

纺锤菌素与双链及三链核酸相互作用的电喷雾质谱研究

万翠红^{1,2}, 刘志强¹, 刘淑莹¹

(1. 中国科学院长春应用化学研究所, 长春质谱中心, 吉林 长春 130022;

2. 中国科学院研究生部, 北京 100049)

Studies on the Interaction of Netropsin with Duplex and Triplex DNA by ESI-MS

WAN Cui-hong^{1,2}, LIU Zhi-qiang¹, LIU Shu-ying¹

(1. Changchun Centre of Mass Spectrometry, Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, China; 2. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: The interaction of netropsin with duplex and triplex DNA, contain repeating sequence CTCT, CCTT and CTT, were studied by electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (ESI-FTICR-MS). The 1:1 specific complexes of netropsin and duplex DNA and netropsin and triplex DNA were observed. The result of comparison between complex peaks shows that netropsin is not destabilization the triplex, and has no remarkable structure selectivity. However it has distinct sequence selectivity, specifically binds to AT-rich DNA.

Key words: netropsin; triplex DNA; duplex DNA; electrospray ionization mass spectrometry; structure selectivity; sequence selectivity

中图分类号: O657.63

文献标识码: A

文章编号: 1004-2997 (2007) 增刊-48-02

纺锤菌素作为一种特异的小沟结合剂^[1], 虽然太毒不能用于临床, 但被广泛用于生物物理学研究, 以阐明小沟结合药物的特异性原理。关于它与双链核酸的相互作用研究已经很深入了, 但是它与三链核酸相互作用的研究还很有限。本研究利用电喷雾质谱研究纺锤菌素对双链和三链核酸的结构选择性, 以及其碱基序列选择性。

1 试验部分

1.1 主要仪器与材料

IonSpec HiRes FT-ICR MS: 美国 IonSpec 公司产品, 配备 7 Tesla 超导磁体和 Z-spray 电喷雾离子源。发卡型双链核酸 5'-GAGAGAGAGAGATTTTCTCTCTCTCTC-3' (CTCT); 5'-GAAGAAGAAGAAGATTTTCTTCTTCTTC-3'(CTT); 5'-AGGAAGGAAGGAAGTTTCTTCCTTCCTC-3'(CCTT), 以及与之相对应的单链 5'-CTCTCTCTCTCT-3'; 5'-CTTCTTCTTCTTCT-3'; 5'-TCCTTCCTTCCTTC-3'均购自 TaKaRa 公司; 纺锤菌素: 购自美国 sigma 公司; 醋酸氨: 购自美国 Fluka 公司; 甲醇 (色谱纯); Mili-Q 水。

1.2 样品制备

将 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 发卡型双链核酸溶液 (150 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸氨, pH 6.8) 在 90 $^{\circ}\text{C}$ 加热 10 min, 缓慢冷却到 4 $^{\circ}\text{C}$, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 制备成双链核酸储备液。将 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 发卡型双链核酸及其相对

应的单链核酸以摩尔比 1: 1 混合 (150 mmol·L⁻¹ 醋酸氨, pH 5.5), 在 90 °C 加热 10 min, 缓慢冷却到 4 °C, 置于 4 °C 过夜, 制备成三链核酸储备液。纺锤菌素用 Mili-Q 水溶解到 1 mmol·L⁻¹, 置于 4 °C 待用。

1.3 实验条件

样品进样前将纺锤菌素与核酸储备液 1: 1、2: 1 (摩尔比) 混合, 混合液用 $V(\text{甲醇}): V(\text{水})=80:20$, 稀释成 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 进样流速 3 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 。在负离子模式下进行数据采集, 样品锥电压为 -35 V, 喷雾电压 2 400 V, 源及探针温度分别为 80 和 100 °C, 采集质量范围 1 000~2 400。

2 结果与讨论

首先对退火后的核酸进行 ESI-FTICR-MS 分析, 三条双链核酸均观察到分别带 8 个、7 个和 6 个负电荷的离子峰。三条三链核酸则都能观察到带 9 个、8 个和 7 个负电荷的三链离子峰, 带 5 个负电荷的双链离子峰和带 3 个负电荷的单链离子峰。

当药物与核酸比为 1: 1 时, 纺锤菌素与双链核酸 CCTT 和 CTT 形成 1: 1 复合物, 没有观察到与双链核酸 CTCT 形成的复合物。增加药物的量到 2: 1 时, 纺锤菌素与 CCTT 和 CTT 形成 1: 1 复合物, 而且复合物峰强度增加, 并观察到纺锤菌素和 CTCT 形成峰强度很小 1: 1 复合物峰。从复合物峰的强度看来, 纺锤菌素倾向于与富含 AT 的双链核酸结合, 这与它作为经典小沟结合剂的特征一致。

药物与核酸比为 1: 1 时, 纺锤菌素与三链核酸 CTCT 和 CTT 没有形成复合物, 与三链核酸 CCTT 形成 1: 1 复合物。当增加药物的量到 2: 1 时, 仍然观察不到纺锤菌素与三链核酸 CTCT 的复合物, 但观察到它与三链核酸 CCTT 和 CTT 形成 1: 1 复合物。大部分研究表明, 纺锤菌素会破坏三链核酸的稳定性^[2-3], 并与三链核酸中的双链核酸相互作用, 也有文献表明^[4]纺锤菌素对平行三链核酸稳定性没有影响。在本研究试验条件下, 没有观察到纺锤菌素对三链核酸的去稳定性。

对比纺锤菌素与双链核酸复合物和它与三链核酸复合物的离子峰的强度, 没有发现明显的结构选择性。对比纺锤菌素与 CCTT、CTT 和 CTCT 复合物的离子峰强度, 结果表明, 纺锤菌素在与双链核酸和三链核酸作用时显示出相同的碱基序列选择性, 即特异性选择富含 AT 的核酸。

3 结论

通过电喷雾质谱研究不同碱基组成的双链和三链核酸与纺锤菌素的相互作用, 发现纺锤菌素能特异的与三链核酸和双链核酸形成非共价复合物, 且倾向于与富含 AT 的核酸形成 1: 1 复合物。

参考文献:

- [1] SRIRAM M, VAN DER MARELI G A, ROELEN HLPF, et al. The molecular origin of DNA-drug specificity in netropsin and distamycin[J]. *Biochemistry*, 1992, 31: 11 823-11 834.
- [2] DURAND M, THANH N T, MAURIZOT J C. Binding of netropsin to a DNA triple Helix[J]. *J Boil Chem*, 1992, 267: 4 394-4 399.
- [3] MARIAPPAN S V, CHENG X, VAN BREEMEN R B, et al. Analysis of GAA/TTC DNA triplexes using nuclear magnetic resonance and electrospray ionization mass spectrometry[J]. *Anal Biochem*, 2004, 334 (2): 216-226.
- [4] GONDEAU C, MAURIZOT J C, DURAND M. Circular dichroism and UV melting studies on formation of an intramolecular triplex containing parallel T*A:T and G*G:C triplets: netropsin complexation with triplex[J]. *Nucleic Acids Res*, 1998, 26: 4 996-5 003.