

G-四链体与配体相互作用的研究方法进展*

魏 强 屈 锋** 龚 芮

(北京理工大学生命学院, 北京 100081)

摘要 核酸的 G-四链体结构在原核生物和真核生物的基因组中广泛存在, 并参与基因复制和重组、端粒延伸、基因表达调控等多种重要的生物学过程. G-四链体与配体如 Telomestatin、TMPyP4、BRACO-19、RHPS4 等的相互作用研究有助于阐明其生物学功能. G-四链体与配体分子间的相互作用研究应用多种分析方法, 如硫酸二甲酯印迹、凝胶迁移、聚合酶终止实验等生物化学法, 而现代分析技术包含圆二色谱、荧光光谱、荧光共振能量转移、核磁共振、X-射线晶体衍射等光谱法, 以及表面等离子体共振、电喷雾质谱和毛细管电泳法等. 本文综述了可与 G-四链体结合的配体以及 G-四链体与配体相互作用的研究方法, 并对各种方法进行了比较.

关键词 G-四链体, 配体, 相互作用, 研究方法

学科分类号 O657, Q52

DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0061

四链螺旋结构的核酸称为 G-四链体(G-quadruplex), 与经典的 DNA 双螺旋结构明显不同. 4 个鸟嘌呤碱基通过 Hoogsteen 氢键配对形成正方形的 G 平面(G-tetrad), 适当体积的阳离子或配体可以促使多个 G 平面堆叠形成 G-四链体结构^[1]. 研究发现, G-四链体在生物体内普遍存在, 并参与基因复制与重组、端粒延伸、基因表达调控等多种生物学过程^[2], 它不仅与细胞衰老、凋亡、免疫系统功能等密切相关, 也参与肿瘤和基因疾病的发生^[3-4]. 已知一些配体(ligands), 如可与 G-四链体特异性识别并结合的 Telomestatin、TMPyP4、BRACO-19、RHPS4 等, 以 G-四链体为靶点, 通过稳定 G-四链体结构或促进 G-四链体的形成进而抑制癌细胞的增殖^[5-6]. 近年来, G-四链体与配体作用的研究也是肿瘤治疗和防治的热点研究之一.

G-四链体与配体的相互作用研究依赖于高分辨、高灵敏的技术和方法. 圆二色谱(CD)、荧光光谱(FS)、荧光共振能量转移(FRET)、核磁共振(NMR)、X-射线衍射(X-ray)、表面等离子体共振(SPR)、电喷雾质谱(ESI-MS)、毛细管电泳(CE)等是 G-四链体结构及与配体相互作用研究的主要方法. 本文综述了上述方法的具体应用, 并对各种方法进行了比较.

1 G-四链体研究的生物学意义

G-四链体结构最初都是在体外环境(*in vitro*)中发现的, 如端粒末端的 DNA 重复序列或其他富含 G 的寡核苷酸, 在一些含阳离子如 K^+ 、 Na^+ 、 NH_4^+ 的缓冲溶液中经过变性和退火的处理可自发形成 G-四链体结构^[7-8]. 随着 X-射线、核磁共振、分子荧光、全组基因分析等方法的应用, 进一步发现 G-四链体广泛存在于生物体内(*in vivo*)的 DNA 和 RNA 中^[2-3, 9-12]. 不仅是在染色体 DNA 末端的端粒区^[13-14], 在原癌基因的启动子区^[15-16], 信使 RNA 的 5'端非翻译区(5'-UTR)^[17]等都能够形成 G-四链体结构.

G-四链体结构在维护基因稳定、保持端粒长度、调控基因转录与翻译表达以及基因重组等生命过程中都具有很重要的作用^[18-22]. 例如真核生物体内的端粒酶能够延长因细胞分裂增殖而逐渐缩短的

* 国家自然科学基金(21175011, 21375008)和国家重点基础研究发展计划(973)(2012CB910603)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 010-68918015, 13910050425, E-mail: qufengqu@bit.edu.cn

收稿日期: 2015-03-20, 接受日期: 2015-06-03

端粒, 具有保持基因完整性的功能^[23-24]. 研究发现, 正常体细胞中端粒酶的活性受到严格的调控, 分化成熟后的体细胞其端粒酶活性逐渐消失, 细胞进而停止分裂, 但 85% 以上具有持续增殖能力的癌细胞依然具有端粒酶活性^[25-26]. 端粒区域 DNA 形成的 G- 四链体结构能够阻断端粒酶对端粒的延伸, 进而抑制癌细胞的持续增殖^[27-35], 因此 G- 四链体可作为癌症治疗的靶点. 研究还发现端粒区域 G- 四链体的形成与解开与细胞周期进程相对应^[29, 36], 这提示 G- 四链体参与基因复制的过程. 启动子区域的 G- 四链体结构能够调控基因的表达, Verma 等^[37]研究发现在人肿瘤细胞中加入一种能够稳定 G- 四链体结构的配体 TMPyP4, 超过 60% 的基因表达发生显著变化. 原癌基因 c-MYC 启动子区域的一段核酸酶超敏区控制着 c-MYC 基因 85%~90% 基因的转录. Grand 等^[38]研究发现, 该区域在体外环境下能够形成 G- 四链体结构, 使用碱基置换的方法破坏该区域 G- 四链体结构的形成能够上调 c-MYC 基因的表达, 而加入能够稳定 G- 四链体结构的配体分子则下调该基因的表达. RNA 区域形成的 G- 四链体结构调控基因的表达通常发生在翻译过程而不是在转录过程, 信使 RNA 5' 端非翻译区形成的 G- 四链体结构能够阻碍核糖体与 mRNA 的识别, 进而导致翻译过程停止, 造成基因表达下调^[17, 20, 38]. G- 四链体可能与人类的多种基因疾病有关, 如脆性 X 染色体综合征和沃纳综合征. 正常生物体内 G- 四链体结构的折叠和解开受到严格的调控, 一旦该调控机制被打破, 基因的稳定性和完整性将受到威胁, 甚至会导致细胞的凋亡^[4].

由此可见, 对 G- 四链体结构、生物学功能、调控机理等问题的基础研究非常有意义, 它不仅有助于进一步揭示基因代谢和疾病发生的机理, 也为多种基因疾病的治疗提供新线索和思路.

2 与 G-四链体作用的配体

肿瘤细胞端粒末端区域以及 c-myc、c-kit 等原癌基因启动区域可形成 G- 四链体结构^[15-16]. 一些能与 G- 四链体结合的配体, 可稳定 G- 四链体结构或促进 G- 四链体结构的形成, 进而抑制端粒酶的活性以及癌基因的表达. 因此 G- 四链体可作为肿瘤治疗的靶点.

G- 四链体具有特殊的拓扑学结构, 与其结合的配体通常具有平面 π 电子离域体系或带有

局部的正电荷, 这些配体分子主要有: 大环类 (macrocycles)、多聚芳香非环化合物 (polyaromatic Non-Cyclic systems) 和金属复合物配体 (metal complexes)^[39]等. 三类配体的结构如图 1. 大环类配体多为多聚芳香环化合物, 如卟啉 (porphyrines)^[40]、酞菁 (phthalocyanines)^[41]等的衍生物, 它们具有平面环合的 π 电子离域体系, 可以插入到相邻两个 G 平面进而稳定四链体结构. 卟啉衍生物 TMPyP4 是第一个报道的可稳定 G- 四链体的配体^[42]. 至今报道的最有效的端粒酶抑制剂则是从链霉菌 (*streptomyces anulatus*) 中提取出的天然代谢产物 Telomestatin. 它是一种多聚杂环化合物, 在无阳离子存在时, 也能稳定 G- 四链体结构, 其对分子内 G- 四链体结合的选择性较对双链 DNA 的识别高出 70 倍^[43-44].

多聚芳香非环化合物, 如吡啶 (acridines)、蒽醌 (anthraquinones)、二萘嵌苯 (perylene)、喹啉 (quinoline) 等衍生物与 G 平面有很强的 π - π 堆积作用. 由于吡啶、蒽醌衍生物也能插入双链 DNA 的碱基对间, 故对 G- 四链体的选择性较低. 但也有研究证实, 该类化合物的多取代衍生物也可以作为四链体的稳定剂以及端粒酶的抑制剂, 如三取代吡啶化合物 BRACO-19 可稳定四链体结构^[45], 且可抑制端粒酶活性并在人体移植瘤细胞中表现出抗癌活性^[46]. 该类配体中的二萘嵌苯衍生物通过 π - π 堆积作用以及与 DNA 沟 (groove) 间的静电作用稳定 G- 四链体结构. 研究发现喹啉衍生物 RHPS4 也是很强的端粒酶活性抑制剂, 长期暴露在低浓度的 RHPS4 下, 细胞会出现不可逆的生长停止和端粒损伤^[47-48]. 进一步研究发现, RHPS4 结合 G- 四链体可使端粒保护蛋白 POT1 脱离, 进而使端粒酶功能丧失, 而过表达 POT1 或 TRF2 则可减轻 RHPS4 诱导的端粒损伤^[32]. 除此, 有文献报道 RHPS4 还可降低脑瘤细胞的增生能力^[49]. Wu 等^[50]研究发现喹啉 (Quindoline) 衍生物能够与血管内皮生长因子启动子区域的富 G 序列作用, 并抑制血管内皮生长因子蛋白的转录和表达.

金属离子与带有离域 π 电子的平面型分子配体配位可形成金属复合物配体, 因金属离子的吸电子效应使 π 电子的离域范围扩大, 复合物配体与 G 平面的 π - π 作用增强, 故金属复合物配体表现出更强的 G- 四链体稳定作用^[51-54]. 金属-卟啉复合物 (metal-porphyrin complexes) 是研究报道的第一类 G- 四链体金属复合物配体, Dixon 等^[55]的研究表明

二价锰离子卟啉化合物对人端粒末端序列 5'-AG3TTAG3TTAG3TTAG3-3'形成的 G- 四链体具有很高的亲和性, 其与 G- 四链体结合的选择性

是与双链 DNA 结合的 1000 倍. 镍、铜、锌、铂、金、钨^[56-57]等金属离子也能形成此类复合物.

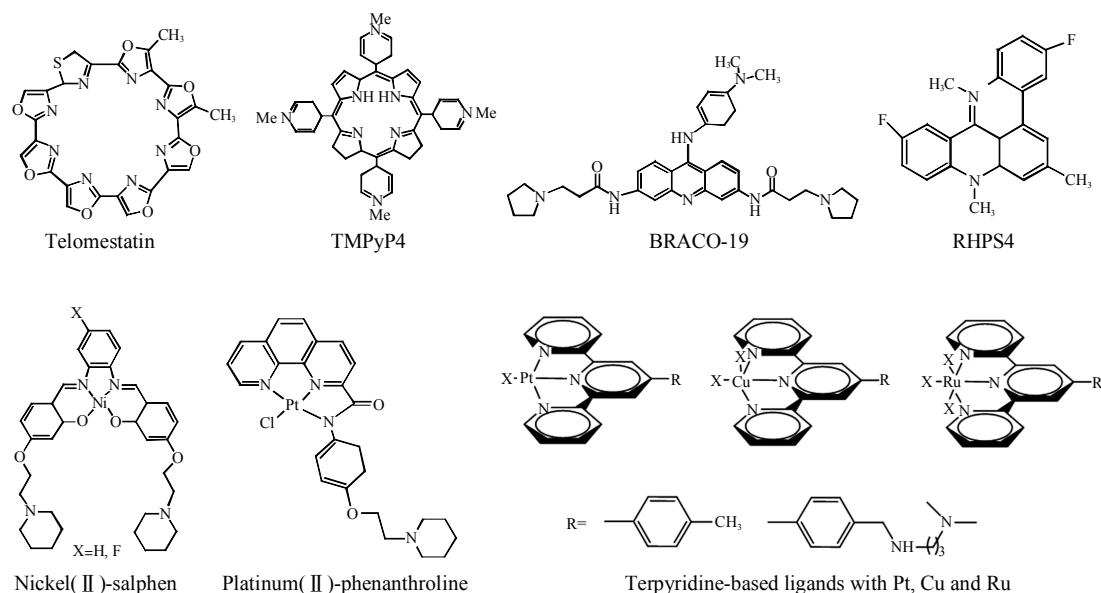


Fig. 1 Three kinds of ligands targeting G-quadruplex

图 1 G-四链体的三类配体

大环类 Telomestatin, TMPyP4; 多聚芳香非环合物 BRACO-19, RHPS4; 其他为金属复合物配体.

3 相互作用的研究方法

早期研究 G- 四链体与配体相互作用的方法主要是生物化学法, 如硫酸二甲酯印迹技术、凝胶迁移实验和 DNA 聚合酶终止实验等. 随着分析仪器的发展, 近年来, 用于 G- 四链体结构及其与配体相互作用研究的有各种光谱法, 如圆二色光谱、荧光光谱、荧光共振能量转移、核磁共振、X- 射线晶体衍射, 此外还有表面等离子体共振、电喷雾质谱和毛细管电泳等方法.

3.1 生物化学法 (biochemical methods)

硫酸二甲酯印迹(DMS footprinting)、凝胶迁移实验(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)和 DNA 聚合酶终止实验(DNA polymerase stop assay)等方法均可用于表征 G- 四链体结构的形成^[23, 58-59]. 硫酸二甲酯印迹技术通常与凝胶迁移实验联用. 将 5'端带有放射性标记的寡核苷酸片段经加热变性和冷却处理形成 G-四链体, 再使用 DMS 进行甲基化处理, 通过非变性 PAGE 分离 DMS 处理的核酸片段, 回收后用六氢吡啶切割处理; 再使用变性

PAGE 分离切割后的片段, 并进行放射自显影. 因六氢吡啶可对甲基化的鸟嘌呤进行特异性切割, 而参与 Hoogsteen 氢键配对的鸟嘌呤碱基则被保护不能被 DMS 甲基化, 故依据放射自显影结果可推断 G- 四链体形成的位置.

基于 DNA 聚合酶终止实验, 确定富含鸟嘌呤的核酸序列形成分子内的 G- 四链体的原理是: DNA 复制过程中, DNA 聚合酶首先识别模板链, 并从 5'→3'合成互补链, 但 DNA 聚合酶不能识别模板链中的 G- 四链体结构, 当 DNA 聚合酶沿着模板链向模板链的 5'端延伸的过程中遇到 G- 四链体结构时, 聚合酶与模板脱离, 互补链的合成过程就会停止^[60]. Han 等^[60]发现 2, 6- 二氨基蒽醌 (2, 6-diamidoanthraquinone, BSU-1051)能加速终止 Taq DNA 聚合酶催化的 DNA 合成. 他们设计的核酸模板序列中含有一段富 G 序列, 如果复制过程中富 G 序列形成了 G- 四链体结构, 则 DNA 聚合酶在该处位置终止合成, DNA 复制的体系中就可能包括引物、全长和半长三种产物. 依据放射性自显影的强度还可判断产物所占的比例. 研究结果还

表明, K^+ 存在时, BSU-1051 浓度升高, 半长产物的比例增加而全长产物的比例降低. 因此可以说 BSU-1051 能够稳定模板链上 $d(TTGGGG)_n$ 和 $d(TTAGGG)_n$ 序列形成的分子内 G-四链体结构, 由此促使聚合酶与模板脱离, 复制终止. Palumbo 等^[61]利用 DNA 聚合酶终止实验、圆二色光谱以及硫酸二甲酯印迹方法, 研究了人端粒(hTERT)核心启动子区域 9 条可能形成 G-四链体的序列, 研究表明, 端粒酶活性受到抑制的原因不仅是由于 G-四链体的配体能识别端粒区域的 G-四链体结构, 也包括配体对 hTERT 启动子区域 G-四链体的稳定作用.

3.2 光谱法 (spectroscopic methods)

3.2.1 圆二色谱法(CD)

具有光学活性的生色基团对平面圆偏振光中的左、右旋两种偏振光的吸收不相同, 造成偏振光矢量的振幅差, 使圆偏振光变成了椭圆偏振光, 表现出圆二色性. 圆二色谱是研究核酸结构多态性的重要方法, 其光谱图以两种偏振光的吸收差值为纵坐标, 波长为横坐标^[62]. G-四链体根据核酸链的极性(即核酸链 $5' \rightarrow 3'$ 极性), 可分为: 平行型、反平行型和混合型 G-四链体^[1]. 不同的 G-四链体结构具有不同的 CD 特征谱图, 平行型的 G-四链体在约 265 nm 有最大正吸收, 同时在约 240 nm 有最大负吸收; 反平行型 G-四链体在约 290 nm 有最大正吸收, 而在约 265 nm 有最大负吸收; 混合式的 G-四链体构型则包括了 290 nm 附近的正吸收以及特征的 265 nm 附近的肩峰^[63]. 平行型与反平行型 G-四链体 CD 谱的差异源于两种 G-四链体结构中鸟嘌呤残基堆积作用的不同^[64]. 如在 pH 7.4 的 100 mmol/L KCl 和 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液中, $d(TG_3TG_3TG_3TG_3T)$ 为平行型 G-四链体结构, 而 $d(TG_3T_4G_3T_4G_3T_4G_3T)$ 为反平行型 G-四链体^[65-66].

CD 还用于研究碱基序列、阳离子、化学修饰、配体结合等因素对四链体结构的影响. Paramasivan 等^[67]的研究表明, 在 100 mmol/L K^+ 溶液中, CD 能反映序列 $d(TAGGGUTAGGGT)$ 和序列 $d(TAGGGTTAGGGT)$ 二者间因单个碱基不同而引起的结构变化. Vorlickova 等^[68]发现人凝血酶核酸适配体 $5' \text{GGTTGGTGTGGTTGG} 3'$ (15-TBA) 形成的四链体结构在 K^+ 溶液中比 Na^+ 溶液中稳定. 通过实时滴定操作, CD 还可表征 G-四链体结构随溶液组分变化的改变, 如改变阳离子种类、浓度或加入有机溶剂等所引起的构型变化^[63]. CD 是研

究 G-四链体的常用方法, 其优势是直观、快速、对四链体序列长度不限.

3.2.2 荧光光谱 (FS)

核酸分子自身没有荧光, 通常用荧光分子取代核酸序列中某个位置的碱基而使其产生荧光. 常用的 2-氨基嘌呤(Ap)是腺嘌呤的结构类似物, 可取代核酸序列中的腺嘌呤并能与胸腺嘧啶配对, 是核酸研究中广泛使用的荧光分子^[69]. 此外, 一些自身具有强荧光的平面芳香化合物可插入 G-四链体的 G 平面间, 使 G-四链体结构产生荧光^[70], 据此可判断 G-四链体的结构. Nagesh 等^[71]用 Ap 取代 b1c-2 启动子区域 DNA 序列中的腺嘌呤或鸟嘌呤碱基研究了配体 TMPyP4 与 G-四链体的结合, 发现 TMPyP4 与 G-四链体采取弱结合方式. 此外, Owen 等^[72]用 Ap 取代 c-myc 启动子区域 Pu22 序列 $d(TGAGGGTGGGGAGGGTGGGGAA)$ 中的 A12, 通过加入 N-甲氧甲基-眉藻素 B (N-methoxymethyl-calothrixin B) 和眉藻素 A (calothrixin A) 后荧光光谱的变化, 首次获得眉藻素与 Pu22 序列形成的 G-四链体结构存在相互作用的证据. 两种眉藻素自身的紫外可见光吸收很弱且不具有荧光, Pu22 序列加入眉藻素后荧光光谱发生变化, 据此可推断两者发生相互作用. 竞争实验还发现眉藻素 A 与 Pu22 结合的解离常数在微摩尔级, 而 N-甲氧甲基-眉藻素 B 与 Pu22 的亲和力则低一个数量级. 此外, 利用荧光光谱还可求算 G-四链体与配体结合形成复合物的化学计量数以及平衡常数^[73-76].

3.2.3 荧光共振能量转移(FRET)

荧光共振能量转移技术(fluorescence resonance energy transfer, FRET)是另一种荧光检测方法. 当两个荧光分子足够靠近时, 一个荧光分子(供体, donor)吸收一定频率的光子后被激发到更高的电子能态, 在该电子回到基态前, 通过偶极子相互作用将能量向邻近的另一个荧光分子(受体, acceptor)转移, 进而使供体分子荧光强度降低, 而受体分子发射出强于自身的特征荧光^[77-78]. 受激发的荧光供体通过分子间相互作用将能量转移给受体, 其能量转移的效率与荧光供体与受体之间的距离成反比, 故 FRET 的强弱程度与供、受体分子的空间距离密切相关. 当二者空间距离为 7~10 nm 时, 供受体分子即可发生 FRET, 但随着二者间距增加, FRET 显著减弱. 利用 FRET 研究配体与 G-四链体的相互作用, 需在单链 DNA 序列的 $5'$ 和 $3'$ 端分别标记

荧光供体和荧光受体分子, 这样当单链 DNA 折叠形成 G- 四链体结构时, 两种荧光基团靠近则产生更强的荧光^[79-80]. Cian 等^[81]使用 FRET 检测了人端粒末端 G- 四链体结构与 neomycin-capped acridines 和 meridine 两种配体结合的稳定性和选择性. 配体对 G- 四链体的稳定效果与所使用的荧光标记分子、缓冲液类型有关, 也与计算溶解温度 T_m 的方法有关. 竞争实验显示 neomycin-capped acridines 对平行型和混合型 G- 四链体的选择性优于反平行型 G- 四链体. Gray 等^[82]利用 CD 和 FERT 揭示了 K^+ 诱导的人端粒末端序列的单分子 G- 四链体折叠与展开过程中的细节, 由单链折叠成四链体结构要经历三种过渡态. FRET 方法克服了分子吸收光谱法和 CD 的缺点, 如所需 DNA 和配体浓度较高, DNA 和配体的吸收区域发生重叠等, 但因不同实验室使用的荧光标记分子、缓冲液以及测定溶解温度 T_m 值的方法不同, FRET 方法增加了不同实验室的数据比对的困难.

常规的 FRET 使用荧光供体和受体进行标记, 检测的是荧光分子的平均响应. 而单分子 FRET (smFRET) 则可实时表征单分子内的折叠动力学, 直接分析单分子内形成的 G- 四链体结构的核酸序列^[83-85]. Jena 等^[86-87]利用 smFRET 研究了人端粒末端 DNA 序列形成的不同结构 G- 四链体的折叠动

力学以及配体稳定下 G- 四链体结构的动态转变. 两端分别用荧光供体 Tetramethylrhodamine (TMR) 和荧光受体青色素衍生物 (Cy5) 标记的人端粒末端 DNA 序列 d((GGGTTA)3GGG)(h-telo), 通过生物素 - 亲和素反应固定在石英表面, h-telo 序列折叠形成 G- 四链体的过程中, 两端的荧光供体和受体的空间位置相互靠近, 进而发射荧光 (图 2 b). 在 2 mmol/L K^+ 溶液中除部分未发生折叠的单链 (U) 外, h-telo 序列折叠形成两种类型的 G- 四链体结构 F1 和 F2, U、F1 和 F2 三者的 FRET 转移效率分别为 0.43、0.63 和 0.80. 在饱和的 100 mmol/L K^+ 溶液中 h-telo 序列仅折叠成 F2 结构, 使用不含 K^+ 的缓冲液冲洗 1 min 除去游离的 K^+ 后, h-telo 几乎全部转变为未折叠单链状态; 而在饱和的 1 μ mol/L 配体 macrocycle 1 (图 2a) 中孵育的 h-telo 序列仅折叠成 F1 结构, 使用不含 K^+ 的缓冲液冲洗, h-telo 序列在 4h 后依然稳定在折叠的 G- 四链体结构, 接着使用 100 mmol/L K^+ 溶液继续冲洗去除游离配体 macrocycle 1, h-telo 序列依然保持 F1 结构. 以上结果说明配体 macrocycle 1 稳定下的 G- 四链体结构与近似生理 K^+ 环境中的 G- 四链体结构不同, 且配体 macrocycle 1 较 K^+ 对 G- 四链体的稳定作用更强.

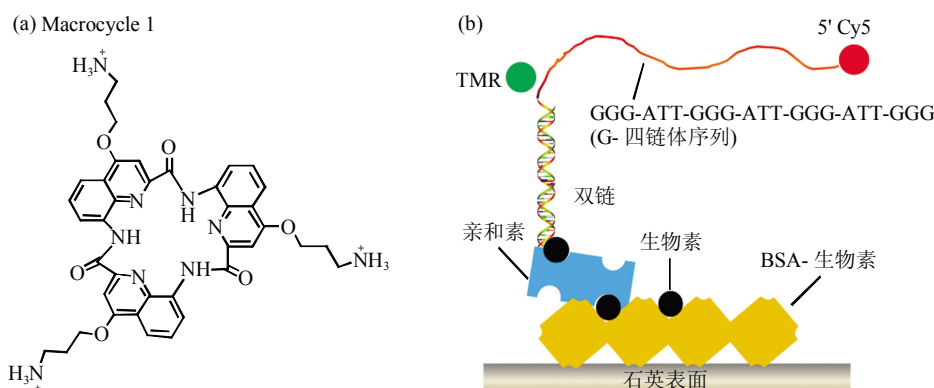


Fig. 2 Ligand structure and schematic diagram

图 2 配体结构与原理图

(a) 配体 Macrocycle 1. (b) 寡核苷酸片段 h-telo 与互补序列杂交, 并通过生物素 - 亲和素反应固定在牛血清白蛋白 - 生物素覆盖的石英表面, TMR (绿色)、Cy5 (红色) 分别是荧光供体和受体分子^[87].

3.2.4 核磁共振(NMR)

在 Watson-Crick 碱基配对中氨基质子的化学位移在 13~14, 而通过 Hoogsteen 氢键配对形成的 G 平面具有特征性亚氨质子, 其化学位移在 10.5~

12, 因此可利用核磁共振氢谱 1H -NMR 通过可交换质子的共振信号分析 G- 四链体结构^[88]. 1H -NMR 检测样品的最低浓度为 1~3 mmol/L, 且对样品纯度要求较高, 为了能够观察全部交换质子, 实验通

常在低温条件下进行. 二维 NOE 增强谱(nuclear overhauser enhancement spectroscopy, NOESY)可分辨的原子间距小于 $5\text{\AA}$, 是研究 G-四链体结构、折叠动力学、稳定性以及分子间相互作用的有效方法^[88-89]. 通过液态 NMR 研究 G-四链体的拓扑学问题时, 核酸序列在溶液中应处于动力学稳定结构, 如果多种混合结构同时存在, 则难以进行正确的结构分析^[90]. 早在 1993 年, Wang 等^[91]通过 ^1H -NMR、距离几何学以及分子动力学的研究发现, 22 碱基的核酸序列 $d(\text{AG}_3(\text{T}_2\text{AG}_3)_3)$ 在 Na^+ 溶液中优先形成带有两个侧向 loop 和一个对角 loop 的反平行型 G-四链体结构. 也有研究表明, 在 K^+ 溶液中, 与 $d(\text{AG}_3(\text{T}_2\text{AG}_3)_3)$ 类似的序列采取一种平行和反平行混合的结构, 而在分子拥挤的环境中平行结构优先^[92]. Kato 等^[93]使用 ^1H -NMR 研究了 $d(\text{T TAG}_n)$ 和 $d(\text{T TAG}_n\text{T})(n=3\sim 5)$ 随机序列, 揭示了 G-四链体二聚体的形成, 当序列末端添加一个 T 修饰则可以阻止二聚体的形成. 液体 NMR 也可用于研究 G-四链体与碱金属离子的结合及 G-四链体结构转变的动力学^[94]. Wong 等^[95]利用 ^{23}Na 、 ^{39}K 、 ^{87}Rb -NMR 直接检测出碱土金属离子在溶液状态下与 G-四链体结合, Ida 等^[96]利用 ^1H 、 ^{23}Na 和 ^{87}Rb -NMR 研究了碱金属与 $d(\text{TG}_4\text{T})$ 、 $d(\text{G}_4\text{T}_3\text{G}_4)$ 和 $d(\text{G}_4\text{T}_4\text{G}_4)$ 三种 DNA 低聚片段的相互作用, 发现在由两条 $d(\text{G}_4\text{T}_4\text{G}_4)$ 序列形成的双分子 G-四链体中, Na^+ 位于 G 平面与对角 T4 loop 之间, 同时与四个鸟嘌呤的 6 位 O 和对角 T4 loop 上一个胸腺嘧啶的 2 位 O. Riva 等^[97]利用 NMR 研究了 G-四链体-萘醌衍生物的复合物, 发现配体与四链体外部的 G 平面结合, 并不改变四链体的核心.

近年来发展的固态 NMR 方法尽管分辨率较液态 NMR 低, 但可用于不溶或者溶解后结构易变的样品^[98-99]. 利用固态 NMR, 如固态 ^{23}Na 、 ^{17}O -NMR 也可以直接检测 G-四链体结构中的碱土金属离子^[100-101]. Rovnyak 等^[102]利用固态 ^{23}Na -NMR 证实 $d(\text{TG}_4\text{T})_4$ 序列形成的 G-四链体内部有 3 个 Na^+ .

3.2.5 X-射线晶体衍射(X-ray)

G-四链体结构为靶标的配体和药物分子的研究需要了解四链体精确的拓扑学结构, 包括 loop 结构的信息^[90]. X-射线晶体衍射法可达原子级分辨率, 是 G-四链体研究的重要方法之一. X-ray 能提供 G-四链体精确的骨架结构和 loop 构象, 还能表征金属离子和小分子配体与 G-四链体的结合

位置以及与其沟槽的水合作用情况等^[103]. 但 X-ray 方法要求高纯度的 G-四链体结晶样品.

Kang 等^[104]在 1992 年获得尖毛虫(*Oxytricha*)端粒末端序列 $d(\text{G}_3\text{T}_4\text{G}_4)$ 分辨率达 $2.5\text{\AA}$ 的三维晶体结构, 发现两个 $d(\text{G}_4\text{T}_4\text{G}_4)$ 序列形成一个双分子的 G-四链体. Haider 等^[105]发现, 在 K^+ 溶液中序列 $d(\text{G}_4\text{T}_4\text{G}_4)$ 形成含有一个对角 loop 的反平行型双分子四链体结构, 该结果与 NMR 测定的结果相吻合. 随后 Haider 等^[106]又获得了 $d(\text{G}_4\text{T}_4\text{G}_4)$ G-四链体与取代吡啶所形成的复合物的三维结构, 分辨率达到 $1.75\text{\AA}$, 结果显示吡啶部分结合在 T4-loop 内和 G 平面之间. Parkinson 等^[107]的研究表明, 人端粒末端重复序列 $d(\text{TAG}_3\text{T}_2\text{A}_3\text{GT})$ 和 $d(\text{A}_3(\text{T}_2\text{A}_3)_3)$ 在近似体内环境的 K^+ 溶液中均形成分子内平行型的四链体晶体结构, 且所有的鸟嘌呤都采取反式的糖苷键构象. Doghaei 等^[108]则利用 X-ray 和分子动力学模拟研究了分子拥挤效应对 G-四链体构型和稳定性的影响, 发现在阳离子不存在的条件下, 乙醇可增强 G 平面内氢键的稳定性进而稳定 G-四链体的结构.

3.3 表面等离子体共振(SPR)

基于表面等离子体共振(SPR)设计的生物传感器可实时跟踪生物分子间的相互作用. 该方法不需对生物分子进行标记, 且无损伤. SPR 通过金属介质传感界面上的配体结合生物分子, 利用介质表面质量的增加所导致的折射率变化表征分子在传感界面的结合. 金属介质表面对光的折射率与结合分子的质量成正比^[109].

SPR 能用于表征 G-四链体与金属表面上的配体的相互作用, 并提供大量相互作用的信息, 如相互作用形成复合物的化学计量关系, 结合动力学及结合力强弱. Dash 等^[110-111]研究了 k-ras、c-myc、c-kit1、c-kit2 等原癌基因启动子区域能够形成 G-四链体结构的序列与配体 10(二乙炔基吡啶酰胺, diethynyl-pyridine amides)的结合. SPR 测量得到一系列配体与各启动子区域 G-四链体结合的平衡解离常数, 其中配体 10 与 c-myc G-四链体结合的平衡解离常数 $K_d=570\text{ nmol/L}$, 与之前报道的 G-四链体高亲和力配体 Se2SAP($K_d=620\text{ nmol/L}$)相近^[112], 配体 10 与 c-kit2 G-四链体以 1:1 的计量关系结合, 其 $K_d=690\text{ nmol/L}$. SPR 结果还发现, 衡量稳定性的 ΔT_m 与 K_d 之间无直接的关联. Murat 等^[113]利用 SPR 比较了分子间与分子内 G-四链体与 TMPyP4、MMQ1、偏端霉素 A、DODC 等配体结

合的亲合力, SPR 实验计算得出 TMPyP4 与分子间和分子内 G- 四链体的解离常数分别为 $9.4 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$ 和 $9.1 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$, 即分子间的 G- 四链体与 TMPyP4 结合的选择性高于分子内 G- 四链体 8 倍。但是分子内 G- 四链体结合的 TMPyP4 数量却比分子间 G- 四链体结合得要多, 衡量结合量的饱和参数 R_m 值两者分别为 115 和 80。经过 Scatchard 分析, 证明配体与分子间的 G- 四链体结合遵循 1:1 线性模型的化学计量比, 而与分子内 G- 四链体结合则表现出非线性行为, 这与平行 / 反平行型混合结构 G- 四链体的存在有关。Romera 等^[14]计算并比较了金属卟啉衍生物分别与序列 d(TTAGGGT)₄ 形成的分子间 G- 四链体、序列 d(GGG(TTAGGG)₃TT)形成的分子内 G- 四链体以及序列 d(CGCGCGCGT₄CGCGCGCG)形成的双链发卡结构相互作用的结合常数, 结果显示锰 - 卟啉衍生物配体 Mn-1 与分子间和分子内 G- 四链体的结合常数分别为 $1.7 \times 10^7 \text{ mol/L}$ 和 $1.8 \times 10^7 \text{ mol/L}$, 但与双链的结合力极弱以致 SPR 方法不能测定, 而配体 TMPyP4 与双链 DNA 的结合常数为 $2.9 \times 10^6 \text{ mol/L}$, 因此 Mn-1 对 G- 四链体的选择性更强。T- 抗原蛋白对病毒基因组复制以及宿主细胞周期循环起着重要的作用, 它可以扮演解旋酶的角色, 可解开多种类型的 DNA 结构。Brennan 等^[15]报道了 SV40 病毒编码的 T- 抗原蛋白对 G- 四链体结构的解旋酶活性。实时 SRP 证明, T- 抗原蛋白在 ATP 存在下, 可形成一个解旋酶亚基活性中心, 该活性中心与单链、双链以及 G- 四链体 DNA 结合并联合双链结合蛋白(SSB)即能够解开分子间的四链体结构。

3.4 电喷雾质谱法(ESI-MS)

质谱法是近年发展很快的结构鉴定方法, 也是研究核酸与配体相互作用的重要方法之一^[116-117]。电喷雾质谱采用软电离技术, 样品在电离过程中产生多电荷负离子, 且碎片离子少, 适合相对分子质量大的生物大分子。ESI-MS 可用来研究 G- 四链体结构形成、与配体非共价结合的化学计量关系、四链螺旋 DNA 与双链 DNA 之间、分子内与分子间的 G- 四链体之间结构相互转变的平衡关系等^[118-120]。Vairamani 等^[121]发现, 人凝血酶核酸适配体 15-TBA 在含 K^+ 的体系中, 高价态的 $(M+K)^6$ 和 $(M+K)^7$ 的离子丰度很高, 而对照序列 d(A₂T₂A₂TGTA₂T₂A₂)、d(AGT₂AGTGTAGT₂AG)、d(GAT₂AGTGTGAT₂AG)出现的高丰度离子却是低

价态离子 $(M+K)^3$ 和 $(M+K)^4$, 在 Na^+ 、 Sr^{2+} 、 Ca^{2+} 等体系中也出现类似结果。15-TBA 经 ESI 电离产生 $(M-nH)^n$ ($n=3 \sim 8$) 离子, 离子的电荷与电离过程中丢失的质子数目有关。G- 四链体结构中, 鸟嘌呤碱基上的氢与羰基氧配对, ESI 电离过程中质子丢失的概率小, 因此与不能形成四链体结构的对照序列相比, 15-TBA 产生的高价态负离子的相对丰度较高。以上研究说明, 15-TBA 与 K^+ 、 Na^+ 、 Sr^{2+} 、 Ca^{2+} 等离子的结合具有专一性, 在这几种离子体系中形成了 G- 四链体结构。Sravani 等^[122]研究了脱氧鸟苷在 5 种碱土金属离子存在下 G- 四链体结构的形成, 金属离子对四链体结构的稳定性顺序为: $Sr^{2+} > Ba^{2+} > Pb^{2+} > Ca^{2+} > Mg^{2+}$ 。Li 等^[123-124]先后研究了 Bcl-2 原癌基因和血管内皮生长因子基因(VEGF)启动子区域 G- 四链体结构的形成, 以及几种小分子与两个区域 G- 四链体结构识别的特异性。Bcl-2 原癌基因的 d(G₃CGCG₃AG₂A₂G₅CG₃) 序列(S1)在 10 mmol/L NH₄OAc 中 ESI-MS 谱图的基峰为 m/z 1472.8, 随着 NH₄OAc 浓度的增加, 基峰转变为 m/z 2111.8, 这说明 S1 序列形成了双分子的 G- 四链体结构, 结果与凝胶电泳和 CD 一致。ESI-MS 谱图显示 VEGF 启动子区域 d(G₄CG₃CCG₅CG₄) 序列(S)在甲醇 / 水溶液(25:75, v/v)中, 产生带有高电荷的去质子化单链离子; 而在 50 mmol/L 醋酸铵溶液中基峰则转变为 m/z 1278.1, 为带有 2 个 NH_4^+ 的离子 $(S+2NH_4^+-7H)^5$, 此时无规则卷曲的单链状态的离子相对丰度低于 8%, 这证实了序列 S 形成了含有 3 个 G 平面的 G- 四链体结构。Collie 等^[125]和 Smargiasso 等^[126]还揭示了 G- 四链体多聚体的存在, 证明形成高聚合度多聚物的趋势随着 loop 长度的减小而增加, 且短的 loop 主要倾向于形成二聚体和三聚体。

ESI-MS 还用于研究 G- 四链体的折叠动力学、稳定性以及与小分子的特异性结合等。Mazzitelli 等^[127]使用 ESI-MS 和分子动力学模拟的方法研究了气相状态下 7 种 G- 四链体结构的稳定性, Rosu 等^[128]研究了醋酸铵溶液中寡核苷酸序列 dTG5T 形成四分子的 G- 四链体结构的机制。国内 Zhou 等^[129]使用 ESI-MS 研究了 Tel01、ImImImβDp、PyPyPyγImImImβDp 3 种小分子(图 3)与序列 (AGGGTT)₄ G- 四链体结合的亲合力以及相互结合的化学计量关系, 其中二萘嵌苯衍生物 Tel01 倾向于以 G- 四链体: 配体摩尔比=1:2 的关系与四链

体结合, 结合亲和力的大小依次是: Tel01> ImImImβDp>>PyPyPyγImImImβDp. 除此, Zhou 等^[130-131]还利用 ESI-MS 研究了环聚酰胺与 c-myc 启

动子区域 G- 四链体及非平面环形分子小檗胺与 (GGA)₈ G- 四链体的结合.

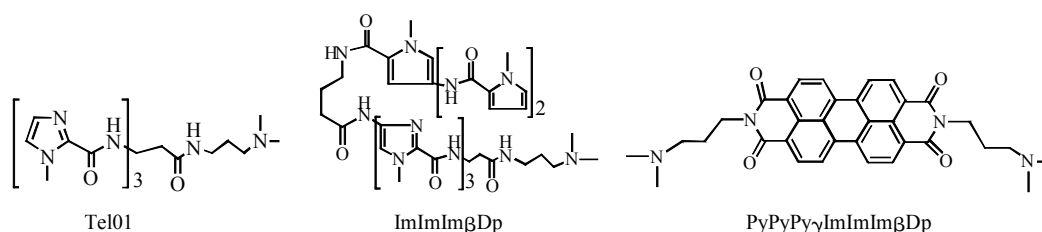


Fig. 3 Structures of three binding molecules, Tel01, ImImImβDp, PyPyPyγImImImβDp^[129]

图 3 Tel01、ImImImβDp、PyPyPyγImImImβDp 三种小分子的结构^[129]

ESI-MS 还可筛选对 G- 四链体结构具有高亲和性和专一性的天然小分子^[131-137], Cui 等^[138]使用 ESI-MS 研究了启动子区域致癌基因 c-myc 上的片段 d(GGAGGAGGAGGA)形成的 G- 四链体结构, 并发现从中药延胡索(corydalis yanhushuo)块茎中提取的小分子脱氢紫堇碱(dehydrocorydaline)对该四链体结构具有极强的亲和力, 其与 G- 四链体结合的选择性甚至强于 TMPyP4. 此外, Ferreira 等^[139]结合 ESI-MS 和离子迁移谱法研究了溶剂效应对端粒末端 d(TAG₃TTAG₃T)序列 G- 四链体形成和结构转变的影响. Mironov 等^[140]使用 ESI-MS 和动力学毛细管电泳研究了溶液中 DNA G- 四链体结构形成的构象动力学. Marchand 等^[141]发现三甲基胺醋酸盐(TMAA)缓冲液中, 在近似生理环境 K⁺ 浓度下的 G- 四链体结构有清晰的 ESI-MS 图谱, 很容易确定在 G- 四链体结构上特异性结合的 K⁺ 数目.

3.5 毛细管电泳法(CE)

毛细管电泳是高效、快速的微量分离分析技术, 具有分析模式多样、样品用量少、研究成本低等明显优势, 也是研究靶分子与配体相互作用的有效方法之一^[142-143]. 亲和毛细管电泳(ACE)中通过受体与配体发生亲和作用前后电泳图谱的明显变化, 可测定亲和常数, 获得结构变化等信息. Huang 等^[144]利用 ACE 研究 15-TBA 与蛋白质的相互作用, 证实适配体形成 G- 四链体结构才能与凝血酶结合形成复合物. 在 CE 方法中, G- 四链体与配体的相互作用在溶液相进行, G- 四链体、配体以及二者形成的复合物三者可完全分离, 并可在线定量检

测. Szilagyi 等^[145]利用毛细管凝胶电泳(CGE)研究了富 G 序列 G- 四链体结构的形成以及单价阳离子浓度对四链体结构的影响. 电泳图显示 15-TBA 的 5' GGTGGTGGTGGTGG 3' 序列在高浓度 K⁺ 体系中能够出现独立的 G- 四链体峰, 而随机序列 5' GGTGGTGGTGGTGGT 3' 则不能. Xu 等^[146]首次使用非平衡毛细管电泳(NECE)研究了 G- 四链体与双链 DNA 竞争的双平衡系统, 该方法在非平衡状态下能够有效地对人端粒末端 DNA 及互补序列的混合物进行分离. 如图 4, 由寡核苷酸序列 5' TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG 3'(ssDNAG)和 5' CCCTAACCCTAACCCTAACCCTAA 3'(ssDNAC)以摩尔浓度 1:1 的比例孵育形成的平衡混合物包含游离 ssDNAG、游离 ssDNAC、双链 DNA 和 G-quadruplex 四种组分, ssDNAG 的 5' 端标记荧光分子 6-Carboxyfluorescein (6-FAM), 但 ssDNAC 没有标记, 因此 ssDNAC 在荧光检测图中不出现, 而游离 ssDNAG、双链 DNA 和 G-quadruplex 三种成分均可在 NECE 电泳图中形成独立的峰. 从 NECE 电泳图获得的数据如迁移时间、峰面积等可计算出 G- 四链体折叠与展开的速率常数、双链 DNA 结合与解离的平衡常数. 五组实验测得的动力学常数的 RSD 小于 0.5%, 说明所用 NECE 方法的稳定性和重现性好. Mironov 等^[140]利用动力学毛细管电泳电喷雾质谱联用(KCE-MS)研究了溶液中 DNA G- 四链体的结构动力学, 并提出 CE 中峰的迁移和拓宽可用来确定 DNA- 金属亲和作用和 DNA 折叠的速率常数和平衡常数.

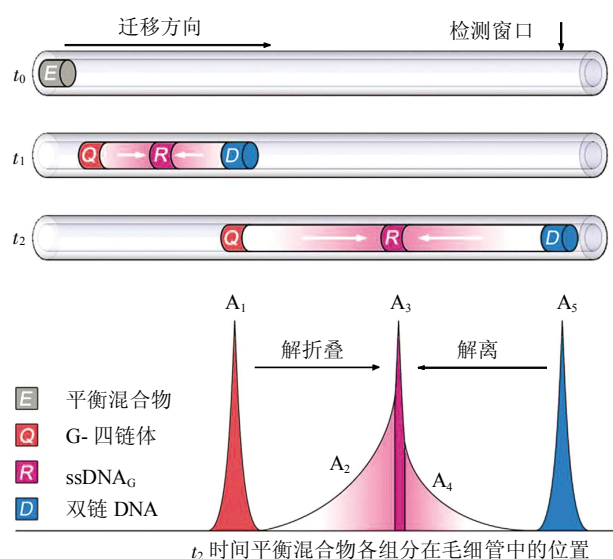


Fig. 4 Schematic illustration of NECE^[146]

图 4 NECE 分离平衡混合物的示意图^[146]

平衡混合体系包括游离 ssDNA_G、游离 ssDNA_C、双链 DNA 和 G-四链体等 4 种组分。

4 研究方法比较

生化法可从基因的任意起点研究 G-四链体结构,该方法接近生物体内的真实环境,有利于揭示 G-四链体在生物体内的作用机理。但操作过程复杂耗时、自动化程度低。圆二色谱法可实时检测,提供 G-四链体结构中四条核酸链相对极性的信息,进而判断 G-四链体的结构类型,但不能提供各原子的信息和精确的三维结构,也无法确定配体结合的模式。故 CD 常与 NMR 和 X-ray 结合应用。荧光光谱法灵敏度高、线性浓度范围广,该方法需要使用荧光配体或是具有荧光的碱基类似物,可用于表征 G-四链体结构的形成并求算 G-四链体与配体结合形成复合物的化学计量数以及平衡常数。荧光共振能量转移可用于研究配体与四链体结合的选择性和稳定性, FRET 方法克服了分子吸收光谱法和 CD 的缺点,如 DNA 和配体的吸收区域发生重叠等。但如果使用的荧光标记分子、缓冲液以及测定熔解温度 T_m 值的方法不同,会增加数据比对的困难。因整体反应的同步化存在困难,故 FRET 不能用于动力学的研究,但 smFRET 则可用于研究单个分子的折叠动力学,且稳定性更高。核磁共振与 X-射线衍射的分辨率高,都能够获得 G-四链

体和配体复合物中原子级别的精确结构信息。前者可用于研究 G-四链体折叠动力学以及其与配体结合的模式和化学计量关系。后者能提供 G-四链体精确的骨架结构和 loop 构象,但两种方法对样品的纯度要求很高。等离子表面共振需要对样品进行生物素标记,优势是能同时研究多个样品,提供 G-四链体与金属表面上的配体相互作用的定量信息,如化学计量关系、结合动力学和结合力强弱。电喷雾质谱法也可研究结构的稳定性并获得配体结合的化学计量关系,提高样品电离效果通常需采取高电压并加入有机溶剂或铵盐等,因此需要考虑其他因素对结构的影响。毛细管电泳是高效的微量电泳分析技术,样品用量极少,可用于研究 G-四链体的形成及与配体的相互作用,利用非平衡毛细管电泳可计算 G-四链体折叠与展开的速率常数。综上所述, G-四链体与配体相互作用的研究方法各具特点和优势。同时,各种方法也存在一定局限性。各种方法的比较见表 1。

5 总结与展望

G-四链体是非经典的核酸二级结构,其表现出广泛的多态性且在生物学过程中具有特定的功能。研究 G-四链体结构的多态性及其与各种配体的相互作用机制,是研究基因代谢和疾病治疗的基础。基于 G-四链体的组成和构象差异及其与配体作用后导致的分子结构与形态以及旋光性、质子化学位移、基团间距等性质变化,为 G-四链体结构多态性及与配体作用机制提供了大量信息。尽管上述多种方法均用于研究 G-四链体与配体相互作用,但这些方法都是局限于体外实验,目前直接用于体内研究的方法很少。最近, Biffi 等^[36, 147]和 Henderson 等^[148]利用能够高度专一识别 G-四链体的抗体先后对人类癌细胞中的 DNA G-四链体和 RNA G-四链体进行了可视化研究,获得了 G-四链体在人体细胞内存在的直接证据,也为体内 G-四链体的存在以及与配体作用的深入研究提供了新的思路和方法。相信分析技术的进步和研究方法的完善,将为以 G-四链体为靶点的新药设计和研发以及癌症等疾病的治疗提供重要的技术支持。近期,基于 G-四链体 DNA 与配体相互作用的传感器设计和无需标记的样品检测方法受到广泛关注,基于 G-四链体与配体相互作用的金属离子^[149-150]、PCR 扩增产物^[151]、血红蛋白^[152]、凝血酶^[153]、抗生素^[154]和转基因食品^[155]的检测方法以及逻辑门路设

Table 1 Comparison of methods for studying the interaction between G-quadruplex and its ligands

表 1 G-四链体与配体相互作用研究方法比较

方法	检测参数	用途	优势	局限
生物化学方法	迁移速率, 产物比率	定性 表征 G- 四链体的形成及生物学功能	重复性好, 与生理环境接近	操作相对复杂
CD	旋光度	定性 序列、离子、化学修饰、结合配体等对结构的影响	快速, 简单 样品用量少($\mu\text{mol/L}$) 对序列长度无要求	选择性低 很多配体不具有旋光性
FS	荧光强度	定性与定量 结合常数	高灵敏, 高选择性 线性浓度范围广	需要荧光配体或荧光碱基类似物
FRET	荧光强度	定性与定量 结合稳定性与选择性 单分子折叠动力学	可研究单分子	需要荧光标记的序列
NMR	质子化学位移, 峰面积	定量 复合物结构以及与配体结合的模式、位点及化学计量学	原子级别分辨率 可获得复合物结构和配体结合位点的信息	低灵敏度, 样品用量大
X-ray	峰值强度	定量 结合位点和复合物结构	原子级别分辨率 可获得复合物的精确结构	样品用量大, 纯度要求高
SPR	相对响应强度	定量 化学计量学、结合常数、结合模式	实时, 多种样品同时检测	寡核苷酸需要生物素标记 存在非特异性吸收
ESI-MS	离子相对丰度, 质荷比	定量, 折叠动力学 与配体结合的稳定性、化学计量学、结合常数	实现软电离, 多种序列可同时研究	需要考虑操作中高压、甲醇、铵盐等对结构的影响
CE	迁移时间, 峰面积	定性与定量 与配体作用平衡常数与速率常数	快速, 简单 样品用量少	选择性低, 重现性差

计^[156]相继出现, 此类检测方法检出限较低、灵敏度相对较高、线性浓度范围较广且很多检测装置便携、快速、易操作. 笔者认为这将成为分析化学和应用化学领域又一个研究热点.

参 考 文 献

- [1] Simonsson T. G-quadruplex DNA structures variations on a theme. *Biological Chemistry*, 2001, **382**(4): 621-628
- [2] Huppert J L, Balasubramanian S. Prevalence of quadruplexes in the human genome. *Nucleic Acids Res*, 2005, **33**(9): 2908-2916
- [3] Lipps H J, Rhodes D. G-quadruplex structures: *in vivo* evidence and function. *Trends in Cell Biology*, 2009, **19**(8): 414-422
- [4] Wu Y, Brosh R M, Jr. G-quadruplex nucleic acids and human disease. *The FEBS Journal*, 2010, **277**(17): 3470-3488
- [5] Bidzinska J, Cimino-Reale G, Zaffaroni N, *et al.* G-quadruplex structures in the human genome as novel therapeutic targets. *Molecules*, 2013, **18**(10): 12368-12395
- [6] Sun H, Xiang J, Shi Y, *et al.* A newly identified G-quadruplex as a potential target regulating Bcl-2 expression. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*, 2014, **1840**(10): 3052-3057
- [7] Sen D, Gilbert W. Formation of parallel four-stranded complexes by guanine-rich motifs in DNA and its implications for meiosis. *Nature*, 1988, **334**: 364-366
- [8] Williamson J R, Raghuraman M K, Cech T R. Monovalent cation-induced structure of telomeric DNA: the G-quartet model. *Cell*, 1989, **59**(5): 871-880
- [9] Todd A K, Johnston M, Neidle S. Highly prevalent putative quadruplex sequence motifs in human DNA. *Nucleic Acids Res*, 2005, **33**(9): 2901-2907
- [10] Rawal P, Kummarasetti V B, Ravindran J, *et al.* Genome-wide prediction of G4 DNA as regulatory motifs: role in *Escherichia coli* global regulation. *Genome Research*, 2006, **16**(5): 644-655
- [11] Huppert J L. Hunting G-quadruplexes. *Biochimie*, 2008, **90** (8): 1140-1148
- [12] Huppert J L. Structure, location and interactions of G-quadruplexes. *The FEBS Journal*, 2010, **277**(17): 3452-3458
- [13] Blackburn E H. Structure and function of telomeres. *Nature*, 1991, **350**(6319): 569-573

- [14] Neidle S, Parkinson G N. The structure of telomeric DNA. *Current Opinion in Structural Biology*, 2003, **13**(3): 275–283
- [15] Siddiqui-Jain A, Grand C L, Bearss D J, *et al.* Direct evidence for a G-quadruplex in a promoter region and its targeting with a small molecule to repress c-MYC transcription. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(18): 11593–11598
- [16] Yang D, Hurley L H. Structure of the biologically relevant G-quadruplex in the c-MYC promoter. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 2006, **25**(8): 951–968
- [17] Kumari S, Bugaut A, Huppert J L, *et al.* An RNA G-quadruplex in the 5' [prime] UTR of the NRAS proto-oncogene modulates translation. *Nat Chem Biol*, 2007, **3**(4): 218–221
- [18] Zhang C, Liu H H, Zheng K W, *et al.* DNA G-quadruplex formation in response to remote downstream transcription activity: long-range sensing and signal transducing in DNA double helix. *Nucleic Acids Res*, 2013, **41**(14): 7144–7152
- [19] Paeschke K, Capra J A, Zakian V A. DNA replication through G-quadruplex motifs is promoted by the *Saccharomyces cerevisiae* Pif1 DNA helicase. *Cell*, 2011, **145**(5): 678–691
- [20] Arora A, Dutkiewicz M, Scaria V, *et al.* Inhibition of translation in living eukaryotic cells by an RNA G-quadruplex motif. *RNA*, 2008, **14**(7): 1290–1296
- [21] Wang Q, Liu J Q, Chen Z, *et al.* G-quadruplex formation at the 3' end of telomere DNA inhibits its extension by telomerase, polymerase and unwinding by helicase. *Nucleic Acids Res*, 2011, **39**(14): 6229–6237
- [22] Maizels N. Dynamic roles for G4 DNA in the biology of eukaryotic cells. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2006, **13**(12): 1055–1059
- [23] Greider C W, Blackburn E H. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell*, 1985, **43**(2 Pt 1): 405–413
- [24] Blackburn E H, Greider C W, Henderson E, *et al.* Recognition and elongation of telomeres by telomerase. *Genome / National Research Council Canada = Genome / Conseil national de recherches Canada*, 1989, **31**(2): 553–560
- [25] Rhyu M S. Telomeres, telomerase, and immortality. *Journal of the National Cancer Institute*, 1995, **87**(12): 884–894
- [26] Mergny J L, Riou J F, Mailliet P, *et al.* Natural and pharmacological regulation of telomerase. *Nucleic Acids Res*, 2002, **30**(4): 839–865.
- [27] Patel D J, Phan A T, Kuryavyi V. Human telomere, oncogenic promoter and 5'-UTR G-quadruplexes: diverse higher order DNA and RNA targets for cancer therapeutics. *Nucleic Acids Res*, 2007, **35**(22): 7429–7455
- [28] Balasubramanian S, Neidle S. G-quadruplex nucleic acids as therapeutic targets. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2009, **13**(3): 345–353
- [29] Zhou W J, Deng R, Zhang X Y, *et al.* G-quadruplex ligand SYUIQ-5 induces autophagy by telomere damage and TRF2 delocalization in cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2009, **8**(12): 3203–3213
- [30] Jing N, Marchand C, Liu J, *et al.* Mechanism of inhibition of HIV-1 integrase by G-tetrad-forming oligonucleotides *in vitro*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, **275**(28): 21460–21467
- [31] Lavelle F, Riou J F, Laoui A, *et al.* Telomerase: a therapeutic target for the third millennium?. *Critical Reviews in Oncology Hematology*, 2000, **34**(2): 111–126
- [32] Salvati E, Leonetti C, Rizzo A, *et al.* Telomere damage induced by the G-quadruplex ligand RHPS4 has an antitumor effect. *Journal of Clinical Investigation*, 2007, **117**(11): 3236–3247
- [33] Burge S, Parkinson G N, Hazel P, *et al.* Quadruplex DNA: sequence, topology and structure. *Nucleic Acids Res*, 2006, **34**(19): 5402–5415.
- [34] Han H, Hurley L H. G-quadruplex DNA: a potential target for anti-cancer drug design. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2000, **21**(4): 136–142
- [35] Kerwin S M. G-Quadruplex DNA as a target for drug design. *Current Pharmaceutical Design*, 2000, **6**(4): 441–478
- [36] Biffi G, Tannahill D, McCafferty J, *et al.* Quantitative visualization of DNA G-quadruplex structures in human cells. *Nature Chemistry*, 2013, **5**(3): 182–186
- [37] Verma A, Yadav V K, Basundra R, *et al.* Evidence of genome-wide G4 DNA-mediated gene expression in human cancer cells. *Nucleic Acids Res*, 2009, **37**(13): 4194–4204
- [38] Bugaut A, Balasubramanian S. 5'-UTR RNA G-quadruplexes: translation regulation and targeting. *Nucleic Acids Res*, 2012, **40**(11): 4727–4741
- [39] Arola A, Vilar R. Stabilisation of G-quadruplex DNA by small molecules. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2008, **8**(15): 1405–1415
- [40] Chang C C, Kuo I C, Ling I F, *et al.* Detection of quadruplex DNA structures in human telomeres by a fluorescent carbazole derivative. *Analytical Chemistry*, 2004, **76**(15): 4490–4494
- [41] Gonçalves D P, Rodriguez R, Balasubramanian S, *et al.* Tetramethylpyridiniumporphyrazines—a new class of G-quadruplex inducing and stabilising ligands. *Chem Commun*, 2006, **45**: 4685–4687
- [42] Wheelhouse R T, Sun D, Han H, *et al.* Cationic porphyrins as telomerase inhibitors: the interaction of tetra-(N-methyl-4-pyridyl) porphine with quadruplex DNA. *J Am Chem Soc*, 1998, **120**(13): 3261–3262
- [43] De Cian A, Lacroix L, Douarre C, *et al.* Targeting telomeres and telomerase. *Biochimie*, 2008, **90**(1): 131–155
- [44] Yang D, Okamoto K. Structural insights into G-quadruplexes: towards new anticancer drugs. *Future Medicinal Chemistry*, 2010, **2**(4): 619–646
- [45] Read M, Harrison R J, Romagnoli B, *et al.* Structure-based design of selective and potent G quadruplex-mediated telomerase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**(9): 4844–4849
- [46] Burger A M, Dai F, Schultes C M, *et al.* The G-quadruplex-interactive molecule BRACO-19 inhibits tumor growth, consistent with telomere targeting and interference with telomerase function. *Cancer Research*, 2005, **65**(4): 1489–1496
- [47] Gowan S M, Heald R, Stevens M F, *et al.* Potent inhibition of telomerase by small-molecule pentacyclic acridines capable of interacting with G-quadruplexes. *Molecular Pharmacology*, 2001, **60**(5): 981–988
- [48] Cookson J C, Dai F, Smith V, *et al.* Pharmacodynamics of the G-quadruplex-stabilizing telomerase inhibitor 3, 11-difluoro-6, 8, 13-trimethyl-8H-quino [4, 3, 2-kl] acridinium methosulfate

- (RHPS4) *in vitro*: activity in human tumor cells correlates with telomere length and can be enhanced, or antagonized, with cytotoxic agents. *Molecular Pharmacology*, 2005, **68** (6): 1551–1558
- [49] Lagah S, Tan I L, Radhakrishnan P, *et al.* RHPS4 G-quadruplex ligand induces anti-proliferative effects in brain tumor cells. *PloS One*, 2014, **9**(1): e86187
- [50] Wu Y, Zan L-P, Wang X-D, *et al.* Stabilization of VEGF G-quadruplex and inhibition of angiogenesis by quindoline derivatives. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*, 2014, **1840**(9): 2970–2977
- [51] Sun D, Liu Y, Liu D, *et al.* Stabilization of G-quadruplex DNA, inhibition of telomerase activity and live cell imaging studies of chiral ruthenium (II) complexes. *Chemistry-a European Journal*, 2012, **18**(14): 4285–4295
- [52] Musetti C, Krapcho A P, Palumbo M, *et al.* Effect of G-quadruplex polymorphism on the recognition of telomeric DNA by a metal complex. *PloS one*, 2013, **8**(3): e58529
- [53] Bertrand H, Monchaud D, De Cian A, *et al.* The importance of metal geometry in the recognition of G-quadruplex-DNA by metal-terpyridine complexes. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2007, **5**(16): 2555–2559
- [54] Reed J E, Arnal A A, Neidle S, *et al.* Stabilization of G-quadruplex DNA and inhibition of telomerase activity by square-planar nickel (II) complexes. *J Am Chem Soc*, 2006, **128**(18): 5992–5993
- [55] Dixon I M, Lopez F, Tejera A M, *et al.* A G-quadruplex ligand with 10000-fold selectivity over duplex DNA. *J Am Chem Soc*, 2007, **129**(6): 1502–1503
- [56] Yu H J, Yu L, Hao Z F, *et al.* Interactions of ruthenium complexes containing indoloquinoline moiety with human telomeric G-quadruplex DNA. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2014, **124**: 187–193
- [57] Zhang Z, Wu Q, Wu X H, *et al.* Ruthenium (II) complexes as apoptosis inducers by stabilizing c-myc G-quadruplex DNA. *Eur J Med Chem*, 2014, **80**: 316–324
- [58] Sun D, Hurley L H. Biochemical techniques for the characterization of G-quadruplex structures: EMSA, DMS footprinting, and DNA polymerase stop assay. *Methods in Molecular Biology*, 2010, **608**: 65–79
- [59] Eddy S, Ketkar A, Zafar M K, *et al.* Human Rev1 polymerase disrupts G-quadruplex DNA. *Nucleic Acids Res*, 2014, **42** (5): 3272–3285
- [60] Han H, Hurley L H, Salazar M. A DNA polymerase stop assay for G-quadruplex-interactive compounds. *Nucleic Acids Res*, 1999, **27**(2): 537–542
- [61] Palumbo S L, Ebbinghaus S W, Hurley L H. Formation of a unique end-to-end stacked pair of G-quadruplexes in the hTERT core promoter with implications for inhibition of telomerase by G-quadruplex-interactive ligands. *J Am Chem Soc*, 2009, **131**(31): 10878–10891
- [62] Greenfield N J. Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data. *Anal Biochem*, 1996, **235**(1): 1–10
- [63] Kypr J, Kejnovska I, Renciuik D, *et al.* Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA. *Nucleic Acids Res*, 2009, **37**(6): 1713–1725
- [64] Gray D M, Wen J D, Gray C W, *et al.* Measured and calculated CD spectra of G-quartets stacked with the same or opposite polarities. *Chirality*, 2008, **20**(3–4): 431–440
- [65] Hazel P, Huppert J, Balasubramanian S, *et al.* Loop-length-dependent folding of G-quadruplexes. *J Am Chem Soc*, 2004, **126**(50): 16405–16415
- [66] Huppert J L. Four-stranded nucleic acids: structure, function and targeting of G-quadruplexes. *Chemical Society Reviews*, 2008, **37**(7): 1375–1384
- [67] Paramasivan S, Rujan I, Bolton P H. Circular dichroism of quadruplex DNAs: applications to structure, cation effects and ligand binding. *Methods*, 2007, **43**(4): 324–331
- [68] Vorlickova M, Kejnovska I, Sagi J, *et al.* Circular dichroism and guanine quadruplexes. *Methods*, 2012, **57**(1): 64–75
- [69] Kimura T, Kawai K, Fujitsuka M, *et al.* Fluorescence properties of 2-aminopurine in human telomeric DNA. *Chemical Communications*, 2004, **12**: 1438–1439
- [70] White E W, Tanious F, Ismail M A, *et al.* Structure-specific recognition of quadruplex DNA by organic cations: Influence of shape, substituents and charge. *Biophys Chem*, 2007, **126**(1–3): 140–153
- [71] Nagesh N, Buscaglia R, Dettler J M, *et al.* Studies on the site and mode of TMPyP4 interactions with Bel-2 promoter sequence G-Quadruplexes. *Biophysical Journal*, 2010, **98**(11): 2628–2633
- [72] Owen E A, Keniry M A. Exploring the binding of calothrixin A to the G-quadruplex from the c-myc oncogene promoter. *Australian Journal of Chemistry*, 2009, **62**(11): 1544–1549
- [73] Wang P, Leung C H, Ma D L, *et al.* Structure-based design of platinum (II) complexes as c-myc oncogene down-regulators and luminescent probes for G-quadruplex DNA. *Chemistry-a European Journal*, 2010, **16**(23): 6900–6911
- [74] Sun J, An Y, Zhang L, *et al.* Studies on synthesis, characterization, and G-quadruplex binding of Ru (II) complexes containing two dpz ligands. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2011, **105** (2): 149–154
- [75] Bhadra K, Kumar G S. Interaction of berberine, palmatine, coralyne, and sanguinarine to quadruplex DNA: A comparative spectroscopic and calorimetric study. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*, 2011, **1810**(4): 485–496
- [76] Xue L, Ranjan N, Arya D P. Synthesis and spectroscopic studies of the aminoglycoside (neomycin)-perylene conjugate binding to human telomeric DNA. *Biochemistry*, 2011, **50**(14): 2838–2849
- [77] Clapp A R, Medintz I L, Mauro J M, *et al.* Fluorescence resonance energy transfer between quantum dot donors and dye-labeled protein acceptors. *J Am Chem Soc*, 2004, **126**(1): 301–310
- [78] Selvin P R. The renaissance of fluorescence resonance energy transfer. *Nature Structural Biology*, 2000, **7**(9): 730–734
- [79] Juskowiak B, Takenaka S. Fluorescence resonance energy transfer in the studies of guanine quadruplexes. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, NJ), 2006, **335**: 311–341
- [80] Mergny J L, Maurizot J C. Fluorescence resonance energy transfer as a probe for G-quartet formation by a telomeric repeat. *Chembiochem*, 2001, **2**(2): 124–132
- [81] De Cian A, Guittat L, Kaiser M, *et al.* Fluorescence-based melting

- assays for studying quadruplex ligands. *Methods*, 2007, **42** (2): 183–195
- [82] Gray R D, Trent J O, Chaires J B. Folding and unfolding pathways of the human telomeric G-Quadruplex. *Journal of Molecular Biology*, 2014, **426**(8): 1629–1650
- [83] Schuler B, Eaton W A. Protein folding studied by single-molecule FRET. *Current Opinion in Structural Biology*, 2008, **18**(1): 16–26
- [84] Roy R, Hohng S, Ha T. A practical guide to single-molecule FRET. *Nature Methods*, 2008, **5**(6): 507–516
- [85] Shirude P S, Balasubramanian S. Single molecule conformational analysis of DNA G-quadruplexes. *Biochimie*, 2008, **90**(8): 1197–1206
- [86] Lee J Y, Okumus B, Kim D S, *et al.* Extreme conformational diversity in human telomeric DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(52): 18938–18943
- [87] Jena P V, Shirude P S, Okumus B, *et al.* G-Quadruplex DNA bound by a synthetic ligand is highly dynamic. *J Am Chem Soc*, 2009, **131**(35): 12522–12523
- [88] Webba Da Silva M. NMR methods for studying quadruplex nucleic acids. *Methods*, 2007, **43**(4): 264–277
- [89] Adrian M, Heddi B, Phan A T. NMR spectroscopy of G-quadruplexes. *Methods*, 2012, **57**(1): 11–24
- [90] Neidle S, Parkinson G N. Quadruplex DNA crystal structures and drug design. *Biochimie*, 2008, **90**(8): 1184–1196
- [91] Wang Y, Patel D J. Solution structure of the human telomeric repeat d[AG3(T2AG3)3] G-tetraplex. *Structure*, 1993, **1**(4): 263–282
- [92] Xue Y, Kan Z Y, Wang Q, *et al.* Human telomeric DNA forms parallel-stranded intramolecular G-quadruplex in K⁺ solution under molecular crowding condition. *Journal of the American Chemical Society*, 2007, **129**(36): 11185–11191
- [93] Kato Y, Ohyama T, Mita H, *et al.* Dynamics and thermodynamics of dimerization of parallel G-quadruplexed DNA formed from d(TTAG(n)) (n=3–5). *J Am Chem Soc*, 2005, **127**(28): 9980–9981
- [94] Li M H, Wang Z F, Kuo M H J, *et al.* Unfolding kinetics of human telomeric G-quadruplexes studied by NMR spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry B*, 2014, **118**(4): 931–936
- [95] Wong A, Ida R, Wu G. Direct NMR detection of the "invisible" alkali metal cations tightly bound to G-quadruplex structures. *Biochem Biophys Research Commun*, 2005, **337**(1): 363–366
- [96] Ida R, Wu G. Direct NMR detection of alkali metal ions bound to G-quadruplex DNA. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, **130**(11): 3590–3602
- [97] Riva B, Ferreira R, Musso L, *et al.* Molecular recognition in naphthoquinone derivatives - G-quadruplex complexes by NMR. *Biochim Biophys Acta*, 2015, **1850**(4): 673–680
- [98] Dybowski C, Bai S. Solid-state NMR spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 2008, **80**(12): 4295–4300
- [99] Duer M J. Solid state NMR spectroscopy: principles and applications [M]. John Wiley & Sons, 2008
- [100] Wu G, Wong A, Gan Z H, *et al.* Direct detection of potassium cations bound to G-quadruplex structures by solid-state K-39 NMR at 19.6 T. *J Am Chem Soc*, 2003, **125**(24): 7182–7183
- [101] Kwan I C M, Mo X, Wu G. Probing hydrogen bonding and ion-carbonyl interactions by solid-state O-17 NMR spectroscopy: G-ribbon and G-quartet. *J Am Chem Soc*, 2007, **129**(8): 2398–2407
- [102] Rovnyak D, Baldus M, Wu G, *et al.* Localization of ²³Na⁺ in a DNA quadruplex by high-field solid-state NMR. *J Am Chem Soc*, 2000, **122**(46): 11423–11429
- [103] Campbell N H, Parkinson G N. Crystallographic studies of quadruplex nucleic acids. *Methods*, 2007, **43**(4): 252–263
- [104] Kang C, Zhang X, Ratliff R, *et al.* Crystal structure of four-stranded Oxytricha telomeric DNA. *Nature*, 1992, **356**(6365): 126–131
- [105] Haider S, Parkinson G N, Neidle S. Crystal structure of the potassium form of an Oxytricha nova G-quadruplex. *Journal of Molecular Biology*, 2002, **320**(2): 189–200
- [106] Haider S M, Parkinson G N, Neidle S. Structure of a G-quadruplex-ligand complex. *Journal of Molecular Biology*, 2003, **326** (1): 117–125
- [107] Parkinson G N, Lee M P H, Neidle S. Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA. *Nature*, 2002, **417**(6891): 876–880
- [108] Verdian Doghaei A, Housaindokht M R, Bozorgmehr M R. Molecular crowding effects on conformation and stability of G-quadruplex DNA structure: insights from molecular dynamics simulation. *J Theor Biol*, 2015, **364**: 103–112
- [109] Pattnaik P. Surface plasmon resonance. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2005, **126**(2): 79–92
- [110] Dash J, Shirude P S, Hsu S-T D, *et al.* Diarylethynyl amides that recognize the parallel conformation of genomic promoter DNA G-quadruplexes. *J Am Chem Soc*, 2008, **130**(47): 15950–15956
- [111] Dash J, Waller Z A, Pantos G D, *et al.* Synthesis and binding studies of novel diethynyl-pyridine amides with genomic promoter DNA G-quadruplexes. *Chemistry*, 2011, **17**(16): 4571–4581
- [112] Seenisamy J, Bashyam S, Gokhale V, *et al.* Design and synthesis of an expanded porphyrin that has selectivity for the c-MYC G-quadruplex structure. *J Am Chem Soc*, 2005, **127**(9): 2944–2959
- [113] Murat P, Bonnet R, Van Der Heyden A, *et al.* Template-assembled synthetic G-quadruplex (TASQ): a useful system for investigating the interactions of ligands with constrained quadruplex topologies. *Chemistry*, 2010, **16**(20): 6106–6114
- [114] Romera C, Bombarde O, Bonnet R, *et al.* Improvement of porphyrins for G-quadruplex DNA targeting. *Biochimie*, 2011, **93**(8): 1310–1317
- [115] Brennan J, Karr J R, Jasheway K, *et al.* Characterization of SV40 T-antigen G-quadruplex helicase activity using SPR. *Faseb Journal*, 2008, **22**: 608–609
- [116] Fabris D. A Role for the MS analysis of nucleic acids in the post-genomics age. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2010, **21**(1): 1–13
- [117] Brodbelt J S. Evaluation of DNA/ligand interactions by electrospray ionization mass spectrometry [M]//YEUNG E S, ZARE R N. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 2010, **3**: 67–87
- [118] Yuan G, Zhang Q, Zhou J, *et al.* Mass spectrometry of G-quadruplex DNA: formation, recognition, property, conversion, and conformation. *Mass Spectrometry Reviews*, 2011, **30** (6): 1121–1142
- [119] Goodlett D R, Camp D G, 2nd, Hardin C C, *et al.* Direct observation of a DNA quadruplex by electrospray ionization mass spectrometry. *Biological Mass Spectrometry*, 1993, **22**(3): 181–183

- [120]Rosu F, Gabelica V, Houssier C, *et al.* Triplex and quadruplex DNA structures studied by electrospray mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2002, **16**(18): 1729–1736
- [121]Vairamani M, Gross M L. G-quadruplex formation of thrombin-binding aptamer detected by electrospray ionization mass spectrometry. *J Am Chem Soc*, 2003, **125**(1): 42–43
- [122]Sravani M, Nagaveni V, Prabhakar S, *et al.* G-Quadruplex formation of deoxyguanosine in the presence of alkaline earth metal ions studied by electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2011, **25**(14): 2095–2098
- [123]Li H, Zhang Q, Yuan G. Investigation of the formation and recognition of a dimeric G-quadruplex in the promoter of Bcl-2 proto-oncogene by electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2010, **24**(3): 393–395
- [124]Li H, Yuan G. Electrospray ionization mass spectrometry probing of formation and recognition of the G-quadruplex in the proximal promoter of the human vascular endothelial growth factor gene. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2010, **24**(14): 2030–2034
- [125]Collie G W, Parkinson G N, Neidle S, *et al.* Electrospray mass spectrometry of telomeric RNA (TERRA) reveals the formation of stable multimeric G-quadruplex structures. *J Am Chem Soc*, 2010, **132**(27): 9328–9334
- [126]Smargiasso N, Rosu F, Hsia W, *et al.* G-quadruplex DNA assemblies: Loop length, cation identity, and multimer formation. *J Am Chem Soc*, 2008, **130**(31): 10208–10216
- [127]Mazzitelli C L, Wang J, Smith S I, *et al.* Gas-phase stability of G-quadruplex DNA determined by electrospray ionization tandem mass spectrometry and molecular dynamics Simulations. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2007, **18**(10): 1760–1773
- [128]Rosu F, Gabelica V, Poncelet H, *et al.* Tetramolecular G-quadruplex formation pathways studied by electrospray mass spectrometry. *Nucleic Acids Res*, 2010, **38**(15): 5217–5225
- [129]Zhou J, Yuan G. Specific recognition of human telomeric G-quadruplex DNA with small molecules and the conformational analysis by ESI mass spectrometry and circular dichroism spectropolarimetry. *Chemistry-a European Journal*, 2007, **13**(17): 5018–5023
- [130]Cui X, Zhang Q, Chen H, *et al.* ESI mass spectrometric exploration of selective recognition of G-quadruplex in c-myc oncogene promoter using a novel flexible cyclic polyamide. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2014, **25**(4): 684–691
- [131]Tan W, Zhou J, Yuan G. Electrospray ionization mass spectrometry probing of binding affinity of berbamine, a flexible cyclic alkaloid from traditional Chinese medicine, with G-quadruplex DNA. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2014, **28**(1): 143–147
- [132]Nagesh N, Krishnaiah A, Dhople V M, *et al.* Noncovalent interaction of G-quadruplex DNA with acridine at low concentration monitored by MALDI-TOF mass spectrometry. *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids*, 2007, **26**(3): 303–315
- [133]Amato J, Viero G, De Pauw E, *et al.* Hybridization of short complementary PNAs to G-quadruplex forming oligonucleotides: an electrospray mass spectrometry study. *Biopolymers*, 2009, **91**(4): 244–255
- [134]He X W, Long H T, Yuan G, *et al.* Investigation of interaction of small natural product molecules and human telomeric G-quadruplex and thermal stabilities of the complexes by electrospray ionization mass spectrometry. *Acta Physico-Chimica Sinica*, 2010, **26**(4): 1082–1086
- [135]He X, Zhang Z, Zhang Q, *et al.* Selective recognition of G-quadruplex in the vascular endothelial growth factor gene with small-molecule natural products by electrospray ionization (ESI) mass spectrometry and circular dichroism (CD) spectrometry. *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie*, 2012, **90**(1): 55–59
- [136]Xu N S, Yang H M, Cui M, *et al.* Investigation of interaction of fangchinoline with G-quadruplex DNA by electrospray ionization mass spectrometry. *Chemical Journal of Chinese Universities-Chinese*, 2012, **33**(11): 2430–2434
- [137]Ma L, Liu S, Song F, *et al.* Investigation of noncovalent interactions of aconitine with duplex, triplex and G-quadruplex DNA by electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2014, **28**(7): 839–842
- [138]Cui X, Yuan G. Formation and recognition of G-quadruplex in promoter of c-myc oncogene by electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 2011, **46**(9): 849–855
- [139]Ferreira R, Marchand A, Gabelica V. Mass spectrometry and ion mobility spectrometry of G-quadruplexes. A study of solvent effects on dimer formation and structural transitions in the telomeric DNA sequence d(TAGGGTTAGGGT). *Methods*, 2012, **57**(1): 56–63
- [140]Mironov G G, Okhonin V, Khan N, *et al.* Conformational dynamics of DNA G-quadruplex in solution studied by kinetic capillary electrophoresis coupled on-line with mass spectrometry. *Chemistry Open*, 2014, **3**(2): 58–64
- [141]Marchand A, Gabelica V. Native electrospray mass spectrometry of DNA G-quadruplexes in potassium solution. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2014, **25**(7): 1146–1154
- [142]Araya F, Huchet G, McGroarty I, *et al.* Capillary electrophoresis for studying drug-DNA interactions. *Methods*, 2007, **42**(2): 141–149
- [143]Araya F, Skellern G G, Waigh R D. Quantification of binding data using capillary electrophoresis [M]. *Drug-DNA Interaction Protocols*. Springer, 2010: 71–88
- [144]Huang C C, Cao Z H, Chang H T, *et al.* Protein-protein interaction studies based on molecular aptamers by affinity capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 2004, **76**(23): 6973–6981
- [145]Szilagyi A, Bonn G K, Guttman A. Capillary gel electrophoresis analysis of G-quartet forming oligonucleotides used in DNA-protein interaction studies. *Journal of Chromatography A*, 2007, **1161**(1–2): 15–21
- [146]Xu Y, Feng X, Du W, *et al.* Kinetic and thermodynamic characterization of telomeric G-quadruplex by nonequilibrium capillary electrophoresis: Application to G-quadruplex/duplex competition. *Analytical Chemistry*, 2008, **80**(18): 6935–6941
- [147]Biffi G, Di Antonio M, Tannahill D, *et al.* Visualization and selective chemical targeting of RNA G-quadruplex structures in the cytoplasm of human cells. *Nature Chemistry*, 2014, **6**(1): 75–80
- [148]Henderson A, Wu Y, Huang Y C, *et al.* Detection of G-quadruplex DNA in mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, 2014, **42**(2): 860–

- 869
- [149]Hao Y, Guo Q, Wu H, *et al.* Amplified colorimetric detection of mercuric ions through autonomous assembly of G-quadruplex DNAzyme nanowires. *Biosensors & Bioelectronics*, 2014, **52**: 261–264
- [150]Shen Q, Zhou L, Yuan Y, *et al.* Intra-molecular G-quadruplex structure generated by DNA-templated click chemistry: "Turn-on" fluorescent probe for copper ions. *Biosensors & Bioelectronics*, 2014, **55**: 187–194
- [151]Bhadra S, Codrea V, Ellington A D. G-quadruplex-generating polymerase chain reaction for visual colorimetric detection of amplicons. *Anal Biochem*, 2014, **445**: 38–40
- [152]Pang S, Liu S, Su X. A novel fluorescence assay for the detection of hemoglobin based on the G-quadruplex/hemin complex. *Talanta*, 2014, **118**: 118–122
- [153]Lin X, Chen Q, Liu W, *et al.* A portable microchip for ultrasensitive and high-throughput assay of thrombin by rolling circle amplification and hemin/G-quadruplex system. *Biosensors & Bioelectronics*, 2014, **56**: 71–76
- [154]Xing Y P, Liu C, Zhou X H, *et al.* Label-free detection of kanamycin based on a G-quadruplex DNA aptamer-based fluorescent intercalator displacement assay. *Sci Rep*, 2015, **5**: 8125
- [155]Jiang X, Zhang H, Wu J, *et al.* G-quadruplex DNA biosensor for sensitive visible detection of genetically modified food. *Talanta*, 2014, **128**: 445–449
- [156]Guo Y, Zhou L, Xu L, *et al.* Multiple types of logic gates based on a single G-quadruplex DNA strand. *Sci Rep*, 2014, **4**: 7315

Research Progresses on Methods for Studying The Interactions Between G-Quadruplex and Its Ligands*

WEI Qiang, QU Feng**, GONG Rui

(School of Life Science, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China)

Abstract G-quadruplex structures of nucleic acids have been demonstrated to be widely existed in the genomes of prokaryotes and eukaryotes, meanwhile, involved in many biological processes, such as gene replication and recombination, telomere elongation, regulation of genetic expression, *etc.* Studying the interactions between G-quadruplex and ligands, such as Telomestatin, TMPyP4, BRACO-19, RHPS4, contributes to understand the roles of G-quadruplex and the corresponding mechanisms in biological processes. The research relies on a variety of analytical methods. Biochemical methods includes DMS footprinting, EMSA and DNA polymerase stop assay, and spectroscopy methods, such as circular dichroism, fluorescence spectrum, fluorescence resonance energy transfer, nuclear magnetic resonance and X-ray crystal diffraction. In addition, surface plasma resonance, electrospray ionization mass spectrometry and capillary electrophoresis are also included. This paper reviews the ligands targeting G-quadruplex and methods mentioned above for characterizing G-quadruplex's structures and interactions with ligands.

Key words G-quadruplex, ligands, interactions, study methods

DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0061

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (21175011, 21375008) and National Basic Research Program of China (2012CB910603).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-68918015, 13910050425, E-mail: qufengqu@bit.edu.cn

Received: March 20, 2015 Accepted: June 3, 2015