哺乳动物细胞DNA高级结构G-四链体检测方法的建立

肖英男 袁晶华 张苗苗 王 峰* (天津医科大学基础医学院遗传学系,天津 300070)

摘要 G-四链体(G-quadruplex, G4)结构是由富含鸟嘌呤(G)的寡核苷酸折叠堆积形成的四链 螺旋结构, 在维持基因组稳定性和调控基因表达上有重要意义。然而, 目前细胞内检测G-四链体方 法有限, 该文利用G-四链体特异性抗体(BG4)对经细胞质抽提和RNase处理的贴壁培养细胞基因组 G-四链体进行免疫荧光-荧光原位杂交检测, 直接观察DNA高级结构G-四链体, 实现了细胞水平G-四链体的可视化, 这将有助于今后更准确、直观地在细胞水平研究DNA G-四链体, 明确G-四链体 与小分子配体相互作用, 巩固G-四链体在遗传学、表观遗传学和病理学等领域研究中的地位。

关键词 G-四链体; BG4; 免疫荧光--荧光原位杂交; 端粒

The Establishment of the Detection Method of G-Quadruplex of DNA Structure in Mammalian Cells

Xiao Yingnan, Yuan Jinghua, Zhang Miaomiao, Wang Feng*

(Department of Genetics, School of Basic Medical, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract Guanine-rich oligonucleotides folded into quadruple-stranded helical structures known as G-quadruplexs (G4), which have been associated with genomic stability and the regulation of gene expression. However, to date, the methods of imaging G-quadruplexes in mammalian cells remain poorly defined. Here, we reported the generation and application of a structure-specific antibody (BG4) that was employed to visualize DNA G-quadruplex structures and telomeric G-quadruplex by immunofluorescence-fluorescence *in situ* hybridization (IF-FISH) in adherent cells with extracting and treating by RNase. This is contributing to research of G-quadruplex structure more accurately and intuitively *in vivo*, definituding the interaction of between G-quadruplex (telomeric G-quadruplex) and ligands, and consolidating the position of G-quadruplex structure in the areas of genetics, epigenetics and pathology.

Keywords G-quadruplex; BG4; immunofluorescence-fluorescence in situ hybridization; telomere

因启动子区域(oncogene promoter regions)、核糖体

DNA(ribosomal DNA)和3'非编码区等。此外,人体端粒在一定条件下也可以形成G-四链体^[2-3],端粒区

域G-四链体的形成能有效地抑制端粒酶对细胞端粒 长度的延伸、从而实现对细胞增殖的控制^[4-5]。同时,

端粒G-四链体的形成还可以激活端粒DNA的损伤

应答机制,导致细胞周期的延长或造成细胞的衰老。

早在1953年, Watson和Crick¹¹发现了DNA以 双螺旋结构存在, 然而随着研究逐步深入, 除了双 螺旋结构外, 研究者们还发现, DNA上存在其他结 构类型, 如发夹结构、十字形结构、三联体、G-四 链体等。其中, G-四链体(G-quadruplex, G4)结构是 由富含鸟嘌呤(G)的寡核苷酸折叠堆积形成的四链 螺旋结构。G-四链体广泛分布于基因组中, 如癌基

收稿日期: 2016-07-26 接受日期: 2016-11-24

国家自然科学基金(批准号: 31471293)和天津市应用基础与前沿技术研究计划(批准号: 14JCYBJC41900)资助的课题

- *通讯作者。Tel: 022-83336839, E-mail: Wangf@tmu.edu.cn
- Received: July 26, 2016 Accepted: November 24, 2016

*Corresponding author. Tel: +86-22-83336839, E-mail: Wangf@tmu.edu.cn

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31471293) and Tianjin Research Program of Application Foundation and Advanced Technology (Grant No.14JCYBJC41900)

网络出版时间: 2016-12-29 15:24:41 URL: http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20161229.1524.008.html

因此, 端粒区的G-四链体被作为一种潜在的肿瘤抑制靶点。

鉴于G-四链体在维持基因组稳定性和调控基 因的转录与表达有重要意义,近年来,化学家和生 物学家对不同G-四链体DNA的生物学功能以及作 为抗肿瘤药物靶点的应用前景给予了高度关注。 目前, G-四链体的检测方法主要包含: 圆二色光谱 (circular dichroism, CD)、X-射线单晶衍射、核磁共 振(nuclear magnetic resonance, NMR)、荧光能量共振 转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)、电 喷雾质谱法(electrospray ionization mass spectrometry, ESI-MS)等。圆二色谱主要通过检测旋光性推断G-四 链体构象,且不同的G-四链体序列以及其他小分子配 体的作用或不同的离子环境都能使G-四链体呈现不 同的峰型,而这些峰型都对应着某种特定的结构^[7]。 X-射线晶体衍射法能确定G-四链体精确结构和环形 (loop)构象,还可以确定金属离子和小分子配体与G-四链体的结合位置^[8]。核磁共振能分析小分子配体 与G-四链体作用模式^[9]。荧光能量共振转移技术可 用于研究G-四链体折叠与展开和G-四链体与小分子 配体的相互作用,同时也可以对G-四链体进行热力学 动力学研究[10-11]。电喷雾质谱法是近年发展迅速的 一种新的结构鉴定方法, 也是研究核酸与配体相互作 用的重要方法之一,可用于研究G-四链体形成及与小 分子配体的结合,还可用于G-四链体的折叠动力学和 热力学稳定性的研究[7,12]。尽管报道有多种方法可用 于G-四链体的研究,但能用于细胞内的检测方法十分 有限,无法有效检测体内G-四链体的形成。

2013年, Balasubramanian实验室^[2,13]筛选出含有 G-四链体特异性抗体基因(*BG4*)的pSANG10-3F-BG4 质粒,表达得到靶向性识别G-四链体的抗体—— BG4,首次实现了细胞水平上G-四链体的可视化研 究。此后,不同研究人员采用该方法研究端粒G-四链体,但是不同研究团队具体的实验步骤不同。 2013年, Henderson等^[14]研究配合物与DNA G-四链体 相互作用的过程中使用一定浓度RNase处理细胞,以 去除RNA G-四链体对实验的影响。我们采用该方 法发现,细胞膜仅通过透化处理, RNase的处理并未 达到预期效果,仍存在RNA G-四链体的干扰,同时 BG4难以进入细胞核内与DNA G-四链体结合。2015 年, Moye等^[3]抽提去除细胞质,利用抽提的方法破坏 细胞膜并暴露细胞核,透化处理核膜以使BG4进入 细胞核内与DNA G-四链体结合。我们采用上述方 法发现,细胞核外存在RNA G-四链体的干扰,主要 是由于细胞内大量存在端粒转录的RNA(telomeric repeat-containing RNA, TERRA)能被BG4所识别,导 致该方法假阳性率非常高。此外,该方法需要先对 细胞进行体外固定,再利用CytoSpin方法进行细胞铺 片、杂交、染色,操作过程繁琐,适应范围较小。本 文中,我们联合应用细胞质抽提和RNase处理的方法 对G-四链体进行检测。利用去垢剂NP-40对细胞质 进行抽提,使BG4易于进入细胞核与G4结合,同时避 免了细胞质中杂蛋白和RNA的信号干扰。高浓度的 RNase处理,能够清除绝大多数TERRA,大大降低了 假阳性实验结果的发生。我们首次利用BG4抗体完 成对贴壁培养细胞基因组中的G-四链体进行检测,方 法更加简单、有效,适应性更广。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

RPMI-1640培养基、胎牛血清均购自Biological Industries(BI)公司。胰蛋白酶(Trypsin)购自Gibco 公司。PMSF、TMPyP4、Triton X-100和Tween-20 均购自Sigma公司。*Nco*I、*Hind*III购自TaKaRa公 司。30 kDa超滤管、抗荧光淬灭剂和Western blot显 色液均购自Millipore公司。Flag-tag (MA4) Mouse Monoclonal Antibody购自北京锐抗公司。Goat Anti-Mouse IgG H&L(HRP)购自Abcam公司。Alexa Fluor 555 Goat Anti-Mouse IgG (H+L) Antibody购自Thermo 公司。Ni-NTA购自全式金公司。其余常用化学试剂 购自国药集团。PCR仪购自Thermo公司。电泳仪、 电转仪均购自Bio-Rad公司。

1.2 细胞

Hela细胞由美国辛辛那提大学惠赠。

1.3 实验方法

1.3.1 酶切检测pSANG10-3F-BG4质粒 从
Balasubramanian实验室获得pSANG10-BG4质粒用于
以下实验。5 U Nco I、Hind III与1 µg pSANG10-3FBG4质粒的混合液置于37 ℃水浴酶解2 h,与1%琼脂
糖凝胶于电压120 V电泳40 min。

1.3.2 BG4抗体的表达与纯化 挑取单菌落接种于 2 mL 2×TY(1%蛋白胨, 0.5%酵母膏, 0.5% NaCl)+2% 葡萄糖+50 μg/mL卡那霉素培养基, 30 ℃振荡培养 12 h。将菌液转接至200 mL自诱导培养基[ZY(0.5%

酵母粉, 1% N-Z蛋白胨), 2 mmol/L MgSO4, 0.2×金 属离子混合液(0.1 mol/L FeCl₃·6H₂O, 1 mol/L CaCl₂, 1 mol/L MnCl₂·4H₂O, 1 mol/L Zn₂SO₄·7H₂O, 0.2 mol/L CoCl₂·6H₂O, 0.1 mol/L CuCl₂·2H₂O, 0.2 mol/L NiCl₂· 6H₂O, 0.1 mol/L Na₂MoO₄·2H₂O, 0.1 mol/L Na₂SeO₃· 5H₂O, 0.1 mol/L H₃BO₃), 1×5 052(0.5%甘油, 0.2% α-乳糖, 0.05%葡萄糖), 1×M(25 mmol/L KH2PO4, 50 mmol/L NH4Cl, 5 mmol/L Na2SO4), 50 µg/mL卡那霉素], 37 ℃ 振荡培养6h后转至30 ℃振荡培养12h。将菌液于 4 ℃、3 000 ×g离心10 min后, 弃上清, 沉淀用100 mL TBS(50 mmol/L Tris-HCl pH8.0, 1 mmol/L EDTA, 20% 蔗糖)+2 µg/mL PMSF 重悬, 冰浴10 min, 溶液置 于冰上超声破碎至澄清。然后, 16 000 ×g、4 ℃离 心20 min。收集上清(L)。2 mL Ni-NTA柱与10 mL洗 涤液(1×PBS, 20 mmol/L咪唑, pH 8.0)4 ℃旋转平衡 12 h, 上清(L)与Ni-NTA亲和结合, 5 mL洗涤液(1×PBS, 20 mmol/L咪唑, pH8.0)4 ℃旋转5 min,重复3次, 流出 液为W1、W2、W3。洗脱液(1×PBS, 250 mmol/L咪唑, pH8.0)洗脱方法同上,洗脱2次,分别为E1、E2。洗 脱液于4℃经30kDa超滤管浓缩。

1.3.3 蛋白质电泳及考马斯亮蓝染色 蛋白质浓 缩液99 ℃金属浴加热5 min。变性后的蛋白质进行 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE, 5%浓缩胶, 10% 分离胶)。考马斯亮蓝染液微波炉加热至凝胶变为 蓝色, 然后用清水洗去浮色。

1.3.4 Western blot 40 μg蛋白质溶液99 ℃金属浴 加热5 min。变性后的蛋白质进行聚丙烯酰胺凝胶电 泳(SDS-PAGE, 5%浓缩胶, 10%分离胶)。100 V半干 法转膜(PVDF膜)1 h。5%脱脂牛奶封闭液(5%脱脂奶 粉溶于TBST)覆盖PVDF膜封闭2.5 h, 然后孵育Flagtag (MA4) Mouse Monoclonal Antibody(1:1 000), 4 ℃ 静置过夜。次日, TBST(1.211 g Tris, 9 g NaCl, 0.1% Tween-20, 总体积为1 L)洗涤3次, 每次15 min。常温 孵育 Goat Anti-Mouse IgG H&L(HRP)(1:10 000)2 h, 再用TBST洗涤3次后, 每次15 min。显色液1:1避光 显色5 min, 暗室曝光10 s。

1.3.5 细胞培养 HeLa(宫颈癌细胞)用1640培养基
[含1%青/链霉素,10%胎牛血清(FBS)]培养在37 ℃、
5% CO₂的培养箱中。

1.3.6 免疫荧光(immunofluorescence, IF) Hela细胞
在6孔板中爬片, 培养24 h。抽提液[20 mmol/L HEPES-KOH(pH7.9), 20 mmol/L NaCl, 5 mmol/L MgCl₂,

300 mmol/L蔗糖, 0.5%(v/v) NP-40]抽提15 min, 随 后分别用0.1% Tween-20/1×PBS和1×PBS洗涤3 min。 然后用2%多聚甲醛固定细胞20 min, 1×PBS洗涤2 次; 0.12 U/µL DNAase 37 ℃ 孵育1 h, 1×PBS洗涤2次; PBG(0.1% cold fisher geltian, 0.05% BSA)封闭细胞 1 h, 然后孵育BG4抗体1 h, 0.1% Tween-20/1×PBS冲 洗细胞4次; 一抗[Flag-tag(MA4) Mouse Monoclonal Antibody, 1:1 000]孵育1 h, 洗涤方法同上; 最后孵育 荧光抗体[Alexa Fluor 555 Goat Anti-Mouse IgG (H+L) Antibody, 1:2 000]30 min, 洗涤方法同上。然后分别 用70%、90%、100%乙醇脱水2 min, 干燥后用抗荧 光淬灭剂封片。

1.3.7 免疫荧光--荧光原位杂交(IF-FISH) Hela细 胞在6孔板中爬片, 10 h后分别按0、10、20 µmol/L浓 度加入TMPyP4,继续培养24 h。抽提液[20 mmol/L HEPES-KOH(pH7.9), 20 mmol/L NaCl, 5 mmol/L MgCl₂, 300 mmol/L蔗糖, 0.5%(v/v) NP-40]抽提15 min, 随后 分别用0.1% Tween-20/1×PBS和1×PBS洗涤3 min; 然 后用2%多聚甲醛固定细胞20 min, 1×PBS冲洗2次; 37 ℃ 1 mg/mL胃蛋白酶(10 mmol/L甘氨酸pH2.0)孵 育5 min, 1×PBS冲洗2次; 避免消化后细胞脱落, 2% 多聚甲醛固定细胞2 min, 冲洗方法同上; 0.5% Triton X-100透化20 min, 冲洗2次。37 ℃ 50 µg/mL RNase 消化过夜。PBG(0.1% cold fisher geltian, 0.05% BSA) 封闭细胞1 h, 然后孵育 BG4抗体1 h, 0.1% Tween-20/1×PBS冲洗细胞4次; 一抗[Flag-tag (MA4) Mouse Monoclonal Antibody, 1:1 000] 孵育1 h, 洗涤方法同 上; 最后, 孵育荧光抗体[Alexa Fluor 555 Goat Anti-Mouse IgG (H+L) Antibody, 1:2 000]30 min, 洗涤方 法同上。随后, Blocking reagent封闭10 min, TelC-FITC(Panagene, FITC-OO-CCC TAA CCC TAA CCC TAA, 1:100), 35 µL FISH杂交液覆盖盖玻片, 暗室 85 ℃变性3 min, 常温杂交2 h; 随后使用洗液1 (2×SSC pH7.2, 50%甲酰胺, 0.1% SDS)和洗液2(2×SSC pH7.2, 0.1% Tween-20)分别在37 ℃和42 ℃冲洗细胞。然后 用分别70%、90%、100%乙醇脱水2 min, 干燥后用 抗荧光淬灭剂封片。

2 结果

2.1 BG4抗体的制备与纯化

含有BG4基因的pSANG10-3F-BG4质粒大小为 6173 bp, 插入表达BG4基因的片段大小为759 bp, 其

中包含组氨酸(6×His)标签和3个FLAG(DYKDHDG DYKDHDI DYKDDDDK)标签(图1A), 以便于用Ni-NTA柱亲和纯化和纯化后的检测。酶切鉴定、测序

结果证实,所获取质粒无误(图1B), Nco I和Hind III 双酶切产物大小约为800 bp。

pSANG10-3F-BG4质粒通过自诱导培养基过 表达BG4, 经Ni-NTA柱亲和纯化后, 进行考马斯亮 蓝染色(图2A)。与诱导前相比,诱导后裂解液在 30~40 kDa有一条带亮度增强;亲和洗脱得到目的蛋

白相对分子质量为30~40 kDa。对诱导前后的总蛋 白使用Flag标签抗体进行Western blot检测(图2B),结 果显示,诱导后的产物有特异性条带,表明BG4蛋白 质成功表达。

2.2 细胞水平G-四链体的检测

Marker

(B)

bp

我们利用免疫荧光--荧光原位杂交技术对贴壁 培养细胞中端粒区的G-四链体进行检测(图3)。利 用FITC探针和BG4抗体分别标记端粒信号和G-四 链体; 使用IF-FISH观察端粒G-四链体结构的形成,

2

3



A: pSANG10-BG4质粒图谱; B: 酶切检测pSANG10-BG4质粒。Marker: 1Kb DNA分子标记; 1: 未经过酶切处理的空白对照; 2: Hind III单酶切结 果; 3: Nco I和Hind III双酶切结果。

A: profiles of pSANG10-BG4; B: examination of pSANG10-BG4 with restriction endonuclease. M: 1 Kb DNA ladder; 1: control; 2: the result of Hind III; 3: the result of Hind III and Nco I. 图1 酶切检测pSANG10-BG4质粒

Fig.1 Examination of pSANG10-BG4 by restriction endonuclease



A:蛋白质电泳及考马斯亮蓝染色。黑色箭头所指即为纯化出的抗体。Marker: 14~100 kDa蛋白质分子标记; 1:诱导前的菌液; 2:自诱导培养 基37 ℃振荡诱导前的菌液; 3: 自诱导培养基30 ℃振荡诱导后的菌液; 4: 诱导后菌液超声破碎后的上清液(L); 5: 超声破碎后的沉淀; 6: 纯化洗 涤液W1; 7: 纯化洗脱液E1; 8: 纯化洗脱液E2。B: 纯化蛋白Western blot鉴定。1: 诱导前目的蛋白; 2: 诱导后目的蛋白。

A: SDS-PAGE and coomassie blue staining. Black arrows indicate purified protein. Marker: 14-100 kDa protein marker; 1: bacteria suspension before induction; 2: bacteria suspension before induction in anto-induction medium at 37 °C; 3: bacteria suspension after induction in anto-induction medium at 30 °C; 4: the supernate of suspension of bacteria suspension after induction; 5: the precipitation of suspension; 6: washing buffer (W1); 7: elution buffer (E1); 8: elution buffer (E2). B: the purified protein detected by Western blot. 1: the protein before induction; 2: the protein after induction.

图2 目的蛋白SDS-PAGE和Western blot结果



(A)

端粒信号与G-四链体的信号重合时,则说明G-四链 体是在端粒上形成端粒G-四链体。结果表明, G-四 链体主要存在于细胞核中,高浓度RNase处理后,能 明显改善细胞质和细胞核中的假阳性信号产生(图 3A)。此外,荧光共定位实验证实,有25%左右的端 粒有红色荧光信号,证明端粒DNA有形成G-四链体 的能力;同时我们发现,大部分红色G-四链体信号不 与端粒DNA发生共定位,证实其他基因组DNA也可 以形成G-四链体,比例相对于端粒区更高。细胞经 DNase处理后,基因组DNA 被消化,细胞核几乎未被 DAPI染色, DNA G-四链体荧光信号基本消失, 证实 BG4抗体所结合的确为DNA结构,并非RNA或者蛋 白质。

在此基础上,我们进一步引入了G-四链体稳 定剂——TMPyP4[5,10,15,20-tetra(N-methyl-4pyridyl)-porphine]^[5,15-19],诱导G-四链体的形成并使 之稳定。在IF-FISH的实验中发现, TMPyP4不仅使 端粒G-四链体数量数量增加(图4A和图4B), 而且使



A: RNase处理结果(白色箭头表示端粒G-四链体); B: DNase处理结果(白色虚线表示细胞核所在位置)。

A: treatment with RNase (white arrows show telomeric G-quadruplex); B: treatment with DNase (white broken circle shows nucleus).



A:利用IF-FISH技术检测TMPyP4(0、10、20 µmol/L)对G-四链体和端粒G-四链体的影响(白色箭头表示端粒G-四链体); B、C: 150个细胞G-四链 体荧光统计结果,***P<0.001。

A: the effect of TMPyP4 (0, 10, 20 µmol/L) on G-quadruplex and telomeric G-quadruplex by IF-FISH(white arrows show telomeric G-quadruplex); B,C: statistical result of 150 nuclei for G-quadruplex were counted, ***P<0.001.

图4 TMPvP4对细胞内G-四链体和端粒G-四链体的影响

Fig.4 The effect of TMPyP4 on G-quadruplex and telomeric G-quadruplex

细胞内G-四链体也有所增加(图4C);统计150个细胞 G-四链体数量发现,经不同浓度TMPyP4处理后端 粒G-四链体数量增多且有统计学差异,增多倍数约 为2倍;细胞核内G-四链体增多且有统计学差异,增 多倍数约为2倍(P<0.001)。以上结果说明,TMPyP4 对G-四链体增多没有选择性,该小分子不仅能诱导 端粒区的G-四链体形成,对基因组其他位置的G-四 链体高级结构同样有诱导作用。

3 讨论

越来越多的证据表明, G-四链体结构在生物体内 扮演着重要的角色^[20]。生物信息学预测分析显示, 在 人类的基因序列中, 约350 000个基因具有形成G-四链 体的潜力^[5], 其中包含染色体末端端粒区域TTA GGG 重复序列^[3]。DNA G-四链体参与细胞的衰老、凋亡、 肿瘤的发生发展及一些其他疾病的过程。正是由于 DNA G-四链体在细胞内重要的生物学功能, 近年来G-四链体和端粒G-四链体的研究受到关注。

研究细胞水平G-四链体主要利用IF-FISH实验 技术,但是该方法对细胞的处理过程较复杂,且无法 对培养细胞进行处理。我们首次采用细胞爬片,同 时联合应用细胞质抽提和RNase处理过夜的方法检 测G-四链体。该方法相较于细胞离心的方法更方便, 并且适用所有贴壁细胞,适用范围更广。细胞质抽 提结合RNase处理,能够更加有效地去除假阳性信 号。通过本研究直接观察到DNA高级结构G-四链体, 实现了细胞水平G-四链体的可视化。建立在细胞中 检测端粒高级结构G-四链体的新方法,将有助于今 后更准确、直观地在细胞水平研究DNA G-四链体, 明确G-四链体(端粒G-四链体)与小分子配体相互作 用, 巩固G-四链体在遗传学、表观遗传学、病理学 等领域研究中的地位。

参考文献 (References)

- 1 Cobb M. 1953: When genes became "information". Cell 2013; 153(3): 503-6.
- 2 Biffi G, Tannahill D, Mccafferty J, Balasubramanian S. Quantitative visualization of DNA G-quadruplex structures in human cells. Nat Chem 2013; 5(3): 182-6.
- 3 Moye AL, Porter KC, Cohen SB, PhanT, Zyner KG, Sasaki N, et al. Telomeric G-quadruplexes are a substrate and site of localization for human telomerase. Nat Commun 2015; 6: 7643.
- 4 Shivalingam A, Izquierdo MA, Le Marois A, Vysniauskas A,

Suhling K, Kuimova MK, *et al.* The interactions between a small molecule and G-quadruplexes are visualized by fluorescence lifetime imaging microscopy. Nat Commun 2015; 6: 8178.

- 5 Murat P, Singh Y, Defrancq E. Methods for investigating G-quadruplex DNA/ligand interactions. Chem Soc Rev 2011; 40(11): 5293-307.
- 6 Paeschke K, Capra JA, Zakian VA. DNA replication through G-quadruplex motifs is promoted by the Saccharomyces cerevisiae Pifl DNA helicase. Cell 2011; 145(5): 678-91.
- 7 Micheli E, Altieri A, Cianni L, Cingolani C, Iachettini S, Bianco A, et al. Perylene and coronene derivatives binding to G-rich promoter oncogene sequences efficiently reduce their expression in cancer cells. Biochimie 2016; 125: 223-31.
- 8 Peters GM, Skala LP, Davis JT. A molecular chaperone for G4quartet hydrogels. J Am Chem Soc 2016; 138(1): 134-9.
- 9 Ambrus A, Chen D, Dai J, Jones RA, Yang D. Solution structure of the biologically relevant G-quadruplex element in the human c-MYC promoter. Implications for G-quadruplex stabilization. Biochemistry 2005; 44(6): 2048-58.
- 10 Seow N, Kirk Y, Yung LY. Detection of G-quadruplex formation via light scattering of defined gold nanoassemblies modulated by molecular hairpins. Bioconjug Chem 2016; 27(5): 1236-43.
- 11 Chatterjee S, Zagelbaum J, Savitsky P, Sturzenegger A, Huttner D, Janscak P, *et al.* Mechanistic insight into the interaction of BLM helicase with intra-strand G-quadruplex structures. Nat Commun 2014; 5: 5556.
- 12 Romanucci V, Marchand A, Mendoza O, D'alonzo D, Zarrelli A, Gabelica V, *et al*. Kinetic ESI-MS studies of potent anti-HIV aptamers based on the G-quadruplex forming sequence d(TGG GAG). ACS Med Chem Lett 2016; 7(3): 256-60.
- 13 Biffi G, Di Antonio M, Tannahill D, Balasubramanian S. Visualization and selective chemical targeting of RNA G-quadruplex structures in the cytoplasm of human cells. Nat Chem 2014; 6(1): 75-80.
- Henderson A, Wu Y, Huang YC, Chavez EA, Platt J, Johnson FB, *et al.* Detection of G-quadruplex DNA in mammalian cells. Nucleic Acids Res 2014; 42(2): 860-9.
- 15 Sissi C, Palumbo M. Telomeric G-quadruplex architecture and interactions with potential drugs. Curr Pharm Des 2014; 20(41): 6489-509.
- 16 Richard T. Wheelhouse DS, *et al.* Cationic porphyrins as telomerase inhibitors: the interaction of tetra-(N-methyl-4pyridyl) porphine with quadruplex DNA. J Am Chem Soc 1998; 120(13): 3261-2.
- 17 Bare GA, Liu B, Sherman JC. Synthesis of a single G-quartet platform in water. J Am Chem Soc 2013; 135(32): 11985-9.
- 18 Zhang S, Wu Y, Zhang W. G-quadruplex structures and their interaction diversity with ligands. Chem Med Chem 2014; 9(5): 899-911.
- 19 Zheng XH, Nie X, Liu HY, Fang YM, Zhao Y, Xia LX. TMPyP4 promotes cancer cell migration at low doses, but induces cell death at high doses. Sci Rep 2016; 6: 26592.
- 20 Rhodes D, Lipps HJ. G-quadruplexes and their regulatory roles in biology. Nucleic Acids Res 2015; 43(18): 8627-37.