

多种方法研究 6-吡咯脱氧胞苷的发夹结构*

孙凌志, 张旭

(盐城师范学院 药学院, 江苏 盐城 224051)

摘要:为更好地了解 DNA 发卡结构在生物学上的功能,利用时间分辨荧光光谱和 2D-NOE NMR 谱确定 6-吡咯脱氧胞苷(6PdC)的二级结构,用滴定曲线测定 7-氨基放线菌素 D(7AAMD)滴定 DNA 的 K_d 值,并用 Z-DOCK 方法计算 7AAMD 与 DNA 的绑定位置。结果显示,6PdC 的表现时间分辨寿命为 1.44 ns,而 7-吡咯脱氧胞苷(7PdC)的该寿命为 2.81 ns;在 2D-NOE NMR 谱中处于 H8/H6 区域的交叉峰,除了处于 7,8,9,10 位上的脱氧胞苷(dC)的 NOE 很弱甚至难以观察到外,其他的 dC 的 NOE 交叉峰很强,并且可以很好地归属;滴定曲线显示 AACC4,7PdC,6PdC,AACC4-comp 等与 7AAMD 的 K_d 值分别是 0.1,0.31,0.46,0.57;Z-DOCK 计算结果显示 7AAMD 的平面多环插入发卡环。研究结果说明 DNA 的结构决定 7AAMD 与自身亲和力的强弱,而吡咯脱氧胞苷(PdC)的空间位阻的影响有限;揭示 7AAMD 可能通过与启动子或增强子的发卡部位结合抑制或减弱原癌基因的转录水平,达到抗癌作用。

关键词:发卡结构;时间分辨荧光光谱;2D-NOE 核磁共振;7-氨基放线菌素 D;分子动力学模拟计算;6-吡咯脱氧胞苷

中图分类号:Q6-3

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2016)06-0120-07

单链 DNA 折叠并通过自身碱基配对形成发卡,且发卡结构中包含 1 个碱基配对的茎和 1 个非碱基或非 Watson-Crick 配对的环。到目前为止,已经知道发卡结构有时在基因调控区域形成启动子、增强子或终结子。例如,DAX-1 绑定到发卡二级结构并通过类固醇合成急性调节蛋白基因的启动子的转录受体阻止类固醇激素分泌肾上腺^[1]。基因的发卡结构常与小分子形成异常高亲和力的结合位点,发卡环可作为抗癌药物的靶^[2-4],如 7-氨基放线菌素 D(7AAMD)^[5-8]。因此,基因的二级结构的结构特性对于理解核糖核酸的生物学作用和潜在的药物靶标起着非常重要的作用。DNA 发卡结构可能的重要性功能为配体的识别元素或折叠起始位点,例如,核酸发卡可作为核酸转录的终止信号^[9]。稳定的 DNA 发卡结构的形成可能影响 DNA 超螺旋结构以及 DNA 的复制^[10-16]。DNA 发卡结构也可能参与基因表达的调控^[1,17-19]、DNA 重组^[20-24]和基因突变^[25-27]。在哺乳动物细胞中,发卡结构常常是 DNA 修复机制的目标,例如在发展中的 B 和 T 淋巴细胞的 V(D)J 重组中,发卡编码末端出现生理性和程序性的 DNA 双链断裂时常发生^[28-29]。通过内在和外在的原因引起的 DNA 发卡的病理损伤,例如反应性氧化物和电离辐射,也被 DNA 修复机制处理加工^[30]。DNA 发卡结构参与多种生物功能,可作为绑定蛋白、药物的靶,而强直性肌营养不良、脊髓小脑共济失调 III 型以及一些遗传病也都与发卡结构的形成或 DNA 重复序列密切相关^[31-33]。但是,绝大多数研究报告都采用内切酶的方法研究 DNA 的发卡结构^[34-37],如此 DNA 分子被切成碎片,破坏了 DNA 的整体结构。本研究利用表现时间分辨荧光光谱和 2D-NOE NMR 谱的方法确定 DNA 的发卡结构,即把吡咯脱氧胞苷(PdC)分别取代其中 6 位点和 7 位点的脱氧胞苷(dC),保持 DNA 的基本结构不变;并通过研究该发卡结构与 7AAMD 的亲合力以及结合部位,预测 7AAMD 可能通过结合到启动子的发卡结构部位,起到抑制原癌基因的表达。

1 材料和方法

1.1 寡核苷酸和化学试剂

研究中用到的寡核苷酸以及 PdC 的序列及结构见图 1。所有的寡核苷酸包括 PdC 取代的寡核苷酸均购自

* 收稿日期:2016-01-05 修回日期:2016-09-25 网络出版时间:2016-11-02 13:28

资助项目:江苏省六大人才高峰资助项目(No. swyy-030);江苏省盐土生物资源研究重点实验室开放课题(No. JKLBS2012024)

作者简介:孙凌志,博士,研究方向为抗癌小分子的合成及其活性,E-mail:sunshine_jj@foxmail.com;通信作者:张旭,副教授,E-mail:zhan-gxthunder@sina.com

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20161102.1328.026.html

米兰试剂公司(Texas, USA)。它们均用标准的固相合成方法合成,并用凝胶过滤纯化,溶于 TE 缓冲溶液(pH 值为 8.0),4 °C 保存。7AAMD 购自 Sigma 公司,用 DMSO 稀释,直接使用,没有进一步纯化,不用时,-20 °C 保存。

1.2 方法

1.2.1 表观时间分辨荧光方法 PdC 各种构象的荧光寿命的测定采用多频交叉相位和调制荧光仪 ISS K2,该仪器配备激发和发射单色器。在相位调制测量时,样品用正弦调制的光激发。发射延迟相位的角度为 φ ,但是以相同频率的光为激发光源。在本研究中,相位角 φ 和解调因子 m 同时被测量,并被用来计算寿命 τ 。二甲基 POPOP 的无水乙醇溶液作为测量荧光寿命的标准参照荧光寿命(在 298 K,荧光寿命为 1.45 ns)。实验样品采用 350 nm 的光源为激发光,用一个大于 400 nm 的长通滤波器收集发射光。测量调制频率介于 10~160 MHz 之间。被测的发夹或配对的双链 DNA 的浓度为 $13 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。使用 ISS187 衰减分析软件拟合数据确定 PdC 在各种配对或未配对情况下的荧光寿命。

1.2.2 滴定稳态荧光光谱和滴定曲线 通过用 7AAMD 滴定 DNA 的方法,确定 7AAMD 与天然或改性的发夹和 DNA 的络合情况。用 Horiba FluorMax-3 光谱仪在激发光波长在 450 nm 时收集波长在 520~750 nm 区间的稳态发射光谱。并通过滴定的稳态荧光光谱图绘制了滴定曲线。

1.2.3 6-吡咯脱氧胞苷(6PdC)的 NMR 结构 用有 5 mm 的 QNP 探头的 Bruker DRX-500 核磁共振仪收集 NMR 图谱。DNA 样品溶于含有 $10 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲重水液(含 $1 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA,pH 值为 7.5),其中 H_2O 与 D_2O 的体积比为 5:95。6PdC 的最终浓度为 $0.25 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在室温(298 K)、相敏模式下,收集非交换质子的 2D NOESY 谱图,每次扫描,纵向弛豫(t_1)收集 256 点,横向弛豫(t_2)收集 2 048 点,混合时间分别为 100,200,300 和 500 ms 以及弛豫延迟时间为 5 s。在所有的 2D NOESY 实验中,用了一个以激发中心为 4.71×10^{-6} 的水预抑制脉冲序列。6PdC 所有相关的非交换的质子的谱图除了 3' 和 4' 质子外,都按常规顺序分配程序标明。用 SPARKY 软件处理和分析 NMR 的原始数据。

1.2.4 分子模拟计算 用 INSIGHT II 建立 6PdC 的分子 3D 模型,用 AMBER11 把模型能量优化。用 AMBER11 的 antechamber 模块标明 6PdC 的各种参数和电荷数。能量优化后,用 NMR 得到的质子间 NOE 的距离限定 AMBER 中的参数,进行精细改良 6PdC 的结构,并进行时间为 100 ps 分子动力学计算。得到 6PdC 的优化结构后,用 Z-DOCK 方法与 7AAMD 之间的络合进行模拟运算,得到 25 个结构,再选取能量最小的结构作为最优化的结构。

2 结果

2.1 表观时间分辨荧光光谱

PdC 的荧光强度高度依赖于与鸟嘌呤形成的氢键状态。为了检验 PdC 的荧光淬灭效应成因,本研究比较了 6PdC、7-吡咯脱氧胞苷(7PdC)以及它们的完全配对的双链 DNA 6PdC-comp 和 7PdC-comp 的表观时间分辨荧光寿命(图 2)。所有被测的 DNA 的表观时间分辨荧光表观寿命(τ_1 和 τ_2)基本都不随 NaCl 浓度的变化而变化或变化甚微。图 2 中很清楚地显示 6PdC 的表观时间分辨荧光表观寿命为 1.44 ns(τ_1),与 6PdC-comp 的基本相同(1.34 ns);7PdC 的表观时间分辨荧光表观寿命是 2.81 ns(τ_1),而 7PdC-comp 的表观时间分辨荧光表观寿命是 1.25 ns,未配对 7PdC 的时间分辨荧光表观寿命是配对的 2 倍多。

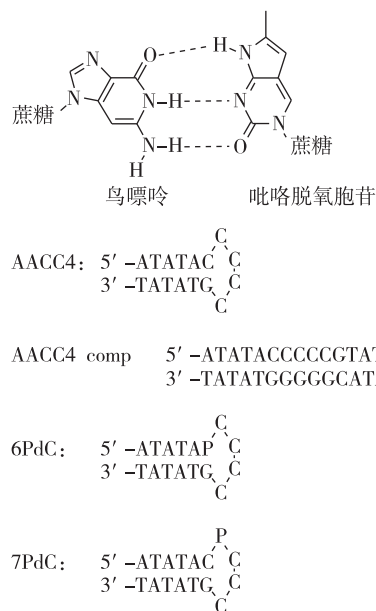
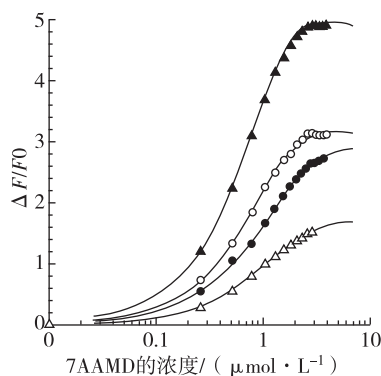


图 1 寡核苷酸的序列与结构

Fig. 1 The sequences and structures of oligonucleotides

2.2 滴定稳态荧光光谱和滴定曲线

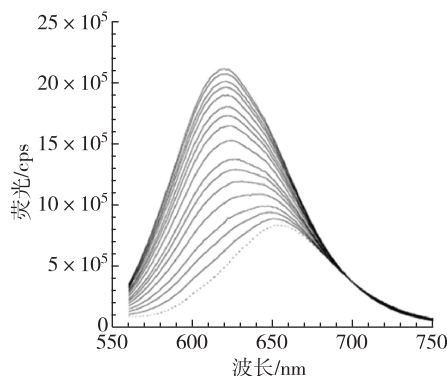
本研究用滴定的方法比较了发夹 AACC4, 6PdC, 7PdC, 双链 AACC4-comp 等与 7AAMD 的亲合力情况以及 PdC 的空间体积对亲和力的影响。滴定过程中, 测量滴定稳态荧光光谱并根据荧光光谱绘制滴定曲线图(图 3)。所有发夹结构 DNA 的滴定稳态荧光光谱都相似, 而所有双链 DNA 的滴定稳态荧光光谱都相似, 因此在本研究中选取了 6PdC 和 6PdC-comp 与 7AAMD 的滴定稳态荧光光谱图为代表(图 4)。由该图可知: 发夹结构的滴定稳态荧光光谱与双链 DNA 的区别很大, 即发夹的稳态荧光强度随滴定的进行而明显的增加, 另一方面, 双链 DNA 的稳态荧光强度随滴定的进行而淬灭。由滴定曲线算出的 K_d 值, 其中 AACC4, 7PdC, 6PdC, AACC4-comp 的 K_d 值分别为 (0.10 ± 0.09) , (0.31 ± 0.10) , (0.46 ± 0.15) , $(0.57 \pm 0.21) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。发夹 AACC4, 7PdC 和 6PdC 与 7AAMD 的亲合力分别是双链 AACC4-comp 与 7AAMD 的亲合力的 5.7, 1.8 和 1.2 倍。



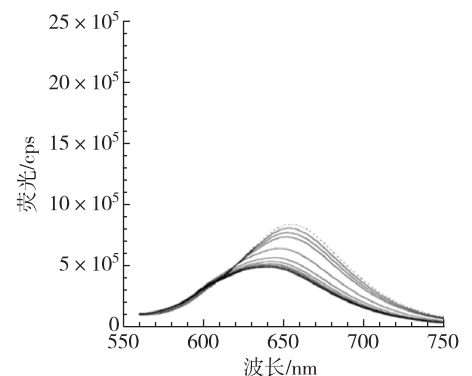
注: 黑色三角形、空心圆形、黑色圆形、空心三角形分别为 AACC4, 7PdC, 6PdC, AACC4-comp。

图 3 DNA 与 7AAMD 的滴定曲线

Fig. 3 The titration curves of DNA titrating with 7AAMD



a 6PdC



b 6PdC-comp

图 4 6PdC, 6PdC-comp 与 7AAMD 的滴定稳态荧光光谱

Fig. 4 The steady-state fluorescence spectra of titration between 6PdC, 6PdC-comp, and 7AAMD

2.3 发夹 6PdC 的 NMR 结构

本研究用 2D-NOESY NMR 波谱和分子模拟计算同样确定了 6PdC 的三维结构。6PdC 的序列通过 H6/H8-H1'/H5 确定(图 5)。胸腺嘧啶的 H6 在甲基区域的 NOE 峰很稳定, 可以很明确标定 T2, T4, T12, T14 和 6PdC 的 H6-甲基质子峰(图 6)。

2.4 分子动力学和 Z-DOCK 分子模拟计算

以 NOE 值为限定条件, 用 AMBER 11 软件对 NMR 结构进行优化并模拟了 100 ps 的分子动力学结构, 每隔 20 ps 截取 1 个结构, 共得到 5 个动力学结构(图 7)。对优化后的结构的 NOE 距离与理论上的距离作图比较(图 8), 说明所得 NMR 结构与理论结构基本一致。

针对 6PdC 与 7AAMD 的亲合力位置, 本研究用 Z-dock 软件进行计算, 图 9 显示 6PdC 与 7AAMD 的亲合力

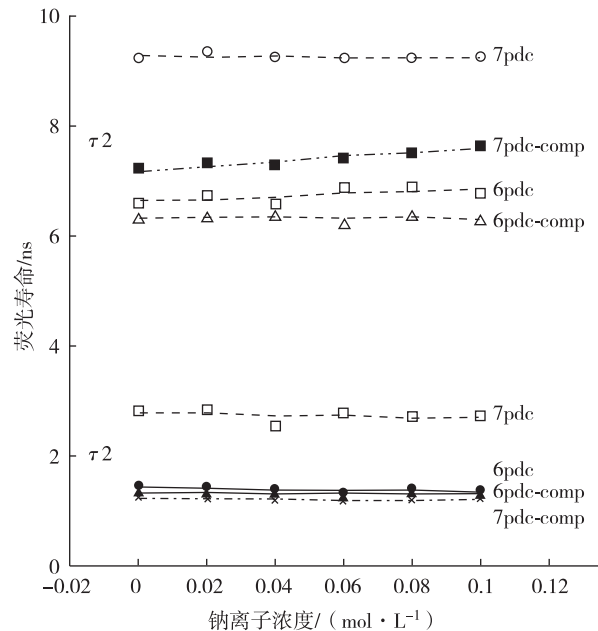


图 2 各 DNA 的表现时间分辨荧光表现寿命

Fig. 2 The apparent time-resolved fluorescence life time of DNAs

置。图中显示 7AAMD 的平面多环插入发夹环中,与实验结果一致。

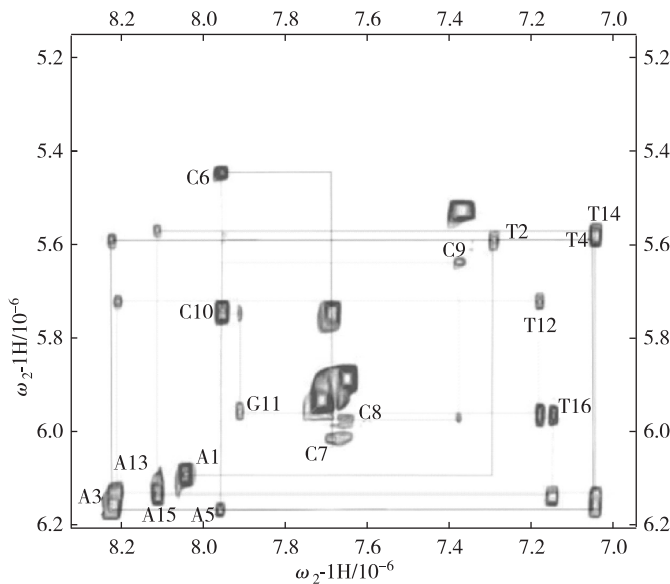


图 5 H8/H6/H2 区的 NMR 2D-NOESY 图谱
 Fig. 5 The NMR 2D-NOESY spectrum in the H8/H6/H2 regions

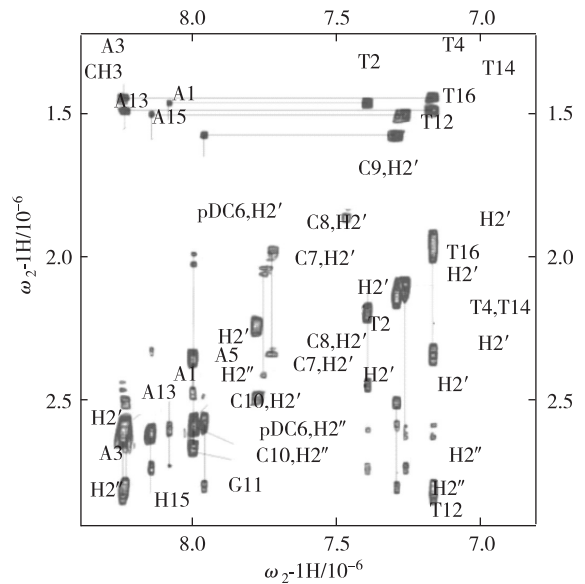
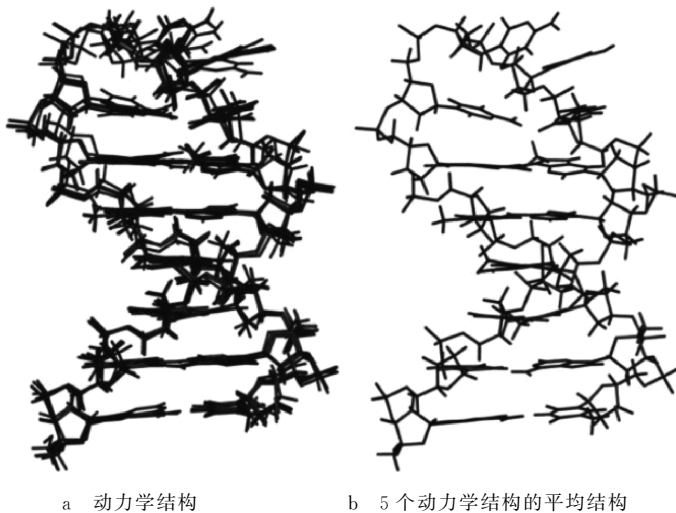


图 6 H6/H8-H2'/H2'' 区以及胸腺嘧啶甲基区
 Fig. 6 The NOESY spectrum in the H6/H8-H2'/H2'' and methyl group of thymine regions



a 动力学结构 b 5个动力学结构的平均结构
 图 7 6PdC 动力学结构和 5 个动力学结构的平均结构

Fig. 7 Dynamic structures and the average structure of 6PdC

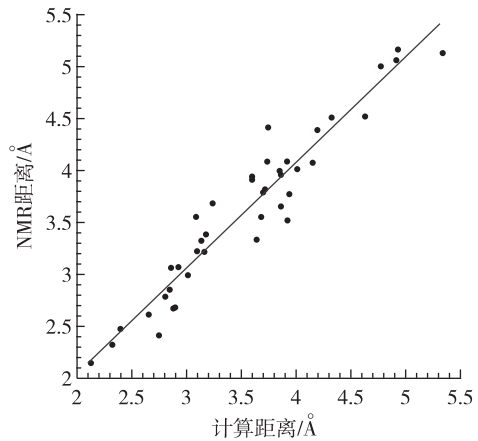


图 8 理论 NOE 距离和 NMR 测定的 NOE 距离比较图
 Fig. 8 The theoretical distances of NOE versus the measured distances via NMR

3 讨论与结论

发夹结构在基因的表达、蛋白质的翻译及其调控上起着非常重要的作用^[38-40]。因此,通过测定生物体内基因结构对于了解基因的表达,特别在基因治疗癌症上非常重要^[41-42]。

本研究分别用 PdC 作为荧光探针,测定 DNA 的表观时间分辨荧光寿命。根据实验所得的表观时间分辨荧光寿命,7PdC 的是 7PdC-comp 的 2 倍,而 6PdC,6PdC-comp 和 7PdC-comp 的表观时间分辨荧光寿命相似,说明 7PdC 是未配对的,而 6PdC 是配对的。以上结果说明 6PdC 处于发夹的茎柄上,而 7PdC 处于发夹的茎环上。

本研究用滴定的方法研究了 PdC 的嵌入对于 DNA 与 7AAMD 的亲合能力以及 PdC 的空间位阻的影响。根据滴定曲线得出的 K_d 值,可知发夹 AACC4 与 7AAMD 的亲合力最强,是同样发夹的 7PdC 的 3 倍多,说明吡咯环的加入增加了与 7AAMD 的亲合过程中的空间位阻;而 7PdC 的 K_d 值是 6PdC 的 1.5 倍,说明 6PdC 与

7AAMD 的亲和力最弱——其一是因为它处于环柄上,已经与 11 位的鸟嘌呤配对,其二可能是 7AAMD 作用于发夹环的缘故。以上结果说明 PdC 的嵌入对于 DNA 与 7AAMD 的亲和力有影响,但最终决定亲和力大小的主要是发夹结构。

本研究还采用 2D-NOESY NMR 方法确定了 6PdC 的二级结构。根据图 5 比较胸腺嘧啶的甲基质子峰和 PdC 的甲基质子峰, PdC 的左移距离为 0.4×10^{-6} , 这可能由于 PdC 上稠芳环的共轭效应所致。图 5 中,处于发夹柄中的碱基 NOE 峰值明显强发夹环上的胞嘧啶的 NOE,这与理论一致:处于发夹柄上的碱基因为配对,刚性大于处于环的碱基;因而处于环上的碱基振幅较大,NOE 会随时间、温度变化而发生较大变化。研究还发现 PdC 的嵌入基本对 DNA 的结构没有影响。

此外,根据 Z-DOCK 计算结果,可以清晰地看出 7AAMD 的平面稠环从小沟方向插入发夹环中,这样的亲和方式空间位阻最小。这与前面的滴定结果高度一致,说明根据实验结果推导的结论是正确可信的。从中还可以推知,7AAMD 作用于发夹环,从而达到抑制基因表达的效果。

通过本研究结果可知, PdC 可以作为灵敏度高、选择性好的荧光分子探针,对于研究药物分子在生物体内的抗病机理提供了新的研究途径;这为今后的研究提供了方向。

PdC 作为 DNA 的荧光探针,可以有效地用来测定 DNA 或 RNA 的结构。本研究用表观时间分辨荧光光谱和 NMR 谱确定了 6PdC 的二级结构(发夹结构),并用滴定曲线推导出 6PdC 与 7AAMD 的亲合位置以及 PdC 的嵌入对于亲和力在空间上的影响。利用 Z-Dock 软件计算了 6PdC 与 7AAMD 在发夹环中的亲和位置,这一计算结果与滴定的 K_d 值一致。

致谢:作者在此诚挚感谢江苏省人力资源与社会保障厅的资助!

参考文献:

- [1] Zazopoulos E, Lalli E, Stocco D M, et al. DNA binding and transcriptional repression by DAX-1 blocks steroidogenesis [J]. *Nature*, 1997, 390(6657): 311-315.
- [2] Tang J Y, Tamsamani J, Agrawal S. Self-stabilized antisense oligodeoxynucleotide phosphorothioates: properties and anti-HIV activity [J]. *Nucleic Acids Research*, 1993, 21(11): 2729-2735.
- [3] Park S, Seetharaman M, Ogdie A, et al. 3'-Exonuclease resistance of DNA oligodeoxynucleotides containing O6-[4-oxo-4-(3-pyridyl) butyl] guanine [J]. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31(7): 1984-1994.
- [4] Nair V, Pal S. Resistance towards exonucleases of dinucleotides with stereochemically altered internucleotide phosphate bonds [J]. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letter*, 2004, 14(1): 289-291.
- [5] Wadkins R M, Jares-Erijman E A, Klement R, et al. Actinomycin D binding to single-stranded DNA: sequence specificity and hemi-intercalation model from fluorescence and ¹H NMR spectroscopy [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1996, 262(1): 53-68.
- [6] Wadkins R M, Jovin T M. Actinomycin D and 7-aminoactinomycin D binding to single-stranded DNA [J]. *Biochemistry*, 1991, 30(39): 9469-9478.
- [7] Wadkins R M, Tung C, Peter M, et al. The role of the loop in binding of an actinomycin D analog to hairpins formed by single-stranded DNA [J]. *Archives Biochemistry & Biophysics*, 2000, 384(1): 199-203.
- [8] An J, Zheng L, Xie S, et al. Regulatory effects and mechanism of adenovirus-mediated PTEN gene on hepatic stellate cells [J]. *Digestive Disease Science*, 2016, 61(4): 1-14.
- [9] Fritsch T E, Siqueira F M, Schrank I S. Intrinsic terminators in *Mycoplasma hyopneumoniae* transcription [J]. *BMC Genomics*, 2015, 16(1): 273.
- [10] Chou S H, Tseng Y Y, Chu B Y. Stable formation of a pyrimidine-rich loop hairpin in a cruciform promoter [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1999, 92(2): 309-320.

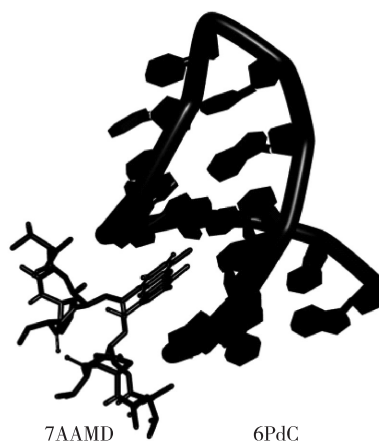


图 9 6PdC 与 7AAMD 的亲合结构

Fig. 9 The complex structure of 6PdC and 7AAMD

- [11] Aslani A A, Mauffret O, Sourgen F, et al. The hairpin structure of a topoisomerase II site DNA strand analysed by combined NMR and energy minimization methods[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1996, 263(5): 776-788.
- [12] Glucksmann M A, Markiewicz P, Malone C, et al. Specific sequences and a hairpin structure in the template strand are required for N4 virion RNA polymerase promoter recognition[J]. *Cell*, 1992, 70(3): 491-500.
- [13] Glucksmann-Kuis M A, Dai X, Markiewicz P, et al. *E. coli* SSB activates N4 virion RNA polymerase promoters by stabilizing a DNA hairpin required for promoter recognition[J]. *Cell*, 1996, 84(1): 147-154.
- [14] Gellert M. V(D)J recombination; RAG proteins, repair factors, and regulation[J]. *Annual Review Biochemistry*, 2002, 71: 101-132.
- [15] Jones J M, Gellert M. Autoubiquitylation of the V(D)J recombinase protein RAG1[J]. *Proceedings National Academy Science U S A*, 2003, 100(26): 15446-15451.
- [16] Grundy G J, Hesse J E, Gellert M. Requirements for DNA hairpin formation by RAG1/2[J]. *Proceedings National Academy Science U S A*, 2007, 104(9): 3078-3083.
- [17] Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals[J]. *Nature Genetics*, 2003, 33(Suppl): 245-254.
- [18] Cohen S E, Kokkotou E, Biddinger S B, et al. High circulating leptin receptors with normal leptin sensitivity in liver-specific insulin receptor knock-out (LIRKO) mice[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(32): 23672-23678.
- [19] Papanicolaou K N, Izumiya Y, Walsh K. Forkhead transcription factors and cardiovascular biology[J]. *Circulation Research*, 2008, 102(1): 16-31.
- [20] Froelich-Ammon S J, Gale K C, Osheroff N. Site-specific cleavage of a DNA hairpin by topoisomerase II. DNA secondary structure as a determinant of enzyme recognition/cleavage[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269(10): 7719-7725.
- [21] Purkerson J M, Isakson P C. Independent regulation of DNA recombination and immunoglobulin (Ig) secretion during isotype switching to IgG1 and IgE[J]. *Journal of Experimental Medicine*, 1994, 179(6): 1877-1883.
- [22] Yuan Z M, Huang Y, Ishiko T, et al. Regulation of DNA damage-induced apoptosis by the c-Abl tyrosine kinase[J]. *Proceedings National Academy Science U S A*, 1997, 94(4): 1437-1440.
- [23] Lieber M R. Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283: 1-5.
- [24] Pellegrini L, Yu D S, Lo T, et al. Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51-BRCA2 complex[J]. *Nature*, 2002, 420(6913): 287-293.
- [25] Trinh T Q, Sinden R R. The influence of primary and secondary DNA structure in deletion and duplication between direct repeats in *Escherichia coli*[J]. *Genetics*, 1993, 134(2): 409-422.
- [26] Kumar S, Giri D, Singh Y. Statistical mechanics of coil-hairpin transition in a single-stranded DNA oligomer[J]. *Europhysics Letters*, 2005, 70(1): 15.
- [27] Kou S C, Xie X S, Liu J S. Markov chain Monte Carlo in the analysis of single-molecule experimental data [J]. *Monte Carlo Method in the Physical Sciences*, 2003, 690: 123-133.
- [28] Lieber M R, Yu K, Raghavan S C. Roles of nonhomologous DNA end joining, V(D)J recombination, and class switch recombination in chromosomal translocations[J]. *DNA Repair (Amst)*, 2006, 5(9/10): 1234-1245.
- [29] Schatz D G. V(D)J recombination[J]. *Immunological Reviews*, 2004, 200: 5-11.
- [30] Lieber M R, Ma Y, Pannicke U, et al. The mechanism of vertebrate nonhomologous DNA end joining and its role in V(D)J recombination[J]. *DNA Repair (Amst)*, 2004, 3(8/9): 817-826.
- [31] Garcia-Lopez A, Llamusi B, Orzáez M, et al. *In vivo* discovery of a peptide that prevents CUG-RNA hairpin formation and reverses RNA toxicity in myotonic dystrophy models[J]. *Proceedings of the National Academy Science U S A*, 2011, 108(29): 11866-11871.
- [32] Pushechnikov A, Lee M M, Let J, et al. Rational design of ligands targeting triplet repeating transcripts that cause RNA dominant disease: application to myotonic muscular dystrophy type 1 and spinocerebellar ataxia type 3[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131(28): 9767-9779.
- [33] 闫正文, 张玉娟, 周勇, 等. 中华按蚊 *CYP4G17* 基因的鉴定及生物信息学分析[J]. *重庆师范大学学报: 自然科学版*, 2015, 32(3): 35-41.
Yan Z W, Zhang Y J, Zhou Y, et al. Identification and bioinformatics analysis of *CYP4G17* gene in *Anopheles sinensis*[J]. *Journal of Chongqing Normal University: Nature Science*, 2015, 32(3): 35-41.
- [34] Pingoud A, Wilson G G, Wende W. Type II restriction endonucleases—a historical perspective and more[J]. *Nucle-*

- ic Acids Research, 2014, 42(12):7489-527.
- [35] Loenen W A, Dryden D T, Raileigh E A, et al. Highlights of the DNA cutters; a short history of the restriction enzymes[J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42(1):3-19.
- [36] Kennaway C K, Taylor J E, Song C F, et al. Structure and operation of the DNA-translocating type I DNA restriction enzymes[J]. Genes & Development, 2012, 26(1):92-104.
- [37] Horton J R, Nugent R, Li A, et al. Structure and mutagenesis of the DNA modification-dependent restriction endonuclease AspBHI[J]. Scientific Reports, 2014, 4:4246.
- [38] Xu M, Yanhao L, Justin T, et al. Base excision repair of oxidative DNA damage coupled with removal of a CAG repeat hairpin attenuates trinucleotide repeat expansion [J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42(6):3675-3691.
- [39] Tang C, Paul A, Alam M P, et al. A short DNA sequence confers strong bleomycin binding to hairpin DNAs[J]. Journal of the American Chemical Society, 2014, 136(39):13715-13726.
- [40] Gill A C. Beta-hairpin-mediated formation of structurally distinct multimers of neurotoxic prion peptides[J]. PLoS One, 2014, 9(1):e87354.
- [41] Yee N S, Li Q, Kazi A A, et al. Aberrantly over-expressed TRPM8 channels in pancreatic adenocarcinoma; correlation with tumor size/stage and requirement for cancer cells invasion[J]. Cells, 2014, 3(2):500-516.
- [42] Bhinder B, Shum D, Djaballah H. Comparative analysis of RNAi screening technologies at genome-scale reveals an inherent processing inefficiency of the plasmid-based shRNA hairpin[J]. Combinatorial Chemistry & High Throughput Screen, 2014, 17(2):98-113.

Study of the Hairpin Structure of 6PdC via Multiple Methods

SUN Lingzhi, ZHANG Xu

(School of Pharmacy, Yancheng Teachers University, Yancheng Jiangsu 224051, China)

Abstract: To better understand the biological function of DNA hairpin, determining the secondary structure of 6-pyrolo deoxycytidine (6PdC) using the time-resolved fluorescence, 2D-NOE NMR spectra, titration curves and as well as Z-DOCK computational method were conducted. The time-resolved fluorescence apparent lifetime of 7-pyrolo deoxycytidine(7PdC) is 2.81 ns and 6PdC is 1.44 ns; 2D-NOE NMR spectra shown that the backbone of 6PdC can be well assigned via cross-peaks in the H8/H6 region, however, the intensity of NOEs of dCs at position 7, 8, 9, 10 are very weak and are hardly to be assigned; the titration results indicated that the K_d values of AACC4 is 0.1, 7PdC is 0.31, 6PdC is 0.46 and AACC4-comp is 0.57; the results of Z-DOCK computing indicated that the planar polycyclic ring of 7-aminoactinomycin D is inserted into the loop of the hairpin. The above results suggested that the DNA structure plays a key role in binding affinity, and the steric hindrance has certain effect, but not the important one; the 7AAMD may be bound to promoter or enhancer, which is hairpin, to inhibit or suppress the transcription of oncogenes, thus far achieving the anti-cancer effect.

Key words: hairpin structure; time-resolved fluorescence; 2D-NOE NMR; 7-aminoactinomycin D; molecular modeling; 6-pyrolo deoxycytidine

(责任编辑 方 兴)