



## 论文

# 基质辅助激光解析电离-飞行时间质谱分析寡核苷酸 G-四链体

宋玉玲, 吕美玲, 汪海林\*

环境化学与生态毒理学国家重点实验室; 中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085

\*通讯作者, E-mail: hlwang@rcees.ac.cn

收稿日期: 2010-01-04; 接受日期: 2010-04-27; 网络版发布日期: 2010-09-14

doi: 10.1360/032010-5

**摘要** 我们发展了一种利用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱技术(MALDI-TOF MS)分析对金属离子具有较高亲和力的寡核苷酸 G-四链体的方法. 考察了不同基质: 3-羟基吡啶甲酸(3-HPA)与柠檬酸氢二铵(DHC)混合基质、3,4-二胺基苯基苯甲酮(DABP)及 DABP/DHC 混合基质, 应用于 G-四链体分析的效果. 实验结果表明不同基质对寡核苷酸链的分析均表现出一定的选择性. DABP 及 DABP/DHC 适合于作为 PolyT 系列寡核苷酸分析的基质, 准分子离子峰信号强, 且所产生的碎片及钠离子和钾离子加合物的离子峰低, 但是这两种基质并不适合作为 G-四链体分析的基质. 与 DABP 组成的基质相比, 3-HPA/DHC 更适合于作为 G-四链体分析的基质, 获得 MALDI 质谱图谱质量更好, 检测灵敏度更高, 且金属离子加合物的干扰小.

**关键词**  
MALDI-TOF MS  
G-四链体  
3-HPA  
DHC  
DABP  
基质选择性

## 1 引言

基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF MS)可应用于短链核苷酸的分析. 由于需要基质辅助寡核苷酸的气化与电离, 寡核苷酸的质谱分析的质量高度依赖于基质的类型和使用方式, 但目前仅有限的基质可应用于寡核苷酸的分析<sup>[1~4]</sup>. 3-羟基吡啶甲酸(3-HPA)与柠檬酸氢二铵(DHC)形成的混合基质是一种使用较为广泛的寡核苷酸分析基质. 采用 3-HPA、2-吡嗪羧酸(PCA)及 DHC 共同组成的三元混合基质可以分析分子量为 5000~10500 Da 的寡核苷酸链, 而且采用该三混合基质对于长度为 23 mer 的寡核苷酸链的分辨率可以达到 7 Da<sup>[5]</sup>. 最近的研究发现一种新型基质 3,4-二胺基苯基苯甲酮(DABP)可应用于寡核苷酸分析.

该基质不需要共基质即可提高寡核苷酸的分析, 对于长达 23 mer 的寡核苷酸仍可以获得较好的分辨率和检测灵敏度<sup>[6]</sup>. 总体而言, 利用 MALDI-TOF MS 分析寡核苷酸链的研究非常有限, 尤其对于具有特殊结构的寡核苷酸, 如 G-四链体.

G-四链体是 DNA 中某些富含 G 碱基的序列通过四个鸟嘌呤循环的互联作用折叠形成的四链螺旋结构<sup>[7~12]</sup>. 富含鸟苷的核酸分子通过 Hoogsteen 碱基配对方式形成链间 G-四链体, 或者 DNA/RNA 分子自身形成堆叠的鸟苷平面<sup>[13]</sup>. G-四链体需要位于结构中央的钾离子或者钠离子稳定, 但不同离子条件下形成的结构具有差别<sup>[14]</sup>. 根据文献报道, 体外存在着几种 G-四链体结构, 根据它们的分子特性及螺旋取向, G-四链体可分为如下几类: (1) 含有鸟嘌呤重复序列的 4 个单链所形成的分子间四链体, 即平行型(parallel)四链体; (2) 含有两个或多个鸟嘌呤重复序

列的 DNA 可形成 G-G 发夹型(hairpin)四链体结构; (3) 具有 4 个或更长的鸟嘌呤重复序列可以自身折叠形成分子内的四链体结构, 即自身折叠型(fold-over)四链体<sup>[15]</sup>. 这些富含鸟苷的重复序列形成的 G-四链体结构因频繁出现在各种生物体系中, 例如染色体的端粒末端或者基因的启动子区域, 与小分子或蛋白具有选择性作用, 而引起了研究者越来越多的关注<sup>[16-20]</sup>. G-四链体特殊的拓扑学结构已经成为新型抗癌药物开发的靶标, 通过设计小分子靶标稳定 G-四链体结构, 抑制端粒的增长最终起到抑癌作用, 或者选择性抑制致癌基因.

目前关于 G-四链体的研究方法主要包括 NMR、X 射线晶体衍射、融解温度的测定、CD 谱、荧光显微镜成像及 ESI MS、NMR、X 射线晶体衍射能够提供关于 G-四链体的完整结构信息<sup>[21, 22]</sup>; 通过测定不同温度时 G-四链体的 295 nm 紫外吸收值的变化可确定其融解温度, 可以提供关于 G-四链体结构稳定的信息<sup>[23]</sup>; CD 谱是目前最为简单的一种可预测 G-四链体折叠结构的方法, 特别用于区别平行结构以及反式平行结构<sup>[24]</sup>; 利用荧光能量共振转移(FRET)的方法可以研究 G-四链体上两点之间距离的变化<sup>[25]</sup>; ESI MS 被广泛应用在研究小分子配体或者大分子与 G-四链体相互作用. 这些方法可研究 G-四链体结构变化或者区别不同结构组成的有效手段, 但是并不能提供有关 G-四链体序列和分子量的准确信息. ESI MS 是一种主要用于配体与已知分子量信息的 G-四链体之间结合计量比及亲和力测定的质谱方法. MALDI-TOF MS 作为一种测定生物大分子分子量信息及序列信息的有效手段, 可应用于 G-四链体的定性分析, 对于研究 G-四链体与小分子配体间或大分子的相互作用以及序列对相互作用的影响具有重要价值. 本文考察了几种不同的寡核苷酸分析基质应用于 G-四链体分析的可能性及效果, 为进一步利用 MALDI-TOF MS 研究 G-四链体的序列信息及其与生物分子相互作用提供有价值的信息.

## 2 实验部分

### 2.1 试剂

3-羟基吡啶甲酸(3-HPA, 纯度 $\geq 99.0\%$ , 美国 Fluka 公司)配置成 60 mg/mL 水溶液. 柠檬酸氢二铵(DHC, 纯度 $\geq 99.0\%$ , 美国 Fluka 公司)配置成 100

mM 水溶液. 3,4-二胺基苯基苯甲酮(DABP, 纯度为 99.0%, 美国 ACROS 公司)配置成 15 mg/mL 溶液, 溶解在盐酸酸化的甲醇中(甲醇/12 M 盐酸= 80:3, V/V). 寡核苷酸 Oxy12 [5'-GGGGTTTTGGGG-3'], Oxy28 [5'-GGGG(TTTTGG--GG)<sub>3</sub>-3'], Hum12 [5'-(TTAGGG)<sub>2</sub>-3']、Hum21[5'-GGG(TTAGGG)<sub>3</sub>-3']、TT2T3[5'-GGGTGGGTGGGTGGG-3']、TTT[5'-G<sub>3</sub>TG<sub>3</sub>TG<sub>3</sub>TG<sub>3</sub>-3']、PolyT6[5'-TTTTTTT-3']、PolyT8[5'-TTTTTTT-T-3']、PolyT10[5'-TTTTTTTTTTT-3']、PolyT12[5'-TTTTTTTTTTTTT-3']、PolyT14[5'-TTTTTTTTTTTTT-TT-3']、22mer-0[5'-CATCATAGTCCAGTGTCCAGG-G-3']、22mer-1[5'-CATCATAGTCCAATGTCCAGGG-3']和 22mer-2[5'-CATCATAGTCCCATGTCCAGGG-3'] (以上寡核苷酸链均由上海生工生物技术有限公司合成, 纯化方式为 HPLC 级)其中, Oxy12、Hum12 为发夹型 G-四链体, Oxy28、Hum21、TT2T3 和 TTT 均为分子内 G-四链体. 每种寡核苷酸分别配制成 100  $\mu$ M 的储备水溶液, 实验中用到的水均用 HPLC 级水(美国 J.T.Baker 公司)配制, 甲醇为色谱纯, 盐酸为农残级.

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 样品的制备

3-HPA 基质: 60 mg/mL 3-HPA 溶于超纯水, 加热促溶. 取 2.0  $\mu$ L 3-HPA 基质溶液, 点在 AnchorChip 靶上直径为 400  $\mu$ m 的点样孔中, 晾干后在基质上点 1.0  $\mu$ L 样品, 再次晾干后待分析.

3-HPA/DHC 混合基质: 60 mg/mL 3-HPA 溶于超纯水, 加热促溶. 取 50  $\mu$ L 3-HPA, 加入 25  $\mu$ L 100 mM 柠檬酸氢二铵、25  $\mu$ L 乙腈. 取 2.0  $\mu$ L 3-HPA 基质溶液, 点在 AnchorChip 靶上直径为 400  $\mu$ m 的点样孔中, 晾干后在基质上点 1.0  $\mu$ L 样品, 再次晾干后待分析; 或者采用样品与基质等体积混合的方式点样.

DABP 基质: 15 mg/mL DABP 溶于盐酸酸化的甲醇中(甲醇/12 M 盐酸 = 80:3, V/V). 基质溶液与待分析溶液等体积混合 3 min, 取 1  $\mu$ L 点在 400  $\mu$ m AnchorChip 靶上, 晾干后待分析. 在 MALDI-TOF MS 分析前, 寡核苷酸稀释到需要的浓度.

DABP/DHC 混合基质: 15 mg/mL DABP 溶于盐酸酸化的甲醇中(甲醇/12 M 盐酸 = 80:3, V/V). 基质

溶液与待分析溶液等体积混合 3 min, 取 1  $\mu\text{L}$  点在 400  $\mu\text{m}$  AnchorChip 靶上, 晾干后待分析. 在 MALDI-TOF MS 分析前, 寡核苷酸链要稀释到需要的浓度.

在实验中, 仅采用新鲜配制的基质溶液.

## 2.2.2 MALDI-TOF MS 测定

实验采用 Bruker Autoflex MALDI-TOF MS(Bruker Company, Bremen, Germany), 337 nm 氮脉冲激光. 寡核苷酸链的分析采用反射式模式. 每张质谱图由 200 个激光脉冲得到, 采用负离子模式[M-H]<sup>-</sup>检测. 离子源 1 加速电压为 19 kV, 离子源 2 加速电压为 16.65 kV, 反射电压为 21 kV, 延时提取 100 ns, 激光频率为 100 Hz. 分子量的校正采用外标法.

## 3 结果和讨论

### 3.1 3-HPA 作为核酸分析基质的考察

#### 3.1.1 基质 3-HPA 与 3-HPA/DHC 分析寡核苷酸链效果考察

3-HPA 是寡核苷酸链分析较常用的基质. 实验中考察了单独用 3-HPA 基质及混合基质 3-HPA/DHC

分析寡核苷酸链的效果. 图 1 是利用这两种基质分别分析 Poly T6 [5'-TTTTTT-3']及 G-四链体 Oxy12 [5'-GGGGTTTTGGGG-3']得到的 MALDI 质谱图. 从图 1(b)可以看出 3-HPA/DHC 作为基质分析 Oxy12, 可以得到典型的 MALDI 质谱图, 准分子离子峰 [M-H]<sup>-</sup> 是质谱图中最主要的峰, 另外存在少量的碎片峰和加钠、加钾峰. 3-HPA 单独作为基质分析 Oxy12, 并没有准分子离子峰的出现, 而是观察到一簇峰. 在 3-HPA 单独作为基质分析寡核苷酸链 PolyT6, 质谱图中钠、钾离子峰要明显高于 3-HPA/DHC 混合基质. 寡核苷酸链以带多电荷的负离子形式存在, 通过结合 H<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup> 离子形成带单电荷的负离子, DHC 中含有 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, 它可以竞争性与带负电子的磷酸结合, 从而降低了钠、钾离子峰, 这些与寡核苷酸链结合的 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 在解析/离子化得过程中丢失, 形成 [M-H]<sup>-</sup> 的准分子离子峰; 另外一方面, 在解析的过程中 DHC 含有的 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 可减弱 3-HPA 与样品分子间的静电相互作用, 使得基质-样品簇松散, 从而利于解析, 同时 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 也有助于寡核苷酸链离子在气相中的稳定性<sup>[2]</sup>. 这可能是 DHC 的加入能够有效得提高 G-四链体的分析效果的原因, 采用 3-HPA/DHC 混合基质可以有效抑制钠、钾离子

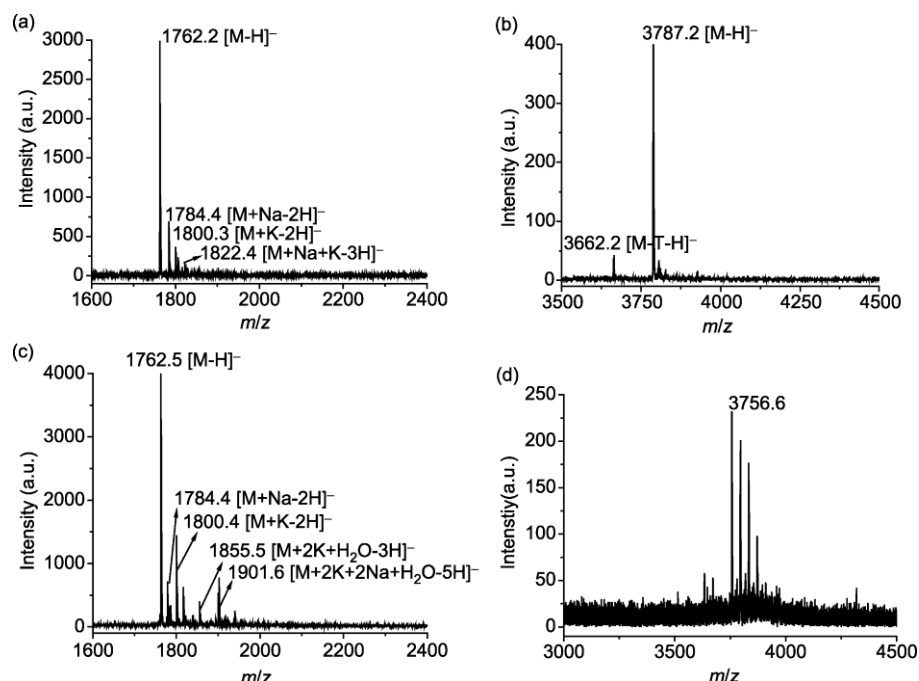


图 1 3-HPA/DHC、3-HPA 作为基质分析 10 pmol 寡核苷酸链 PolyT6[5'-TTTTTT-3'] (图 1(a)与(c)) 和 Oxy12[5'-GGGGTTTTGGGG-3'] (图 1(b)与(d)) 的质谱图, 激光能量为 80% 左右

峰的形成.

### 3.1.2 样品制备方法考察

样品制备方式在 MALDI-TOF MS 分析过程中直接影响到样品的分析效果. 实验考察了 3-HPA/DHC 作为基质分析寡核苷酸链时点样顺序的影响. 采用三种不同的样品制备顺序, 包括: (A)先点基质溶液, 晾干后点样品; (B)样品与基质混合后再点在样品靶上; (C)“sandwich 方法”: 先点基质溶液, 晾干后点样品, 再次晾干后再点一层基质. 图 1(b)及图 2 为用不同样品制备方法得到的 MALDI 质谱图. 结果表明先点基质, 再点样品的点样顺序(A)及 “sandwich”的方法(C)获得分析效果较好, 与基质样品预先混合的方法比较, 质谱图中钠、钾离子加合物峰的信号要明显降低. 与“sandwich”的方法比较, 先点基质再点样品的方法较方便, 而且分析效果并没有受到明显的影响, 所以在以后的实验中都采用了先点基质再点样品的样品制备顺序.

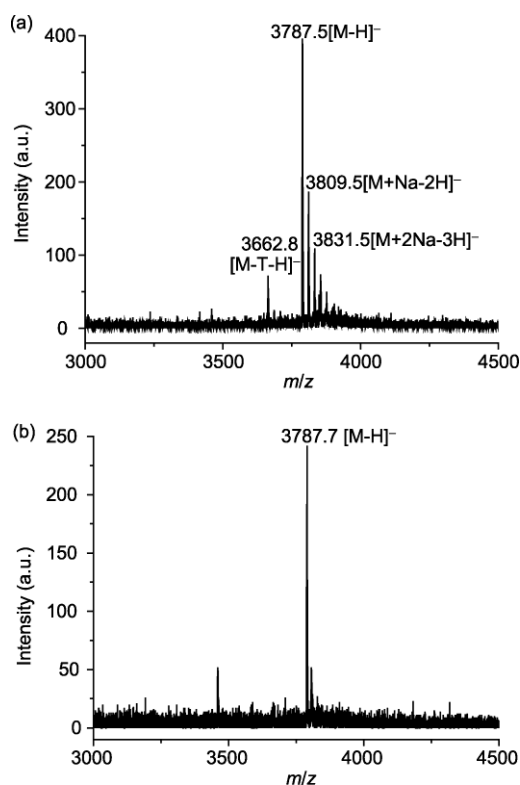


图 2 3-HPA/DHC 作为基质分析 G-四链体 Oxy12[5'-GGG-GTTTTGGGG-3']时不同点样顺序的影响, 上样量为 10 pmol, 激光能量为 80%左右. (a)样品与基质混合后点样; (b) 三明治方法: 先点基质, 晾干后点样品, 晾干后再点一层基质

### 3.1.3 3-HPA/DHC 作为基质分析寡核苷酸链 G-四链体及 PolyT 系列

MALDI-TOF MS 分析寡核苷酸链时, 基质对于不同序列的核酸分子具有选择性. 实验中考察了 3-HPA/DHC 作为基质, 对不同碱基组成的寡核苷酸链的分析效果, 特别是对于具有二级结构的 G-四链体核酸链的分析能力. 图 3(a)是不同长度 PolyT 系列核酸分子对应的质谱图, 图中没有明显的核酸分子断裂产生的碎片峰, 但钠、钾加合物离子峰较显著. 与 PolyT 系列核酸分子比较, G-四链体核酸链在分析过程较容易形成碎片离子峰. G-四链体较相似长度的 PolyT 分子, 获得质谱图信号响应较小, 而且随着寡核苷酸链长度的增加, 需要的激光能量也增高, 不可避免地引起寡核苷酸链的断裂, 从图 3(b)中可以看出, 在分析较长的寡核苷酸链 TT2T3 及 Hum21 时, 碎片峰要明显高于 Oxy12、Hum12, 从而降低了分析

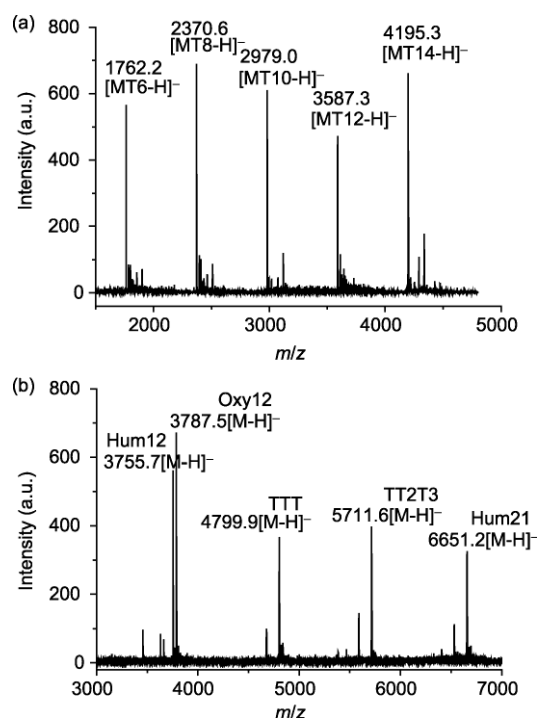


图 3 3-HPA/DHC 作为基质分析寡核苷酸链 PolyT 系列及 G-四链体, 上样量 10 pmol. (a) PolyT<sub>6</sub>[5'-TTT--TTT-3'], PolyT<sub>8</sub>[5'-TTTTTTTTT-3'], PolyT<sub>10</sub>[5'-TTTTTTTTTTTTT-3'], PolyT<sub>12</sub>[5'-TTTTTTTTTTTTTTT-3'], PolyT<sub>14</sub>[5'-TTTTTTTTTTTTTTT-3']; (b) Hum12[5'-(TTAGGG)<sub>2</sub>-3'], Oxy12[5'-GGGGTTTTGGGG-3'], TTT[5'-G<sub>3</sub>TG<sub>3</sub>TG<sub>3</sub>TG<sub>3</sub>-3'], TT2T3[5'-GGGTGGGTGGG-TTG-3'], Hum21[5'-GGG(TTAGGG)<sub>3</sub>-3']

的灵敏度. 另外 3-HPA 和 DHC 组成的混合基质分析 28merG-四链体结构寡核苷酸链 Oxy28, 没有得到很好的信号响应.

### 3.2 DABP 作为核酸分析基质的考察

#### 3.2.1 基质 DABP 与 DABP/DHC 分析寡核苷酸链效果比较

根据文献报道 15 mg/mL DABP (3,4-diaminobenzophenone) 溶于盐酸酸化的甲醇中(甲醇/12 M 盐酸 = 80:3, V/V) 分析 Poly T 系列及长度达到 23 mer 的寡核苷酸链具有较好的分析灵敏度<sup>[6]</sup>. 实验中考察 DABP 及混合基质 DABP/DHC 作为基质分析 G-四链体的可能性. 结果表明 DABP 及混合基质分析 PolyT6 能够获得较好的分析效果, 但是对于 G-四链体 Oxy12 的分析并没有获得质谱信号. 进一步考察 15 mg/mL DABP 与 100 mM DHC 等体积混合作为基质分析 PolyT6、G-四链体, 图 4(a)、(c) 表明用混合基质分析 PolyT6 可以获得较好的分析效果, 比较 DABP 单独作为基质及加入 100 mM DHC 组成的混合基质分析 PolyT6 的结果表明, 加入 DHC 后可以

显著地降低钠、钾加合物离子峰的信号. 但是将他们用于 G-四链体 Oxy12 分析, 依旧没有获得质谱信号. 文章中 2.1.1 部分的实验证明 3-HPA 或者 3-HPA/DHC 混合基质用作分析 PolyT6、G-四链体 Oxy12, 都得到了典型的 MALDI-TOF 质谱图. 以上结果说明基质对于不同序列组成或者结构差异的寡核苷酸链的分析存在选择性. 已有的研究结果表明单链 DNA 的离子化效率要高于双链 DNA 及具有复杂结构的 DNA 链<sup>[5]</sup>, 因此 G-四链体结构的寡核苷酸链分析难度要高于由多个胸腺嘧啶 T 组成的核酸链. 较低 pH 值有利于避免 G-四链体形成分子内氢键或者分子间的氢键, 从而提高 DNA 的离子化效率; 同时较低的 pH 值可以酸化 DNA 磷酸骨架, 避免多电荷离子的形成. 3-HPA 的饱和溶液 pH 小于 3, 酸性较强, 在分析过程中可以减少富含 G 的 DNA 序列分子内/间氢键的形成, 提高离子化效率. DABP 的结构中缺少羧基或环上羟基, 其自身的酸性较低, 虽然在样品配置过程中酸化可以提高其分析能力, 但是在实验中发现 DABP 仍然不能作为一种有效分析 G-四链体的基质, 导致这种实验现象的原因尚不清楚. 另外, 当 DABP

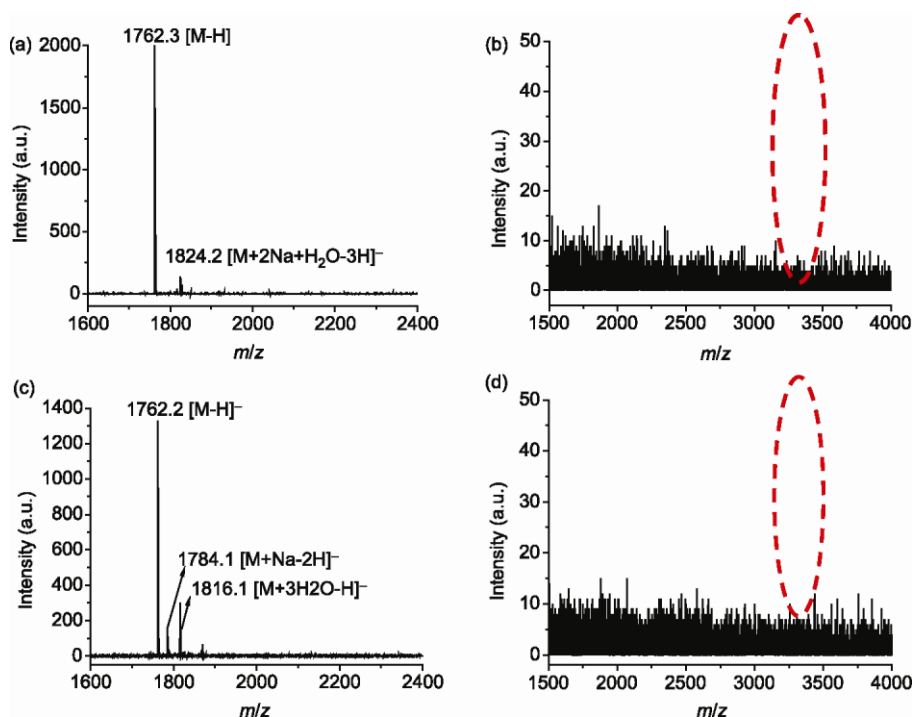


图 4 DABP/DHC、DABP 作为基质分析 5 pmol 寡核苷酸链 PolyT6[5'-TTTTTT-3'] (图 5(a)与(c)) 和 Oxy12[5'-GGGG-TTTTGGGG-3'] (图 5(b)与(d)), 激光能量为 60%

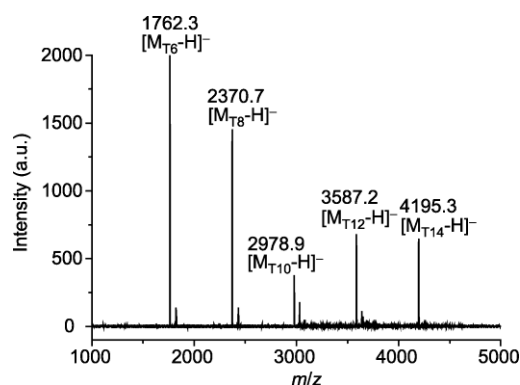


图 5 3-HPA/DHC 作为基质分析寡核苷酸链 PolyT<sub>6</sub>, PolyT<sub>8</sub>, PolyT<sub>10</sub>, PolyT<sub>12</sub>, PolyT<sub>14</sub> 的质谱图, 上样量为 5 pmol.

作为基质分析 PolyT 系列寡核苷酸链时, 由于富含胸腺嘧啶 T 的寡核苷酸链碱度较弱, DABP 自身在较低能量下就可激发(337 nm 摩尔吸光系数高, 熔点低), 从而减少了核苷酸的断裂, 所以采用 DABP 分析 PolyT 时能够获得较好的分析效果.

### 3.2.2 样品制备方法及 PH 值对分析效果的影响

DABP/DHC 混合基质对于 PolyT 系列寡核苷酸链具有较好的分析效果, 但是不能有效地分析具有 G-四联体/四链体结构的核酸分子. 为了进一步优化该混合基质分析寡核苷酸链的条件, 实验中考察了样品制备方法及基质酸碱度对分析效果的影响. 采用与 3.1.2 相同的三种样品制备顺序. 分析 PolyT<sub>6</sub> 和 Oxy12 发现样品制备方法的改变并没有提高 DABP/DHC 混合基质对 G-四链体的分析能力, 用三种不同的点样顺序都没有获得 Oxy12 的质谱图. 改变基质溶液的 PH 值, 分别采用甲醇、盐酸酸化或者氨水碱化的甲醇作为基质 DABP 的溶剂, 考察质谱图的变化. DABP/DHC 分析 G-四链体 Oxy12、Hum21、TT2T3, 都没有采集到相应的质谱图. 结果表明即使在降低基质 PH 值的条件下, 可能一定程度上减少了寡核苷酸链分子内/间氢键的形成, 但是并没有有效提高离子化效率, 混合基质 DABP/DHC 依然无法作为分析 G-四链体的有效基质, 却可以很好地分析 PolyT 系列的单链 DNA.

### 3.2.3 DABP/DHC 作为基质分析寡核苷酸链 PolyT 系列及 G-四链体

15 mg/mL DABP 与 100 mM DHC 按照 2:1 的比例混合后作为基质分析不同长度的 PolyT 系列核酸分子, 如图所示. 但是用该种混合基质进行 G-四链

体的分析, 例如 Oxy12、Hum12、TTT、TT2T3、Hum21, 都没有获得质谱信号. 与 3-HPA/DHC 混合基质比较, DABP/DHC 对不同长度的 PolyT 具有更好的分析效果, 质谱图中钠、钾加合物离子峰强度明显减弱, 分析过程中可获得较高的信号响应. DABP 用作基质时所需要的激光能量(40%左右)要明显低于 3-HPA(80%左右), 所以由于激光能量引起的寡核苷酸链断裂效应减弱, 利于提高分析的灵敏度. 虽然 DABP/DHC 作为基质分析 PolyT 系列寡核苷酸链具有很多优势, 但是其并不能作为 G-四链体的分析基质. 不同碱基组成的寡核苷酸链以及结构的差别会影响到基质与样品分子形成共结晶, 也会影响到基质辅助解析形成离子的过程, 这些因素都会影响到 DABP/DHC 作为基质分析 G-四链体的效果, 使得该种基质不能有效分析 G-四链体. 以上的实验结果表明, DABP 分析单链 DNA 时具有选择性. 但是混合基质 3-HPA/DHC 并没有表现出对 DNA 结构的选择性, 是一种通用性较好的基质.

### 3.3 3-HPA/DHC 混合基质分析不同序列 G-四链体灵敏度及仪器分辨率的考察

对于不同长度及序列组成的寡核苷酸链, MALDI-TOF MS 的分析能力存在差别, 所以本研究进一步考察 3-HPA/DHC 作为基质分析 G-四链体, MALDI-TOF MS 的检出浓度. 按照 10 pmol、1 pmol、100 fmol、50 fmol、10 fmol 的顺序逐级稀释寡核苷酸溶液. 不同长度及组成的 G-四链体在 MALDI-TOF/MS 分析过程具有不同的分析灵敏度. 长度较短的寡核苷酸链, 例如 Oxy12、Hum12 在 50 fmol 依然可以获得较好的质谱信号. 随着寡核苷酸链长度的增加, 质谱信号降低, 例如 Hum21、TTT、TT2T3 需要 1 pmol 才能获得相应的 MALDI 谱图.

MALDI-TOF MS 的分辨率是指仪器能够区别质量数相近的两种物质的能力. 实验中考察了存在单碱基差别的 3 条 22 mer 的寡核苷酸链, 如图 6 所示. 分子量相差 16 Da 的两条寡核苷酸序列 22mer-0 和 22mer-1 存在单碱基差别[G→A], 图 6 可以看出这样的单碱基差别在 MALDI 质谱图中可以区别开. 分子量相差 40 Da 的两条寡核苷酸链 22mer-0 和 22mer-2 在 MALDI 谱图中也分别以独立的质谱峰出现. 该实验结果表明 3-HPA/DHC 作为基质分析寡核苷酸链时, 可以区别质量数相差 16 Da 的 22 mer 核酸分子.

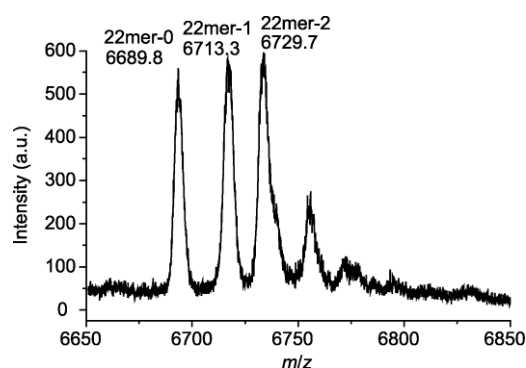


图6 3-HPA/DHC 作为基质分析寡核苷酸链 22mer-0、22mer-1、22mer-2 获得的质谱图, 寡核苷酸的上样量为 10 pmol.

## 4 结论

本文利用 MALDI-TOF MS 的方法分析了具有

G-四链体结构的寡核苷酸链, 考察了不同基质对检测结果的影响. 实验结果表明 3-HPA 与 DHC 组成的混合基质可以用来分析 G-四链体, 而对于 PolyT 系列寡核苷酸具有很好分析结果的 DABP 与 DHC 组成的混合基质并不能作为一种有效分析 G-四链体的基质. G-四链体的长度和序列组成的差别影响着分析灵敏度, 长度较短的 G-四链体更容易离子化, 在较低的浓度下 (fmol) 依旧能够获得较高的质谱信号. 利用 3-HPA/DHC 作为基质分析 22 mer 核酸分子, 可以区别分子量相差 16 Da 的两条寡核苷酸链. 本文为利用 MALDI-TOF MS 分析具有特殊结构的寡核苷酸分子的基质选择提供一定的参考价值, 为进一步利用 MALDI-TOF MS 手段研究 G-四链体的序列信息, 及其与小分子的相互作用提供了实验基础.

## 参考文献

- Currie GJ, Yates JR. Analysis of oligodeoxynucleotides by negative-ion matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*, 1993, 4: 955-963
- Wu KJ, Shaler TA, Becker CH. Time-of-flight mass spectrometry of underivatized single-stranded DNA oligomers by matrix-assisted laser desorption. *Anal Chem*, 1994, 66: 1637-1645
- Nordhoff E, Luebbert C, Thiele G, Heiser V, Lehrach H. Rapid determination of short DNA sequences by the use of MALDI-MS. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28: 86-91
- Sauer S, Lehrach H, Reinhardt R. MALDI mass spectrometry analysis of single nucleotide polymorphisms by photocleavage and charge-tagging. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31: 63-72
- Zhou LH, Deng HM, Deng QY, Zhao SK. 3,4-Diaminobenzophenone matrix for analysis of oligonucleotides by MALDI-TOF mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2004, 18: 787-794
- Fu Y, Xu SY, Pan CP, Ye ML, Zou HF, Guo BC. A matrix of 3,4-diaminobenzophenone for the analysis of oligonucleotides by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34: 94-100
- Blackburn EH. Structure and function of telomeres. *Nature*, 1991, 350: 569-573
- Reilly MO, Teichmann SA, Rhodes D. Telomerases. *Curr Opin Struct Biol*, 1999, 9: 56-65
- Patel DJ, Phan AT, Kuryavyi V. Structure of two intramolecular G-quadruplexes formed by natural human telomere sequences in K<sup>+</sup> solution. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35: 6517-6525
- Gehring K, Leroy J, Gue' ron M. A tetrameric DNA structure with protonated cytosine-cytosine base pairs. *Nature*, 1993, 363: 561-565
- Mergny JL, Riou JF. Natural and pharmacological regulation of telomerase. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30: 839-865
- Huppert JL, Balasubramanian S. Prevalence of quadruplexes in the human genome. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33: 2908-2916
- Huppert JL. Four-stranded nucleic acids: Structure, function and targeting of G-quadruplexes. *Chem Soc Rev*, 2008, 37: 1375-1384
- Su DGT, Fang HF, Gross ML, Taylor JSA. Photocrosslinking of human telomeric G-quadruplex loops by anti cyclobutane thymine dimer formation. *Proc Natl Acad Sci*, 2009, 31: 12861-12866
- Kong DM, Ma YE, Guo JH, Yang W, Shen HX. Fluorescent sensor for monitoring structural changes of g-quadruplexes and detection of potassium ion. *Anal Chem*, 2009, 81: 2678-2684
- Neidle S, Parkinson GH. Telomere maintenance as a target for anticancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discovery*, 2002, 1: 383-393
- Oganesian L, Bryan TM. Physiological relevance of telomeric G-quadruplex formation: A potential drug target. *Bioessays*, 2007, 29: 155-165
- Schaffitzel C, Berer I, Postberg J, Hanes J, Lipps HJ, Plückthun A. *In vitro* generated antibodies specific for telomeric guanine-quadruplex DNA react with Stylonychia lemnae macronuclei. *Proc Natl Acad Sci*, 2001, 98: 8572-8577

- 19 Front M Fry. Tetraplex DNA and its interacting proteins. *Biosci*, 2007, 12: 4336–4351
- 20 Isalan M, Patel SD, Balasubramanian S, Choo Y. Selection of zinc fingers that bind single-stranded telomeric DNA in the G-quadruplex conformation. *Biochemistry*, 2001, 40: 830–836
- 21 Campbell NH, Parkinson GN. Crystallographic studies of quadruplex nucleic acids. *Methods*, 2007, 43: 252–263
- 22 Da Silva MW. NMR methods for studying quadruplex nucleic acids. *Methods*, 2007, 43: 264–268
- 23 Hazel P, Huppert J, Balasubramanian S, Neidle S. Loop-length-dependent folding of G-quadruplexes. *J Am Chem Soc*, 2004, 126: 16405–16415
- 24 Paramasivan S, Rujan I, Bolton PH. Circular dichroism of quadruplex DNAs: Applications to structure, cation effects and ligand binding. *Methods*, 2007, 43: 324–331
- 25 Simonsson T, Sjoback R. DNA Tetraplex formation studied with fluorescence resonance energy transfer. *J Biol Chem*, 1999, 274: 17379–17383

## Analysis of G-quadruplexes by matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry

SONG YuLing, LU MeiLing & WANG HaiLin

State Key Laboratory of Environmental Chemistry and Eco-toxicology; Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

**Abstract:** A matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) method was developed for analysis of G-quadruplexes. Various matrixes and their combination including 3-hydroxypicolinic acid (3-HPA), 3,4-diaminobenzophenone (DABP), and diammonium hydrogen citrate (DHC) had been studied. The combination of DABP and DHC can improve the quality of MALDI-TOF MS analysis of PolyT, showing less fragmentation and alkali metal ion adduct. However, this combination cannot generate MS signal of G-quadruplexes. In comparison, the combination of 3-HPA and DHC can be applied for MALDI-TOF analysis of G-quadruplexes, with the low limit of detection of 10 fmol.

**Keyword:** MALDI-TOF/MS, G-quadruplexes, 3-hydroxypicolinic acid (3-HPA), 3,4-diaminobenzophenone (DABP), diammonium hydrogen citrate (DHC), selectivity of matrixes