Archive of SID

زیست‌فناوری دانشگاه تربیت مدرس
دورهٔ 4، شمارهٔ 1، بهار و تابستان 1392

بررسی DNA چهاررشته‌ای تشکیل‌دهنده دزوکسی‌ریبوزایم شبه‌پراکسیدازی با روش‌های طیف‌سنجی

زهرا کرمی[1]، بیژن رنجبر[2*]، ارسطو بدویی دلفارد[3]

1- دانشجوی دکتری بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
2- استاد گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
3- استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

*کدپستی 175-14115، تهران، ایران
ranjbarb@modares.ac.ir
(دریافت مقاله: 91/4/27، پذیرش: 91/6/20)

چکیده- بازهای نیتروژنی آلی تشکیل دهنده نوکلئوتیدها ویژگی‌هایی شبیه به فلورفورها را از خود نشان می‌دهند. با این حال اسیدهای‌هسته‌ای از نوع DNA، خاصیت فلورسانسی بسیار ضعیفی دارند. از این رو شناسایی لیگاندهای متصل‌شونده به DNA که در حالت ازاد؛ فاقد نشر فلورسانس هستند و تنها بر اثر اتصال به مولکول‌های DNA نشر فلورسانس می‌یابند، بسیار کاربردی است. در این مقاله اثر یون‌های فلزی سدیم و پتاسیم بر القای ساختار چهاررشته‌ای در الیگومری با نام PS2.M (GTG3TAG3CG3T2G2) بررسی شده است. برهمکنش DNA چهار رشته‌ای با مولکول Hemin، موجب تشکیل دزوکسی‌ریبوزایمی با فعالیت پراکسیدازی می‌شود. طیف‌سنجی نور مرئی-فرابنفش، فعالیت پراکسیدازی الیگومر PS2.M را نشان داد، همچنین تشکیل ساختار چهاررشته‌ای DNA به‌وجودآمده از این الیگومر با استفاده از طیف‌سنجی دورنگ‌نمایی دورانی،بررسی شد. در ادامه نتایج حاصل از فلورسانس ذاتی چهاررشته‌ای تشکیل‌دهنده دزوکسی‌ریبوزایم شبه-پراکسیدازی ، افزایش شدت فلورسانس DNA در حالت چهاررشته‌ای را در مقایسه با حالت تک‌رشته‌ای نشان داد. افزون بر این، رنگ نامتقارن سیانینی (سایبرگُلد) به‌عنوان کاوشگر برای بررسی فلورسانس خارجی DNA چهاررشته‌ای مورد استفاده قرار گرفت. این کاوشگر تمایز بالایی بین DNA تک‌رشته و چهاررشته‌ای نشان داد.

واژگان کلیدی: چهاررشته‌ای، فلورفور، سایبرگُلد، فعالیت پراکسیدازی،دورنگ‌نمایی دورانی

www.SID.ir

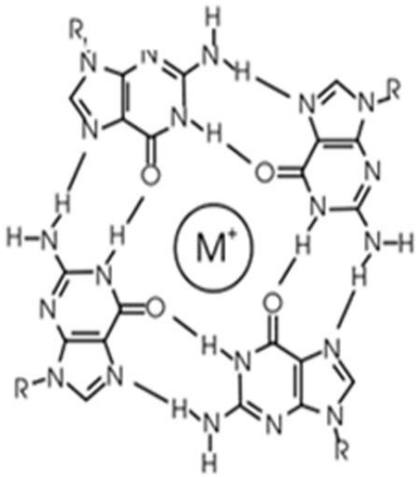
Archive of SID

1- مقدمه

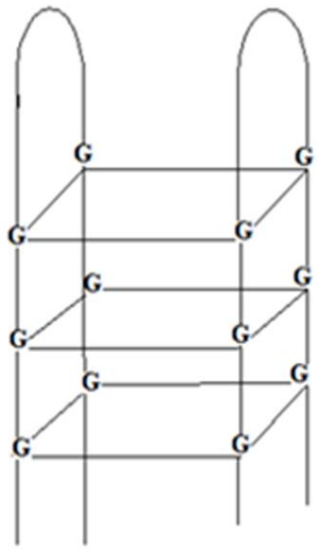
ساختار DNA ژنومی در ارگانیسم‌های زنده، مارپیچ دورشته‌ای است. با این حال DNA می‌تواند شکل‌های ساختاری دیگری هم داشته باشد. یکی از این ساختارها، توالی‌های اسیدهای هسته‌ای سرشار از گوانین است که توانایی تشکیل ساختارهای چهاررشته‌ای را دارند [1]. در این ساختارها، توالی‌های سرشار از گوانین، تشکیل صفحات مربع مانندی را می‌دهند که بازهای گوانین در آن‌ها با پیوندهای هیدروژنی از نوع هاگستینی[1] به هم پیوند و به‌وسیله‌ی برخی کاتیون‌ها پایدار می‌شوند (شکل 1) [2]. این ساختارها در شکل‌های کروموزومی مهمی مانند تلومرها و پروموتر ژن‌ها یافت می‌شوند و نقش‌های کارکردی مهمی در فرایندهای زیستی دارند و در نانوتکنولوژی و پزشکی استفاده فراوان می‌شوند [3]. کشف برخی ساختارهای چهاررشته‌ای-هِمین[2] که فعالیت پراکسیدازی دارند، گام مهمی در بررسی این ساختارها به شمار می‌رود. تنها تعداد بسیار کمی از چهاررشته‌ای‌ها در حضور هِمین فعالیت شبه‌پراکسیدازی نشان می‌دهند [4].

PS2.M یک توالی 18تایی الیگونوکلئوتیدی سرشار از گوانین است که تمایل به تشکیل ساختار چهاررشته‌ای دارد و می‌تواند با اتصال به هِمین، فعالیت پراکسیدازی را در حضور پراکسیدهیدروژن و سوبسترای کروموژنیک ABTS (2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid) نشان دهد (شکل 2) [5]. در حقیقت این ساختار پیچیده یک دزوکسی‌ریبوزایم[3] (DNAzyme) با فعالیت شبه-پراکسیدازی است [6]. تاکنون ویژگی‌های ساختاری مختلفی از این دزوکسی‌ریبوزایم بررسی‌شده‌است [6-9]؛ با این وجود هیچ گزارشی در مورد فلورسانس ذاتی و خارجی چهاررشته‌ای تشکیل‌دهنده این ساختار وجود ندارد.

(الف)



(ب)

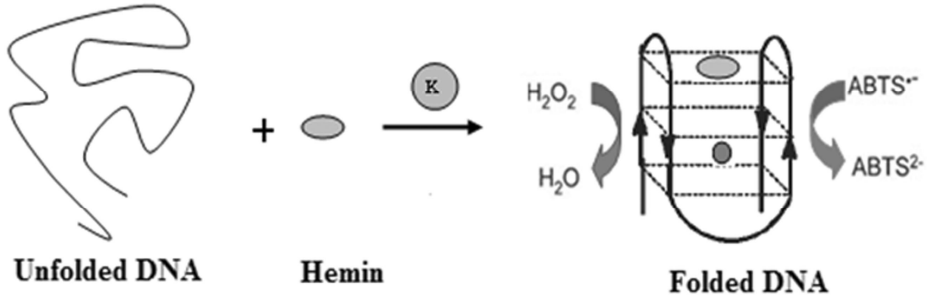


شکل 1 الف- ساختار یک صفحه تترادی که شامل پیوندهای هیدروژنی از نوع هاگستینی است [2]. ب- ساختار شماتیک یک چهاررشته‌ای.

1 Hoogsteen-type
2 Hemin(Fe (III) protoporphyrin IX)
3 Deoxyribozyme

www.SID.ir

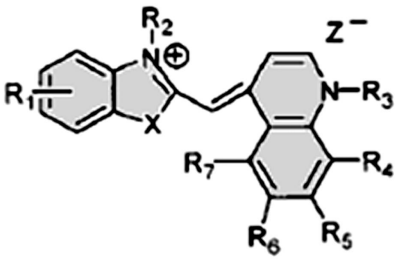
Archive of SID



شکل 2 عملکرد دزوکسی‌ریبوزایم شبه پراکسیدازی از طریق اکسیداسیون پراکسیدهیدروژن به‌واسطه سوبسترای کروموژنیک ABTS.

طیف‌سنجی فلورسانس برای بررسی جنبه‌های ساختاری چهاررشته‌ای‌ها [10-13] و همچنین برهم‌کنش آن‌ها با نشانگرهای مختلف استفاده می‌شود؛ به همین دلیل میزان و کیفیت نشر برچسب‌های[1] فلورسنت بررسی می‌شود [14-16]. مولکول‌های DNA که بازهای نیتروژن‌دار دارند به‌نظر ویژگی فلوروفوری[2] نشان می‌دهند اما در واقع آن‌ها یا ویژگی فلورسانس ندارند و یا نشر فلورسانس بسیار ضعیفی نشان می‌دهند [17]. دلیل اصلی نشر پایین فلورسانس در مولکول‌های DNA تک‌رشته و یا دورشته، دقیق مشخص نشده است [18]. با این حال، مولکول‌های DNA سرشار از گوانین، نشر فلورسانس بالاتری در مقایسه با سایر توالی‌هایی بدون گوانین نشان می‌دهند، هرچند که مقدار فلورسانس نشرشده پایین است [19]. از آن‌جا که نشر ذاتی DNA بسیار ضعیف گزارش شده است، برچسب‌های فلورسانس خارجی برای تشخیص آن استفاده می‌شود [20].

در سال‌های نزدیک، پیشرفت‌بسیاری در تولید رنگ‌های ویژه متصل‌شونده به DNA رخ داده است که از آن‌ها می‌توان به رنگ‌های سیانینی اشاره کرد [21-23]. رنگ‌های سیانینی به داشتن فلورسانت ذاتی پایین معروف هستند و بر اثر اتصال به مولکول‌های DNA تک‌رشته و دورشته، افزایش فلورسانس خارجی در آن‌ها دیده می‌شود [24]. رنگ سایبر از خانواده رنگ‌های سیانینی هستند (شکل 3). داده‌های کمی در مقالات علمی در مورد ساختار رنگ‌های سایبر شامل سایبرگرین I[3]، سایبرگرین II[4]، پیکوگرین[5] و سایبرگُلد[6]، منتشر شده است [24-26].



شکل 3 ساختار نامتقارن رنگ سیانینی. در مورد سایبرگلد، X می‌تواند اکسیژن یا گوگرد باشد. استخلاف‌های متعدد و مختلفی می‌تواند روی حلقه‌های مزدوج وجود داشته باشد (Ri). یون مخالف Z (counterion) می‌تواند کلراید، یدید، پرکلراید و یا سولفونات‌های مختلف باشد.

1 Lable
2 Fluorophore

3 SYBR Green I
4 SYBR Green II
5 Pico Green
6 SYBR Gold

www.SID.ir

Archive of SID

بیشتر بررسی‌هایی که تاکنون روی این رنگ‌ها انجام شده است در زمینه‌ی کاربرد آن‌ها در رنگ‌آمیزی ژل الکتروفورز DNA تک‌رشته و دورشته‌ای است [27-32]. با این حال، تاکنون گزارشی در مورد اندازه‌گیری فلورسانس خارجی چهاررشته‌ای‌ها (به‌ویژه چهاررشته‌ای تشکیل‌دهنده دزوکسی‌ریبوزایم شبه-پراکسیدازی) و شناسایی آن‌ها از سایر ساختارهای معمول DNA با استفاده از رنگ‌های سایبر داده نشده است. از این رو در این مقاله پس از بررسی اثر یون‌های فلزی در القای ساختار چهاررشته‌ای در توالی PS2.M، بر هم‌کنش آن با هِمین برای تشکیل دزوکسی‌ریبوزایم با فعالیت شبه-پراکسیدازی بررسی و روش دورنگ‌نمایی دورانی برای تعیین ساختار PS2.M به‌کار برده شد. سپس فلورسانس ذاتی این ساختار چهاررشته‌ای بررسی و با فلورسانس ذاتی همان توالی از DNA در حالت تک‌رشته مقایسه شد. به این‌ترتیب سایبر گُلد به‌عنوان یک نشانگر برای بررسی ساختار چهاررشته‌ای آزموده شد. بر اساس دانسته‌های ما، برهم‌کنش سایبر گُلد و DNA چهاررشته‌ای با طیف‌سنجی دورنگ‌نمایی دورانی و فلورسانس، تاکنون گزارش نشده است.

2- مواد و روش‌ها

2-1- الیگونوکلئوتید

الیگونوکلئوتید سرشاراز گوانین با توالی (GTGGGTAGGGCGGGTTGG) با درجه خلوص بالا به‌وسیله‌ی شرکت سیگما ساخته شد. غلظت تک‌رشته‌های الیگونوکلئوتیدی با خوانش جذب در طول موج 260 نانومتر به‌دست آمده و برای تهیه محلول‌ها استفاده شد. محلول نخست الیگونوکلئوتیدها در آب مقطر استریل تهیه شد و پیش از هر بار استفاده، برای رسیدن به غلظت موردنظر رقیق شد.

2-2- مواد

مواد استفاده شده:

H_2O_2 (Hydrogen peroxide) 30% (w/v), ABTS, Triton X-l00, HEPES(4-(2-hy-droxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid sodium salt), NaCl, KCl, DMSO, Hemin

با درجه خلوص بالا از شرکت سیگما تهیه شد.

محلول نخست هِمین در دی‌متیل‌سولفوکساید 2 درصد، تهیه و در 20- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و پیش از هر بار استفاده با بافر موردنظر به حجم و غلظت موردنیاز رسانده شد. رنگ فلورسانس سایبر گُلد از کمپانی Molecular Probes (Eugene, OR, USA) خریداری شد.

2-3- روش‌ها

طیف‌سنجی مرئی- فرابنفش (UV-vis) با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر V S-2100 (Scinco, Korea) و بررسی‌های طیف‌سنجی دورنگ‌نمایی دورانی با استفاده از دستگاه اسپکتروپلاریمتر J-715 (Jasco, Japan) انجام شد. اندازه‌گیری‌های فلورسانس نیز با دستگاه اسپکتروفوتومتر LS-5S (PerkinElmer, Wellesley, MA) ثبت شد.

2-3-1- تشکیل DNA چهاررشته‌ایی

الیگومر DNA پیش از استفاده، 15 دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت و سپس به مدت 10 دقیقه در 88 درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. این کار برای جدا سازی همه ساختارهای بین رشته‌ای انجام شد. سپس DNA با بافر 50 میلی‌مولار HEPES با pH 7/4 که شامل نمک‌های 40 میلی‌مولار کلرید پتاسیم و 400 میلی‌مولار کلرید سدیم است، در حضور Triton X-100 و DMSO 2 درصد،

www.SID.ir

Archive of SID

تیمار شد و60 دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد تا الیگومر بتواند در این شرایط ساختار نهایی تاخورده خود را که همان DNA چهاررشته‌ای است به‌دست آورد [33].

2-3-2- تشکیل دزوکسی‌ریبوزایم

پس از شکل‌گیری ساختار چهاررشته‌ای، محلولی هم‌حجم و هم‌غلظت از هِمین در بافر HEPES به آن اضافه شد و برای 60 دقیقه، این محلول در دمای اتاق قرارگرفت تا محصول نهایی که همان دزوکسی‌ریبوزایم است به‌دست آید. برای اطمینان از شکل‌گیری، از طیف‌سنجی مرئی-فرابنفش استفاده شد [33].

2-3-3- اندازه‌گیری فعالیت پراکسیدازی

فعالیت پراکسیدازی DNA چهاررشته‌ای در حضور هِمین بر پایه‌ی روش‌های پیشین گزارش شده، آزموده شد [34]. رنگ‌سنجی[1] در دمای اتاق و در محلول شناسایی که شامل بافر HEPES و اجزای تشکیل‌دهنده آن بود، با طیف‌سنجی مرئی-فرابنفش انجام شد. به‌طور کوتاه شده، 490 میکرولیتر محلول 6 میلی‌مولار ABTS به 5 میکرولیتر محلول 60 میکرومولار پراکسید هیدروژن افزوده شد. واکنش با افزودن 5 میکرولیتر از دزوکسی‌ریبوزایم و یا هِمین، بسیار سریع آغاز شد. افزایش جذب در طول موج 421 نانومتر که نشان‌دهنده ظهور رادیکال ABTS است، با خوانش جذب در دامنه طول موجی 390 تا 500 نانومتر دنبال شد.

2-3-4- اندازه‌گیری دورنگ‌نمایی دورانی

محلول الیگونوکلئوتیدی در بافر HEPES با pH 7/4 با کمینه غلظت 100 میکرومولار آماده شد. برای اطمینان از تشکیل ساختار DNA چهاررشته‌ایی، نخست محلول الیگونوکلئوتیدی 12 دقیقه در 88 درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. سپس به آرامی و در دمای اتاق خنک شد و سرانجام در بافر دارای کاتیون‌های سدیم و پتاسیم، 24 ساعت انکوبه شد. طیف‌های دورنگ‌نمایی دورانی در بازه طول موجی 200 تا 320 نانومتر و در کووتی با ضخامت 1 میلی‌متر ثبت شد. پارامترهای مؤثر در دورنگ‌نمایی دورانی، سرعت 100 نانومتر بر دقیقه، رزولوشن 1 نانومتر، زمان پاسخ 1 ثانیه، پهنای باند 1 نانومتر و حساسیت 200 میلی‌درجه تنظیم شدند. سرانجام برای تفسیر نهایی، طیف بافر از طیف نمونه‌ها کم شد [35،36].

2-3-5- اندازه‌گیری فلورسانس

برای اندازه‌گیری فلورسانس ذاتی 8 میکرو گرم/میلی‌لیتر DNA تک‌رشته‌ای در آب مقطر و نیز 8 میکرو گرم/میلی‌لیتر DNA چهاررشته‌ای در 50 میلی‌مولار بافر HEPES با pH 7/4 استفاده شد. نمونه‌های تک‌رشته و چهاررشته‌ایی DNA هر دو در طول موج 240 نانومتر تهییج شدند. طیف‌نشری ایجاد شده در بازه طول موجی 550 تا 700 نانومتر جمع‌آوری شد. برای سنجش فلورسانس خارجی طیف تهییجی و طیف‌نشری سایبر گُلد پس از دمادهی 15 دقیقه‌ای این رنگ با 8 میکروگرم/میلی‌لیتر برای هر دو شکل DNA جمع‌آوری شد. طول موج تهییجی این رنگ، 495 نانومتر و طول موج نشری آن، 537 نانومتر است.

3- نتایج و بحث

3-1- طیف‌سنجی مرئی-فرابنفش: شناسایی برهم‌کنش DNA چهاررشته‌ای- هِمین

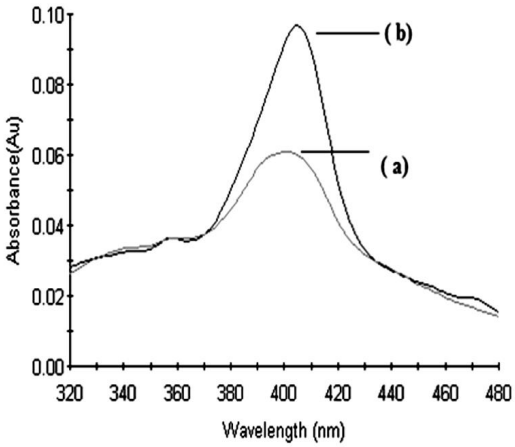
الیگونوکلئوتیدهای محدودی گزارش شده است که توانایی اتصال به مولکول‌های پورفیرین را دارند؛ این الیگونوکلئوتیدها از روش *In Vitro* Selection شناسایی

1 Colorimetry

www.SID.ir

Archive of SID

می‌شوند [38،37]. از میان این آپتامرهای الیگونوکلئوتیدی، الیگومری با نام PS2.M که نشان داده شده است افزون بر اتصال به پورفیرین‌ها، فعالیت پراکسیدازی دارد، برای تشکیل DNAzyme شبه پراکسیدازی به‌عنوان آپتامر متصل‌شونده به پورفیرین، انتخاب شد. شکل 4، طیف جذبی هِمین را پیش و پس از دمادهی با PS2.M نشان می‌دهد؛ همان‌گونه که دیده می‌شود، هِمین در حالت آزاد و غیرمتصل، یک باند جذبی در ناحیه Soret در طول موج 396 نانومتر نشان می‌دهد [شکل 4a]. بر اثر انکوبه شدن هِمین با PS2.M، افزایش چشم‌گیری در میزان جذب در ناحیه باند Soret دیده می‌شود [شکل 4b]. همچنین مرکز جذب، مقدار کمی جابه‌جایی به سمت طول موج بالاتر، از طول موج 396 به 404 نانومتر نشان می‌دهد. این ویژگی نمایانگر ماهیت هیدروفوب محل اتصال به هِمین است؛ از این ویژگی می‌توان برای بررسی برهم‌کنش PS2.M و هِمین استفاده کرد [38].



شکل 4 طیف جذبی مرئی- فرابنفش برهمکنش بین Hemin-DNA در بافر HEPES با pH 7/4 (a؛ 0/5 میکرومولار Hemin؛ b) انکوباسیون Hemin با 0/5 میکرومولار PS2.M.

3-2- سنجش فعالیت پراکسیدازی

توانایی DNA چهاررشته‌ای برای افزایش فعالیت پراکسیدازی هِمین با استفاده از سامانه $ABTS-H_2O_2$ بررسی شد. برای اثبات فعالیت DNAzyme ایجاد شده از PS2.M، کارکرد کاتالیتیک آن با هِمین به‌عنوان کنترل، مقایسه و ثبت شد.

Hemin (Ferric Protoporphyrin IX Chloride) جزء خانواده پروتوپورفیرین‌های آهن‌دار است [4-6]. پورفیرین‌ها به‌عنوان کوفاکتور در جابه‌جایی، انتقال الکترون و در انواع واکنش‌های اکسایش و کاهش در پراکسیدازها، کاتالازها، مونواکسیژنازها، هموگلوبین، پروتئین‌های فتوسنتزی، سیتوکروم‌ها و ... مورد استفاده قرار می‌گیرند [5-7].

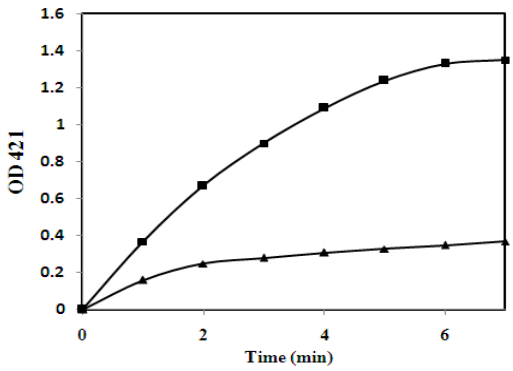
بررسی‌های EPR نشان داده است که پروتئین‌های دارای هِم و هِمین می‌توانند به تنهایی با پروکسیدهای آلی واکنش داده و در اثر شکستن پیوند O-O، مخلوطی از رادیکال‌های آزاد آلی تولید کنند که باعث تولید گونه‌های ferryl [Fe(IV)]-oxo می‌شود. این مورد مشابه سازوکار پراکسیدازی کلاسیک است [38، 39].

اکسیداسیون پراکسید هیدروژن که با واسطه ABTS انجام می‌شود، رادیکال‌های آزاد $ABTS^+$ را تولید می‌کند که ایجاد این رادیکال‌ها، اساس سنجش فعالیت پراکسیدازی است؛ زیرا رادیکال آزاد ABTS که محصول واکنش اکسیداسیون است، در طول موج 421 نانومتر جذب دارد [37-39]. همان‌گونه که در شکل 5 نشان داده شده است، فعالیت ذاتی هِمین به تنهایی بسیار پایین است و هیچ محصول واکنشی بعد از گذشت زمان دیده نمی‌شود (شکل 5▲). با این وجود در حضور PS2.M، شدت سیگنال جذب کمینه 4 برابر افزایش می‌یابد (شکل 5■). این نتایج نشان می‌دهد که حضور ساختار DNA چهاررشته‌ای PS2.M برای افزایش فعالیت پراکسیدازی هِمین ضروری است.

www.SID.ir

Archive of SID

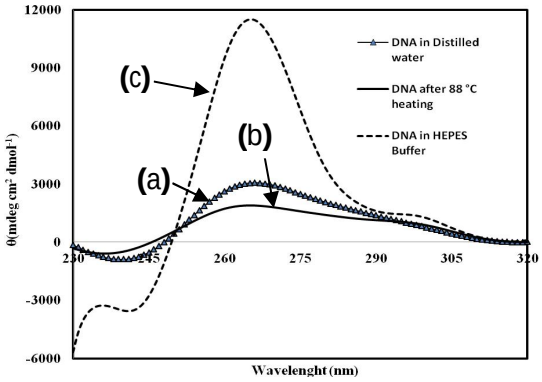
هرچه هیدروفوبیسیتی محیط دربردارنده هِمین افزایش یابد، به همان میزان فعالیت پراکسیدازی آن افزایش پیدا خواهد کرد [38]. بنابراین به‌نظر می‌رسد DNA چهاررشته‌ای PS2.M توانسته است محیط مناسبی برای افزایش فعالیت پراکسیدازی فراهم کند. درصد بالا، ترتیب و چگونگی قرارگیری گوانین‌ها در توالی PS2.M برای اتصال به هِمین و فعالیت گروه پروستتیک هِم در مولکول هِمین ضروری است [39]. افزون بر این، بررسی Low-temperature electron paramagnetic DNA resonance spectroscopic چهاررشته‌ای–هِمین نشان می‌دهد که کئوردینانس پنجم و ششم آهن با گوانین ایجاد می‌شود که باعث دور شدن آب و افزایش ویژگی هیدروفوبیسیتی می‌شود [38، 39]. با توجه به‌وجود آهن در ترکیب هِمین، بررسی‌های ویژه روی سازوکار پراکسیدازی باید با روش EPR انجام شود. همچنین زمانی می‌توان دقیق درباره‌ی سازوکار اثر DNA چهاررشته‌ای بر هِمین صحبت کرد که مطالعات Molecular Dynamic و Docking روی این ساختار انجام شود ولی ساختار DNA چهاررشته‌ای PS2.M با روش‌های کریستالوگرافی و NMR تعیین نشده است.



شکل 5 مقایسه فعالیت پراکسیدازی DNAzyme و Hemin در بافر HEPES با pH 7/4 در حضور کروموژن ABTS در طول موج 421 نانومتر: 0/25 میکرومولار Hemin (▲)، 0/25 میکرومولار DNAzyme (■).

3-3- اندازه‌گیری دورنگ‌نمایی دورانی

برای درک ساختار فضایی[1] الیگومر PS2.M در شرایط درون بافر HEPES و آب مقطر استریل، طیف‌های دورنگ‌نمایی دورانی ثبت شد. الیگونوکلئوتید موجود در آب مقطر، پس از 15 دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، پیک بسیار ضعیفی در طول موج 265 نانومتر نشان داد (شکل 6a). ساختار تانخورده یا تک‌رشته‌ای PS2.M که بر اثر حرارت به‌مدت 10 دقیقه در دمای 88 درجه سانتی‌گراد ایجاد شده بود، هیچ‌گونه پیک ساختاری از خود نشان نداد (شکل 6b). در مقابل، الیگونوکلئوتید PS2.M که 24 ساعت در بافر HEPES در حضور کاتیون‌های سدیم و پتاسیم انکوبه شده بود، ساختار متفاوتی پذیرفت و پیک‌های طیف دورنگ‌نمایی دورانی شناخته‌شده DNAهای چهار رشته‌ای را نشان داد (شکل 6c).



شکل 6 طیف دورنگ‌نمایی دورانی PS2.M در حضور آب مقطر استریل (a)، بعد از حرارت 88 درجه سانتی‌گراد (b)، در بافر HEPES با pH 7/4 واجد کاتیون‌های سدیم (400میلی مولار) و پتاسیم (40 میلی مولار) (c). غلظت نمونه‌های مورد استفاده در دورنگ نمایی دورانی 100 میکرومولار است.

1 Conformation

www.SID.ir

Archive of SID

به‌گونه‌ای کلی، دورنگ‌نمایی دورانی، اختلاف جذب نور مسطح قطبیده چپ‌گرد و راست‌گرد را اندازه‌گیری می‌کند [35، 36]. کاربرد دورنگ‌نمایی دورانی، شواهدی برای تعیین وجود DNA چهاررشته‌ایی در ساختار نوکلئیک‌اسیدها فراهم می‌کند. همچنین این روش برای تعیین نوع آرایش رشته‌های چهاررشته‌ای‌های موازی و غیرموازی[1] به‌کار می‌رود. چهاررشته‌ای موازی، یک پیک مثبت در 265 نانومتر و یک پیک منفی در ناحیه 245 نانومتر نشان می‌دهد. در حالی که چهاررشته‌ای غیرموازی با یک پیک مثبت در 295 نانومتر و یک پیک منفی در ناحیه 265 نانومتر مشخص می‌شود [40]. افزون بر این طیف دورنگ‌نمایی دورانی می‌تواند بین شکل‌های DNA تک‌رشته‌ای و DNA چهاررشته‌ای تمایز نشان دهد [40]. بنابراین در این بررسی، از روش دورنگ‌نمایی دورانی به‌عنوان ابزاری سودمند برای تعیین وجود چهاررشته‌ای‌ها استفاده شد. نتایج دورنگ‌نمایی دورانی نشان داد که DNA حل‌شده در آب مقطر استریل، پیش از حرارت 88 درجه سانتی‌گراد، پیک بسیار ضعیفی با مقدار بیضی‌واری پایین نشان می‌دهد. علت این رویداد، ممکن است نبود محیط مناسب برای تشکیل ساختار چهاررشته‌ای باشد.

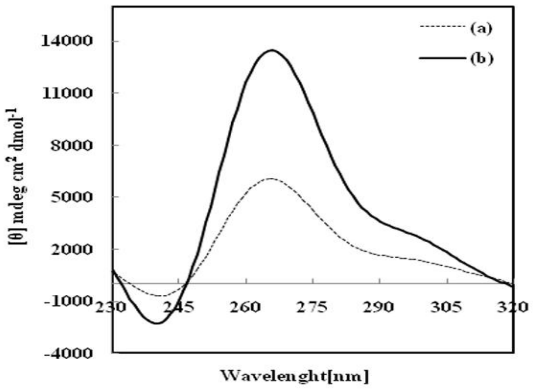
ازآنجاکه وجود بازهای گوانین چه از دیدگاه تعداد و چه از دیدگاه ترتیب و چگونگی قرارگیری در توالی، نقش مهمی در شکل‌گیری ساختار چهاررشته‌ای ایفا می‌کنند، می‌توان گفت به این خاطر شاخص بیضی‌واری پایین دیده شده است که تنها تعداد کمی از الیگومرها به درستی شکل گرفتند. در حقیقت به‌خاطر این که یون‌های کاتیونی نقش مهمی در شکل‌گیری و پایداری چهاررشته‌ای‌ها دارند و در محلول دارای آب مقطر استریل هیچ یونی وجود ندارد؛ یک ساختار چهاررشته‌ای ضعیف و ناپایدار از PS2.M دیده می‌شود (شکل 6a). بر اثر حرارت، به‌دلیل از بین رفتن بیشتر برهم‌کنش‌های مولکولی هیچ پیک ساختاری معنی‌داری دیده نمی‌شود (شکل 6b). همان‌گونه که دیده می‌شود، در حضور یون‌های سدیم و پتاسیم در بافر HEPES، مولکول PS2.M به شکل DNA چهاررشته‌ای تا می‌خورد. این کاتیون‌ها نقش چشم‌گیری در پایدارسازی ساختارهای DNA چهاررشته‌ای دارند؛ آن‌ها فضای حفره مرکزی ایجاد شده در اثر روی هم قرارگرفتن صفحات تترادی را اشغال می‌کنند و با ایجاد پیوند کئوردینانسی با اکسیژن شماره 6 گروه کربونیل هر گوانین در صفحات تترادی و به دنبال آن خنثی‌سازی دافعه الکتروستاتیک، این نقش را بر عهده دارند [41]. به همین خاطر است که PS2.M در بافر دارای کاتیون در مقایسه با آب، می‌تواند یک ساختار DNA چهاررشته‌ایی از نوع موازی و پایدار ایجاد کند که پیک شاخص مثبت 265 و منفی 240 نانومتر، نشان‌دهنده وجود آن است (شکل 6c). در واقع می‌توان گفت وجود کاتیون‌های یونی سدیم- پتاسیم در بافر، تعیین کننده آرایش رشته‌های DNA در چهاررشته‌ای PS2.M از دیدگاه موازی یا غیرموازی بودن است [42].

پس از انکوباسیون PS2.M با رنگ سایبرگُلد، تغییر چشم‌گیری در شدت پیک در طول موج 265 و 245 نانومتر دیده شد که نشان می‌دهد با افزودن رنگ سایبرگُلد، هر دو پیک DNA چهاررشته‌ایی تشکیل شده، 2/5 برابر در هر دو ناحیه 265 و 245 نانومتر کاهش یافتند (شکل 7). از آن‌جا که طیف دورنگ‌نمایی دورانی به میزان بالایی به استاکینگ هندسه بازها وابسته است، می‌توان پیشنهاد داد که رنگ سایبرگلد تاثیر زیادی بر پارامترهای ساختاری داشته و باعث تغییراتی در محتوای گوانینی ساختار چهاررشته‌ای شده است.

1 Parallel and Anti Parallel

www.SID.ir

Archive of SID



شکل 7 طیف دورنگ نمایی دورانی PS2.M در حضور (a) و غیاب (b) سایبرگُلد در 50 میلی‌مولار بافر HEPES با pH 7/4 واجد کاتیون‌های سدیم (400 میلی‌مولار) و پتاسیم (40 میلی‌مولار). غلظت نمونه‌های مورد استفاده در دورنگ‌نمایی دورانی 100 میکرومولار می‌باشد.

3-4- طیف‌سنجی فلورسانس

3-4-1- فلورسانس ذاتی

طیف فلورسانس DNA در حالت تک‌رشته در آب مقطر، در مقایسه با DNA چهاررشته‌ای شکل‌گرفته در بافر در طول موج تهییجی 336 نانومتر، شدت پایین‌تری (حدود 3 برابر) نشان داد (شکل 8A). با این وجود، تغییرات در شدت نشر برای DNA، چهاررشته‌ای زمانی که DNA در طول موج 240 نانومتر تهییج شد، چشم‌گیر بود (شکل 8B). همان‌گونه که در شکل 8B دیده می‌شود، سیگنال نشرشده DNA در بافر دارای سدیم و پتاسیم به گونه‌ای تقریبی، 250 برابر شدت نشر دیده شده در آب است. این نتایج باز هم تأییدی بر اهمیت حضور یون‌ها برای تاخوردن و شکل‌گیری الیگومر PS2.M به شکل DNA چهاررشته‌ای است. در واقع می‌توان گفت وجود DNA چهاررشته‌ای برای تولید شدت نشر فلورسانس بالاتر ضروری است. اختلاف میان شدت نشر فلورسانس ذاتی DNA در دو حالت تک‌رشته و چهاررشته‌ای، زمانی که هر دو در دو طول موج 336 و 240 نانومتر تهییج شدند، چشم‌گیر بود.

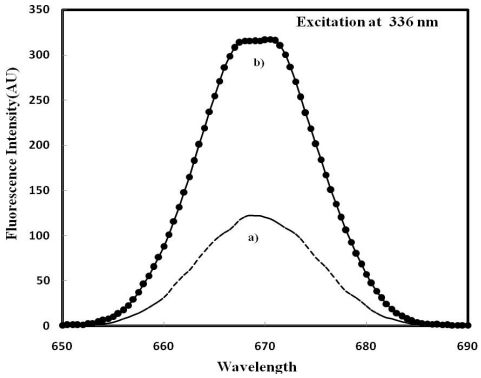
به‌نظر می‌رسد طول موج 240 نانومتر می‌تواند طول موج ویژه برای ساختار DNA چهاررشته‌ای PS2.M باشد. دلیل درست و قطعی برای افزایش فلورسانس ذاتی در الیگونوکلوتیدهای تشکیل‌دهنده چهاررشته‌ای‌ها به‌طور دقیق مشخص نشده است. این موضوع به کافی نبودن داده‌های علمی درباره‌ی سطوح برانگیختگی و ویژگی‌های الکترونیکی ماکرومولکول‌های پیچیده مانند DNA مربوط است [43]. بررسی‌های پیشین نیز فلورسانس ذاتی ضعیفی برای مولکول‌های DNA در حالت طبیعی دورشته‌ایی گزارش کرده است؛ البته برای افزایش شدت فلورسانس، روش‌هایی معرفی و استفاده شده است [44]. نتایج این بررسی، مانند دیگر نتایج گزارش‌شده تا امروز، نشان داد که DNA در حالت تک‌رشته (بدون ساختار) در مقایسه با DNA چهاررشته‌ای (دارای ساختار) کاهش فلورسانس ذاتی نشان می‌دهد. فلورسانس اسیدهای نوکلئیک، با ساختار الکترونیکی مولکول DNA مهاجرت و اتلاف انرژی تهییجی در ارتباط است [10]. از میان بازهای تشکیل‌دهنده مولکول DNA، باز آلی گوانین فلورسانس قوی‌تری نسبت به دیگر بازها دارد [11-13]؛ با این حال، تنها وجود باز آلی گوانین در توالی DNA نمی‌تواند موجب افزایش فلورسانس ذاتی شود. همان‌گونه که درباره‌ی DNA استفاده شده در این مقاله (PS2.M) دیده شد، وجود بازهای گوانین تانخورده (خطی) هیچ اثری بر فلورسانس ذاتی ندارد؛ بلکه عامل اثر گذار، سازماندهی درون مولکولی بین بازهای گوانین است [17-19].

آرایش بازها در DNA چهاررشته‌ای به‌صورت صفحات ترادی، با برهم‌کنش کروموفورها و افزایش استاکینک میان ترامرها موجب افزایش فلورسانس می‌شود [10-13]. چنین استاکینگ‌هایی از گوانین‌ها در برابر آب، حفاظت کرده و از

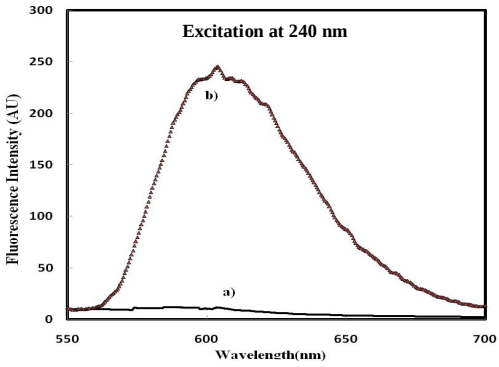
www.SID.ir

Archive of SID

مسیرهای منتهی به خاموشی با واسطه حلال، جلوگیری می‌کنند (Dynamic quenching) [43]. به‌نظر می‌رسد که فاکتورهایی مانند تشکیل حالت G*G excimer کنار اجزای تشکیل‌دهنده توالی، استاکینک بازها و هتروژنسیتی ساختار، می‌تواند بر ویژگی‌های انتقال انرژی و حالات برانگیختگی و تهییجی DNAهای چهاررشته‌ای اثر بگذارد [44,43].



(A)

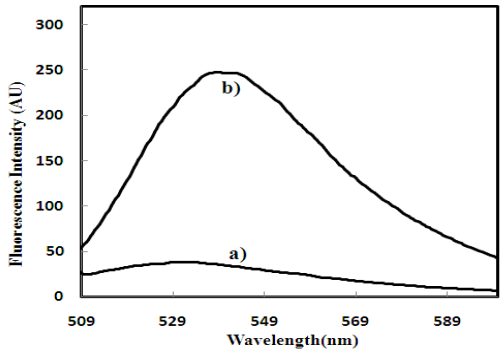


(B)

شکل 8 طیف فلورسانس ذاتی الیگونوکلئوتید PS2.M در طول موج 336 (A) و 240 نانومتر(B) در حضور آب مقطر استریل (a) و در حضور 50 میلی‌مولار بافر HEPES با pH 7/4 (b).

3-4-2- فلورسانس خارجی

رنگ سایبر گُلد دو طول موج تهییجی دارد، یکی در ناحیه فرابنفش در طول موج 300 نانومتر و دیگری در ناحیه مرئی در طول موج 495 نانومتر. بیشترین نشر فلورسانس برای این رنگ در طول موج 537 نانومتر دیده شده است [24]. مانند شکل 9 b، در حضور محلول رنگ‌آمیزی سایبر گُلد میزان نشر فلورسانس خارجی DNA ساختار یافته [DNA چهاررشته‌ای تشکیل شده در بافر (HEPES)] بیشتر از DNA تک‌رشته موجود در آب مقطر استریل است. فلورسانس DNA چهاررشته‌ای انکوبه شده با رنگ سایبر گُلد در بازه 15، 30 و 45 دقیقه، بیشترین شدت فلورسانس را در طول موج 537 نانومتر، پس از 15 دقیقه از خود نشان داد (شکل 9 b)؛ در حالی که پس از 30 و 45 دقیقه تغییر معنی‌داری دیده نشد (داده‌ها نشان داده نشده است). بیشترین نشر خارجی DNA چهاررشته‌ای همراه با سایبر گُلد در بازه 15 دقیقه، ممکن است نتیجه گسترش و کشیدگی این ماکرومولکول باشد. این نتایج نشان داد که افزایش چشم‌گیری در شدت فلورسانس سایبر گُلد پس از اتصال به DNA چهاررشته‌ای ایجاد می‌شود. به‌نظر می‌رسد که DNA چهاررشته‌ای، در مقایسه با DNA تک‌رشته و تانخورده و فاقد ساختار، ظرفیت پذیرش بیشتری برای اتصال به رنگ فلورسانس سایبر گلد دارد.



شکل 9 طیف فلورسانس خارجی DNA فاقد ساختار، در آب مقطر استریل (a) و DNA چهار رشته‌ایی (b) در حضور سایبرگُلد در بافر50 میلی‌مولار HEPES با 7/4 pH. طول موج مورد نظر برای تهییج 495 نانومتر و طول موج نشری برابر با 537 نانومتر استفاده شد.

www.SID.ir

Archive of SID

مشابه با دیگر رنگ‌های نامتقارن سیانینی، سایبر گُلد از یک گروه بنزازول و کوئینولین یا یک گروه هتروسیکلیک پیریدین تشکیل شده است که به‌وسیله‌ی یک پل متنی با همدیگر ارتباط دارند (شکل 3). به‌گونه‌ای کلی افزایش فلورسانس رنگ‌های نامتقارن سیانینی به محدودیت حرکات داخلی رنگ بر اثر اتصال رنگ به مولکول DNA مربوط است [32]. افزون بر این، استاکینک رنگ روی سطوح خارجی صفحات تترادی موجب افزایش استحکام ساختار رنگ و به دنبال آن افزایش فلورسانس خارجی می‌شود [44]. گزارش‌های منتشر شده نشان داده است که جابه‌جایی انرژی میان بازهای DNA و یک لیگاند فلورسنت پیوند شده به آن، تنها زمانی ممکن است که لیگاند کاملاً در نزدیکی بازهای DNA قرار داشته باشد [45]. همین مسئله باید در مورد رنگ سایبر گُلد نیز رخ دهد. بررسی‌ها نشان داده است که برای رنگ‌های خانواده سایبری، 2 حالت پیوند به مولکول DNA در نظر گرفته می‌شود؛ نخست پیوند بین صفحات تترادی (Intercalative) و دوم، از راه برهم‌کنش با شیار کوچک ایجاد شده در اثر شکل‌گیری ساختار چهاررشته‌ای است [42-45].

در حالی که همه‌ی رنگ‌های خانواده سایبری یک هسته مشترک ساختاری تشکیل‌دهنده در میان خود دارند، ولی وجود استخلاف‌های مختلف روی حلقه‌های آروماتیک به گونه معنی‌دار روی ویژگی‌های اتصال این رنگ‌ها با مولکول هدف اثر می‌گذارد. آنچه در مقالات و گزارش‌های منتشر شده تا به امروز دیده نشده است، تعیین دقیق عوامل استخلاف شده روی این ساختارها، به ویژه روی سایبرگلد است؛ به همین دلیل است که نداشتن داده‌های کافی درباره‌ی اجزای تشکیل‌دهنده این رنگ، امکان پیش‌بینی نوع اتصال آن به DNA را مشکل می‌کند. در واقع برهم‌کنش رنگ‌های سیانین مانند سایبر گلد با DNA، به عوامل مختلفی مانند جزئیات ساختاری، مقدار بارهای مثبت، تقارن و نوع ساختار مولکول DNAای که رنگ با آن برهم‌کنش دارد، وابسته است. در حقیقت این فاکتورها تعیین‌کننده نوع برهم‌کنش رنگ با DNA یا از راه Intercalative و یا از راه اتصال به شیار کوچک خواهند بود [24-26]. با این وجود، مقالات اندکی در زمینه برهم‌کنش سایبرگُلد با مولکول‌های DNA تک‌رشته و دورشته ای در رنگ‌آمیزی ژل الکتروفورز به چاپ رسیده است. این بررسی‌ها نشان داده است که سایبرگُلد می‌تواند با ویژگی و حساسیت بالا به ساختار دو رشته‌ای از راه اتصال به گروه‌های فسفات با بار منفی در بدنه و لوپ‌ها، ارتباط برقرار کند [45].

متاسفانه نمی‌توان نوع و محل اتصال این رنگ به مولکول DNA را به‌وسیله‌ی فلورسانس تعیین کرد. تمایز این دو حالت اتصالی تنها با تکنیک‌های پیچیده‌تر مانند رزونانس مغناطیسی هسته هیدروژن[1]، رزونانس مغناطیسی هسته فسفر[31] و دورنگ‌نمایی خطی ممکن است. افزون بر این، اگر جزییات ساختاری کاوشگر فلورسانس و چهاررشته‌ای برهم‌کنش دهنده با آن به گونه ای دقیق تعیین شده باشد، تفسیر نتایج ساده‌تر و دقیق‌تر خواهد بود [30-32]؛ با این وجود نه تنها جزئیات ساختاری سایبرگُلد در انحصار شرکت تولیدکننده آن است (ثبت اختراع) بلکه ساختار چهاررشته‌ای استفاده شده در این بررسی یعنی PS2.M نیز، چه از نظر تعداد صفحات تترادی و چه از نظر نوع لوپ‌های پیونددهنده بین صفحات، به‌گونه‌ی درست و

www.SID.ir

Archive of SID

روشن، تعیین نشده است؛ هر چند شواهدی وجود دارد که تأیید می‌کند حضور یون‌های پتاسیم میان صفحات تترادی، از ورود مولکول‌های آروماتیک دیگر به چهاررشته‌ای جلوگیری می‌کند؛ پس می‌توان نتیجه گرفت که رقابتی میان مولکول سایبرگُلد و کاتیون‌ها ایجاد می‌شود [45].

به‌نظر می‌رسد زمانی‌که رنگ به چهاررشته‌ای PS2.M متصل می‌شود، از راه گروه‌های با بار مثبت خود، تنها می‌تواند با گروه‌های باردار منفی فسفات موجود در بدنه و لوپ‌ها بر هم‌کنش داشته باشد. در این مقاله، فعالیت پراکسیدازی الیگومر PS2.M با طیف‌سنجی نور مرئی- فرابنفش و ویژگی‌های ساختاری آن در آب مقطر استریل و بافر HEPES با طیف‌سنجی دورنگ‌نمایی دورانی، بررسی شد. بر اساس نتایج، تشکیل DNA چهاررشته‌ای در بافر دارای کاتیون‌های پتاسیم و سدیم تأیید شد. افزون بر این، طیف‌سنجی فلورسانس نشان داد که شدت نشر توالی سرشار از گوانین در حالت DNA چهاررشته‌ای بیشتر از تک‌رشته‌ای است. همچنین پتانسیل رنگ سایبرگُلد به‌عنوان برچسب فلورسانس برای تشخیص و تمایز DNA چهاررشته‌ای بررسی شد. یافته‌ها نشان داد که رنگ سایبرگُلد، قدرت انتخاب بالایی برای DNA چهاررشته‌ای از نوع موازی، نسبت به DNA تک‌رشته‌ایی دارد. چنین ویژگی ممتازی برای این رنگ می‌تواند آن را به‌عنوان یک کاوشگر مناسب برای DNAهای چهاررشته‌ای معرفی کند. با این حال کسب داده‌های دقیق‌تر و بیشتر برای درک سازوکار برهم‌کنش رنگ سایبرگُلد و DNA چهاررشته‌ای برای بررسی‌های علمی آینده، مهم و ضروری است.

5- تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است که بدین‌وسیله سپاسگزاری می‌شود.

6- منابع

[1] McManus, S. A., and Li, Y. (2010) The structural diversity of deoxyribozymes. *Molecules*. 15, 6269–6284.

[2] Lipps, H. J., and Rhodes, D. (2009) G-quadruplex structures: in vivo evidence and function. *Trends Cell Biol*. 2009, 19: 414–422.

[3] Lu, Y., and Liu, J. (2006) Functional DNA nanotechnology: emerging applications of DNAzymes and aptamers. *Curr Opin Biotech*. 17, 580–588.

[4] Travascio, P., Li, Y., and Sen, D. (1998) DNA-enhanced peroxidase activity of a DNA aptamer-hemin complex. *Chem Biol*. 5, 505–517.

[5] Baum, D. A., and Silverman, S. K. (2008) Deoxyribozymes: useful DNA catalysts in vitro and in vivo. *Cell Mol Life Sci*. 65, 2156–2174.

[6] Ito, Y., and Hasuda, H. (2004) Immobilization of DNAzyme as a thermostable biocatalyst. *Biotechnol Bioeng*. 86, 72–77.

[7] Majhi, P. R., and Shafer, R. H. (2006) Characterization of an unusual folding pattern in a catalytically active guanine quadruplex structure. *Biopolymers*. 82, 558–569.

[8] Cheng, X., Liu, X., Bing, T., Cao, Z., and Shangguan, D. (2009) General peroxidase activity of G-quadruplex-hemin complexes and its application in ligand screening. *Biochemistry*. 48, 7817–7823.

www.SID.ir

Archive of SID

[9] Wang, Y., Wang, J., Yang, F., Yang, X. (2010) Spectrophotometric detection of lead(II) ion using unimolecular peroxidase-like deoxyribozyme, *Microchim Acta*. 171, 195–201.

[10] Ren, J., Qin, H., Wang, J., Luedtke, N. W., Wang, E., and Wang, J. (2011) Label-free detection of nucleic acids by turn-on and turn-off G-quadruplex-mediated fluorescence, *Anal Bioanal Chem*. 399, 2763–2770.

[11] Xu, H., Gao, S., Yang, Q., Pan, D., Wang, L., and Fan, C. (2010) Amplified fluorescent recognition of G-quadruplex folding with a cationic conjugated polymer and DNA intercalator. *Appl Mater Interfaces*. 2, 3211–3216.

[12] Zhao, C., Geng, J., Feng, L., Ren, J., and Qu, X. (2011) Chiral metallo-upramoleculare complexes selectivity induce human telomeric G-quadruplex formation under salt-deficient conditions. *Chem. Eur. J*. 17, 8209–8215.

[13] Largy, E., Hamon, F., and Teulade-Fichou, M. P. (2011) Development of a high-throughput G4-FID assay for screening and evaluation of small molecules binding quadruplex nucleic acid structures. *Anal Bioanal Chem*. 400, 3419–3427.

[14] Juskowiak, B. (2006) Analytical potential of the quadruplex DNA-based FRET probes. *Analytica Chimica Acta*. 568, 171–180.

[15] Kong, D. M., Ma, Y. E., Guo, J. H., Yang, W., Shen, H. X. (2009) Fluorescent sensor for monitoring structural changes of G-quadruplexes and detection of potassium ion. *Anal. Chem.* 81, 2678–2684.

[16] Li, T., Wang, E., and Shaojun, D. (2010) Parallel G-quadruplex-specific fluorescent probe for monitoring DNA structural changes and label-free detection of potassium ion, *Anal. Chem*. 82, 7576–7580.

[17] Lakowicz, J. R. (2006) Principles of Fluorescence Spectroscopy. *Springer*, New York, PP 104-115

[18] Pisarevskii, N., Cherenkevich, S. N., and Andrianov, V. T. (1966) Fluorescence spectrum and quantum yield of DNA in solution. *J. Appl. Spect*. 5, 452–454.

[19] Mendez, M. A., and Szalai, V. A. (2009) Fluorescence of unmodified oligonucleotides: a tool to probe G-quadruplex DNA structure. *Biopolymers*. 91, 841–850.

[20] Rihn, B., Coulais, C., Bottin, M. C., and Martinet, N. (1995) Evaluation of non-radioactive labelling and detection of deoxyribonucleic acids. Part one: Chemiluminescent methods. *Biochem. Biophys. Methods*. 30, 91–102.

[21] Alzeer, J., Vummidi, B. R., Roth, P.J., and Angew, N.W. (2009) Guanidinium-modified phthalocyanines as high affinity G-quadruaplex fluorescent probes and transcriptional regulators. *Chem. Int. Ed*. 48, 9362 –9365.

[22] Meguellati, K., Koripelly, G., and Angew, S. L. (2010) DNA-template synthesis of trimethine cyanine dyes: a versatile fluorogenic reaction for sensing G-quadruplex formation, *Chem. Int. Ed*. 49, 2738–2742.

[23] Yang, Q., Xiang, J., Yang, S., Li, Q., Zhou, Q., Guan, A., Zhang, H., Zhang, X., Tang, Y., and

www.SID.ir

Archive of SID

[29] Ahmad, A. I. (2007) BOXTO as a real-time thermal cycling reporter dye. *J. Biosci*. 32, 229–239.

[30] Karlsson, H. J., Bergqvist, M. H., Lincoln, P., and Westman, G. (2004) Syntheses and DNA-binding studies of a series of unsymmetrical cyanine dyes: structural influence on the degree of minor groove binding to natural DNA. *Bioorgan Med Chem*. 12, 2369–2384.

[31] Karlsson, H. J., Eriksson, M., Perzon, E., kerman, B. A., Lincoln, P., and Westman, G. (2003) Groove-binding unsymmetrical cyanine dyes for staining of DNA: syntheses and characterization of the DNA-binding. *Nucleic Acids Res*. 31, 6227-6234.

[32] Kaloyanova, S., Trusova, V. M., Gorbenko, G. P., and Deligeorgiev, T. (2011) Synthesis and fluorescence characteristics of novel asymmetric cyanine dyes for DNA detection. *Journal of Photoch Photobio A*. 217, 147–156.

[33] Li, T., Shi, L., Wang, E., and Dong, S. (2009) Multifunctional G-quadruplex aptamers and their application to protein detection. *Chem. Eur. J*. 15, 1036–1042.

[34] Travascio, P., Sen, D., and Bennet, A. J. (2006) DNA and RNA enzymes with peroxidase activity- an investigation into the mechanism of action. *Can. J. Chem*. 84, 613–619.

[35] Ranjbar, B., and Gill, P. (2009) Circular dichroism techniques: biomolecular and nanostructural analyses, *Chem Biol Drug Des*. 74, 101–120.

[36] Protasevich, I., Ranjbar, B., Lobachov, V., Makarov, A., Gilli, R., Briand, C., Lafitte, Xu, G. (2010) Verification of specific G-quadruplex structure by using a novel cyanine dye supramolecular assembly: II. The binding characterization with specific intramolecular G-quadruplex and the recognizing mechanism. *Nucleic Acids Res*. 38, 1022–1033.

[24] Tuma, R. S., Beaudet, M. P., Jin, X., Jones, L. J., Cheung, C. Y., Yue, S., Singer, V. L. (1999) Characterization of SYBR Gold nucleic acid gel stain: a dye optimized for use with 300-nm ultraviolet transilluminators. *Anal Biochem*. 268, 278–288.

[25] Cosa, G., Focsaneanu, K. S., McLean, J. R., McNamee, J. P., Scaiano, J. C. (2001) Photophysical properties of fluorescent DNA-dyes bound to single- and double-stranded DNA in aqueous buffered solution. *Photochem photobiol*. 73, 585-599.

[26] Guo, J. H., Zhu, L. N., Konga, D. M., and Shen, H. X. (2009) Triphenylmethane dyes as fluorescent probes for G-quadruplex recognition. *Talanta*. 80, 607–613.

[27] Hongxia, S., Junfeng, X., Yazhou, Z., Guangzhi, X., Lianghua, X., and Yalin, T. (2006) Spectroscopic studies of the interaction between methylene blue and G-quadruplex. *Chinese Sci Bull*. 51, 1687–1692.

[28] Netzel, T. L., Nafisi, K., and Zhao, M. (1995) Base-content dependence of emission enhancements, quantum yields, and lifetimes for cyanine dyes bound to double-strand DNA: photophysical properties of monomeric and bichromophoric DNA stains. *J. Phys. Chem*. 99, 17936–17947.

www.SID.ir

Archive of SID

D., and Haiech, J. (1997) Conformation and thermal denaturation of apocalmodulin: role of electrostatic mutations, *Biochemistry*. 36, 2017-2024.

[37] Travascio, P., Witting, P. K., Mauk, A. G., and Sen, D. (2001) The peroxidase activity of the hemin-DNA oligonucleotide complex: free radical damage specific guanine base of the DNA. *J. Am. Chem. Soc*. 123, 1337-1348.

[38] Kawazoe, N., Teramoto, N., Ichinari, H., Imanishi, Y., and Ito, Y. (2001) In vitro selection of nonnatural ribozyme-catalyzing porphyrin metalation. *Biomacromolecules*. 2, 681-686.

[39] Witting, P. K., Travascio, P., Sen, D., and Mauk, A. G. (2001) DNA Oligonucleotide-Hemin Complex Cleaves t-Butyl Hydroperoxide through a Homolytic Mechanism. *Inorg. Chem.* 40, 5017-5023.

[40] Holm, A. I. S., Kohler, B., Hoffmann, S. V., and Nielsen, S. B. (2010) Synchrotron radiation circular dichroism of various G-quadruplex structures. *Biopolymers*. 93, 429–433.

[41] Arthanari, H., Basu, S., Kawano, T. L., and Bolton, P. H. (1998) Fluorescent dyes specific for quadruplex DNA. *Nucleic Acids Res*. 26, 3724-3728.

[42] Gray, D. M., Wen, J. D., Gray, C. W., Repges, R., Repges, C., Raabe, and G., Fleischhauer, J. (2008) Measured and calculated CD spectra of G-quartets stacked with the same or opposite polarities. *Chirality*. 20, 431–440.

[43] Miannay, F. A., Banyasz, A., Gustavsson, T., and Markovitsi, D. (2009) Excited states and energy transfer in G-quadruplexes. *J. Phys. Chem*. C. 113, 11760–11765.

[44] Kong, D. M., Ma, Y. E., Wu, J., and Shen, H. X. (2009) Discrimination of G-quadruplexes from duplex and single-stranded DNAs with fluorescence and energy-transfer fluorescence spectra of crystal violet. *Chem. Eur. J*. 15, 901–909.

[45] Lubitz, I., Zikich, D., and Kotlyar, A. (2010) Specific high-affinity binding of Thiazole Orange to triplex and G-quadruplex DNA. *Biochemistry*. 49, 3567–3574.

www.SID.ir