

อภิธาน์นทาการ



สำนักหอสมุด

รายงานการวิจัย

การสังเคราะห์และศึกษาสมบัติการจับยึดกับกรดนิวคลีอิก
ของพีโรลิดินิลเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่มีการแทนที่นิวคลีโอเบส
ด้วยยูนิเวอร์ซอลเบสบางชนิด

คณะผู้วิจัย

สังกัด

จตุรงค์ สุภาพพร้อม

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

รุ่งแสง จันทร์คุณาสุชะ

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร

วันลงทะเบียน.....15 มิ.ย. 2558

เลขทะเบียน.....16577160

เลขเรียกหนังสือ.....0 ๑P

๒๗๐

๑๖๖๕

๒๕๕๗

สนับสนุนโดย งบประมาณรายได้ มหาวิทยาลัยนเรศวร

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องการสังเคราะห์และศึกษาสมบัติการจับยึดกับกรดนิวคลีอิกของพอลิไดนิลเพปไทด์ นิวคลีอิกแอซิดที่มีการแทนที่นิวคลีโอเบสด้วยยูนิเวอร์ซอลเบสบางชนิด สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความร่วมมือและช่วยเหลือจากหลายฝ่าย ขอขอบคุณกองทุนวิจัย มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ได้ให้ทุนสนับสนุนโครงการวิจัยนี้ ตามโครงการทุนอุดหนุนการวิจัย ประจำปี 2556 ขอขอบคุณคณะผู้วิจัย ทั้งจาก ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร โดยเฉพาะอย่างยิ่งนางสาว รุ่งแสง จันทร์คุณา สุขะ นิสิตระดับปริญญาโท ชั้นปีที่ 3 ที่ได้ช่วยดำเนินการวิจัยนี้ด้วยความวิริยะอุตสาหะเป็นอย่างยิ่ง รวมทั้งนิสิตปริญญาตรี และนิสิตปริญญาโท ในกลุ่มวิจัยห้อง SC4-501 ที่ได้มาช่วยเหลืองานวิจัยมาก บ้างน้อยบ้างตามแต่โอกาสและเวลา งานวิจัยคงจะดำเนินไปอย่างล่าช้าหากไม่ได้รับความช่วยเหลือต่างๆ จากนิสิตเหล่านี้ ขอขอบคุณ ศ.ดร. ธีรยุทธ วิไลวัลย์ และดร. อุทัย วิชัย ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสารเคมีบางชนิด และคำแนะนำที่มีประโยชน์ต่องานวิจัย รวมทั้งบุคคลอีกหลายท่านที่ไม่ได้เอ่ยนามไว้ในที่นี้ สุดท้ายนี้ขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ได้เอื้อเฟื้อเวลาในการทำวิจัย สถานที่ เครื่องมือวิทยาศาสตร์ อุปกรณ์และสารเคมี และสาธารณูปโภคต่างๆ ที่จำเป็น



บทคัดย่อ

พีโรลิดินิลเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่มี D-prolyl-2-aminocyclopentane carboxylic acid เป็นโครงสร้างหลัก (acpcPNA) เป็นเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิดซึ่งสามารถจับยึดกับดีเอ็นเอเป้าหมายได้อย่างเสถียรและมีความจำเพาะเจาะจงสูง การดัดแปรโครงสร้างของ acpcPNA โดยเฉพาะบริเวณส่วน β -amino acid เพื่อเพิ่มสมบัติบางประการและนำไปสู่การประยุกต์ใช้ด้านต่างๆ ในงานวิจัยนี้ 3,6-dinitrocarbazole (DNC) ซึ่งถูกออกแบบเป็นยูนิเวอร์ซอลเบส ซึ่งจะทำหน้าที่แทนนิวคลีโอเบสธรรมชาติ (A, T, C, G) ในระบบของ acpcPNA โดยหลักการทั่วไปของยูนิเวอร์ซอลเบสคือ สามารถเกิดการเข้าคู่กับนิวคลีโอเบสธรรมชาติทั้งใน DNA/RNA โดยปราศจากความแตกต่าง ซึ่งสมบัติดังกล่าว น่าจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบ polymorphic region ในเทคนิค PCR หรือเพื่อหาตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์ได้ มอนอเมอร์ของ acpcPNA ที่มี DNC เชื่อมต่ออยู่ถูกสังเคราะห์ขึ้นโดยผ่านปฏิกิริยา nucleophilic substitution ของ *N*-Boc-(4S)-tosyloxy-(2R)-proline diphenyl methyl ester โดยสภาวะที่เหมาะสมคือการใช้ K_2CO_3 ใน DMF ที่อุณหภูมิ 80 °C ได้ผลิตภัณฑ์ร้อยละ 13 หลังจากนั้น acpcPNA ที่มีลำดับเบสเป็น T_4XT_4 (เมื่อ X คือ DNC) ได้ถูกเตรียมด้วยวิธีการสังเคราะห์เพปไทด์บนวัฏภาคของแข็ง และนำไปศึกษาความสามารถในการจับยึดกับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบส dA_4YA_4 (เมื่อ Y = A, T, C, G) ด้วยเทคนิค melting temperature measurement (T_m) พบว่าระบบ acpcPNA ที่มี DNC อยู่จะทำให้ความเสถียรของสารประกอบเชิงซ้อน PNA·DNA ที่เกิดขึ้นลดลง เมื่อเทียบกับ acpcPNA ที่ไม่ได้ดัดแปร โดยพิจารณาจากค่า T_m ซึ่งอยู่ในช่วง 25-40 °C และนอกจากนี้ ความเสถียรที่ลดลงยังขึ้นอยู่กับธรรมชาติของเบสคู่สมกับ DNC ทั้งนี้ น่าจะเนื่องมาจากความเกะกะของหมู่ไนโตร (nitro group) บนวงของคาร์บาริโซล ซึ่งไม่พอดีกับช่องว่างระหว่างเกลียวคู่ของสารประกอบเชิงซ้อน PNA·DNA โดยจากผลการทดลองพบว่าเบส G จะลดความเสถียรลงมากที่สุด ส่วนเบส A นั้นจะลดความเสถียรลงน้อยที่สุด ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า DNC ในระบบของ acpcPNA นั้นไม่สามารถทำหน้าที่เป็นยูนิเวอร์ซอลเบสได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: พีเอ็นเอ, กรดเบต้าอะมิโน, พีโรลิดีน

Abstract

Pyrrolidinyl peptide nucleic acid based on D-prolyl-2-aminocyclopentane carboxylic acid backbone or acpcPNA is a class of peptide nucleic acids that can bind to DNA target with high affinity and specificity. Fine-tuned structural modification of this acpcPNA had extensively introduced at β -amino acid spacer to enhance the binding properties and applications. In this work, 3,6-dinitrocarbazole (DNC) which was designed to be universal base, has been first incorporated into acpcPNA by replacing natural nucleobase. In principle, universal base can form base pairing with any of the natural DNA/RNA bases without discrimination; this property could be applied in the detection of polymorphic region in PCR technique or of point mutation. The acpcPNA monomer carrying DNC was synthesized via nucleophilic substitution of *N*-Boc-(4*S*)-tosyloxy-(2*R*)-proline diphenyl methyl ester. Based on the conditions attempted, the optimum result of 13% yield was obtained using K_2CO_3 in DMF at 80 °C. The acpcPNA with a sequence T_4XT_4 , where X is DNC, was then prepared by a standard solid phase peptide synthesis. The hybridization ability with the complementary dA_4YA_4 (Y = A, T, C, G) strand was determined by melting temperature (T_m) measurements. It was found that incorporation of DNC led to a large destabilization of the duplexes relative to unmodified acpcPNA, as suggested by a lowered T_m within a range of 25-40 °C. Moreover, the destabilization was dependent on the nature of the complementary base of DNC and was due to the steric hindrance of nitro group on carbazole ring, which not appropriately fit in the space between PNA•DNA strands. Based on the results obtained, G was the most destabilizing and A was the least destabilizing. The results revealed that DNC in acpcPNA could not behave as a universal base in acpcPNA.

Keyword: Peptide nucleic acid, β -amino acid, detection of polymorphic region

บทที่ 1

บทนำ

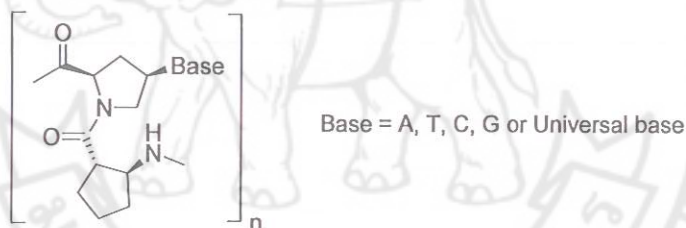
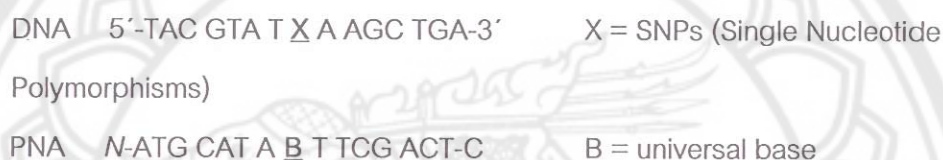
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

เป็นที่ทราบกันดีว่าสารพันธุกรรม หรือดีเอ็นเอ (deoxyribonucleic acid; DNA) นั้นมีหน้าที่ในการจัดเก็บและถ่ายทอดข้อมูลทางพันธุกรรม หรือลักษณะทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ จากรุ่นหนึ่งไปสู่อีกรุ่นหนึ่ง ผ่านทางกระบวนการสร้างโปรตีนในระดับเซลล์ นอกจากนี้อาจรวมไปถึงการถ่ายทอดลักษณะของโรคชนิดต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติในยีน โดยปกติ การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอเป็นสิ่งที่สามารถเกิดขึ้นได้ในกระบวนการทางธรรมชาติ การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบนดีเอ็นเอเพียงหนึ่งนิวคลีโอไทด์ หรือที่เรียกว่า "สเนปส์" (Single Nucleotide Polymorphisms; SNP) ซึ่งอาจเกิดขึ้นในตำแหน่งยีนที่เป็นรหัสพันธุกรรม (coding gene) หรือบริเวณที่ไม่ใช่รหัสพันธุกรรม (non-coding region of gene) ก็ได้ และในบางครั้งถึงแม้ว่าการเกิด SNP จะเกิดขึ้นในตำแหน่ง coding gene ก็ตาม แต่ก็อาจไม่มีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนเนื่องจากสมบัติ degeneracy of genetic code ที่กรดอะมิโนหนึ่งๆ สามารถสังเคราะห์ได้จากโคดอน (codon) มากกว่าหนึ่ง ชนิด นอกจากนี้ปรากฏการณ์ SNP ที่เกิดขึ้นยังทำให้เกิดความหลากหลายในลำดับเบสของดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิต ทำให้สิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน มีการตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมได้ไม่เหมือนกัน เช่น ในแต่ละคนอาจจะมีการตอบสนองต่อเชื้อโรค การตอบสนองต่อสารเคมี การตอบสนองต่อยา หรือการตอบสนองต่อวัคซีนได้ไม่เหมือนกัน อย่างไรก็ตามการเกิด SNP ในตำแหน่งยีนที่มีความสำคัญก็อาจส่งผลให้เกิดภาวะกลายพันธุ์ (mutation) ได้เช่นกัน โดยปกติจะพบการเกิดสเนปส์ ในทุกๆ 1000 เบส ในยีน ถ้ายีนนั้นเป็นยีนที่มีความสำคัญต่อกระบวนการต่างๆ ในร่างกาย ก็จะมีผลกระทบต่อการดำรงชีวิตได้ ดังนั้นเมื่อการเกิด SNP สามารถเกิดขึ้นได้ในธรรมชาติ การตรวจสอบการเกิด SNP ในยีนเป้าหมาย หรือการตรวจสอบการเกิด SNP ในสิ่งมีชีวิตสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันจึงมีความสำคัญ โดยจะทำให้ทราบอัตราการเกิด SNP รวมทั้งติดตามและทำนายจีโนไทป์และฟีโนไทป์ในสิ่งมีชีวิตได้ ซึ่งจะมีประโยชน์ในการทำความเข้าใจการถ่ายทอดข้อมูลทางพันธุกรรม โดยปกติในการตรวจลำดับเบสในดีเอ็นเอ นั้นจะใช้โมเลกุลที่สามารถจับยึดเข้ากับดีเอ็นเอ หรือยีนเป้าหมายได้อย่างจำเพาะเจาะจง ตามกฎการเข้าคู่เบสของวัตสัน-คริก (Watson-Crick base pairing rule) เมื่อเกิดการจับยึดก็จะทำให้เกิดการส่งสัญญาณจากหน่วยส่งสัญญาณ (signaling unit) ซึ่งอาจจะอยู่ในรูปของสัญญาณสี แสง การเรืองแสง สัญญาณทางไฟฟ้า เป็นต้น ตัวอย่างโมเลกุลประเภทนี้ได้แก่ แอนติเซนส์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ (antisense oligonucleotide) ซึ่งเป็นนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ ที่มีลำดับเบสคู่สมกับดีเอ็นเอ

เป้าหมายและมีการติดหน่วยส่งสัญญาณเข้าไป อย่างไรก็ตามในกรณีของการตรวจสอบ SNP นั้นทำได้ไม่ถนัด เนื่องจากในบางครั้ง เราไม่สามารถทำนายได้ว่าการเกิด SNP จะเกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสจากเดิมไปเป็นเบสใด ทำให้การเข้าสู่สมของเบสมีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ดังนั้นจึงต้องมีการออกแบบเบสชนิดพิเศษที่จะสามารถเข้ากับนิวคลีโอเบสธรรมชาติทั้ง 4 ชนิด (A, T, C, G) ได้ โดยเบสชนิดนี้จะต้องสามารถจับยึดกับเบสทั้ง 4 ชนิดได้อย่างไม่มีความแตกต่าง และมีเสถียรภาพ เบสที่มีสมบัติดังกล่าวจะเรียกว่า ยูนิเวอร์ซอลเบส (universal base) ดังนั้น antisense oligonucleotide ที่มียูนิเวอร์ซอลเบส ก็จะสามารถจับยึดกับดีเอ็นเอเป้าหมายได้ แม้ว่าจะมีการเกิด SNP ในตำแหน่งที่กำหนดก็ตาม แต่อย่างไรก็ตาม เทคนิค antisense oligonucleotide ก็ยังมีข้อบกพร่องบางประการ กล่าวคือ ความเสถียรในการจับยึดเข้ากับดีเอ็นเอเป้าหมายกับ antisense oligonucleotide จะขึ้นอยู่กับความยาวของเบสและจำนวนชนิดของเบส (CG content) อันเนื่องมาจากทั้งดีเอ็นเอเป้าหมายและ antisense oligonucleotide ต่างก็มีประจุลบอันเนื่องมาจากหมู่ฟอสเฟต จะทำให้เกิดการผลักกันระหว่างประจุลบ (electrostatic repulsion) ส่งผลให้ความเสถียรของสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นลดลง อีกทั้งในการส่ง antisense oligonucleotide เข้าสู่เซลล์ก็ประสบปัญหาคือไม่เสถียรในสภาวะทางชีวภาพในร่างกาย เนื่องจากอาจจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ประเภทโปรตีเอสหรือนิวคลีเอสภายในเซลล์ได้ จึงทำให้ antisense oligonucleotide ยังเป็นตัวเลือกที่ไม่ดีนัก ต่อมาในปีค.ศ. 1991 Peter E. Nielsen และคณะ ได้รายงานการสังเคราะห์โมเลกุลชนิดหนึ่งซึ่งเรียกว่าเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิด หรือพีเอ็นเอ (Peptide Nucleic Acid; PNA) ซึ่งเป็นโมเลกุลสังเคราะห์เลียนแบบโมเลกุลของดีเอ็นเอ (DNA mimic) โดยจะมีการแทนที่หมู่ฟอสเฟตและน้ำตาลในดีเอ็นเอด้วยโครงสร้างที่ไม่มีประจุ และเป็นโมเลกุลอะไครัล โดยพีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ยังคงมีความสามารถในการเข้ากับดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอ ได้ผ่านพันธะไฮโดรเจนระหว่างเบสในรูปแบบของวัตสัน-คริกได้เช่นเดียวกับสารประกอบเชิงซ้อน DNA·DNA และสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นยังมีความเสถียรมากกว่าอีกด้วย ทั้งนี้เนื่องจากการเข้ากับของ PNA·DNA จะทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่ไม่มีการผลักกันของประจุ (พีเอ็นเอไม่มีประจุ) และนอกจากนี้ พีเอ็นเอยังสามารถทนต่อการย่อยสลายของเอนไซม์อีกด้วย หลังจากนั้นก็ได้มีกลุ่มวิจัยอีกหลายกลุ่มได้นำเสนอพีเอ็นเอระบบต่างๆ ที่มีโครงสร้างและสมบัติที่แตกต่างกันไป จนกระทั่งในปีค.ศ. 2006 Tirayut Vilaivan และคณะ ได้เสนอพีเอ็นเอชนิดใหม่ ที่เรียกว่า พีโรลิดินิลพีเอ็นเอ (pyrrolidinyl PNA) ซึ่งมีโครงสร้างหลักเป็นวงแหวนพิโรลิดีนต่อเชื่อมกับกรดเบต้าอะมิโนผ่านพันธะเพปไทด์ ซึ่งพบว่าพีเอ็นเอระบบนี้มีสมบัติการจับยึดกับกรดนิวคลีอิกที่ดีมาก มีความเสถียรและความจำเพาะเจาะจงในการเข้าสู่เบสสูงกว่าพีเอ็นเอระบบเดิม จากข้อมูลดังกล่าวมาจะเห็นได้ว่าพีเอ็นเอเป็นโมเลกุลที่มีคุณสมบัติที่ดีและมีศักยภาพสูงในการนำไปพัฒนาและ

ประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยลำดับเบสในกรดนิวคลีอิกได้ แต่อย่างไรก็ตามพีเอ็นเอก็ยังมีข้อด้อยอีกหลายประการที่จะต้องมีการพัฒนาและปรับปรุงต่อไป เช่น ความสามารถในการละลายน้ำค่อนข้างต่ำ ทำให้เกิดการลำเลียงสู่เซลล์เป้าหมายได้ค่อนข้างยากและปัญหาเรื่องความจำเพาะเจาะจงต่อการเข้าสู่ของนิวคลีโอเบส

ในงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาการนำโมเลกุลพีเอ็นเอชนิดพิโรลิดีนพีเอ็นเอที่มีความสามารถในการจับยึดกับดีเอ็นเอได้ดีมาใช้ร่วมกับยูนิเวอร์ซอลเบส ซึ่งเป็นส่วนที่สามารถเข้าสู่กับนิวคลีโอเบสธรรมชาติทั้ง 4 ชนิดได้ (A, G, C และ T) โดยไม่เห็นความแตกต่างมากนัก โดยคาดว่าโมเลกุลดังกล่าวจะสามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อน PNA·DNA ที่เสถียรได้ แม้ว่าจะเกิด SNP ก็ตาม โดยจะทำการสังเคราะห์ยูนิเวอร์ซอลเบสชนิด 3,6-dinitrocarbazole แสดงดังภาพ 1.1



ภาพ 1.1 โมเลกุลของพิโรลิดีนพีเอ็นเอ

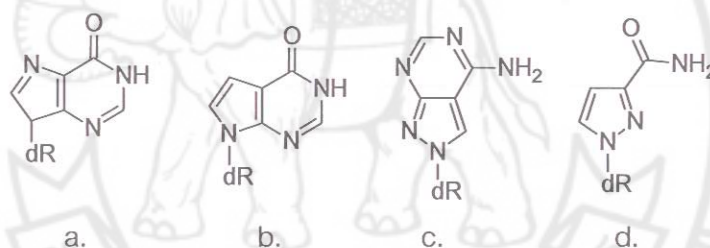
1.2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

งานวิจัยนี้จะศึกษาการสังเคราะห์พิโรลิดีนพีเอ็นเอชนิดใหม่ที่มีการแทนที่นิวคลีโอเบสด้วยยูนิเวอร์ซอลเบส (universal base) ชนิดเฮเทอโรไซคลิก ซึ่งยูนิเวอร์ซอลเบสเป็นสารประกอบที่สังเคราะห์ขึ้นเพื่อทดแทนนิวคลีโอเบสทั้ง 4 ชนิดทั้งกลุ่มพิริมิดีน และพิวรีนในดีเอ็นเอ ยูนิเวอร์ซอลเบสที่ดีจะมีคุณสมบัติที่แสดงความไม่จำเพาะเจาะจงในการเข้าสู่กับนิวคลีโอเบสในธรรมชาติทั้ง 4 ชนิด (A, G, C, T) [1] ด้วยสมบัติดังกล่าวทำให้ยูนิเวอร์ซอลเบสสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับโมเลกุลพีเอ็นเอได้ โดยการทำให้เกิด hybridization กับดีเอ็นเอจนเกิดเป็นโมเลกุลลูกผสม (PNA·DNA hybrid) ที่มีความเสถียรไม่ว่าจะเข้าสู่กับนิวคลีโอเบสชนิดใดก็ตาม ซึ่งสามารถนำไป

ประยุกต์ใช้ในงานทางด้านการตรวจสอบ SNP การใช้เป็นไพรเมอร์โดยการต่อส่วนของพีเอ็นเอเข้ากับดีเอ็นเอ เป็นต้น [2] สำหรับยูนิเวอร์ซอลเบสชนิดนี้ มีหลายประเภท ได้แก่ ชนิดสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจน ชนิดอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน และชนิดเฮเทอโรไซคลิก โดยแต่ละชนิดจะมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1. ยูนิเวอร์ซอลเบสชนิดสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจน

ยูนิเวอร์ซอลเบสชนิดนี้จะมีการปรับปรุงและเลียนแบบโครงสร้างของนิวคลีโอเบสในธรรมชาติให้ยังคงมีตำแหน่งที่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับนิวคลีโอเบสที่ต้องการอยู่ในโมเลกุล ตัวอย่างยูนิเวอร์ซอลเบสชนิดนี้ แสดงดังภาพ 1.2 เช่น 2'-Deoxyinosine (hypoxanthine) หรือ 7-Deaza-2'-deoxyinosine [3] ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายกับเบส guanine แต่ไม่มีหมู่เอมีน หรือ 8-Aza-7-deaza-inosine [4] ที่มีโครงสร้างคล้ายกับเบส adenine และ Pyrazole-3-carboxamide ซึ่งมีการออกแบบโครงสร้างที่แตกต่างจากนิวคลีโอเบสธรรมชาติตรงที่มีตำแหน่งที่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนได้หลายตำแหน่ง ทำหน้าที่ให้และรับไฮโดรเจนในการเกิดพันธะไฮโดรเจน [5]



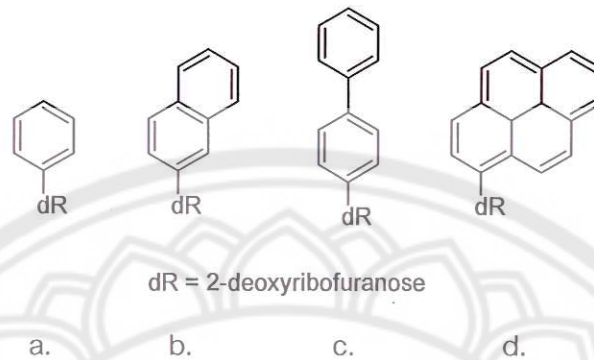
dR = 2-deoxyribofuranose

ภาพ 1.2 ยูนิเวอร์ซอลเบสชนิดสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจน เช่น a. 2'-Deoxyinosine b. 7-Deaza-2'-deoxyinosine c. 8-Aza-7-deaza-inosine d. Pyrazole-3-carboxamide

2. ยูนิเวอร์ซอลเบสชนิดอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน

ยูนิเวอร์ซอลเบสชนิดนี้จะเป็นการแทนที่โครงสร้างของนิวคลีโอเบสธรรมชาติด้วยสารกลุ่มอะโรมาติก แสดงดังภาพ 1.3 ยกตัวอย่างเช่น สารกลุ่มฟีนิล (phenyl) สารประกอบกลุ่มนี้จะออกแบบโดยมุ่งเน้นให้ไม่มีความจำเพาะเจาะจงในการเข้าคู่กับเบส [6] แต่จะอาศัยการเกิด π - π stacking interaction ระหว่างยูนิเวอร์ซอลเบสกับนิวคลีโอเบสเป็นหลัก ซึ่งต่างก็มีโครงสร้างในลักษณะแบนราบ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นมักไม่เสถียรเท่าที่ควร ซึ่งอาจเป็นเพราะการหายไปของพันธะไฮโดรเจนและความสามารถในการเกิด π - π stacking

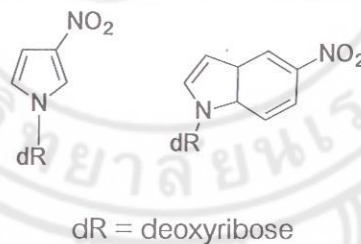
interaction ที่ไม่ดีนัก ดังนั้นสารไฮโดรคาร์บอนชนิดอื่นๆ ที่มีการเพิ่มพื้นที่ในการเกิด π - π stacking interaction จึงถูกนำมาประยุกต์ใช้เป็นยูนิเวอร์ซอลเบส เช่น naphthalene, phenanthrene, biphenyl และ pyrene [7-8]



ภาพ 1.3 อะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนยูนิเวอร์ซอลเบส ได้แก่ a. สารกลุ่ม phenyl
b. α/β -naphthalene c. biphenyl และ d. pyrene

3. กลุ่มเฮเทอโรไซเคิล

ยูนิเวอร์ซอลเบสกลุ่มนี้เป็นการนำสารเฮเทอโรไซเคิลมาแทนที่นิวคลีโอเบส เพื่อจุดประสงค์คือการหาโมเลกุลที่สามารถเข้าคู่กับนิวคลีโอเบสทั้ง 4 ชนิด โดยไม่มีความจำเพาะเจาะจง เช่น 3-Nitropyrrole [9-11] และ 5-nitroindole [12-13] ดังแสดงในภาพ 1.4



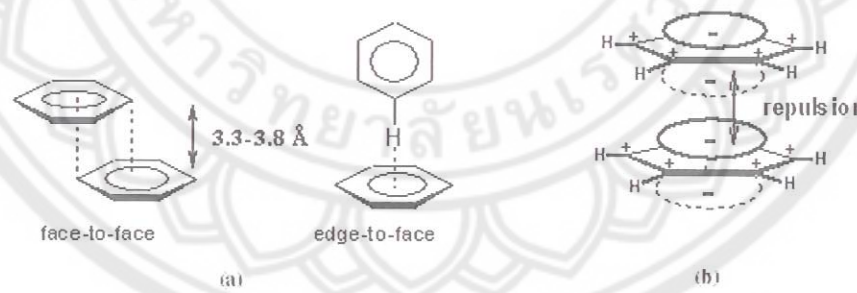
ภาพ 1.4 อะโรมาติกเฮเทอโรไซเคิลยูนิเวอร์ซอลเบส ได้แก่ 3-nitropyrrole และ 5-nitroindole

ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเป็นยูนิเวอร์ซอลเบส [14]

โดยทั่วไปการเกิดโครงสร้างเกลียวคู่ (duplex) ของดีเอ็นเอนั้นจะมีการยึดเหนี่ยวกันด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างคู่เบสที่เป็นเบสคู่สมกัน (complementary base) ซึ่งจะวางตัวอยู่บนดีเอ็นเอคนละสายตรงข้ามกัน โดยการเข้าคู่คือเบสอะดีนีน (adenine; A) จะจับคู่กับเบสไทมีน (thymine; T) เกิดพันธะไฮโดรเจน 2 พันธะ และเบสไซโตซีน (cytosine; C) จะจับคู่กับเบสกวานีน (guanine; G) เกิดพันธะไฮโดรเจน 3 พันธะ นอกจากการเกิดพันธะไฮโดรเจนแล้วยังมีแรงไฮโดรโฟบิก

(hydrophobic interaction) ที่เกิดขึ้นจากความไม่ชอบน้ำของโมเลกุลเบสที่ซ้อนเหลื่อมอยู่ในสายเดียวกัน (stacking bases) ช่วยยึดโครงสร้างเกลียวคู่ให้มีความเสถียร การจับคู่กันของเบสบนสายของดีเอ็นเอเป็นกระบวนการที่มีความจำเพาะ และจะเกิดได้อย่างสมบูรณ์เมื่อเบสบนสายดีเอ็นเอเป็นเบสคู่สมกัน และความเสถียรจะลดลงเมื่อมีการเข้าคู่เบสที่ผิดไป (mismatch base) ในกรณียูนิเวอร์ซอลเบสที่จะสามารถเข้าคู่กับเบสทั้ง 4 ชนิดได้โดยไม่มีความแตกต่าง หรือมีความแตกต่างน้อยที่สุดนั้น การออกแบบโครงสร้างของยูนิเวอร์ซอลเบสจะมีปัจจัยหลายด้านที่ส่งผลต่อการเป็นยูนิเวอร์ซอลเบสที่มีประสิทธิภาพ ได้แก่

1. การเกิด π - π stacking หรือ π - π interaction เป็นแรงที่เกิดจากอันตรกิริยาในส่วนของ π -orbital ในระบบของวงแหวนที่มีวงน้อยกว่าสามวงในระบบ จะมีแรงที่เกิดจากการซ้อนเหลื่อมกันของวงอะโรมาติก (stacking) เกิดขึ้น ซึ่งเป็นแรงที่มีความแข็งแรง ใกล้เคียงกับแรง van der Waals ที่เกิดขึ้นในโมเลกุลไฮโดรคาร์บอนอิ่มตัว การเกิด π - π stacking แสดงดังภาพ 1.5 นั้นทำให้เกิดเกลียวคู่ของดีเอ็นเอเกิดความเสถียร อันตรกิริยาระหว่างนิวคลีโอเบสชนิดพิวรีน และพิริมิดีน ซึ่งจะมีวงอะโรมาติก 2 และ 1 วง ตามลำดับ ทำให้เกิดแรงในการจับยึดกัน ในกรณีหากมีวงอะโรมาติกมากกว่า 2 วง อาจทำให้เกิดผลของ π - π effect อันเนื่องมาจากการที่มีออร์บิทัล (orbital) ที่ใหญ่มากเกินไป ทำให้เกิดแรงผลักระหว่างโมเลกุลเกิดขึ้นได้ อย่างไรก็ตาม การอธิบายการเกิด π - π stacking ในระบบที่มีวงอะโรมาติกอยู่ใกล้กันในสารชีวโมเลกุล หรือในสารมหโมเลกุล ทฤษฎีที่อธิบายในเรื่องนี้ก็ยังเป็นที่ถกเถียงกันว่าถูกต้องหรือมีอยู่จริงหรือไม่ [15-16]



ภาพ 1.5 แรงระหว่างโมเลกุลที่เรียกว่า π - π interaction a) คือ การเกิด π stacking แบบ face-to-face หรือ off-set stacking และแบบ edge-to-face หรือ T-stacking b) แรงผลักระหว่าง π - π effect

ที่มา : <http://www.thaiblogonline.com/patchara3.blog?PostID=21380>

2. แรงแวนเดอร์วาลส์ (van der Waals force) เป็นแรงที่เกิดจากอันตรกิริยาระหว่างอะตอม โมเลกุล และพื้นผิวของโมเลกุล ไม่ว่าจะเป็นแรงดึงดูด แรงผลักระหว่าง

โมเลกุล (intermolecular force) ที่นอกเหนือไปจากพันธะไฮโดรเจน หรือแรงทางไฟฟ้า อันได้แก่ แรงระหว่างโมเลกุลมีขั้ว แรงระหว่างโมเลกุลมีขั้วกับไม่มีขั้ว (Debye force) และแรงระหว่างโมเลกุลไม่มีขั้วกับไม่มีขั้ว (London dispersion force) แรงแวนเดอวาลส์ถึงแม้จะอ่อนเมื่อเทียบกับพันธะโคเวเลนต์ หรือพันธะไฮโดรเจน แต่ก็มีบทบาทสำคัญอย่างมากในเคมีมหโมเลกุล และชีวเคมีเชิงโครงสร้าง

3. แรงทางไฟฟ้า (electrostatic force) เป็นแรงที่มีอิทธิพลมาจากโมเลกุลที่มีประจุทางไฟฟ้าที่แตกต่างกัน เช่น ประจุบวก กับประจุลบ โปรตอนกับอิเล็กตรอน เป็นต้น ผลที่เกิดทางประจุไฟฟ้ามีหลายชนิด เช่น induction เกิดจากการกระจายตัวของความหนาแน่นของอิเล็กตรอนผ่านพันธะซิกมา (σ -bond) ในโมเลกุล โดยจะสอดคล้องกับค่าอิเล็กโตรเนกาติวิตี (electronegativity; EN) ของอะตอมซึ่งจะรวมถึงผลของ inductive effect ที่ถูกดึงผ่านพันธะซิกมาด้วย หรือแรงทางไฟฟ้าระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลของกรดอะมิโนในโครงสร้างระดับตติยภูมิของโปรตีน

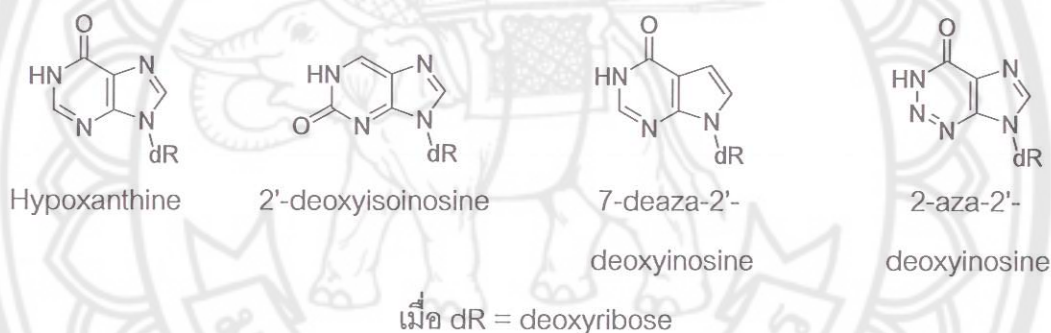
4. การเกิดคอนจูเกชัน (conjugation) เป็นการเคลื่อนที่ไป-มาของความหนาแน่นของอิเล็กตรอนในระบบโมเลกุลที่ไม่อิ่มตัว (unsaturated system) ซึ่งเป็นระบบที่มีออร์บิทัล p (p orbital) และอิเล็กตรอนที่เคลื่อนที่ได้ (delocalized electron) เป็นการเคลื่อนที่ผ่านพันธะไพ (π -electron framework) โดยการเกิดคอนจูเกชันไม่ได้เกิดจากผลของค่าอิเล็กโตรเนกาติวิตีของอะตอมที่ติดกัน แต่เกิดจากตำแหน่งของอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวในระบบของพันธะไพที่เกิดการเคลื่อนที่ต่อเนื่องกันไป การเกิดประจุทางไฟฟ้า (electrostatic effect) นั้นก็สามารถเกิดผ่านพันธะไพได้เช่นกัน

5. กระบวนการโซลเวชัน (solvation) หรือบางครั้งอาจจะเรียกว่า dissolution นั่นคือกระบวนการที่เกิดจากการรวมกันระหว่างโมเลกุลหรือไอออนของตัวถูกละลายกับตัวทำละลาย ไอออนที่สามารถละลายได้จะถูกแยกออกโดยโมเลกุลของตัวทำละลาย ในตัวทำละลายที่มีขั้ว โครงสร้างของโมเลกุลจะมีสภาพขั้ว (dipole moment) โดยโมเลกุลที่มีขั้วของตัวทำละลายจะสามารถเกิดเป็นไอออนที่ล้อมรอบ (solvate ions) โดยกระบวนการโซลเวชันจะเป็นการรวมของผลต่างๆ ที่แตกต่างกันที่เกิดอันตรกิริยาภายในโมเลกุล นั่นคือ การเกิดแรงดึงดูดผ่านพันธะไฮโดรเจน แรงระหว่างโมเลกุลมีขั้ว แรงระหว่างโมเลกุลมีขั้วกับไม่มีขั้ว และแรงระหว่างโมเลกุลไม่มีขั้วกับไม่มีขั้ว

จากปัจจัยทั้งหมดที่กล่าวมา ทำให้มีผู้ทำการศึกษาออกแบบโครงสร้างอนุพันธ์ของยูนิเวอร์ซอลเบสมากมายหลายกลุ่ม เพื่อนำไปใช้ทดแทนนิวคลีโอเบสในดีเอ็นเอ หรือเพปไทด์นิวคลีโอไทด์ อย่างเช่น Donald E. Bergstrom, Michel Camplo, David Loakes, John S. Oliver, Floyd

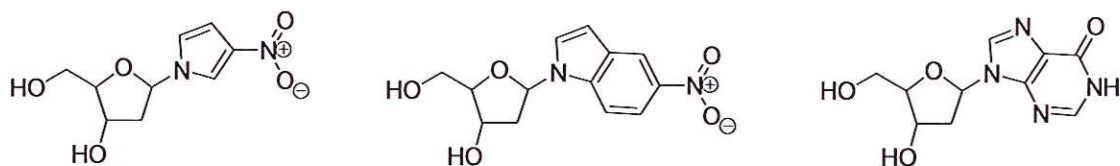
E. Romesberg, Steven A. Woski และ Shigeyuki Yokoyama เป็นต้น เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ใน
ด้านต่างๆ

งานวิจัยทางการออกแบบและการสังเคราะห์ยูนิเวอร์ซอลเบสนั้น มีการศึกษากันมา
อย่างต่อเนื่อง โดยเริ่มแรกนั้นจะศึกษาในโมเลกุลที่เป็นยูนิเวอร์ซอลเบสตามธรรมชาติ ได้แก่
hypoxanthine, 2'-deoxyisoinosine, 7-deaza-2'-deoxyinosine และ 2-aza-2'-deoxyinosine ซึ่ง
มีสมบัติเป็น inert base คือสามารถจับยึดกับนิวคลีโอเบสอื่นๆ ตัวใดก็ได้ แม้จะมีความเสถียรไม่ดี
นัก และยังมีความแตกต่างในเสถียรภาพในเบสแต่ละชนิดอยู่ค่อนข้างมาก (ช่วงของอุณหภูมิ
หลอมเหลวค่อนข้างกว้าง) ดังนั้นจึงมีการพัฒนาโครงสร้างของยูนิเวอร์ซอลเบสให้มีสมบัติตาม
ต้องการ คือ สามารถจับยึดกับนิวคลีโอเบสธรรมชาติทั้ง 4 ชนิดได้ใกล้เคียงกัน และมีความเสถียร
มากพอ สังเคราะห์ได้ง่าย และสามารถต่อเชื่อมกับดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ หรือโมเลกุลสังเคราะห์ได้ไม่
ยากนัก



ภาพ 1.6 โครงสร้างของ deoxyribonucleosides ของ hypoxanthine, 2'-deoxyisoinosine,
7-deaza-2'-deoxyinosine และ 2-aza-2'-deoxyinosine

ในปี 1995 Loakes และคณะ [11] ได้ทำการสังเคราะห์ 3-Nitropyrrole และ 5-
nitroindole ซึ่งเป็นสารกลุ่มอนุพันธ์เฮเทอโรไซคลิกของไนโตรอazole) เพื่อใช้เป็นยูนิ
เวอร์ซอลเบสเพื่อใช้เป็นไพรเมอร์ (primer) สำหรับ dideoxy DNA sequencing ใน polymerase
chain reaction (PCR) โดยเตรียมจาก deoxyribonucleoside ของ 3-Nitropyrrole และ 5-
nitroindole ดังภาพ 1.7 ผ่านอนุพันธ์ของ phosphoramidite



ภาพ 1.7 โครงสร้างของ deoxyribonucleosides ของ 3-Nitropyrrole, 5-nitroindole และ hypoxanthine

จากผลการทดลองแสดงดังตาราง 1.1 พบว่ายูนิเวอร์ซอลเบสทั้งชนิด 3-Nitropyrrole และ 5-nitroindole มีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับยูนิเวอร์ซอลเบสธรรมชาติไฮโปแซนทีน เมื่อพิจารณาจากค่า melting temperature โดยค่า melting temperature จะลดลงเมื่อจำนวนของยูนิเวอร์ซอลเบสเพิ่มมากขึ้น และสามารถแทนที่ยูนิเวอร์ซอลเบสชนิด 5-nitroindole ในไพรเมอร์ได้ถึง 6 ตำแหน่ง (primer 6) ส่วนยูนิเวอร์ซอลเบสชนิด 3-nitropyrrole สามารถแทนลงในไพรเมอร์ได้ 4 ตำแหน่ง (primer 16) โดยไม่มีผลกระทบในการทำ PCR และ sequencing ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายูนิเวอร์ซอลเบสทั้งสองชนิดสามารถใช้ทดแทนนิวคลีโอเบสธรรมชาติได้ในการนำไปประยุกต์ใช้ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ

ตาราง 1.1 ไพรเมอร์สำหรับ PCR และ sequencing และค่า melting temperature ใน PCR buffer

Primers	Sequences	T_m in PCR buffer ($^{\circ}\text{C}$)
1	5'- CCC GTG GAT CCA AAT CCT CC	98
2	5'- CCI GTI GAI CCI AAI CCI CC	50
3	5'- CCI GT5 GAI CCI AAI CCI CC	65
4	5'- CCI GT5 GAI CC5 AAI CCI CC	61
5	5'- CC5 GT5 GAI CC5 AAI CC5 CC	56
6	5'- CC5 GT5 GA5 CC5 AA5 CC5 CC	32
7	5'- CCC GT3 GAT CCA AAT CCT CC	60
8	5'- CCC GT3 GAT CC3 AAT CCT CC	51
9	5'- CC3 GT3 GA3 CC3 AA3 CC3 CC	Not detected
10	5'- CCC GTG GAT CCA AAT CCT C5	56
11	5'- CCC GTG GAT C55 AAT CCT CC	61

12	5'- CCC GTG GAT 555 AAT CCT CC	56
13	5'- CCC GTG GA5 555 AAT CCT CC	54
14	5'- CCC GTG GAT C33 AAT CCT CC	57
15	5'- CCC GTG GAT 333 AAT CCT CC	51
16	5'- CCC GTG GA3 333 AAT CCT CC	48
17	5'- CCC GTG GAT CCA AAT 555 CC	61
18	5'- CCC GTG GAT CCA AAT 333 CC	58

หมายเหตุ ไพรมอร์ออกแบบโดยการแทนที่ด้วย 5-nitroindole-2'-deoxyriboside (5), 3-nitropyrrole-2'-deoxyriboside (3) หรือ hypoxanthine (I) ณ ตำแหน่งที่กำหนด

ในปี 1999 Woski และคณะ [17] ได้นำยูนิเวอร์ซอลเบสชนิด 3-Nitropyrrole และ 5-nitroindole เช่นเดียวกับ Loakes แต่ได้นำมาดัดแปลงใส่ในโครงสร้างของพีเอ็นเอแทน ซึ่งพีเอ็นเอเป็นสารเลียนแบบดีเอ็นเอที่มีโครงสร้างเป็นเพปไทด์ชนิด (2-aminoethyl)-glycine (aegPNA) และตรวจสอบสมบัติการจับยึดกับ oligodeoxynucleotides ด้วยการทดลอง thermal denaturation และวัดค่าทาง thermodynamic parameters ได้ผลดังตาราง 1.2



ภาพ 1.8 โครงสร้างของ aegPNA ที่มี 3-Nitropyrrole และ 5-nitroindole เป็นยูนิเวอร์ซอลเบส

จากผลการทดลองพบว่าพีเอ็นเอที่มียูนิเวอร์ซอลเบสทั้ง 2 ชนิด (N_p และ N_i) เมื่อจับกับดีเอ็นเอที่มีนิวคลีโอเบสธรรมชาติทั้ง 4 ชนิด (A, T, C, G) จะมีความแตกต่างของค่า melting temperature (T_m) น้อยมาก เพียง 1.5 และ 1.3 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และค่า thermodynamic parameters ของการจับยึดก็มีใกล้เคียงกัน ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการจับยึดแบบไม่จำเพาะเจาะจงของยูนิเวอร์ซอลเบสทั้งสองชนิด ถึงแม้ว่าความเสถียรของการจับยึดจะน้อยกว่าการจับยึดระหว่างคู่เบสธรรมชาติเล็กน้อย ซึ่งจากสมบัติดังกล่าวทำให้น่าจะนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบลำดับเบสได้

ตาราง 1.2 ค่า Thermodynamic parameters ของการจับยี่ดระหว่าง PNA ที่มียูนิเวอร์ซอลเบสกับ DNA คู่สม

H-TGT ACG X CAC AAC TA-NH₂

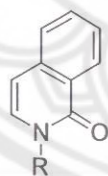
PNA1 (X = N_p) PNA2 (X = N_i)

3'-ACATGC Y GTG TTG AT-5'

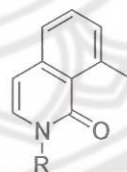
Y = A, G, C, T

PNA	Y	T _m (°C)	ΔH (kJ/mol)	ΔS (kJ/mol·K)
X = N _p	A	56.2	-317	-0.85
	G	54.7	-318	-0.86
	C	55.9	-309	-0.83
	T	55.1	-306	-0.82
X = N _i	A	58.4	-338	-0.91
	G	58.9	-344	-0.93
	C	59.7	-343	-0.97
	T	59.3	-350	-0.94
X = T	A	68.5	-446	-1.20

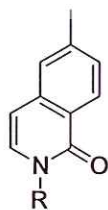
นอกจากนี้ ในปี 2000 Romesberg และคณะ [18] ได้รายงานการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ isocarbostyryl สามชนิด ได้แก่ 3-methyl isocarbostyryl (MICS), 5-methyl isocarbostyryl (5MICS) และ 3-methyl-7-propynyl isocarbostyryl (PIM) เพื่อนำมาใช้เป็นยูนิเวอร์ซอลเบสชนิดไฮโดรโฟบิกชนิดใหม่ ดังแสดงในภาพ 1.9



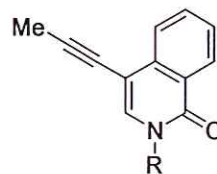
Isocarbostyryl



3-methyl isocarbostyryl



5-methyl isocarbostyryl



3-methyl-7-propynyl isocarbostyryl

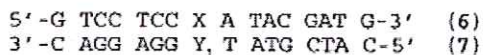
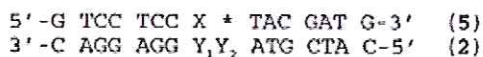
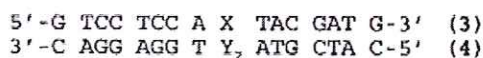
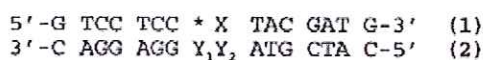
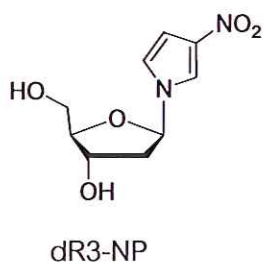
ภาพ 1.9 โครงสร้างอนุพันธ์ของ isocarbostyryl ทั้ง 3 ชนิด

หลังจากนั้นได้นำยูนิเวอร์ซอลเบสดังกล่าวมาเชื่อมต่อกับโพลิโกนิวคลีโอไทด์ชนิด 5'-GCG TAC X CAT GCG หรือ 3'-CGC ATG X GTA CGC และได้ทดสอบวัดค่า melting temperature กับดีเอ็นเอคู่สมที่มีนิวคลีโอเบสธรรมชาติ 4 ชนิด (A, T, C, G) ได้ผลดังตาราง 1.3 จากผลการทดลองพบว่ายูนิเวอร์ซอลเบสชนิดไฮโดรโฟบิกทั้ง 2 ชนิดสามารถเกิดการจับยึดกับนิวคลีโอเบสได้อย่างเสถียรเมื่อวางตัวในตำแหน่งกลางของโพลิโกนิวคลีโอไทด์ที่มีความยาว 13 เบส โดยพิจารณาจากค่า melting temperature เฉลี่ยของ MICS และ 5MICS เท่ากับ 54.6 ± 0.7 และ 55.3 ± 0.6 °C ตามลำดับ เมื่อเทียบกับการจับยึดระหว่าง dT·dA ที่มีค่า 58.7 °C ซึ่งมีค่าต่างกันไม่มากนัก และช่วงความแตกต่างในการจับยึดระหว่างเบสทั้ง 4 ชนิดมีค่าเท่ากับ 1.4 °C ซึ่งถือว่ามีช่วงที่แคบและมีค่าใกล้เคียงกับยูนิเวอร์ซอลเบสชนิด 3-nitropyrrole และ 5-nitroindole และเป็นที่น่าสังเกตว่าในโพลิโกนิวคลีโอไทด์ชนิด 3'-CGC ATG X GTA CGC นั้น MICS และ 5MICS จะสามารถจับคู่กับ dA และ dC (54.2 และ 55.2 สำหรับ MICS และ 54.6 และ 54.2 สำหรับ 5MICS ตามลำดับ) ได้เสถียรกว่า dT และ dG (51.9 และ 51.2 สำหรับ MICS และ 51.6 และ 49.9 สำหรับ 5MICS ตามลำดับ) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการเลือกสรรที่พบในยูนิเวอร์ซอลเบสชนิดนี้

ตาราง 1.3 ค่า melting temperature ของ duplex ที่มียูนิเวอร์ซอลเบสเป็น MICS และ 5MICS

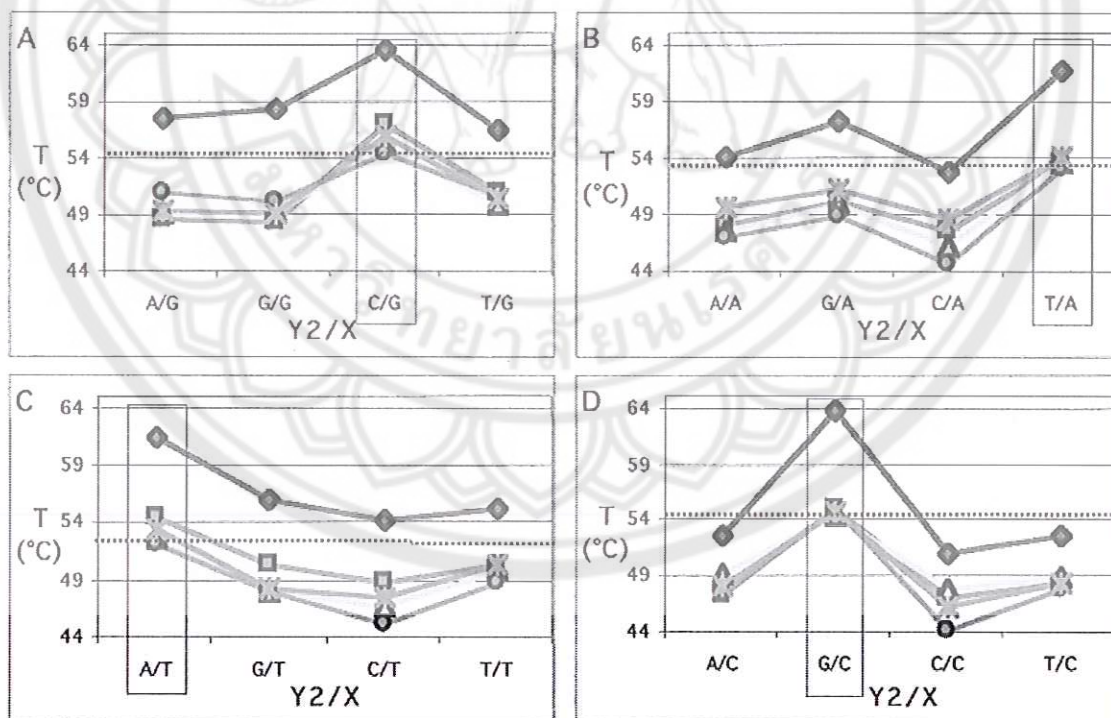
Duplex	N	X	T_m ($^{\circ}\text{C}$)
5'-GCG TAC X CAT GCG 3'-CGC ATG N GTA CGC	A	MICS	53.6
	T	MICS	55.1
	C	MICS	54.8
	G	MICS	54.8
	MICS Average = 54.6 ± 0.7 $^{\circ}\text{C}$		
	A	5MICS	55.7
	T	5MICS	55.5
	C	5MICS	54.3
	G	5MICS	55.5
	5MICS Average = 55.3 ± 0.6 $^{\circ}\text{C}$		
5'-GCG TAC N CAT GCG 3'-CGC ATG X GTA CGC	A	MICS	54.2
	T	MICS	51.9
	C	MICS	55.2
	G	MICS	51.2
	MICS Average = 53.1 ± 1.9 $^{\circ}\text{C}$		
	A	5MICS	54.6
	T	5MICS	51.6
	C	5MICS	54.2
	G	5MICS	49.9
	5MICS Average = 52.6 ± 2.2 $^{\circ}\text{C}$		

ในปี 2001 Oliver และคณะ [19] ได้ศึกษาผลของลำดับเบสข้างเคียง (neighboring natural base) บนสายโพลิโก นิวคลีโอไทด์ที่มีต่อสมบัติการจับยึดของยูนิเวอร์ซอลเบสชนิด 3-nitropyrrole โดยได้ออกแบบสายโพลิโกนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 8 สาย แสดงดังภาพ 1.10 เพื่อทำการทดลองศึกษาว่าเมื่อหมู่เบสข้างเคียงเปลี่ยนไปจะส่งผลต่อความเสถียรของการจับยึดของยูนิเวอร์ซอลอย่างไร



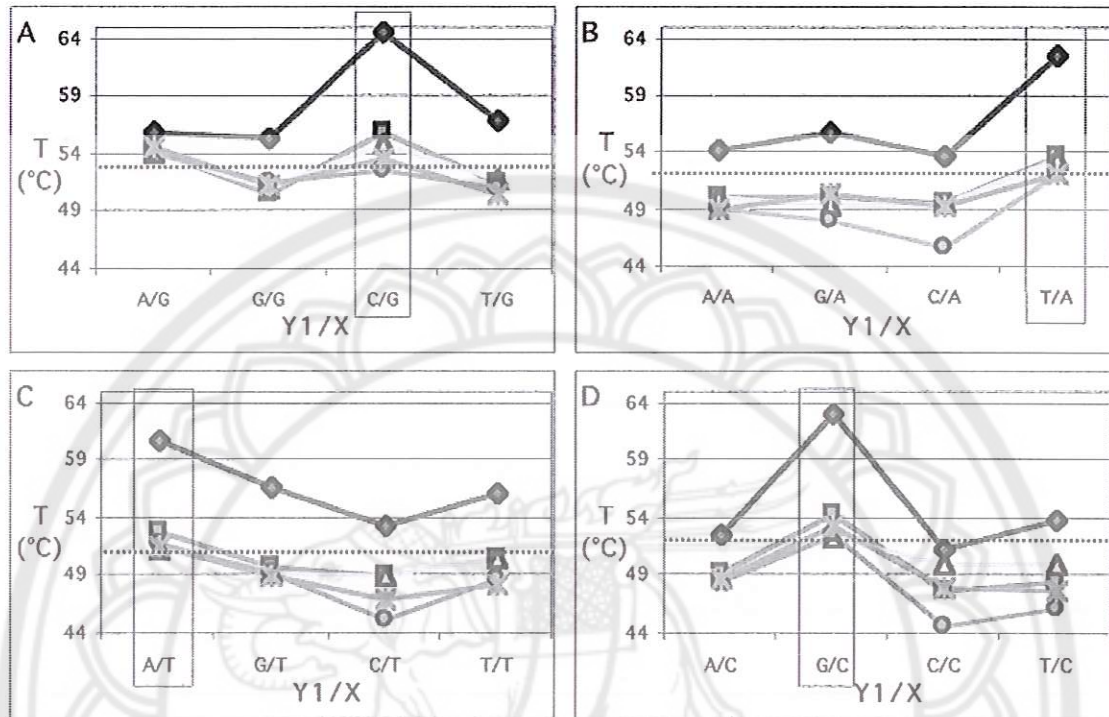
ภาพ 1.10 โครงสร้างของ deoxyribonucleosides ของ 3-nitropyrrole และสายโพลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการทดลองของ Oliver และคณะ โดย X และ Y คือ A, G, C, T และ * คือ 3-nitropyrrole

จากผลการทดลองแสดงดังภาพ 1.11 และภาพ 1.12 แสดงให้เห็นว่าหมู่เบสข้างเคียงที่มีการจับคู่แบบเบสคู่สม (C/G, T/A, AT, G/C) จะให้ค่า melting temperature ที่สูงกว่าการจับคู่แบบ mismatch ในทุกกรณี และค่าอุณหภูมิต่ำสุด (เส้นประ) ของการจับคู่ของ 3-nitropyrrole กับนิวคลีโอเบสทั้ง 4 ชนิด ในกรณีที่หมู่ข้างเคียงเป็นเบสคู่สม จะมีค่าที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งยืนยันสมบัติความเป็นยูนิเวอร์ซอลเบสที่ดีของ 3-nitropyrrole ในโพลิโกนิวคลีโอไทด์



ภาพ 1.11 ผล thermal denaturation ของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างโพลิโกนิวคลีโอไทด์ 4-3 และโพลิโกนิวคลีโอไทด์ที่มี 3-nitropyrrole 1-2 โดยเส้นกราฟแสดงถึงชุดควบคุมนิวคลีโอเบสธรรมชาติ: (blue, ♦), Y₁ = A (red, □), Y₁ = G (yellow, △), Y₁ = C (cyan, o) Y₁ = T (green,

* และเส้นประแสดงถึงค่า melting temperature ที่ต่ำที่สุดของสารเชิงซ้อนของโพลิโกนิวคลีโอไทด์ ที่มี 3-nitropyrrole ที่มีการเข้าคู่สมของเบส



ภาพ 1.12 ผล thermal denaturation ของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างโพลิโกนิวคลีโอไทด์ 6-7 และโพลิโกนิวคลีโอไทด์ที่มี 3-nitropyrrole 2-5 โดยเส้นกราฟแสดงถึงจุดควบคุมนิวคลีโอเบสธรรมชาติ: (blue, \diamond), Y1 = A (red, \square), Y1 = G (yellow, \triangle), Y1 = C (cyan, \circ) Y1 = T (green, \ast) และเส้นประแสดงถึงค่า melting temperature ที่ต่ำที่สุดของสารเชิงซ้อนของโพลิโกนิวคลีโอไทด์ที่มี 3-nitropyrrole ที่มีการเข้าคู่สมของเบส

ในปี 2001 Bergstorm และคณะ [20] ได้รายงานการศึกษาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างดีเอ็นเอกับพีเอ็นเอที่มียูนิเวอร์ซอลเบสชนิด 3-nitropyrrole ซึ่งมีลักษณะงานคล้ายกับที่รายงานโดย Woski ในปี 1999 แต่ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอ (DNA-DNA duplex) กับสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างพีเอ็นเอกับดีเอ็นเอ (PNA-DNA duplex) ซึ่งต่างก็มียูนิเวอร์ซอลเบสชนิด 3-nitropyrrole แสดงผลดังตาราง 1.4

ตาราง 1.4 ค่า melting temperature ของสารประกอบเชิงซ้อน DNA·DNA duplex และ PNA·DNA duplex

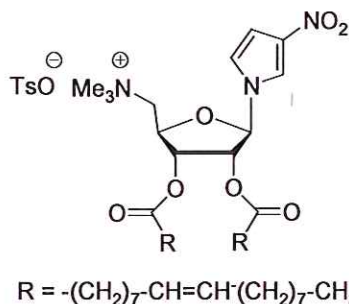
X:Y	T_m (°C)	
	DNA·DNA ^a	PNA·DNA ^b
C:G	55.0±0.1	69.7±0.2
Q:A	40.3±0.1	52.7±0.2
Q:C	38.7±0.2	50.7±0.3
Q:G	39.3±0.1	49.8±0.2
Q:T	40.0±0.1	51.3±0.2

^a 5'-TGTACGT X ACAACTA-3' + 3'-ACATGCA Y TGTTGAT-5' [X = C, 3-nitropyrrole (Q); Y = A, C, G, T]

^b H-TGTACGT X ACAACTA-NH₂ + 3'-ACATGCA Y TGTTGAT-5' [X = C, 3-nitropyrrole (Q); Y = A, C, G, T]

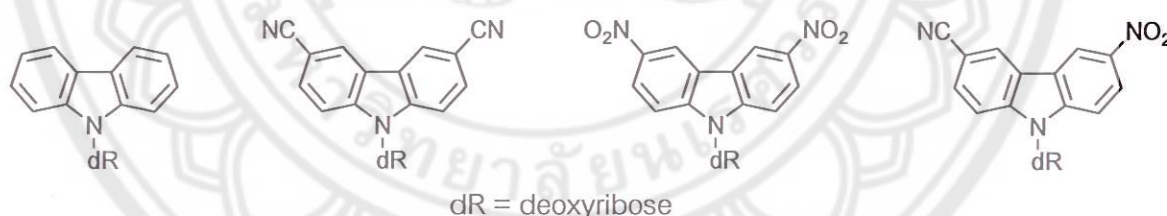
จากผลการทดลองพบว่าสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างพีเอ็นเอกับดีเอ็นเอที่มี 3-nitropyrrole เป็นยูนิเวอร์ซอลเบสมีค่า melting temperature สูงกว่าสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอที่มี 3-nitropyrrole แสดงให้เห็นถึงความเสถียรที่สูงกว่าโดยมีผลต่างอยู่ในช่วง 10.5-12.4°C จากงานวิจัยนี้ช่วยยืนยันสมบัติของยูนิเวอร์ซอลเบสชนิด 3-nitropyrrole ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในดีเอ็นเอหรือพีเอ็นเอได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ในปี 2009 Camplo และคณะ [21] ได้รายงานการนำยูนิเวอร์ซอลเบสชนิด 3-nitropyrrole ไปประยุกต์ใช้ในการทดลองศึกษา transient gene knockdown (การยับยั้งการแสดงออกของยีนหรือเซลล์โดยการบล็อกอาร์เอ็นเอ) โดยการใช้ siRNA ที่มียูนิเวอร์ซอลเบสชนิด 3-nitropyrrole โดยได้สังเคราะห์อาร์เอ็นเอที่มียูนิเวอร์ซอลเบสดังกล่าวและต่อเชื่อมกับหมู่ลิพิดที่มีประจุบวก แสดงดังภาพ 1.13 เกิดเป็นสารมหโมเลกุลขนาดนาโนในสารละลาย ซึ่งสามารถเกิดการจับยึดกับกรดนิวคลีอิกเป้าหมายได้ โดยทำให้เกิด protein knockdown ที่ให้ผลเช่นเดียวกับการใช้ siPORT NeoFX และยังไม่พบรายงานความเป็นพิษของสารประกอบดังกล่าว



ภาพ 1.13 โครงสร้างของนิวคลีโอไทด์ที่มี 3-nitropyrrole เป็นยูนิเวอร์ซอลเบส [เกลือ tosylate ของ 1'-(2',3'-dioleoyl-5'-trimethylammonium- α,β -D-ribofuranosyl)-3-nitropyrrole]

ในปี 2012 Tantirungrotechai และคณะ [22] ได้รายงานการศึกษาการคำนวณ molecular dynamics ของ DNA duplex ความยาว 15 เบส ที่มีสารในกลุ่มคาร์บาโซลเป็นยูนิเวอร์ซอลเบส ด้วยวิธี MM-PBSA เพื่อคำนวณค่าทางเทอร์โมไดนามิกส์ โดยได้ศึกษา ยูนิเวอร์ซอลเบส ทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ carbazole (CBZ), 3,6-dicyanocarbazole (DCC), 3,6-dinitrocarbazole (DNC) และ 3-nitro-6-cyanocarbazole (NCC) ซึ่งจากการคำนวณพบว่าค่าเฉลี่ยของพลังงานเสรีกิ๊บส์ของการเกิดเกลียวคู่มีลำดับดังนี้ คือ $DNC > NCC > CBZ > DCC$ โดยเฉพาะกรณี DNC ไม่มีความแตกต่างจากการเกิดเกลียวคู่ในนิวคลีโอเบสธรรมชาติ แสดงให้เห็นว่า DNC เป็นตัวเลือกที่ดีในการนำไปประยุกต์ใช้เป็นยูนิเวอร์ซอลเบส



ภาพ 1.14 โครงสร้าง deoxyribonucleosides ของ carbazole (CBZ), 3,6-dicyanocarbazole (DCC), 3,6-dinitrocarbazole (DNC) และ 3-nitro-6-cyanocarbazole (NCC)

จากเอกสารอ้างอิงที่กล่าวมาเป็นตัวอย่างของการออกแบบและสังเคราะห์ยูนิเวอร์ซอลเบส ชนิดต่างๆ โดยเฉพาะ 3-nitropyrrole และ 5-nitroindole ที่มีสมบัติในการเป็นยูนิเวอร์ซอลเบสที่มีประสิทธิภาพและยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานด้านเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น การนำไปใช้ในการทดลอง gene knockdown อย่างได้ผล และใช้เป็นตัวตรวจวัดโพลิโกนิวคลีโอไทด์ได้ ดังนั้นในงานวิจัยจึงสนใจศึกษาการนำยูนิเวอร์ซอลเบสทั้งสองชนิดมาประยุกต์ใช้กับพีเอ็นเอชนิดพิโรลิดีนพีเอ็นเอ ซึ่งพัฒนาขึ้นโดยกลุ่มวิจัย เพื่อศึกษาผลของการแทนที่ยูนิเวอร์ซอลเบสต่อสมบัติการจับยึด

กับกรณีศึกษา เพื่อเป็นองค์ความรู้ในการพัฒนาพิโรตินิลที่เอ็นเอพีเอ็นเอไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อไป



บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 อุปกรณ์และสารเคมี

2.1.1 อุปกรณ์

1. เครื่องแก้วที่ใช้ในการตั้งปฏิกิริยา ให้นำไปอบให้แห้งก่อนใช้ในตู้อบที่อุณหภูมิ 120°C
2. แผ่นทินเลย์โครมาโตกราฟี (TLC) ยี่ห้อ Merck รุ่น D.C. Silica gel 60 F₂₅₄ 0.2 mm precoated aluminium plates cat. no. 1.05554 และใช้แสงยูวี (UV light) ความยาวคลื่น 254 nm ในการติดตามปฏิกิริยา
3. ซิลิกาเจล ขนาด 70-230 mesh สำหรับทำโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์

2.1.2 เครื่องมือ

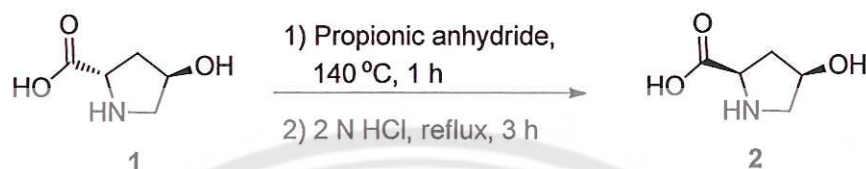
เครื่องมือ	บริษัท	รุ่น
1. เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง	Ohaus Corp. Pine Brook, NJ, USA	Adventurer
2. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง	Sartorius	BS224S
3. เครื่องคนสารและให้ความร้อน	Fisher scientific	810T0076
4. ตู้อบเครื่องแก้ว	Labtech	UM100
5. หลอดยูวี (UV lamp)	Boyu	UV-6W
6. เครื่องระเหยตัวทำละลายแบบลดความดัน (rotary evaporator) ชนิด diaphragm pump	Buchi	R-124
7. บีมสูญญากาศ	Vacuu brand	DC24
8. บีมสูญญากาศสมรรถนะสูง (high vacuum pump)	LAX	Serial E2M5 53954
9. เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance : (NMR) ความถี่ 400 MHz	Bruker	Advance 400
10. เครื่อง UV-Visible Spectroscopy ชนิดควบคุมอุณหภูมิได้	(Varian, Inc., USA)	CARY 100 Bio

2.1.3 สารเคมี

สารเคมี (MW g/mol)	บริษัท
1. Methyl tosylate; C ₈ H ₁₀ O ₃ S (MW=186.23)	Fluka
2. Triphenyl phosphine; C ₁₈ H ₁₅ P (MW=262.29)	Fluka
3. Tetrahydrofuran; C ₄ H ₈ O (MW=72.11)	Merck
4. Propanoic anhydride; (CH ₃ CH ₂ CO) ₂ O (MW=130.14)	Aldrich
5. Diisopropyl azodicarboxylate; C ₈ H ₁₄ N ₂ O ₄ (MW=202.21)	Wilmad
6. Hexane; C ₆ H ₁₄ (MW=86.18)	Zenpoint
7. Ethyl acetate; C ₄ H ₈ O ₂ (MW=88.11)	RCI Labscan
8. Benzophenone hydrazine; C ₁₃ H ₁₂ N ₂ (MW=196.25)	Acros organics
9. Dimethyl Formamide; C ₃ H ₇ NO (MW=73.09)	Labscan
10. <i>p</i> -Toluenesulfonic acid; C ₇ H ₈ O ₃ S (MW=190.22)	Fluka
11. Acetonitrile; C ₂ H ₃ N (MW=41.05)	Labscan
12. Potassium permanganate; KMnO ₄ (MW=158.03)	Rankem
13. Di- <i>tert</i> -butyldicarbonate; C ₁₀ H ₁₈ O ₅ (MW=218.25)	Fluka
14. <i>tert</i> -Butyl alcohol; C ₄ H ₁₀ O (MW=74.12)	Ajax Finechem
15. Aluminium oxide; Al ₂ O ₃ (MW=101.96)	Scharlau
16. Potassium Carbonate; K ₂ CO ₃ (MW=138.21)	ศึกษาภัณฑ์พานิชย์
17. Diisopropylethylamine; C ₈ H ₁₉ N (MW=129.2)	Wilmad
18. Trifluoroacetic acid; C ₂ HF ₃ O ₂ (MW=114.02)	Merck
19. Dichloromethane; CH ₂ Cl ₂ (MW=84.93)	RCI Labscan
20. Sodium sulfate; Na ₂ SO ₄ (MW=322.20)	ศึกษาภัณฑ์พานิชย์
21. Carbazole; C ₁₂ H ₉ N (MW=167.21)	Sigma
22. 1,2-dichloroethane; C ₂ H ₄ Cl ₂ (MW=98.96)	RCI labscan
23. Fluorenylmethoxycarbonyl chloride; C ₁₅ H ₁₁ ClO ₂ (MW=258.70)	GL Biochem (Shanghai) Ltd

2.2 วิธีการทดลอง

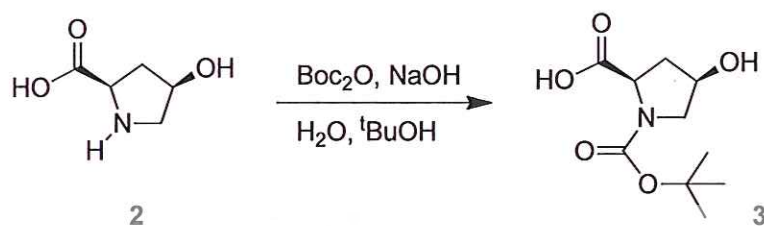
2.2.1 การสังเคราะห์ *cis*-4-hydroxy-D-proline (สาร 2)



นำ *trans*-4-Hydroxy-L-proline (1) (10.0450, 76.60 mmol) ละลายในตัวทำละลาย propionic anhydride (50 mL) ลงในขวดก้นกลม 250 mL ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 140 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออกจนได้ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม นำไปเติม 2 N HCl ปริมาตร 50 mL แล้วนำไปรีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และทำการกำจัดสีโดยการต้มกับผงถ่าน (activated charcoal) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองผงถ่านขณะร้อน และนำสารละลายที่ได้มาระเหยตัวทำละลายออก จะได้ของแข็งสีขาว หนัก 14.2868 g (70% yield) ซึ่งเป็นของผสมของ *trans*-4-Hydroxy-L-proline และ *cis*-4-hydroxy-D-proline หลังจากนั้นนำของแข็งที่ได้ มาละลายในน้ำ 42 mL และ Et₃N 14 mL รวจนสารละลายอุ่นแล้วเติม EtOH 389 mL ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที กรองและล้างตะกอนด้วย EtOH 40-50 mL จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาว หนัก 4.8730 g (49% yield)

¹H NMR (400 MHz, D₂O) (ภาพ A-1) δ_H 2.08-2.12 [m, 1H, 1×CH₂(3')] 2.31-2.38 [m, 1H, 1×CH₂(3')] 3.19-3.32 [m, 2H, CH₂(5')] 4.04-4.07 [m, 1H, CH(4')] 4.42 [br, 1H, CH(2')]
¹³C NMR (100 MHz, D₂O) (Figure A-2) δ_C 36.9 [CH₂(3')] 52.7 [CH₂(5')] 59.3 [CH(4')] 68.9 [CH(2')] 174.4 [COOH]. [α]_D²⁵ = 60.3 (c = 2.00 g/100 mL, H₂O), mp = 250-254 °C.

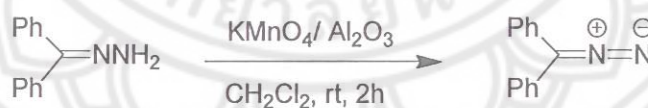
2.2.2 การสังเคราะห์ *N*-*tert*-Butoxycarbonyl-*cis*-4-hydroxy-D-proline (สาร 3)



ซึ่ง *cis*-4-Hydroxy-D-proline (2) (4.8736 g, 21 mmol) ในขวดก้นกลม ละลายด้วย สารละลาย 5% NaOH หลังจากนั้นค่อยๆ หยด Di-*tert*-butyl bicarbonate (Boc_2O) (9.97, 44.6 mmol) ที่ละลายใน *tert*-butanol 25 mL โดยหยดช้าๆ จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีขาวขุ่น และปรับให้เป็นสารละลายเนื้อเดียวอีกครั้งโดยการเติมน้ำและ *tert*-butanol คนสารละลายทิ้งไว้ข้ามคืน และนำไปประเหย *tert*-butanol ออก หลังจากนั้นปรับ pH ของสารละลายให้ได้ประมาณ pH = 2 โดยการเติม NaHSO_3 และทำการสกัดด้วย (EtOAc 30 mL×4) นำชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ไประเหยตัวทำละลาย จะได้ของแข็งสีขาว และทำการตกผลึกด้วย EtOAc 30 mL ผลึกภัณฑ์ที่ได้เป็นของแข็งสีขาว น้ำหนัก 9.5048 g (90%yield)

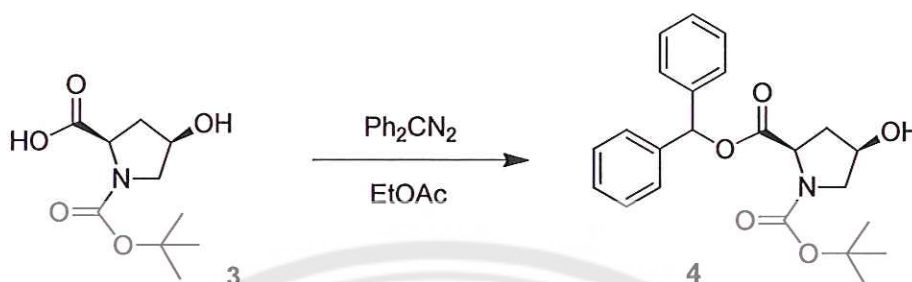
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ_{H} 1.32 [s, 9H, CH_3 Boc] 1.80 [m, 1H, $\text{CH}_2(3')$] 2.30 [m, 1H, $\text{CH}_2(3')$] 3.09 [m, 1H, $\text{CH}_2(5')$] 3.46 [m, 1H, $\text{CH}_2(5')$] 4.07, 4.12 [m, 2H, $\text{CH}(4')$ and $\text{CH}(2')$]

2.2.3 การสังเคราะห์ Diphenyldiazomethane



ซึ่ง Benzophenone hydrazine (5.0 g, 25.5 mmol) 5 g ละลายในตัวทำละลาย CH_2Cl_2 (25 mL) ลงในขวดก้นกลมขนาด 500 mL โดยห่อฟอยด์ขวดก้นกลมเพื่อป้องกันแสง เตรียม KMnO_4 (7.9 g, 50 mmol) ผสมกับ Al_2O_3 (25 g, 245 mmol) แล้วค่อยๆ เติมน้ำลงไปเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ให้รินสารละลายถ่ายใส่ภาชนะอีกอันหนึ่ง นำสารละลายไประเหยตัวทำละลายโดยไม่ต้องให้ความร้อน จะได้ผลึกภัณฑ์เป็นสารละลายชั้นสีม่วง และนำไปแช่ตู้เย็นที่อุณหภูมิ $-20\text{ }^\circ\text{C}$ เพื่อนำไปใช้ในปฏิกิริยาต่อไป โดยไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์และการตรวจสอบเอกลักษณ์

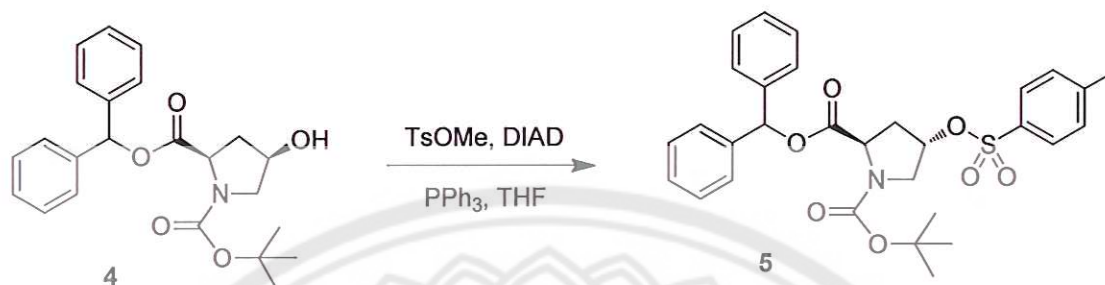
2.2.4 การสังเคราะห์ *N*-*tert*-Butoxycarbonyl-*cis*-4-hydroxy-D-proline diphenylmethyl ester
(สาร 4)



ตั้ง *N*-*tert*-Butoxycarbonyl-*cis*-4-hydroxy-D-proline (3) (9.504 g, 41 mmol) ลงในขวดก้นกลมที่ห่อฟอยล์ ละลายด้วย EtOAc และนำไปแช่ในอ่างน้ำเย็น หลังจากนั้นค่อยๆ หยด Ph_2CN_2 ที่ละลายใน EtOAc เล็กน้อยลงไปเรื่อยๆ จนได้สารละลายสีชมพูม่วงคงที่และไม่เกิดฟองเกิดขึ้น และคนสารละลายต่อ ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นใสไม่มีสี ให้เติม Ph_2CN_2 เพิ่มจนกระทั่งได้สารละลายสีชมพูม่วงคงที่ หลังจากนั้นนำไปประเหยตัวทำละลายออก จะได้เป็นของเหลวหนืดและเติม Hexane ลงไปประมาณ 350 mL จะเกิดตะกอนสีขาวเกิดขึ้น และใช้แท่งแก้วคนบดให้ละเอียดแล้วนำไปแช่ตู้เย็นทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง กรองตะกอน จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาว 12.1209 g (74% yield)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO): δ_{H} 1.18, 1.40 [2×s, 9H, CH_3 Boc rotamers] 1.98 [t, $J=8.4$ Hz, 1H, $1\times\text{CH}_2(3'')$] 2.16-2.33 [m, 1H, $1\times\text{CH}_2(3'')$] 3.47-3.55 [m, 2H, $\text{CH}_2(5'')$] 4.24 [m, 1H, CH(4'')] 4.34, 4.40 [dd, $J=23.6, 6.2$ Hz, 1H, CH(2'')] 6.81, 6.88 [2×s, 1H, CHPh₂ rotamers] 7.25 [m, 10H, phenyl CH]

2.2.5 การสังเคราะห์ *N*-*tert*-Butoxycarbonyl-*trans*-4-tosyl-D-proline diphenylmethyl ester (สาร 5)



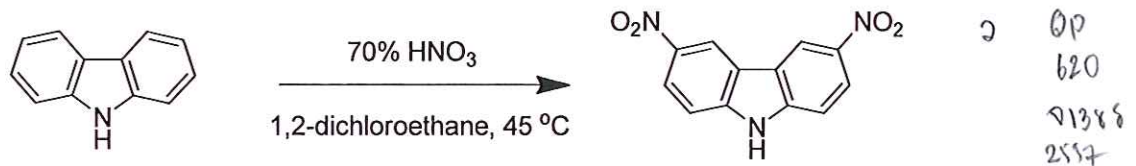
ซึ่ง *N*-Boc-4-hydroxy-D-proline diphenylmethyl ester (4) (4.6523 g, 11.7 mmol) และ triphenylphosphine (PPh₃) (3.9542 g, 15 mmol) ในตัวทำละลาย tetrahydrofuran (THF) ที่ปราศจากน้ำ 20 mL ในขวดก้นกลมขนาด 250 mL ภายใต้ความดันบรรยากาศไนโตรเจน โดยคนด้วยเครื่อง Magnetic stirrer จนสารละลายหมด จากนั้นลดอุณหภูมิมาที่ 0 °C โดยใช้อ่างน้ำแข็ง หลังจากนั้นเติม methyl tosylate (TsOMe) (1.90 mL, 15 mmol) และ diisopropyl azodicarboxylate (DIAD) (3.0 mL, 15 mmol) ซ้ำๆ ผ่านทางกระบอกฉีดยา คนสารละลายข้ามคืน แล้วติดตามปฏิกิริยาด้วยทินแลย์โครมาโตกราฟีโดยใช้ 4:6 EtOAc:Hexane เมื่อสารตั้งต้นหมดจึงหยุดปฏิกิริยาโดยนำไประเหยตัวทำละลายให้ได้ของเหลวเหนียว (ในขั้นระเหยตัวทำละลายไม่ควรให้แห้งเป็นของแข็ง ถ้าเป็นของแข็งจะทำให้ต้องใช้ EtOH ในขั้นตอนการตกผลึกมาก เพราะจะละลายได้ยาก โดยถ้าเป็นของแข็งให้เติม CH₂Cl₂ แล้วนำไประเหยตัวทำละลายออก จะได้ลักษณะเป็นน้ำมัน) แล้วจึงนำมาตกผลึกใน EtOH โดยการต้ม EtOH 50 mL ให้เดือด แล้วจึงนำมาละลายสารที่ได้ หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้จนได้ของแข็ง และทำการกรองผลึก ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นของแข็งสีขาว น้ำหนัก 4.4445 g (70%yield)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ_H 1.22-1.58 [m, 9H, 3xCH₃ Boc] 2.41 [s, CH₃ OTs] 3.68-3.77 [m, 2H, CH(4') proline] 4.52, 4.40 [dd, 1H, CH₂(1') proline] 5.05-5.07 [m, 1H, CH(3') proline] 6.83 [s, 1H, CH ODpm] 7.56-7.62 [m, 14H, CH Benzene]

i 6833160
15 ก.ย. 2558



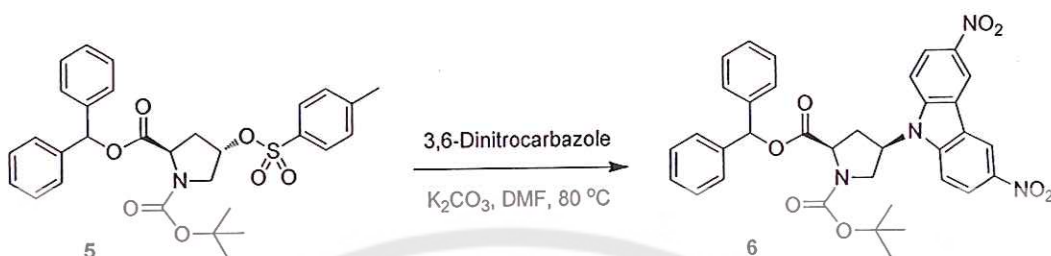
2.2.6 การสังเคราะห์ 3,6-Dinitrocarbazole



ชั่ง Carbazole (1.093 g, 5.98 mmol) ลงในขวดก้นกลมขนาด 25 mL ละลายในตัวทำละลาย 1,2-dichloroethane 5 mL คนด้วยเครื่อง Magnetic stirrer จนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นลดอุณหภูมิมาที่ 10°C ด้วยการแช่ในอ่างน้ำแข็ง และเติม 70% HNO₃ (3 mL, 32.9 mmol) โดยเจือจางใน 1,2-dichloroethane ปริมาณที่เท่ากันและเติมลงในสารผสมที่ละหยดเป็นเวลานานน้อยกว่า 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 45°C ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมินี้เป็นเวลา 3.5 ชั่วโมง ลดอุณหภูมิลงมาที่อุณหภูมิห้อง และเติมน้ำกลั่นจนเกิดตะกอนแล้วจึงกรองตะกอนที่เกิดขึ้นและล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง ตะกอนที่ได้ทำให้บริสุทธิ์โดยละลายในสารละลาย 0.85 กรัม KOH:EtOH (10 mL) และ น้ำกลั่น (10 mL) คนจนสารละลายเปลี่ยนสีเป็นสีแดง แล้วคนสารละลายต่ออีกประมาณ 30 นาที และกรองสารละลาย สารละลายที่ได้จากการกรองเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นจนเกิดตะกอนสีเหลืองขึ้น กรองและล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น หลังจากนั้นทำให้แห้งด้วยปั๊มสุญญากาศ (high vacuum pump) ถ้าผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้เกิด 3-nitrocarbazole ทำการแยกโดยละลายใน toluene ให้ความร้อนจนสารละลายเดือดทำการกรองขณะร้อนจะได้ตะกอน 3,6-dinitrocarbazole ทำให้แห้ง ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง ได้ผลผลิตน้ำหนัก 0.8300 g (54% yield) และพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค NMR

¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ_H 7.75 [d, J=9.2 Hz, 2H, CH(1',8')] 8.38 [dd, J=9.2, 2.4 Hz, 2H, CH(2',7')] 9.48 [d, J=2.4 Hz, 2H, CH(4',5')]

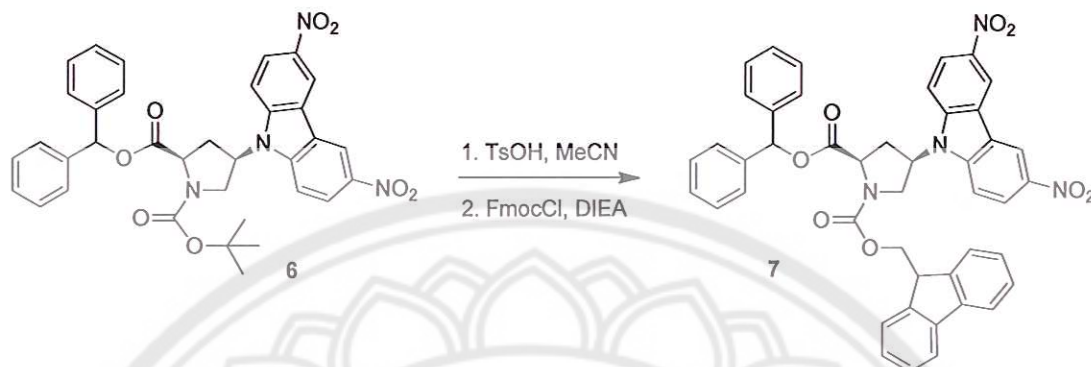
2.2.7 การสังเคราะห์ *N-tert*-Butoxycarbonyl-*cis*-3,6-dinitrocarbazole-D-proline diphenylmethyl ester (สาร 6)



ซึ่ง *N-tert*-Butoxycarbonyl-*trans*-4-tosyl-D-proline diphenylmethyl ester (5) (0.505 g, 1.0 mmol) 3,6-dinitrocarbazole (0.260 g, 1.0 mmol) และ K_2CO_3 (0.691 g, 5 mmol) ที่ผ่านการเผาไล่ความชื้น ละลายใน DMF 5 mL ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน ให้ความร้อนที่ $80\text{ }^{\circ}C$ เป็นเวลา 9 ชั่วโมง ติดตามปฏิกิริยาด้วยทินแลย์โครมาโตกราฟีโดยใช้ตัวทำละลาย Hexane:EtOAc 2:1 และหยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลาย 5% HCl จะเกิดของแข็งสีเหลือง หลังจากนั้นนำตะกอนที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เริ่มจาก 10% EtOAc ใน Hexane ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน น้ำหนัก 0.085 g (13%yield) และนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย 1H -NMR

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ_H 1.42, 1.50 [m, 9H, $3 \times CH_3$ Boc rotamer] 2.65 [m, 1H, CH(3') proline] 2.84 [m, 1H, CH(3') proline] 4.04-4.16 [m, 2H, CH(5') proline] 4.62-4.72 [m, 1H, CH(4') proline] 5.39-5.41 [m, 1H, CH_2 (2') proline] 6.98 [d, $J=20.1$ Hz, 1H, CHPh₂ Dpm] 7.21-7.32 [m, 10H, CH Aromatic Dpm] 7.44 [d, $J=9.1$ Hz, 2H, CH(1,8) DNC] 8.17 [d, $J=8.7$ Hz, 2H, CH(2,7) DNC] 8.97 [d, $J=1.8$ Hz, 2H, CH(4,5) DNC]

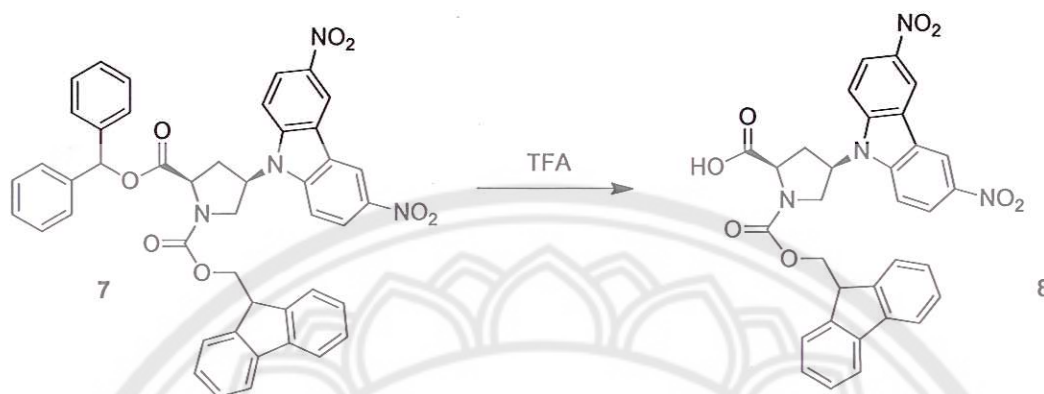
2.2.8 การสังเคราะห์ (*N*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*cis*-3,6-Dinitrocarbazole-D-proline diphenylmethyl ester (สาร 7)



เตรียม *N*-*tert*-Butoxycarbonyl-*cis*-3,6-dinitrocarbazole-D-proline diphenylmethyl ester (0.2018 g, 0.3166 mmol) ละลายใน MeCN 5 mL หลังจากนั้นเติม *p*-Toluenesulfonic acid (0.150 g, 0.7915 mmol) และตามปฏิกิริยาด้วย TLC โดยใช้ Hexane:EtOAc 2:1 เป็นเฟสเคลื่อนที่ พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 5 ชั่วโมง ปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ โดยสังเกตจากจุดสารตั้งต้นหายไป จนหมด นำมาเติม diisopropylethylamine (0.1937 g, 1.1081 mmol) และ Fmoc-Cl (81.9 mg, 0.3166 mmol) พบว่าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลืองน้ำตาล หลังจากนั้นติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 1 ชั่วโมง ปฏิกิริยาเกิดขึ้นสมบูรณ์ จึงระเหยตัวทำละลายออกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีโดยใช้ตัวทำละลายเป็น Hexane:EtOAc 4:1 และนำไปใช้ในปฏิกิริยาขั้นต่อไป

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ_{H} 2.63-2.86, 2.87-3.09 [br, 2H, $\text{CH}(3')$ proline] 4.03-4.37 [m, 2H, $\text{CH}(4')$ proline & CH Fmoc] 4.53-4.83 [br, m, 4H, $\text{CH}(5')$ proline & CH_2 Fmoc] 5.51 [br, 1H, $\text{CH}(2')$ proline] 7.03 [m, 1H, CHPh_2 Dpm] 7.74 [s, 2H, $\text{CH}(1,8)$ DNC] 7.12-7.63 [m, 18H, CH Aromatic of Dpm & CH Aromatic Fmoc] 8.26 [dd, $J=27.6, 6.8$ Hz, 2H, $\text{CH}(2,7)$ DNC] 9.04 [s, 2H, $\text{CH}(4,5)$ DNC]

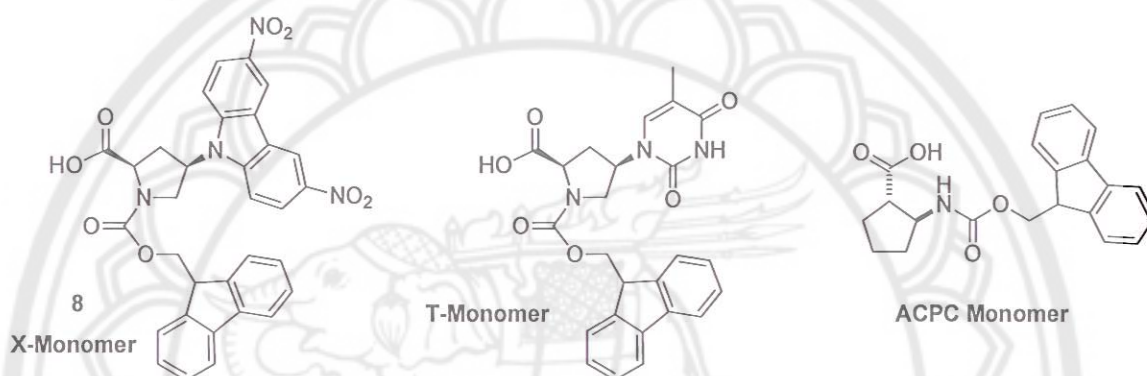
2.2.9 การสังเคราะห์ (*N*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*cis*-3,6-dinitrocarbazole-D-proline
(สาร 8)



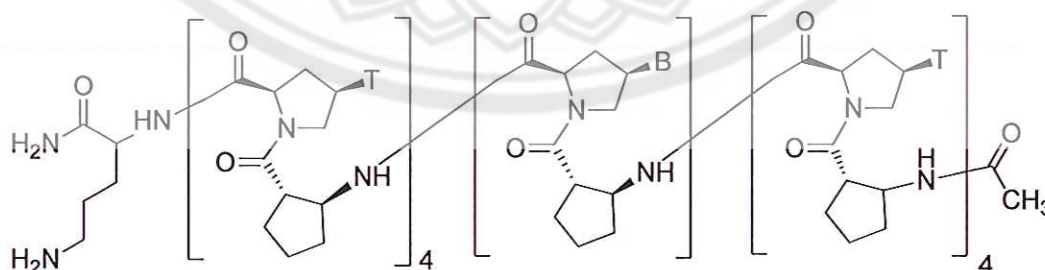
สารละลายของสาร (7) ที่เริ่มต้นจากสาร (6) (0.2018 g , 0.3166 mmol) นำมาเติม diisopropylethylamine (0.1937 g, 1.1081 mmol) และ Fmoc-Cl (81.9 mg, 0.3166 mmol) พบว่าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลืองน้ำตาล หลังจากนั้นติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 1 ชั่วโมง ปฏิกิริยาเกิดขึ้นสมบูรณ์ จึงระเหยตัวทำละลายออกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีโดยใช้ตัวทำละลายเป็น Hexane:EtOAc 4:1 หลังจากนั้นนำสารที่แยกได้มาละลายใน anisole, TFA และ CH_2Cl_2 ในอัตราส่วน 1:4:4 (2 mL) เขย่าเป็นครั้งคราวเป็นเวลา 30 นาที เมื่อปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ ติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC โดยใช้สารละลาย Hexane: EtOAc 2:1 เป็นเฟสเคลื่อนที่ หลังจากนั้นนำไปเป่าระเหยสารระเหยด้วยแก๊สไนโตรเจนจนได้ลักษณะสารหนืด หลังจากนั้นล้างด้วยอีเทอร์ จะได้ตะกอนของแข็งสีเหลืองอ่อนน้ำหนัก 0.033 g (31%yield)

2.3 การสังเคราะห์เพปไทด์บนวิฎภาคของแข็ง

ในการสังเคราะห์เพปไทด์บนวิฎภาคของแข็งนั้น ในงานวิจัยนี้จะสังเคราะห์สาย acpcPNA ความยาว 9 เบส (P1) ที่มีเบส 3,6-dinitrocarbazole อยู่ตำแหน่งกลางระหว่างเบสไทมีน (T_4XT_4 , X = DNC) ซึ่งสามารถสังเคราะห์ได้ตามวิธีในเอกสารอ้างอิง [24,25] โดยใช้สาร (8) (X-monomer), T-monomer (B = T) and Fmoc-(1S,2S)-aminocyclopentane carboxylic acid (ACPC spacer) เป็นมอนอเมอร์ แสดงดังภาพ โดยการสังเคราะห์เพปไทด์บนวิฎภาคของแข็งนั้น ได้ขอความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือและพื้นที่จาก ศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



จะได้สาย PNA P1 ($Ac-T_4XT_4-LysNH_2$, X = DNC) หลังจากทีปลดออกจากวิฎภาคของแข็งด้วย TFA/anisole แล้ว นำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย RP-HPLC Water 600TM โดยใช้ ACE 5 C18-AR HPLC column, 3 μ m particle size 150 X 4.6 mm และทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย MALDI-TOF mass spectrometry ด้วยเครื่อง Microflex MALDI-TOF mass spectrometry (Bruker Daltonics) และใช้เมทริกซ์เป็น α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid (CCA) ที่ละลายในสารละลาย Trifluoroacetic acid ใน acetonitrile:water (1:2)



2.4 การศึกษาการจับยึดของพีเอ็นเอกับดีเอ็นเอ

การทดลองนี้เป็นการศึกษาสมบัติการจับยึดของพีเอ็นเอที่สังเคราะห์ขึ้นกับกรดนิวคลีอิก ได้ดำเนินการที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ภายใต้ความอนุเคราะห์ของศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์ โดยโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ DNA A₄YA₄ (เมื่อ Y = A, T, C หรือ G) นั้นซื้อมาจาก Biodesign (Bangkok, Thailand) การศึกษาความเสถียรของสารเชิงซ้อนระหว่าง PNA:DNA โดยการวัด Melting temperature (T_m) ใช้เครื่อง CARY 100 Bio UV-Visible spectrophotometer (Varian, Inc., USA) ที่มีการติดตั้ง thermal melt system ในการทดลองกำหนดอัตราส่วนความเข้มข้นระหว่าง PNA:DNA เป็น 1:1 ที่ 2 μ M ในสารละลายบัฟเฟอร์ 10 mM sodium phosphate pH 7.0 มีอัตราการ heating rate ที่ 1 $^{\circ}$ C/นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm ในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 29-90 $^{\circ}$ C.

สำหรับค่าอุณหภูมิที่บันทึกได้จะต้องนำมาคูณ correction factor ของเครื่องมือ โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{Correct Temp.} = (0.9696 \times T_{\text{block}}) - 0.8396$$

ส่วนค่าการดูดกลืนแสง (Abs_{obs}) จะถูกเปลี่ยนเป็นค่า Normalized Abs ที่ใช้ในการเปรียบเทียบ

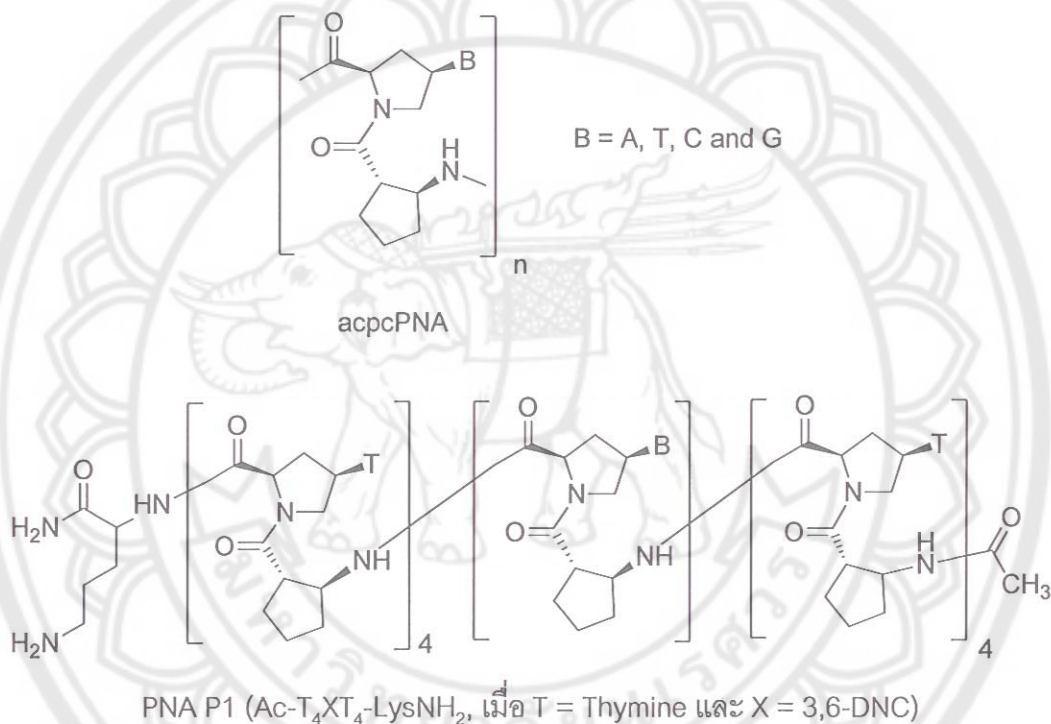
$$\text{Normalized Abs.} = \frac{\text{Abs}_{\text{obs}}}{\text{Abs}_{\text{init}}}$$

ค่าอุณหภูมิหลอมเหลวที่จรรยาณาจากการพล็อตกราฟระหว่าง Correct Temp. กับ Normalized Abs จะได้กราฟรูปตัวเอส และหาค่าอุณหภูมิหลอมเหลวจากกราฟที่มีความชันสูงสุดของอนุพันธ์ลำดับที่ 1 โดยใช้โปรแกรม KaleidaGraph 3.6 (Synergy Software) และ Microsoft Excel

บทที่ 3

ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

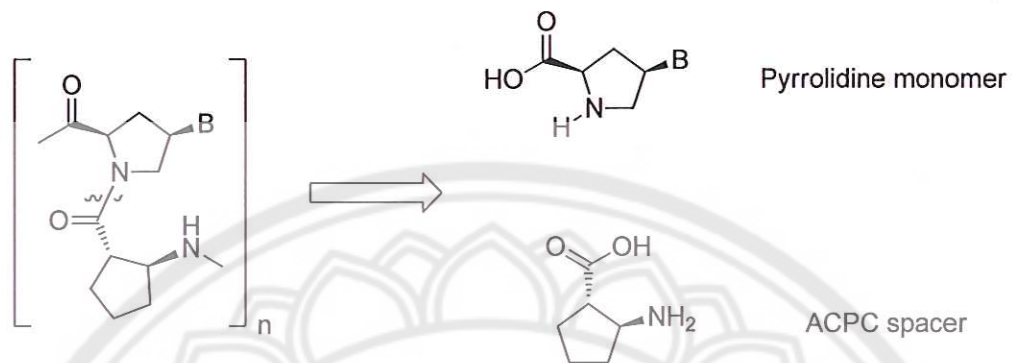
ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาการสังเคราะห์ acpcPNA ที่มีเบส 3,6-dinitrocarbazole (3,6-DNC) อยู่ในตำแหน่งกลางระหว่างเบสไทมีน (T_4XT_4 , X = DNC) ซึ่งพัฒนามาจาก acpcPNA เดิม โดยการเปลี่ยนเบสที่ตำแหน่งกลางเป็นเบสชนิด 3,6-dinitrocarbazole แสดงดังภาพ 3.1 เพื่อศึกษาสมบัติการเป็นยูนิเวอร์ซอลเบสของ 3,6-dinitrocarbazole



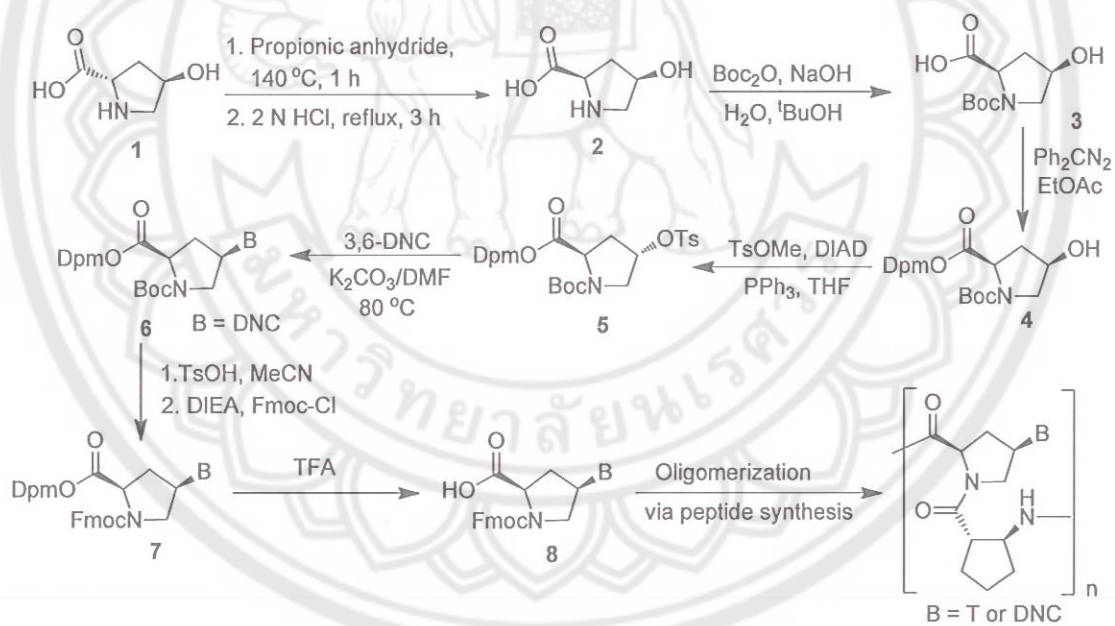
ภาพ 3.1 โครงสร้างของ acpcPNA และ PNA P1 ที่สังเคราะห์ขึ้นในงานวิจัยนี้

แผนการออกแบบและการสังเคราะห์ PNA P1 แสดงดังภาพ 3.2 โดยสาย PNA จะแบ่งเป็นสองส่วน คือ ส่วนบนมาจากส่วนของวงพิโรลิดีน ซึ่งจะมีเบส (B) ต่ออยู่ ซึ่งในงานวิจัยนี้จะใช้สองชนิด คือ T-monomer (B = T) และ X-monomer (B = 3,6-DNC) และส่วนล่างมาจาก (1S,2S)-2-aminocyclopentanecarboxylic acid (ACPC spacer) โดย T-monomer และ ACPC spacer ได้รับความอนุเคราะห์จากหน่วยวิจัยของ ศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์ และหลังจากนั้นจะนำทั้งสองส่วนนี้จะนำมาเชื่อมต่อกันด้วยการสังเคราะห์เพปไทด์บนวัฏภาคของแข็ง ให้ได้ความยาวของ

เบสตามที่กำหนด โดยการสังเคราะห์ X-monomer จะเริ่มจาก *trans*-4-hydroxy-L-proline (1) เป็นสารตั้งต้นตามแผนภาพการสังเคราะห์ แสดงดังภาพ 3.3



ภาพ 3.2 acpcPNA ที่สังเคราะห์มาจาก pyrrolidine monomer และ ACPC spacer



ภาพ 3.3 แผนภาพการสังเคราะห์ X-monomer เพื่อนำไปใช้สังเคราะห์เป็น PNA P1

3.1 การสังเคราะห์ *N-tert*-Butoxycarbonyl-*trans*-4-tosyl-D-proline diphenylmethyl ester

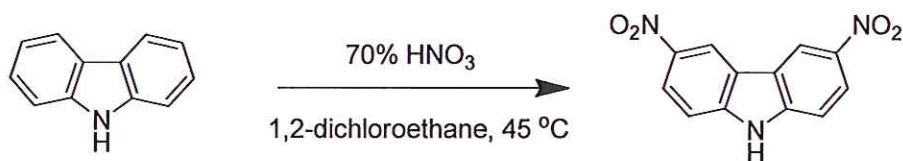
(สาร 5)

สำหรับสาร 5 นั้นเป็นสารมัธยันตร์ที่สำคัญในการนำไปสังเคราะห์เป็น X-monomer หรือสาร 8 ซึ่งสาร 5 นี้สามารถสังเคราะห์ได้ตามแผนภาพ 3.2 โดยใช้วิธีตามเอกสารอ้างอิง [23-24] โดยเริ่มจาก *trans*-4-hydroxy-L-proline (สาร 1) ซึ่งเป็นสารที่มีจำหน่าย เป็นสารตั้งต้น นำมาทำปฏิกิริยา Epimerization ด้วย propionic anhydride ที่อุณหภูมิ 140°C และไฮโดรไลซิสด้วยสารละลาย 2N HCl เพื่อเปลี่ยนคอนฟิกูเรชันจาก *trans*-L-Hydroxyproline เป็น *cis*-D-Hydroxyproline เพราะเป็นสเตอริโอเคมีที่เหมาะสมในการจับยึดกับกรดนิวคลีอิก ได้ผลผลิต 49% yield ในขั้นตอนนี้จะพิสูจน์เอกลักษณ์สารด้วย ¹H NMR และวัดด้วยเครื่องโพลาไรมิเตอร์เพื่อยืนยันว่าได้สารผลิตภัณฑ์ที่มีคอนฟิกูเรชันตามที่ต้องการ [α]_D²⁵ = 60.3 (c = 2.00 g/100 mL, H₂O)

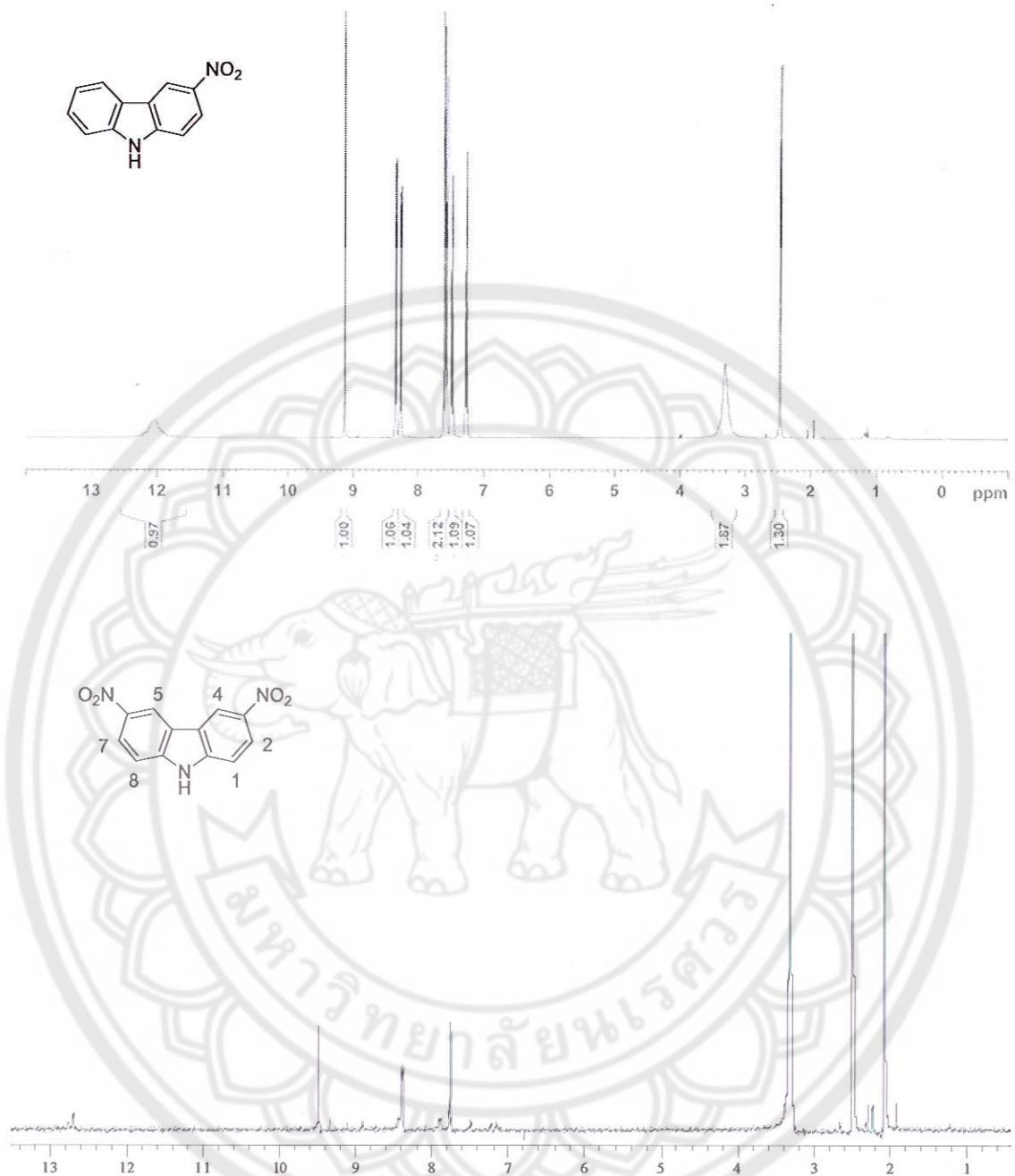
หลังจากนั้นจึงนำมาปกป้องหมู่เอมิโนและหมู่คาร์บอกซิลิก ด้วยหมู่ Boc และ Dpm ตามลำดับ โดยได้ผลผลิตร้อยละ 90 และ 74 ตามลำดับ และนำมาเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซี (-OH) ที่ตำแหน่ง 4' ให้เป็นหมู่ tosylate (-OTs) แบบมีการกลับคอนฟิกูเรชัน (inversion of configuration) เนื่องจากในกลไกการเกิดปฏิกิริยาจะเห็นว่า การแทนที่ของนิวคลีโอไฟล์ (MeOTs) จะเป็นการแทนที่แบบ inversion ทำให้ configuration ของสาร (4) จากเดิมที่เป็น (2*R*,4*R*) จะกลายเป็น (2*R*,4*S*) ในสาร (5) ด้วยปฏิกิริยา Mitsunobu โดยใช้ triphenyl phosphine (PPh₃), diisopropyl azodicarboxylate (DIAD) และ methyl-4-toluene sulfonate (MeOTs) ในตัวทำละลาย THF ที่ปราศจากน้ำ และดำเนินปฏิกิริยาภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน ในขั้นนี้จะได้ผลิตภัณฑ์เป็น *trans*-*N*-Boc-4-tosyl-D-proline diphenylmethyl ester (สาร 5) ได้ผลิตภัณฑ์ร้อยละ 70 และนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการเตรียมสาร (6) ต่อไป

3.2 การสังเคราะห์ *N-tert*-Butoxycarbonyl-*cis*-3,6-dinitrocarbazole-D-proline diphenyl methyl ester (สาร 6)

หลังจากที่เตรียมสาร (5) ได้แล้ว ในขั้นต่อมาจะเป็นการเตรียมสาร (6) ซึ่งเป็น X-monomer ที่จะใช้แทรกลงในสาย PNA โดยจะทำปฏิกิริยากับ 3,6-dinitrocarbazole ภายใต้สภาวะเบส ซึ่งจะต้องเตรียม 3,6-dinitrocarbazole [25] ขึ้นมาก่อน โดยเริ่มต้นจาก carbazole ทำปฏิกิริยาไนเตรชัน (nitration) กับสารละลายกรดไนตริก 70% ใน 1,2-dichloroethane ที่อุณหภูมิ 45°C



โดยในปฏิกิริยานี้ อาจจะมีผลิตภัณฑ์ข้างเคียงเกิดขึ้น คือ 3-nitrocarbazole ซึ่งสามารถกำจัดได้โดยการตกผลึกใน toluene จะได้ผลิตภัณฑ์เป็น 3,6-dinitrocarbazole มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง และพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ พบว่ามีการแทนที่ของหมู่ไนโตรที่ตำแหน่ง 3 และ 6 ซึ่งอยู่ในตำแหน่งพารา (*para*-substitution) ของหมู่อะมิโน (-NH-) ซึ่งเป็นหมู่แทนที่แบบให้อิเล็กตรอน (electron donating group; *o,p*-directing substituent) โดยพบว่าการหายไปของสัญญาณโปรตอนตำแหน่ง 3 และ 6 ในขณะที่สัญญาณโปรตอนตำแหน่ง 4,5- เป็นแบบ doublet ($J = 2.4$ Hz) เกิดจากการ coupling กับโปรตอนตำแหน่ง 2 และ 7 (long range coupling) ส่วนสัญญาณโปรตอนตำแหน่ง 2,7- เป็นแบบ double doublet (dd) ($J = 2.4, 9.2$ Hz) เกิดจากการ coupling กับโปรตอนตำแหน่ง 1 และ 8 ($J = 9.2$ Hz) และการ coupling กับโปรตอนตำแหน่ง 4 และ 5 ($J = 2.4$ Hz) และสัญญาณโปรตอนตำแหน่ง 1,8- เป็นแบบ doublet ($J = 9.2$ Hz) เกิดจากการ coupling กับโปรตอนตำแหน่ง 2 และ 7 และจากข้อมูลจะเห็นว่าพบสัญญาณของโปรตอน 3 ชุด ซึ่งเกิดจากความสมมาตรของโมเลกุล โดยโปรตอนตำแหน่ง 1 จะสมมาตรกับโปรตอนตำแหน่ง 8 โปรตอนตำแหน่ง 2 จะสมมาตรกับโปรตอนตำแหน่ง 7 และโปรตอนตำแหน่ง 3 จะสมมาตรกับโปรตอนตำแหน่ง 6 จึงทำให้สามารถสรุปได้ว่า สามารถสังเคราะห์ 3,6-dinitrocarbazole ได้สำเร็จ แสดงดังตาราง 3.1 ซึ่งจะนำไปแทนที่บนวงฟิโรลิดีนต่อไป สำหรับสเปกตรัม NMR ของ 3-nitrocarbazole เปรียบเทียบกับ 3,6-dinitrocarbazole แสดงดังภาพ 3.4 โดย 3-nitrocarbazole จะมีสัญญาณของโปรตอน 7 ชุด ซึ่งเกิดจากไม่ความสมมาตรของโมเลกุล

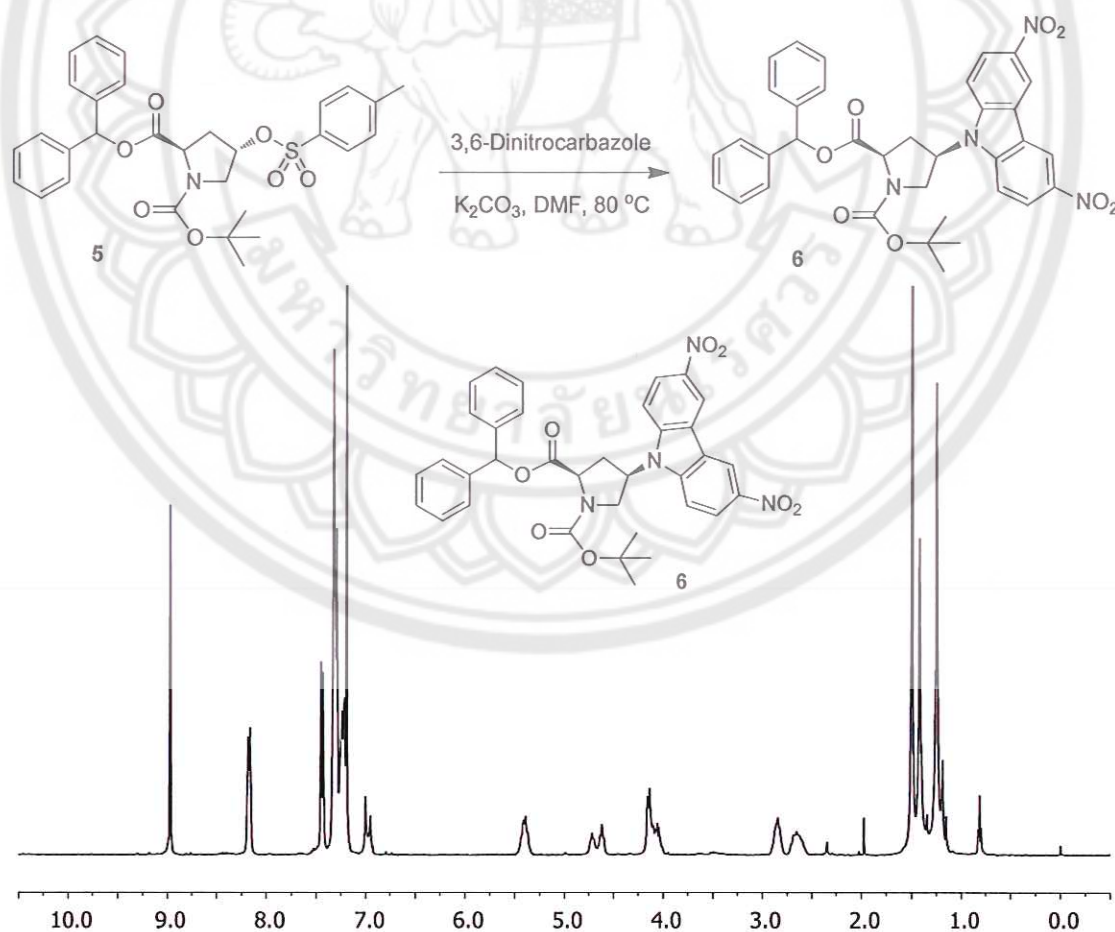


ภาพที่ 3.4 ^1H NMR สเปกตรัมของ 3,6-dinitrocarbazole ในตัวทำละลาย DMSO

ตาราง 3.1 ค่า Chemical shift (δ) ของ 3,6-dinitrocarbazole

ตำแหน่ง	ชนิดโปรตอน	(δ) (ppm)	Splitting	Integration	J (Hz)
1	CH(1',8')	7.75	d	2	9.2
2	CH(2',7')	8.38	dd	2	9.2, 2.4
3	CH(4',5')	9.48	d	2	2.4

ในขั้นต่อไปจะเป็นการสังเคราะห์ *N-tert*-Butoxycarbonyl-*cis*-3,6-dinitrocarbazole-D-proline diphenyl methyl ester (สาร 6) ซึ่งจะเป็นการทำปฏิกิริยา substitution by inversion of configuration โดยการให้สาร 5 กับ 3,6-dinitrocarbazole และใช้ K_2CO_3 เป็นเบส ในตัวทำละลาย DMF ที่อุณหภูมิ $80^\circ C$ โดย 3,6-dinitrocarbazole จะเข้าไปแทนที่หมู่ tosylate (-OTs) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นวงพิโรลิดีนที่มี 3,6-dinitrocarbazole ต่ออยู่ที่ตำแหน่ง C4 ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน (13%yield)

ภาพที่ 3.5 1H NMR สเปกตรัมของสาร (6) ในตัวทำละลาย $CDCl_3$

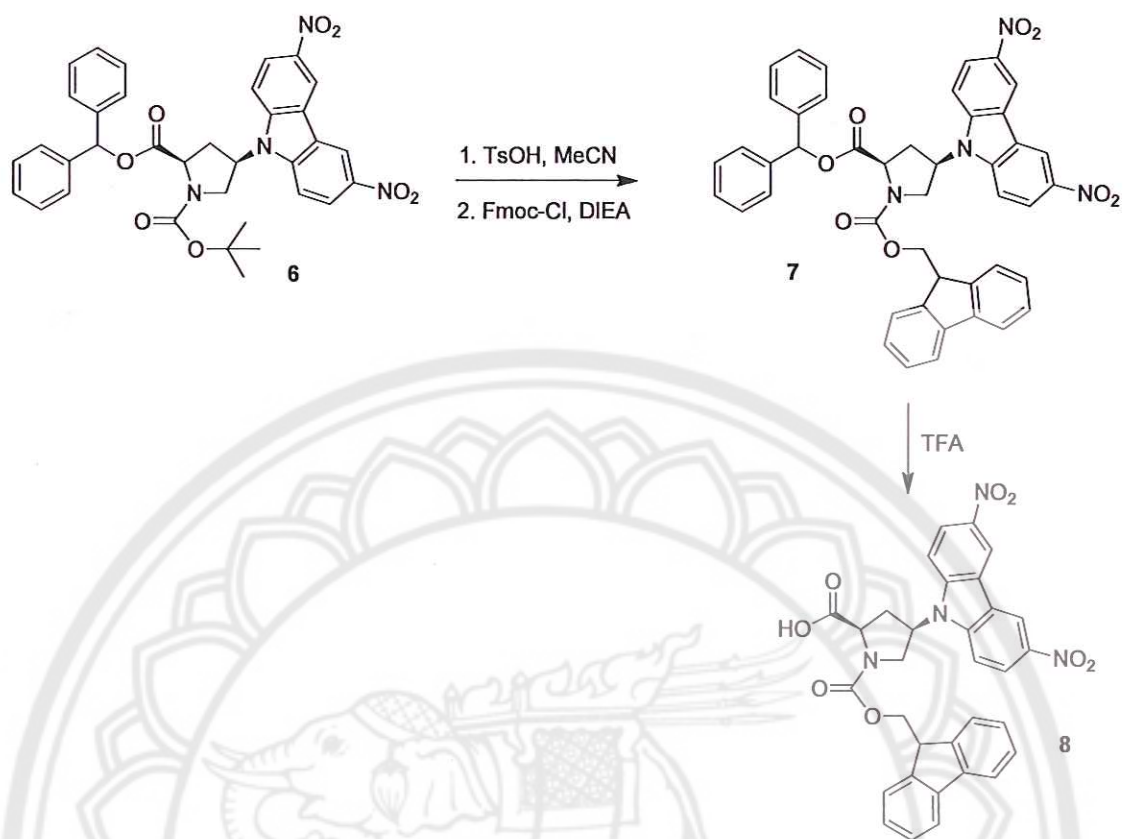
จาก $^1\text{H-NMR}$ จะเห็นว่าสัญญาณค่า chemical shift (δ) ที่บริเวณ 7.56-7.62 ppm ของหมู่ tosylate (-OTs) ได้หายไป และมีสัญญาณของวงเบนซีนของ 3,6-dinitrocarbazole เกิดขึ้นที่บริเวณ 7.44, 8.17 และ 8.97 ppm ซึ่งก็เป็นการยืนยันว่าสามารถสังเคราะห์สาร (6) ได้จริงดังที่แสดงในภาพ 3.5 ค่า chemical shift ทั้งหมดของสาร (6) แสดงในตาราง 3.2

ตาราง 3.2 ค่า Chemical shift (δ) ของสาร (6)

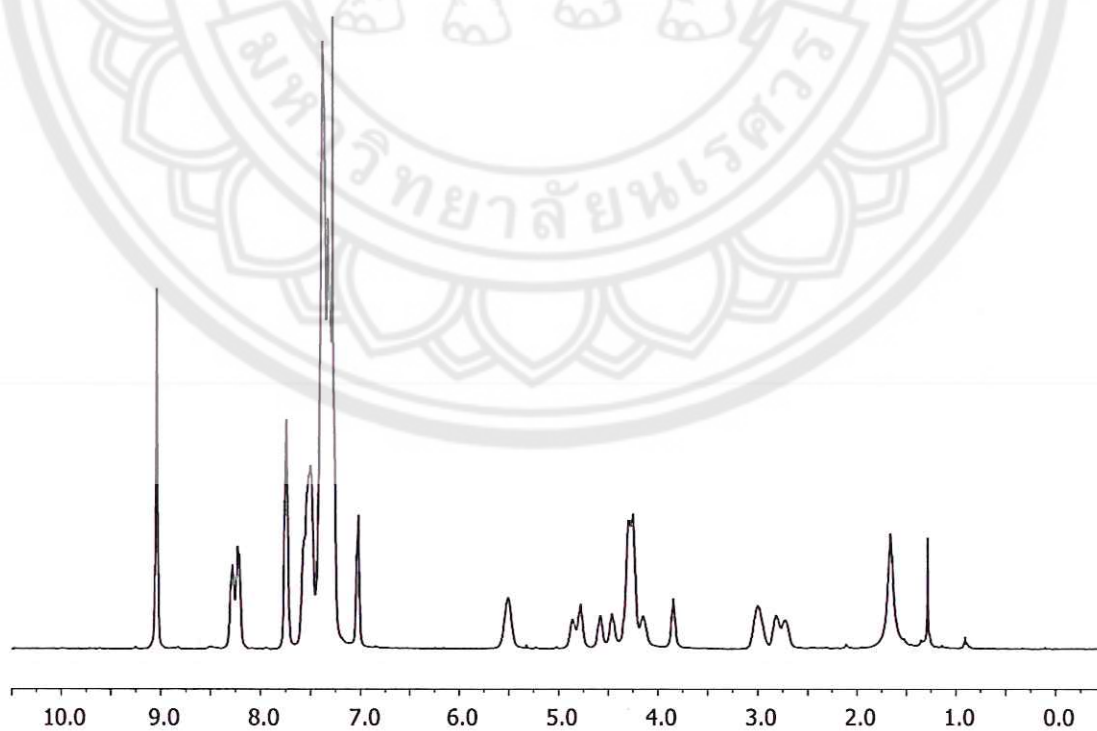
ตำแหน่ง	ชนิดโปรตอน	δ (ppm)	Splitting	Integration	J (Hz)
1	CH_3 Boc	1.42-1.50	m	9	-
2	$\text{CH}(3')$ proline	2.65	m	1	-
3	$\text{CH}(3')$ proline	2.84	m	1	-
4	$\text{CH}_2(5')$ proline	4.04-4.16	m	2	-
5	$\text{CH}(4')$ proline	4.62-4.72	m	1	-
6	$\text{CH}(2')$ proline	5.39-5.41	m	1	-
7	CHPh_2 Dpm	6.98	d	1	20.1
8	CH Aromatic Dpm	7.21-7.32	m	10	-
9	$\text{CH}(1,8)$ DNC	7.44	d	2	9.1
10	$\text{CH}(2,7)$ DNC	8.17	d	2	8.7
11	$\text{CH}(4,5)$ DNC	8.97	d	2	1.8

3.3 การสังเคราะห์ (N-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*cis*-3,6-dinitrocarbazole-D-proline (สาร 8)

ในขั้นตอนต่อไป จะเป็นการสังเคราะห์สาร (8) โดยนำสาร (6) มาทำการปลดหมู่ปกป้องหมู่อะมิโน (-Boc) ให้กลายเป็นหมู่อะมิโนอิสระ (-NH-) และจึงทำการกระตุ้นหมู่อะมิโนดังกล่าวด้วยหมู่ 9-fluorenyl methoxycarbonyl (Fmoc) (สาร 7) และปลดหมู่ปกป้องหมู่คาร์บอกซิล (-Dpm) ให้กลายเป็นหมู่คาร์บอกซิลอิสระ (-COOH) จะได้สาร (8) เพื่อให้อยู่ในรูปพร้อมที่จะนำไปใช้ในการสังเคราะห์เปปไทด์บนวิฏภาคของแข็ง แสดงดังภาพ 3.6



ภาพ 3.6 แนวทางการสังเคราะห์สาร (5)



ภาพที่ 3.7 ^1H NMR สเปกตรัมของสาร (7) ในตัวทำละลาย CDCl_3

จาก $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัม (ภาพ 3.7) ที่สามารถยืนยันโครงสร้างของสาร (7) ได้จากค่า chemical shift (δ) ที่บริเวณ 7.31-7.44 ppm ของหมู่ Dpm ได้หายไป และมีสัญญาณบริเวณ 4.03-4.37, 4.53-4.83 และ 7.12-7.63 ppm ซึ่งแสดงโปรตอนของหมู่ Fmoc CH Fmoc, CH_2 Fmoc และ CH Ar Fmoc ตามลำดับ ซึ่งเป็นการยืนยันว่าสามารถสังเคราะห์สาร (7) ได้จริงตามภาพ 3.7 โดยค่า chemical shift ทั้งหมดของสาร (7) แสดงในตาราง 3.3

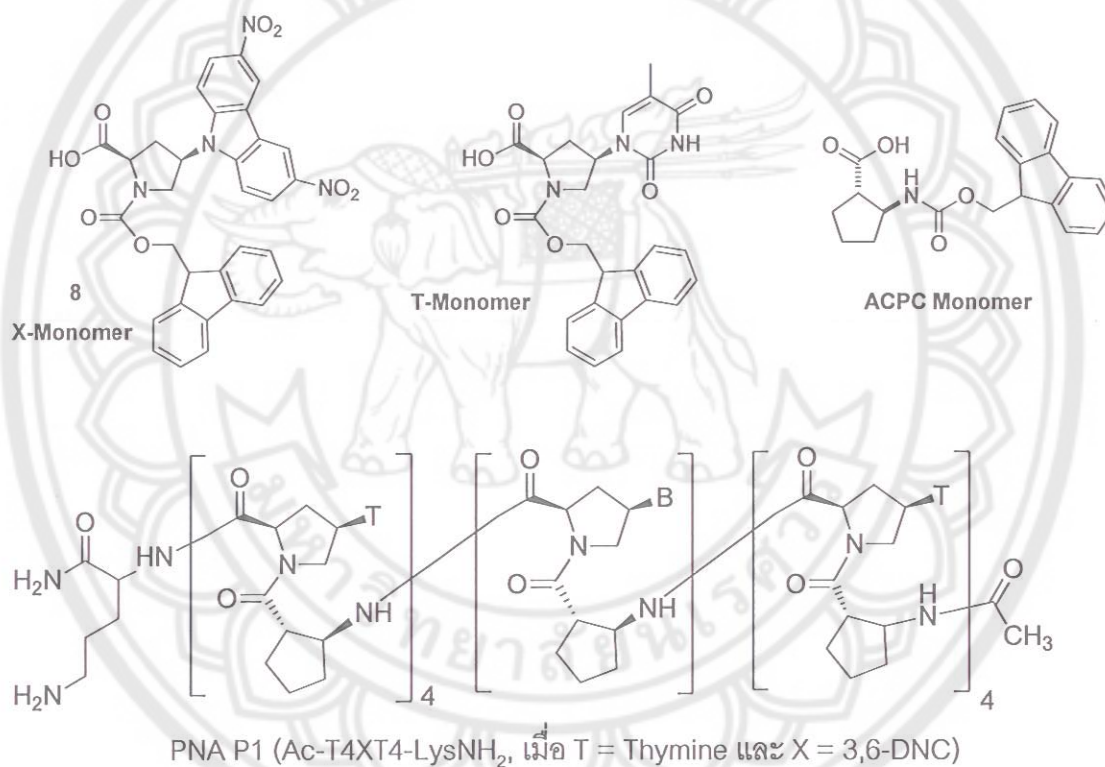
ตารางที่ 3.3 ค่า Chemical shift (δ) ของสาร (7)

ตำแหน่ง	ชนิดโปรตอน	δ (ppm)	Splitting	Integration	J (Hz)
1	CH(3') proline	2.63-2.86 2.87-3.09	m	2	-
2	CH(4') proline, CH Fmoc	4.03-4.37	m	2	-
3	CH(5') proline, CH_2 Fmoc	4.53-4.83	m	4	-
4	CH(2') proline	5.51	m	1	-
5	CHPh_2 Dpm	7.03	m	1	-
6	CH(1,8) DNC	7.74	m	2	-
7	CH Ar Dpm, CH Ar Fmoc	7.12-7.63	m	18	-
8	CH(2,7) DNC	8.26	m	2	-
9	CH(4,5) DNC	9.04	m	2	-

หลังจากนั้นจึงนำสาร 7 ไปปลดหมู่ปกป้องหมู่คาร์บอกซิล (-Dpm) ให้กลายเป็นหมู่คาร์บอกซิลอิสระ (-COOH) โดยใช้ TFA/anisole เป็นรีเอเจนต์ และเป่าไล่ TFA ออกด้วยแก๊สไนโตรเจน จะได้สารลักษณะขุ่นหนืด นำไปเติม diethyl ether จะเกิดตะกอนสีขาวของสาร (8) ซึ่งอยู่ในรูปพร้อมที่จะนำไปใช้ในการสังเคราะห์เพปไทด์บนวัสดุภาคของแข็ง ซึ่งจะได้กล่าวรายละเอียดในหัวข้อต่อไป

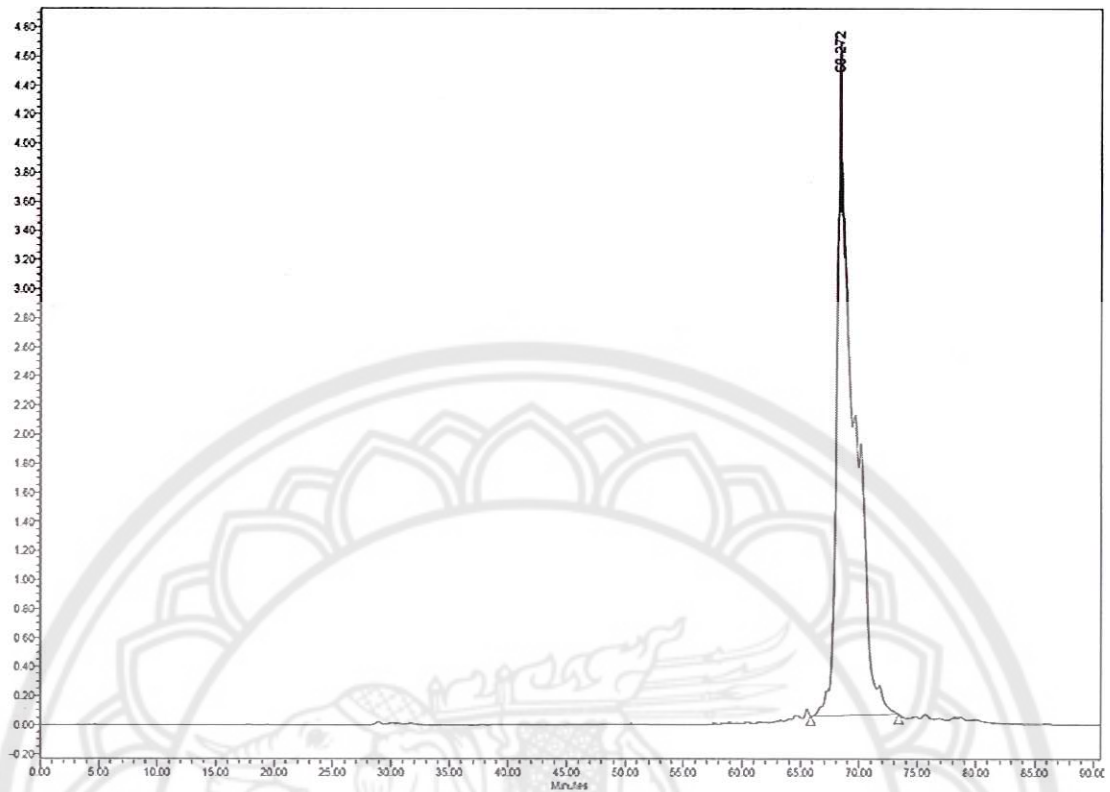
3.4 การศึกษาสมบัติการจับยึดกับกรดนิวคลีอิก

ในงานวิจัยนี้จะสังเคราะห์ PNA P1 (Ac-T4XT4-LysNH₂, เมื่อ T = Thymine และ X = 3,6-DNC) ซึ่งจะใช้ T-monomer, X-monomer (สาร 8) และ ACPC monomer โดยที่ T-monomer, ACPC monomer และ DNA 4 ชนิด ได้แก่ DNA1-4 ที่ใช้ในการวิจัยนี้ที่มาจาก Biodesign (Bangkok, Thailand) ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการของ ศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์ หน่วยวิจัยเคมีอินทรีย์สังเคราะห์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร โดยวิธีการในการสังเคราะห์เพปไทด์บนวัฏภาคของแข็งจะดำเนินการตามเอกสารอ้างอิง [23-24] โดยหลังจากปลดสาย PNA ออกจากวัฏภาคของแข็งและผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วจะได้ PNA P1 24% yield และทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ได้ (m/z calcd for M•H⁺ 3310.44; found 3309.26)

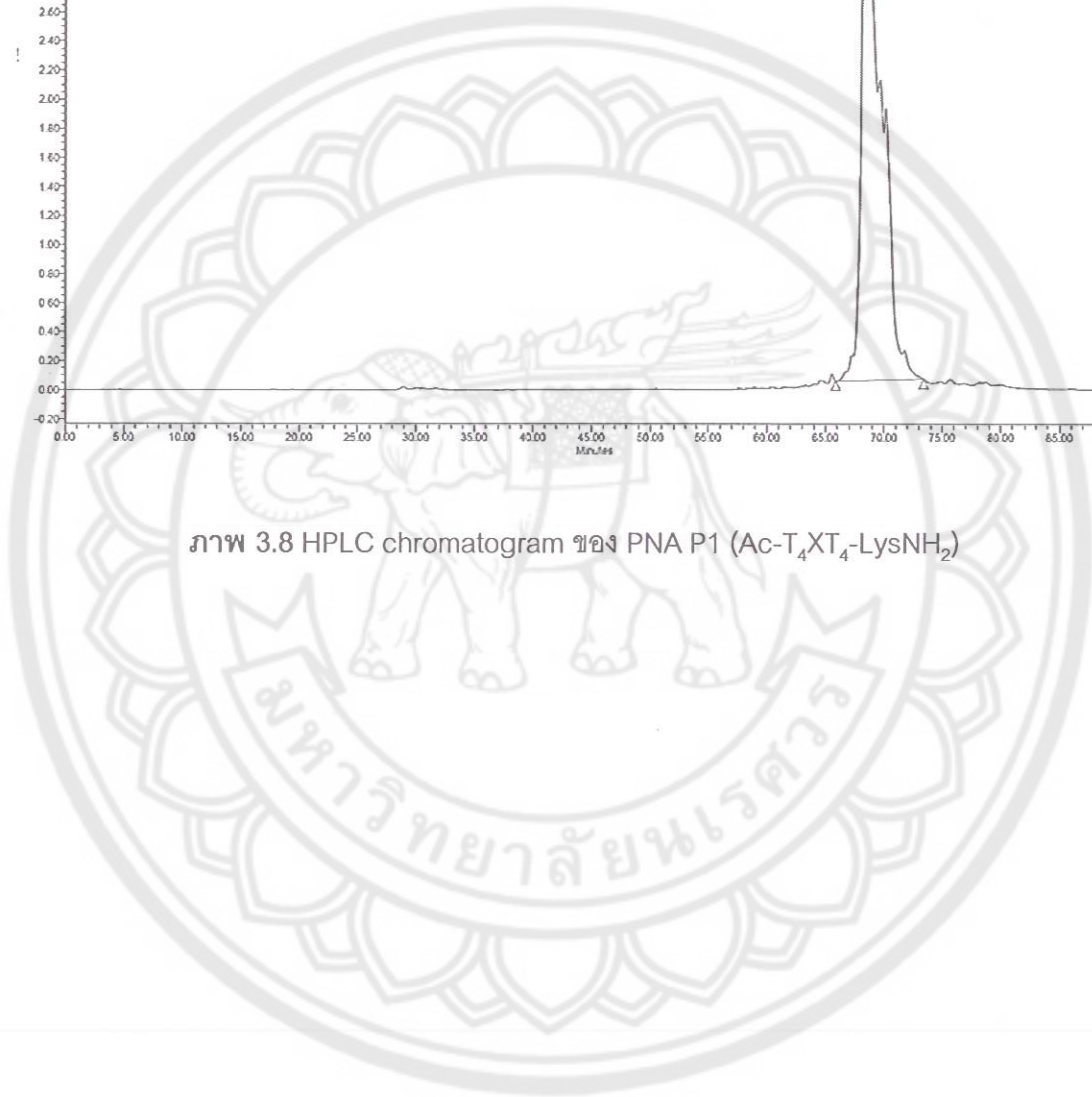


HPLC โครมาโตแกรม และ Mass spectrum ของ PNA P1 แสดงดังภาพ 3.8 และ ภาพ

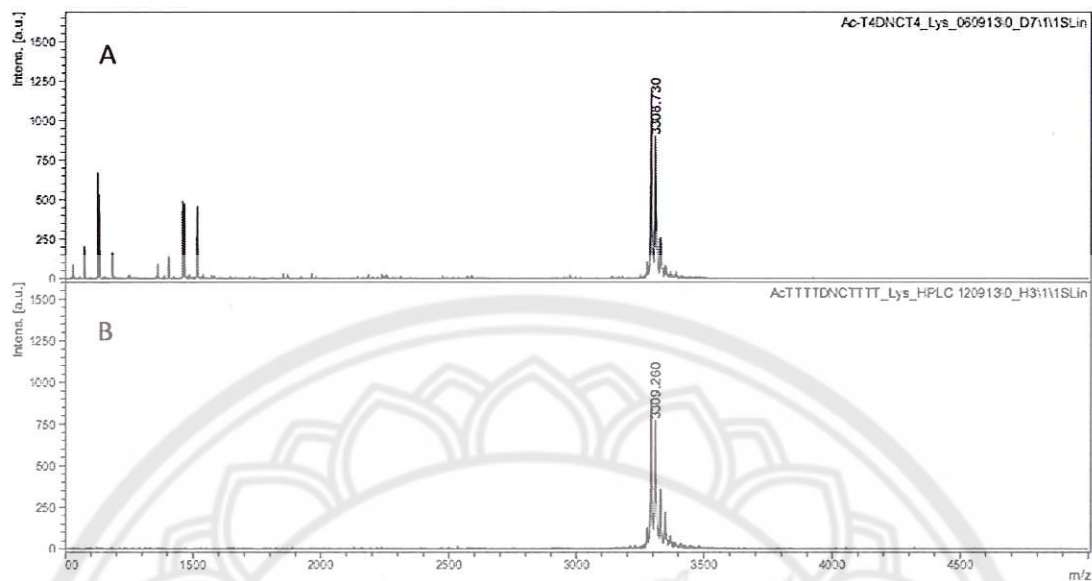
3.9



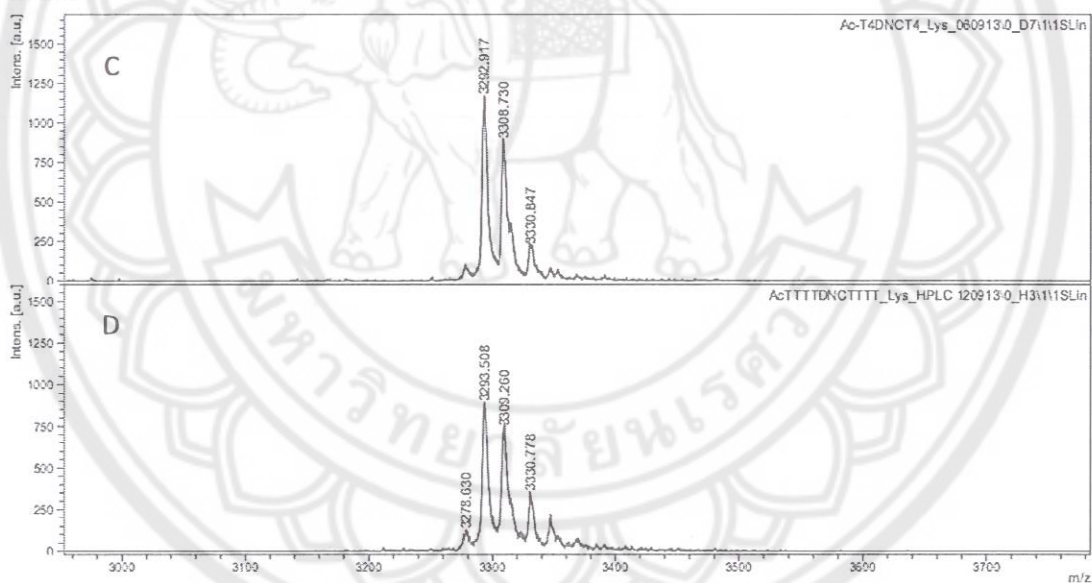
ภาพ 3.8 HPLC chromatogram ของ PNA P1 (Ac-T₄X_T₄-LysNH₂)



Comment 1 Ac-T4DNCT4_Lys_060913
 Comment 2



Comment 1 AcTTTTDNCTTTT_Lys_HPLC 120913
 Comment 2



ภาพ 3.9 MALDI-TOF Mass spectrum ของ PNA P1 ($\text{Ac-T}_4\text{XT}_4\text{-LysNH}_2$) (A) ก่อน HPLC (B) หลัง HPLC (C) ก่อน HPLC แบบขยายสเกล (D) หลัง HPLC แบบขยายสเกล

ตาราง 3.4 ลำดับเบส มวลโมเลกุลจากการคำนวณและจากที่วิเคราะห์ได้ของพีเอ็นเอที่สังเคราะห์และดีเอ็นเอที่ใช้ในงานวิจัยนี้

รหัส	Sequence (N→C)	m/z (calcd)	m/z (found)
PNA P1	Ac-T ₄ X ₄ T ₄ -LysNH ₂	3310.44	3309.26
DNA1	dA ₉	-	-
DNA2	dA ₄ TA ₄	-	-
DNA3	dA ₄ CA ₄	-	-
DNA4	dA ₄ GA ₄	-	-

การทดลองศึกษาสมบัติการจับยึดกับกรดนิวคลีอิกด้วยเทคนิคทาง spectroscopy จะกระทำใน 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 ที่ความเข้มข้นของเกลือเป็น 100 mM sodium chloride และความเข้มข้นของพีเอ็นเอและดีเอ็นเอ เท่ากับ 1.0 μ M (ในกรณีที่กระทำในสภาวะอื่นจะกำหนดไว้ได้ภาพ เช่น ที่ความเข้มข้นอื่น หรือที่ pH อื่น) การทดลองหา UV melting temperature ได้ผลการทดลองแสดงดังตาราง 3.5 และภาพ 3.10 และภาพ 3.11

ตาราง 3.5 ค่าอุณหภูมิหลอมเหลว T_m ของ PNA P1 กับ DNA 4 ชนิดเปรียบเทียบกับ acpcPNA

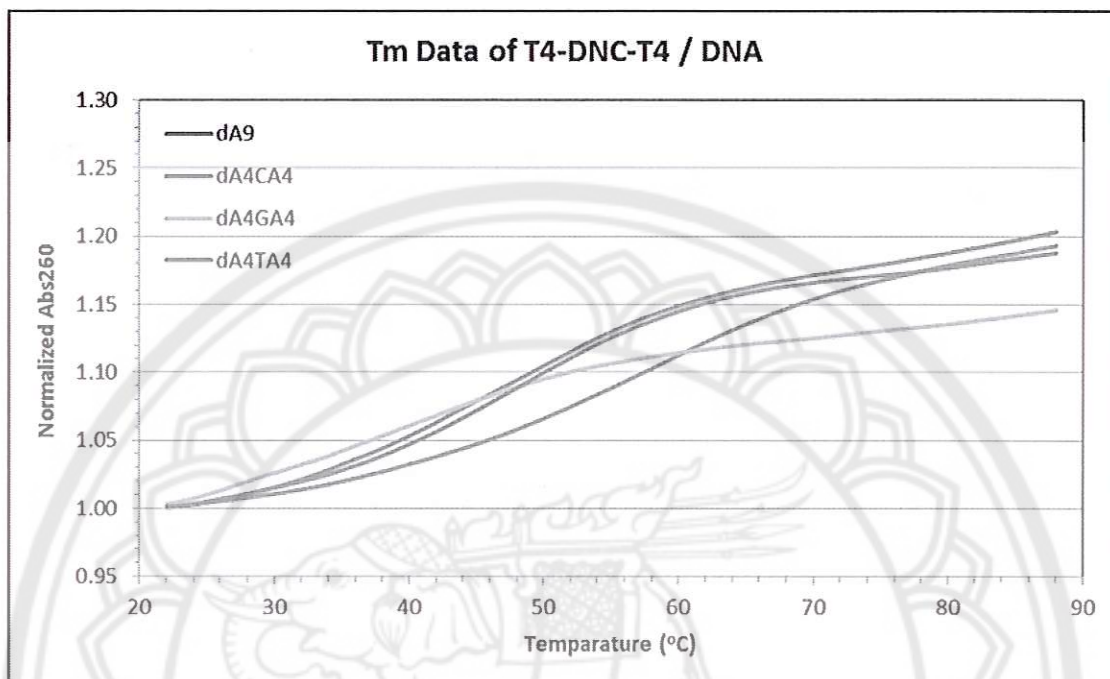


PNA (X)	DNA (Y)	T_m (°C)	T_m range ^a	ΔT_m ^b
DNC	A	55.4	17.7	-21.4
	T	45.5		-31.3
	C	47.5		-29.3
	G	37.7		-39.1
T	A	76.8°	37.8	-
	T	47.6°		-29.2
	C	47.7°		-29.1
	G	39.0°		-37.8

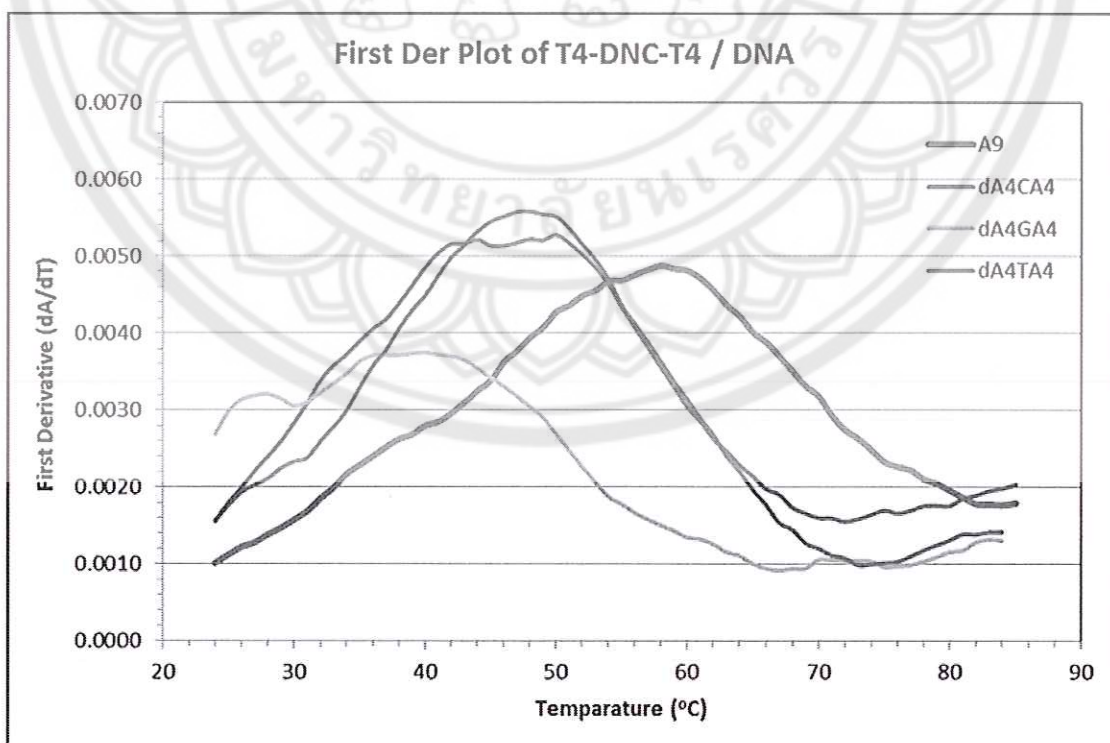
a ค่า T_m range แสดงค่าความแตกต่างระหว่างค่า T_m max (55.4°C) กับ T_m min (37.7°C) ของ PNA P1 กับ DNA1-4 ที่มีนิวคลีโอเบสพื้นฐาน (A, T, C, G)

b ΔT_m แสดงค่าความแตกต่างระหว่าง T_m ของ PNA P1·DNA กับ acpcPNA·DNA (pT9·dA9) (76.8°C)

c ข้อมูลจากเอกสารอ้างอิง [24]



ภาพ 3.10 แสดงค่าอุณหภูมิหลอมเหลวของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง PNA P1 กับ DNA1-4



ภาพ 3.11 แสดง First derivative plot ของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง PNA P1 กับ DNA1-4

จากกราฟแสดงให้เห็นว่าสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง PNA P1 กับ DNA1-4 ที่มีเบส Y = A T C และ G นั้นมีช่วงของอุณหภูมิหลอมเหลวที่ค่อนข้างกว้าง และพบค่าอุณหภูมิหลอมเหลวสูงสุดเมื่อ Y = A (55.4 °C) และค่าอุณหภูมิหลอมเหลวต่ำสุดเมื่อ Y = G (37.7 °C) ส่วนสารประกอบเชิงซ้อน PNA·DNA เมื่อ Y = T และ C จะมีค่าอุณหภูมิหลอมเหลวที่ใกล้เคียงกันที่ 45.5 และ 47.5 °C ตามลำดับ ดังนั้นค่าช่วงอุณหภูมิหลอมเหลวของเบส 3,6-dinitrocarbazole จะมีค่าในช่วง 17.7 °C (55.4 – 37.7 = 17.7) ซึ่งเมื่อเทียบกับ acpcPNA T₉ ที่ไม่มีการดัดแปลงใดๆ จะมีช่วงอุณหภูมิหลอมเหลวระหว่างสารประกอบเชิงซ้อน PNA·DNA คู่สมกับสารประกอบเชิงซ้อน PNA·DNA แบบ mismatch ที่มีความเสถียรน้อยที่สุดอยู่ที่ 37.8 °C (76.8 – 39.0 = 37.8) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการแทนที่ 3,6-dinitrocarbazole ไปใน acpcPNA สามารถลดค่าความแตกต่างของความเสถียรระหว่างเบสได้เมื่อเทียบกับ acpcPNA T₉ ที่ไม่มีการดัดแปลงใดๆ หรืออาจกล่าวได้ว่า 3,6-dinitrocarbazole มีแนวโน้มในการเป็น universal base ได้ แต่อย่างไรก็ตาม universal base ที่ดีนั้นไม่ควรจะลดความเสถียรของสารประกอบเชิงซ้อน PNA·DNA มากนัก เพราะจะทำให้ความสามารถในการจับยึดกับ DNA เป้าหมายนั้นด้อยลง ซึ่งจากตาราง 3.2 จะเห็นว่า 3,6-dinitrocarbazole ใน acpcPNA นั้นลดความเสถียรของสารประกอบเชิงซ้อน PNA·DNA ลงอยู่ในค่าที่ใกล้เคียงกับความเสถียรของสารประกอบเชิงซ้อน PNA·DNA แบบ mismatch (-21.4 ถึง -39.1 เปรียบเทียบกับ -29.1 ถึง -37.8 °C) ซึ่งจากข้อมูลการลดลงของความเสถียรของสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้น ประกอบกับช่วงของอุณหภูมิหลอมเหลวที่กว้าง ทำให้ 3,6-dinitrocarbazole ไม่สามารถเป็น universal base ที่มีประสิทธิภาพได้ (เมื่อพิจารณาจากการทดลองกับสาย PNA ที่เป็น homothymine เท่านั้น) โดยสันนิษฐานว่า ถึงแม้ว่า 3,6-dinitrocarbazole จะมีพื้นที่ผิวสัมผัสที่มีลักษณะแบนราบ (planar molecule) ซึ่งน่าจะทำให้เกิดอันตรกิริยาแบบ π -stacking ได้ดี แต่เนื่องด้วยขนาดที่ค่อนข้างใหญ่ (large steric effect) จึงทำให้มีความเกะกะค่อนข้างมาก ทำให้ไม่สามารถแทรกอยู่ในช่องว่างระหว่างสารประกอบเกลียวคู่ของ acpcPNA·DNA ได้อย่างเหมาะสม ส่งผลให้ 3,6-dinitrocarbazole ไม่สามารถเป็น universal base ที่มีประสิทธิภาพได้ แต่ข้อมูลจากงานวิจัยนี้ก็มีประโยชน์อย่างมากในการนำมาใช้ประกอบการออกแบบ universal base แบบใหม่ในอนาคต ซึ่งทางผู้วิจัยจะดัดแปรส่วนของเบสของ acpcPNA ด้วยอนุพันธ์ที่มีขนาดเล็กลง อย่างเช่น 5-nitroindoles, 3-nitropyrrroles และอนุพันธ์ของคาร์บาโซลชนิดอื่นๆ โดยอาจจะต้องดำเนินการทดลองควบคู่ไปกับการศึกษาทางด้าน molecular modeling

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการสังเคราะห์มอนอเมอร์ของ acpcPNA ที่มี 3,6-dinitrocarbazole แทนที่นิวคลีโอเบสธรรมชาติ และนำไปสังเคราะห์เป็น acpcPNA ที่มี 3,6-dinitrocarbazole เป็นผลสำเร็จ เพื่อนำไปศึกษาสมบัติการเป็น universal base ของ 3,6-dinitrocarbazole ดังกล่าว จากการศึกษาค่าคุณสมบัติการห่อหุ้มของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง acpcPNA ที่มี 3,6-dinitrocarbazole ($\text{Ac-T}_4\text{XT}_4\text{-LysNH}_2$; $\text{X} = 3,6\text{-dinitrocarbazole}$) ที่สังเคราะห์ขึ้นกับดีเอ็นเอ 4 ชนิด (dA_4YA_4 ; $\text{Y} = \text{A T C}$ และ G) พบว่ามีช่วงคุณสมบัติการห่อหุ้มที่กว้างระหว่างนิวคลีโอเบสธรรมชาติทั้งสี่ชนิด นอกจากนี้ยังพบว่า acpcPNA ที่มี 3,6-dinitrocarbazole มีผลทำให้ความเสถียรระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง PNA·DNA ลดลงในระดับที่เทียบเท่ากับสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง PNA·DNA แบบ mismatch จากผลการทดลองดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่า 3,6-dinitrocarbazole ไม่สามารถแสดงสมบัติการเป็น universal base ที่มีประสิทธิภาพ ในระบบของ acpcPNA ได้ อย่างไรก็ตามผลการศึกษาที่ได้จะเป็นพื้นฐานสำคัญในการออกแบบและสังเคราะห์ universal base ชนิดใหม่ได้ในอนาคต

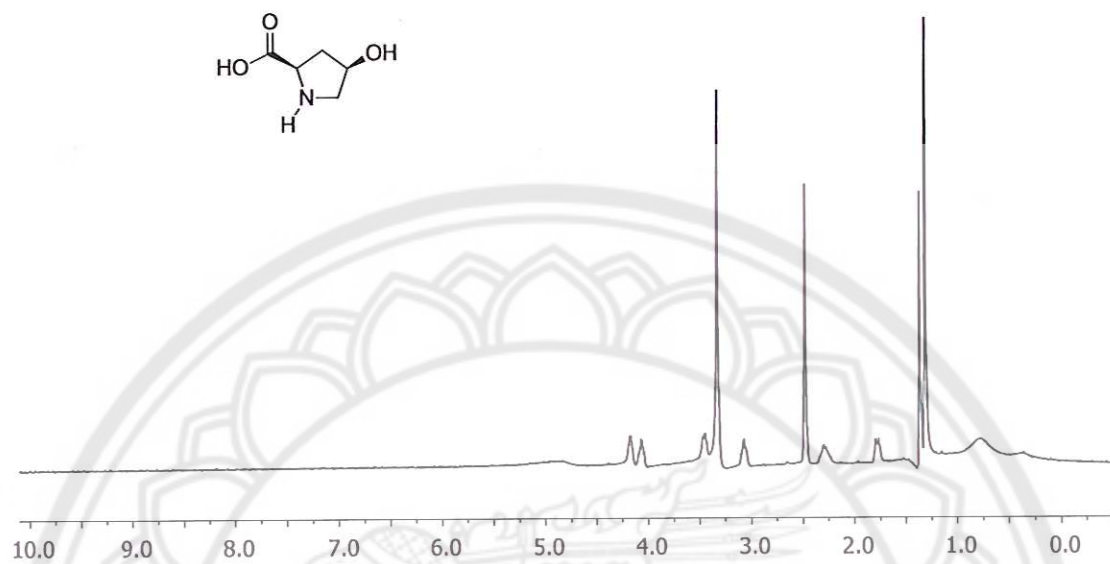
เอกสารอ้างอิง

- [1] Hill, F., Loakes, D.; Brown, D. M. Polymerase Recognition of Synthetic oligodeoxy ribonucleotides incorporating degenerate pyrimidine and purine base. *Proc. Nat. Sci.*, 1989, 95, 4258-4263.
- [2] Giles, R. V.; Spiller, D. G.; Tidd, M. Chimeric oligodeoxynucleotide analogues: enhanced cell uptake of structures which direct ribonuclease H with high specificity. *Anti-Cancer Drug*, 1993, 8, 33-51.
- [3] Ohtsuka, E. An alternative approach to deoxyoligonucleotides as hybridization probes by insertion of deoxyinosine at ambiguous codon positions. *Bioelectro chemistry*, 1985, 260, 2605-2608.
- [4] Seela, F. 7-deaza-2'-deoxyinosine: A stable nucleoside with the ambiguous base pairing properties of 2'-deoxyinosine. *Nucleos. Nucleot. Nucl.*, 1999, 18, 425-441.
- [5] Hoops, G. C.; Zhang, P.; Johnson, T. W.; Paul, N.; Bergstrom, E. D. Template Directed Incorporation of Nucleotide Mixtures Using Azole-Nucleobase Analogs. *Nucleic. Acids. Res.*, 1997, 25, 4866-4871.
- [6] Milican, T. A.; Mock, G. A.; Patel, P. T.; Eaton, P. T.; Gunning, J.; Cutbush, D.S.; Neidle, S.; Mann, J. Synthesis and biophysical studies of short oligodeoxynucleotides with novel modifications: a possible approach to the problem of mixed base oligodeoxynucleotide synthesis. *Nucleic. Acids. Res.*, 1984, 12, 7435-7453.
- [7] Ren, R. X.; Chaudhuri, C. N.; Paris, L. P.; Rumney, S.; Kool, T. E. Naphthalene, Phenanthrene, and Pyrene as DNA Base Analogues: Synthesis, Structure, and Fluorescence in DNA. *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118, 7671-7678.
- [8] Guckian, K. M.; Schweitzer, A. B.; Ren, R. X.; Sheils, J. C.; Tahmassebi, C. D.; Kool, T. E. Factors contributing to aromatic stacking in water: evaluation in the context of DNA. *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122, 2213-2222.

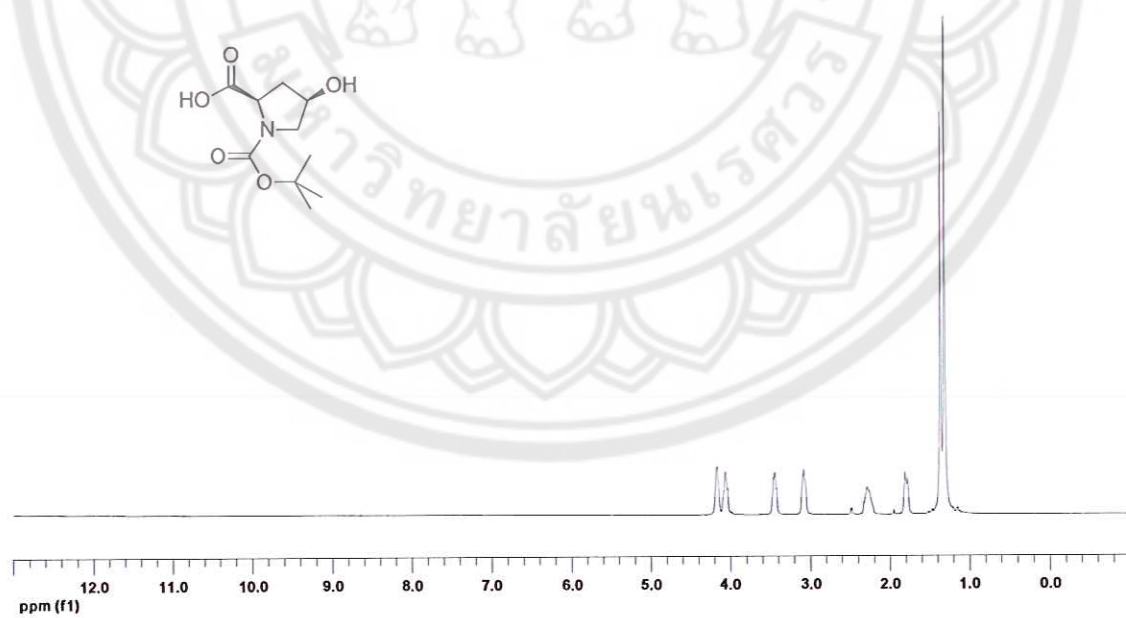
- [9] Nichols, R.; Andrews, C. P.; Zhang, P. A Universal Nucleoside for Use at Ambiguous Sites in DNA Primers. *Nature.*, 1994, 369, 492-493.
- [10] Bergstrom, D. E.; Kim, S.K. Synthesis, Structure, and Deoxyribonucleic Acid Sequencing with a Universal Nucleoside: 1-(2'-deoxy-b-D-ribofuranosyl)-3-Nitropyrrole. *J. Am Chem. Soc.*, 1995, 117, 1201-1209.
- [11] Loakes, D.; Brown, M. D. 3-nitropyrrole and 5-nitroindole as universal bases in primers for DNA sequencing. *Nucleic. Acids. Res.*, 1995, 23, 2361-2366.
- [12] Loakes, D.; Brown, M. D. 5-Nitroindole as an universal base analogue. *Nucleic Acid Res. Nucleic. Acids. Res.*, 1994, 22, 4039-4043.
- [13] Kool, E. T. Hydrogen Bonding, Base Stacking, and Steric Effect in DNA replication. *Annu. Rev. Bioph. Biom.*, 2001, 30, 1-22.
- [14] Schweitzer, B. A., Kool, E. T. Hydrophobic, Non-Hydrogen-Bonding Bases and Base Pairs in DNA. *J Am Chem Soc.* 1995, 117(7), 1863-1872.
- [15] Martinez. C. R., Iverson, B. L. Rethinking the term "pi-stacking" *Chem. Sci.*, 2012, 3, 2191-2201.
- [16] Grimme, S. Do Special Noncovalent p-p Stacking Interactions Really Exist? *Angew. Chem. Int. Ed.* 2008, 47, 3430-3434.
- [17] Challa, H.; Styers, M. L.; Woski, S. A. Nitroazole Universal Bases in Peptide Nucleic Acid. *Org Lett.*, 1999, 1, 1639-1641.
- [18] Berger, M., Wu, Y., Ogawa, A. K., McMinn, D. L., Schultz, P. G., Romesberg, F. E. Universal bases for hybridization, replication and chain termination. *Nucleic Acid Research*, 2000, 28(15), 2911-2914.
- [19] Oliver, S. J., Parker A. K.; Suggs, W. J. Effect of the Universal Base 3-Nitropyrrole on the Selectivity of Neighboring Natural Bases. *Org Lett.*, 2001, 3, 1977-1980.

- [20] Zhang, P., Egholm, M., Paul, N., Pingle, M., Bergstrom, D. E. Peptide Nucleic Acid-DNA Duplexes Containing the Universal Base 3-Nitropyrrole. *Methods*, 2001, 23, 132-140.
- [21] Ceballos, C., Prata, C. A. H., Giorgio, S., Garzino, F., Payet, D., Barthe'le'my, P., Grinstaff, M. W., Camplo, M. Cationic Nucleoside Lipids Based on a 3-Nitropyrrole Universal Base for siRNA Delivery. *Bioconjugate Chem.* 2009, 20, 193-196.
- [22] Soodsawang, W., Benchawan, T., Wichai, U., Tantirungrotechai, Y. Molecular Dynamics Study of DNA Duplex Containing Carbazole-derived Universal Base. *Advanced Materials Research*. 2012, 506, 258-261.
- [23] Suparpprom, C., Srisuwannaket, C., Sangyanich, P., Vilaivan, T. Synthesis and oligodeoxynucleotide binding properties of pyrrolidinyl peptide nucleic acids bearing prolyl-2-aminocyclopentanecarboxylic acid (ACPC) backbones. *Tetrahedron Lett.* 2005, 46, 2833-2837.
- [24] Vilaivan, T., Srisuwannaket, C. Hybridization of Pyrrolidinyl Peptide Nucleic Acids and DNA: Selectivity, Base-Pairing Specificity, and Direction of Binding. *Org. Lett.* 2006, 8, 1897-1900.
- [25] Challa, H., Styers, M. L., Woski, S. A. Nitroazole Universal Bases in Peptide Nucleic Acids. *Org Lett.* 1999, 1, 1639-1641.

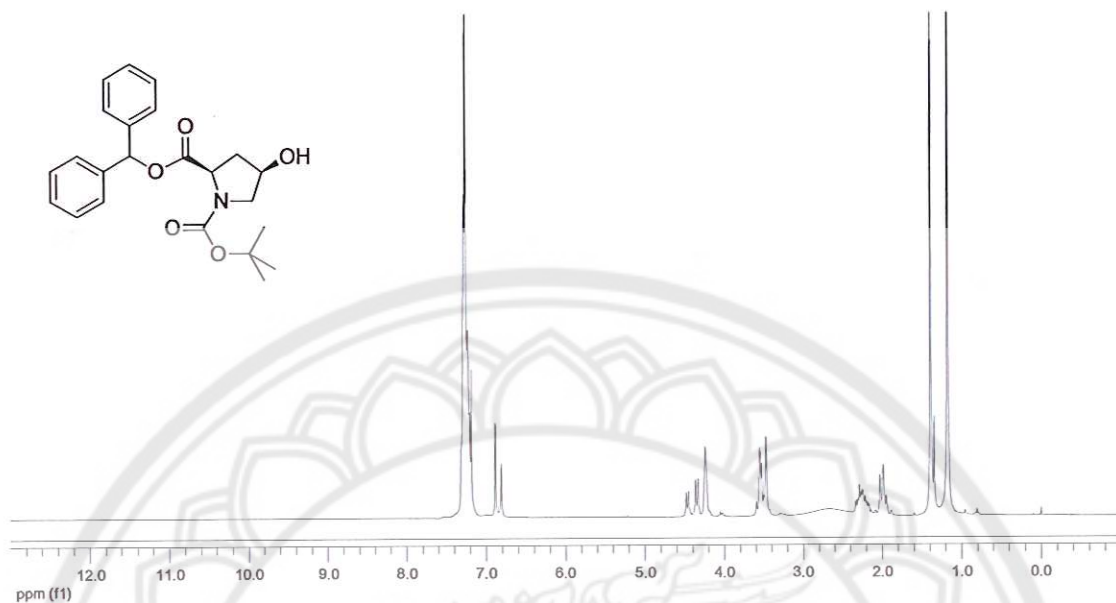




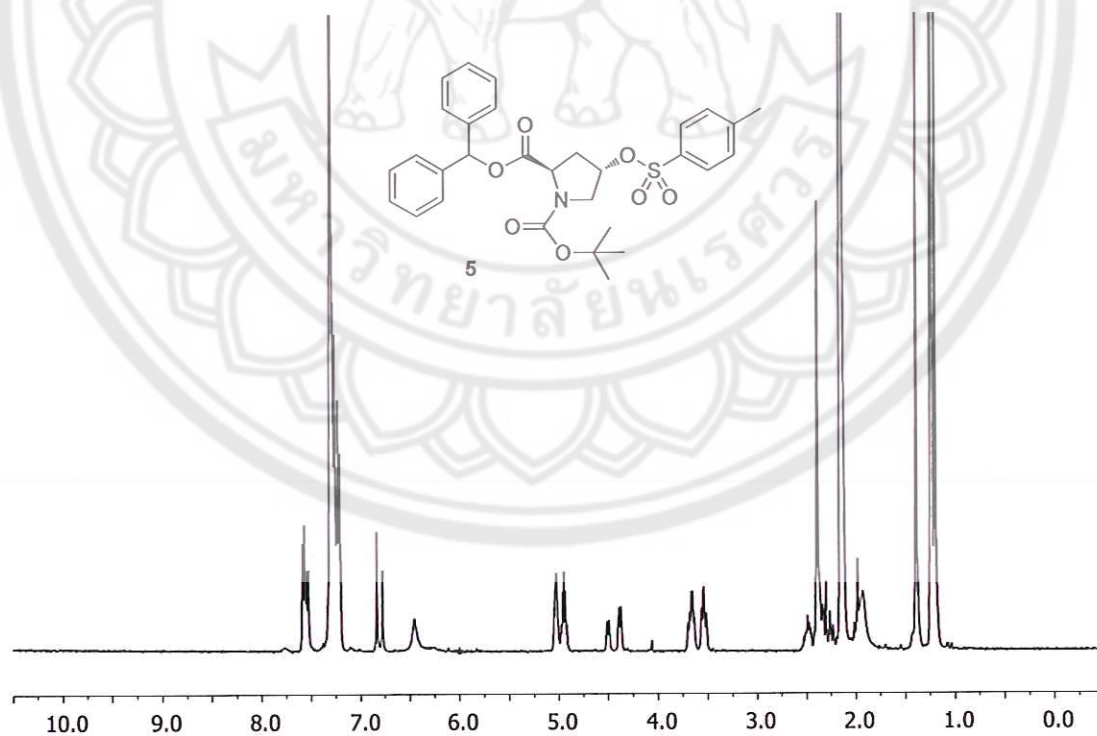
ภาพ A1 ^1H NMR สเปกตรัมของ *cis*-4-hydroxy-D-proline (สาร 2) ในตัวทำละลาย D_2O



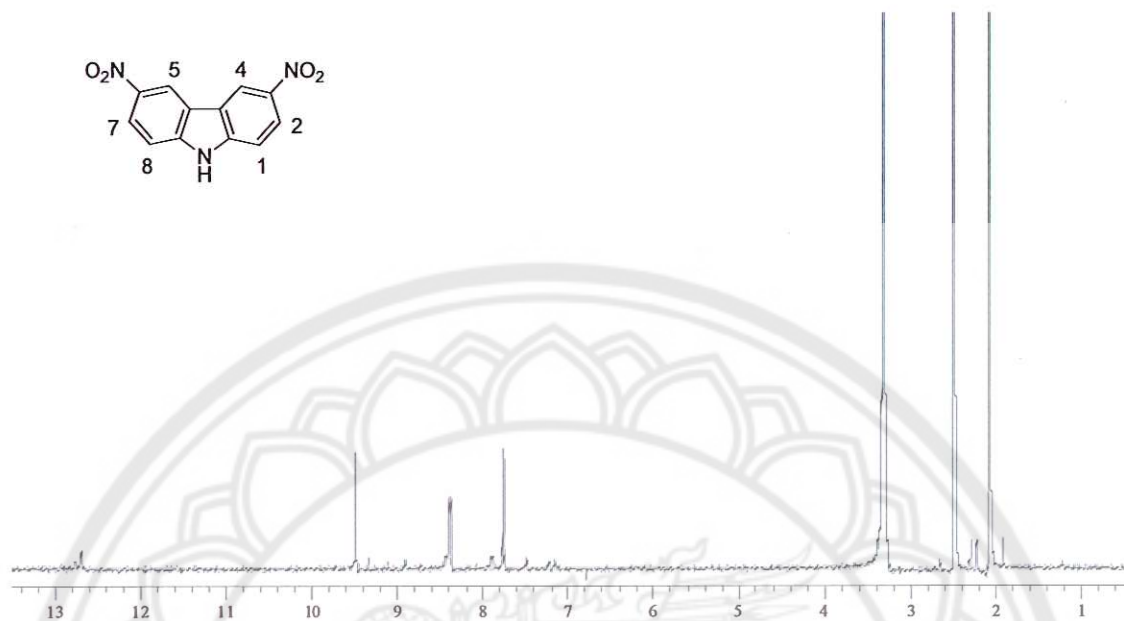
ภาพ A2 ^1H NMR สเปกตรัมของ *N*-*tert*-Butoxycarbonyl-*cis*-4-hydroxy-D-proline (สาร 3) ในตัว
ทำละลาย CDCl_3



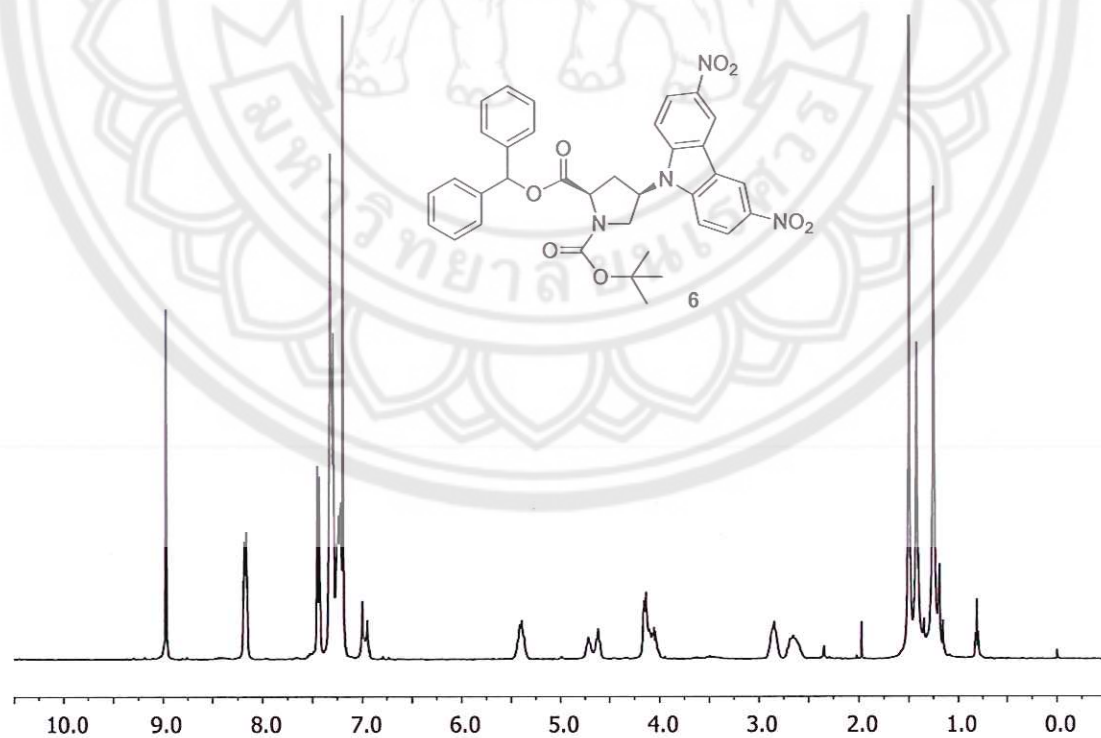
ภาพ A3 ¹H NMR สเปกตรัมของ *N*-tert-Butoxycarbonyl-*cis*-4-hydroxy-D-proline diphenyl methyl ester (สาร 4) ในตัวทำละลาย CDCl₃



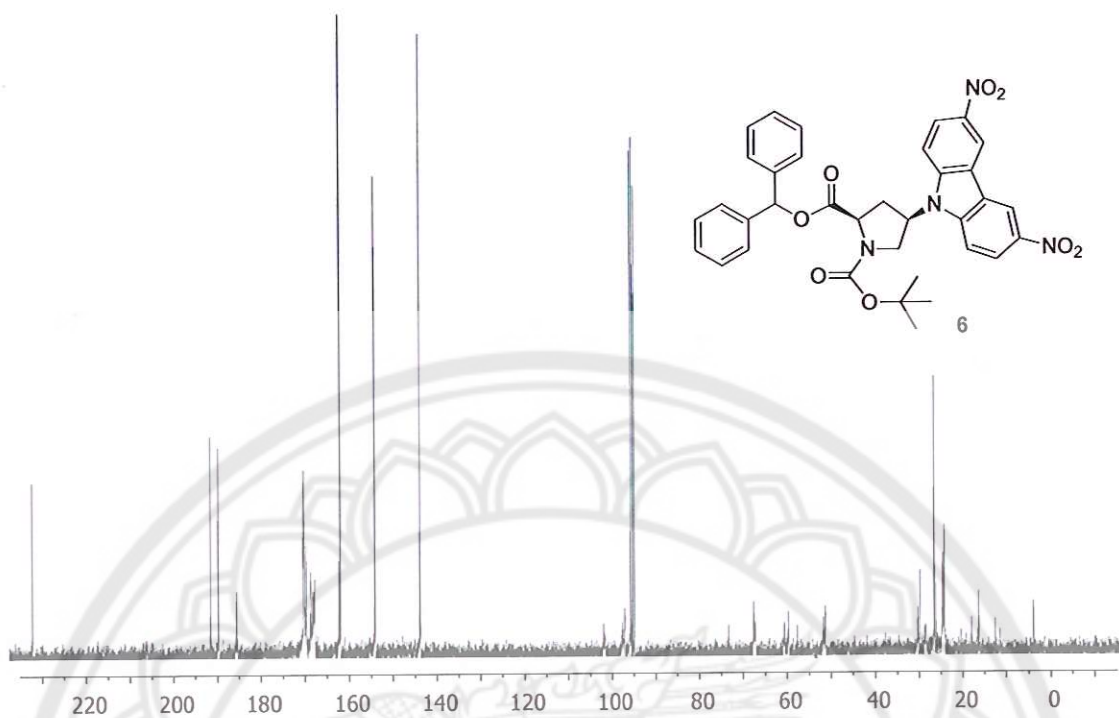
ภาพ A4 ¹H NMR สเปกตรัมของ *N*-tert-Butoxycarbonyl-*trans*-4-tosyl-D-proline diphenyl methyl ester (สาร 5) ในตัวทำละลาย CDCl₃



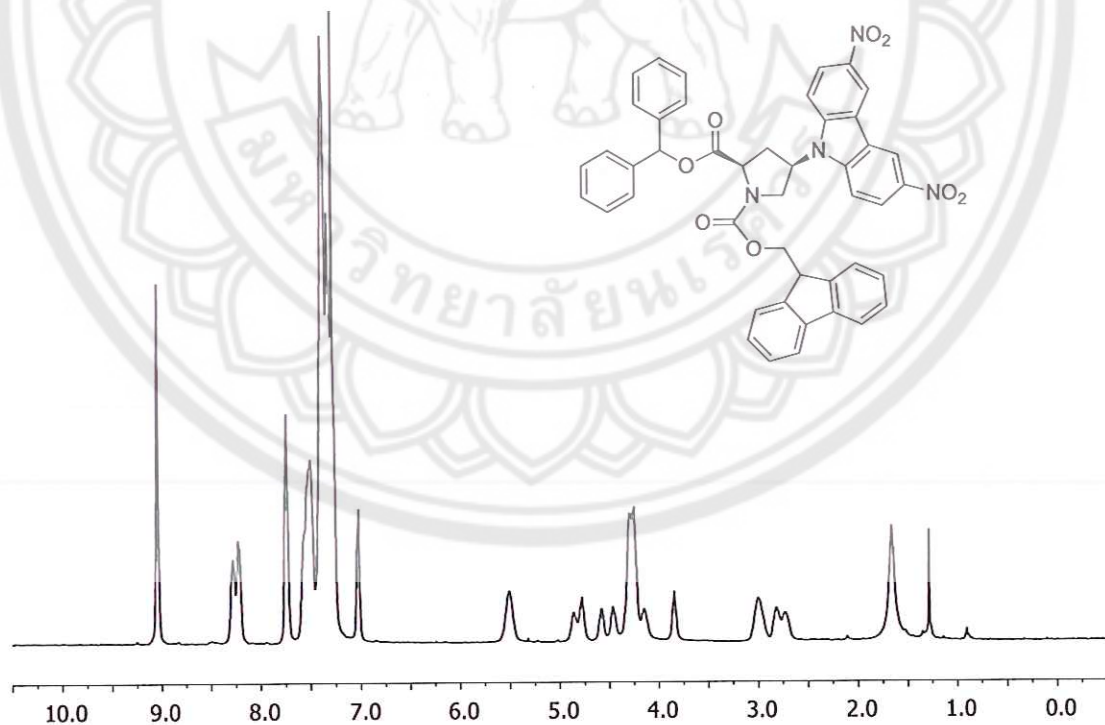
ภาพ A5 ^1H NMR สเปกตรัมของ 3,6-Dinitrocarbazole ในตัวทำละลาย CDCl_3



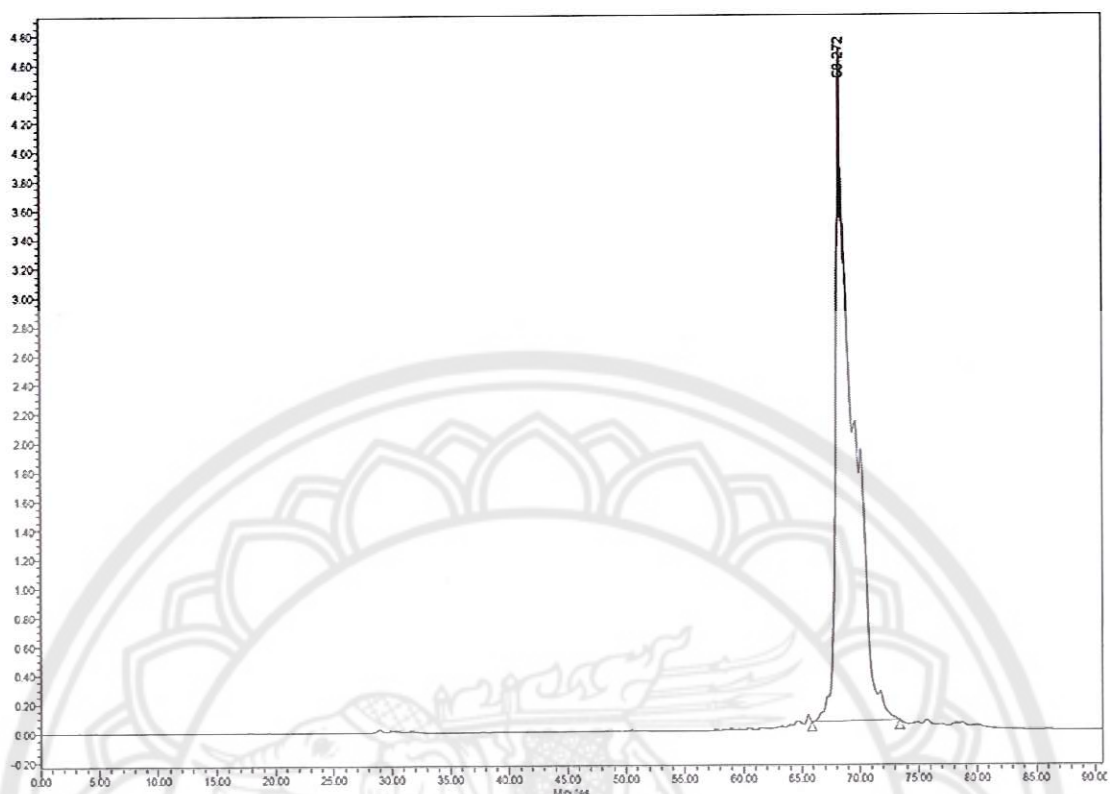
ภาพ A6 ^1H NMR สเปกตรัมของ *N*-tert-Butoxycarbonyl-*cis*-3,6-dinitrocarbazole-*D*-proline diphenylmethyl ester (สาร 6) ในตัวทำละลาย CDCl_3



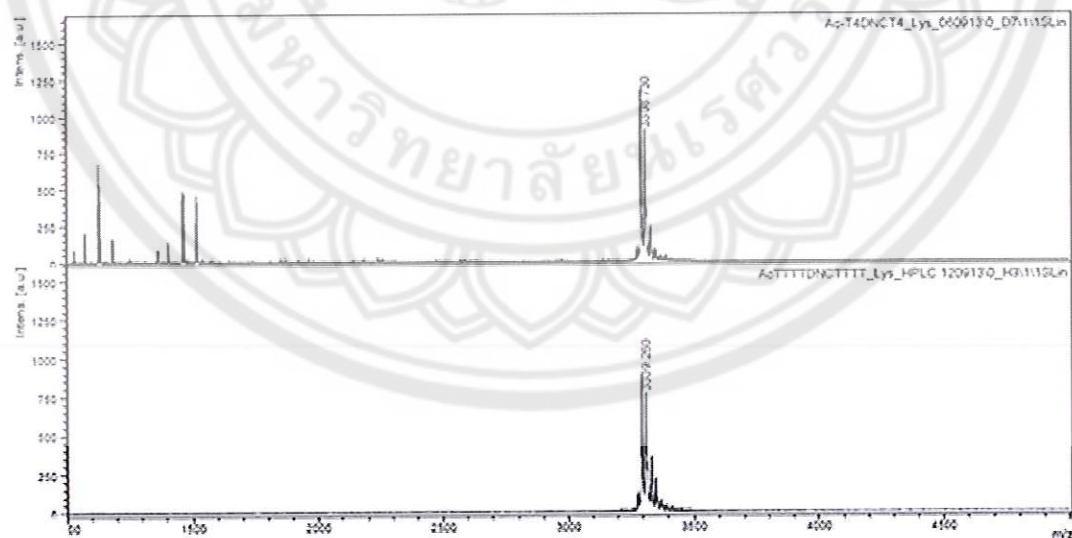
ภาพ A7 ^{13}C NMR สเปกตรัมของ *N-tert*-Butoxycarbonyl-*cis*-3,6-dinitrocarbazole-D-proline diphenylmethyl ester (สาร 6) ในตัวทำละลาย CDCl_3



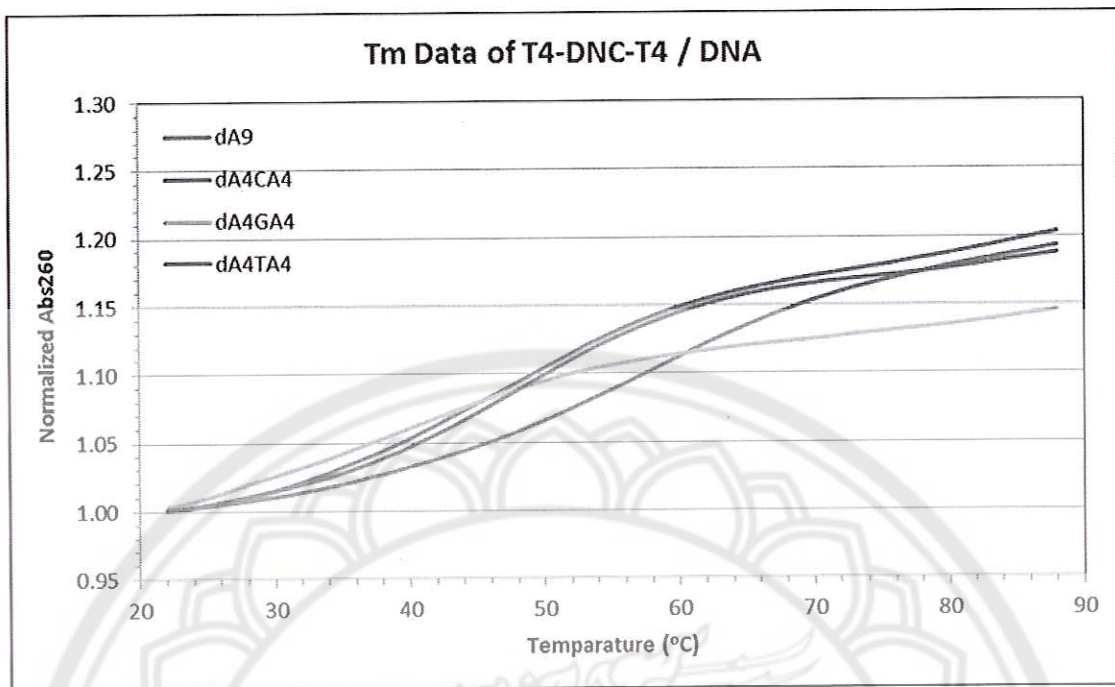
ภาพ A7 ^1H NMR สเปกตรัมของ (*N*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*cis*-3,6-dinitrocarbazole-D-proline diphenylmethyl ester (สาร 7) ในตัวทำละลาย CDCl_3



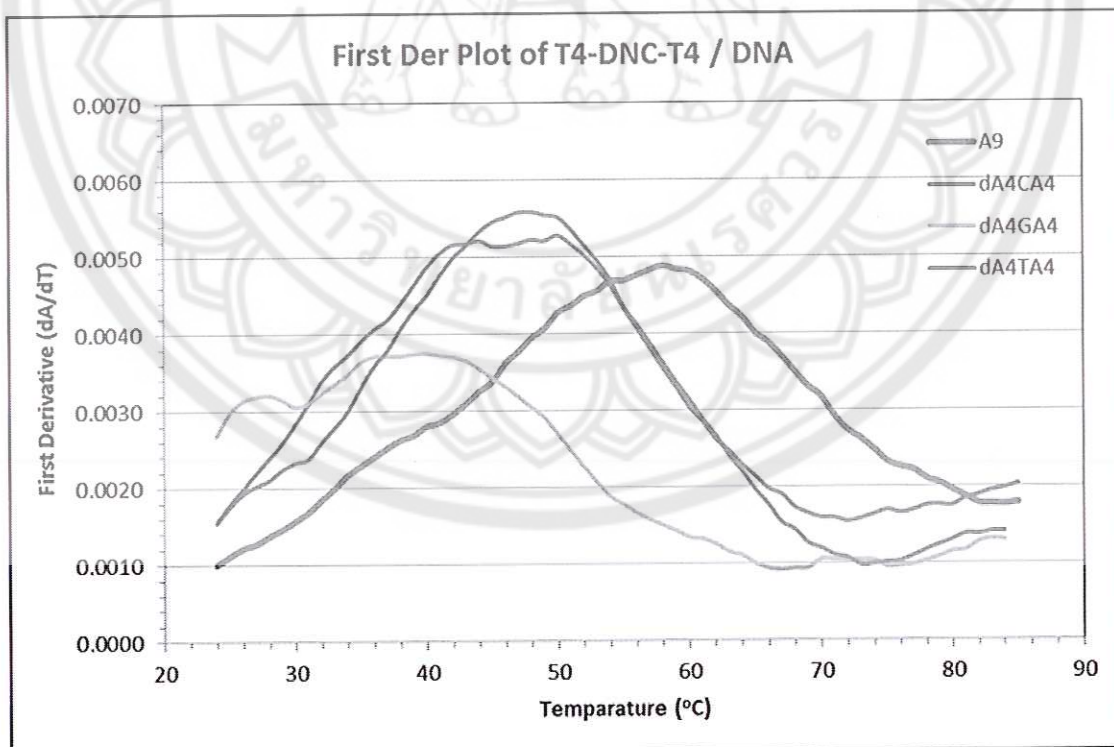
ภาพ A8 HPLC chromatogram ของ PNA P1 (Ac-T₄X_T₄-LysNH₂; X = 3,6-dinitrocarbazole)



ภาพ A9 MALDI-TOF mass spectrum ของ PNA P1 (Ac-T₄X_T₄-LysNH₂; X = 3,6-dinitrocarbazole) ก่อนและหลัง HPLC



ภาพ A9 UV melting experiment ของ PNA P1 ($\text{Ac-T}_4\text{XT}_4\text{-LysNH}_2$; X = 3,6-dinitrocarbazole) กับ DNA1-4 (dA_4YA_4 ; Y = A T C และ G)



ภาพ A9 First derivative plot ของ PNA P1 ($\text{Ac-T}_4\text{XT}_4\text{-LysNH}_2$; X = 3,6-dinitrocarbazole) กับ DNA1-4 (dA_4YA_4 ; Y = A T C และ G)



เลขทะเบียน.....43.....

หนังสือยินยอมการเผยแพร่ผลงานทางวิชาการบนเว็บไซต์
ฐานข้อมูล NU Digital Repository (<http://obj.lib.nu.ac.th/media/>)
สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร

ตามที่ข้าพเจ้า ผศ.ดร.จตุรงค์ สุภาพพร้อม (ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์) ได้ส่งผลงานทางวิชาการการรายงานการวิจัย (เรื่อง) รายงานการวิจัยการสังเคราะห์และศึกษาสมบัติการจับยึดกับกรดนิวคลีอิกของพอลิไดนิลเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่มีการแทนที่นิวคลีโอเบสด้วยยูนิเวอร์ซอลเบสบางชนิด

ปีที่พิมพ์ 2557

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานทางวิชาการเป็นลิขสิทธิ์ของข้าพเจ้า ผศ.ดร.จตุรงค์ สุภาพพร้อม (ผู้วิจัยร่วม) คุณรุ่งแสง จันทร์คุณาสุขะ เป็นเจ้าของลิขสิทธิ์ร่วม และเพื่อให้ผลงานทางวิชาการของข้าพเจ้าเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาและสาธารณชน จึงอนุญาตให้เผยแพร่ผลงาน ดังนี้

- อนุญาตให้เผยแพร่
 ไม่อนุญาตให้เผยแพร่ เนื่องจาก.....

ลงชื่อ
(..... ผศ.ดร.จตุรงค์ สุภาพพร้อม)

วันที่..... 3 พฤศจิกายน 2558

หมายเหตุ ลิขสิทธิ์ใดๆ ที่ปรากฏอยู่ในผลงานนี้เป็นความรับผิดชอบของเจ้าของผลงาน ไม่ใช่ของสำนักหอสมุด