTAGGG})_3$  迁移速度最快而  $d(\text{TTAGGG})_5$  迁移速度最慢 (图 2A)。当 50 mmol/L  $\text{K}^+$  或 50 mmol/L  $\text{Na}^+$  加入缓冲液中时, 3 种寡核苷酸在凝胶中的迁移速度出现了不连续,  $d(\text{TTAGGG})_4$  及  $d(\text{TTAGGG})_5$  迁移的速度明显加快, 几乎与  $d(\text{TTAGGG})_3$  的迁移速度相同 (图 2B)。这表明  $\text{K}^+$ 、 $\text{Na}^+$  可诱导单链多个端粒重复序列的核苷酸发生分子内折叠, 使其空间分子构象变小, 而且至少需要分子内 TTAGGG 重复出现 4 次。

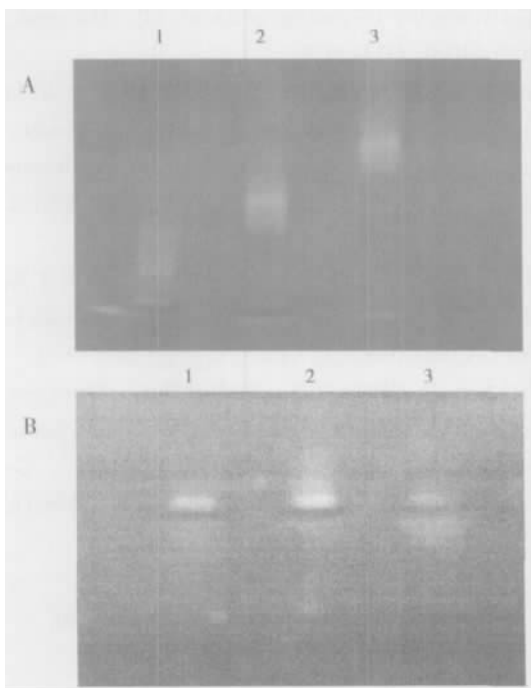


图 2  $d(\text{TTAGGG})_3$ 、 $d(\text{TTAGGG})_4$ 、 $d(\text{TTAGGG})_5$  在非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳中的迁移速度变化

Fig.2 The mobility changes of  $d(\text{TTAGGG})_3$ ,  $d(\text{TTAGGG})_4$  and  $d(\text{TTAGGG})_5$  in the polyacrylamide gel electrophoresis under non-denaturing conditions

A: At the absence of  $\text{K}^+$ ; B: in the presence of  $\text{K}^+$ ; Lane 1, 2 and 3 represent  $d(\text{TTAGGG})_3$ ,  $d(\text{TTAGGG})_4$  and  $d(\text{TTAGGG})_5$  respectively

## 3 讨论

端粒 3 末端的单链可以形成各种折叠结构, 多数结构不稳定, 在 40~50 下就“熔化”掉; 但形成的 G4 结构较稳定。根据 G4 的分子特征及螺旋取向, 它可分为 3 类<sup>[1]</sup>: 四个单链分子间的 G4 称为平行型 G4; 含两个 TTAGGG 的单链可分子内自身折叠, 通过 G-G 碱基对形成发夹型结构, 称发夹型 G4; 较长的 3 突出单链通过几次分子内折叠形成分子内自身折叠型 G4。由于 G4 结构对端粒功能有重要影响, 且其结构变化与细胞的繁殖、生长、分化、衰老及凋亡等细胞基本生命活动密切相关<sup>[6]</sup>; 尤其是大量研究发现<sup>[4,5]</sup> G4 结构可以抑制端粒酶活性, 因此引起了人们广泛的研究兴趣。

人们发现四膜虫和纤毛虫端粒 DNA 能在酵母中维持微小的染色体稳定, 尽管它们的核苷酸序列不同, 但端粒 DNA 具有一个普遍的共同结构主框架。这提示端粒 DNA 在体内有独特的折叠结构。另外, 在细胞周期中, 在复制、重组、转录和 DNA 延长过程中, 双链 DNA 在细胞内会短暂地分离为单链, 存在一个时期可使富 G 单链稳定存在, 为其形成 G4 结构提供了机会。近年研究<sup>[6]</sup>发现有几种 DNA 解旋酶能解旋 G4 结构。这些研究发现均提示 G4 结构是细胞内瞬时存在的正常结构。

NMR 氢谱是一种利用核磁共振现象和化学移位作用进行一系列特定原子核及其化合物分析的方法, 以在相应化合物固有频率的位置上显示波峰来表示。NMR 常用于 DNA、RNA 等生物大分子三维结构和动力学分析。当核苷酸在  $\text{K}^+$ 、 $\text{Na}^+$  存在下形成 G4 时, 其原始分子结构的化学环境发生改变, 故在 NMR 氢谱相应的化学移位处出现代表有 3 个四分体形成的 3 个氢键波峰; 因此利用 NMR 氢谱仪可检测含端粒重复序列核苷酸形成的代表有 G4 存在的波峰。在 NMR 氢谱检测中,  $\text{K}^+$ 、 $\text{Na}^+$  可使  $d(\text{TTAGGGT})$  原始的 NMR 光谱图形发生变化, 在 11~12 处出现了代表维持 3 个四分体聚集在一起的 3 个氢键波峰。依据此寡核苷酸碱基序列特点, 形成的 G4 是四分子  $d(\text{TTAGGGT})$  之间形成的平行型结构。NMR 氢谱变温实验发现  $\text{K}^+$  比  $\text{Na}^+$  显示出具有更强的稳定 G4 结构的能力, 这与细胞内高  $\text{K}^+$  低  $\text{Na}^+$  的生理环境密切相关,

也提示细胞内液中的  $K^+$ 、 $Na^+$  利于端粒重复序列形成 G4 结构。

研究发现端粒重复序列寡核苷酸在单价离子存在下可形成多种二级结构<sup>[7]</sup>,使其在非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳中的迁移速率提高;因此,非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳是检测端粒重复序列寡核苷酸中二级结构存在的有用工具。笔者对上述 3 种寡核苷酸进行了非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,发现在  $K^+$ 、 $Na^+$  存在下,  $d(TTAGGG)_4$  及  $d(TTAGGG)_5$  迁移的速度明显加速,几乎与  $d(TTAGGG)_3$  的迁移速度相同,这提示此两种寡核苷酸有紧凑的二级结构形成。这是证明端粒重复序列在细胞内可形成 G4 结构的另一间接证据。

$K^+$ 、 $Na^+$  是维持细胞生存环境的重要物质。细胞内外  $K^+$ 、 $Na^+$  的分布对维持细胞渗透压、细胞形态及正常生理功能十分重要。本研究在细胞生理浓度范围内选择  $K^+$ 、 $Na^+$  的体外实验浓度,且研究结果表明  $K^+$ 、 $Na^+$  可诱导含端粒重复序列的核苷酸形成 G4 结构并可稳定此结构,这提示细胞内液中的  $K^+$ 、 $Na^+$  是诱导端粒 3 末端单链形成 G4 的基础条件,这进一步为证实 G4 在细胞内存在提供了有力的实验证据。值得注意的是,尽管富含端粒重复序列的寡核苷酸在体外  $K^+$ 、 $Na^+$  影响下可形成 G4,但体内 G4 的形成要复杂得多;因为大多数端粒在细胞周期中处于双螺旋状态下。另外,体外分子间 G4 形成需要较高的 DNA 浓度,而这在体内是不能实现的。虽然体内 G4 结构还未能得到直接证实,但目前多项研究结果<sup>[2,8]</sup>均已间接证明其在细胞内的客观存在。

#### 参考文献:

[1] HAN H Y, HURLEY L H. G- quadruplex DNA: a potential target for anti- cancer drug design [J]. Trends Pharm Sci, 2000, 21(4):136- 141.

- [2] SKET P, CMUGELJ M, PLAVEC J. d(G3T4G4) forms unusual dimeric G- quadruplex structure with the same general fold in the presence of  $K^+$ ,  $Na^+$  or  $NH_4^+$  ions [J]. Bioorg Med Chem, 2004, 12(22):5735- 5744.
- [3] COSTA L T, KERKMANN M, HARTMANN G, et al. Structure studies of digonucleotides containing G- quadruplex motifs using AFM[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 313(4):1065- 1072.
- [4] GOMEZ D, LEMARTELEUR T, LACROIX L, et al. Telomerase downregulation induced by the G- quadruplex ligand 12459 in A549 cells is mediated by HERT RNA alternative splicing[J]. Nucleic Acids Res, 2004, 32(1):371- 379.
- [5] PENNARUN G, GRANOTIER C, GAUTHIER L R, et al. Apoptosis related to telomere instability and cell cycle alteration in human glioma cells treated by new highly selective G- quadruplex ligands [J]. Oncogene, 2005, 24(18):2917- 2928.
- [6] PENNARUN G, GRANOTIER C, GAUTHIER L R, et al. Apoptosis related to telomere instability and cell cycle alterations in human glioma cells treated by new highly selective G- quadruplex ligands [J]. Oncogene, 2005, 24(18): 2917- 2928.
- [7] SCHAFFITZEL L, BERGER I, POSTBERG K, et al. In vitro generated antibodies specific for telomeric guanine- quadruplex DNA react with stylonychia lemnae macronuclei[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(15): 8572- 8577.
- [8] WILLIAMSON J R, RAGHURAMAN M K, CECH T R. Monovalent cation- induced structure of telomeric DNA: The G-Quartet model[J]. Cell, 1989, 59(5 ):871- 880.
- [9] PHAN A T, MODI Y S, PATEL D J. Two-repeat Tetrahymena telomeric d(TGGGGTTGGGGT) sequence interconverts between asymmetric dimeric G- quadruplexes in solution[J]. J Mol Biol, 2004, 338(1): 93- 102.

(编辑 刘清海)