



國立臺灣大學生命科學院分子與細胞生物學研究所

碩士論文

Institute of Molecular and Cellular Biology

College of Life Science

National Taiwan University

Master's Thesis

以單分子螢光共振能量轉移技術檢測 r(G₄C₂)重複序列

之構形變化

Exploring conformational changes of r(G₄C₂) tandem
repeats by using single-molecule FRET

王渝暄

Yu-Xuan Wang

指導教授：溫進德 博士

Advisor : Jin-Der Wen, Ph.D.

中華民國 113 年 7 月

July, 2024



國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書

MASTER'S THESIS ACCEPTANCE CERTIFICATE
NATIONAL TAIWAN UNIVERSITY

以單分子螢光共振能量轉移技術檢測 r(G4C2)重複序列之構形變化

Exploring conformational changes of r(G4C2) tandem repeats by using
single-molecule FRET

本論文係 王渝暄 (R10B43020) 在國立臺灣大學 分子與細胞生物學研究所 完成之碩士學位論文，於民國 113 年 7 月 17 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明。

The undersigned, appointed by the Institute of Molecular and Cellular Biology on July 17th, 2024 have examined a Master's Thesis entitled above presented by Yu-Xuan Wang (R10B43020) candidate and hereby certify that it is worthy of acceptance.

口試委員 Oral examination committee:

溫進德

李小川

李淑文

(指導教授 Advisor)

系（所、學位學程）主管 Director:

董桂華

致謝



漫長的求學生涯終於要告一段落了，萬分感謝溫老師的教導，在實驗結果不盡理想時，耐心的開導我，結果存在多種可能，不同的結果有不同的意義，並不代表實驗失敗，或許只是我們暫時無法解釋而已，謝謝老師在繁忙之中，修改程式編碼，讓我們可以從不同的面向解釋數據並完成本篇論文，儘管有些結果仍不完善，有一點可惜，但我相信學弟妹可以抽絲剝繭，從中找尋線索以完成 G₄C₂ RNA 計畫。

碩一在蔡老師的實驗室也學習到很多，謝謝蔡老師的教導，謝謝當時教導我的鴻杰學長，在我壓力太大時，讓我知道我還有其它選擇，謝謝正勇學長不吝教導實驗訣竅並給予建議，謝謝柏翔、小賴、泓宇學長，在我缺乏實驗室經驗時，耐心的教學，通勤台大上課時，幫忙顧魚、顧菌、顧細胞，雖然他們可能不會看見，但是真心感謝他們，一直有點抱歉後來沒有好好和大家說一聲。

謝謝曼妤確診還耐心的跟我說明實驗室經歷，也謝謝魏小姐和所長的幫忙，再次感謝溫老師願意讓我到此學習，謝謝鈺婕教我 FRET 技術，謝謝曼妤、瑀彤和名巧，讓實驗室氣氛總是熱鬧活絡，有妳們在真的很開心！謝謝楊世綸和我討論 G₄C₂，總是默默的做事，讓大家有好的實驗環境，祝你順利發表！謝謝郁涵在我寫論文時，和我閒聊抒壓，謝謝恩慈和我一起洗 slide，謝謝王碩和名巧鬥嘴，謝謝翰彧帶伴手禮給大家。

最後不免俗的謝謝媽媽養我，謝謝林先生總是接收我的負面情緒，謝謝莫居朵開導我各式各樣的煩惱，和高中隊友們偶爾聚餐，謝謝經濟和精神支柱們，還有一直陪著我的可爾必思，希望大家都可以平安健康、快快樂樂！

其實還有很多大大小小的事情值得感謝，但是我不想寫論文了，簡而言之，非常感謝大家的幫助，祝未來實驗順利，工作順利，再次謝謝大家！



摘要

ALS 和 FTD 的病因之一為 *C9ORF72* 基因中的 GGGGCC 重複序列異常擴增，致病機制與轉錄出的多重複 G_4C_2 RNA 有關，其結構多型性相當複雜，可能在細胞核內形成 RNA foci 以結合各種 RNA-binding protein，導致蛋白質功能異常，而 RNA foci 的形成可能和 G_4C_2 RNA 的結構密切相關。此外，離子種類也會影響 G_4C_2 RNA 的結構。至今， G_4C_2 RNA 的結構多型性使其折疊方式備受爭議，我們將藉由 single-molecule 技術研究 G_4C_2 RNA 結構的特性以理解相關疾病的潛在分子機制。

文獻表明 $d(G_4C_2)_4$ (含有四重複序列的 G_4C_2 DNA) 於 KCl 鹽溶液中會形成 G-quadruplex，而我們在實驗中也發現互補的 antisense 難以結合並展開該結構，然而在相同條件下，antisense 得以部分展開 $r(G_4C_2)_4$ (含有四重複序列的 G_4C_2 RNA)，顯示 RNA 形成之結構較 DNA 不穩定。而五重複的 $r(G_4C_2)_5$ 展開比例減少，揭示重複次數和結構穩定性相關。此外，RNA 在 $MgCl_2$ 的溶液中幾乎完全被展開，表明離子種類會影響結構多型性和穩定性。後續以識別 G-quadruplex 的 BG4 抗體搭配 photobleaching 實驗進行初步檢測，結果顯示在 $MgCl_2$ 溶液中， $r(G_4C_2)_4$ 可能形成 tetramer G-quadruplex，而且 flanking sequence 也會影響其結構多型性。在初步解析 G_4C_2 RNA 的結構特性後，我們進一步研究分子間的交互作用，結果顯示 G_4C_2 RNA 於 KCl 中容易發生交互作用但不易維持，相對而言，於 $MgCl_2$ 中不易發生交互作用卻得以維持，於 NH_4Cl 中不僅不易發生交互作用亦難以維持。此外， $r(G_4C_2)_4$ 似乎形成某種特別的構形，而此構形不易發生分子間的交互作用。

綜上所述，我們推論 G_4C_2 RNA 將形成 hairpin 或 G-quadruplex 結構並且維持動態平衡，在 $MgCl_2$ 中有利於形成 hairpin，而 KCl 中有利於形成 G-quadruplex，此外，hairpin loop 可能為分子間交互作用的潛在位點，而 $MgCl_2$ 有助於維持 loop-loop interactions，文獻亦表明該結構可能導致 RNA-binding protein 結合，以上現象符合 RNA foci 的致病機制，值得未來研究並驗證。

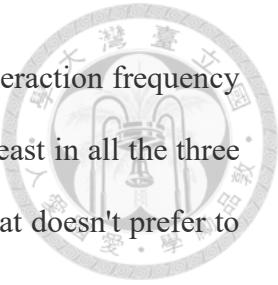
關鍵詞： G_4C_2 RNA、單分子技術、結構多型性、離子影響、hairpin 交互作用



Abstract

The abnormal expansion of the GGGGCC tandem repeats in the human *C9ORF72* gene is the most common genetic cause of neurological disorders Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) and Frontotemporal Dementia (FTD). One of the proposed disease mechanisms is the toxicity of bidirectionally transcribed repeat-containing RNAs, which result in the sequestration of RNA-binding proteins into RNA foci. The formation of RNA foci is closely related to the structure of G₄C₂ repeats, which is affected by the type of ions. However, the structural polymorphism of the G₄C₂ repeat sequence has elicited a considerable discussion regarding its folding variability; especially the more the repeat number, the higher the structural complexity. We aim to study the structural characteristics of G₄C₂ RNA by using single-molecule techniques to understand the potential molecular mechanisms of pathogenesis.

It has been reported that d(G₄C₂)₄ forms G-quadruplexes in KCl. Consistently, we found that the complementary antisense strand was hardly to form duplexes with d(G₄C₂)₄. However, the antisense strand partially unfolded r(G₄C₂)₄ under the same conditions, indicating that the structure of r(G₄C₂)₄ is less stable than DNA. The extent of antisense-mediated unfolding of r(G₄C₂)₅ is less than r(G₄C₂)₄, suggesting that the number of repeats correlates with structural stability. Furthermore, RNA was nearly completely unfolded in MgCl₂, indicating that the type of ions affects structural polymorphism and stability. Photobleaching experiments with the BG4 antibody, which recognizes G-quadruplexes, showed that r(G₄C₂)₄ might form tetramer G-quadruplexes in MgCl₂ and the formation was affected by flanking sequences. After preliminarily analyzing the structural characteristics of G₄C₂ RNA, we further studied their intermolecular interactions. The results showed that the binding between G₄C₂ RNA molecules was more frequent in KCl but the overall association duration was shorter, whereas the binding was



less frequent in MgCl₂ but was more stable. Besides, the dynamic interaction frequency and the intermolecular association of G₄C₂ RNA in NH₄Cl were the least in all the three ions. Additionally, r(G₄C₂)₄ seems to form a specific conformation that doesn't prefer to participate in intermolecular interactions.

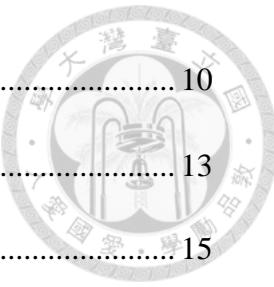
In conclusion, we propose that G₄C₂ RNA dynamically forms hairpin or G-quadruplex structures, with KCl favoring the formation of G-quadruplexes, and MgCl₂ favoring the hairpins. In addition, hairpin loops may be potential sites for intermolecular interactions, and putative loop-loop interactions are relatively stable in MgCl₂. It has been suggested that these structures may be the binding sites of proteins. Our observations shed light on the pathogenic mechanisms of RNA foci and are worthy of future research and verification.

Keywords: G₄C₂ RNA、single molecule technology、structural polymorphism、ion effect、hairpin interaction

目次

| | |
|--------------------------------|-----|
| 口試委員審定書 | i |
| 致謝 | ii |
| 摘要 | iii |
| Abstract..... | iv |
| 目次 | vi |
| 圖次 | ix |
| 表次 | x |
| 第一章 緒論 | 1 |
| 1.1 Short tandem repeats..... | 1 |
| 1.2 GGGGCC 的致病機制..... | 1 |
| 1.3 GGGGCC 結構多型性..... | 2 |
| 1.4 單分子技術 | 3 |
| 1.5 single-molecule FRET | 3 |
| 1.6 研究動機與目的 | 4 |
| 第二章 材料與方法 | 5 |
| 2.1 材料 | 5 |
| 2.1.1 質體 | 5 |
| 2.1.2 Oligomers | 5 |
| 2.2 方法 | 8 |
| 2.2.1 質體構築 | 8 |





| | |
|--|-----------|
| 2.2.2 In vitro transcription..... | 10 |
| 2.2.3 Annealing condition | 13 |
| 2.2.4 Single-molecule 實驗..... | 15 |
| 2.2.5 純化 BG4 scFv anti-G-quadruplex antibody | 17 |
| 2.2.6 Bulk 實驗 | 19 |
| 第三章 結果 | 21 |
| 3.1 In vitro transcription | 21 |
| 3.2 Annealing test | 22 |
| 3.3 smFRET 實驗 | 23 |
| 3.3.1 d/r($G_4C_2)_n$ -2H 於三種鹽離子條件，表現至少兩種結構特性 | 23 |
| 3.3.2 d($G_4C_2)_3$ -2H 於三種鹽離子條件之展開時間測試 | 24 |
| 3.3.3 d/r($G_4C_2)_n$ -2H 展開比例： $MgCl_2 > NH_4Cl > KCl$ | 24 |
| 3.3.4 d/r($G_4C_2)_n$ -2H 展開比例之 DNA 或 RNA 差異 | 25 |
| 3.3.5 d/r($G_4C_2)_n$ -2H 展開比例之重複次數差異 | 26 |
| 3.4 Bulk 實驗..... | 26 |
| 3.4.1 檢測 d/r($G_4C_2)_4$ -Cy3 於不同鹽離子條件之結構多型性 | 26 |
| 3.4.2 BG4 antibody 識別 d/r($G_4C_2)_4$ -Cy3 於不同鹽離子條件之結構多型性 | 27 |
| 3.4.3 r($G_4C_2)_4$ -Cy3 於 $MgCl_2$ 條件之 flanking sequence effect..... | 28 |
| 3.5 Photobleaching 實驗..... | 29 |
| 3.6 Interaction 實驗 | 29 |
| 3.6.1 r($G_4C_2)_n$ -2H 和 r($G_4C_2)_n$ -NH-Cy5UTP interaction 之數據分析 | 29 |



| | |
|--|----|
| 3.6.2 r(G ₄ C ₂) _n -2H 和 r(G ₄ C ₂) _n -NH-Cy5UTP interaction 之 Half occupancy... | 31 |
| 3.6.3 r(G ₄ C ₂) _n -2H 和 r(G ₄ C ₂) _n -NH-Cy5UTP 之 dynamic interaction | 32 |
| 3.6.4 r(G ₄ C ₂) _n -2H 和 r(G ₄ C ₂) _n -NH-Cy5UTP 以相似形式結合且速率相近 ... | 33 |
| 3.6.5 r(G ₄ C ₂) _n -2H 和 r(G ₄ C ₂) _n -NH-Cy5UTP 以兩種形式解離 | 33 |
| 3.6.6 r(G ₄ C ₂) _n -2H 和 r(G ₄ C ₂) _n -NH-Cy5UTP 之相對慢速解離速率 | 34 |
| 3.6.7 r(G ₄ C ₂) _n -2H 和 r(G ₄ C ₂) _n -NH-Cy5UTP 之相對快速解離速率 | 34 |
| 第四章 討論 | 36 |
| 參考文獻 | 39 |



圖次

| | |
|--|----|
| 圖 1、質體示意圖 | 43 |
| 圖 2、DNA 模板和對應的 $r(G_4C_2)_n$ 序列示意圖 | 44 |
| 圖 3、 $r(G_4C_2)_n$ transcripts | 45 |
| 圖 4、single-molecule 實驗設計 | 46 |
| 圖 5、檢測 single-molecule 實驗之 $d/r(G_4C_2)_n\text{-}2\text{H}$ annealing 情形 | 47 |
| 圖 6、 $d/r(G_4C_2)_n\text{-}2\text{H}$ 於三種鹽離子條件之 FRET 分布 | 49 |
| 圖 7、 $d(G_4C_2)_3\text{-}2\text{H}$ 於三種鹽離子條件下，加入 antisense 後隨時間之展開比例 ... | 50 |
| 圖 8、 $d/r(G_4C_2)_n\text{-}2\text{H}$ 於三種鹽離子條件，加入 antisense 之 $\text{FRET} < 0.5$ 的占比.... | 51 |
| 圖 9、檢測 $d/r(G_4C_2)_4\text{-Cy}3$ 於不同鹽離子條件之結構多型性 | 52 |
| 圖 10、純化 BG4 scFv anti-G-quadruplex antibody | 54 |
| 圖 11、以 BG4 antibody 識別 $d/r(G_4C_2)_4\text{-Cy}3$ 於不同鹽離子條件之結構多型性 | 55 |
| 圖 12、 $r(G_4C_2)_4$ 於 MgCl_2 條件之結構多型性..... | 56 |
| 圖 13、分子間交互作用實驗之數據分析示例 | 57 |
| 圖 14、 $r(G_4C_2)_n\text{-}2\text{H}$ 和 $r(G_4C_2)_n\text{-NH-Cy}5\text{UTP}$ interaction 之 Half occupancy 分析 ... | 60 |
| 圖 15、 $r(G_4C_2)_n\text{-}2\text{H}$ 和 $r(G_4C_2)_n\text{-NH-Cy}5\text{UTP}$ 之 dynamic interaction 分析 | 62 |
| 圖 16、 $r(G_4C_2)_n\text{-}2\text{H}$ 和 $r(G_4C_2)_n\text{-NH-Cy}5\text{UTP}$ 以兩種形式解離 | 63 |
| 圖 17、 $r(G_4C_2)_n\text{-}2\text{H}$ 和 $r(G_4C_2)_n\text{-NH-Cy}5\text{UTP}$ 之慢速解離速率比較 | 64 |
| 圖 18、 $r(G_4C_2)_n\text{-}2\text{H}$ 和 $r(G_4C_2)_n\text{-NH-Cy}5\text{UTP}$ 之相對快速解離速率比較 | 65 |



表次

| | |
|--|----|
| 表 1、 $d/r(G_4C_2)_n-2H$ 於三種鹽離子條件，加入 antisense 後分子呈現 $FRET < 0.5$ 的比例 | 66 |
| 表 2、 $d(G_4C_2)_3-2H$ 於三種鹽離子條件下，加入 antisense 後隨時間之展開百分比 .. | 67 |
| 表 3、 $r(G_4C_2)_n-2H$ 和 $r(G_4C_2)_n-NH-Cy5UTP$ 於三種鹽離子條件之交互作用統計 .. | 68 |



第一章 緒論

1.1 Short tandem repeats

Human genome – 細胞內所有的 DNA 序列，其中 short tandem repeats 約佔 3%，short tandem repeats 是 2 ~ 6 個核苷酸的重複序列(Willems et al., 2014)，例如：(CAG) n 、(GGGCC)n，重複次數因人而異，故可應用於身分鑑定(Butler, 2006)。

DNA 複製過程會解開雙股螺旋，被解開的序列可能會形成 loop，倘若 DNA 繼續複製且沒有被修復將致使基因突變，STR 因不斷重複（例如：每一次 CAG 重複便有可能形成一個 loop），突變機率上升，重複次數隨之擴增(Ellegren, 2004)，STR 可能位於 coding 或 non-coding region (Fujino & Nagai, 2022)，而 wild-type allele 的重複次數通常小於 20，倘若 STR 重複次數大於 30 則可能導致疾病發生(Renton et al., 2011)，1991 年確定了 fragile X syndrome 的致病起因為 FMR1 基因中的 CGG 重複序列異常擴增(Kremer et al., 1991)，至今已確定了 40 多種和 STR 異常擴增相關的疾病，包含一些神經退化性疾病像是 Huntington's disease (HD)、amyotrophic lateral sclerosis (ALS)、frontotemporal dementia (FTD) 等等，HD 是由於 CAG 重複序列異常擴增引起的(Fujino & Nagai, 2022)，ALS 和 FTD 則是 C9ORF72 基因中的 GGGGCC 重複序列異常擴增導致(DeJesus-Hernandez et al., 2011)。

1.2 GGGGCC 的致病機制

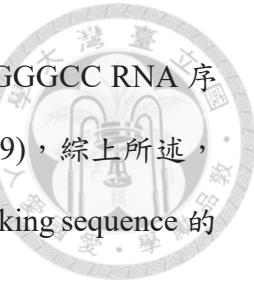
GGGGCC 重複序列位於 C9ORF72 基因的 intron 1，介於 non-coding exons 1a 以及 1b 之間(Yang et al., 2020)，GGGGCC 重複序列的異常擴增會在細胞中引起各種現象，推測這些現象最終可能導致疾病發生(Breevoort et al., 2022)，其一為降低 C9ORF72 基因的轉錄機制，造成蛋白質表現量下降(van Blitterswijk et al., 2015)，其二為 RAN 轉譯生成 toxic dipeptide repeat protein (DPR)，其三為轉錄了大量的 GGGGCC 和 GGCCCC RNA，可能折疊成各式各樣的構形並於細胞核內形成 RNA



foci 以結合各種 RNA-binding protein，導致這些蛋白質無法正常發揮作用(Gendron & Petrucelli, 2018)，RNA foci 的形成可能和 GGGGCC RNA 的結構密切相關。

1.3 GGGGCC 結構多型性

核苷酸序列最普遍的配對方式是依據 Watson-Crick 鹼基配對並以 B-form 螺旋形式存在，然而，結構的折疊取決於許多因素，例如：non-Watson-Crick 鹼基配對、序列重複的次數、序列為 DNA 或 RNA、環境中的離子種類或是濃度等等(Fay et al., 2017)，因此，GGGGCC 重複序列可能折疊成各種不同的結構像是 hairpin 或 G-quadruplex，根據其為 DNA 或是 RNA，分子內或是分子間作用力，亦可能形成更加複雜且多樣的構形，G-quadruplex 是由 guanine-rich 的核苷酸序列（可能是單一條亦或是多條）經由 Hoogsteen 鹼基配對形成 G-quartet 並堆疊而成（離子種類和 G-quartet 結構的穩定性息息相關），依據其堆疊方向的差異又可區分為 parallel 或 antiparallel (Bochman et al., 2012)，在 *in vitro* 且鉀離子存在的情況下，GGGGCC DNA 形成 parallel G-quadruplex，而 $d(G_4C_2)_4$ 却形成 antiparallel G-quadruplex，表示 GGGGCC DNA 序列的重複次數會影響其構形(Šket et al., 2015)，在 *in vitro* 且沒有離子或是鈉離子存在的情況下， $d(G_4C_2)_4$ 似乎形成 hairpin，表示離子的存在與否或是離子的類型會影響 GGGGCC DNA 重複序列的構形(Haeusler et al., 2014)，再再說明了 GGGGCC DNA 重複序列的結構多型性，DNA 在細胞中通常以雙股形式存在，而 RNA 則以單股形式存在，可能形成 hairpin、loop、bulge、pseudoknot 等多種結構，相較 DNA 複雜許多，故 GGGGCC RNA 重複序列是否會形成 G-quadruplex 眾說紛紛，由於 DNA 和 RNA 最根本的差異（thymine 或 uracil，去氫核糖核酸或核糖核酸），GGGGCC RNA 重複序列若是形成 G-quadruplex 會以 parallel 形式為主要堆疊方式(Fay et al., 2017)，當 GGGGCC RNA 序列重複次數不同，circular dichroism 光譜的 pattern 有所差異，此外，Electrophoretic migration 結果顯示 GGGGCC RNA 的結構受到 flanking sequence 影響，顯示出 GGGGCC RNA



的結構多型性(Reddy et al., 2013)，然而，2019 年的文獻指出當 GGGGCC RNA 序列重複次數擴增，在 *in vitro* 的折疊形式為 hairpin (Wang et al., 2019)，綜上所述，GGGGCC RNA 重複序列的結構會受到重複次數、離子類型和 flanking sequence 的影響，值得深入探究。

1.4 單分子技術

細胞是生物執行功能的基本單位(Ellinger & Ellinger, 2014)，在普遍的生物學實驗當中，常以動植物、細菌或是細胞進行研究，即便是細胞實驗，細胞數目動輒百萬，雖然是相同類型的細胞，仍舊存在個體差異，更遑論細胞內部更為精細的胞器、蛋白質、甚至是 DNA 或是 RNA，單一條或是多條的相同序列 DNA 或 RNA 片段可能折疊成不同的結構，因應分子內或是分子間氫鍵可能存在多種構形組合，單分子技術可以固定單一分子，施加外力以觀測單一分子現象，例如：光鉗技術利用雷射固定 coating 抗體的 bead，便可透過抗體結合單一分子，再施加外力觀測該分子的構形變化，單分子技術亦可固定單一分子並標定螢光進行觀測，隨著光學技術的演進，更加清晰的單分子成像提供了直觀的分子證據，例如：共軛焦螢光顯微鏡、全反射螢光顯微鏡 (TIRF) 和 fluorescence resonance energy transfer (FRET)，應用單分子技術使 DNA 複製、核醣體轉譯、motor protein 的動力學等機制更加明瞭。

1.5 single-molecule FRET

1948 年 Theodor Förster 發現當兩個 chromophore 分子距離非常接近，且其中一個分子的發射光譜和另一對應分子的吸收光譜重疊時，便可引起共振使其能量轉移以換算鄰近分子之間的距離(Förster, 1948)，此機制叫作 Förster resonance energy transfer(FRET)，當 chromophore 為螢光分子時，又叫作 fluorescence resonance energy transfer，常見的 dye-pair 有 CFP-YFP、Cy3-Cy5、Alexa546-Alexa647……其中，提供發射光譜的分子為 donor 而接收光譜的分子為 acceptor，例如：550nm 波長的光



激發了 Cy3 分子並釋出 650 nm 的光，而 Cy5 分子接收了 570 nm 的光並釋出 670 nm 的光(Wade et al., 2017)，故 Cy3 為 donor 而 Cy5 為 acceptor，FRET 機制配合 TIRF 顯微鏡和精密的感光儀器使觀測單一分子和鄰近分子之間的距離成為可能，當 Cy3 和 Cy5 之間的距離小於 10nm，則 Cy3 釋出的螢光會被 Cy5 接收，依據兩個分子之間的距離遠近，螢光分子的強度隨之改變，越近則 Cy3 強度減弱而 Cy5 強度提高，越遠則 Cy3 強度提高而 Cy5 強度減弱，故可應用於檢測蛋白質分子之間是否相互作用，single-molecule FRET 亦可檢測 DNA 或 RNA 於特定條件下，結構是否轉變。

1.6 研究動機與目的

C9ORF72 基因中的 GGGGCC 重複序列異常擴增是 ALS 和 FTD 的可能病因，致病機制多樣且複雜，在細胞核中形成 RNA foci 致使特定蛋白質失去其作用為主要因素之一。RNA foci 的形成和 GGGGCC RNA 的結構息息相關，然而，GGGGCC 序列的結構多型性使其折疊方式備受爭議。我們藉由 single-molecule FRET 技術，研究 $r(G_4C_2)_n$ 之重複次數差異和離子的關聯性，進而解析 $r(G_4C_2)_n$ 的特性將有助於理解相關疾病的潛在分子機制。綜上所述，我們的研究目的將探討和其結構相關之特性，藉由重複次數和離子差異確認相關構形，初步探究該構形和兩側序列的影響，試圖理解重複次數和離子差異將如何影響 G_4C_2 RNA 交互作用。

第二章 材料與方法



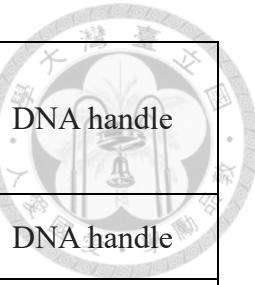
2.1 材料

2.1.1 質體

pT7SP6Vec (許鈺婕論文, 2023) 具有 T7 和 SP6 promoter，楊世綸藉由 EcoRI 和 BsrGI cutting sites 將 d(G₄C₂)₃ 或 d(G₄C₂)₅ 接入，構築 pT7SP6-3x 和 pT7SP6-5x (圖 1A)。浩盟生技代理購入 Addgene pSANG10-3F-BG4 #55756 (圖 1B)。

2.1.2 Oligomers

| 名稱 | 序列 (5' → 3') | 用途 |
|-----------------|---|--------------|
| T7SP6-4x-F | AATTGGGGCCGGGGCCGGGGCC GGGCCT | Construction |
| T7SP6-4x-R | GTACAGGCCCGGCCCGGCC GGCCCCG | Construction |
| T7SP6-4x-DNA | TTGGGTACCATTAGGTGACACTA TAGAATTGGGGCCGGGGCCGGG GCCGGGCCTGTACACACCACGC GACCCG | FRET sample |
| T7SP6-3x-DNA | TTGGGTACCATTAGGTGACACTA TAGAATTGGGGCCGGGGCCGGG GCCTGTACACACCACGCGACCCG | FRET sample |
| 5'h-T7SP6-5'Cy3 | Cy3-TTCTATAGTGTACCTAAATG GTACCCAATTGGCCC | DNA handle |



| | | |
|---|--|---------------|
| pGAA_3'handle_Cy5_biotin | Bio-CGGGTCGCGTGGTGTACAT-Cy5 | DNA handle |
| pGAA_3'handle_biotin | Bio-CGGGTCGCGTGGTGTACAT | DNA handle |
| pGAA_3'handle_Cy5 | CGGGTCGCGTGGTGTACAT-Cy5 | DNA handle |
| 5'-d(G ₄ C ₂) ₃ -Cy3-3' | GGGGCCGGGGCCGGGGCCT-Cy3 | Bulk |
| 5'-d(G ₄ C ₂) ₄ -Cy3-3' | GGGGCCGGGGCCGGGGCCGGGG CCT-Cy3 | Bulk |
| d(G ₄ C ₂) ₄ -hairpin-Cy3 | GAGGCTGAAGCTGAGGCTGAAGC CT-Cy3 | Bulk |
| d(G ₄ C ₂)-hairpin-F | AATTGAGGCTGAAGCTGAGGCT GAAGCCT | *Construction |
| d(G ₄ C ₂)-hairpin-R | GTACAGGCTTCAGCCTCAGCTTC AGCCTCG | *Construction |
| mG ₄ C ₂ -for | TAGTCCAGTGTGGTGGAATT CGG GCCCGGG | *Construction |
| mG ₄ C ₂ -rev | CTGTGCTGGATATCTGTACAATT C CCCGGC | *Construction |
| p(G ₄ C ₂) ₂₅ -F-EcoRI | TTTGTAACTTAAGAAGGAGAT ATAGAATTCTAGGGGCCGGGG | *Construction |



| | | |
|---|--|-----------------|
| BsrGI-C4G2-EcoRI | CATTGC GTTCTGTACATGGCCCCG GCCCGGCCCCGGCCCCGGCCCC GGCCCCGGCCCCGGCCCCGGCCC CGGCCCCGGCCCCGGCCCCGGCC CCGGCCCCGGCCCCGGCCCCGGC CCCGGCCCCGGCCCCGGCCCCGG CCCCGGCCCCGGCCCCGGCCCCG GCCCTAGAATTCTATATCTCCTTC TTAAAG | *Construction |
| d(AGCCCC)3 | AGCCCCAGCCCCAGCCCC | *FRET antisense |
| d(G ₄ C ₂) ₄ -hairpin-with handle | TTGGGTACCATTAGGTGACACTA TAGAATTGAGGCTGAAGCTGAG GCTGAAGCCTGTACACACCACGC GACCCG | *FRET sample |
| T7P | TAATACGACTCACTATAG | *RNA template |
| tR4UA | mUmAGGCCCCGGCCCCGGCCCCG GCCCTATAGTGAGTCGTATTA | *RNA template |
| tGGAR4 | mUmGGGCCCCGGCCCCGGCCCCG GCCCTATAGTGAGTCGTATTA | *RNA template |
| 5'-Cy3-rA(G ₄ C ₂) ₄ A-3' | Cy3-AGGGGCCGGGGCCGGGGCC GGGGCCA | *FRET 、 Bulk |
| 5'-Cy5-rA(G ₄ C ₂) ₄ A-3' | Cy5-AGGGGCCGGGGCCGGGGCC GGGGCCA | *FRET 、 Bulk |

註解：米字符號（*）為本文未使用之 oligo。



2.2 方法

2.2.1 質體構築

製備 pT7SP6-EcoRI-BsrGI vector

使用 EcoRI-HF (NEB, #R3101S) 和 BsrGI-HF (NEB, #R3575S) 處理 pT7SP6-5x (from 世綸)，使其線性化，加入 FastAP (Thermo Fisher, #EF0651) 使 DNA 末端 dephosphorylation，避免 vector self-ligation，依據下表配製溶液並於 37°C 水浴 4 小時，再使用 QIAquick PCR & Gel Cleanup Kit (QIAGEN, #28506) 純化 vector。

| Reagents | Final conc. | Amount |
|----------------------|-------------|-----------------------------------|
| 10x rCutSmart buffer | 1x | — |
| pT7SP6-5x | 0.03 µg/µl | 3 µg |
| EcoRI-HF | 0.4 U/µl | 40 U |
| BsrGI-HF | 0.4 U/µl | 40 U |
| FastAP | 0.02 U/µl | 2 U |
| Total volume | | Fill ddH ₂ O to 100 µl |

製備 insert

使用 T4 PNK (NEB, #M0201S) 將兩段單股 DNA 之 5'端 phosphorylation，依據下表配製溶液並於 37°C 乾浴 30 分鐘，待作用完畢，再以 80°C 乾浴 5 分鐘使 T4 PNK inactivation，再於 60 分鐘從 80°C 緩慢降溫至 10°C 以 anneal 兩段單股 DNA。

| Reagents | Final conc. | Amount |
|----------------------|-------------|---------------------------------|
| 10x T4 ligase buffer | 1x | — |
| Forward oligomers | 0.2 µM | — |
| Reverse oligomers | 0.2 µM | — |
| T4 PNK | 0.2 U/µl | 10 U |
| Total volume | | Fill ddH ₂ O to 50µl |



Ligation

使用 T4 DNA ligase (NEB, #M0202S) 將 d(G₄C₂)₄ insert 接至 pT7SP6-EcoRI-BsrGI vector 以完成質體構築，依據下表配製溶液並於 25°C 乾浴 15 分鐘。

| Reagents | Final conc. | Amount |
|---------------------------|-------------|---------------------------------|
| 10x T4 ligase buffer | 1x | — |
| insert | 0.04 μM | — |
| pT7SP6-EcoRI-BsrGI vector | 0.014 μM | — |
| T4 DNA ligase | 20 U/μl | 400 U |
| Total volume | | Fill ddH ₂ O to 20μl |

Transformation

於 37°C incubator 預熱含有 50 mg/l ampicillin (MDBio, #101-69-52-3) 的 LB (FocusBio, #LBB500) agar (FocusBio, #IBA-AGAR) plate，取 10 μl ligation plasmid mixture 加至 100 μl XL-10 competent cells (Stratagene, #200315)，置於冰上 5 分鐘以進行 transformation，取 90 μl S.O.C medium (Thermo Fisher, #15544034) 於 eppendorf 並加入 10 μl transformation mixture，pipetting 混勻後，取 10 μl 回養菌液加至回溫的 LB-agar plate (50 mg/l ampicillin) 並使用玻棒塗盤，將其置於 37°C incubator 培養 16~18 小時。

Plasmid extraction

取 5 ml 含有 100 μg/ml ampicillin 的 LB 於菌管，使用滅菌牙籤挑選 single colony 置於菌管，於 37°C, 250 rpm incubator 培養 16~18 小時，取 1 ml 菌液定序 (pT7SP6-4x: 基龍米克斯, SB221110053) 並使用 PrestoTM Mini Plasmid Kit (Geneaid, # PDH100) 純化剩餘菌液之 plasmid。



質體存放位置

| 名稱 | 存放位置 | 用途 |
|--|--------------|------------|
| pT7SP6-4x | Bank (6), D1 | FRET、Bulk |
| pT7SP6-d(G ₄ C ₂) ₄ -hairpin | Bank (5), H1 | *FRET、Bulk |
| pT7SP6-10x | Bank (6), D2 | *FRET、Bulk |
| pSANG10-3F-BG4 | Bank (5), G7 | 蛋白質純化 |

註解：米字符串號（*）為本文未使用之質體。

菌株存放位置

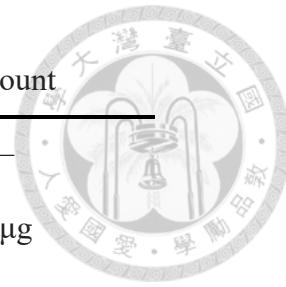
| 名稱 | 存放位置 | Host cell |
|--|---------------------|-----------|
| pT7SP6-d(G ₄ C ₂) ₄ -hairpin | Box 8 (cloning), A6 | *XL-10 |
| pSANG10-3F-BG4 | Box B (protein), G1 | BL21-RIPL |

註解：米字符串號（*）為本文未使用之菌株。

2.2.2 In vitro transcription

Restriction enzyme digestion

使用 BsrGI-HF 或 BamHI-HF (NEB, #R3136S) 將 pT7SP6-nx 線性化，依據下表配製溶液並於 37°C 水浴 4 小時，前者可於後續轉錄收獲 r(G₄C₂)_n-NH，後者可於後續轉錄收獲 r(G₄C₂)_n-1H、r(G₄C₂)_n-2H，再使用 QIAquick PCR & Gel Cleanup Kit 純化 linear plasmid。



| Reagents | Final conc. | Amount |
|----------------------|-------------|-----------------------------------|
| 10x rCutSmart buffer | 1x | — |
| pT7SP6-nx | 0.03 μg/μl | 5 μg |
| BsrGI-HF or BamHI-HF | 0.4 U/μl | 40 U |
| Total volume | | Fill ddH ₂ O to 100 μl |

r(G₄C₂)_n-2H

使用 HiScribe T7 Quick High Yield RNA Synthesis Kit (NEB, #E2050S) 進行 in vitro transcription，以 pT7SP6-nx-BamHI 作為 template 可收獲 r(G₄C₂)_n-2H，依據下表配製溶液並於 37°C 作用 16 小時，再加入 30 μl ddH₂O 和 2 μl DNase I 於 37°C 水浴 15 分鐘以移除 DNA template，再使用 Monarch RNA Cleanup Kit 純化 r(G₄C₂)₃-2H、r(G₄C₂)₄-2H，並使用 MEGAclear Transcription Clean-Up Kit (Thermo Fisher, #AM1908) 純化 r(G₄C₂)₅-2H。

| Reagents | Final conc. | Amount |
|---|---------------|----------------------------------|
| NTP buffer mix | 10 mM | — |
| r(G ₄ C ₂) _n template | 25 ~ 40 ng/μl | 0.5 ~ 1 μg |
| DTT, 100 mM | 5 mM | — |
| T7 RNA polymerase Mix | 5 U/μl | 100 U |
| Total volume | | Fill ddH ₂ O to 20 μl |

r(G₄C₂)_n-NH、r(G₄C₂)_n-1H

使用 HiScribe SP6 RNA Synthesis Kit(NEB, #E2070S)進行 in vitro transcription，以 pT7SP6-nx-BsrGI 作為 template 可收獲 r(G₄C₂)_n-NH，以 pT7SP6-nx-BamHI 作為 template 可收獲 r(G₄C₂)_n-1H，依據下表配製溶液並於 37°C 作用 16 小時，再加入

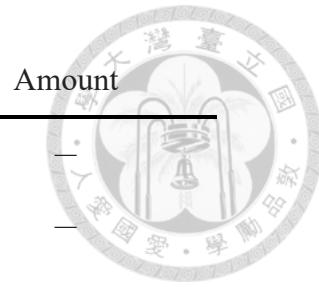


25 μ l ddH₂O 和 2 μ l DNase I 於 37°C 水浴 15 分鐘以移除 DNA template，再使用 Monarch RNA Cleanup Kit (NEB, #T2040S) 純化。

| Reagents | Final conc. | Amount |
|---|--------------|---------------------------------------|
| 10x SP6 buffer | 1x | — |
| ATP, 50 mM | 5 mM | — |
| GTP, 50 mM | 5 mM | — |
| CTP, 50 mM | 5 mM | — |
| UTP, 50 mM | 5 mM | — |
| r(G ₄ C ₂) _n template | — | 0.5 ~ 1 μ g |
| SP6 RNA polymerase Mix | 2 U/ μ l | 50 U |
| Total volume | | Fill ddH ₂ O to 25 μ l |

r(G₄C₂)_n-NH-Cy3UTP、r(G₄C₂)_n-NH-Cy5UTP

使用 Cy3-UTP(Enzo, #ENZ-42505)或 Cy5-UTP(Enzo, #ENZ-42506)以 HiScribe SP6 RNA Synthesis Kit 進行 in vitro transcription，依據下表配製溶液並於 37°C 作用 16 小時，再加入 25 μ l ddH₂O 和 2 μ l DNase I 於 37°C 水浴 15 分鐘以移除 DNA template，再使用 Monarch RNA Cleanup Kit 純化。



| Reagents | Final conc. | Amount |
|---|--------------|----------------------------------|
| 10x SP6 buffer | 1x | — |
| ATP, 50mM | 5 mM | — |
| GTP, 50mM | 5 mM | — |
| CTP, 50mM | 5 mM | — |
| UTP, 37.5mM | 1.2 ~ 1.5 mM | — |
| Cy3-UTP or Cy5-UTP, 10mM | 0.2 ~ 1.5 mM | — |
| r(G ₄ C ₂) _n template | — | 0.5 ~ 1 μg |
| SP6 RNA polymerase Mix | 2 U/μl | 50 U |
| Total volume | | Fill ddH ₂ O to 25 μl |

2.2.3 Annealing condition

Annealing buffer 配製

| Reagents | Final conc. |
|-----------------------|---|
| 10x annealing buffer- | 20 mM Tris-HCl, pH8.0 (Thermo Fisher, AM9855G) |
| NH ₄ Cl | 200 mM NH ₄ Cl (SIGMA, #A9434) |
| 10x annealing buffer- | 20 mM Tris-HCl, pH8.0 |
| MgCl ₂ | 10 mM MgCl ₂ (Thermo Fisher, #AM9530G) |

d/r(G₄C₂)_n-2H for smFRET 實驗

依據下表配製溶液並於 85°C 作用 1 分鐘，-1°C/min 至 25°C。



| Reagents | Final conc. |
|--|----------------------------------|
| 10x annealing buffer-NH ₄ Cl | 1x |
| 5'h-T7SP6-5'Cy3 | 1 μM |
| pGAA_3'handle_Cy5_biotin | 0.5 μM |
| d/r(G ₄ C ₂) _n -2H | 1 μM |
| Total volume | Fill ddH ₂ O to 20 μl |

r(G₄C₂)_n-2H for interaction 實驗

依據下表配製溶液並於 70°C 作用 1 分鐘，-1°C/min 至 25°C。

| Reagents | Final conc. |
|--|----------------------------------|
| 10x annealing buffer-NH ₄ Cl | 1x |
| 5'h-T7SP6-5'Cy3 | 1 μM |
| pGAA_3'handle_biotin | 0.5 μM |
| r(G ₄ C ₂) _n -2H | 1 μM |
| Total volume | Fill ddH ₂ O to 20 μl |

r(G₄C₂)_n-1H for photobleaching 實驗

依據下表配製溶液並於 70°C 作用 1 分鐘，-1°C/min 至 25°C。

| Reagents | Final conc. |
|--|----------------------------------|
| 10x annealing buffer- MgCl ₂ | 1x |
| pGAA_3'handle_biotin | 0.5 μM |
| pGAA_3'handle_Cy5 | 5 μM |
| r(G ₄ C ₂) ₄ -1H | 1 μM |
| Total volume | Fill ddH ₂ O to 20 μl |



2.2.4 Single-molecule 實驗

Slide PEGylation

將 glass jar 以 1M KOH (Honeywell, #30603) sonicate 20 分鐘，使用電鑽將 slide 鑽孔，以 acetone (SIGMA, #32201) 洗淨 slide 和 coverslip 並置於 glass jar，以 MeOH (Macron, #3016-68) sonicate 20 分鐘再以 acetone sonicate 20 分鐘，置於 4°C O/N，以 acetone sonicate 20 分鐘再以 ddH₂O sonicate 20 分鐘，以 1M KOH sonicate 25 分鐘，以 ddH₂O rinse，仔細沖洗 slide 和 coverslip 並以氮氣乾燥，火焰燒灼 slide 和 coverslip 並置於 glass jar 備用，加入 300 ml MeOH、15 ml HOAc (SIGMA, #33209) 和 3 ml aminosilane (SIGMA, #104884) 於乾淨的錐形瓶以配製 aminosilane mixture 並倒入 glass jar，避光作用 10 分鐘，sonicate 1 分鐘再避光作用 10 分鐘，以 MeOH 洗淨再以 ddH₂O 洗淨，仔細沖洗 slide 和 coverslip 並以氮氣乾燥，將 800 µl 100 mM H₃BO₃-KOH, pH 8.4 (Cyrusbioscience, #101-10043-35-3)、200 mg mPEG (Laysan Bio, #mPEG-SVA-5000-5g)、4 mg biotin-PEG (Laysan Bio, #Biotin-PEG-SVA- 5000-100mg) 配製於 eppendorf, votex 混勻並以 11000 rpm 離心 30 秒，取 75 µl PEG mixture 加至 slide 並覆上 coverslip，避光作用 3 小時，仔細沖洗 slide 和 coverslip 並以氮氣乾燥，置於 50 ml 離心管以避光並真空保存於-80°C 冰箱。

Single-molecule 實驗前置

事先配製 Imaging buffer，將 10 mg Trolox (SIGMA, #238813) 溶於 10 ml TE buffer (20 mM Tris-HCl, pH8.0) 於 50 ml 離心管，votex 混勻並置於 37°C incubator 40 小時再以 filter 過濾，將裝有 slide 和 coverslip 的離心管置於 37°C incubator 回溫 30 分鐘，以雙面膠組裝 slide 和 coverslip，加入 5 µl β-Me (SIGMA, #M3148) 至 20 ml TE buffer 以配製 TEβ buffer，load 200 µl TEβ buffer 至 chamber 以測漏，再 load 60 µl 0.2 mg/ml NeutrAvidin (Thermo Fisher, #31030) 至 chamber 以 immobilize molecule，避光作用 5 分鐘，load 200 µl TEβ buffer 至 chamber 以 wash，再 load 60



μl $5 \times 10^{-11} \text{ M}$ annealing sample 至 chamber 以固定，load $200 \mu\text{l}$ TE β buffer 至 chamber 以 wash，再依據下表配製 OSS imaging buffer (PCA : SIGMA, #37580-25G-F ; PCD : OYC Americas, #46852004 ; KCl : Thermo Fisher, #AM9640G) 並 load $60 \mu\text{l}$ 至 chamber 以除氧，避光作用 5 分鐘並上機檢測。

| Reagents | Final conc. |
|--|--|
| PCA | 0.4 mg/ml |
| PCD | 0.21 U/ml |
| NH ₄ Cl/KCl/MgCl ₂ | 200/100/10 mM |
| Total volume | Fill Imaging buffer to $100 \mu\text{l}$ |

smFRET 實驗

前置確認 slide 狀況，後續再 load $60 \mu\text{l}$ 含有 $1 \mu\text{M}$ antisense 的 OSS imaging buffer 並上機檢測。

Interaction 實驗

前置確認 slide 狀況，後續再 load $60 \mu\text{l}$ 含有 0.2 nM r(G₄C₂)_n-NH-Cy5UTP 的 OSS imaging buffer 並上機檢測。

Photobleaching 實驗

前置確認 slide 狀況，後續再 load $60 \mu\text{l}$ 將 PCA 濃度調降為 0.06 mg/ml 的 OSS imaging buffer 並上機檢測。



2.2.5 純化 BG4 scFv anti-G-quadruplex antibody

Transformation

於 37°C incubator 預熱含有 50 mg/l kanamycin (MDBio, #101-25389-94-0) 的 LB-agar plate，加入 7.5 ng pSANG10-3F-BG4 (Addgene, #55756) 至 100 μl BL21 (DE3)-RIPL Competent Cells (Agilent, #230280) 以進行 transformation，置於冰上 10 分鐘，並於 42°C heat shock 30 秒，再置於冰上 2 分鐘，加入 450 μl 回溫的 S.O.C medium，pipetting 混勻後，取至養菌管並於 37°C，250 rpm incubator 培養 1 小時，取 100 μl 回養菌液加至回溫的 LB-agar plate (50 mg/l kanamycin) 並使用玻棒塗盤，將其置於 37°C incubator 培養 16 ~ 18 小時，使用滅菌牙籤挑選 single colony 至 5 ml LB (50 mg/l kanamycin)，置於 37°C，280 rpm incubator 培養 16 ~ 18 小時，取 1 ml 菌液定序 (基龍米克斯, SB230411061)。

Bacteria culture & lysis

事先滅菌裝有 600 ml LB 的 2L 錐形瓶，共兩瓶，待其降溫再加入 30 μg kanamycin，取 1200 μl 菌液加至錐形瓶，置於 37°C，280 rpm incubator 培養 5 小時 10 分鐘 (OD₆₀₀ = 0.53)，以 0.5 mM IPTG (SIGMA, #I6758) induce BG4 antibody expression，置於 25°C，220 rpm incubator 培養 16 ~ 18 小時，將錐形瓶置於冰上並手動搖晃使其快速降溫，將菌液分裝至 150 ml 離心管，4°C，5500 rpm 離心回收 pellet，依據下表配製 TES buffer (Tris : PRO TECH, #0497-1KG ; EDTA : J.T. Baker, #4040-01 ; sucrose : J.T. Baker, #4097-04) 並加入 100 μl Protease Inhibitor Cocktail (SIGMA, #P8849)，以 TES buffer 回溶菌液(De Magis et al., 2021)，置於冰上 10 分鐘，再加入 40 ml ddH₂O 破菌並置於冰上 15 分鐘，4°C，5500 rpm 離心 30 分鐘，再使用 filter 過濾 lysate。



| Reagents | Final conc. |
|-----------------|----------------------------------|
| Tris-HCl, pH7.5 | 50 mM |
| EDTA | 1 mM |
| sucrose | 20% |
| Total volume | Fill ddH ₂ O to 50 ml |

FPLC

安裝 HisTrap FF Crude column (Cytiva, #17528601)，將 lysate load 至 FPLC，以 binding buffer (Imidazole : SIGMA, #5513 ; MgCl₂ : SIGMA, #63064) 使 BG4 antibody 結合至 column，以 wash buffer 洗滌 column，再以 0 ~ 100% elution buffer 回收 BG4 antibody，使用 Amicon ultra-15 centrifuge filter 10K(Millipore, #UFC901008) 濃縮 BG4 antibody mixture 。

| Reagents | Binding buffer | Wash buffer | Elution buffer |
|----------------------|----------------|-------------|----------------|
| Tris-HCl, pH7.5 | 25 mM | 25 mM | 25 mM |
| NH ₄ Cl | 60 mM | 60 mM | 60 mM |
| MgCl ₂ | 7 mM | 7 mM | 7 mM |
| KCl | — | 500 mM | — |
| Imidazole-HCl, pH7.5 | 20 mM | 20 mM | 500 mM |
| β-ME | 6 mM | 6 mM | 6 mM |

安裝 Superdex 200 Increase 10/300 GL column (Cytiva, #28990944)，以 Amicon ultra-15 centrifuge filter 10K (Millipore, #UFC901008) 置換 buffer S (Glycerol : J.T. Baker, #2136-03) 再使用 filter 過濾，將其 load 至 FPLC 以 size 純化，再使用 Amicon ultra-15 centrifuge filter 10K 濃縮 BG4 antibody 並置換 storage buffer，以 Bradford assay (Bovine Serum Albumin : NEB, #B9000S) 定量。



| Reagents | Binding buffer | Storage buffer |
|--------------------|----------------|----------------|
| Tris-HCl, pH7.5 | 25 mM | 25 mM |
| NH ₄ Cl | 60 mM | 60 mM |
| MgCl ₂ | 7 mM | 7 mM |
| Glycerol | — | 15% |
| β-ME | 6 mM | 6 mM |

2.2.6 Bulk 實驗

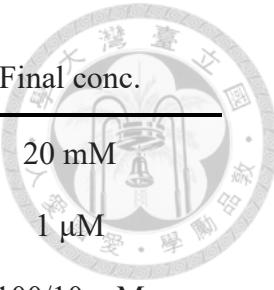
Antisense 實驗

依據下表配製溶液並分裝三管 (10 μl/tube)，其中一管加入 2 μl 的 10 μM antisense 作為對照組，其餘二管加入等體積 ddH₂O，於 85°C 作用 1 分鐘，-1°C/min 至 25°C。實驗組再加入 2 μl 的 10 μM antisense，其餘二管加入等體積 ddH₂O，最後體積為 14 μl，室溫作用 30 分鐘。

| Reagents | Final conc. |
|--|----------------------------------|
| Tris-HCl, pH8.0 | 20 mM |
| r(G ₄ C ₂) ₄ -NH-Cy3UTP or d(G ₄ C ₂) ₄ -Cy3 | 1 μM |
| NH ₄ Cl/KCl/MgCl ₂ | 200/100/10 mM |
| Total volume | Fill ddH ₂ O to 35 μl |

BG4 antibody 實驗

依據下表配製溶液並分裝四管 (10 μl/tube)，於 85°C 作用 1 分鐘，-1°C/min 至 25°C，實驗組分別加入 7.5 μl 的 0.45、0.9 或 2.3 μM BG4 antibody，對照組則加入等體積 ddH₂O，室溫作用 30 分鐘。



| Reagents | Final conc. |
|---|----------------------------------|
| Tris-HCl, pH8.0 | 20 mM |
| r(G ₄ C ₂) ₄ -NH-Cy3UTP/d(G ₄ C ₂) ₄ -Cy3/d(G ₄ C ₂) ₄ -hairpin-Cy3 | 1 μM |
| KCl/MgCl ₂ | 100/10 mM |
| Total volume | Fill ddH ₂ O to 45 μl |

第三章 結果

3.1 In vitro transcription

藉由 BamHI-HF 將 pT7SP6-nx 線性化（圖 1A），以 T7 RNA polymerase 進行 in vitro transcription，經由純化可收獲 r(G₄C₂)_n-2H（圖 3），r(G₄C₂)₃-2H 預期為 81 nt，r(G₄C₂)₄-2H 預期為 87 nt，r(G₄C₂)₅-2H 預期為 93 nt（圖 2A），1.5% agarose 電泳結果顯示 r(G₄C₂)₃-2H 低於 150 nt 且僅有一條 band（目標產物），r(G₄C₂)₄-2H 介於 80 ~ 150 nt 之間將有一條 band（目標產物），大於 1000 nt 處亦有一條 band，可能為 pT7SP6-4x 線性化不完全導致轉錄較長之 RNA，因比例差距懸殊，故仍以此進行後續實驗，r(G₄C₂)₅-2H 介於 80 ~ 150 nt 且僅有一條 band（目標產物）。

藉由 BamHI-HF 將 pT7SP6-nx 線性化（圖 1A），以 SP6 RNA polymerase 進行 in vitro transcription，經由純化可收獲 r(G₄C₂)_n-1H（圖 3），r(G₄C₂)₄-1H 預期為 56 nt（圖 2A），1% agarose 電泳結果顯示 r(G₄C₂)₄-1H 低於 80 nt 將有一條 band（目標產物），大於 1000 nt 處亦有一條 band，可能為 pT7SP6-4x 線性化不完全導致轉錄較長之 RNA，但結果以目標產物為主，故仍以此進行後續實驗。

藉由 BsrGI-HF 將 pT7SP6-nx 線性化（圖 1A），以 SP6 RNA polymerase 進行 in vitro transcription，經由純化可收獲 r(G₄C₂)_n-NH（圖 3），r(G₄C₂)₄-NH 預期為 35 nt，r(G₄C₂)₅-NH 預期為 41 nt（圖 2A），1.5% agarose 電泳結果顯示 r(G₄C₂)₄-NH 低於 80 nt 且僅有一條 band（目標產物），2% agarose 電泳結果顯示 r(G₄C₂)₅-NH 低於 80 nt 且僅有一條 band（目標產物）。

藉由 BsrGI-HF 將 pT7SP6-nx 線性化（圖 1A），使用含 Cy3-UTP 或 Cy5-UTP 之 NTPs，以 SP6 RNA polymerase 進行 in vitro transcription，經由純化可收獲 r(G₄C₂)_n-NH-Cy3UTP 或 r(G₄C₂)_n-NH-Cy5UTP（圖 3），r(G₄C₂)₃-NH-Cy5UTP 預期為 29 nt，r(G₄C₂)₄-hairpin-NH-Cy3UTP、r(G₄C₂)₄-NH-Cy3UTP 和 r(G₄C₂)₄-NH-Cy5UTP 預期為 35 nt，r(G₄C₂)₅-NH-Cy5UTP 預期為 41 nt（圖 2A），10% UREA PAGE 電泳結果顯示 r(G₄C₂)₃-NH-Cy5UTP、r(G₄C₂)₄-NH-Cy5UTP 和 r(G₄C₂)₅-NH-Cy5UTP 高於 26



nt (以 IDT 合成之 rA(G₄C₂)₄A-Cy5 作為對照) 有兩條 band (目標產物)，可能為 label 1 ~ 4 個 dye 之差異，r(G₄C₂)₄-hairpin-NH-Cy3UTP 和 r(G₄C₂)₄-NH-Cy3UTP 低於 50 nt 有一條 band (目標產物)，此外，有些許 in vitro transcription 之 G₄C₂ RNA 無法順利以 10% UREA PAGE 進行電泳分離而滯留於 well，可能為 G₄C₂ RNA clusters，formamide 和 UREA 似乎無法完全破壞它並順利 denature，而合成之 rA(G₄C₂)₄A-Cy5 則並未發生類似情況，詳細原因尚不清楚。

3.2 Annealing test

以 5'h-T7SP6-5'Cy3 和 pGAA_3'handle_Cy5_biotin anneal d/r(G₄C₂)_n-2H (圖 5 之 lane 1 ~ 5)，10% native PAGE 電泳結果顯示極少未 anneal d/r(G₄C₂)_n-2H 之 5'h-T7SP6-5'Cy3 (淺綠箭號) 或 pGAA_3'handle_Cy5_biotin (紅色箭號)，而有些許僅 anneal 5'h-T7SP6-5'Cy3 之 d/r(G₄C₂)_n-2H (深綠箭號)，電泳移動最慢的則為順利 anneal 兩端 DNA handle 之 d/r(G₄C₂)_n-2H (黃色箭號)，作為後續 smFRET 實驗樣本。

以 pGAA_3'handle_Cy5 和 pGAA_3'handle_biotin anneal r(G₄C₂)₄-1H (圖 5 之 lane 6)，因實驗設計需要 pGAA_3'handle_Cy5 和 pGAA_3'handle_biotin 競爭相同的 annealing site，故前者濃度為 5 μM 而後者濃度為 0.5 μM，r(G₄C₂)₄-1H 的濃度則為 1 μM，10% native PAGE 電泳結果顯示符合預期之較多未 anneal r(G₄C₂)₄-1H 之 pGAA_3'handle_Cy5 (粉色箭號)，順利 anneal DNA handle 之 r(G₄C₂)₄-1H 將形成分子內結構 (杏色箭號) 或分子間結構 (橘色箭號)，作為後續 photobleaching 實驗樣本。

以 5'h-T7SP6-5'Cy3 和 pGAA_3'handle_biotin anneal r(G₄C₂)_n-2H (圖 5 之 lane 7 ~ 9)，10% native PAGE 電泳結果顯示極少未 anneal r(G₄C₂)_n-2H 之 5'h-T7SP6-5'Cy3 (淺綠箭號)，而有些許僅 anneal 5'h-T7SP6-5'Cy3 之 r(G₄C₂)_n-2H (深綠箭號)，電



泳移動最慢的則為順利 anneal 兩端 DNA handle 之 $r(G_4C_2)_n\text{-}2H$ (藍色箭號)，作為後續 G_4C_2 RNA interaction 實驗樣本。

3.3 smFRET 實驗

3.3.1 $d/r(G_4C_2)_n\text{-}2H$ 於三種鹽離子條件，表現至少兩種結構特性

$d(G_4C_2)_n\text{-}2H$ ($n = 3$ 或 4) 和 $r(G_4C_2)_n\text{-}2H$ ($n = 3$ 、 4 或 5) 於 $200\text{ mM NH}_4\text{Cl}$ 、 100 mM KCl 或 10 mM MgCl_2 條件之結果 (圖 6A) 皆為 high FRET (yellow bar)，擬合高斯函數之 FRET 值 > 0.95 (黃色曲線)，high FRET trace 並無特殊動態變化 (圖 6B 右)，說明 $d/r(G_4C_2)_n\text{-}2H$ 於三種鹽離子條件皆形成特定結構，使 $d/r(G_4C_2)_n\text{-}2H$ 兩端之 Cy3 和 Cy5 發生螢光共振能量轉移，誠如前言所述，該結構可能為 G-quadruplex，亦有可能為 hairpin (圖 2B)，或是其它更為複雜的特殊構形。

後續加入 $1\text{ }\mu\text{M}$ 對應的互補序列 $d(G_2C_4)_n$ ，將會有部分 $d/r(G_4C_2)_n\text{-}2H$ 由 high FRET shift 至 low FRET (blue bar)，擬合高斯函數之 high FRET 值 > 0.95 而 low FRET 值 < 0.25 (藍色曲線)，low FRET trace 並無特殊動態變化 (圖 6B 左)，轉變過程亦無觀測到特殊的中間形態。若以 $\text{FRET} < 0.5$ 的 trace numbers 作為分子而 total trace numbers 作為分母，計算 low FRET population 占比，其中 $d(G_4C_2)_4\text{-}2H$ 於 KCl 條件僅約 7% shift 至 low FRET，前人文獻已表明 $d(G_4C_2)_4$ 於 KCl 條件之結構為穩定的 antiparallel G-quadruplex，而 $d(G_4C_2)_3$ 於 KCl 條件之結構為較不穩定的 G-quadruplex (Zhou et al., 2015)，說明 $d(G_4C_2)_n\text{-}2H$ 較難以被 antisense 展開之構形可能為 G-quadruplex，綜上所述， $d/r(G_4C_2)_n\text{-}2H$ 於三種鹽離子條件形成之特定結構，表現至少兩種結構特性，其中一種可被 antisense 展開，可能的原因為該結構的分子內作用力較弱，形成之結構較不穩定而被 antisense 所取代，亦或是此種結構穩定但存在特定的 loop，讓 antisense 有機會結合以展開該結構。



3.3.2 d(G₄C₂)₃-2H 於三種鹽離子條件之展開時間測試

倘若以 antisense 取代與否作為結構區分方式，需確認加入 antisense 之作用時間，實驗以無法形成穩定 G-quadruplex 之 d(G₄C₂)₃-2H 作為測定樣本（圖 7A），結果顯示 d(G₄C₂)₃-2H 於 MgCl₂ 展開最快，作用 5 分鐘便趨近於完全反應，NH₄Cl 次之，作用 10 分鐘將趨近於完全反應，而 KCl 最慢，作用 20 分鐘仍未趨近於完全反應（圖 7B），原因可能為 d(G₄C₂)₃ 於 KCl 條件形成較不穩定的 G-quadruplex，而於 MgCl₂ 或 NH₄Cl 則形成較易展開的其它構形，雖然於 KCl 條件作用 20 分鐘仍未趨近於完全反應，但作用 5 分鐘時，反應已逾半，速率為每分鐘展開 10.1%，而作用 5 ~ 10 分鐘時，速率為每分鐘展開 1.94%，作用顯著趨緩（表 2），故相關實驗將以作用 5 分鐘進行分析，此外，r(G₄C₂)₃-2H 於 KCl 展開仍相當快速，介於 d(G₄C₂)₃-2H 於 MgCl₂ 和 NH₄Cl 之間，可能原因為 r(G₄C₂)₃-2H 無法形成 G-quadruplex，初步顯示 G₄C₂ RNA 和 DNA 的特性差異。

3.3.3 d/r(G₄C₂)_n-2H 展開比例：MgCl₂ > NH₄Cl > KCl

d/r(G₄C₂)_n-2H 於三種鹽離子條件，加入 antisense 之 FRET < 0.5 的占比根據離子種類而有所差異，r(G₄C₂)₃-2H 於三種鹽離子條件，加入 antisense 幾乎完全展開，皆 > 95%，可能原因為 r(G₄C₂)₃-2H 於三種鹽離子條件皆形成分子內作用力較弱的結構，例如：hairpin，以 mfold 預測 (UUCGGGGCCGGGGCCGGGGCC) 僅至多 5 對鹼基互補，而 antisense 若完全配對將有 19 對鹼基互補，故幾乎完全 shift 至 low FRET，除此之外，d(G₄C₂)₃-2H、d(G₄C₂)₄-2H、r(G₄C₂)₄-2H 和 r(G₄C₂)₅-2H 於 MgCl₂ 條件皆展開最多，NH₄Cl 次之，而 KCl 最少（圖 8A），以上四種分子於 KCl 條件皆有潛力形成 G-quadruplex，此結構可能較難以被 antisense 所取代，因而展開比例最低，此外，前人文獻曾指出 d(G₄C₂)₄ 於 NH₄Cl 條件將形成 G-quadruplex (Zalar et al., 2023)，作為 d(G₄C₂)₄-2H 於 NH₄Cl 僅約 38% shift 至 low FRET 可能的原因之一（表 1），且 d(G₄C₂)₄ 於 KCl 條件形成之 G-quadruplex 較 NH₄Cl 穩穩定，而 d(G₄C₂)₃-



2H、d(G₄C₂)₄-2H、r(G₄C₂)₄-2H 和 r(G₄C₂)₅-2H，於 MgCl₂ 條件展開最多，說明四種分子於 MgCl₂ 形成之結構的分子內作用力最弱，或是此種結構存在特定的 loop，讓 antisense 有機會結合以展開該結構，然而，d(G₄C₂)₃-2H、r(G₄C₂)₄-2H 和 r(G₄C₂)₅-2H 於 NH₄Cl 或 MgCl₂ 條件展開的差異平均僅 9.5%，暫且無法說明該影響是由於結構差異、陽離子價數差異，或是離子特性導致。

3.3.4 d/r(G₄C₂)_n-2H 展開比例之 DNA 或 RNA 差異

d/r(G₄C₂)_n-2H 於 NH₄Cl 和 KCl 條件，皆為 RNA 展開較多（圖 8B），d/r(G₄C₂)₃-2H 於 NH₄Cl 可能較不會形成 G-quadruplex，DNA 和 RNA 展開比例差異僅 3.5%，r(G₄C₂)₃-2H 於 KCl 亦可能較不會形成 G-quadruplex，而 d(G₄C₂)₃ 於 KCl 可形成較不穩定的 G-quadruplex，故 RNA 展開比例較 DNA 多，d(G₄C₂)₄ 於 KCl 和 NH₄Cl 將有潛力形成 G-quadruplex，根據前人文獻，d(G₄C₂)₄ 形成 antiparallel G-quadruplex (Zhou et al., 2015)，而 r(G₄C₂)₄ 於 KCl 若形成 G-quadruplex 則是以 parallel 形式 (Fay et al., 2017)，若以此為前提則 G-quadruplex 形式不同將影響展開比例，結果顯示 antiparallel G-quadruplex 較不易展開，而 r(G₄C₂)₄-2H 於 NH₄Cl 可能形成的結構為 parallel G-quadruplex 或是 hairpin，兩者展開比例皆高於 antiparallel G-quadruplex，d/r(G₄C₂)_n-2H 於 MgCl₂ 條件，皆為 DNA 展開較多，d/r(G₄C₂)₃-2H 於 MgCl₂ 可能較不會形成 G-quadruplex，DNA 和 RNA 展開比例差異僅 1.8%，然而，d/r(G₄C₂)₄-2H 展開比例差異約 18%，說明此條件可能形成不同於其它條件之結構，前人文獻指出，RNA 若可形成 hairpin 或 G-quadruplex 結構，K⁺將促使其形成 G-quadruplex 而 Mg²⁺將促使其形成 hairpin (Bugaut et al., 2012)，儘管該文獻之 RNA 序列不是 G₄C₂，仍為此提供相當有趣的見解，且圖 8A 結果顯示於 MgCl₂ 形成之結構的分子內作用力最弱，將假設 d/r(G₄C₂)₄-2H 於 MgCl₂ 形成 hairpin 結構，而 RNA hairpin 展開比例較 DNA hairpin 為少，可能原因為 DNA 和 RNA 特性差異。



3.3.5 d/r(G₄C₂)_n-2H 展開比例之重複次數差異

d(G₄C₂)₃-2H 於三種鹽離子條件之展開比例較 d(G₄C₂)₄-2H 為多，d(G₄C₂)₄-2H 於 NH₄Cl 將有潛力形成 G-quadruplex，而 d(G₄C₂)₃-2H 於 NH₄Cl 可能較不會形成 G-quadruplex，故前者展開比例較少，d(G₄C₂)₃-2H 和 d(G₄C₂)₄-2H 於 KCl 皆有潛力形成 G-quadruplex，但前者較不穩定，故展開比例較少，假設 d(G₄C₂)₃-2H 和 d(G₄C₂)₄-2H 於 MgCl₂ 形成 hairpin 結構，以 mfold 預測前者僅至多 5 對鹼基互補，而後者為 7 對鹼基互補，故前者展開比例較多。

r(G₄C₂)₃-2H 於三種鹽離子條件，形成 G-quadruplex 的可能性較低，故展開比例最多，r(G₄C₂)₄-2H 於 KCl 形成 parallel G-quadruplex，故展開比例最少，r(G₄C₂)₅-2H 於 KCl 亦有可能形成 G-quadruplex，但可能會有 bulge 或其它結構，穩定性將不及前者，故展開比例居中，假設 r(G₄C₂)_n-2H 於 MgCl₂ 形成 hairpin 結構，以 mfold 預測其鹼基互補，依序為至多 5 對、7 對和至多 9 對，故展開比例依序遞減，此外，r(G₄C₂)_n-2H 於 NH₄Cl 展開比例之趨勢和 MgCl₂ 相近，皆為依序遞減，將一同假設其形成之結構為 hairpin，有待未來驗證。

3.4 Bulk 實驗

3.4.1 檢測 d/r(G₄C₂)₄-Cy3 於不同鹽離子條件之結構多型性

smFRET 結果顯示，single molecule d/r(G₄C₂)₄-2H 於 KCl 條件，有潛力形成 G-quadruplex，此結構多型性相當複雜，可能為 monomer、dimer 或 tetramer，電泳為檢測分子間結構的簡便方式，初步分析以提供後續實驗相關線索（圖 9），結果顯示 d/r(G₄C₂)₄-Cy3 於 KCl 條件將有一條 band（藍色箭號），加入 antisense 則有微量展開而有兩條 band（黑色箭號），以 imageJ 定量，d(G₄C₂)₄-Cy3 約展開 11%，r(G₄C₂)₄-Cy3 約展開 8.6%，d(G₄C₂)₄-2H 於 smFRET 實驗之 KCl 條件約展開 4.6%，r(G₄C₂)₄-2H 於 smFRET 實驗之 KCl 條件約展開 18.6%（表 1），可能因實驗方式不同或作用時間不同（smFRET 實驗為加入 antisense 作用 5 分鐘而 bulk 實驗為加入 antisense



作用 30 分鐘) 亦或是 flanking sequence 存在與否，導致展開比例差異，然而，展開比例顯著低於 MgCl₂ 條件，推論其形成分子內 G-quadruplex 結構，smFRET 實驗為 r(G₄C₂)₄-2H 展開較 d(G₄C₂)₄-2H 為多，而 bulk 實驗為 r(G₄C₂)₄-Cy3 展開較 d(G₄C₂)₄-Cy3 為少，說明 r(G₄C₂)₄-Cy3 於 KCl 條件形成之分子內 G-quadruplex 可能以分子間作用穩定彼此的結構，使其更難以展開。

d(G₄C₂)₄-Cy3 於 MgCl₂ 條件將有一條 band (藍色箭號)，加入 antisense 幾乎完全展開 (黑色箭號)，而 smFRET 實驗約展開 90.2% (表 1)，可能因作用時間不同導致展開比例差異，此外，r(G₄C₂)₄-Cy3 於 MgCl₂ 條件將有兩條 band，移動較快的 band 和 KCl 條件僅有的 band 位置相近 (藍色箭號)，加入 antisense 可使其完全展開，後續實驗結果顯示此為 G-quadruplex 結構 (圖 11)，說明於 KCl 條件形成之 G-quadruplex 結構較 MgCl₂ 穩穩，而移動較慢的 band 位置將略高於 double strand，推論其形成 tetramer G-quadruplex (黃色箭號) 或其它 multiple-strand 結構，加入 antisense 可使其完全展開，已知 RNA 形成之 G-quadruplex 可能為 parallel 形式，若以此為前提，完全展開的可能原因為 CC overhang，d(G₂C₄)₄ antisense 以 Watson-Crick 鹼基配對取代 Hoogsteen 鹼基配對，其是否形成 tetramer G-quadruplex 有待後續驗證。

3.4.2 BG4 antibody 識別 d/r(G₄C₂)₄-Cy3 於不同鹽離子條件之結構多型性

以上實驗揭示了 d/r(G₄C₂)₄-Cy3 於 KCl 條件和 r(G₄C₂)₄-Cy3 於 MgCl₂ 條件將有可能形成 G-quadruplex 結構，此處將純化 BG4 scFv anti-G-quadruplex antibody 加以驗證實驗結果，BG4 antibody 可識別 G-quadruplex 結構，前人研究已將其應用於 G₄C₂ RNA (Conlon et al., 2016)，使用 0.5 mM IPTG 誘導 BL21 (DE3)-RIPL Competent Cells 表現 BG4 antibody，以 osmotic shock 破菌再經由 HisTrap FF Crude column 純化，並回收於 291.7~434.7 mM imidazole elute 之 protein mixture (圖 10A、C)，接著使用 Superdex 200 Increase 10/300 GL column 二次純化 (圖 10B、D)，電泳結果



顯示 25 ~ 35 kDa 之間將有一條 band (圖 10E)，而 BG4 antibody 分子量為 32.75 kDa，符合預期並以此進行後續實驗。

此外，參照 2019 年發表的 paper (Wang et al., 2019) 設計無法形成 G-quadruplex 的序列，作為以 BG4 antibody 識別結構的對照 (圖 11)，電泳結果顯示 d/r(G₄C₂)₄-Cy3 於 KCl 條件可能會形成 G-quadruplex (綠色箭號)，而 d(G₄C₂)₄-hairpin-Cy3 則否，d(G₄C₂)₄-Cy3 於 KCl 條件可能有兩個 BG4 antibody binding sites，r(G₄C₂)₄-Cy3 於 MgCl₂ 條件可能會形成分子內和分子間 G-quadruplex (黃色箭號)，r(G₄C₂)₄-Cy3 移動最快的 band 可能為 RNA degradation，礙於純化之 BG4 antibody 濃度限制，尚無法排除 storage buffer 之離子影響，至於 smFRET 實驗假設 r(G₄C₂)₄-2H 於 MgCl₂ 形成 hairpin 結構，然而此處卻檢測到分子內 G-quadruplex 結構，可能的原因之一為 flanking sequence 差異，有待後續驗證，可能的原因之二為 hairpin 或 G-quadruplex 結構將互相轉換，當其轉換成 G-quadruplex 結構，而 BG4 antibody 識別並結合，便穩定其 G-quadruplex 結構而無法再轉換為 hairpin 結構，有待未來驗證。

3.4.3 r(G₄C₂)₄-Cy3 於 MgCl₂ 條件之 flanking sequence effect

前人文獻指出 flanking sequence 將影響 G₄C₂ RNA 之結構多型性 (Reddy et al., 2013)，smFRET 和 bulk 實驗結果可見端倪，以電泳解析 r(G₄C₂)₄-NH、r(G₄C₂)₄-1H 和 r(G₄C₂)₄-2H 於 MgCl₂ 條件之結構多型性 (圖 12A)，r(G₄C₂)₄-NH 之 5' 端有 6 個 nucleotides 而 3' 端有 5 個 nucleotides，r(G₄C₂)₄-1H 之 5' 端有 6 個 nucleotides 而 3' 端有 25 個 nucleotides，r(G₄C₂)₄-2H 之 5' 端有 39 個 nucleotides 而 3' 端有 25 個 nucleotides (圖 2A)，結果顯示 r(G₄C₂)₄-NH 和 r(G₄C₂)₄-2H 表現之結構多型性有所差異，故 smFRET 和 bulk 實驗結果雖可相互印證卻無法完全相提並論，此外，r(G₄C₂)₄-NH (藍色箭號) 和 r(G₄C₂)₄-1H (橘色箭號) 形成之分子間結構表現濃度依賴性，並且 flanking sequence 將影響分子間結構形成，r(G₄C₂)₄-1H 之分子間結構 (藍色箭號) 比例下降，以 imageJ 定量分子內結構和分子間結構之比值於 1 μM r(G₄C₂)₄-NH



為 2.5，2 μM r(G₄C₂)₄-NH 為 1.2，1 μM r(G₄C₂)₄-1H 為 31.7，2 μM r(G₄C₂)₄-1H 為 12.5，後續將以 1 μM r(G₄C₂)₄-1H 進行 photobleaching 實驗。

3.5 Photobleaching 實驗

以上實驗揭示了 r(G₄C₂)₄-NH-Cy3UTP 於 MgCl₂ 條件將有可能形成 tetramer G-quadruplex 或其它 multiple-strand 結構，而 flanking sequence 將影響其分子間結構形成，權宜之計將使用 r(G₄C₂)₄-1H 進行 photobleaching 實驗以檢測該結構之分子總數，結果顯示有 1~3 個 Cy5 photobleaching，說明該結構之分子數目為 2~4（圖 12B），而 bulk 實驗結果顯示該結構相對於 double-strand 結構之移動較慢，故推論此結構之分子數目為 3 或 4，然而，BG4 antibody 可識別該結構，說明此結構有可能為 tetramer G-quadruplex，至於 photobleaching 結果差異，可能的原因之一為 photobleaching，由於實驗條件相對容易發生 photobleaching，故無法排除相關現象，可能的原因之二，儘管以 10 倍濃度差異競爭相同的 annealing site，仍可能發生該分子 annealing 兩個 biotin handle，而此類分子可能相對容易固定於 slide 而被檢測到，目前亦無法排除此現象，有待未來調整相關實驗架設再行驗證。

3.6 Interaction 實驗

3.6.1 r(G₄C₂)_n-2H 和 r(G₄C₂)_n-NH-Cy5UTP interaction 之數據分析

前人研究指出 G₄C₂ RNA 致病機制將於細胞核內形成 RNA foci 以結合各種 RNA-binding protein，導致這些蛋白質無法正常發揮作用 (Gendron & Petrucelli, 2018)，然而，其它文獻表明僅 RNA 便可形成 RNA foci (Jain & Vale, 2017)，實驗過程亦檢測到 r(G₄C₂)_n-NH foci，此外，文獻表明 MgCl₂ 有利於 foci 形成而 NH₄Cl 不利於 foci 形成 (Jain & Vale, 2017)，smFRET 和 bulk 實驗已經提供一些線索，顯示 G₄C₂ RNA 於 KCl、NH₄Cl 或 MgCl₂ 表現特定的結構多型性，研究 G₄C₂ RNA 交互作用的特性有助於理解 RNA foci 的成因和相關疾病的潛在分子機制。



將僅有 Cy3 signal 之 $r(G_4C_2)_n$ -2H (5' handle 為 5'h-T7SP6-5'Cy3，3' handle 為 pGAA_3'handle_biotin) 固定於 slide，加入 $r(G_4C_2)_n$ -NH-Cy5UTP (mobile 分子) 以檢測 interaction 情形 (實驗設計參照圖 4B)，結果顯示於三種鹽離子條件之 interaction pattern (圖 13A)，有持續較長時間的交互作用 (occupancy > 0.5)，較短時間的交互作用和極短時間的交互作用，由於 mobile $r(G_4C_2)_n$ -NH-Cy5UTP 會隨機接近 slide 表面而導致雜訊，分析將以 NA 專一性固定 biotin-Cy5 DNA handle 並檢測其 Cy5 signal 作為對照以過濾雜訊 (圖 13B、C)，reference intensity 將擬合高斯函數而平均值 - 2S.D. 約涵蓋 95.4% 數據，根據實驗當日儀器架設將有些微差異 (20240502 為 268 a.u.；20240507 為 286 a.u.；20240520 為 253 a.u.；20240618 為 247 a.u.；20240623 為 280 a.u.)，將 trace 檢測到訊號的 frame 數作為分子而 total frame 數作為分母以計算 occupancy (0.05 s/frame)，而 occupancy > 0.5 之 trace number / 發生 interaction 的 total trace number 為 Half occupancy (圖 13D)。

將檢測到訊號的 trace 以 HMM 擋合 2 state (圖 13A)，將排除：(1) 擋合失準之 trace；(2) state 1 intensity > 100 a.u. 之 trace，此類 trace 將檢測到 $r(G_4C_2)_n$ -2H 已結合 $r(G_4C_2)_n$ -NH-Cy5UTP 並再結合 $r(G_4C_2)_n$ -NH-Cy5UTP，此現象可能和 foci 的形成有關；(3) state 2 intensity > 1200 a.u. 之 trace，此類 trace 將檢測到 $r(G_4C_2)_n$ -2H 結合 $r(G_4C_2)_n$ -NH-Cy5UTP foci，說明 G_4C_2 RNA 將有潛力形成複雜的分子間結構。儘管檢測到相當有趣的現象，但以上 trace 可能會影響後續分析，故於此處暫且排除，將尚未發生交互作用 (state 1) 之 dwell time 擋合 $\exp(-k*t)$ 以計算 on rate，而發生交互作用 (state 2) 之 dwell time 擋合 $\exp(-k*t)$ 或 $a_1*\exp(-k_1*t) + a_2*\exp(-k_2*t)$ 以計算 off rate (圖 13E)。



3.6.2 r(G₄C₂)_n-2H 和 r(G₄C₂)_n-NH-Cy5UTP interaction 之 Half occupancy

r(G₄C₂)_n-2H 和 r(G₄C₂)_n-NH-Cy5UTP 交互作用之 Half occupancy，離子差異的整體趨勢為 MgCl₂ > KCl > NH₄Cl，於 NH₄Cl 條件之 Half occupancy 皆 < 5% (表 3)，結果顯示 G₄C₂ RNA 於 NH₄Cl 條件不易發生較長時間的交互作用 (圖 14A)，KCl 條件居中，MgCl₂ 條件則相對容易發生較長時間的交互作用，然而，r(G₄C₂)₃-2H 和 r(G₄C₂)₄-NH-Cy5UTP 於 MgCl₂ 條件交互作用之 Half occupancy 將略低於 KCl 條件，r(G₄C₂)₄-2H 和 r(G₄C₂)₄-NH-Cy5UTP 於 MgCl₂ 條件交互作用之 Half occupancy 甚至為 0，說明 r(G₄C₂)₄-2H 於 MgCl₂ 條件將形成穩定的分子內結構且不易和 r(G₄C₂)_n-NH-Cy5UTP 交互作用，此外，Half occupancy 於 MgCl₂ 條件並固定相同重複次數之 r(G₄C₂)_n-2H 和不同重複次數之 r(G₄C₂)_n-NH-Cy5UTP 交互作用的整體趨勢為 r(G₄C₂)₃-NH-Cy5UTP > r(G₄C₂)₅-NH-Cy5UTP > r(G₄C₂)₄-NH-Cy5UTP (圖 14C)，結果顯示 r(G₄C₂)₃-NH-Cy5UTP 於 MgCl₂ 條件相對容易發生較長時間的交互作用，說明於 MgCl₂ 條件形成之 G₄C₂ hairpin 結構，可能存在發生交互作用的潛在位點，以下論述衍生自世綸研究報告，假設該潛在位點為 hairpin loop，其序列為 GGGC，則 loop-loop interaction 將以兩組 Watson-Crick 鹼基配對和兩組 Hoogsteen 鹼基配對，如同以 mfold 預測 G₄C₂ RNA 之分子內 stem 結構，而 r(G₄C₂)₅-NH-Cy5UTP 可能類似 r(G₄C₂)₄-NH-Cy5UTP 之情形，於 MgCl₂ 條件將形成分子間結構，但與之相比則相對不穩定或是藉由額外的 G₄C₂ RNA 和 r(G₄C₂)_n-2H 交互作用。

三種鹽離子條件固定之 half occupancy 於不同重複次數之 r(G₄C₂)_n-2H 和 r(G₄C₂)₅-NH-Cy5UTP 交互作用的整體趨勢為 r(G₄C₂)₅-2H > r(G₄C₂)₃-2H > r(G₄C₂)₄-2H (圖 14B)，說明 r(G₄C₂)₅-NH-Cy5UTP 相對容易和 r(G₄C₂)₅-2H 發生較長時間的交互作用，特別是在 MgCl₂ 條件，r(G₄C₂)₃-NH-Cy5UTP 和 r(G₄C₂)₄-NH-Cy5UTP 皆相對容易和 r(G₄C₂)₅-2H 發生較長時間的交互作用，文獻曾表明 MgCl₂ 條件有利於 r(G₄C₂)₅ 形成 RNA foci (Jain & Vale, 2017)，而以 mfold 預測 r(G₄C₂)₅-2H 將有可能形成兩個 hairpin loop，可能作為其相對容易發生較長時間的交互作用之解釋。



3.6.3 $r(G_4C_2)_n\text{-}2H$ 和 $r(G_4C_2)_n\text{-NH-Cy5UTP}$ 之 dynamic interaction

$r(G_4C_2)_n\text{-}2H$ 和 $r(G_4C_2)_n\text{-NH-Cy5UTP}$ 之 dynamic interaction 將排除 occupancy 為 1 之 trace，因其無法以 HMM 擬合 2 state，而離子差異的整體趨勢為 $KCl > NH_4Cl > MgCl_2$ 或 $KCl > MgCl_2 > NH_4Cl$ （圖 15A），結果顯示於 KCl 條件相對容易發生交互作用，說明於 KCl 條件形成之 G-quadruplex 為相對容易發生交互作用之結構， $r(G_4C_2)_n\text{-}2H$ 和 $r(G_4C_2)_n\text{-NH-Cy5UTP}$ 較不易形成 G-quadruplex，故發生頻率和 NH_4Cl 差異最小，僅 2.6%，至於 NH_4Cl 和 $MgCl_2$ 差異略小，至多 4%，且 dynamic interaction 將排除 occupancy 為 1 之 trace，而 NH_4Cl 幾乎沒有此類 trace，說明於 NH_4Cl 和 $MgCl_2$ 條件皆相對不易發生 interaction，儘管如此，三種離子之 dynamic interaction 方式仍有所差異，有待後續分析。

Dynamic interaction 於三種鹽離子條件固定不同重複次數之 $r(G_4C_2)_n\text{-}2H$ 和 $r(G_4C_2)_n\text{-NH-Cy5UTP}$ 交互作用，結果顯示 $r(G_4C_2)_n\text{-NH-Cy5UTP}$ 相對不易和 $r(G_4C_2)_n\text{-}2H$ 發生交互作用（圖 15B），說明 $r(G_4C_2)_n\text{-}2H$ 於三種鹽離子皆形成穩定的分子內結構且不易和 $r(G_4C_2)_n\text{-NH-Cy5UTP}$ 交互作用，根據 smFRET 實驗推論此結構於 KCl 條件可能為 G-quadruplex，於 NH_4Cl 和 $MgCl_2$ 條件可能為 hairpin。

Dynamic interaction 於 $MgCl_2$ 條件固定相同重複次數之 $r(G_4C_2)_n\text{-}2H$ 和 $r(G_4C_2)_n\text{-NH-Cy5UTP}$ 交互作用，結果顯示 $r(G_4C_2)_n\text{-NH-Cy5UTP}$ 相對不易和 $r(G_4C_2)_n\text{-}2H$ 發生交互作用（圖 15C），可能原因為 $r(G_4C_2)_n\text{-NH-Cy5UTP}$ 於 $MgCl_2$ 條件將有潛力形成分子間結構，而相對不易和 $r(G_4C_2)_n\text{-}2H$ 發生交互作用



3.6.4 $r(G_4C_2)_n\text{-}2H$ 和 $r(G_4C_2)_n\text{-NH-Cy5UTP}$ 以相似形式結合且速率相近

$r(G_4C_2)_n\text{-}2H$ 和 $r(G_4C_2)_n\text{-NH-Cy5UTP}$ 於三種鹽離子條件將發生動態交互作用，而尚未發生交互作用之 dwell time 皆可擬合 $\exp(-k^*t)$ ，說明無論何種離子條件，無論重複次數差異，trace 大多發生 1~2 次交互作用，將以相似形式結合，on rate 則介於 0.1~0.24 (1/s) 之間，結果顯示 $r(G_4C_2)_4\text{-}2H$ 和 $r(G_4C_2)_5\text{-NH-Cy5UTP}$ 於 NH_4Cl 和 MgCl_2 條件之 on rate 為離群值（圖 13F），可能原因為其發生動態交互作用的頻率僅 1.5%，若 trace 發生 ≥ 2 次交互作用，儘管極少仍導致數據差異，除此之外，結合速率皆相近。

3.6.5 $r(G_4C_2)_n\text{-}2H$ 和 $r(G_4C_2)_n\text{-NH-Cy5UTP}$ 以兩種形式解離

$r(G_4C_2)_n\text{-}2H$ 和 $r(G_4C_2)_n\text{-NH-Cy5UTP}$ 於三種鹽離子條件將發生動態交互作用，而發生交互作用之 dwell time 於三種鹽離子條件大多可擬合 $a_1^*\exp(-k_1^*t) + a_2^*\exp(-k_2^*t)$ ， $r(G_4C_2)_4\text{-}2H$ 和 $r(G_4C_2)_n\text{-NH-Cy5UTP}$ 、 $r(G_4C_2)_5\text{-}2H$ 和 $r(G_4C_2)_4\text{-NH-Cy5UTP}$ 於 MgCl_2 條件； $r(G_4C_2)_3\text{-}2H$ 和 $r(G_4C_2)_4\text{-NH-Cy5UTP}$ 、 $r(G_4C_2)_4\text{-}2H$ 和 $r(G_4C_2)_5\text{-NH-Cy5UTP}$ 於 NH_4Cl 條件僅可擬合 $\exp(-k^*t)$ （圖 16），可能原因為其發生動態交互作用的頻率略低，至多 2.5%，導致擬合結果差異，事實上，無論何種離子條件，無論重複次數差異，皆以相對快速或相對慢速解離形式發生動態交互作用（圖 13A），整體趨勢將以相對快速解離為主要形式，僅 $r(G_4C_2)_5\text{-}2H$ 和 $r(G_4C_2)_4\text{-NH-Cy5UTP}$ 於 NH_4Cl 條件之相對快速解離形式占比略低於 50%，其發生動態交互作用的頻率僅 2.3%，可能導致數據差異，而它所對應相對慢速解離形式的 off rate 之數值約為 1.7，說明結合時間仍相當短暫，綜上所述， $r(G_4C_2)_n\text{-}2H$ 和 $r(G_4C_2)_n\text{-NH-Cy5UTP}$ 於三種鹽離子條件之動態交互作用以極短時間的結合為主要形式。

此外， MgCl_2 之相對快速解離占比最高，平均為 94.9%（圖 16 之黃色虛線）， NH_4Cl 居中，平均為 85.1%（圖 16 之藍色虛線），而 KCl 之相對快速解離占比最低，平均為 75.3%（圖 16 之綠色虛線），然而， MgCl_2 之 half occupancy 占比大多



高於 KCl 條件，說明儘管 MgCl₂ 條件相對不易發生交互作用，倘若一旦結合將以相對較高的機率維持結合狀態，對比 KCl 相對容易發生交互作用，但結合僅維持短暫的時間便解離，至於 NH₄Cl 條件將不易發生交互作用，即使結合仍瞬間解離，其特性將不利於 foci 形成。

3.6.6 $r(G_4C_2)_n\text{-}2H$ 和 $r(G_4C_2)_n\text{-NH-Cy5UTP}$ 之相對慢速解離速率

$r(G_4C_2)_n\text{-}2H$ 和 $r(G_4C_2)_n\text{-NH-Cy5UTP}$ 於三種鹽離子條件以相對慢速解離形式之速率平均約為 0.5 (1/s)，而離子差異的整體趨勢為 NH₄Cl > KCl > MgCl₂ (圖 17A)，其中， $r(G_4C_2)_3\text{-}2H$ 和 $r(G_4C_2)_4\text{-NH-Cy5UTP}$ 、 $r(G_4C_2)_4\text{-}2H$ 和 $r(G_4C_2)_5\text{-NH-Cy5UTP}$ 於 NH₄Cl 條件，僅擬合相對快速解離形式，說明 NH₄Cl 即使以相對慢速解離形式結合，仍比較容易解離，而 KCl 條件居中，此外，MgCl₂ 若以相對慢速解離形式結合則相對穩定。

固定相同重複次數之 $r(G_4C_2)_n\text{-}2H$ 和 $r(G_4C_2)_n\text{-NH-Cy5UTP}$ 於相同鹽離子條件交互作用，結果顯示 $r(G_4C_2)_n\text{-}2H$ 和 $r(G_4C_2)_4\text{-NH-Cy5UTP}$ 交互作用於三種鹽離子條件之相對慢速解離形式仍比較容易解離 (圖 17B)，然而， $r(G_4C_2)_4\text{-NH-Cy5UTP}$ 於三種鹽離子條件之結構多型性複雜，於 KCl 可能形成分子內 G-quadruplex，於 MgCl₂ 可能形成 hairpin、分子內或分子間 G-quadruplex，於 NH₄Cl 可能形成 hairpin，暫且無法解釋此現象可能的原因。

3.6.7 $r(G_4C_2)_n\text{-}2H$ 和 $r(G_4C_2)_n\text{-NH-Cy5UTP}$ 之相對快速解離速率

$r(G_4C_2)_n\text{-}2H$ 和 $r(G_4C_2)_n\text{-NH-Cy5UTP}$ 於三種鹽離子條件以相對快速解離形式之速率平均約為 6.2 (1/s)，而離子差異的整體趨勢為 MgCl₂ 或 NH₄Cl > KCl (圖 18A)，說明於 KCl 條件相對容易發生交互作用，且以相對快速解離形式結合時，比較不易解離，而於 MgCl₂ 或 NH₄Cl 條件則相對不易發生交互作用，且以相對快速解離形式結合時，比較容易解離。



固定不同重複次數之 $r(G_4C_2)_n\text{-}2H$ 和相同重複次數之 $r(G_4C_2)_n\text{-NH-Cy5UTP}$ 於相同鹽離子條件交互作用，結果顯示 $r(G_4C_2)_4\text{-}2H$ 和 $r(G_4C_2)_n\text{-NH-Cy5UTP}$ 交互作用於三種鹽離子條件之相對快速解離形式，大致比較容易解離（圖 18B）， $r(G_4C_2)_4\text{-}2H$ 和 $r(G_4C_2)_4\text{-NH-Cy5UTP}$ 於 $MgCl_2$ 條件，off rate 相對較低可能的原因為其僅擬合 $\exp(-k^*t)$ ，導致相對慢速解離形式影響其數值，說明 $r(G_4C_2)_4\text{-}2H$ 於三種鹽離子條件皆形成穩定的分子內結構，相對不易和 $r(G_4C_2)_n\text{-NH-Cy5UTP}$ 發生交互作用，若以相對快速解離形式結合時，仍比較容易解離。



第四章 討論

C9ORF72 基因中的 G₄C₂ 重複序列異常擴增並轉錄出多重複的 G₄C₂ RNA 進而形成 foci 為 ALS 或 FTD 的病因之一，G₄C₂ RNA 的結構和 foci 的成因息息相關，但其結構多型性相當複雜，至今仍備受爭議，G₄C₂ RNA 可能形成 G-quadruplex、hairpin 或是其它複合型結構，本文盼以單分子技術研究 G₄C₂ RNA 可揭示其不同面向，為此，我們以 *in vitro* 的方式轉錄 G₄C₂ RNA 作為待測分子，以電泳結果確認純化情形時，卻發現 r(G₄C₂)₄-2H 或 r(G₄C₂)₄-1H 於 agarose gel 將有一條移動較慢的 band (圖 3)，當時推論可能原因為限制酵素處理 plasmid 不完全而轉錄出較長的 RNA，然而，後續實驗欲以 Cy3-UTP 或 Cy5UTP 轉錄各種 r(G₄C₂)_n 時，於 UREA PAGE 亦檢測到殘留在 well 而無法順利進行電泳的 RNA (圖 3)，由於進行單分子實驗將檢測到 RNA foci，暫且推論那些殘留在 well 的 RNA 形成 foci，而且相當穩固，甚至無法以 UREA 和 formamide 進行 denature，儘管數據分析時已盡量排除，此類無法以 Monarch RNA Cleanup Kit 移除的 RNA foci 仍可能會干擾單分子實驗結果，特別的是，購自 IDT 以化學方式合成的 rA(G₄C₂)₄A-Cy5UTP 並不會殘留在 well，尚未將 *in vitro* 轉錄之 r(G₄C₂)_n 進行 gel extraction 回收以確認是否仍將形成 RNA foci，若是，則可優化未來單分子實驗，若否，則此類 RNA foci 可能於 *in vitro* 轉錄過程便已成形，可作為 *in vitro* 製備 RNA foci 的潛在方式，至於如何將其固定於 slide 則需要進行相關測試，研究如何干擾或破壞已成形的 RNA foci，可能作為潛在的治療手段，值得未來進行相關研究。

儘管 r(G₄C₂)₄-2H 之純化情形仍有些許疑慮，進行 DNA handle annealing 測試結果顯示 Cy3 handle 無法順利 annealing 在殘留於 well 的 RNA 之上，而我們將藉由 Cy3 signal 擇選欲進行後續分析的單分子 G₄C₂ RNA，故以此進行後續 FRET 實驗，由於 r(G₄C₂)₄-2H 作為待測分子，結果皆為 high FRET 而無法區分結構差異，我們試著在 antisense 展開過程觀測 FRET 值變化，也許不同的結構於展開過程會有特別的 intermediate 構形，可惜的是我們並沒有觀測到相關現象，初始為了即時



觀測 FRET 值動態變化，將以 antisense 作為 mobile molecular 進行 FRET 實驗，然而，實驗當下可能發生各種突發狀況，例如：因 photobleaching 導致需要重新配製除氧溶液，此類時間因素可能導致展開比例的些微落差，欲控制相關變因，於固定作用時間完畢則應移除 antisense，那麼實驗將更為嚴謹，後續分析結果也會更準確。

G₄C₂ RNA 的結構多型性相當複雜，FRET 實驗初步探究可能有至少兩種分子內結構，而電泳為檢測結構差異的簡便方式，預期 G-quadruplex 或 hairpin 結構因構形差異而改變移動快慢，但我們的實驗結果無法區分兩者，將以識別 G-quadruplex 的 BG4 antibody 輔助驗證 G₄C₂ RNA 的結構，結果顯示 r(G₄C₂)₄-NH-Cy3UTP 於 MgCl₂ 溶液之移動較慢的 band 可能和 BG4 antibody 形成複合物，有關於此，已於本文 3.4.2 末段解釋可能的原因，儘管如此，我們仍無法排除 r(G₄C₂)₄-NH-Cy3UTP 於 MgCl₂ 溶液形成不同於 KCl 溶液之 G-quadruplex 構形，而 antisense 可展開前者，卻相對無法展開後者，或是形成相同的 G-quadruplex 構形，在 KCl 較為穩定而相對無法展開。此外，我們發現 r(G₄C₂)₄-NH-Cy3UTP 於 MgCl₂ 溶液可能形成多股 RNA 聚合體，然而，暫且無法確認是否為 artificial effect，以上皆有待未來驗證。已知 G₄C₂ 重複序列異常擴增至次數大於 30 可能導致疾病發生，此外，前人文獻指出 flanking sequence 將影響 G₄C₂ RNA 之結構多型性，而我們的電泳結果也觀察到類似的現象，探究 flanking sequence 如何影響 G₄C₂ RNA 的結構多型性，而該影響是否隨著重複次數增加而下降，若是，那麼 flanking sequence 是否作為保護功能，研究相關效應將有助於理解疾病的潛在分子機制。

前人研究指出僅 RNA 便可形成 foci，而我們使用 TIRF 顯微鏡也觀測到類似的現象，研究 G₄C₂ RNA 的交互作用有助於理解其構形如何影響 RNA foci 的形成，本文初步分析以 biotin-Cy5 DNA handle 作為對照以過濾雜訊，然而，不同的 immobilized molecule 和 chamber 或 mobile molecule 存在與否皆有可能影響 Cy5 signal intensity，如何分析才能更接近客觀事實，需要再作考量。此外，觀測到 mobile RNA foci 在 slide 附近移動，說明 RNA foci 和固定於 slide 的 G₄C₂ RNA 交互作用，



至於如何進行交互作用，將有待未來驗證，雖然此類現象相當有趣，但仍有可能影響實驗結果，而我們暫且無法於實驗時排除，只能在分析時盡可能將其移除。儘管事先進行 non-specific binding 確認，但在 KCl 溶液仍發現些許無法被 Cy3 signal 捷選之單分子和 G₄C₂ RNA 交互作用，我們尚無法解釋此種現象，也只能在分析時盡可能將其移除。由於 HMM 擬合將有失準之 trace 需要移除，可能略微影響 dynamic interaction 的發生頻率，此外，在 NH₄Cl 或 MgCl₂ 溶液之 G₄C₂ RNA 相對不易進行交互作用，故移除 HMM 擬合失準之 trace 將影響結合速率或解離速率。綜上所述，interaction 實驗的數據分析仍需要優化，使結果更為客觀且可信。

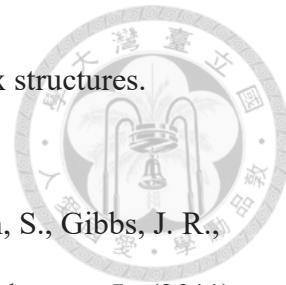


參考文獻

- Bochman, M. L., Paeschke, K., & Zakian, V. A. (2012). DNA secondary structures: stability and function of G-quadruplex structures. *Nature reviews genetics*, 13(11), 770-780.
- Breevoort, S., Gibson, S., Figueroa, K., Bromberg, M., & Pulst, S. (2022). Expanding clinical spectrum of C9ORF72-related disorders and promising therapeutic strategies: a review. *Neurology Genetics*, 8(3).
- Bugaut, A., Murat, P., & Balasubramanian, S. (2012). An RNA hairpin to G-quadruplex conformational transition. *Journal of the American Chemical Society*, 134(49), 19953-19956.
- Butler, J. M. (2006). Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing. *Journal of forensic sciences*, 51(2), 253-265.
- Conlon, E. G., Lu, L., Sharma, A., Yamazaki, T., Tang, T., Shneider, N. A., & Manley, J. L. (2016). The C9ORF72 GGGGCC expansion forms RNA G-quadruplex inclusions and sequesters hnRNP H to disrupt splicing in ALS brains. *elife*, 5, e17820.
- De Magis, A., Kastl, M., Brossart, P., Heine, A., & Paeschke, K. (2021). BG-flow, a new flow cytometry tool for G-quadruplex quantification in fixed cells. *BMC biology*, 19, 1-12.
- DeJesus-Hernandez, M., Mackenzie, I. R., Boeve, B. F., Boxer, A. L., Baker, M., Rutherford, N. J., Nicholson, A. M., Finch, N. A., Flynn, H., & Adamson, J. (2011). Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron*, 72(2), 245-256.



- Ellegren, H. (2004). Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature reviews genetics*, 5(6), 435-445.
- Ellinger, I., & Ellinger, A. (2014). Smallest unit of life: cell biology. *Comparative medicine: Anatomy and physiology*, 19-33.
- Förster, T. (1948). Zwischenmolekulare energiewanderung und fluoreszenz. *Annalen der physik*, 437(1-2), 55-75.
- Fay, M. M., Lyons, S. M., & Ivanov, P. (2017). RNA G-quadruplexes in biology: principles and molecular mechanisms. *Journal of molecular biology*, 429(14), 2127-2147.
- Fujino, Y., & Nagai, Y. (2022). The molecular pathogenesis of repeat expansion diseases. *Biochemical Society Transactions*, 50(1), 119-134.
- Gendron, T. F., & Petrucelli, L. (2018). Disease mechanisms of C9ORF72 repeat expansions. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 8(4), a024224.
- Haeusler, A. R., Donnelly, C. J., Periz, G., Simko, E. A., Shaw, P. G., Kim, M.-S., Maragakis, N. J., Troncoso, J. C., Pandey, A., & Sattler, R. (2014). C9orf72 nucleotide repeat structures initiate molecular cascades of disease. *Nature*, 507(7491), 195-200.
- Jain, A., & Vale, R. D. (2017). RNA phase transitions in repeat expansion disorders. *Nature*, 546(7657), 243-247.
- Kremer, E., Pritchard, M., Lynch, M., Yu, S., Holman, K., Baker, E., Warren, S., Schlessinger, D., Sutherland, G., & Richards, R. (1991). Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p (CCG) n. *Science*, 252(5013), 1711-1714.
- Reddy, K., Zamiri, B., Stanley, S. Y., Macgregor, R. B., & Pearson, C. E. (2013). The disease-associated r (GGGGGCC) n repeat from the C9orf72 gene forms tract



- length-dependent uni-and multimolecular RNA G-quadruplex structures. *Journal of Biological Chemistry*, 288(14), 9860-9866.
- Renton, A. E., Majounie, E., Waite, A., Simón-Sánchez, J., Rollinson, S., Gibbs, J. R., Schymick, J. C., Laaksovirta, H., Van Swieten, J. C., & Mallykangas, L. (2011). A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron*, 72(2), 257-268.
- Šket, P., Pohleven, J., Kovanda, A., Štalekar, M., Župunski, V., Zalar, M., Plavec, J., & Rogelj, B. (2015). Characterization of DNA G-quadruplex species forming from C9ORF72 G4C2-expanded repeats associated with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration. *Neurobiology of aging*, 36(2), 1091-1096.
- van Blitterswijk, M., Gendron, T. F., Baker, M. C., DeJesus-Hernandez, M., Finch, N. A., Brown, P. H., Daugherty, L. M., Murray, M. E., Heckman, M. G., & Jiang, J. (2015). Novel clinical associations with specific C9ORF72 transcripts in patients with repeat expansions in C9ORF72. *Acta neuropathologica*, 130, 863-876.
- Wade, M., Méndez, J., Coussens, N. P., Arkin, M. R., & Glicksman, M. A. (2017). Inhibition of protein-protein interactions: cell-based assays. *Assay Guidance Manual [Internet]*.
- Wang, X., Goodrich, K. J., Conlon, E. G., Gao, J., Erbse, A. H., Manley, J. L., & Cech, T. R. (2019). C9orf72 and triplet repeat disorder RNAs: G-quadruplex formation, binding to PRC2 and implications for disease mechanisms. *Rna*, 25(8), 935-947.



- Willems, T., Gymrek, M., Highnam, G., Mittelman, D., Erlich, Y., & Consortium, G. P. (2014). The landscape of human STR variation. *Genome research*, 24(11), 1894-1904.
- Yang, Q., Jiao, B., & Shen, L. (2020). The development of C9orf72-related amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia disorders. *Frontiers in Genetics*, 11, 562758.
- Zalar, M., Wang, B., Plavec, J., & Šket, P. (2023). Insight into Tetramolecular DNA G-Quadruplexes Associated with ALS and FTLD: Cation Interactions and Formation of Higher-Ordered Structure. *International journal of molecular sciences*, 24(17), 13437.
- Zhou, B., Liu, C., Geng, Y., & Zhu, G. (2015). Topology of a G-quadruplex DNA formed by C9orf72 hexanucleotide repeats associated with ALS and FTD. *Scientific reports*, 5(1), 16673.
- Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic acids research*, 31(13), 3406-3415.
- 許鈺婕，2023，國立臺灣大學分子與細胞生物學研究所碩士論文，以單分子螢光共振能量轉移觀測 mRNA 的長度對反義寡核苷酸以及 30S 核糖體次單元的交互作用影響

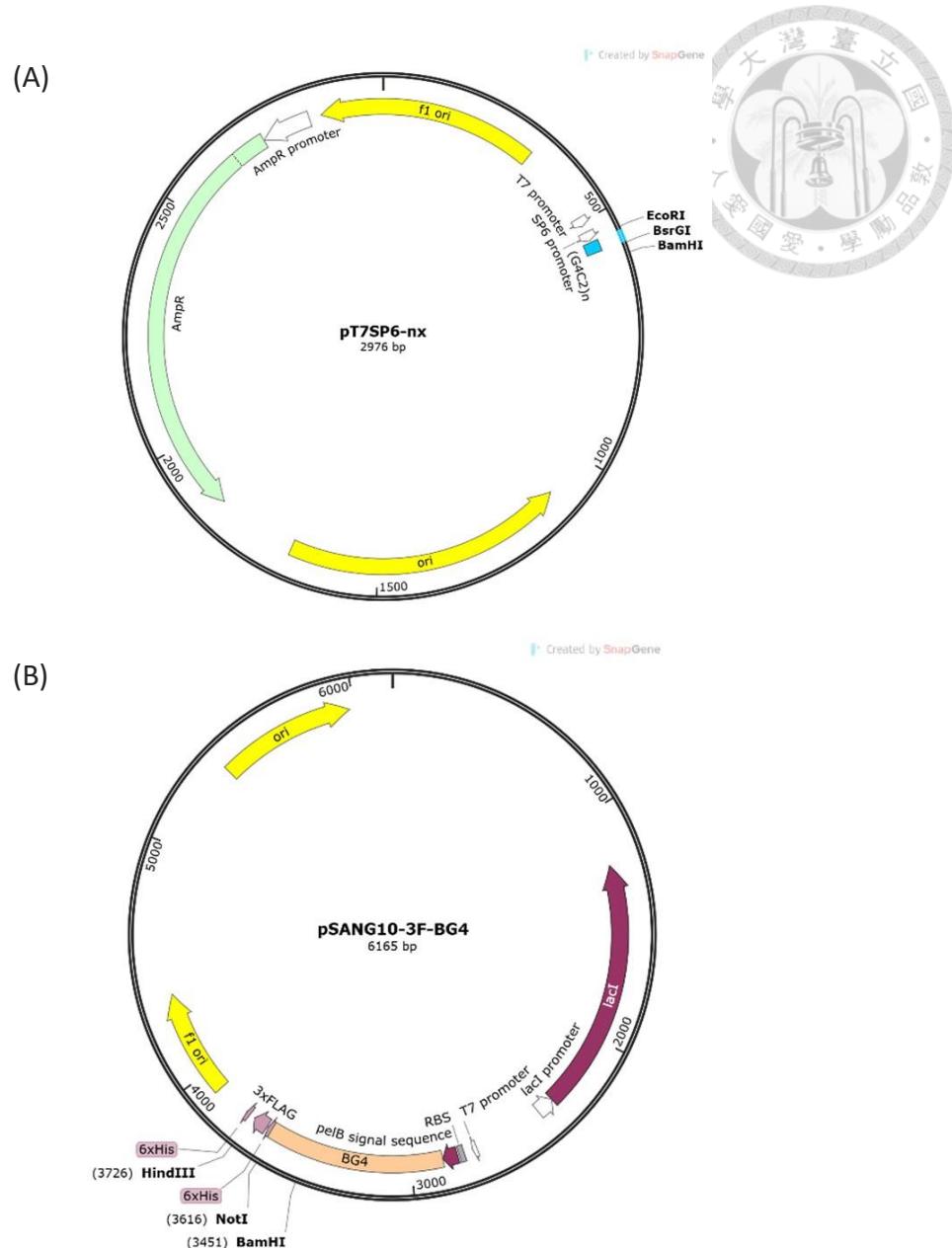
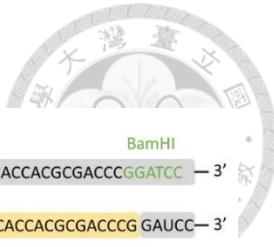
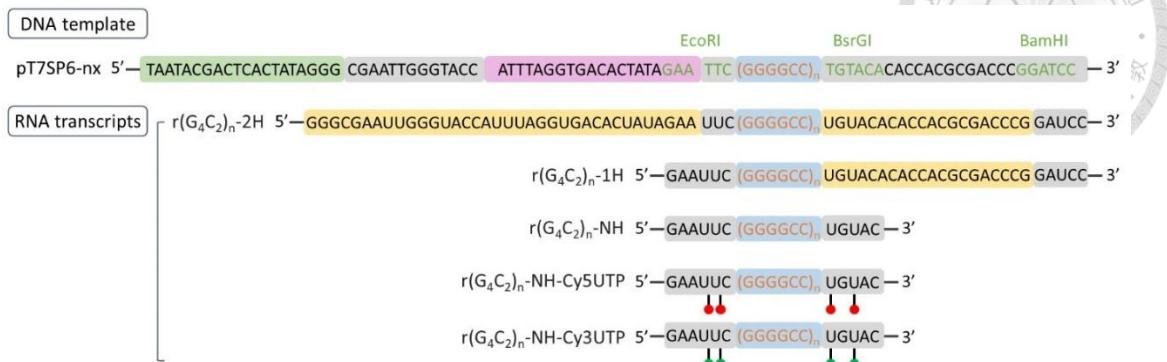


圖 1、質體示意圖

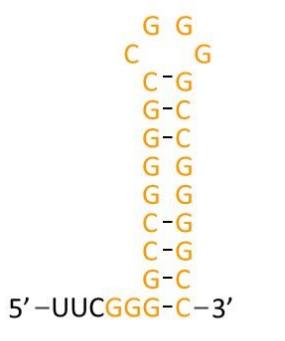
(A) pT7SP6-(G₄C₂)_n-hairpin 和 pT7SP6-nx , n = 3 或 4 或 5，代表 d(G₄C₂) 重複次數。藉由 EcoRI 和 BsrGI cutting sites 將 d(G₄C₂)_n 接入（參照圖 2）。藉由 in vitro transcription 依據 BsrGI 或 BamHI cutting sites 配合 T7 或 SP6 promoter，可獲得兩端無 handle annealing site 之 r(G₄C₂)_n-NH，帶有 5' handle annealing site 之 r(G₄C₂)_n-1H，或同時帶有 5' 和 3' handle annealing site 之 r(G₄C₂)_n-2H。(B) pSANG10-3F-BG4 #55756，購自浩盟生技代理，將其轉形至 BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL 菌株以製備 Anti-DNA G-quadruplex Antibody (BG4)。



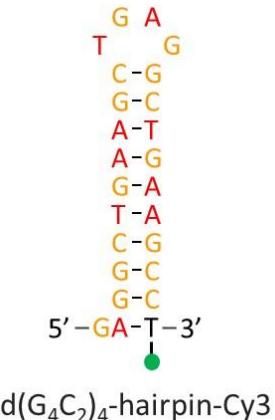
(A)



(B)



(C)

圖 2、DNA 模板和對應的 r(G₄C₂)_n 序列示意圖

(A) 上方序列为 DNA template，绿底为 T7 promoter，紫底为 SP6 promoter，绿字为 restriction enzyme cutting site，下方序列为 RNA transcripts，蓝底为(G₄C₂)_n，黄底为 DNA handle annealing site，灰底为其餘序列，红点为可标定 Cy5 的鹼基，绿点为可标定 Cy3 的鹼基。(B) 以 mfold (Zuker, 2003) 預測 r(G₄C₂)₄-2H 結構。(C) 以 mfold (Zuker, 2003) 預測 d(G₄C₂)₄-hairpin-Cy3 結構，參照 2019 年發表的 paper (Wang et al., 2019) 設計無法形成 G-quadruplex 結構的序列作為 d(G₄C₂)₄-Cy3 的 control。圖例僅為示意，single-molecule r(G₄C₂)_n-NH-Cy5UTP 或 r(G₄C₂)_n-NH-Cy3UTP 可能 label 0 ~ 4 個 dye。

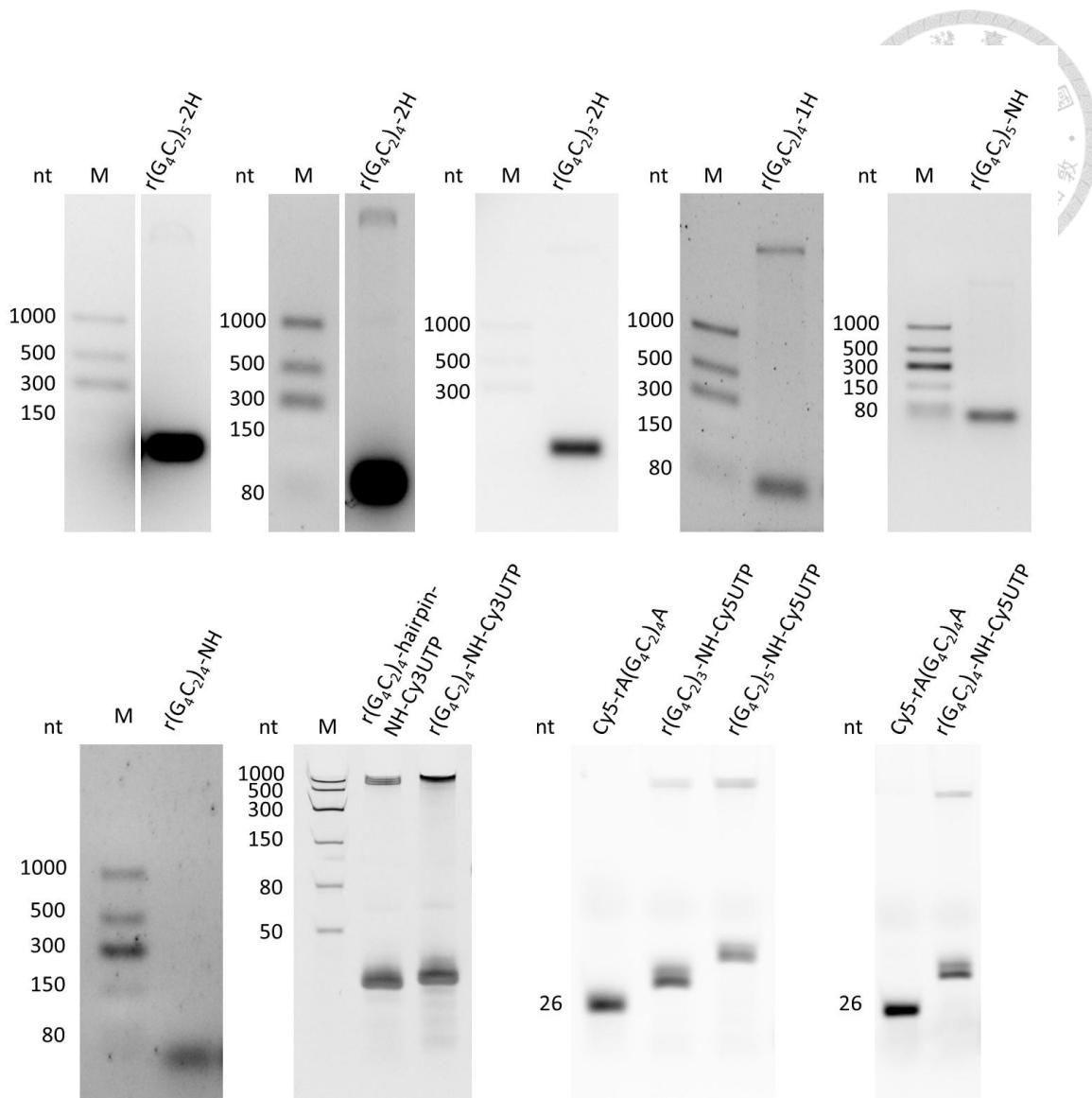


圖 3、 $r(G_4C_2)_n$ transcripts

1 ~ 2% agarose gel 以 SYBR Green II RNA Gel Stain 呈色，電泳結果確認 in vitro transcription 之 $r(G_4C_2)_n$ -NH、 $r(G_4C_2)_n$ -1H、 $r(G_4C_2)_n$ -2H 的純化情形，M 為 Low Range ssRNA Ladder。10% UREA PAGE 以 UV冷光影像系統呈色，電泳結果確認 in vitro transcription 之 $r(G_4C_2)_4$ -hairpin-NH-Cy3UTP、 $r(G_4C_2)_4$ -NH-Cy3UTP、 $r(G_4C_2)_5$ -NH-Cy5UTP 的純化情形，M 為 Low Range ssRNA Ladder，Cy5-rA(G_4C_2)₄A 為 26 nt，作為 size 對照。

Data from 2022/0804, 0915, 1024, 1117, 1124 ; 2023/0704, 0511 ; 2024/0426, 0516

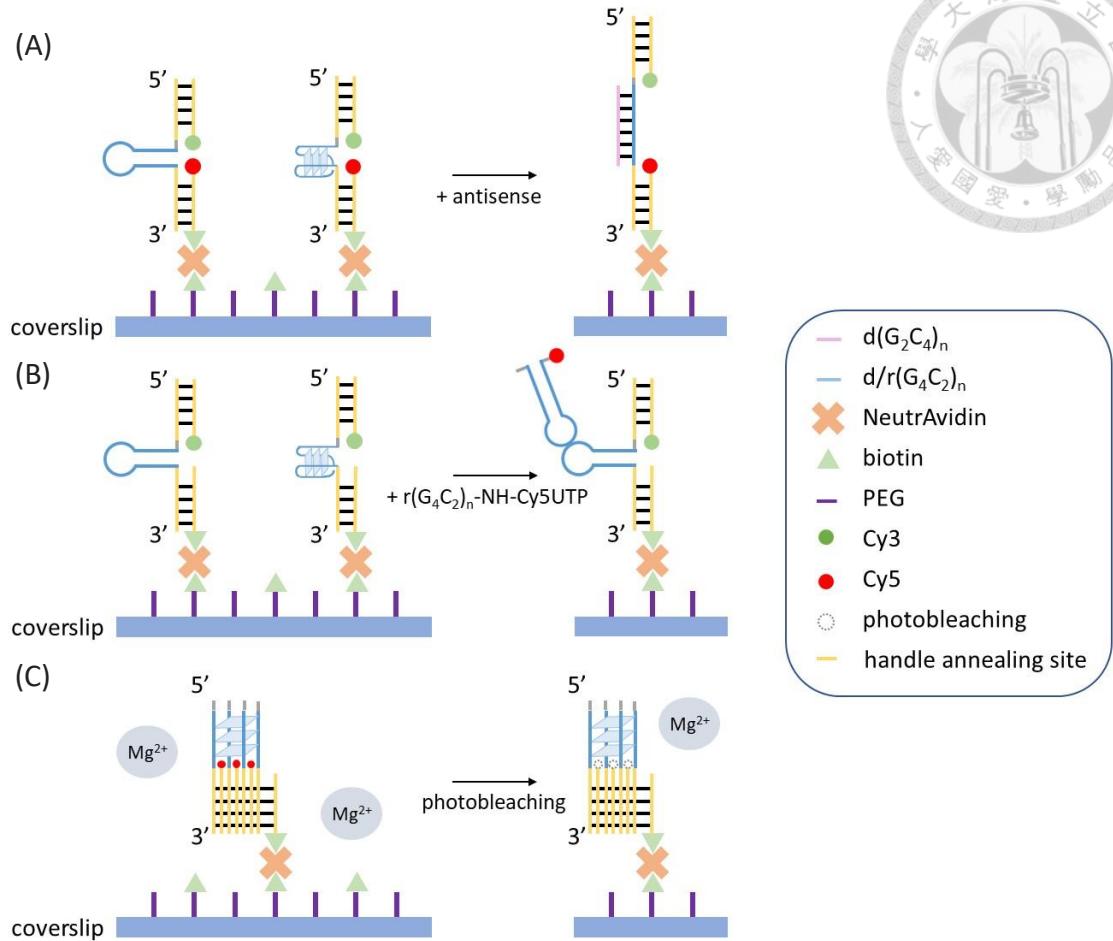


圖 4、single-molecule 實驗設計

事先以 PEG 和 biotin-PEG mixture 修飾 coverslip，實驗過程將 flow NeutrAvidin (NA)，NA 將專一性結合至 coverslip 表面的 biotin-PEG，再 flow 藉由 3' handle 的 biotin 專一性結合至 NA 的待測分子以將其固定於 coverslip。(A) $d/r(G_4C_2)_n-2H$ 的 5' anneal Cy3 handle 而 3' anneal biotin-Cy5 handle， $d/r(G_4C_2)_n-2H$ 可能形成 hairpin 或 G-quadruplex 結構，藉由 antisense 干擾結構以檢測 FRET 變化。(B) $r(G_4C_2)_n-2H$ 的 5' anneal Cy3 handle 而 3' anneal biotin handle，加入 $r(G_4C_2)_n-NH-Cy5UTP$ 以檢測 interaction 情形。(C) $r(G_4C_2)_4-1H$ 於鎂離子條件下，可能形成分子間 G-quadruplex，藉由 photobleaching 檢測結構。

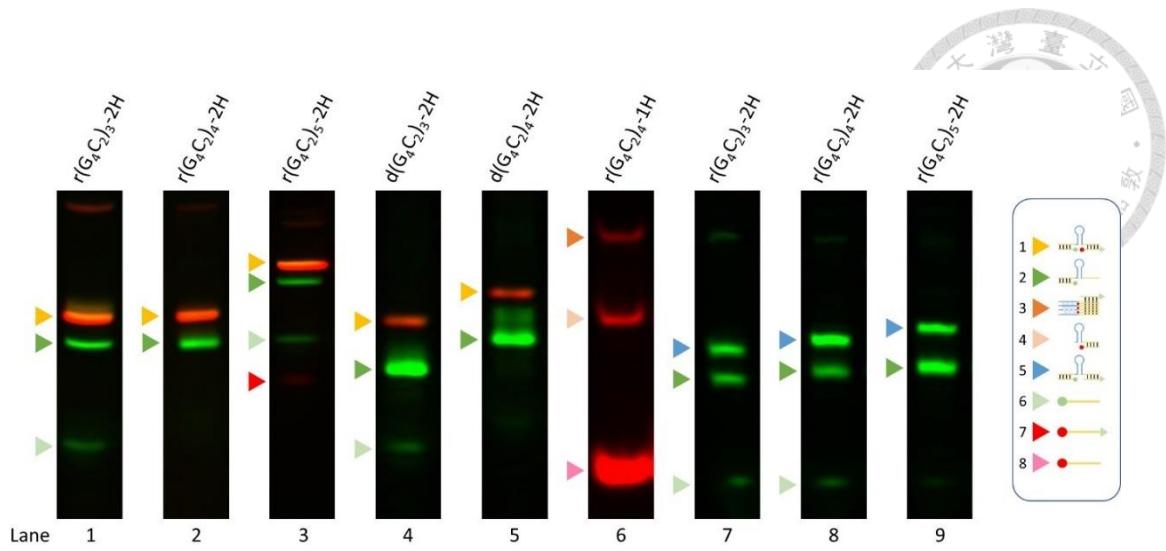
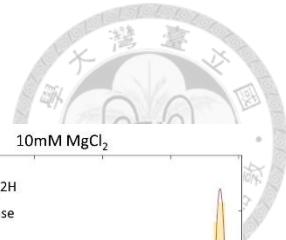


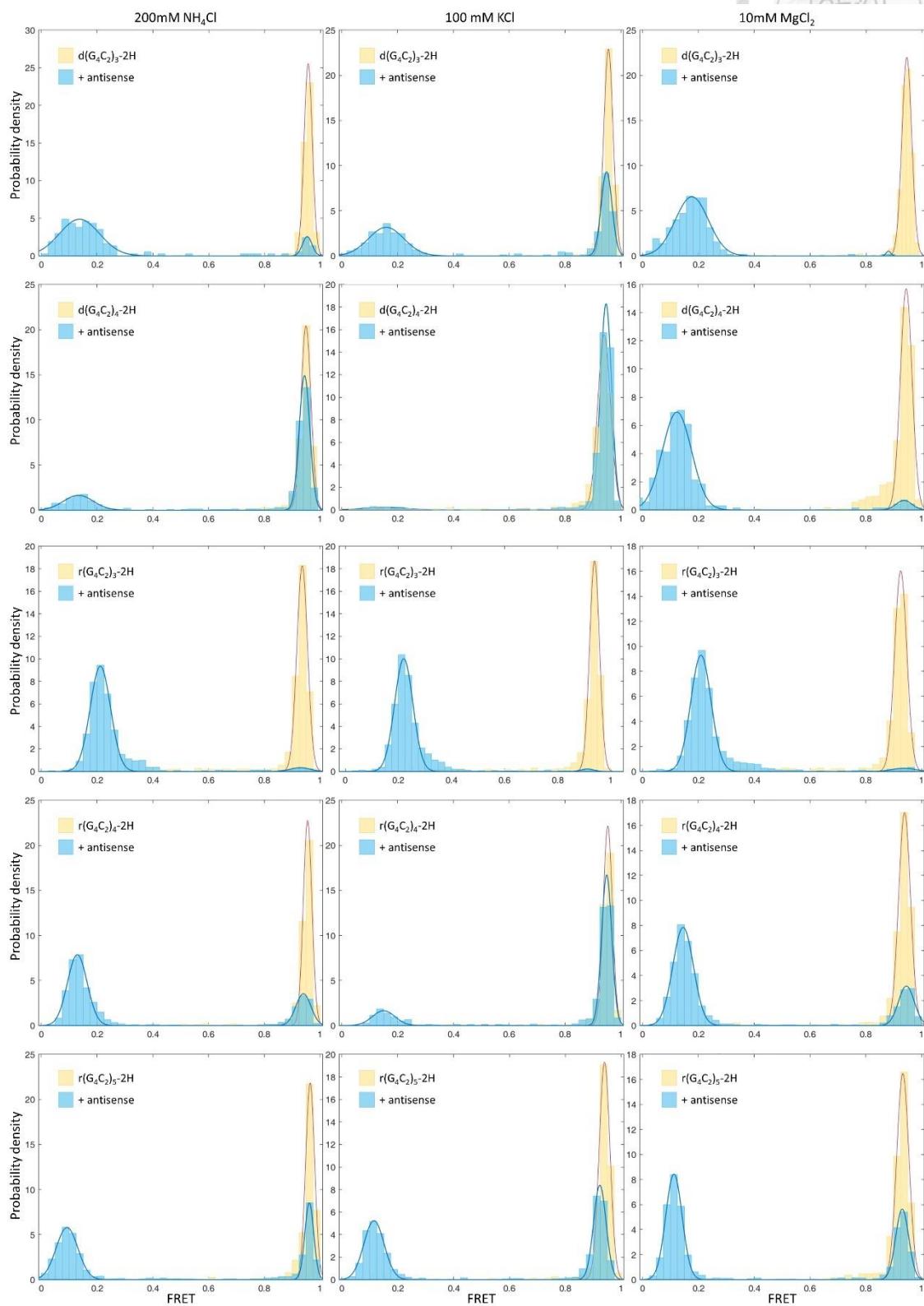
圖 5、檢測 single-molecule 實驗之 $d/r(G_4C_2)_n-2H$ annealing 情形

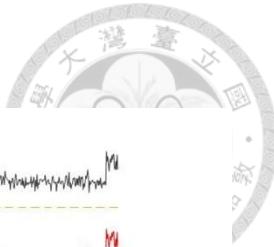
將 $d/r(G_4C_2)_n-2H$ 或 $r(G_4C_2)_4-1H$ 和 DNA handle 以 70 或 $85^{\circ}C$ denature 再緩慢降溫以 anneal，10% native PAGE 並以 UVP 螢冷光影像系統呈色，後續使用 ImageJ 套色螢光訊號。Lane 1~9 參照本文 3.2 段落。右側 icon 示意圖：(1) $d/r(G_4C_2)_n-2H$ 、5' Cy3 handle 和 3' biotin-Cy5 handle annealing；(2) $d/r(G_4C_2)_n-2H$ 和 5' Cy3 handle annealing；(3) $r(G_4C_2)_4-1H$ 同時和 3' Cy5 handle 或 3' biotin handle annealing 之分子間結構；(4) $r(G_4C_2)_4-1H$ 和 3' Cy5 handle 或 3' biotin handle annealing 之分子內結構；(5) $r(G_4C_2)_n-2H$ 、5' Cy3 handle 和 3' biotin handle annealing；(6) 5' Cy3 handle 為 5' h-T7SP6-5' Cy3；(7) 3' biotin-Cy5 handle 為 pGAA_3'handle_Cy5_biotin；(8) 5' Cy5 handle 為 pGAA_3'handle_Cy5；3' biotin handle 為 pGAA_3'handle_biotin（螢光呈色結果無法顯示）。

Data from 2022/0818, 1024, 1221 ; 2023/0809, 1226 ; 2024/0506



(A)





(B)

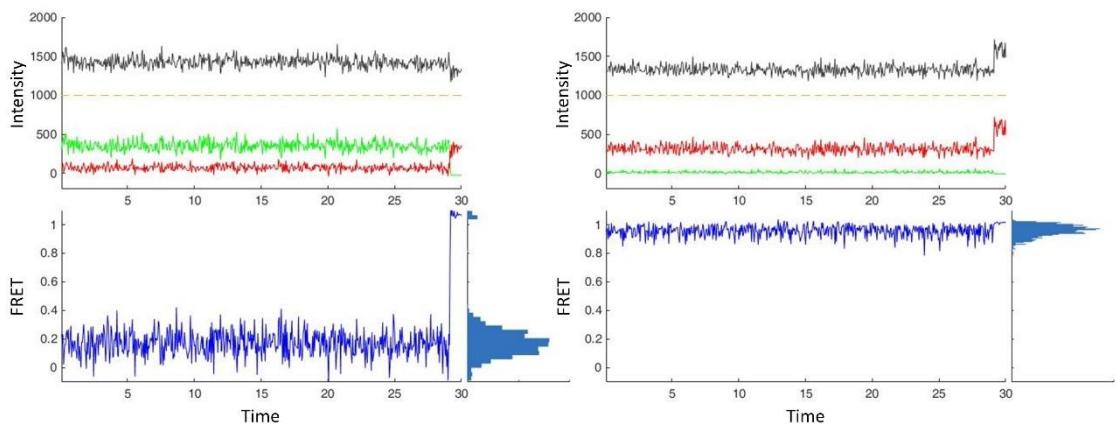


圖 6、 $d/r(G_4C_2)_n\text{-}2\text{H}$ 於三種鹽離子條件之 FRET 分布

(A) $d/r(G_4C_2)_n\text{-}2\text{H}$ 於三種鹽離子條件 ($200 \text{ mM NH}_4\text{Cl}$ 、 100 mM KCl 、 10 mM MgCl_2)

皆為 high FRET， $\text{FRET} > 0.95$ (yellow bar)。加入 $1 \mu\text{M}$ antisense 作用約 5 分鐘，將會 shift 至 low FRET， $\text{FRET} < 0.25$ (blue bar)，而 $\text{FRET} < 0.5$ 的占比根據重複次數或離子種類有所差異。加入 antisense 之前的高斯函數擬合結果為黃色曲線，加入 antisense 之後的高斯函數擬合結果為藍色曲線。定量結果參照圖 8 和表 1。(B) 左圖為 $d/r(G_4C_2)_n\text{-}2\text{H}$ 之 low FRET trace pattern，右圖為 $d/r(G_4C_2)_n\text{-}2\text{H}$ 之 high FRET trace pattern。

Data from 2022/1215, 1229 ; 2024/0615

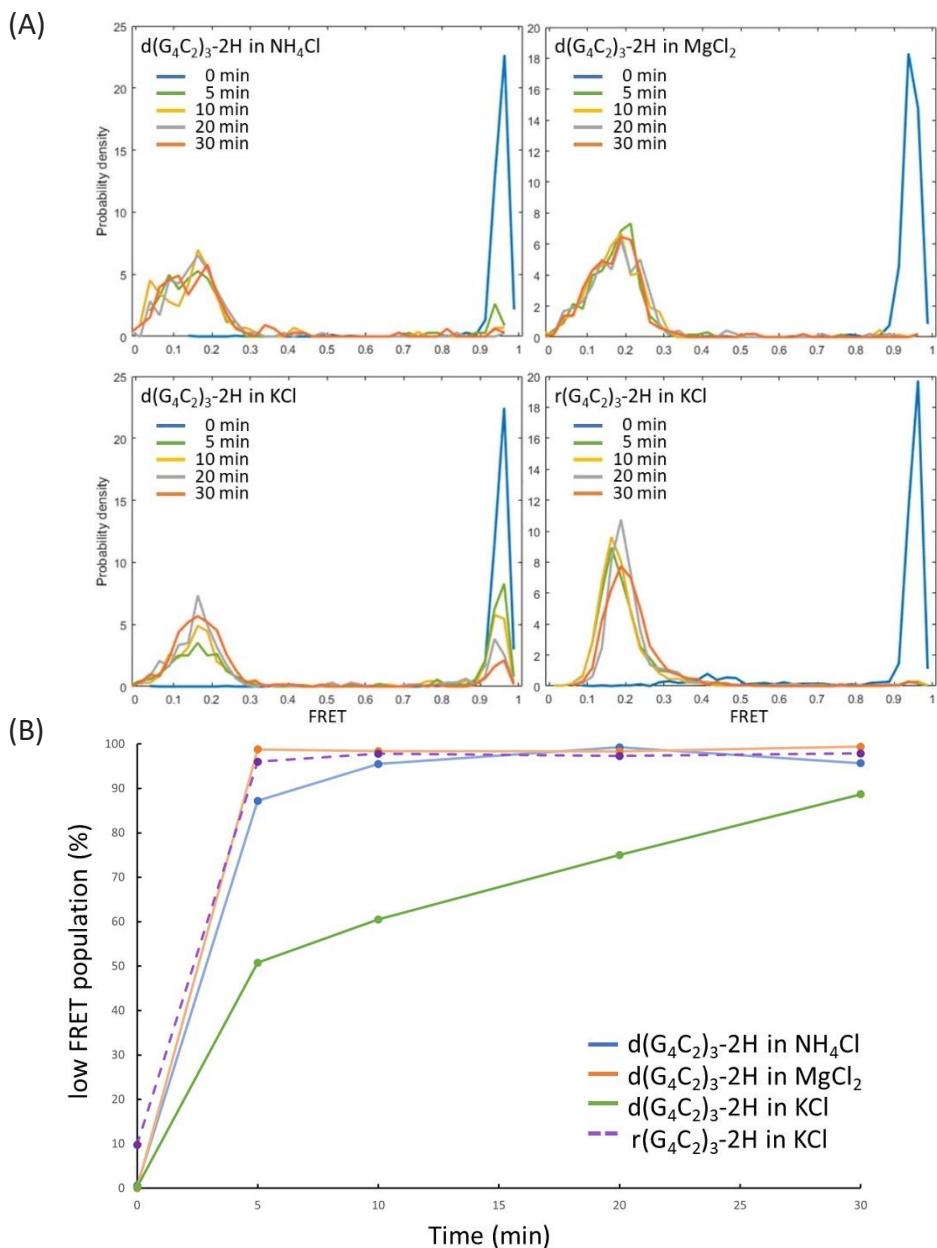
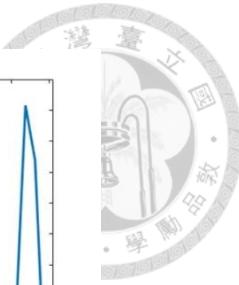


圖 7、 $d(G_4C_2)_3\text{-}2\text{H}$ 於三種鹽離子條件下，加入 antisense 後隨時間之展開比例

(A) $d(G_4C_2)_3\text{-}2\text{H}$ 於三種鹽離子條件和 $r(G_4C_2)_3\text{-}2\text{H}$ 於 KCl 條件之 FRET population distribution，未加入 antisense (0 min) 為藍色折線，皆為 high FRET，加入 $1 \mu\text{M}$ antisense 作用 5、10、20、30 min，將有 high 和 low FRET population。(B) $d(G_4C_2)_3\text{-}2\text{H}$ 於三種鹽離子條件和 $r(G_4C_2)_3\text{-}2\text{H}$ 於 KCl 條件之 time course 折線散佈圖。詳細數據記載於表 2。

Data from 2022/1229 ; 2023/0424

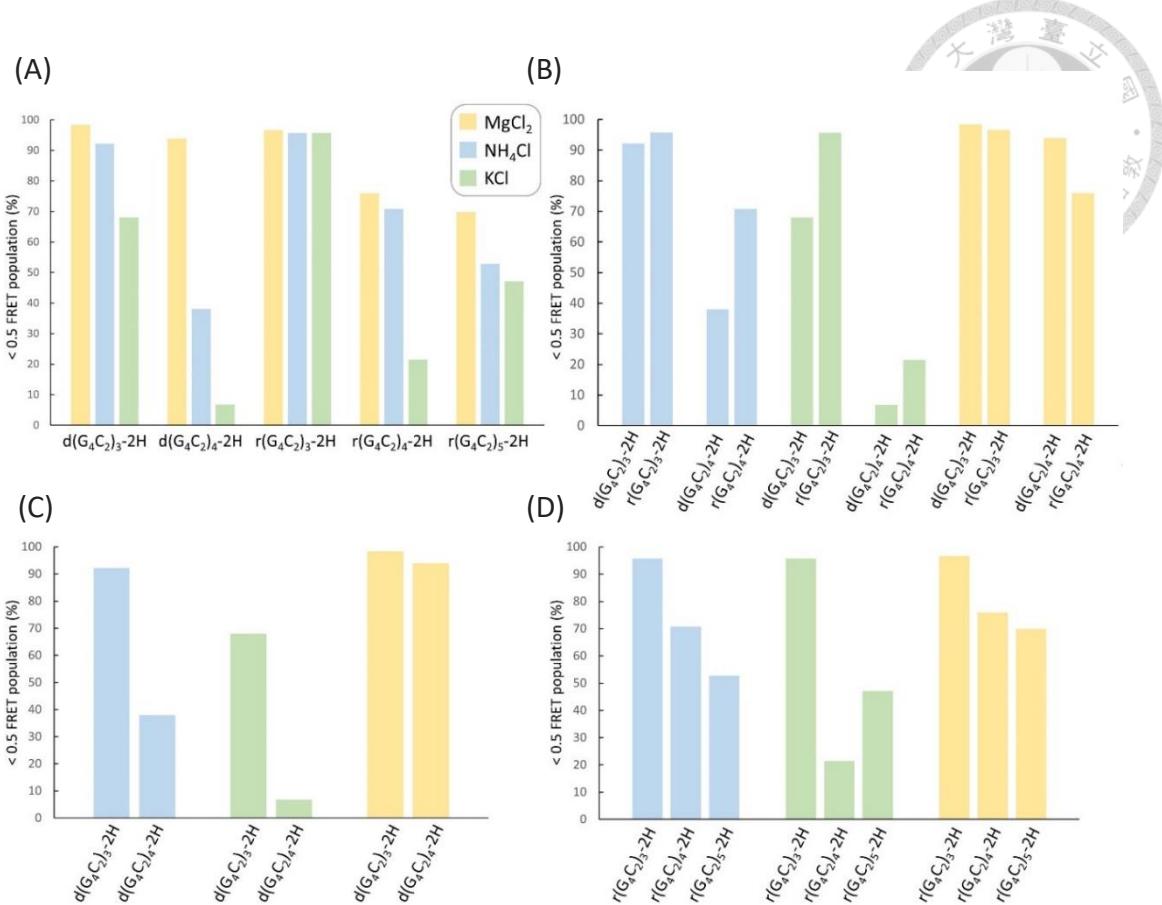


圖 8、d/r(G₄C₂)_n-2H 於三種鹽離子條件，加入 antisense 之 FRET < 0.5 的占比

(A) immobilized molecule 相同，比較離子種類差異，整體趨勢於 MgCl₂ 條件展開最多，NH₄Cl 條件次之，KCl 條件最少。(B) 離子條件和重複次數相同，比較 DNA or RNA 差異，於 NH₄Cl 和 KCl 條件，RNA 展開較 DNA 為多，於 MgCl₂ 條件，則 RNA 展開較 DNA 為少。(C) 離子條件相同，比較 d(G₄C₂)_n-2H 重複次數差異，於三種離子條件下，3 個 repeats 展開較 4 個 repeats 為多。(D) 離子條件相同，比較 r(G₄C₂)_n-2H 重複次數差異，於 NH₄Cl 和 MgCl₂ 條件，重複次數越多則展開越少，於 KCl 條件，則為 3 個 repeats 最多，4 個 repeats 最少，5 個 repeats 居中。縱軸為分子展開 (FRET < 0.5) 之百分比。FRET population distribution 參照圖 6，詳細數據記載於表 1，以上數據皆為三次實驗之結果。

Data from 2022/1027, 1116, 1206, 1215, 1229 ; 2023/0424 ; 2024/0608, 0615, 0726, 0729,
0731

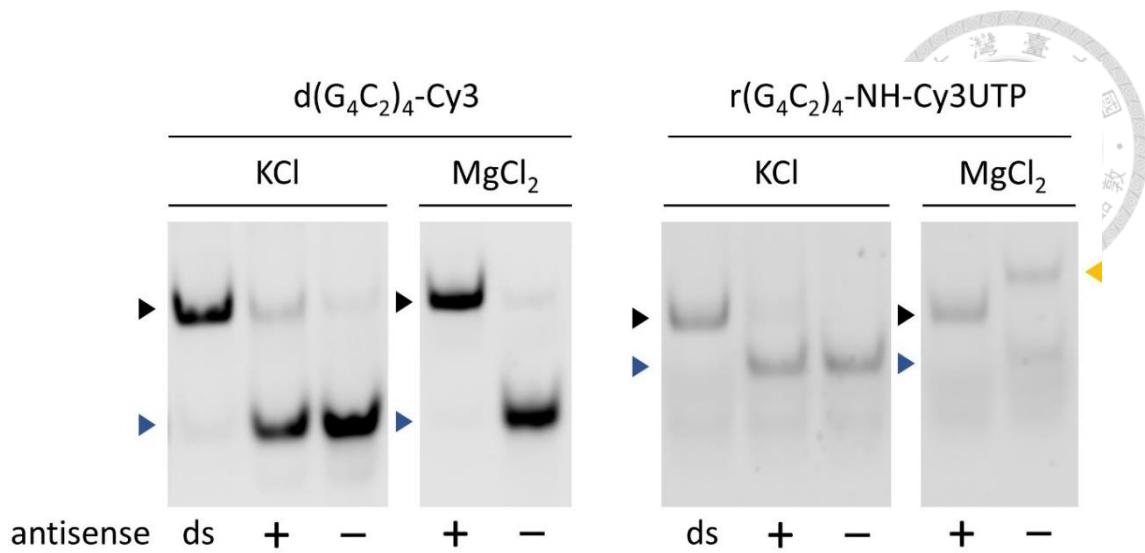


圖 9、檢測 d/r(G_4C_2)₄-Cy3 於不同鹽離子條件之結構多型性

將 1 μ M d(G_4C_2)₄-Cy3 或 r(G_4C_2)₄-NH-Cy3UTP 於 100 mM KCl 或 10 mM MgCl₂ 離子條件以 85°C denature 1 分鐘再緩慢降溫以形成各式構形。後續加入 2 μ M antisense (+)，或等體積 ddH₂O (-)，作用 30 分鐘，ds (double strand) 為 85°C denature 之前事先加入 2 μ M antisense 以形成 double strand 作為對照組。樣品於 10% native PAGE 解析並以 UVP 螢冷光影像系統呈色。黑色箭號標示 ds 位置，藍色箭號標示 single-strand 位置，黃色箭號標示多股 RNA 聚合體的位置。

Data from 2023/0329, 0413

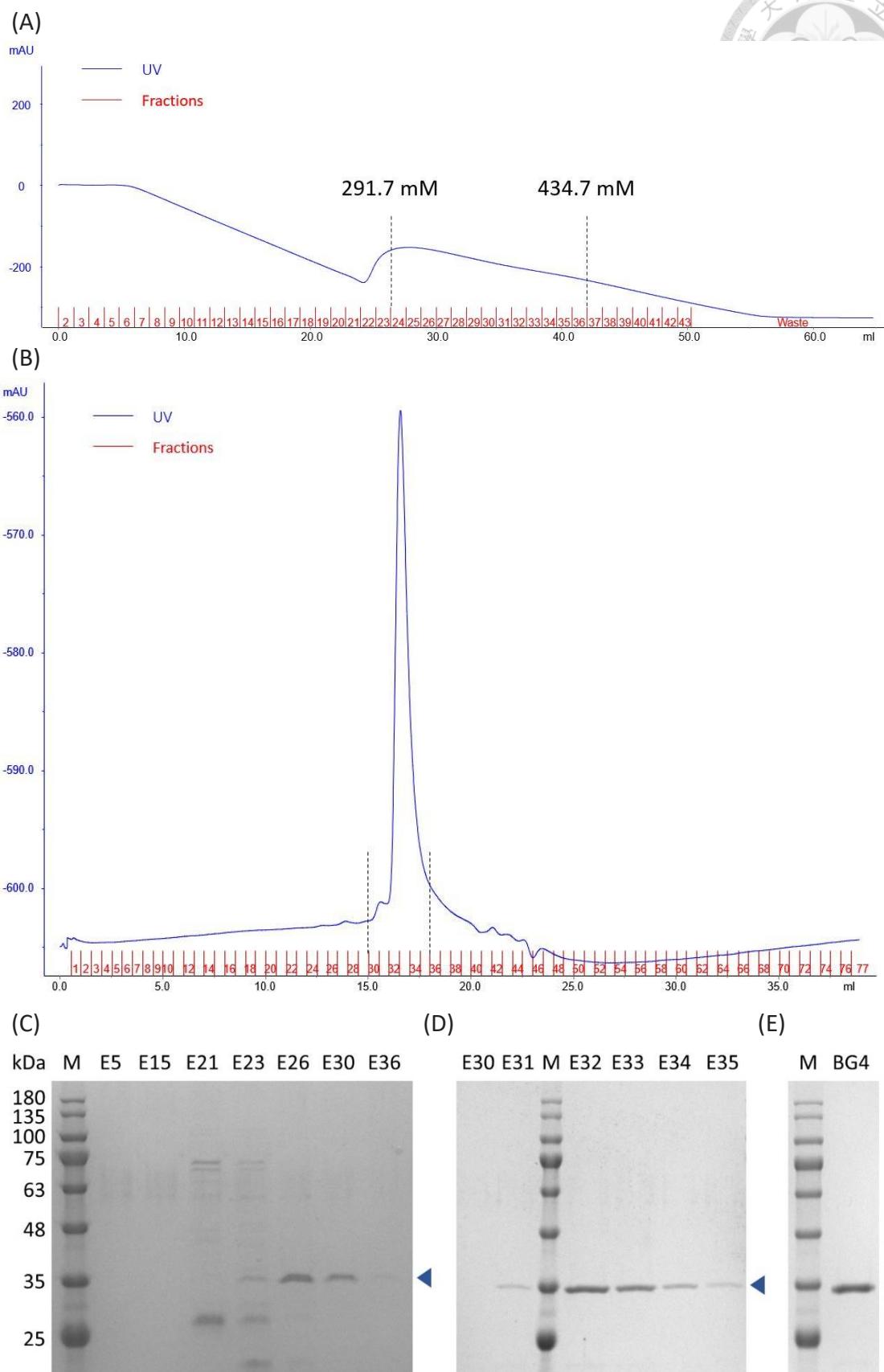




圖 10、純化 BG4 scFv anti-G-quadruplex antibody

(A、C) Cell lysate 經由 HisTrap FF Crude column 初次純化將於 291.7 ~ 434.7 mM imidazole (E24 ~ E36) elute 含有 BG4 antibody (藍色箭號) 之樣品。(B、D) 從 HisTrap column 收集之樣品再經由 Superdex 200 Increase 10/300 GL column 二次純化將於 15 至 17.5 ml (E30~E35) elute BG4 antibody (32.75 kDa)。(E) 使用 Amicon ultra-15 centrifuge filter 10K 濃縮 BG4 antibody 並置換 storage buffer, 10% SDS PAGE 以 Bromophenol Blue (Thermo Fisher, #032641.06) 呈色檢測純度。M 為 BlueRay Prestained Protein Ladder (GeneDireX, #PM008-0500)。

Data from 2023/08/28

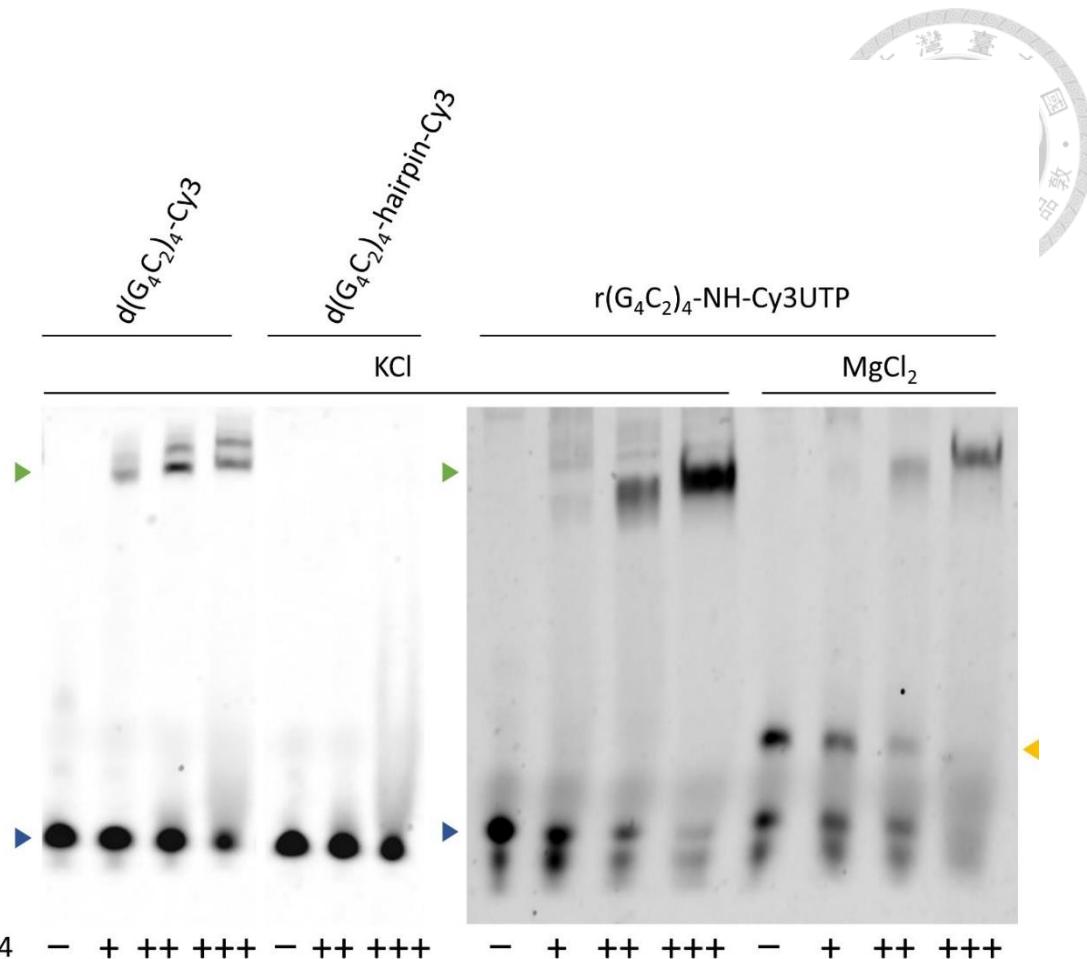


圖 11、以 BG4 antibody 識別 d/r(G_4C_2)₄-Cy3 於不同鹽離子條件之結構多型性

將 1 μM d(G_4C_2)₄-Cy3 或 d(G_4C_2)₄-hairpin-Cy3 或 r(G_4C_2)₄-NH-Cy3UTP 於 100 mM KCl 或 10 mM MgCl₂離子條件以 85°C denature 1 分鐘再緩慢降溫以形成各式構形，1 ~ 3 個正號 (+) 為加入 7.5 μl 的 0.45、0.9 或 2.3 μM BG4 antibody，負號 (-) 為加入等體積 ddH₂O，作用 30 分鐘，10% native PAGE 並以 UVP 螢冷光影像系統呈色，藍色箭號標示 single-strand 位置，黃色箭號標示多股 RNA 聚合體的位置，綠色箭號標示 d(G_4C_2)₄-Cy3 或 r(G_4C_2)₄-NH-Cy3UTP 和 BG4 antibody 的複合物。

Data from 2023/10/05, 10/17

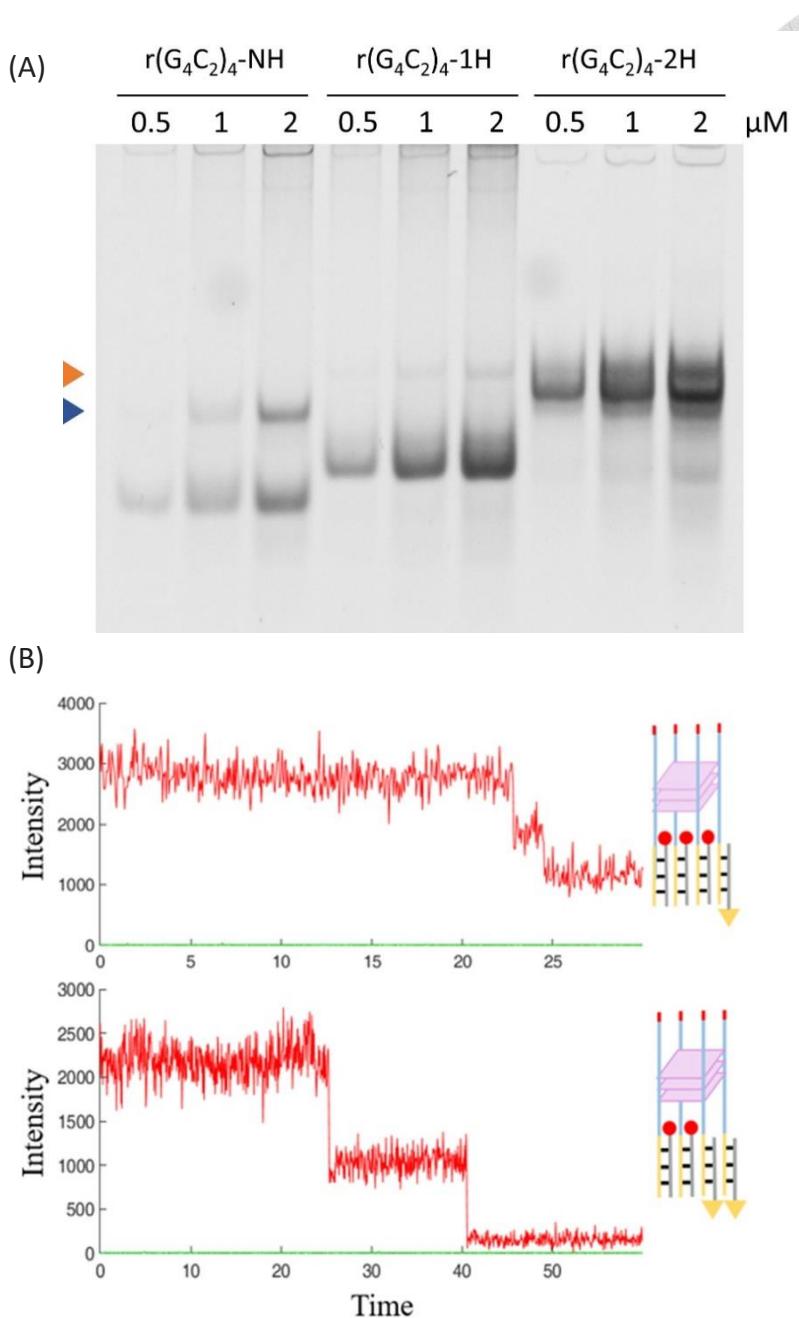


圖 12、r(G₄C₂)₄ 於 MgCl₂ 條件之結構多型性

(A) r(G₄C₂)₄-NH 於 10 mM MgCl₂ 條件將形成 tetramer G-quadruplex (藍色箭號)，相同條件之 r(G₄C₂)₄-1H 的分子間結構比例下降 (橘色箭號)，而 r(G₄C₂)₄-2H 之結構多型性則更為複雜，故 flanking sequence 將影響其結構多型性。(B) 以 photobleaching 實驗檢測 r(G₄C₂)₄-1H 於 MgCl₂ 條件形成 tetramer G-quadruplex 之 trace pattern。

Data from 2023/07/17, 09/06

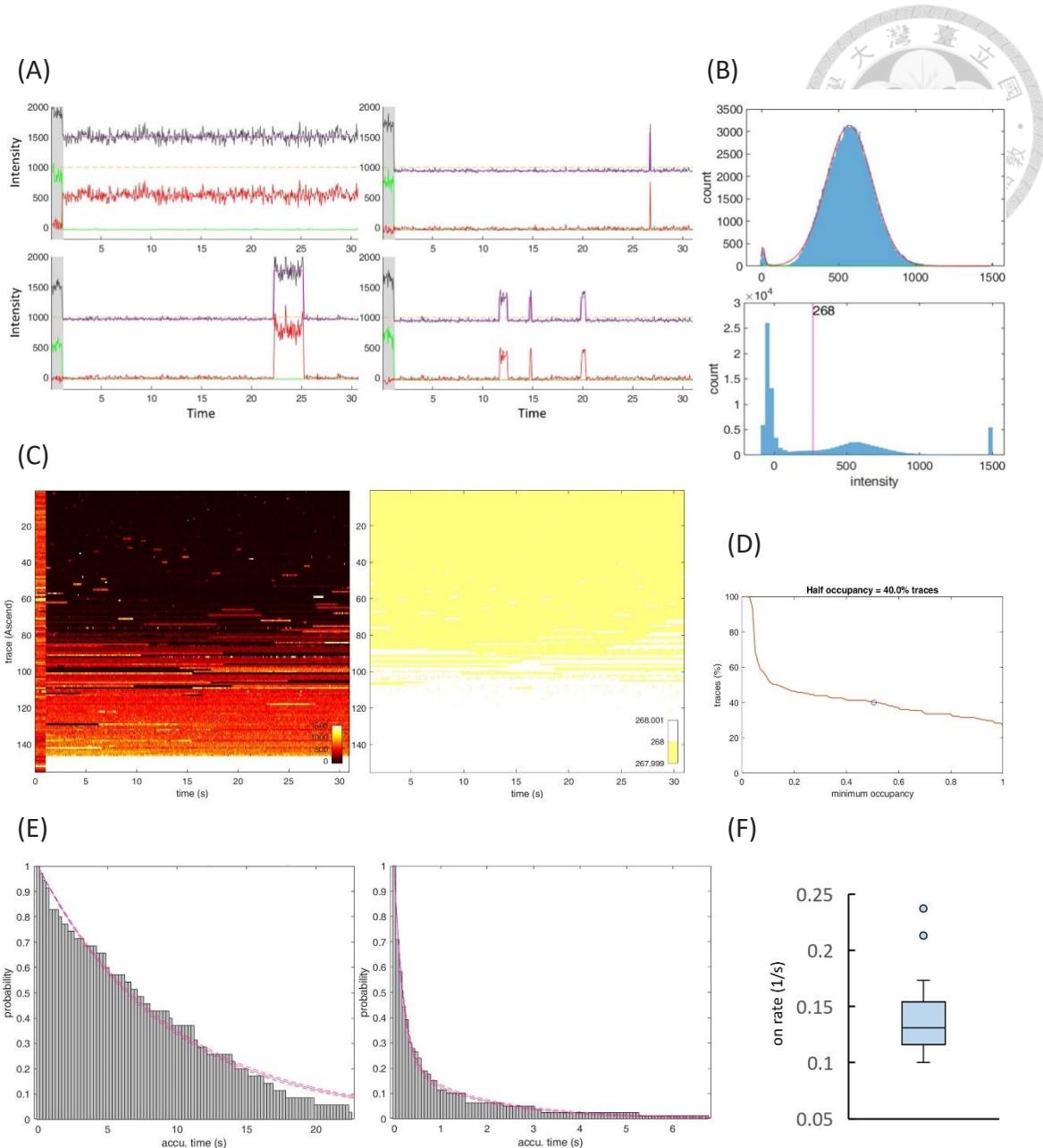
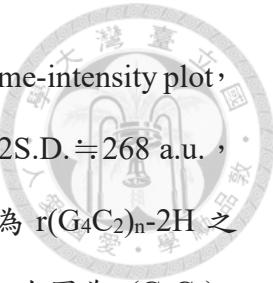


圖 13、分子間交互作用實驗之數據分析示例

(A) 實驗設計參照圖 4B。以 532 nm 雷射激發 1 秒，藉由 Cy3 signal 定位 $r(G_4C_2)_n \cdot 2H$ ，再以 638 nm 雷射激發 30 秒並記錄 Cy5 intensity 變化以檢測 RNA interaction 情形。左上為一次 interaction trace pattern 而 occupancy 為 1，右上為一次 interaction trace pattern 而 occupancy 為 0.00167 (dwell time 較短)，左下為 occupancy 為一次 interaction trace pattern 而 occupancy 為 0.1 (dwell time 較長)，右下為三次 interaction trace pattern。黑色線條為 Cy3 intensity + Cy5 intensity + 1000 a.u.，粉紫線條為 HMM 擬合 2 state，尚未發生 interaction 為 state 1，發生 interaction 為 state 2。(B) 上圖為



將 Cy5 DNA handle(pGAA_3'handle_Cy5_biotin)固定於 slide 之 frame-intensity plot , 擬合高斯函數之 Center 為 567.9 a.u. , S.D. 為 149.9 a.u. , Center - 2S.D. = 268 a.u. , 以此作為分子間是否產生 interaction 的 intensity reference 。下圖為 $r(G_4C_2)_n\text{-}2H$ 之 frame-intensity plot , intensity > 268 a.u. 之 trace 將進行後續分析。(C) 左圖為 $r(G_4C_2)_n\text{-}2H$ 之 carpet plot , 右圖為移除 1st sec 而 intensity > 268 a.u. 之 carpet plot 。(D) Half occupancy 為 occupancy > 0.5 之 trace number / total trace number 。(E) 左圖為尚未發生交互作用 (state 1) 之 dwell time 直方圖 , 可擬合單一反應的模型 $\exp(-k*t)$, 可獲得 RNA 與 RNA 的結合速率 k (on rate) 。右圖為發生交互作用 (state 2) 之 dwell time 直方圖 , 可擬合兩種反應的組合模型 $a_1*\exp(-k_1*t) + a_2*\exp(-k_2*t)$, 其中 $a_1 + a_2 = 1$, 可獲得 RNA 複合體的解離速率 k_1 和 k_2 (off rate) 。(F) $r(G_4C_2)_n\text{-}2H$ 和 $r(G_4C_2)_n\text{-NH-Cy5UTP}$ 結合速率盒鬚圖 , 數值介於 0.1 ~ 0.24 (1/s) 之間 , 圓點為離群值 , 對應的條件參照本文 3.6.4 段落 , 詳細數據記載於表 3 。此數據分析示例為 $r(G_4C_2)_5\text{-}2H$ 和 $r(G_4C_2)_3\text{-NH-Cy5UTP}$ 於 MgCl₂ 交互作用 。移除 trace 的定義參照本文 3.6.1 段落 。

Data from 2024/05/02, 0507, 0520, 0618, 0623

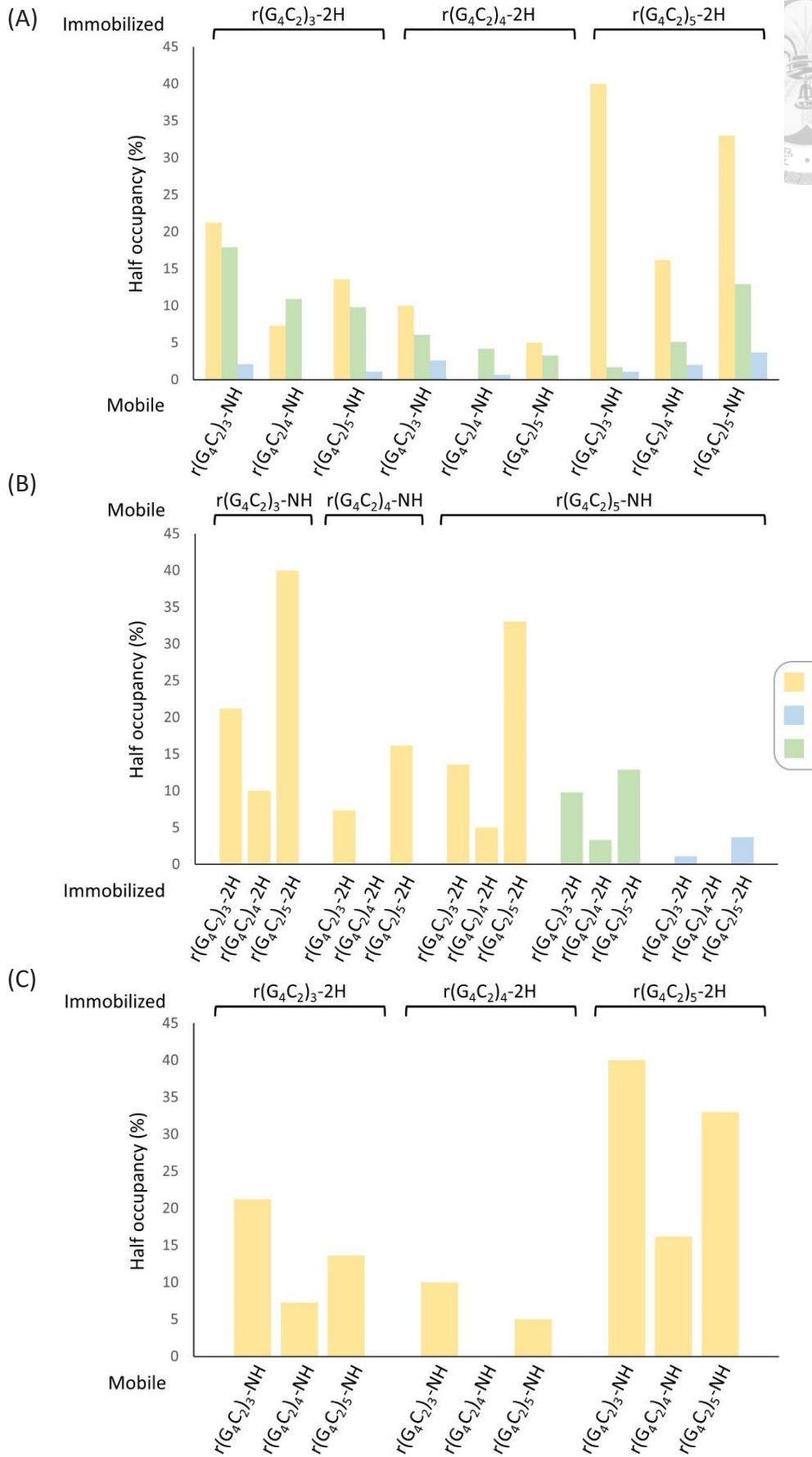




圖 14、 $r(G_4C_2)_n\text{-}2H$ 和 $r(G_4C_2)_n\text{-NH-Cy5UTP}$ interaction 之 Half occupancy 分析

(A) Immobilized 和 mobile molecule 相同，比較離子種類的影響，整體趨勢於 NH_4Cl 條件之 Half occupancy 最少。(B) 異子條件和 mobile molecule 相同，比較 Immobilized molecule 的影響，整體趨勢為 $r(G_4C_2)_5\text{-}2H > r(G_4C_2)_3\text{-}2H > r(G_4C_2)_4\text{-}2H$ 。(C) 於 MgCl_2 條件而 immobilized molecule 相同時，整體趨勢為 $r(G_4C_2)_3\text{-NH-Cy5UTP} > r(G_4C_2)_5\text{-NH-Cy5UTP} > r(G_4C_2)_4\text{-NH-Cy5UTP}$ 。以上數據各為一次實驗之結果，詳細數據記載於表 3。

Data from 2024/0502, 0507, 0520, 0618, 0623

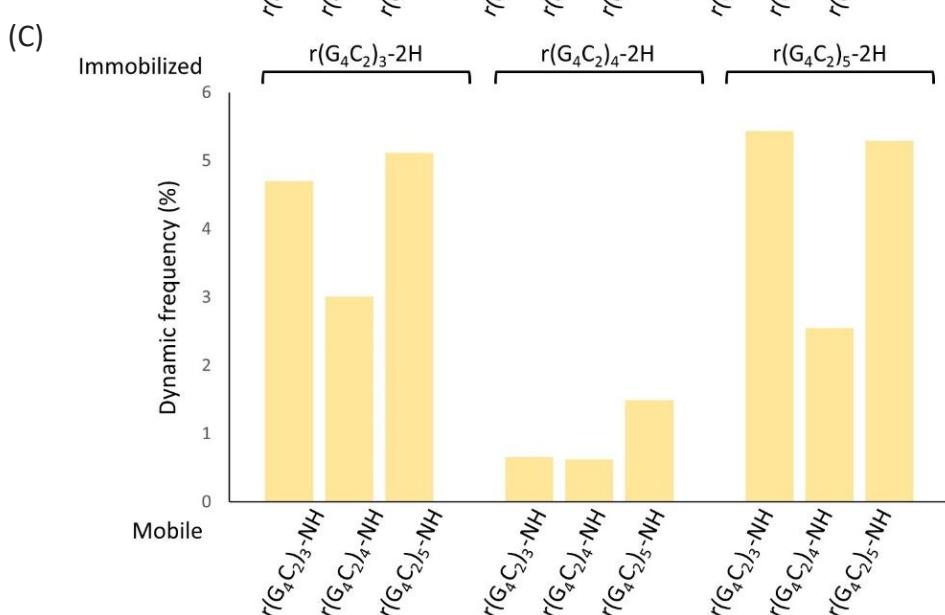
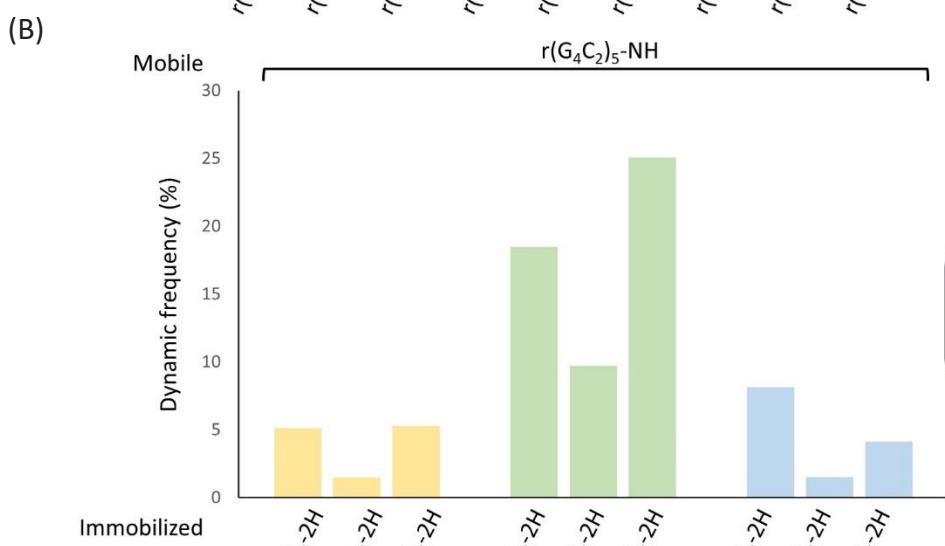
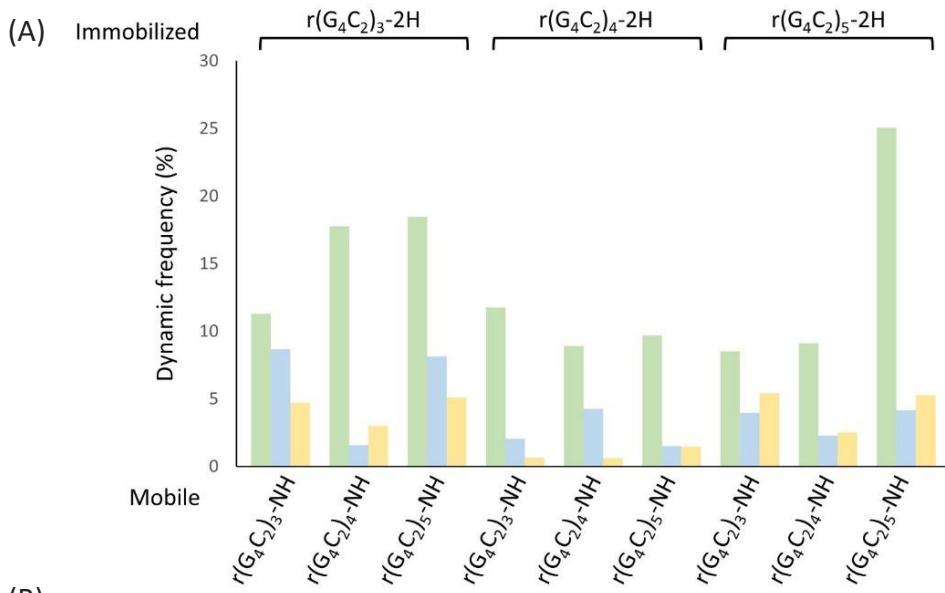




圖 15、 $r(G_4C_2)_n\text{-}2H$ 和 $r(G_4C_2)_n\text{-NH-Cy5UTP}$ 之 dynamic interaction 分析

(A) Immobilized 和 mobile molecule 相同，比較離子種類的影響，整體趨勢於 KCl 條件之 dynamic interaction 最多。(B) 異離子條件相同而 mobile molecule 為 $r(G_4C_2)_5\text{-NH-Cy5UTP}$ ，比較 immobilized molecule 的影響，整體趨勢為 $r(G_4C_2)_4\text{-}2H$ 之 dynamic interaction 最少。(C) 於 $MgCl_2$ 條件而 immobilized molecule 相同時，比較 mobile molecule 的影響，整體趨勢為 $r(G_4C_2)_4\text{-NH-Cy5UTP}$ 之 dynamic interaction 最少。Dynamic interaction 為在記錄過程中，發生交互作用然後解離，以上數據各為一次實驗之結果，詳細數據記載於表 3。

Data from 2024/0502, 0507, 0520, 0618, 0623

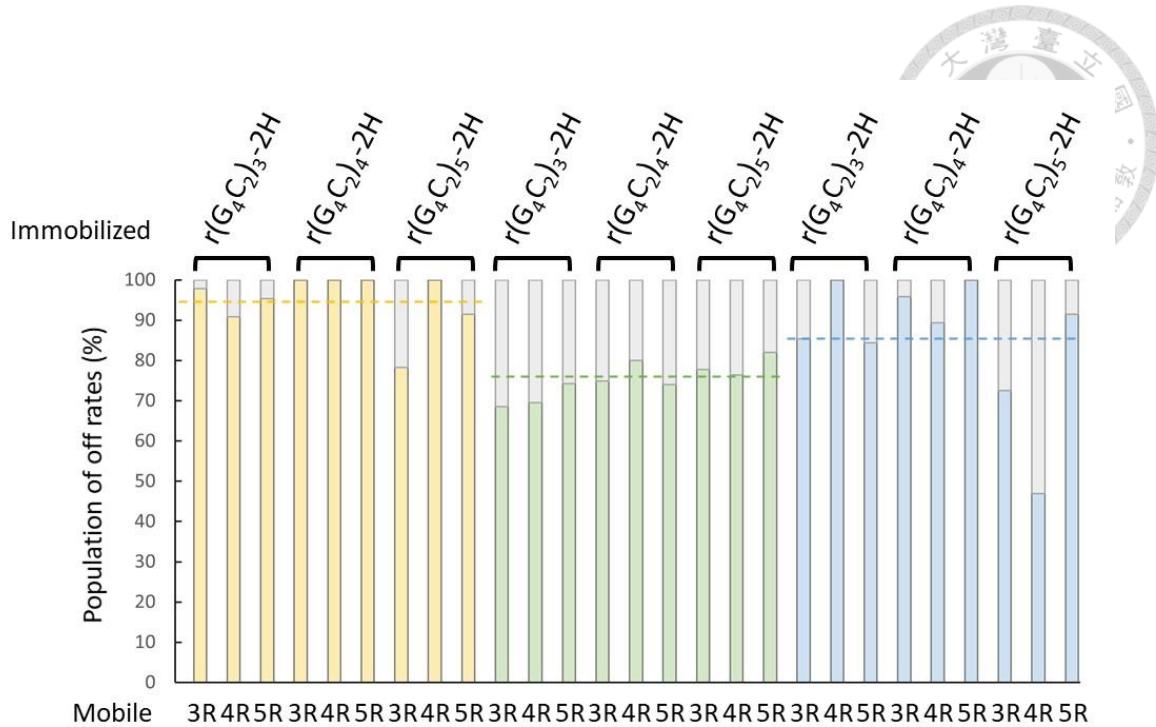


圖 16、 $r(G_4C_2)_n\text{-}2H$ 和 $r(G_4C_2)_n\text{-NH-Cy5UTP}$ 以兩種形式解離

解離速率 (offrate) 中的 k_2 (相對快速) 占比於 10 mM MgCl₂ 條件為黃色，100 mM KCl 條件為綠色，200 mM NH₄Cl 條件為藍色；灰色表示各條件下的 k_1 (相對慢速) 占比。整體以相對快速的解離方式為主，占比最多的為 MgCl₂，平均為 94.9% (黃色虛線)，NH₄Cl 居中，平均為 85.1% (藍色虛線)，占比最少的為 KCl，平均為 75.3% (綠色虛線)。3R、4R、5R 為 $r(G_4C_2)_n\text{-NH-Cy5UTP}$ ($n=3, 4, 5$)，以上數據各為一次實驗之結果，詳細數據記載於表 3。

Data from 2024/0502, 0507, 0520, 0618, 0623

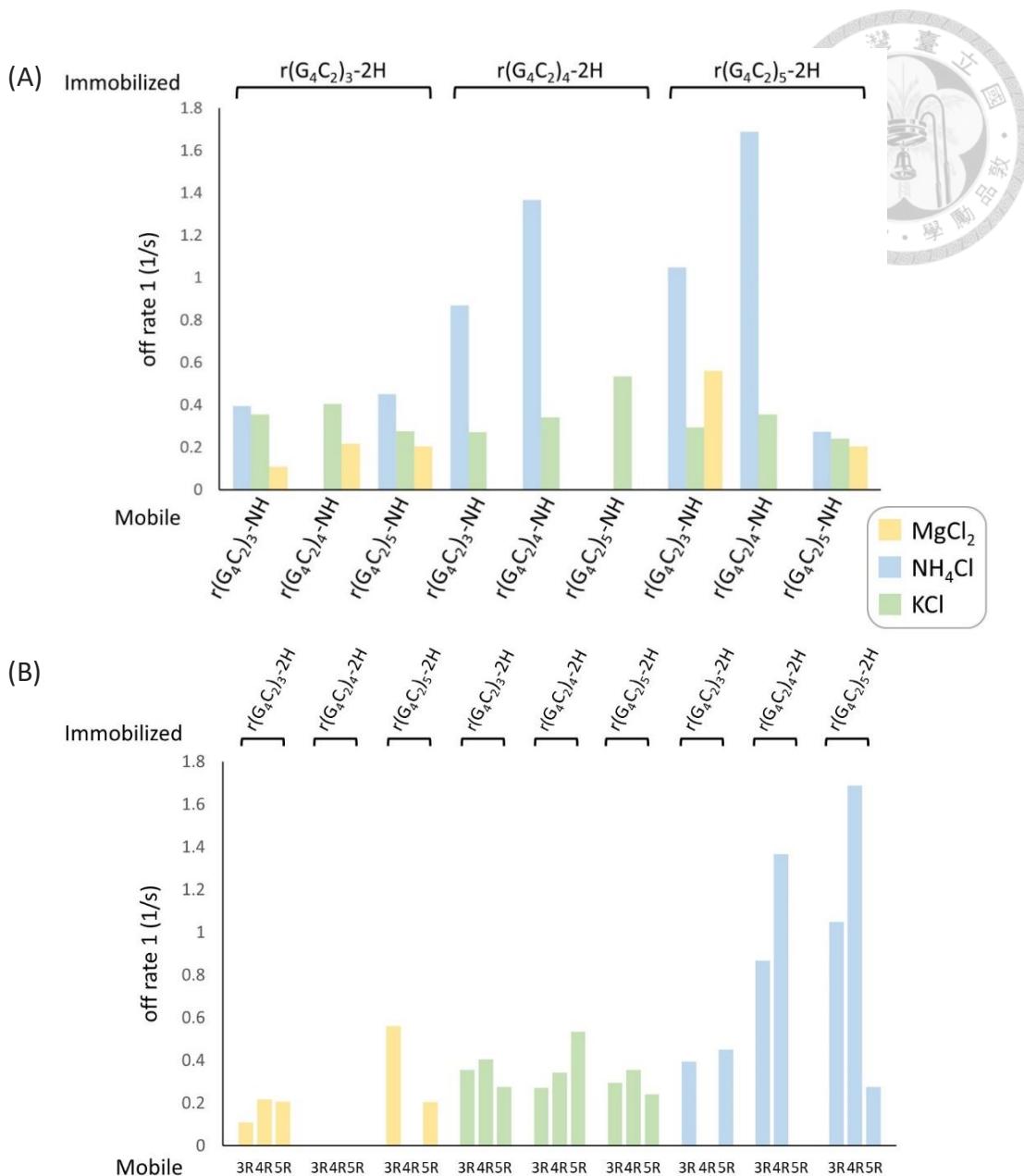


圖 17、 $r(G_4C_2)_n\text{-}2H$ 和 $r(G_4C_2)_n\text{-NH-Cy5UTP}$ 之慢速解離速率比較

(A) Immobilized 和 mobile molecule 相同，比較離子種類的影響，相對慢速解離形式之解離速率的整體趨勢為 $NH_4Cl > KCl > MgCl_2$ 。(B) 離子條件和 immobilized molecule 相同，比較 mobile molecule 的影響，相對慢速解離形式之解離速率的整體趨勢於 $r(G_4C_2)_4\text{-NH-Cy5UTP}$ 為最大，而 immobilized $r(G_4C_2)_4\text{-}2H$ in $MgCl_2$ 僅擬合 $\exp(-k*t)$ 。3R、4R、5R 為 $r(G_4C_2)_n\text{-NH-Cy5UTP}$ ($n = 3, 4, 5$)，以上數據各為一次實驗之結果，詳細數據記載於表 3。

Data from 2024/0502, 0507, 0520, 0618, 0623

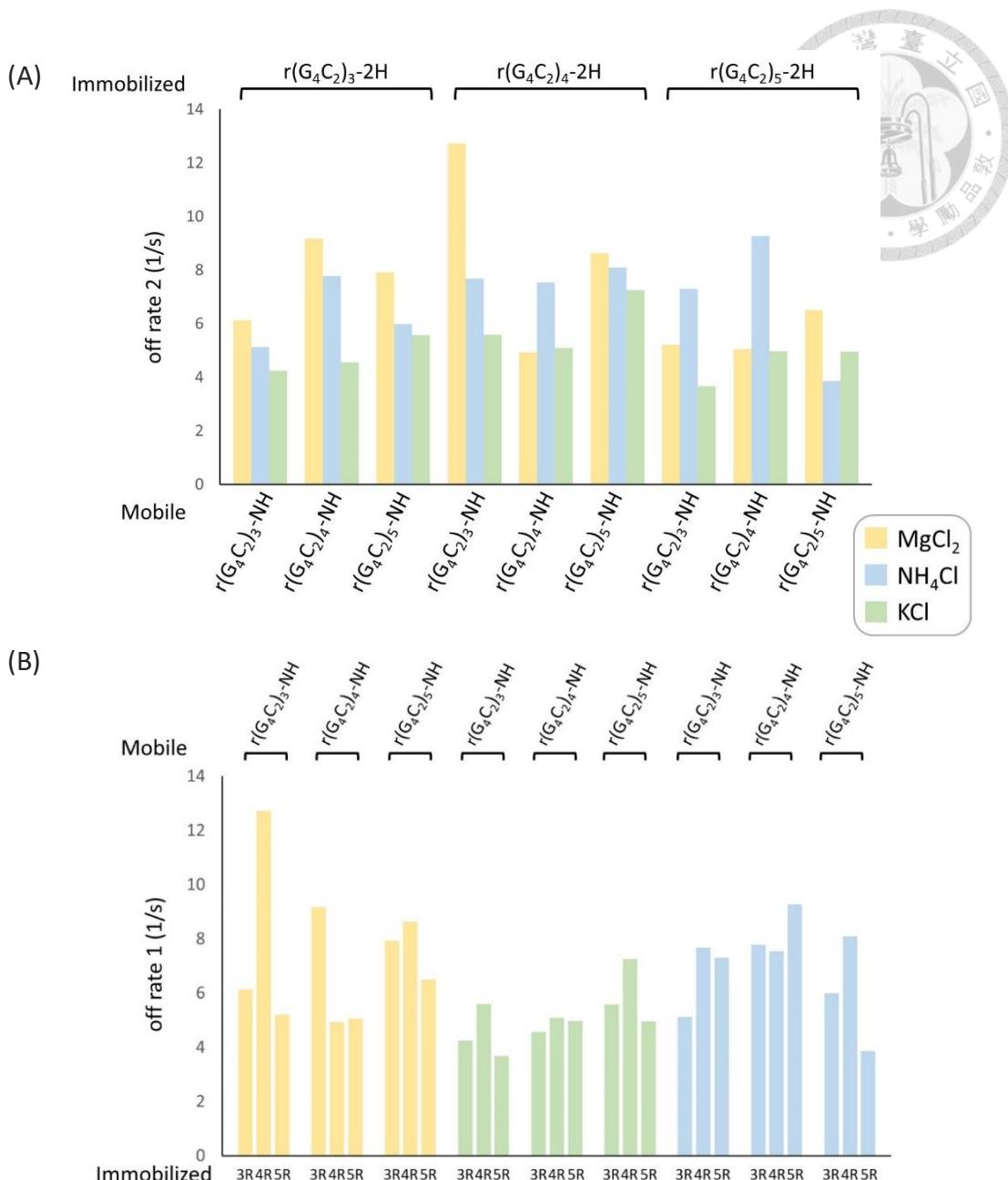


圖 18、 $r(G_4C_2)_n\text{-}2\text{H}$ 和 $r(G_4C_2)_n\text{-NH-Cy5UTP}$ 之相對快速解離速率比較

(A) Immobilized 和 mobile molecule 相同，比較離子種類的影響，相對快速解離形式之解離速率的整體趨勢為 KCl 為最小。(B) 離子條件和 mobile molecule 相同，比較 immobilized molecule 的影響，相對快速解離形式之解離速率的整體趨勢於 $r(G_4C_2)_4\text{-}2\text{H}$ 為最大。3R、4R、5R 為 $r(G_4C_2)_n\text{-}2\text{H}$ ($n=3, 4, 5$)，以上數據各為一次實驗之結果，詳細數據記載於表 3。

Data from 2024/0502, 0507, 0520, 0618, 0623

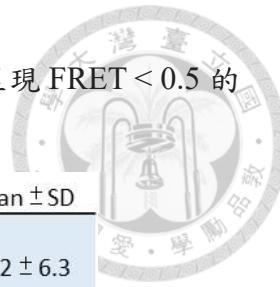


表 1、d/r(G₄C₂)_n-2H 於三種鹽離子條件，加入 antisense 後分子呈現 FRET < 0.5 的比例

| Immobilized molecule | Salt types | < 0.5 population | Mean ± SD |
|--|--------------------|------------------|-------------|
| d(G ₄ C ₂) ₃ -2H | NH ₄ Cl | 85.4 | |
| | | 93.5 | 92.2 ± 6.3 |
| | | 97.8 | |
| | KCl | 52.1 | |
| | | 73.0 | 68.0 ± 14.1 |
| | | 78.9 | |
| | MgCl ₂ | 98.2 | |
| | | 98.9 | 98.4 ± 0.4 |
| | | 98.1 | |
| d(G ₄ C ₂) ₄ -2H | NH ₄ Cl | 23.1 | |
| | | 43.5 | 38.0 ± 13.1 |
| | | 47.4 | |
| | KCl | 4.6 | |
| | | 7.4 | 6.8 ± 1.9 |
| | | 8.3 | |
| | MgCl ₂ | 90.2 | |
| | | 96.6 | 93.9 ± 3.3 |
| | | 94.9 | |
| r(G ₄ C ₂) ₃ -2H | NH ₄ Cl | 96.3 | |
| | | 95.0 | 95.7 ± 0.6 |
| | | 95.9 | |
| | KCl | 95.9 | |
| | | 96.9 | 95.7 ± 1.3 |
| | | 94.3 | |
| | MgCl ₂ | 95.8 | |
| | | 97.5 | 96.6 ± 0.8 |
| | | 96.6 | |
| r(G ₄ C ₂) ₄ -2H | NH ₄ Cl | 60.9 | |
| | | 74.7 | 70.8 ± 8.7 |
| | | 76.7 | |
| | KCl | 18.6 | |
| | | 24.6 | 21.5 ± 3.0 |
| | | 21.3 | |
| | MgCl ₂ | 75.8 | |
| | | 76.9 | 75.9 ± 0.9 |
| | | 75.2 | |
| r(G ₄ C ₂) ₅ -2H | NH ₄ Cl | 59.5 | |
| | | 52.7 | 52.8 ± 6.7 |
| | | 46.2 | |
| | KCl | 49.5 | |
| | | 47.5 | 47.1 ± 2.6 |
| | | 44.4 | |
| | MgCl ₂ | 64.7 | |
| | | 69.1 | 69.9 ± 5.6 |
| | | 75.8 | |

註：參照圖 6 之 FRET population distribution 和圖 8 直條圖。



表 2、d(G₄C₂)₃-2H 於三種鹽離子條件下，加入 antisense 後隨時間之展開百分比

| Time (min) | | 0 | 5 | 10 | 20 | 30 |
|--|--------------------|-----|------|------|------|------|
| d(G ₄ C ₂) ₃ -2H | NH ₄ Cl | 0.6 | 87.2 | 95.5 | 99.3 | 95.7 |
| | MgCl ₂ | 0.1 | 98.8 | 98.4 | 98.3 | 99.4 |
| | KCl | 0.3 | 50.8 | 60.5 | 75 | 88.7 |
| r(G ₄ C ₂) ₃ -2H | KCl | 9.8 | 96 | 97.8 | 97.3 | 97.9 |

註：參照圖 7 之 FRET population distribution 和折線散佈圖。

表 3、 $r(G_4C_2)_n\text{-}2H$ 和 $r(G_4C_2)_n\text{-NH}\text{-Cy5UTP}$ 於三種鹽離子條件之交互作用統計

| Immobilized | Mobile | Salt types | Half occupancy (%) | Dynamic frequency (%) | on rate (1/s) | off rate (1/s) | | | |
|-------------------------|-------------------------|--------------------|--------------------|-----------------------|---------------|----------------|-------------|-----------|-------------|
| | | | | | | a_1 (%) | k_1 (1/s) | a_2 (%) | k_2 (1/s) |
| $r(G_4C_2)_3\text{-}2H$ | $r(G_4C_2)_3\text{-NH}$ | MgCl ₂ | 21.2 | 4.7 | 0.14 | 2.2 | 0.11 | 97.8 | 6.1 |
| | | KCl | 17.9 | 11.3 | 0.12 | 31.5 | 0.36 | 68.5 | 4.2 |
| | | NH ₄ Cl | 2.1 | 8.7 | 0.14 | 14.7 | 0.40 | 85.3 | 5.1 |
| $r(G_4C_2)_3\text{-}2H$ | $r(G_4C_2)_4\text{-NH}$ | MgCl ₂ | 7.3 | 3.0 | 0.17 | 9.2 | 0.22 | 90.8 | 9.2 |
| | | KCl | 10.9 | 17.8 | 0.13 | 30.5 | 0.41 | 69.5 | 4.6 |
| | | NH ₄ Cl | 0 | 1.6 | 0.17 | — | — | 100 | 7.8 |
| $r(G_4C_2)_3\text{-}2H$ | $r(G_4C_2)_5\text{-NH}$ | MgCl ₂ | 13.6 | 5.1 | 0.12 | 4.7 | 0.21 | 95.3 | 7.9 |
| | | KCl | 9.8 | 18.5 | 0.13 | 25.8 | 0.28 | 74.2 | 5.6 |
| | | NH ₄ Cl | 1.1 | 8.1 | 0.16 | 84.3 | 0.45 | 15.7 | 6.0 |
| $r(G_4C_2)_4\text{-}2H$ | $r(G_4C_2)_3\text{-NH}$ | MgCl ₂ | 10 | 0.7 | 0.12 | — | — | 100 | 12.7 |
| | | KCl | 6.1 | 11.8 | 0.12 | 25.1 | 0.27 | 74.9 | 5.6 |
| | | NH ₄ Cl | 2.6 | 2.1 | 0.14 | 95.8 | 0.87 | 4.2 | 7.7 |
| $r(G_4C_2)_4\text{-}2H$ | $r(G_4C_2)_4\text{-NH}$ | MgCl ₂ | 0 | 0.6 | 0.17 | — | — | 100 | 4.9 |
| | | KCl | 4.2 | 8.9 | 0.15 | 20 | 0.34 | 80 | 5.1 |
| | | NH ₄ Cl | 0.7 | 4.3 | 0.13 | 89.3 | 1.37 | 10.7 | 7.5 |
| $r(G_4C_2)_4\text{-}2H$ | $r(G_4C_2)_5\text{-NH}$ | MgCl ₂ | 5 | 1.5 | 0.21 | — | — | 100 | 8.6 |
| | | KCl | 3.3 | 9.7 | 0.12 | 26 | 0.54 | 74 | 7.3 |
| | | NH ₄ Cl | 0 | 1.5 | 0.24 | — | — | 100 | 8.1 |
| $r(G_4C_2)_5\text{-}2H$ | $r(G_4C_2)_3\text{-NH}$ | MgCl ₂ | 40 | 5.4 | 0.11 | 21.7 | 0.56 | 78.3 | 5.2 |
| | | KCl | 1.7 | 8.5 | 0.15 | 22.2 | 0.30 | 77.8 | 3.7 |
| | | NH ₄ Cl | 1.1 | 4.0 | 0.15 | 27.5 | 1.05 | 72.5 | 7.3 |
| $r(G_4C_2)_5\text{-}2H$ | $r(G_4C_2)_4\text{-NH}$ | MgCl ₂ | 16.2 | 2.5 | 0.10 | — | — | 100 | 5.1 |
| | | KCl | 5.1 | 9.1 | 0.11 | 23.6 | 0.36 | 76.4 | 5.0 |
| | | NH ₄ Cl | 2 | 2.3 | 0.11 | 53.1 | 1.69 | 46.9 | 9.3 |
| $r(G_4C_2)_5\text{-}2H$ | $r(G_4C_2)_5\text{-NH}$ | MgCl ₂ | 33 | 5.3 | 0.12 | 8.5 | 0.20 | 91.5 | 6.5 |
| | | KCl | 12.9 | 25.1 | 0.13 | 18 | 0.24 | 82 | 5.0 |
| | | NH ₄ Cl | 3.7 | 4.1 | 0.11 | 8.5 | 0.28 | 91.5 | 3.9 |

註：Immobilized 為固定於 slide 的 $r(G_4C_2)_n\text{-}2H$ ；Mobile 以 $r(G_4C_2)_n\text{-NH}$ 檢測和 $r(G_4C_2)_n\text{-}2H$ 之 interaction。數據分析方式參考圖 13；Half occupancy 直條圖參考圖 14；Dynamic frequency 直條圖參考圖 15；解離速率占比 (a_1 和 a_2) 參考圖 16；相對慢速解離 (k_1) 參考圖 17；相對快速解離 (k_2) 參考圖 18。