

## 研究简报

d(TC<sub>n</sub>) 序列形成 i-Motif 四聚体的电喷雾质谱分析

秦玉娇 魏士刚 刘振爽 汪兵 国新华\*

(吉林大学化学学院, 长春 130012)

**摘要** 富含胞嘧啶(C)的 DNA 序列 d(TC<sub>n</sub>) 能通过 C 和质子化 CH<sup>+</sup> 氢键之间的相互作用形成平行的双链结构, 两条质子化双链从头到尾插入, 进一步形成反平行 i-Motif 四链结构。利用电喷雾质谱在乙酸-乙酸钠缓冲溶液中研究了样品浓度、缓冲液的浓度、溶液的 pH 值及 d(TC<sub>n</sub>) 序列中 C 的长度 ( $n=3, 4, 5, 6$ ) 对 d(TC<sub>n</sub>) 形成四分子 i-Motif 结构影响。结果显示: d(TC<sub>5</sub>) 序列在 pH 4.0 ~ 5.0, 甲醇含量为 30%, 浓度为 20 mmol/L 醋酸-醋酸钠缓冲溶液中形成四聚体准分子离子强度最高。对于所研究的 d(TC<sub>n</sub>) 序列, 序列长度 ( $n$ ) 越大, 形成四分子 i-Motif 离子的相对强度越高。

**关键词** 电喷雾离子阱质谱; 四聚体 i-Motif 结构; d(TC<sub>n</sub>) 序列; C · CH<sup>+</sup> 碱基对

## 1 引言

富含胞嘧啶(C)的 DNA 序列在酸性溶液中通过 C 和质子化 CH<sup>+</sup> 的氢键相互作用形成平行双分子结构, 两个质子化双链从头到尾插入, 进一步形成反平行 i-Motif 四链结构<sup>[1~3]</sup>。DNA 序列含有 1~4 个重复的 C 片段可分别形成四分子、双分子和单分子 i-Motif 结构<sup>[1]</sup>, 例如: d(CCCAACCCACCACCCTACCCC) 折叠形成单分子 i-Motif 结构<sup>[4]</sup>, d(CCCTAACCCCTAA) 可形成双链以及四链 i-Motif 结构<sup>[5]</sup>, 而 d(C<sub>4</sub>) 形成四链 i-Motif 结构<sup>[6]</sup>。i-Motif 结构由于在酸性条件下形成, 在碱性条件下解离, 可应用于多功能纳米分子器件<sup>[4, 7]</sup>。一些蛋白质选择性地与富含 C 的 DNA 序列相互作用, 特别是当这种序列以 i-Motif 的结构形式存在, 改变基因或蛋白的功能<sup>[8, 9]</sup>。所以 i-Motif 结构具有特殊的生物学意义, 并具有广泛的应用潜力。由 d(TC<sub>n</sub>) 序列形成的 i-Motif 结构是 i-Motif 结构种类中最简单的四聚体, 故引起较多的关注, 然而用质谱的方法研究各种因素对 i-Motif 形成的影响鲜为报道。最近, Leroy 利用 NMR 研究了 d(TC<sub>n</sub>) 序列形成 i-Motif 结构动力学过程, 指出四分子 i-Motif 是由单分子逐级结合形成<sup>[10]</sup>。本研究采用电喷雾质谱研究了乙酸钠缓冲溶液条件及序列长度等因素对形成四链 i-Motif 结构的影响。

电喷雾源是一种特别软的电离源, 可以在质谱的气体相保留溶液中形成的非共价相互作用并使被测生物大分子带多电荷<sup>[11]</sup>。本研究通过电喷雾离子阱质谱检测由 d(TC<sub>n</sub>) 序列形成的 i-Motif 四聚体的 [4M]<sup>x-</sup> 峰, 利用测定的四聚体峰的相对强度来评价四聚体形成的难易和稳定性。然而, 当四链的 [4M]<sup>x-</sup> 离子带偶电荷 ( $x=2, 4, 6$ ), [4M]<sup>x-</sup> 峰将与 [M]<sup>-</sup> 和 [2M]<sup>2-</sup> 峰重叠, 所采用的质谱的分辨率不足以区分上述离子, 所以只用 [4M]<sup>x-</sup> 带奇电荷峰 ( $x=1, 3, 5$ ) 辨别是否生成 i-Motif 四聚体。d(TC<sub>n</sub>) 序列质谱分析显示: 序列的碱基数 < 5, 带 3 电荷的四聚体被检测出; 序列的碱基数 > 5, 带 5 电荷的四聚体被检测出。[4M]<sup>x-</sup> 的相对强度 (RI<sub>[4M]<sup>x-</sup>) 用公式 (1) 计算得到。</sub>

$$RI_{[4M]^{x-}} = \frac{I_{[4M]^{x-}}}{I_{all}} \times 100\% \quad (1)$$

## 2 实验部分

## 2.1 试剂与仪器

2011-07-05 收稿; 2011-10-27 接受

本文系国家自然科学基金面上项目 (No. 20975044) 和吉林省国际合作项目 (No. 20110707) 资助

实验所使用的核酸序列: d( TC<sub>3</sub>)、d( TC<sub>4</sub>)、d( TC<sub>5</sub>) 和 d( TC<sub>6</sub>) 由大连 TaKaRa 宝生物工程有限公司提供, 使用之前未进一步纯化。甲醇( 色谱纯, 北京化工厂); 冰醋酸( 色谱纯, 天津市福晨化学试剂厂); 乙酸铵( 分析纯, 北京化工厂)。实验用水为 Milli-Q 级纯水( 美国 Millipore 公司), 电阻率为 18.2 MΩ · cm。

G6300 Trap 质谱仪( 美国 Agilent 公司), 使用 Agilent 6300 Ion Trap LC-MS 数据分析软件记录数据和分析质谱图。

## 2.2 实验方法

将样品配制成浓度约为 2 mmol/L 的储备液, 于 -18 °C 保存。DNA 的准确浓度根据在 260 nm 测定的吸光度和摩尔吸光系数( <http://scitools.idtdna.com/country.aspx>) 计算获得。将 DNA 样品溶于一定浓度的醋酸-醋酸铵缓冲溶液中, 在 90 °C 水浴中加热 10 ~ 15 min, 室温冷却, 于 -4 °C 保存 24 h。进入质谱前加入适量甲醇。改变缓冲溶液浓度, DNA 浓度或甲醇含量, 测定形成四分子结构的相对强度。使用电喷雾离子源, 在负离子模式下对仪器条件进行优化。实验所采用主要仪器参数为: Capillary, 3600; Capillary Exit, -100; Skimmer, -15; Nebulizer, 10.34 kPa; Dry gas, 5 L/min; Dry Temperature, 325 °C。直接进样, 进样流速 5 μL/min, 每次采集时间为 1.0 min。

## 3 结果与讨论

### 3.1 d( TC<sub>5</sub>) 浓度对形成 [d( TC<sub>5</sub>) ]<sub>4</sub> 的影响

在 DNA 单链浓度为 40 ~ 200 μmol/L 范围内, 考察了 d( TC<sub>5</sub>) 序列浓度对形成 [d( TC<sub>5</sub>) ]<sub>4</sub> 四聚体离子相对强度的影响。理论上, 在相对稀的溶液中, DNA 分子越多, 相互碰撞结合“成核”的机会越大, 也就越容易形成多聚体。从动力学角度考虑, DNA 浓度越大, 形成多聚体的速率越快。在本研究的浓度范围内, 随着 DNA 浓度的增加, 测定的四链峰相对峰强度在 39.60% ± 1.13% 范围内, 未发生明显变化, 这可能是因为在这一浓度范围内形成四链结构已经达到饱和, 因此进一步增加浓度将不改变反应的平衡。图 1 为 80 μmol/L DNA 单链浓度条件下测得到 [d( TC<sub>5</sub>) ]<sub>4</sub> 的质谱图。为节省样品并得到重现性好的谱图, 取 80 μmol/L DNA 单链进行质谱分析。

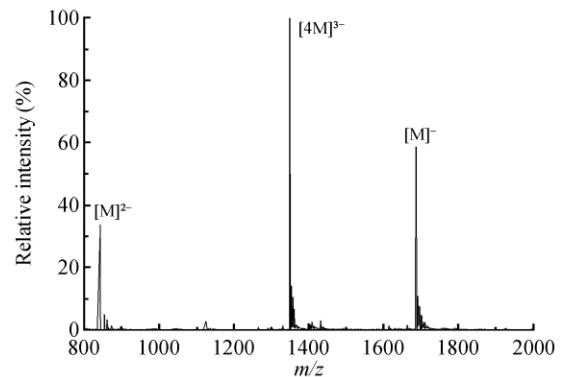


图 1 80 μmol/L d( TC<sub>5</sub>) 的质谱图

Fig. 1 Mass spectrum of 80 μmol/L d( TC<sub>5</sub>)

### 3.2 缓冲溶液浓度对 [d( TC<sub>5</sub>) ]<sub>4</sub> 的影响

富含 G 的序列形成 G 四链结构, 通常需要镶嵌在两个 4G 平面中间的一价阳离子稳定 G 四链体结构<sup>[3, 12]</sup>。i-Motif 结构虽然不需要阳离子的嵌入, 但是同样需要一定浓度的盐去中和磷酸骨架上的负电荷。考察了 NH<sub>4</sub>OAc-HOAc 缓冲溶液浓度变化对 i-Motif 四聚体形成的影响。如表 1 所示, 在不同浓度的缓冲溶液中, 几种离子的相对强度发生了明显变化。随着缓冲溶液浓度的增大, [M]<sup>3-</sup>, [2M]<sup>3-</sup>, [3M]<sup>4+</sup> 峰强度逐渐降低, [4M]<sup>5-</sup> 峰强度逐渐增大, 直到达到最佳缓冲溶液浓度( 20 mmol/L) 后, 四链峰强度开始下降。可以推测, 在较低的盐溶液中, [M]<sup>n-</sup> 上的负电荷未被抵消, 很容易形成多电荷离子。因此, 在质

表 1 在不同浓度的乙酸铵缓冲溶液下 d( TC<sub>5</sub>) 序列形成各种分子离子峰相对强度

Table 1 Intensities of various molecular ions formed by oligonucleotide ( d( TC<sub>5</sub>) ) at different concentrations of buffer solution

浓度 Concentration ( mmol/L)	M <sup>3-</sup> ( %)	M <sup>2-</sup> ( %)	M <sup>-</sup> ( %)	2M <sup>3-</sup> ( %)	3M <sup>4+</sup> ( %)	4M <sup>5-</sup> ( %)	浓度 Concentration ( mmol/L)	M <sup>3-</sup> ( %)	M <sup>2-</sup> ( %)	M <sup>-</sup> ( %)	2M <sup>3-</sup> ( %)	3M <sup>4+</sup> ( %)	4M <sup>5-</sup> ( %)
0.1	28.10	46.74	2.62	12.29	6.13	4.01	20	0.78	42.42	24.34	7.98	0.97	24.41
1	14.38	32.91	8.23	16.02	9.23	19.24	50	0.54	52.17	23.53	5.46	0.96	18.33

谱图的低质量端产生离子峰; 此外, 在较低的离子强度下, 难于形成四聚体; 或由于四聚体负电荷密度大, 形成的四聚体不稳定, 而随着 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 浓度的增大, 双链和三链峰强度降低, 四链峰强度逐渐增加。可

以观察到,在不同的溶液条件下四链峰形成是逐条链加合,最后形成四链多聚体结构的动力学过程,这与 NMR 的研究结果相一致<sup>[10]</sup>。当缓冲溶液浓度超过最佳浓度值,较高的盐浓度就会使质子化的 i-Motif 结构不稳定,使 DNA 倾向于容纳更大负电荷密度的单链形式存在<sup>[3]</sup>。图 2 显示了  $[d(\text{TC}_5)]_4$  相对强度随乙酸铵浓度变化曲线。由图 2 可见,最佳缓冲溶液浓度为 20 mmol/L。

### 3.3 甲醇含量对 $[d(\text{TC}_5)]_4$ 的影响

由非共价相互作用力稳定的 DNA 多聚体很不稳定,有机溶剂的存在可以使其结构被破坏;然而在纯水溶液中多聚体分子很难被离子化。因此,在质谱进样前向样品中加入适量甲醇以提高分析的灵敏度。图 3 显示了四分子  $[d(\text{TC}_5)]_4$  的相对强度随甲醇含量的变化曲线。从图 3 可见,甲醇的最佳含量为 30% (V/V)。

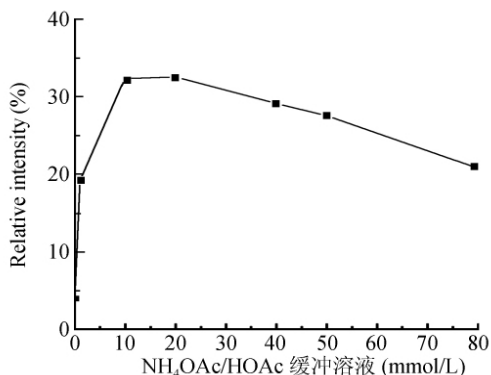


图 2  $[d(\text{TC}_5)]_4$  的相对强度随醋酸铵浓度变化曲线

Fig. 2 Relative intensity of  $[d(\text{TC}_5)]_4$  vs concentration of ammonium acetate

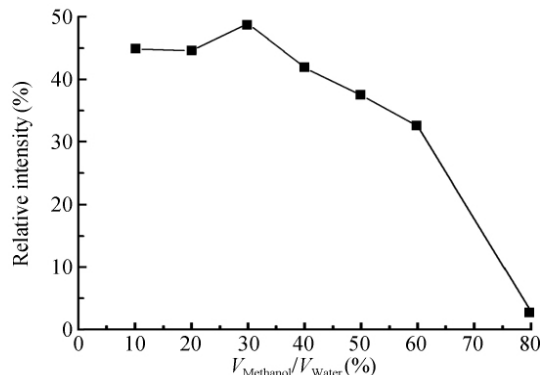


图 3  $[d(\text{TC}_5)]_4$  相对强度随甲醇含量的变化曲线

Fig. 3 Relative intensity of  $[d(\text{TC}_5)]_4$  vs volume ratio of methanol to water

### 3.4 pH 值的影响

富含 C 碱基的序列形成 i-Motif 四聚体结构的一个主要因素是胞嘧啶先质子化 ( $\text{CH}^+$ ) 与未质子化的 C 形成  $\text{C} \cdot \text{CH}^+$  碱基对,而质子化反应通常需要在酸性条件下进行。采用电喷雾质谱在 pH 值 2.5 ~ 9.0 的乙酸铵缓冲溶液中测定了  $d(\text{TC}_n)$  序列形成四分子  $[d(\text{TC}_n)]_4^{x-}$  的相对强度 ( $n=4, 5$  或 6)。图 4 显示了 3 个不同序列形成四分子  $[d(\text{TC}_n)]_4^{x-}$  的相对强度随 pH 变化曲线。由图 4 可见  $d(\text{TC}_4)$ 、 $d(\text{TC}_5)$  和  $d(\text{TC}_6)$  均在 pH 4.5 左右形成最强的  $[d(\text{TC}_n)]_4^{x-}$  峰;在接近中性的条件下,几乎没有四分子离子被检测出。因此,形成 i-Motif 结构最佳的 pH 范围应该为 4.0 ~ 5.0。

### 3.5 胞嘧啶 C 长度的影响

半质子化碱基对之间的相互插入稳定 i-Motif 结构。设想:如果 C 碱基数增多,C 和质子化  $\text{CH}^+$  的离子对将增加,插入的碱基对将增加,非共价作用力就会增强,形成的 i-Motif 结构将更稳定。质谱测定结果与此设想一致。表 2 列出了在相同的溶液和仪器条件下由  $d(\text{TC}_4)$ 、 $d(\text{TC}_5)$  和  $d(\text{TC}_6)$  序列形成  $[4\text{M}]^{x-}$  峰的相对强度和 6 次测定的相对标准偏差。同时分析了  $d(\text{TC}_3)$  序列,由于其

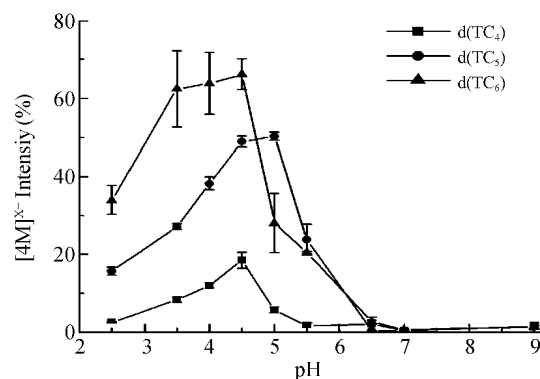


图 4  $d(\text{TC}_4)$ 、 $d(\text{TC}_5)$  和  $d(\text{TC}_6)$  序列形成四分子  $[4\text{M}]^{x-}$  相对强度随 pH 变化曲线

Fig. 4  $[4\text{M}]^{x-}$  intensity of  $d(\text{TC}_4)$ 、 $d(\text{TC}_5)$  or  $d(\text{TC}_6)$  vs pH values

表 2  $d(\text{TC}_4)$ 、 $d(\text{TC}_5)$  和  $d(\text{TC}_6)$  序列在 pH=4.5 时形成四链峰  $[4\text{M}]^{x-}$  的相对强度

Table 2 Relative intensities of  $[4\text{M}]^{x-}$  formed by sequences  $d(\text{TC}_4)$ 、 $d(\text{TC}_5)$  and  $d(\text{TC}_6)$  at pH 4.5

DNA oligomer	$I_{4\text{M}^{3-}}$ (%)	$I_{4\text{M}^{5-}}$ (%)
$d(\text{TC}_4)$	$0.19 \pm 0.04$	
$d(\text{TC}_5)$		$0.49 \pm 0.07$
$d(\text{TC}_6)$		$0.66 \pm 0.22$

形成的四链峰的相对强度低,这里没有给出数据。表2显示:d( TC<sub>n</sub>) 序列中C碱基数增多,四链峰强度明显增加,其中d( TC<sub>5</sub>) 比d( TC<sub>4</sub>) 增加了近30%,但是d( TC<sub>6</sub>) 比d( TC<sub>5</sub>) 只增加了15%,说明当序列碱基数达到一定值,继续增大C碱基数目,四链峰强度增加不明显。

### 3.6 小结

本研究利用电喷雾质谱对d( TC<sub>n</sub>) 序列形成i-Motif四聚体进行分析,研究发现:缓冲溶液浓度为20 mmol/L, pH 4.0~5.0, 甲醇含量30%为形成四聚体的最佳溶液条件。在最佳溶液条件下,d( TC<sub>n</sub>) 序列形成四聚体结构的能力随着n的增大而增强,其形成动力学过程是逐条链结合的过程。

### References

- 1 Gilbert D E, Feigon J. *Current Opinion in Structural Biology.* ,1999, 9(3): 305~314
- 2 Guéron M, Leroy J L. *Current Opinion in Structural Biology.* ,2000, 10(3): 326~331
- 3 Mills M, Lacroix L, Arimondo P B, Leroy J-L, Francois J-C, Klump H, Mergny J-L. *Curr. Med. Chem. Anti Cancer Agents.* ,2002, 2(5): 627~644
- 4 Song G T, Chen M. L, Chen C, Wang C Y, Hu D, Ren J S, Qu X G. *Biochemistry* ,2010, 92(2): 121~127
- 5 Kaushik M, Prasad M, Kaushik S, Singh A, Kukreti S. *Biopolymers* ,2010, 93(2): 150~160
- 6 Chen L Q, Cai L, Zhang X H, Rich A. *Biochemistry* ,1994, 33(46): 13540~13546
- 7 Alberti P, Mergny J L. *PNAS* ,2003, 100(4): 1569~1573
- 8 Sarig G, Weisman-Shomer P, Erlitzki R, Fry M. *J. Biol. Chem.* ,1997, 272: 4478~4482
- 9 Marsich E, Piccini A, Xodo L. E, Manzini G. *Nucleic. Acids. Res.* ,1996, 24(20): 4029~4033
- 10 Leroy J L. *Nucleic Acids Research.* ,2009, 37(12): 4127~4134
- 11 Meng Z J, Simmons-Willis T A, Limbach P A. *Biomolecular Engineering* ,2004, 2: 1~13
- 12 Williamson J R. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* ,1994, 23: 703~730

## Oligonucleotide Forming Tetramolecular i-Motif Structure Studied by Electropray Ionization Mass Spectrometry

QIN Yu-Jiao, WEI Shi-Gang, LIU Zheng-Shuang, WANG Bing, GUO Xin-Hua\*  
(College of Chemistry, Jilin University, Changchun 130012, China)

**Abstract** Cytocine (C) rich DNA sequence oligonucleotide (d( TC<sub>n</sub>)) can form parallel duplex through the interactions of C and protonated CH<sup>+</sup> base pair and two parallel duplexes intercalate into each other in a head to tail orientation to adopt a four-stranded i-Motif structure. In this study, the tetramolecular ions formed by the sequence d( TC<sub>n</sub>) are measured by electrospray ionization mass spectrometry, and the influence of solution conditions and cytosine length on the formation of tetramolecular i-Motif are investigated. The results show that d( TC<sub>5</sub>) sequence in a buffer solution containing 20 mmol/L ammonium acetate and 30% methanol with pH 4.0~5.0 generates the most abundant tetramolecular ion. Increasing n numbers of the d( TC<sub>n</sub>) (where n varies from 3~6) favors the formation of the tetramolecular i-Motif.

**Keywords** Electropray ionization-ion trap mass spectrometry; Tetramolecular i-Motif structure; Oligonucleotide sequence; C • CH<sup>+</sup> base pair

(Received 5 July 2011; accepted 27 October 2011)