

圆二色谱测定技术在小分子化合物与 DNA 相互作用研究中的应用

刘振佳, 司伊康, 陈晓光*

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 北京 100050)

摘要: 圆二色谱 (CD) 是研究 DNA 构象随环境条件 (如温度、离子强度和 pH) 的改变而变化的检测技术, 也是研究 DNA 与配基 (包括小分子和蛋白质等大分子) 相互作用的有力工具。DNA 的圆二色谱是由其骨架结构中的不对称糖分子和由这些糖分子的构型决定的螺旋结构产生的。根据配基对原有的 DNA 圆二色谱信号的影响, 以及诱导产生的圆二色谱新信号 (ICD) 的不同特点, 不仅可以得知配基与 DNA 具有相互作用, 还可以推断配基与 DNA 结合的不同模式。研究表明这些 ICD 信号是由配基的电子跃迁偶极矩与 DNA 的碱基电子跃迁偶极矩在 DNA 不对称环境中发生偶合产生的。如果使用不同序列的短链 DNA 进行深入研究, 还可获知配基与 DNA 相互作用中的序列特异性。实验已经证明, 圆二色谱法虽然灵敏度较低, 但它具有快速、简便、样品用量少、对构象变化敏感及不受分子大小的限制等特点, 可以作为核磁共振 (NMR) 和 X-光单晶衍射技术的补充。本文将介绍圆二色谱技术在研究 DNA 与小分子化合物相互作用中的应用以及本实验室利用圆二色谱技术研究抗肿瘤新药的初步结果。由于圆二色谱可作为新药研究中发现先导化合物辅助筛选的手段, 因此可用于发现更多以 DNA 为靶点的药物, 如抗肿瘤药、抗菌药、抗病毒药等。

关键词: 圆二色谱; 诱导圆二色谱; 抗肿瘤药; 药物与 DNA 相互作用; DNA 嵌入; DNA 沟结合

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 12-1478-07

Application of circular dichroism to the study of interactions between small molecular compounds and DNA

LIU Zhen-jia, SI Yi-kang, CHEN Xiao-guang*

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: Circular dichroism (CD) is a useful technique for monitoring DNA conformation changes resulting from changes in environmental conditions, such as temperature, ionic strength, and pH, and also for the study of the interaction between DNA and ligands (including small molecules and proteins). CD spectroscopy of DNA arises from the asymmetric backbone sugars and by the helical structures often adopted by nucleic acids. By the interpretation of induced circular dichroism (ICD) of ligand signals resulting from the coupling of electric transition moments of the ligand, DNA bases within the asymmetric DNA environment, ligand-DNA interactions, as well as the DNA-binding mode can be assessed. A number of important conclusions have been reported that related to the observed ICD signals resulting from the interactions between intercalators and groove binders with DNA. If short oligonucleotide sequences are used in the study, sequences-specific of binding also can be deduced. CD determination requires smaller amounts of sample, and not limited by the molecular weight or size and can be performed rapidly; though CD is of low resolution, but it's a complement to NMR and X-ray diffraction methods. This review will introduce the characters of the CD spectra of DNA, and its application to

收稿日期: 2010-04-15.

*通讯作者 Tel: 86-10-63165207, E-mail: chxg@imm.ac.cn

the studies of DNA with small molecules; some progress of the studies in our laboratory will also be discussed. CD is expected to be used as a screening method in seeking more DNA-targeted drugs, such as, antineoplastic, antimicrobial and antiviral drugs.

Key words: circular dichroism; induced circular dichroism; antineoplastics; interaction between compounds and DNA; DNA intercalation; DNA groove binding

圆二色谱 (circular dichroism, CD) 测定技术是一种利用平面偏振光研究溶液中蛋白质、DNA 等生物大分子二级和三级结构的快速、简单、较准确的方法。目前被广泛应用于这些大分子的结构与功能的研究以及配基 (小分子或大分子药物) 与它们的相互作用研究中。

尽管与 NMR 和 X 单晶衍射技术相比, CD 提供的结构信息相对较简单, 但由于测定时操作简便、所需样品量极少、可在稀溶液中测定、没有分子量或分子大小的限制且测定时间很短, 这些优点是其他方法所不能比拟的。CD 谱对溶液中的蛋白质、核酸等生物大分子的二级及三级结构变化高度灵敏, 能检测到其微小的改变, 因此该测定技术在生物大分子结构分析中得到了很多的应用, 其中包括小分子药物与 DNA 相互作用的分析研究^[1, 2]。本文将介绍近年来这方面研究的新进展。

1 应用圆二色谱法检测小分子化合物与 DNA 相互作用的重要意义

DNA 是生物的基本遗传物质, 是遗传信息的载体, 是基因表达的物质基础, 因此 DNA 也是很多类药物 (如抗肿瘤药、抗菌药、抗病毒药、抗寄生虫药) 的重要靶点^[3, 4]。DNA 与药物分子相互作用的研究对此类药物的设计、合成、结构改造及相关的作用机制研究具有重要的意义^[5]。相关的研究方法有很多, 如核磁共振法、X 射线衍射法、荧光光谱法、电化学法等, 而 CD 法, 以其快捷、迅速、灵敏、样品用量少等优点, 在相关研究中受到了越来越多地关注, 前景广阔^[1]。尤其是快捷、样品用量少等优点使其有望成为筛选与 DNA 相互作用的药物, 尤其是细胞毒类抗肿瘤药的重要方法。

肿瘤是继心脑血管疾病之后的人类第二号杀手, 尽管最近抗肿瘤药物中分子靶向药物不断上市, 肿瘤的免疫治疗、生物学治疗、基因治疗等选择性更强, 毒性更低的药物和新技术也在不断涌现, 但是在我国, 多数一线使用的药物仍然以细胞毒类抗肿瘤药物为主, 其中不乏与 DNA 相互作用的药物, 如烷化剂类药物、蒽环类抗生素、铂类等, 多数分子靶向药

物仍只作为二、三线药物使用或是与细胞毒类药物联合应用。很显然, 与 DNA 相互作用的细胞毒类药物在肿瘤治疗中的地位仍然是无可替代的, 且在相当长的时间之内还不会改变。尽管在欧美国家靶向抗肿瘤药物的市场份额很大, 但目前细胞毒类的抗肿瘤药物的研究仍然受到广泛的支持与重视。最近几年, 美国 FDA 就批准了包括 pralatrexate、bendamustine、ixabepilone 等在内的多种细胞毒类抗肿瘤药物上市, 可见对细胞毒类的抗肿瘤药物的筛选和结构优化研究仍然是药学工作者的重要任务。

2 DNA 圆二色谱的产生原理及其特征

DNA 是核苷酸的聚合物, 由五碳糖和磷酸骨架及含氮碱基组成, 并形成双螺旋结构。双螺旋结构又具有 A、B 和 Z 等多种构型, 其中 B 构型最为常见。DNA 的 CD 信号由不对称的主链上的核糖分子以及螺旋结构产生。DNA 的含氮碱基, 如腺嘌呤 (A)、胸腺嘧啶 (T)、鸟嘌呤 (G) 和胞嘧啶 (C), 它们的结构是平面对称的, 本身并没有光学活性, 当碱基连接到不对称核糖的 1' 位碳原子上后, 碱基生色团电子跃迁受到不对称环境的影响产生相互作用, 因而可以产生很强的 CD 谱信号。碱基不同、糖的类型不同都会导致 DNA 的构象不同, 以致它们的 CD 图谱特征不同。这些就是 CD 谱可以用于 DNA 二级结构即构象变化研究的基础。

CD 谱对 DNA 的构象变化极其敏感, 尤其是在 180~320 nm 内^[6]。理论上, 核酸的 CD 谱可以根据量子力学原理通过计算而得到, 但是由于实际测定中影响因素的多样性, 迄今为止这类计算还不能可靠地、定量地解释实测的 CD 谱。因此, 核酸的 CD 谱一般只能作为某给定核酸二级结构的经验性的标识使用^[7]。但是, CD 谱是监测 DNA 结构改变的强有力的工具。不同构型 DNA 的 CD 谱本身就存在显著差异^[8]。环境因素的变化, 如温度、溶剂、离子强度、缓冲液组成和 pH 值等都会显著地影响其 CD 谱的谱型^[8-10]。自身序列的差异、碱基组成等因素也可显著地影响其 CD 谱^[11]。B 构型 DNA 是最常见的一种 DNA 的构型, 每个螺旋有 10 个碱基对, 且碱基对几

乎垂直于双螺旋的纵轴, 标准的 B 型 DNA 的 CD 谱可参见图 1。CD 正性带出现在 280 nm 附近, 负性带则位于 245 nm 附近, 与基线轴交汇于约 260 nm 附近。这一对正-负的 CD 带是由堆积的碱基之间的电子跃迁偶极矩的偶合产生, 也称激发态相互作用产生的裂分的圆二色谱。天然的 DNA 包含 4 种不同的碱基, 总共有 7 种不同的 $\pi \rightarrow \pi^*$ 吸收带, 它们的电子跃迁间都存在激发态相互作用, 总的作用结果则是呈现出一对简单的一正一负 CD 带^[6]。220 nm 以下的短波长区域 CD 信号较强, 与特定的 DNA 的 GC 含量有关, 二级结构的改变可引起其强度的巨大变化。许多研究主要探讨 220 nm 以上波段的 DNA 的 CD 谱^[7, 12]。天然存在的 DNA 中唯一不对称结构组分, 即脱氧核糖, 均为 *D* 构型, 如以 *L* 构型的脱氧核糖替代天然的 *D*-脱氧核糖, 其 DNA 寡聚体所呈现的 CD 谱是天然 DNA CD 谱的镜像。由于除了脱氧核糖的手性 (即不对称性) 不同外, *L*-DNA 和 *D*-DNA 拥有同样的构象和动力学构象性质^[12]。两种构型 DNA 的 CD 谱呈现的镜像关系也说明了 CD 谱可敏感地检测

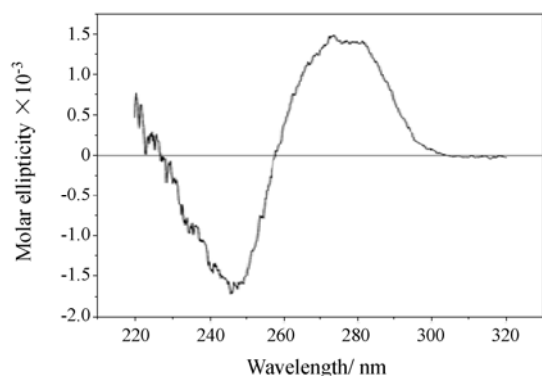


图 1 *E. coli* DNA 的 CD 谱, 溶液体系为 1 mmol·L⁻¹ Na₂EDTA, 185 mmol·L⁻¹ NaCl, 6 mmol·L⁻¹ Na₂HPO₄/2 mmol·L⁻¹ NaH₂PO₄, pH 7.0^[7]

DNA 的不对称性的变化。核酸的 CD 谱的相关研究和综述可以参见相关的其他文献^[6, 7, 13, 14]。

3 小分子化合物与 DNA 相互作用的方式

药物与 DNA 相互作用的典型方式有 3 种: 嵌入、沟结合和烷基化/金属化。前两种为非共价结合 (图 2 所示), 后一种为共价结合。平面的芳香烃分子可嵌入到 DNA 双螺旋分子碱基对的片层间, 引起双螺旋解旋, DNA 分子伸长, 结合常数一般在 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^{11}$ (mol·L⁻¹)⁻¹ 内^[4, 15], 如玫瑰树碱类 (ellipticines) 化合物^[16, 17]。一些柔性结构的分子可结合到 DNA 的沟槽中, 尤其是结合到小沟^[18-21], 如 berenil^[1, 22], 此类结合并不像嵌入结合那样可改变 DNA 的双螺旋结构, 结合常数一般较嵌入结合要大, 约为 1×10^{11} (mol·L⁻¹)⁻¹ 左右^[15]。蒽环类抗生素的蒽醌环可以嵌合到 DNA 的 C-G 碱基对片层之间, 蒽醌环的长轴几乎垂直于碱基对的氢键方向, 9 位的氨基糖位于 DNA 的小沟处, D 环插入到大沟部位。放线菌素 D 与 DNA 结合是通过其平面结构的吩噻嗪酮母核嵌入到 DNA 的 2 个鸟嘌呤片层之间, 其结构中苏氨酸的羧基氧原子与 DNA 中鸟嘌呤的 2-氨基形成氢键, 而其肽链侧位则可进入到 DNA 双螺旋的小沟内^[23]。这两类结合都只是非共价结合于 DNA。而烷基化/金属化过程中, 药物与 DNA 分子发生了共价相互作用, 可引起 DNA 链内或链间的交联, 影响其复制、转录等生物学功能, 如氮芥类和铂类抗肿瘤药。

4 推测小分子化合物与 DNA 结合方式的诱导的圆二色谱 (ICD)

DNA 中的杂环碱基本身是平面对称无手性的, 在圆二色谱中没有信号, 但是置于手性的五糖-磷酸骨架中后, 由于受到不对称环境的影响, 杂环碱基的电子跃迁可以产生 CD 上的 Cotton 效应 (即正或负的

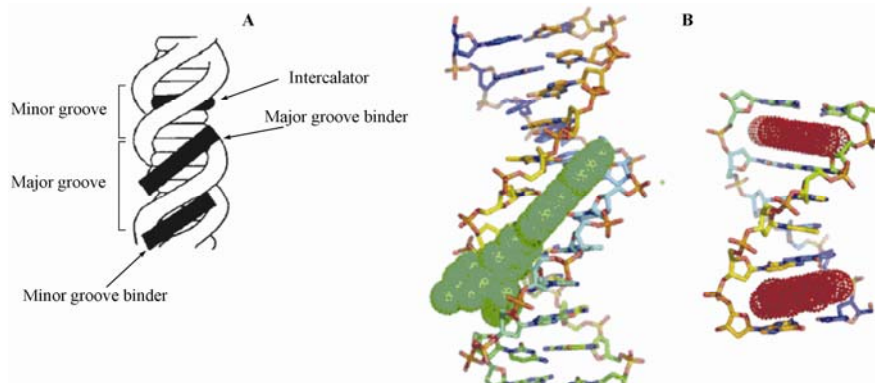


图 2 A: DNA 与配体结合方式示意图^[24]; B: (小) 沟结合 (Hoechst33258) 和嵌入 (ellipticine)^[15]相互作用示意图

峰), 并在碱基对间产生由电子跃迁偶合形成的 CD 信号。很多与 DNA 结合的配基本身无手性、无光学活性, 而与 DNA 相互作用后, 使该配基的构象发生了改变, 成为具有手性的空间排列, 也可以通过和 DNA 碱基的电子跃迁偶极矩间的偶合而产生 CD 信号, 称为诱导的圆二色谱 (induced circular dichroism, ICD)。在小分子与 DNA 混合样品的 CD 谱中, 如观察到 ICD 的吸收带即提示该配基与 DNA 存在着相互作用^[1]。根据 DNA 与配基相互作用产生的 ICD 的不同特征, 可以对配基与 DNA 的作用方式, 以及 DNA 分子的几何形状进行定性的、经验性的推测。DNA 嵌入剂一般表现为最大不超过 $10 (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})^{-1} \text{cm}^{-1}$ 的 ICD 信号, 而较强的 ICD 信号则提示配体与 DNA 小沟发生了结合 (图 3)。

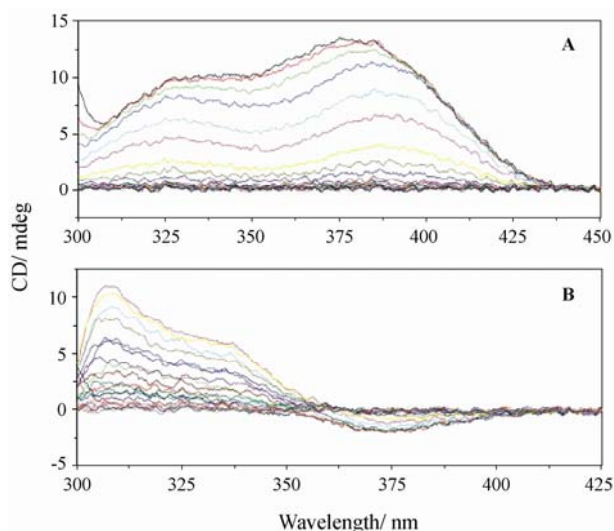


图 3 A: 典型的小沟结合 ICD (385 nm); B: 典型的嵌入结合 ICD (375 nm)^[1]

对于电子跃迁偶极矩的方向是沿着该分子长轴

方向的嵌入剂来说, 如果配基的电子跃迁偶极矩的方向平行于碱基对的长轴方向, 则 ICD 信号为正, 如果垂直于碱基对的长轴方向, ICD 则为负 (如图 4 所示)。如果配体的电子跃迁偶极矩沿其他方向, 则需要进一步考虑其他因素。对于并不位于嵌入位点中心的配基来说, CD 信号的正负符号和强度则会受到更加复杂的方式影响, 如配体的侧向距离和配体周围碱基对的特性等^[1]。

Monnot 等^[17]报道, CD 法是一种区别小分子药物与 DNA 相互作用模式的强有力而又敏感的技术, 能够用于确定嵌入到碱基对之间的生色团的几何形状。他们通过 CD 检测发现, 抗肿瘤药物 2-methyl-9-hydroxyellipticinium 可以与 cAMP-反应元件 (CRE) 的 8 bp (base pair) 寡核苷酸序列 d(TGACGTCA) 及其反向序列 d(ACTGCAGT) 分别发生相互作用。在 CD 谱中, 330 nm 处产生明显的剂量依赖性增加的正峰, 提示该分子的长轴与短链 DNA 的碱基对间处于垂直的几何位置 (如图 4B 所示)。

配基结合到 B-DNA 小沟时, 电子跃迁偶极矩的方向沿着小沟的方向, 即与碱基呈 45° , 则会出现强的正 ICD 信号。结合到大沟的配基的 ICD 信号强度和符号则变化较大, 这是因为大沟的宽度允许配体的结合存在多种可能的方向。Garbett 等^[1]报道了以 CD 法来检测溴化乙啶 (EB)、berenil 与小牛胸腺 DNA (CT-DNA) 的相互作用的研究结果。在 DNA 中加入嵌入剂 EB 的 CD 谱中, 在 375 nm 处存在明显的剂量依赖性增大的负峰, 强度在 5 mdeg (millidegree, CD 的强度单位) 以下。而在 DNA 中加入小沟结合剂 berenil 的 CD 谱中, 则在 385 nm 处有明显的剂量依赖性增加的正峰, 强度高至 $12 \sim 15 \text{ mdeg}$ 。Willis 等^[18]报道, 新霉素-Hoechst33258 的结合物与 poly(dA)·

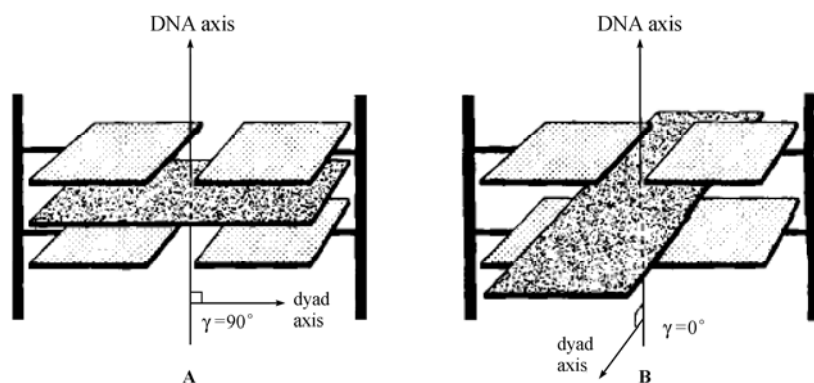


图 4 药物嵌入 DNA 碱基对的方式。A: 化合物的生色团垂直于 DNA 纵轴, 药物分子的长轴方向平行于碱基对轴; B: 药物分子的长轴方向垂直于碱基对轴^[17]

poly(dT) 多聚核苷酸的相互作用, 在其 CD 谱的 360 nm 处有显著的剂量依赖性增加的正峰, 大约高至 11 mdeg, 主要是 Hoechst33258 部分与 DNA 存在小沟结合作用。Hoechst33258 是一种 DNA 染料, 与 DNA 有明确的小沟结合性的相互作用。Liu 等^[25]报道, DB-75 与 poly(dA)·poly(dT)、poly(dA-dT)₂、A15 和 (AT)₇ 等多种寡链 DNA 有相互作用, 在这 4 种 DNA 中, 均能在 391 nm 处产生剂量依赖性增加的 ICD 正峰, 强度在 10 mdeg 左右。Fleury 等^[19]报道 fagaronine 与 DNA 的相互作用是大沟结合式的相互作用, CD 谱中, 在 405、336 和 321 nm 处有多重的正峰, 而在 304 nm 处则出现负峰。这是由于配基结合具有多种可能取向方式导致了其 ICD 谱中出现了复杂信号。

ICD 信号也与配基是以单体还是二聚体的方式结合到 DNA 上有关。如果有二聚体或更大的配基聚合体结合到 DNA 上, 则会观察到很强的裂分的激发态 CD 信号, 和 DNA 本身的信号一样是双信号的形状, 在配基的最大吸收波长附近呈现一个正性带和一个负性带 (从长波向短波方向观察) 或相反。这是两个同等能量的电子跃迁偶极矩由于紧密地相接近而产生偶合的结果。裂分的 CD 信号的出现提示存在着配基二聚体或更大的聚合体, 它们以沟结合或外部堆积结合的方式结合到 DNA^[1]。

小分子化合物与 DNA 结合除了在 300 nm 以上出现 ICD 信号以外, 小分子化合物的作用还对 DNA 的一对正、负的 CD 双信号带产生影响。这是因为配体结合到 DNA 后, 可引起 DNA 构象的明显改变, CD 谱对这些改变有非常敏感的变化反映。CD 谱改变的原因可能有以下两个方面: ① DNA 与配基的电子跃迁偶极矩的偶合或 DNA 几何结构的改变引起了 DNA 碱基的电子跃迁偶极矩相互偶合的改变。因此 DNA 结合配基后, 可引起原有 CD 峰的强度变化和波长位置的改变。② 波长在 275~280 nm 出现的正峰的大小与双螺旋的螺旋状态密切相关, 其强度的大小与 DNA 每个螺旋的碱基数相关^[26]。配基嵌入到 DNA 中, 可引起螺旋碱基数的增加, 但是, 其对 CD 谱的影响较为复杂, 275~280 nm 正峰可出现降低、增加或变化不大^[17, 27]。245 nm 负峰的变化也较大。随着配基/DNA 的比例的增加, 该峰有时下探, 有时上抬^[27, 28]。

5 圆二色谱可作为新药研究中辅助筛选的工具

由于 300 nm 以上的 ICD 峰可以用来定量分析药

物与 DNA 结合的强弱, 这种现象有可能被应用于筛选以 DNA 为靶点的与 DNA 相互作用的药物。300 nm 以下的 ICD 是对 DNA 原正负峰的影响, 也有望用于此类筛选。Sarkar 等^[29]报道, 3 个结构类似的化合物 PSF、ST 和 SO 与 CT-DNA 相互作用的 450~600 nm 范围内的 ICD 图谱中, 3 个化合物均在 558 nm 处出现正峰, 510 nm 处出现负峰。而且其 CD 峰的强度均随着化合物浓度的增加而增强。而同等浓度的化合物所诱导的峰强度的大小顺序是 PSF > ST > SO。占据空间相对较小的 PSF 诱导 ICD 的变化强度较大, 提示 PSF 能够程度更大地嵌入 DNA 的碱基对之间。可见, ICD 的强度可以用于区分结构类似的化合物与 DNA 的结合程度, 从而有望用于相关药物的筛选, 以及对活性化合物的结构优化研究提供有用的信息。

本研究所陈晓光研究员实验室用 CD 测定方法对某些已知的抗肿瘤药, 如放线菌素 D、阿霉素、米托蒽醌等, 以及一些明确与 DNA 有相互作用的化合物, 如 Hoechst33258、EB、berenil、ellipticine 等与 DNA 的相互作用进行了初步的研究, 发现从 CD 谱信息分析得到的这些化合物与 DNA 相互作用的方式完全与文献报道的一致。在将 CD 谱用于新型作用于 DNA 的药物的筛选并用以指导新的细胞毒抗肿瘤药物母核的结构修饰研究中, 也发现可以很好地区别出这些不同生物活性的配基与 DNA 结合方式的差异。在研究中使用的样品仅 1 mg 以下, 可便捷、迅速地获知其与 DNA 相互作用的情况, 并通过 CD 谱, 对已知作用于 DNA 的抗肿瘤药物的众多结构修饰物与 DNA 的结合能力进行半定量的分析, 以求优化药物的作用强弱, 也获得了较好的研究进展。

6 小分子化合物与 DNA 的序列特异性相互作用研究

许多小分子化合物与 DNA 的相互作用存在着序列特异性。蒽环类抗生素、放线菌素 D 等药物已被证明与 GC 碱基对具有相互作用。相关的研究可采用特定序列的 DNA, 如 poly(A)·poly(T)、poly(A-T)·(A-T)、poly(G)·poly(C)、poly(G-C)·(G-C)或是其他特定序列的 DNA。不同序列的 DNA 由于特定的碱基间具有的相互作用以及几何构型上的细微差异, 其本身的 CD 谱就有所不同。与特定的小分子化合物相互作用后, 通过 ICD 谱的变化可以推测小分子化合物与 DNA 结合的序列偏好。Bhadra 等^[30]报道, 细胞毒类的生物碱掌叶防己碱 (palmatine) 可与不同的 DNA 序列具

有相互作用。同等浓度条件下, 在 poly(dA)·poly(dT) 序列和 poly(dA-dT)·poly(dA-dT) 序列的 DNA 中所引起的 ICD 的改变比在 poly(dG)·poly(dC) 序列和 poly(dG-dC)·poly(dG-dC) 序列的 DNA 中改变更为显著。该结果提示掌叶防己碱与富含 AT 的序列具有更强的结合能力。本研究所陈晓光研究员实验室对菲并吡啶里西啶类抗肿瘤生物碱与 DNA 的相互作用做过深入的研究, 发现此类化合物与 DNA 有明确的序列特异性的相互作用, 因此认为圆二色谱在预测这类结合方式的过程中起到了关键的作用, 但要确证作用方式, 还需要应用 NMR、X 射线衍射等其他技术。相关的研究仍在进行中。

结论

圆二色谱测定快速、简便、对构象变化敏感、样品用量少的优点弥补了其提供的结构相关信息相对较少的缺点。在我国圆二色谱测定以往大多只是用于确定小分子手性化合物的绝对构型以及蛋白质构象与功能相关的研究, 采用 CD 技术研究核酸, 包括其构象变化与功能的关系, 以及小分子化合物与之相互作用的研究很少。作者的研究显示了将 CD 技术用于筛选与 DNA 相互作用的药物并进行相关的结构优化的研究, 以及采用 CD 技术深入研究小分子化合物与 DNA 结合位点的序列特异性等, 均可为研究以 DNA 为靶点的药物作用方式提供重要的线索。由此可以相信圆二色谱技术在抗肿瘤药物的深入研究中将会具有更加令人期待的广阔前景。

References

- [1] Garbett NC, Ragazzon PA, Chaires JB. Circular dichroism to determine binding mode and affinity of ligand-DNA interactions [J]. *Nat Protoc*, 2007, 2: 3166-3172.
- [2] Norden B, Kurucsev T. Analysing DNA complexes by circular and linear dichroism [J]. *J Mol Recognit*, 1994, 7: 141-155.
- [3] Strekowski L, Wilson B. Noncovalent interactions with DNA: an overview [J]. *Mutat Res*, 2007, 623: 3-13.
- [4] Martinez R, Chacon-Garcia L. The search of DNA-intercalators as antitumoral drugs: what it worked and what did not work [J]. *Curr Med Chem*, 2005, 12: 127-151.
- [5] Palchaudhuri R, Hergenrother PJ. DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2007, 18: 497-503.
- [6] Berova N, Nakanishi K, Woody RW. *Circular Dichroism: Principles and Applications* [M]. 2 ed. New York: Wiley-VCH, 2000: 703-718.
- [7] Bishop GR, Chaires JB. Characterization of DNA structures by circular dichroism [J]. *Curr Protoc Nucleic Acid Chem*, 2003, Chapter 7: Unit 7.11.
- [8] Ivanov VI, Minchenkova LE, Schyolkina AK, et al. Different conformations of double-stranded nucleic acid in solution as revealed by circular dichroism [J]. *Biopolymers*, 1973, 12: 89-110.
- [9] Chung SY, Holzwarth G. Circular dichroism of flow-oriented nucleic acids. II. Comparison between observed and calculated spectra [J]. *Biopolymers*, 1975, 14: 1531-1545.
- [10] Imahori K, Watanabe K. The circular dichroism of polynucleotides in relation to their conformations [J]. *J Polymer Sci Part C: Polymer Symposia*, 1970, 30: 633-656.
- [11] Gray DM, Ratliff RL. Circular dichroism spectra of poly[d(AC):d(GT)], poly[r(AC):r(GU)], and hybrids poly[d(AC):r(GU)] and poly[r(AC):d(GT)] in the presence of ethanol [J]. *Biopolymers*, 1975, 14: 487-498.
- [12] Negi S, Dhanasekaran M, Hirata T, et al. Biomolecular mirror-image recognition: reciprocal chiral-specific DNA binding of synthetic enantiomers of zinc finger domain from GAGA factor [J]. *Chirality*, 2006, 18: 254-258.
- [13] Gratzer WB, Hill LR, Owen RJ. Circular dichroism of DNA [J]. *Eur J Biochem*, 1970, 15: 209-214.
- [14] Moore DS, Wagner TE. Double-helical DNA and RNA circular dichroism. Calculations on base-sugar-phosphate helix interactions [J]. *Biopolymers*, 1974, 13: 977-986.
- [15] Chaires JB. Energetics of drug-DNA interactions [J]. *Biopolymers*, 1997, 44: 201-215.
- [16] Monnot M, Mauffret O, Simon V, et al. DNA-drug recognition and effects on topoisomerase II-mediated cytotoxicity. A three-mode binding model for ellipticine derivatives [J]. *J Biol Chem*, 1991, 266: 1820-1829.
- [17] Monnot M, Mauffret O, Lescot E, et al. Probing intercalation and conformational effects of the anticancer drug 2-methyl-9-hydroxyellipticinium acetate in DNA fragments with circular dichroism [J]. *Eur J Biochem*, 1992, 204: 1035-1039.
- [18] Willis B, Arya DP. Recognition of B-DNA by neomycin — Hoechst 33258 conjugates [J]. *Biochemistry*, 2006, 45: 10217-10232.
- [19] Fleury F, Sukhanova A, Ianoul A, et al. Molecular determinants of site-specific inhibition of human DNA topoisomerase I by fagaronine and ethoxidine. Relation to DNA binding [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275: 3501-3509.