



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

พิร์โรลิดินิลเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่มีคอนฟอร์เมชันถูกจำกัด: หน้าที่ใหม่และการประยุกต์ใช้

โดย **ธีรยุทธ วิไลวัลย์ และคณะ**

เดือน-ปี ที่เสร็จโครงการ กันยายน 2560

สัญญาเลขที่ DPG5780002

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ พิร์โรลิดินิลเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่มีคอนฟอร์เมชันถูกจำกัด:
หน้าที่ใหม่และการประยุกต์ใช้

คณะผู้วิจัย

1. ศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. ผศ.ดร.จตุรงค์ สุภาพพร้อม	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
3. ผศ.ดร.ภาณุวัฒน์ ผดุงรส	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
4. ดร.ธเนศวร นวลใย	คณะศิลปะศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลรัตนโกสินทร์ วิทยาเขตวังไกลกังวล อ.หัวหิน จ.ประจวบคีรีขันธ์
5. ดร.ธนิษฐ์ ปราณีนรารัตน์	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
6. ดร.นำพล อินสิน	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
7. ดร.แพรทอง เหลาภา	หลักสูตรเคมีประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ จ.สกลนคร
8. ดร. คริสโตเฟอร์ สมิธ	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (ย้ายที่ทำงานไปมหาวิทยาลัยมหิดลตั้งแต่ตุลาคม 2558)
9. รศ.ดร.วรวีร์ โฮเว่น	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
10. รศ.ดร.ปณต ถาวรังกูร	ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
11. รศ.ดร.เพริศพิชญ์ คณาธารณา	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
12. ผศ.ดร.วรากร ลิ่มบุตร	ภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
13. ผศ.ดร.อาภรณ์ นุ่มน่วม	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
14. ผศ.ดร. ชิตนนท์ บูรณชัย	ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
15. ผศ.ดร. จงดี ธรรมเขต	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
16. รศ.ดร.เมธา รัตนากรพิทักษ์	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
17. ผศ.ดร.บุญจิรา บุญทา	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
18. ดร.มลิวรรณ นาคขุนทด	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
19. ดร.อุทัย วิชัย	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
20. ผศ.ดร.คัชรินทร์ ศิริวงศ์	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
21. อ.ดร.วรรณฑณี สิทธิวงษ์	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
และจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.และ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องพิร์โรลิดินิลเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่มีคอนฟอร์เมชันถูกจำกัด: หน้าที่ใหม่และการประยุกต์ใช้ ได้ดำเนินการไปจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความร่วมมือของหลายฝ่าย กระผมในฐานะหัวหน้าโครงการขอขอบคุณ แหล่งเงินทุนสนับสนุน ได้แก่ ทุนศาสตราจารย์วิจัยดีเด่น ประจำปี พ.ศ. 2557 (DPG5780002) จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ร่วมกับจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และแหล่งทุนอื่นที่มีส่วนเกี่ยวข้อง รวมทั้ง ทุนวิจัยของผู้ร่วมโครงการ และทุนอื่นๆ ที่ให้แก่นิสิต-นักศึกษา ได้แก่ทุนปริญญาเอกกาญจนาภิเษก (คปก.) ทุนพัฒนาและส่งเสริมผู้มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (พสวท.) ทุนโครงการพัฒนากำลังคนด้านวิทยาศาสตร์ (ทุนเรียนดีวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย) ทุนโครงการพัฒนาอัจฉริยภาพทางวิทยาศาสตร์สำหรับเด็กและเยาวชน (JSTP) ขอขอบคุณสถาบันต้นสังกัดของหัวหน้าโครงการและคณะผู้วิจัยทุกท่านที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ เครื่องมือ ระบบสาธารณูปโภค และการสนับสนุนอื่นๆ ที่จำเป็น โดยเฉพาะอย่างยิ่ง คณะศิลปะศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลรัตนโกสินทร์ วิทยาเขตวังไกลกังวล อ.หัวหิน จ.ประจวบคีรีขันธ์ และ คณะวิทยาศาสตร์และวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ จ.สกลนคร ที่ได้รับเป็นเจ้าภาพดูแลเรื่องสถานที่ในการจัดประชุมวิชาการประจำปีของกลุ่มวิจัยครั้งที่ 2 และ 3 สุดท้ายต้องขอขอบคุณคณะผู้วิจัยทุกท่าน ทั้งอาจารย์ผู้ร่วมโครงการ และนิสิตนักศึกษา และผู้ช่วยวิจัยที่อยู่ในโครงการรวมกว่า 30 รวมทั้งผู้ร่วมวิจัยที่ไม่ได้อยู่ในโครงการอีกจำนวนมากที่ไม่สามารถกล่าวนามได้ทั้งหมด หากปราศจากท่านเหล่านี้แล้วงานคงจะดำเนินไปไม่ได้ สุดท้ายขอขอบคุณคุณโชติมา วิไลวัลย์ เจ้าหน้าที่โครงการที่ช่วยประสานงานและอำนวยความสะดวกในโครงการ ตั้งแต่การจัดซื้อ ทำบัญชี งานเอกสาร ดูแลห้องปฏิบัติการ รวมถึงการสังเคราะห์พีเอ็นเอให้กับผู้ร่วมโครงการและผู้อื่นที่ต้องการใช้ประโยชน์จากพีเอ็นเอนี้

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: DPG5780002
ชื่อโครงการ: พิร์โรลิดินิลเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่มีคอนฟอร์เมชันถูกจำกัด: หน้าที่ใหม่และการประยุกต์ใช้
ชื่อนักวิจัย: ธีรยุทธ วิไลวัลย์และคณะ
E-mail address: vtirayut@chula.ac.th
ระยะเวลาของโครงการ: 3 ปี (17 มีนาคม 2559 ถึงวันที่ 16 มีนาคม 2560 ขยายเวลาถึง 16 กันยายน 2560)

เพปไทด์นิวคลีอิกแอซิดหรือพีเอ็นเอเป็นสารสังเคราะห์เลียนแบบดีเอ็นเอที่มีโครงหลักคล้ายเพปไทด์ ซึ่งมีความเป็นกลางทางไฟฟ้า และสามารถจับยึดกับดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอเป้าหมายได้อย่างจำเพาะเจาะจงตามกฎการเข้าคู่เบสของวัตสัน-คริก จากความสำเร็จที่ผ่านมาในการพัฒนาเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิดชนิดใหม่ที่มีคอนฟอร์เมชันที่ถูกจำกัดโดยมีโครงหลักเป็นแอลฟ่าและเบต้าอะมิโนแอซิดเรียงสลับกันที่ได้มาจากโพรลีนและกรดเบต้าอะมิโนที่เป็นวงแหวน เช่น acpcPNA, acbcPNA และ epi-acpcPNA งานวิจัยนี้จะมุ่งเน้นไปที่การขยายขอบเขตของสมบัติหน้าที่และการประยุกต์ใช้งานของพีเอ็นเอระบบใหม่ในกลุ่มนี้ออกไปอีก โดยได้มีการออกแบบ สังเคราะห์ และศึกษาสมบัติการเข้าคู่เบสของพิร์โรลิดินิลพีเอ็นเอระบบใหม่ มีการเพิ่มเติมหน้าที่และสมบัติใหม่เข้าไปในพิร์โรลิดินิลพีเอ็นเอโดยการดัดแปรเชิงเคมีด้วยเบสที่ไม่พบในธรรมชาติ สีย้อมเรืองแสงฉลากที่ตอบสนองกับเคมีไฟฟ้า และหมู่ที่ว่องไวต่อปฏิกิริยา และนำพิร์โรลิดินิลพีเอ็นเอเหล่านี้ไปพัฒนาระบบตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอด้วยเทคนิคเชิงแสงหรือเคมีไฟฟ้า ร่วมกับการขยายสัญญาณทั้งแบบที่ใช้เอนไซม์และไม่ใช้เอนไซม์เช่น ปฏิกิริยาที่ถูกเร่งด้วยดีเอ็นเอเทมเพลต การใช้พอลิเมอร์ที่ชอบน้ำ และวัสดุนาโน ในรูปแบบที่ใช้งานได้ง่าย ตลอดจนการนำไปประยุกต์ใช้ในวัตถุประสงค์ทางด้านการแพทย์ อาหาร และการเกษตร นอกจากนี้ยังได้มีการพัฒนาระบบทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์โดยใช้พิร์โรลิดินิลพีเอ็นเอที่ตรึงบนอนุภาคแม่เหล็กขนาดนาโน รวมถึงการศึกษาปัจจัยเชิงโครงสร้างที่ส่งผลต่อการจับยึดที่เป็นลักษณะเฉพาะของพิร์โรลิดินิลพีเอ็นเอโดยใช้การคำนวณทางทฤษฎีประกอบกับผลการทดลอง งานวิจัยนี้อาศัยพิร์โรลิดินิลพีเอ็นเอเป็นจุดสนใจร่วมในการดึงนักวิจัยที่มีความเชี่ยวชาญจากหลายสาขาได้แก่ เคมีอินทรีย์สังเคราะห์ เคมีวิเคราะห์ เคมีพอลิเมอร์ นาโนเทคโนโลยี ชีววิทยาโมเลกุล เคมีคำนวณ และการเชื่อมโยงระหว่างเคมีกับชีววิทยามาทำงานร่วมกัน ผลผลิตที่ได้คือผลงานตีพิมพ์มากกว่า 20 เรื่องในวารสารวิชาการระดับนานาชาติที่มีคุณภาพสูง โดยบางวารสารจัดอยู่ในระดับแนวหน้า นอกจากนี้ยังได้มีส่วนในการสร้างบุคลากรด้านวิจัยซึ่งรวมถึงนักวิจัย 20 คนและนักศึกษาระดับปริญญาโท-เอกอย่างน้อย 20 คน จาก 7 สถาบัน และเครือข่ายงานวิจัยที่ยั่งยืนทั้งในระดับชาติและนานาชาติ

คำสำคัญ: DNA; PNA; fluorescence; genotyping; diagnostic; functional probes

Abstract

Project Code : DPG5780002
Project Title : Conformationally constrained pyrrolidinyl peptide nucleic acids: New functions and applications
Investigators : Tirayut Vilaivan and co-workers
E-mail Address : vtirayut@chula.ac.th
Project Period : 3 years (17 March 2014 - 16 March 2017 extended to 16 September 2017)

Peptide nucleic acid or PNA is a type of DNA mimic with electrostatically neutral peptide-like backbone that can bind strongly and specifically to DNA and RNA targets following Watson-Crick base paring rules. Based on our previous success in developing a new class of conformationally-constrained peptide nucleic acid bearing alternating α/β-peptide backbone derived from proline and cyclic β-amino acids such as acpcPNA, acbcPNA and *epi*-acpcPNA, this research aims to expand this capability and applications of these new PNA systems further. New pyrrolidinyl PNA with have been designed, synthesized and evaluated for base pairing properties. New functions and properties have been incorporated into pyrrolidinyl PNA by chemical modification with unnatural bases, fluorescence dyes, electroactive labels and chemically reactive groups. New optical and electrochemical methods for DNA/RNA sequence determination using pyrrolidinyl PNA as the sensing element in combination with enzyme- and non-enzyme-based signal amplification technologies such as DNA-templated reactions, hydrophilic polymers, and nanomaterials in a simple-to-use platforms have been investigated together with their applications in medical and/or food/agricultural sciences. A DNA purification system based on pyrrolidinyl PNA probes immobilized onto magnetic nanoparticles has also be developed. In addition, structural basis of many unusual properties of pyrrolidinyl PNA was be investigated using combined experimental and theoretical approaches. The research, with our unique pyrrolidinyl PNA as a common focal point, has put together expertises from several research areas including organic synthesis, analytical chemistry, polymer chemistry, nanotechnology, computational chemistry as well as the interface between chemistry and biology. This resulted in more than 20 publications in high quality international journals, some of which are among the top tier ranks. In addition, high quality research personnel including 20 researchers and at least 20 graduate students from 7 institutions and a long-lasting research network at national and international levels.

Keywords: DNA; PNA; fluorescence; genotyping; diagnostic; functional probes

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร (Executive Summary)
ทุนศาสตราจารย์วิจัยดีเด่น (DPG5780002)

1. ชื่อโครงการ

ภาษาไทย พิร์โรลิดินิลเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่มีคอนฟอร์เมชันถูกจำกัด: หน้าที่ใหม่และการประยุกต์ใช้

ภาษาอังกฤษ Conformationally constrained pyrrolidinyl peptide nucleic acids: New functions and applications

2. ชื่อหัวหน้าโครงการ หน่วยงานที่สังกัด ที่อยู่ หมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail

ศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
โทรศัพท์: 022187627 ต่อ 101
โทรศัพท์เคลื่อนที่: 0839868772
โทรสาร: 022187598
อีเมล์: vtirayut@chula.ac.th

3. สาขาวิชาที่ทำการวิจัย เคมี

4. งบประมาณทั้งโครงการ 8,994,000.- (แปดล้านเก้าแสนเก้าหมื่นสี่พันบาทถ้วน)

5. ระยะเวลาดำเนินงาน 3 ปี

6. ได้เสนอโครงการนี้ หรือโครงการที่มีส่วนเหมือนกับเรื่องนี้บางส่วน เพื่อขอทุนต่อแหล่งทุนอื่นที่ใดบ้าง

☑ ไม่ได้เสนอต่อแหล่งทุนอื่น
☐เสนอต่อ_____
ชื่อโครงการที่เสนอ _____
กำหนดทราบผล(หรือสถานภาพเท่าที่ทราบ) _____

7. ปัญหาที่ทำการวิจัย และความสำคัญของปัญหา

การเข้าคู่กันตามกฎของวัตสัน-คริกระหว่างนิวคลีโอเบสคู่สมในกรดนิวคลีอิกเป็นรากฐานสำคัญของการเก็บรักษาและถ่ายทอดข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดบนโลกนี้ มันยังนำไปสู่การประยุกต์ใช้กรดนิวคลีอิกและสารเลียนแบบที่ได้จากการสังเคราะห์ในด้านต่างๆ เช่น การรักษา การตรวจ

วินิจฉัย และการพัฒนาวัสดุชนิดใหม่ โครงสร้างตามธรรมชาติของกรดนิวคลีอิกอาจไม่เหมาะสมสำหรับวัตถุประสงค์เหล่านี้เนื่องจากความเสถียรทางเคมีและชีวภาพที่จำกัด นอกจากนี้ สมบัติและหน้าที่ของกรดนิวคลีอิกที่จะนำไปใช้งานดังกล่าวอาจจำเป็นต้องมีการดัดแปลง เช่น การเพิ่มหมู่ที่ทำหน้าที่รายงานผล หรือหมู่ที่ทำหน้าที่อื่นเข้าไป แม้ว่าการดัดแปลงดังกล่าวจะทำได้ง่ายด้วยเทคโนโลยีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอในปัจจุบัน การปรับเปลี่ยนสมบัติพื้นฐานอื่นของกรดนิวคลีอิก เช่น ความแข็งแรงของการจับยึด ความจำเพาะเจาะจง และการเลือกจับกับกรดนิวคลีอิกต่างชนิดกันจะเป็นไปได้ยาก อย่างไรก็ตาม กฎการเข้าคู่เบสของวัตสัน-คริกสามารถใช้กับสารเลียนแบบสารพันธุกรรมอื่นๆ ที่ได้จากการปรับเปลี่ยนส่วนของโครงสร้างหลักของกรดนิวคลีอิก เช่น น้ำตาล (เช่น แอลเอ็นเอ) ฟอสเฟต (เช่น ฟอสฟอโรไทโอเอต) หรือแม้แต่การแทนที่โครงสร้างหลักทั้งหมด (เช่น มอร์โฟลิโน และเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิด (พีเอ็นเอ)) ในบรรดาสารเลียนแบบสารพันธุกรรมเหล่านี้ พีเอ็นเอมีความโดดเด่นเนื่องจากในแง่ของโครงสร้างทางเคมี สิ่งเดียวที่พีเอ็นเอมีเหมือนกับกรดนิวคลีอิกธรรมชาติได้แก่นิวคลีโอเบส A, T, C และ G ดังนั้นจึงไม่เป็นที่น่าประหลาดใจหากพีเอ็นเอจะแสดงสมบัติเฉพาะตัวที่ไม่พบในสารเลียนแบบกรดนิวคลีอิกชนิดอื่น เช่น การที่พีเอ็นเอปราศจากประจุ และความเสถียรต่อการถูกย่อยด้วยนิวคลีเอส อย่างไรก็ตาม สิ่งสำคัญคือพีเอ็นเอนอกจากจะสามารถจับคู่กับดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ และตัวมันเองตามกฎของวัตสัน-คริกแล้ว การเข้าคู่นั้นยังแข็งแรงและมีความจำเพาะเจาะจงมากกว่าที่พบในสารพันธุกรรมในธรรมชาติและสารสังเคราะห์เลียนแบบสารพันธุกรรมอื่นๆ ส่วนใหญ่ สมบัติเหล่านี้ทำให้พีเอ็นเอเป็นโมเลกุลที่น่าสนใจทั้งในด้านการวิจัยพื้นฐานและการนำไปใช้ประโยชน์ ในด้านต่างๆ เช่นเดียวกับดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ นอกจากนี้ ด้วยสมบัติบางประการที่แตกต่างออกไปทำให้อาจนำพีเอ็นเอไปประยุกต์ใช้ในด้านอื่นๆ ที่ไม่สามารถใช้ดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอแทนได้

ด้วยการสนับสนุนอย่างต่อเนื่องจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2545 (ทุนพัฒนานักวิจัย 2 ทุน และทุนเมธีวิจัยอาวุโส 1 ทุน) คณะผู้วิจัยได้สร้างสมองค์ความรู้เกี่ยวกับพีเอ็นเอที่มีคอนฟอร์เมชันที่ถูกจำกัดระบบใหม่ที่เรียกว่า พิร์โรลิดินิลพีเอ็นเอซึ่งประกอบด้วยหน่วยไดเพปไทด์ที่เกิดจากดี-โพรลีน และเบต้าอะมิโนแอซิดที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวน พิร์โรลิดินิลพีเอ็นเอหลายชนิดได้ถูกออกแบบ สังเคราะห์ และศึกษาสมบัติการจับยึดกับดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ และการจับตัวกันเอง โดยพบว่าการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างเพียงเล็กน้อย เช่น การหดหรือขยายขนาดของวงแหวน การปรับเปลี่ยนสเตอริโอเคมี มีผลกระทบต่อสมบัติของพิร์โรลิดินิลพีเอ็นเออย่างมาก ซึ่งทำให้ทราบถึงกฎเกณฑ์ ข้อจำกัด และโอกาสในการออกแบบพีเอ็นเอชนิดใหม่ๆ ที่สามารถควบคุมสมบัติให้เหมาะสมต่อหน้าที่การใช้งาน ตัวอย่างของระบบพิร์โรลิดินิลพีเอ็นเอที่ได้มีการศึกษาอย่างกว้างขวางที่สุดคือ acpcPNA ซึ่งประกอบด้วยหน่วยย่อยของ D-prolyl-(1*S*,2*S*)-2-aminocyclopentanecarboxylic acid ซึ่งแสดงความสามารถในการจับยึดกับดีเอ็นเอที่แข็งแรงกว่าพีเอ็นเอระบบดั้งเดิม (aegPNA) และมีความจำเพาะเจาะจงสูงกว่า ทั้งในเรื่องของการแยกแยะความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอเป้าหมายที่เป็นคู่สมและไม่เป็นคู่สม และทิศทางของการจับยึด โดยคณะผู้วิจัยได้นำ acpcPNA เพื่อไปใช้เป็นโพรบสำหรับตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ให้ความไวและความจำเพาะเจาะจงสูงด้วยเทคนิคต่างๆ เช่น surface plasmon resonance, แมสสเปกโทรเมตรี, ฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรโฟโทเมตรี และวิธีทางเคมีไฟฟ้า เป็นต้น

จากความสำเร็จของ acpcPNA ทำให้คณะผู้วิจัยได้พัฒนาข้อเสนอโครงการวิจัยนี้ขึ้นโดยมีเป้าหมายหลักคือ 1) การออกแบบ สังเคราะห์ และศึกษาสมบัติการเข้าคู่เบสของเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิด (พีเอ็นเอ) ชนิดใหม่ที่มีคอนฟอร์เมชันที่ถูกจำกัด โดยมีเป้าหมายเพื่อเพิ่มการละลายและลดการจับยึดแบบไม่จำเพาะเจาะจง โดยยังคงรักษาหรือมีสมบัติการจับยึดที่ดีขึ้น 2) การเพิ่มสมบัติและหน้าที่ใหม่ให้แก่ระบบพีเอ็นเอที่มีอยู่แล้ว ตัวอย่างเช่น การทำให้พีเอ็นเอมีสมบัติการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงที่ตอบสนองต่อการเข้าคู่กับดีเอ็นเอเป้าหมาย หรือสามารถเร่งปฏิกิริยาเคมี เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดดีเอ็นเอโดยมีการขยายสัญญาณ 3) การพัฒนาวิธีใหม่สำหรับการตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยใช้ acpcPNA เป็นโพรบ ร่วมกับเทคนิคใหม่ เช่น DNA-templated or DNA-catalyzed reaction และ/หรือวัสดุสมัยใหม่ เช่น พอลิเมอร์ และวัสดุนาโน เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ เช่น การแพทย์ อาหาร และการเกษตร 4) การทำความเข้าใจปัจจัยทางโครงสร้างที่ส่งผลต่อสมบัติการจับยึดของพีเอ็นเอโดยใช้ข้อมูลจากการทดลองร่วมกับการคำนวณทางทฤษฎี เพื่อให้บรรลุเป้าหมายหลักทั้ง 4 ประการนี้จำเป็นต้องอาศัยความร่วมมือกับกลุ่มวิจัยอื่นที่มีความเชี่ยวชาญที่หลากหลาย ทำให้เกิดการสร้างเครือข่ายวิจัยที่ยั่งยืนทั้งในระดับชาติและนานาชาติโดยใช้ระบบพีเอ็นเอเป็นจุดสนใจร่วม ผลงานที่ได้นอกจากจะสามารถตีพิมพ์ในวารสารที่มีผลกระทบสูงแล้ว ยังอาจนำไปสู่การใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ และการผลิตบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญในสาขาวิจัยทางด้านเคมีอินทรีย์/เคมีวิเคราะห์/เคมีวัสดุ ทั้งในระดับปริญญาโท ปริญญาเอก และหลังปริญญาเอก รวมกันไม่น้อยกว่า 30 คน ซึ่งจะเป็นกำลังสำคัญของการพัฒนางานวิจัยของประเทศต่อไปในอนาคต

8. วัตถุประสงค์

1. เพื่อออกแบบ สังเคราะห์ และศึกษาสมบัติการเข้าคู่เบสของเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิด (พีเอ็นเอ) ชนิดใหม่ที่มีคอนฟอร์เมชันที่ถูกจำกัด
2. เพื่อเพิ่มสมบัติและหน้าที่ใหม่ให้แก่ระบบพีเอ็นเอที่มีอยู่แล้วโดยวิธีการทางเคมี
3. เพื่อพัฒนาวิธีใหม่สำหรับการตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยใช้พีเอ็นเอเป็นโพรบและนำไปประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ อาหาร และการเกษตร
4. เพื่อทำความเข้าใจปัจจัยทางโครงสร้างที่ส่งผลต่อสมบัติการจับยึดของพีเอ็นเอโดยใช้ข้อมูลจากการทดลองร่วมกับการคำนวณทางทฤษฎี
5. เพื่อผลิตผลงานตีพิมพ์ในวารสารที่มีผลกระทบสูงและผลิตบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญในสาขาวิจัยด้านนี้
6. เพื่อสร้างเครือข่ายวิจัยที่ยั่งยืนทั้งในระดับชาติและนานาชาติโดยใช้ระบบพีเอ็นเอเป็นจุดสนใจร่วม

9. ระเบียบวิธีวิจัย

โครงการวิจัยนี้แบ่งเป็นหกโครงการย่อย ซึ่งครอบคลุมงานวิจัยเกี่ยวกับการออกแบบ การสังเคราะห์ และการศึกษาสมบัติการจับยึดกับกรดนิวคลีอิกและการจับตัวกันเองของพีเอ็นเอชนิดใหม่ที่มีคอนฟอร์เมชันจำกัด การเพิ่มหน้าที่ใหม่ของพีเอ็นเอโดยวิธีการทางเคมี การพัฒนาวิธีใหม่สำหรับการ

ตรวจสอบลำดับเบสของสารพันธุกรรมและการทำสารพันธุกรรมให้บริสุทธิ์โดยอาศัยพีเอ็นเอ และการคำนวณทางทฤษฎีเพื่ออธิบายสมบัติของพีเอ็นเอ

โครงการย่อยที่ 1: Conformationally restricted PNA with new structures and functions

โครงการนี้เกี่ยวเนื่องกับการออกแบบพิร์โรลิดินิลพีเอ็นเอระบบใหม่ หรือพิร์โรลิดินิลพีเอ็นเอที่คณะผู้วิจัยได้ศึกษามาก่อนหน้านี้แล้วแต่มีการดัดแปรทางเคมีเพื่อเพิ่มหน้าที่ใหม่ ซึ่งครอบคลุมถึง 1) การสังเคราะห์และประเมินสมบัติการจับยึดกรดนิวคลีอิกของพิร์โรลิดินิลพีเอ็นเอชนิดใหม่ที่ประกอบด้วยโพรลีนและเบต้าอะมิโนแอซิดที่มีโครงสร้างเป็นไซคลิกอีเทอร์ 2) การสังเคราะห์ การประเมินสมบัติการจับยึดกรดนิวคลีอิก การละลาย และการลดการจับยึดแบบไม่จำเพาะเจาะจง และความสามารถในการผ่านเข้าเซลล์ของพิร์โรลิดินิลพีเอ็นเอที่ดัดแปรโครงสร้างด้วยหมู่กัวนิดีนหรือหมู่อะมิโน 3) การสังเคราะห์พิร์โรลิดินิลพีเอ็นเอที่ติดฉลากสารเรืองแสงหนึ่งถึงสองชนิด และศึกษาสมบัติการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงที่ตอบสนองต่อการเกิดไฮบริดกับดีเอ็นเอ 4) การสังเคราะห์พิร์โรลิดินิลพีเอ็นเอที่มีเบสที่ไม่เป็นมาตรฐานอย่างน้อย 2 ชนิด และศึกษาสมบัติการจับยึดกับดีเอ็นเอ และ 5) การสังเคราะห์พิร์โรลิดินิลพีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วยสารที่ว่องไวทางเคมีไฟฟ้าเพื่อนำไปเป็นโพรบสำหรับระบบตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะเจาะจงสูง

โครงการย่อยที่ 2: New approaches to improve the sensitivity of PNA-based DNA sequence detection

โครงการนี้เกี่ยวเนื่องกับการพัฒนาระบบการขยายสัญญาณเพื่อเพิ่มความไวในการตรวจวัดดีเอ็นเอโดยอาศัยพีเอ็นเอ และการนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบลำดับเบสของสารพันธุกรรม โดยแบ่งออกเป็นแนวทางต่างๆ คือ 1) การออกแบบและสังเคราะห์พีเอ็นเอที่เร่งปฏิกิริยาได้และนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบลำดับเบสของสารพันธุกรรมแบบมีการขยายสัญญาณ 2) การพัฒนาพีเอ็นเอโพรบที่มีสมบัติในการสร้างพันธะโคเวเลนต์กับดีเอ็นเอเมื่อถูกกระตุ้นโดยวิธีการที่เหมาะสมเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการเพิ่มความไวในการตรวจวัดดีเอ็นเอ 3) การพัฒนาปฏิกิริยาของพีเอ็นเอโพรบที่อาศัยดีเอ็นเอเทมเพลต 4) การพัฒนาระบบตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักการของ strand displacement probe 5) การพัฒนาระบบการตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอฐานกระดาษ และ 6) การพัฒนาระบบตรวจลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยใช้พีเอ็นเอโพรบร่วมกับวัสดุนาโนแบบใหม่ที่อาศัยการเลือกเกิดปฏิกิริยาที่แตกต่างกันระหว่างดีเอ็นเอและพีเอ็นเอ

โครงการย่อยที่ 3: PNA-conjugated polymer brushes as platforms for DNA sequence determination

โครงการนี้เป็นการสังเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์ของพอลิเมอร์บรัชที่ติดอยู่บนพื้นผิวของวัสดุต่างๆ เช่น แผ่นทอง อนุภาคนาโนของทอง หรือขั้วไฟฟ้าเคลือบทอง และตรึงพีเอ็นเอเข้ากับพื้นผิวเหล่านี้เพื่อนำไปใช้ในการตรวจวัดดีเอ็นเอแบบจำเพาะเจาะจงโดยอาศัยเทคนิค surface plasmon resonance เทคนิคทางเคมีไฟฟ้า หรือเทคนิคการวัดดูดกลืนแสงหรือฟลูออเรสเซนส์

โครงการย่อยที่ 4: Signal enhancement in PNA based sensors by utilizing electron transfer/energy transfer upon target binding

โครงการนี้เกี่ยวเนื่องกับการพัฒนาไบโอเซ็นเซอร์ที่มีความว่องไวและความจำเพาะเจาะจงของการตรวจวัดที่สูงและสามารถตรวจวัดได้แบบ โดยอาศัยพิร์โรลิดินิลพีเอ็นเอเป็นโพรบ โดยแบ่งออกเป็นสองส่วนย่อยคือ ๑) การใช้กราฟีนหรือวัสดุคอมโพสิตระหว่างกราฟีน-อนุภาคนาโนของโลหะเพื่อการตรวจวัดดีเอ็นเอโดยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้าโดยอาศัยพีเอ็นเอโพรบ และ ๒) การพัฒนาพีเอ็นเอโพรบที่ติดฉลากเรืองแสงร่วมกับดีเอ็นเอแอพตาเมอร์เพื่อใช้ในการตรวจวัดโมเลกุลเป้าหมายโดยอาศัยหลักการของ FRET โดยทั้งสองส่วนจะเริ่มจากการออกแบบระบบ ศึกษาอิทธิพลของตัวแปรต่างๆ ศึกษาประสิทธิภาพของระบบ แล้วจึงนำไปประยุกต์ใช้งาน

โครงการย่อยที่ 5: Bioconjugation of anionic magnetic nanoparticle with PNA for DNA purification

โครงการนี้จะมุ่งเน้นการพัฒนาอนุภาคแม่เหล็กขนาดนาโนที่ตรึงด้วยพิร์โรลิดินิลพีเอ็นเอโดยผ่านชั้นของพอลิเมอร์ที่มีประจุลบ เพื่อนำไปใช้ในการทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ โดยเริ่มจากการสังเคราะห์อนุภาคแม่เหล็ก การดัดแปรพื้นผิวอนุภาคด้วยพอลิเมอร์ที่มีประจุลบเช่นพอลิอะคริลิกแอซิด การตรึงพีเอ็นเอกับหมู่คาร์บอกซิเลตโดยตรง หรือผ่านอันตรกิริยาระหว่างไบโอติน-สเตรปตาวิดิน และนำไปศึกษาประสิทธิภาพในการจับดีเอ็นเอจากสารละลายและความสามารถในการนำกลับมาใช้ซ้ำ

โครงการย่อยที่ 6: A theoretical study of structural and energetic properties of peptide nucleic acid

โครงการนี้เป็นการสร้างแบบจำลองของพิร์โรลิดินิลพีเอ็นเอโดยอาศัยเทคนิค Molecular Dynamics Simulation และการคำนวณทางเคมีควอนตัม เพื่อนำไปใช้ในการทำนายโครงสร้างและคำนวณพลังงานของระบบ เพื่อนำไปใช้อธิบายสมบัติบางประการของพิร์โรลิดินิลพีเอ็นเอ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง acpcPNA และ C4’-อีพิเมอร์ของมันคือ epi-acpcPNA เช่น ความเสถียรที่แตกต่างกันของไฮบริดระหว่าง PNA-DNA, PNA-RNA และ PNA-PNA และการเกิด charge transfer ใน PNA duplex เปรียบเทียบกับ DNA duplex

10. ผลการดำเนินงาน

ผลการดำเนินการในภาพรวมตัวงานเสร็จสมบูรณ์ตามข้อเสนอโครงการ และบรรลุวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ในเชิงขององค์ความรู้ที่เกิดขึ้น กล่าวคือ 1) การออกแบบ สังเคราะห์ และศึกษาสมบัติการเข้าคู่เบสของเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิด (พีเอ็นเอ) ชนิดใหม่ที่มีคอนฟอร์เมชันที่ถูกจำกัด โดยมีเป้าหมายเพื่อเพิ่มการละลายและลดการจับยึดแบบไม่จำเพาะเจาะจง โดยยังคงรักษาหรือมีสมบัติการจับยึดที่ดีขึ้น 2) การเพิ่มสมบัติและหน้าที่ใหม่ให้แก่ระบบพีเอ็นเอที่มีอยู่แล้ว ตัวอย่างเช่น พีเอ็นเอมีสมบัติการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงที่ตอบสนองต่อการเข้าคู่กับดีเอ็นเอเป้าหมาย พีเอ็นเอโพรบที่ตอบสนองทางเคมีไฟฟ้า หรือพีเอ็นเอโพรบที่สามารถเกิดปฏิกิริยาเชื่อมขวางกับดีเอ็นเอหลังการกระตุ้นที่เหมาะสม ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพสูง 3) วิธีการใหม่สำหรับการตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยใช้ acpcPNA เป็นโพรบ ร่วมกับเทคนิคใหม่ เช่น DNA-templated or DNA-catalyzed reaction และ/หรือวัสดุสมัยใหม่ เช่น พอลิเมอร์ และวัสดุนาโน เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ เช่น

การแพทย์ อาหาร และการเกษตร 4) ความเข้าใจปัจจัยทางโครงสร้างที่ส่งผลต่อสมบัติการจับยึดของพีเอ็นเอโดยใช้ข้อมูลจากการทดลองร่วมกับการคำนวณทางทฤษฎี

ผลลัพธ์เชิงประจักษ์ที่ได้จากงานวิจัยนี้คือผลงานตีพิมพ์จำนวนกว่า 20 เรื่องในวารสารวิชาการระดับนานาชาติที่มีคุณภาพสูง นับถึงวันที่รายงานมีผลงานที่ตีพิมพ์และได้รับการตอบรับให้ตีพิมพ์ถึงวันที่รายงานจำนวนรวม 22 บทความ และอยู่ระหว่างรอผลการพิจารณาและเตรียมต้นฉบับบทความอีกไม่น้อยกว่า 8 บทความ ในเชิงปริมาณ ผลงานที่ได้รับการตีพิมพ์หรือตอบรับแล้วเป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 1 จำนวน 14 บทความ โครงการย่อยที่ 2 จำนวน 3 บทความ โครงการย่อยที่ 3 จำนวน 2 บทความ โครงการย่อยที่ 4 จำนวน 1 บทความ โครงการย่อยที่ 5 จำนวน 2 บทความ โครงการย่อยที่ 6 ยังไม่มีผลงานตีพิมพ์ ในเชิงคุณภาพ มีบทความที่ได้ลงตีพิมพ์ในวารสารที่มี IF2016 มากกว่าหรือเท่ากับ 10 จำนวน 2 บทความ, อยู่ระหว่าง 6.00–9.99 จำนวน 2 บทความ, อยู่ระหว่าง 4.00–5.99 จำนวน 6 บทความ, อยู่ระหว่าง 2.00–3.99 จำนวน 10 บทความ, ต่ำกว่า 2.00 จำนวน 2 บทความโดยหนึ่งในนี้เป็นวารสารใหม่ จึงยังไม่มีข้อมูลในฐานข้อมูล ISI ข้อมูลสรุป output ในด้านอื่นๆ เป็นดังแสดงในตารางที่ 1 และ 2 องค์ความรู้ที่ได้นอกจากจะสามารถตีพิมพ์ในวารสารที่มีผลกระทบสูงแล้ว ยังมีศักยภาพในเชิงพาณิชย์ โดยคณะผู้วิจัยได้พยายามต่อยอดโดยการสร้างความร่วมมือกับทั้งนักวิจัยและภาคเอกชนเพื่อพัฒนาสู่การนำใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ โดยได้มีบริษัทต่างประเทศที่ให้ความสนใจเทคโนโลยีนี้แล้ว 2 บริษัท และกำลังอยู่ระหว่างการทดสอบการใช้งานพีเอ็นเอ

ในด้านของการสร้างคน โครงการวิจัยนี้อาศัยพิร์โรลิดินิลพีเอ็นเอเป็นจุดสนใจร่วมในการดึงนักวิจัยที่มีความเชี่ยวชาญจากหลายสาขาได้แก่ เคมีอินทรีย์สังเคราะห์ เคมีวิเคราะห์ เคมีพอลิเมอร์ นาโนเทคโนโลยี ชีววิทยาโมเลกุล เคมีคำนวณ และการเชื่อมโยงระหว่างเคมีกับชีววิทยามาทำงานร่วมกัน นอกจากนี้ยังได้มีส่วนในการสร้างบุคลากรด้านวิจัยซึ่งรวมถึงนักวิจัย 20 คนและนักศึกษาระดับปริญญาโท-เอกอย่างน้อย 20 คน จาก 7 สถาบัน และเกิดเครือข่ายงานวิจัยที่ยั่งยืนทั้งในระดับชาติและนานาชาติ และการผลิตบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญในสาขาวิจัยทางด้านเคมีอินทรีย์/เคมีวิเคราะห์/เคมีวัสดุ ทั้งในระดับปริญญาโท ปริญญาเอก และหลังปริญญาเอก รวมกันไม่น้อยกว่า 30 คน ซึ่งจะเป็นกำลังสำคัญของการพัฒนางานวิจัยของประเทศต่อไปในอนาคต

ตารางที่ 1 สรุปผลงานที่ได้ตลอดโครงการเชิงปริมาณ (ตัวเลขในวงเล็บคือเป้าหมายที่ตั้งไว้ในข้อเสนอโครงการ)

ผลผลิต	รวม
1 จำนวนนักวิจัยที่สร้างจากโครงการ	
1.1 สถาบันเดียวกัน	6
1.2 ต่างสถาบัน	15
1.3 นักศึกษาระดับปริญญาเอก[1]	11
1.4 นักศึกษาระดับปริญญาโท[2]	7
1.5 ผู้ช่วยวิจัย	2
2. จำนวนผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ[3]	22 (23)
3. จำนวนผลงานการจดสิทธิบัตรในประเทศ[4]	1 (1)

[1]นับเฉพาะผู้ที่รับทุนผู้ช่วยวิจัยจากโครงการ หากนับนักศึกษาที่ทำงานเป็นส่วนหนึ่งของโครงการแต่รับทุนจากแหล่งอื่นจะมีจำนวนมากกว่านี้อย่างน้อย 1 เท่าตัว

[2]นับเฉพาะผู้ที่รับทุนผู้ช่วยวิจัยจากโครงการ หากนับนักศึกษาที่ทำงานเป็นส่วนหนึ่งของโครงการแต่รับทุนจากแหล่งอื่นจะมีจำนวนมากกว่านี้

[3]เฉพาะที่ตีพิมพ์หรือได้รับตอบรับให้ตีพิมพ์แล้ว ยังมีที่อยู่ระหว่างรอผลการพิจารณาและเตรียมบทความอีก 8 เรื่อง

[4]อนุสิทธิบัตร

ตารางที่ 2 สรุปผลงานที่ได้ตลอดโครงการเชิงคุณภาพ (แยกตามโครงการย่อย)

โครงการย่อย	จำนวนบทความที่มี impact factor 2016 ในช่วงที่ระบุ					
	<2.00	2.00-3.99	4.00-5.99	6.00-9.99	≥10.00	Total
1	-	7	5	-	2	14
2	1	1	-	1	-	3
3	-	1	1	-	-	2
4	-	-	-	1	-	1
5	1	1	-	-	-	2
6	-	-	-	-	-	0
Total	2	10	6	2	2	22

สัญญาเลขที่ DPG5780002

โครงการ พิร์โรลิดินิลเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่มีคอนฟอร์เมชันถูกจำกัด:
หน้าที่ใหม่และการประยุกต์ใช้

รายงานฉบับสมบูรณ์

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน นายธีรยุทธ วิไลวัลย์

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 17 มีนาคม 2559 **ถึงวันที่** 16 มีนาคม 2560 ขยายเวลาถึง 16 กันยายน 2560

1. เนื้อหางานวิจัย

โครงการวิจัยนี้แบ่งเป็นหกโครงการย่อย ซึ่งครอบคลุมงานวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาพิร์โรลิดินิลเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่มีคอนฟอร์เมชันถูกจำกัดที่มีสมบัติและหน้าที่ใหม่ นอกเหนือจากการจับยึดกับดีเอ็นเอดังที่เคยได้มีการศึกษามาก่อนหน้านี้แล้ว รวมทั้งการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อการตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอและการใช้งานด้านอื่นๆ เช่นการสกัดแยกดีเอ็นเอ รายละเอียดการดำเนินงานของแต่ละโครงการสามารถสรุปได้ดังนี้

โครงการย่อยที่ 1 : Conformationally restricted PNA with new structures and functions

โครงการนี้เกี่ยวเนื่องกับการออกแบบพิร์โรลิดินิลพีเอ็นเอระบบใหม่ รวมทั้งพิร์โรลิดินิลพีเอ็นเอที่คณะผู้วิจัยได้ศึกษามาก่อนหน้านี้แล้วแต่มีการดัดแปรทางเคมีเพื่อเพิ่มหน้าที่ใหม่ ซึ่งประกอบด้วยโครงการย่อยดังนี้

1.1) พิร์โรลิดินิลพีเอ็นเอชนิดใหม่ที่ประกอบด้วยโพรลีนและเบต้าอะมิโนแอซิดที่มีโครงสร้างเป็นไซคลิกอีเทอร์: งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสังเคราะห์และศึกษาสมบัติการจับยึดกับดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอของพีเอ็นเอระบบใหม่ที่มีกรดเบต้าอะมิโนชนิด (2*S*,3*S*)-3-aminotetrahydrofuran-2-carboxylic acid (ATFC) และ (2*S*,3*S*)-3-amino-oxetane-2-carboxylic acid (AOC) เป็นตัวเชื่อม โดยมีสมมติฐานว่าการเพิ่มอะตอมของออกซิเจนเข้าไปในโครงสร้างหลักจะทำให้ได้พิร์โรลิดินิลพีเอ็นเอที่มีสภาพขั้วเพิ่มขึ้นอันจะเป็นการช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำและลดการเกิดแรงกระทำแบบไม่จำเพาะเจาะจงกับวัสดุที่ไม่ชอบน้ำ โดยไม่ทำให้ความสามารถในการจับยึดกับดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงไป โดยได้สามารถสังเคราะห์พีเอ็นเอระบบใหม่ทั้งสองชนิดได้แก่ atfcPNA และ aocPNA ได้เป็นผลสำเร็จ และได้ศึกษาผลการจับยึดกับดีเอ็นเอ/อาร์เอ็นเอ ซึ่งพบว่า atfcPNA มีสมบัติใกล้เคียงกับ acpcPNA แต่ aocPNA จับยึดได้ไม่แข็งแรงเท่า acpcPNA ซึ่งอธิบายได้ด้วยแบบจำลองโมเลกุล รวมทั้งยังได้ศึกษาผลการละลายและการลดแรงกระทำแบบไม่จำเพาะเจาะจงของ atfcPNA ซึ่งพบว่ามีการละลายใกล้เคียงกับ acpcPNA แต่มีแรงกระทำแบบไม่จำเพาะเจาะจงที่ลดลง

1.2) พิร์โรลิดินิลพีเอ็นเอชนิดใหม่ที่มีโครงสร้างหลักเป็นประจุบวก: งานวิจัยในส่วนนี้จะเน้นการดัดแปร backbone ของ acpcPNA ด้วย modifier ที่มีสมบัติชอบน้ำ และ/หรือมีประจุบวก ได้แก่ หมู่ไฮดรอกซิล หมู่อะมิโน และหมู่กัวนิดิโน โดยผ่านตัวเชื่อมที่เป็นสายโซ่คาร์บอนหรือพอลิเอทิลีนไกลคอล (PEG) สำหรับการติดไปบนโครงสร้างหลักของ acpcPNA โดยมีเป้าหมายเพื่อให้ได้พีเอ็นเอที่ละลายน้ำได้ดีขึ้นและอาจจับยึดกับดีเอ็นเอได้แข็งแรงขึ้นเนื่องจากแรงดึงดูดระหว่างประจุบวกบนสายของพีเอ็นเอกับประจุลบของดีเอ็นเอ นอกจากนี้ประจุบวกและสายพอลิเอทิลีนไกลคอลอาจช่วยให้พีเอ็นเอสามารถซึมผ่านเข้าเซลล์ได้ดีขึ้น ในงานวิจัยได้พัฒนาวิธีการสังเคราะห์พิร์โรลิดินิลพีเอ็นเอที่ดัดแปรด้วย modifier ที่เป็น hydroxyalkyl, aminoalkyl และ guanidinoalkyl และศึกษาสมบัติการจับยึดกับดีเอ็นเอ โดยพบว่าพีเอ็นเอที่ผ่านการดัดแปรยังคงความสามารถในการจับยึดกับดีเอ็นเอที่ดีและมีความจำเพาะเจาะจงต่อการจับยึดที่สูง และมีการละลายน้ำที่ดีขึ้น นอกจากนี้ยังได้สังเคราะห์พีเอ็นเอที่ผ่านการดัดแปรและติดฉลากด้วยฟลูออเรสซีนเพื่อนำไปศึกษา

การเข้าสู่เซลล์โดยเทคนิค flow cytometry และ fluorescence microscopy โดยพบว่าพีเอ็นเอที่ผ่านการดัดแปรด้วย guanidine (-$(CH_2)_4$NHC(=NH)NH_2) สามารถเข้าสู่เซลล์ของมนุษย์ (HEK293T) ได้ดีกว่าพีเอ็นเอที่ไม่ได้ผ่านการดัดแปร จึงเป็นการปูทางไปสู่การใช้พิร์โรลิดินิลพีเอ็นเอกับงานวิจัยในเซลล์ต่อไปในอนาคต

1.3) การสังเคราะห์พิร์โรลิดินิลพีเอ็นเอที่ติดฉลากสารเรืองแสง และการศึกษาสมบัติการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงที่ตอบสนองต่อการเกิดไฮบริดกับดีเอ็นเอ: งานวิจัยในส่วนนี้เป็นการพัฒนาพีเอ็นเอที่ติดฉลากเรืองแสงที่สามารถเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงที่ตอบสนองต่อการเกิดไฮบริดระหว่างพีเอ็นเอกับดีเอ็นเอ โดยงานวิจัยนี้ได้พัฒนา doubly-end-labeled acpcPNA beacon โดยอาศัยการติดฉลากเรืองแสงร่วมกับตัวดับแสงที่มีความสามารถในการเกิด end-stacking ที่ตำแหน่งปลายสายของ acpcPNA ที่แสดงการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงที่ชัดเจนและมีความจำเพาะเจาะจงเมื่อจับยึดกับดีเอ็นเอเป้าหมายเนื่องจากการเกิด end stacking ของ quencher ที่คู่เบสตรงปลายของ PNA·DNA duplex นอกจากนี้ยังได้มีความพยายามพัฒนาพีเอ็นเอโพรบเรืองแสงที่ตอบสนองต่อการเกิดไฮบริดกับดีเอ็นเอจาก acpcPNA ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงที่ตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อม ได้แก่ Nile red, 3,6-diaminocarbazole (DAC) และ styryl dyes โดยพบว่าพีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วย DAC แสดงการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงที่ชัดเจน (>10 เท่า) และสามารถแยกแยะความแตกต่างของ single mismatch DNA จาก complementary DNA ได้ดี ในขณะที่ Nile red และ styryl dye เมื่อมี single base mismatch หรือ insertion/abasic site ในสายของดีเอ็นเอจะให้สัญญาณที่สูงกว่าในกรณีที่เป็น complementary ซึ่งล้วนแต่เป็นองค์ความรู้ที่ใหม่และนำไปใช้ประโยชน์ได้

1.4) การสังเคราะห์พิร์โรลิดินิลพีเอ็นเอที่มีเบสที่ไม่ใช่เบสมาตรฐาน และศึกษาสมบัติการจับยึดกับดีเอ็นเอ: งานวิจัยนี้งานวิจัยนี้เป็นการสังเคราะห์ acpcPNA ที่มีนิวคลีโอเบสที่ถูกดัดแปรด้วยฟลูออโรฟอร์และการศึกษาสมบัติเชิงแสงของมัน โดยแบ่งเป็นสองแนวทางคือ การสังเคราะห์ผ่าน acpcPNA monomer ที่มีนิวคลีโอเบสที่ถูกดัดแปรด้วยฟลูออโรฟอร์ (ในที่นี้คือ 8-pyrenylethynyl adenine (A^{PyE})) และการทำปฏิกิริยา post synthetic modification ของพีเอ็นเอที่มีเบส iodouridine (U^{I}) โดยปฏิกิริยา Pd-catalyzed cross coupling โดยงานในส่วนแรกสามารถสังเคราะห์พีเอ็นเอที่มีเบส A^{PyE} ได้สำเร็จ และยืนยันได้ว่าเบส A^{PyE} ในพีเอ็นเอแสดงการตอบสนองต่อการเข้าคู่เบสระหว่าง A^{PyE} บนสายพีเอ็นเอกับ dT บนสายดีเอ็นเออย่างจำเพาะเจาะจง โดยทำให้การเรืองแสงเพิ่มขึ้น และเมื่อมี mismatch base การเรืองแสงจะใกล้เคียงกับเดิมหรือลดลง เนื่องจากการเกิด π-π stacking ระหว่างไพรีนใน A^{PyE} กับคู่เบสใน PNA-DNA duplex งานในส่วนหลังได้แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้วิธีการดังกล่าวในการสังเคราะห์พีเอ็นเอที่มี modified base ได้อย่างหลากหลายและมีประสิทธิภาพสูงโดยไม่ต้องสังเคราะห์โมโนเมอร์แยกต่างหาก โดยตัวอย่างของหมู่ฟังก์ชันที่สามารถติดได้สำเร็จได้แก่หมู่ไทโอฟีน เบนโซไทโอฟีน เบนโซฟิวแรน และ ไพรีนิลอีทายน์ พร้อมทั้งยังได้ศึกษาสมบัติเชิงแสงเบื้องต้นของระบบพีเอ็นเอเหล่านี้ โดยพบว่าพีเอ็นเอที่มีหมู่ ไพรีนิลอีทายน์ ต่อกับ U ให้การเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงแบบเพิ่มขึ้น (signal on) ประมาณ 5 เท่าเมื่อเกิดไฮบริดกับดีเอ็นเอ

1.5) การสังเคราะห์พิร์โรลิดินิลพีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วยสารที่ว่องไวทางเคมีไฟฟ้าเพื่อนำไปเป็นโพรบสำหรับระบบตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะเจาะจงสูง: งานวิจัยในส่วนนี้เกี่ยวข้องกับการพัฒนา apcpPNA ที่ติดฉลากด้วย anthraquinone เพื่อเป็น redox-active probe สำหรับตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า โดยสามารถใช้ redox-active probe ดังกล่าวร่วมกับขั้วไฟฟ้าชนิด screen printed carbon electrode (SPCE) ที่ดัดแปรด้วยพอลิเมอร์ที่มีประจุบวก และการนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจดีเอ็นเอของไวรัสโรคกุ้ง (WSSV) ที่ผ่านการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค LAMP โดยมีช่วงที่เป็นเส้นตรงที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอระหว่าง 0.35-50 nM โดยมีค่า LOD ($3SD_{blank}$/Slope) เป็น 0.1. nM (S/N = 10) ตัวเลขนี้แม้จะไม่ต่ำมากนัก แต่ก็อยู่ในช่วงใกล้เคียงกับเทคนิคการตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอเชิงไฟฟ้าที่ไม่ได้อาศัย

การขยายสัญญาณอื่นๆ และเนื่องจากขั้วที่ใช้มีขนาดเล็ก เทคนิคนี้จึงใช้ตัวอย่างปริมาณน้อยมาก เทียบเท่ากับ <10 fmol หรือ <1 ng สำหรับ ssDNA ที่มีความยาว 300 เบส ซึ่งน่าจะว่องไวพอที่จะนำไปใช้ตรวจวัดดีเอ็นเอที่ผ่านการเพิ่มปริมาณมาแล้ว และที่สำคัญคือเทคนิคนี้แสดงการเลือกจำเพาะที่สูงมาก นอกจากนี้ยังได้นำพีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วย redox-active label ไปเป็นโพรบสำหรับการวิเคราะห์ดีเอ็นเออื่นเช่น HPV, miRNA เป็นต้น โดยเป็นงานวิจัยร่วมกับกลุ่มวิจัยอื่น เช่น กับโครงการย่อยที่ 4 และกับ ศ.ดร. อรวรรณ ชัยลภากุล ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (เมธีวิจัยอาวุโส สกว.)

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวเนื่องกับโครงการย่อยนี้ทั้งหมดที่ได้รับการตีพิมพ์แล้วมี 14 เรื่อง ได้แก่ ผลงานลำดับที่ 2.1.1.1, 2.1.1.2, 2.1.1.4, 2.1.1.6, 2.1.1.7, 2.1.1.8, 2.1.1.9, 2.1.1.10, 2.1.1.15, 2.1.1.17, 2.1.1.18, 2.1.1.19, 2.1.1.20, 2.1.1.22 โดยผลงานลำดับที่ 2.1.1.6 ที่เป็นบทความรีวิวที่เกี่ยวเนื่องกับผลงานของทุกโครงการและผลงานที่มีมาก่อนหน้านี้ และได้ยื่นจดอนุสิทธิบัตร 1 เรื่อง (2.1.3.1) นอกจากนี้ยังมีผลงานที่อยู่ระหว่างการรอพิจารณาอีก 2 เรื่องคือผลงานลำดับที่ 2.1.1.b, 2.1.1.e อยู่ระหว่างเตรียมต้นฉบับบทความอีก 1 เรื่องคือ 2.1.1.f และกำลังรวบรวมข้อมูลเพื่อจัดเตรียมต้นฉบับอีกอย่างน้อย 1 เรื่อง

โครงการย่อยที่ 2 : New approaches to improve the sensitivity of PNA-based DNA sequence detection

โครงการนี้เกี่ยวเนื่องกับการพัฒนาระบบตรวจสอบลำดับเบสของสารพันธุกรรมที่มีความว่องไวและจำเพาะเจาะจงสูงโดยอาศัยพิร์โรลิดินิลพีเอ็นเอโพรบที่ทำหน้าที่พิเศษ โดยแบ่งออกเป็นโครงการย่อยคือ

2.1) การออกแบบและสังเคราะห์พีเอ็นเอหรือดีเอ็นเอที่เร่งปฏิกิริยาได้และนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบลำดับเบสของสารพันธุกรรมแบบมีการขยายสัญญาณ: งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนาโพรบที่มีความสามารถในการจับยึดกับดีเอ็นเอเป้าหมายอย่างจำเพาะเจาะจงและแสดงความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาโดยการดัดแปรพีเอ็นเอ(หรือดีเอ็นเอ)ให้มี catalytic function โพรบดังกล่าวอาจจะนำไปใช้ในการตรวจวัดลำดับเบสของสารพันธุกรรมแบบมีการขยายสัญญาณได้ โดยไม่ต้องอาศัยเอนไซม์ จากรายงานครั้งก่อนหน้านี้ได้รายงานถึงการสังเคราะห์อนุภาคขนาดนาโนของ Pt (PtNP) ที่ถูกทำให้เสถียรด้วยดีเอ็นเอ (PtNP-DNA)1 และได้ศึกษาเบื้องต้นถึงการเร่งปฏิกิริยาเกิดสีที่คล้ายกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส แต่ยังไม่ได้ดำเนินงานในส่วนนี้เพิ่มเติมเนื่องจากประสบปัญหาในการสังเคราะห์ PtNP-DNA ที่มี well-defined sequence ในปริมาณมากพอ

2.2) การพัฒนาพีเอ็นเอโพรบที่มีสมบัติในการสร้างพันธะโคเวเลนต์กับดีเอ็นเอเมื่อถูกกระตุ้นโดยวิธีการที่เหมาะสมเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการเพิ่มความไวในการตรวจวัดดีเอ็นเอ: ในงานวิจัยได้พัฒนา functional acpcPNA probe ที่ถูก modify ด้วย 3-(2-furyl)propionic acid โดยการเกิด crosslink กับดีเอ็นเอคู่สมเมื่อผ่านการกระตุ้นด้วย N-bromosuccinimide (NBS) โดยมีเป้าหมายเพื่อเพิ่มความแข็งแรงในการจับยึดกับดีเอ็นเอ ซึ่งอาจนำไปใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอได้ งานที่ได้ดำเนินการไปคือการศึกษาการเกิด crosslink ระหว่างพีเอ็นเอที่ถูกดัดแปรด้วยฟิวแรนที่ตำแหน่งกลางสายกับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สมกันโดยเทคนิค HPLC, gel electrophoresis และ mass spectrometry ซึ่งไม่พบว่าเกิดการ crosslink แต่เมื่อย้ายตำแหน่งของฟิวแรนมาติดที่ปลายสายของพีเอ็นเอพบว่าสามารถเกิดการ crosslink ได้ จากการศึกษาโดย HPLC, T_m และ gel electrophoresis และจะศึกษาชนิดและตำแหน่งของเบสที่มีผลต่อการเกิด crosslink โดยพบว่าเบส C จะเกิด crosslink ได้ดีที่สุด ตามด้วยเบส A, G และเบส T ไม่เกิดการ crosslink นอกจากนี้ยังมีความพยายามทำให้เกิด crosslink กับ DNA duplex แต่ยังไม่ประสบความสำเร็จ อย่างไรก็ตาม พีเอ็นเอที่เกิดการ crosslink ได้นี้มีศักยภาพที่จะนำไปใช้ในการตรวจวัดดีเอ็นเอต่อไป

2.3) การพัฒนาปฏิกิริยาของพีเอ็นเอโพรบที่อาศัยดีเอ็นเอเทมเพลต: งานวิจัยนี้พยายามจะพัฒนาระบบที่จะเร่งการทำปฏิกิริยาระหว่างพีเอ็นเอสองสาย ซึ่งติดฉลากด้วยหมู่ที่ว่องไวต่อปฏิกิริยาไว้ที่ปลายคนละด้าน โดยอาศัย DNA template ซึ่งจะนำพีเอ็นเอทั้งสองสายมาอยู่ใกล้กัน จึงเกิดปฏิกิริยาได้เร็วขึ้น โดยได้พยายามพัฒนาระบบ DNA-catalyzed reaction ระบบใหม่ จากหลายๆ คู่ปฏิกิริยา แต่ผลการวิเคราะห์โดยเทคนิค MALDI-TOF mass spectrometry ในทุกกรณียังถือว่าเกิดผลิตภัณฑ์ที่ต้องการในปริมานน้อยมาก และการมีหรือไม่มี DNA template ไม่ทำให้เกิดปฏิกิริยาที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จากปัญหาดังกล่าว ประกอบกับ impact ของงานที่อาจจะไม่สูงมากนักเมื่อเทียบกับงานที่ใช้ DNA ที่มีผู้ศึกษากันมาค่อนข้างมากแล้ว คณะผู้วิจัยจึงได้หยุดดำเนินการโครงการย่อยนี้และไปเพิ่มเนื้องานในส่วนอื่นแทน

2.4) การพัฒนาระบบตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักการของ strand displacement probe: งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนา self-reporting fluorescence PNA probe สำหรับการตรวจวัดลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักการของ strand displacement ซึ่งตัวโพรบจะประกอบด้วยสองส่วนคือ sensor strand ซึ่งเป็นพีเอ็นเอโพรบที่ติดฉลากเรืองแสง กับ quencher strand ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่ติดด้วยตัวดับแสง โดยโพรบนี้จะออกแบบให้เข้าคู่กัน ซึ่งจะทำให้เกิดการระงับสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ในภาวะปกติ เมื่อมีดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สมกับ PNA ที่เป็น sensor strand อยู่ด้วย ดีเอ็นเอจะเข้าไปแทนที่ quencher strand เกิดเป็นไฮบริดคู่ใหม่ การแทนที่ของ quencher strand นี้จะทำให้สัญญาณฟลูออเรสเซนต์เพิ่มขึ้น โดยต้องออกแบบให้ displacement probe มีความเสถียรน้อยกว่า hybrid ที่เกิดขึ้นใหม่ ซึ่งทำได้โดยการใช้ quencher strand สายสั้น หรือที่มี base mismatch อยู่ด้วย ผลการศึกษาพบว่า strand displacement probe ที่ได้จากระบบ acpcPNA จะเกิดการแทนที่ด้วยดีเอ็นเอคู่สม พร้อมกับสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่เพิ่มขึ้นจากโพรบเมื่อเริ่มต้น 8.3–14.6 เท่า ในขณะที่ดีเอ็นเอที่ไม่เป็นคู่สม รวมทั้งที่มีลำดับเบสผิดไปหนึ่งตำแหน่งจะให้การคืนสัญญาณที่น้อยกว่ามาก โดยอยู่ในช่วง 1.0–2.4

2.5) การพัฒนาระบบการตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอฐานกระดาษ: งานวิจัยในส่วนนี้เป็นการพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดดีเอ็นเอจากกระดาษเซลลูโลส ซึ่งเกี่ยวข้องกับการพัฒนากระบวนการตรึงพีเอ็นเอโพรบบนกระดาษเซลลูโลส และการตรวจวัดการจับยึดกับดีเอ็นเอที่ติดฉลากเรืองแสง และกับดีเอ็นเอที่ไม่ติดฉลากร่วมกับการย้อมด้วยสี Azure A ซึ่งจะจับได้กับเฉพาะดีเอ็นเอ ทำให้เกิดสีน้ำเงินขึ้นบริเวณที่มีดีเอ็นเออยู่บนกระดาษ ทำให้สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า โดยได้ตีพิมพ์ผลการทดลองเบื้องต้นซึ่งเป็นการพิสูจน์หลักการไปแล้วว่าสามารถตรวจวัดดีเอ็นเอสังเคราะห์ได้อย่างเลือกจำเพาะ แต่มีปัญหาคือความไวของการตรวจวัดยังไม่เพียงพอต่อการใช้งานกับตัวอย่างจริง จึงได้มีการพัฒนาระบบตรวจวัดให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นโดยอาศัยเทคนิคการขยายสัญญาณด้วยเอนไซม์ ซึ่งเป็นงานวิจัยร่วมกับกลุ่มวิจัยของ ศ.ดร.สุทัศน์ ฟู่เจริญ ศูนย์วิจัยธาลัสซีเมีย สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล โดยการตรึงพีเอ็นเอโพรบสองชนิดสำหรับแยกแยะดีเอ็นเอ HbE (G->A mutation ที่ตำแหน่ง codon 26) จากดีเอ็นเอปกติบนกระดาษเซลลูโลส จากนั้นจึงนำไปไฮบริไดซ์กับ biotinylated oligodeoxynucleotide target และทำปฏิกิริยาสร้างสีด้วย ALP-streptavidin โดยสามารถแยกแยะความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอปกติกับ HbE ในตัวอย่างดีเอ็นเอที่เป็น PCR product ที่ความยาว 279 และ 600 คู่เบสได้อย่างชัดเจนที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งไม่สามารถทำได้ด้วยดีเอ็นเอโพรบ นอกจากนี้ยังได้มีความพยายามขยายขอบเขตของงานต่อไปโดยการสังเคราะห์และตรึงพีเอ็นเอโพรบที่ออกแบบมาสำหรับการตรวจวัดการกลายพันธุ์บนดีเอ็นเอที่เกี่ยวเนื่องกับ thalassemia ชนิดอื่นๆ ที่พบบ่อยในประเทศไทยอีก 3 ตำแหน่ง (4 base pair deletion, Codon17 และ IVS54 (654)) บนอุปกรณ์ตรวจวัดชิ้นเดียวกันเพื่อการตรวจสอบรูปแบบของโรค thalassemia ชนิดต่างๆ ได้ในครั้งเดียว ผลการตรวจสอบเบื้องต้นพบว่าการใช้โพรบ

ทั้งสี่คู่ร่วมกันยังไม่สามารถแยกแยะความแตกต่างของดีเอ็นเอได้ไม่เป็นที่น่าพอใจนัก จึงยังต้องมีการปรับภาวะของการไฮบริไดซ์และการทำให้เกิดสัญญาณเพิ่มเติมเพื่อให้แยกแยะความแตกต่างได้ชัดเจนยิ่งขึ้น

2.6) การพัฒนาระบบตรวจลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยใช้พีเอ็นเอโพรบร่วมกับวัสดุนาโน: งานวิจัยภายใต้หัวข้อนี้เกี่ยวข้องกับการพัฒนาระบบตรวจลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยใช้วัสดุนาโนร่วมกับพีเอ็นเอโพรบ ซึ่งทั้งหมดจะอาศัยหลักการเดียวกันคือการเกิดอันตรกิริยาทางไฟฟ้าสถิตที่แตกต่างกันระหว่างวัสดุนาโนที่มีประจุลบกับพีเอ็นเอที่มีประจุบวก และกับพีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอไฮบริดซึ่งมีประจุลบ ซึ่งเป็นการใช้สมบัติที่โดดเด่นของพีเอ็นเอที่ไม่สามารถทำได้กับดีเอ็นเอหรือโอลิโกนิวคลีโอไทด์โพรบอื่นๆซึ่งมีประจุลบ โดยได้ศึกษากับวัสดุนาโน 4 ชนิด ได้แก่ กราฟีนออกไซด์ (GO) โอลิโกดีออกซีกัวโนซีน (dG_n) อนุภาคนาโนของทองคำ (AuNP) และควอนตัมดอท

งานวิจัยในส่วนของ GO พบว่า GO สามารถระงับการเรืองแสงของ fluorescein-labeled acpcPNA ได้ และเมื่อเติมดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สมการเรืองแสงกลับเพิ่มขึ้นไปจนเกือบเท่ากับเมื่อก่อนเติม GO ส่วนเมื่อมีดีเอ็นเออื่นการเรืองแสงจะไม่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิมมากนัก แสดงถึงความจำเพาะเจาะจงที่ดีของการตรวจวัด และมี detection limit อยู่ที่ 4.4±0.3 nM และเมื่อใช้พีเอ็นเอโพรบที่มีประจุบวกเพิ่มขึ้น (Flu-PNA-Lys5) จะทำให้การระงับแสงโดย GO มีประสิทธิภาพมากขึ้นเนื่องจากแรงกระทำทางไฟฟ้าสถิต ซึ่งส่งผลให้ detection limit ที่ต่ำลงถึง 0.11±0.3 nM นอกจากนี้ยังได้ค้นพบโดยบังเอิญว่าdG_n มีความสามารถในการระงับการเรืองแสงของ fluorescein-labeled acpcPNA โดยที่การระงับแสงนี้จะเจาะจงเฉพาะกับพีเอ็นเอที่มีประจุบวกสูงเท่านั้น (Flu-PNA-Lys5) และประสิทธิภาพในการระงับแสงจะลดลงที่ความเข้มข้นของเกลือสูงกว่า 50 mM ซึ่งแสดงว่าการระงับแสงเกิดจากอันตรกิริยาทางไฟฟ้าสถิตระหว่างพีเอ็นเอกับดีเอ็นเอแบบไม่จำเพาะเจาะจง และเมื่อเมื่อเติมดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สมลงไปจะทำให้สัญญาณฟลูออเรสเซนส์กลับคืนมา ในขณะที่ดีเอ็นเอที่ไม่เป็นคู่สมจะเกิดการคืนสัญญาณน้อยกว่ามาก ผลการทดลองเหล่านี้เสนอแนะว่าอาจใช้ oligo(dG) เป็นตัวระงับแสงในลักษณะเดียวกับ graphene oxide หรือวัสดุนาโนอื่นๆ เพื่อใช้ร่วมกับพีเอ็นเอโพรบที่ติดฉลากเรืองแสงสำหรับการตรวจลำดับเบสของดีเอ็นเอ งานอีกส่วนหนึ่งคือการใช้พีเอ็นเอที่ติดฉลากเรืองแสงร่วมกับอนุภาคทองคำขนาดนาโน (AuNP) หรืออนุภาคเงินขนาดนาโน (AgNP) ซึ่งสามารถพิสูจน์ในหลักการได้ว่าสามารถใช้ AuNP/AgNP เพื่อระงับสัญญาณของ Flu-PNA-Lys5 ได้เช่นเดียวกับ GO และ dG_n และสามารถคืนสัญญาณได้เมื่อมีดีเอ็นเอที่เป็นคู่สม แต่มีความพิเศษกว่าคือนอกจากการตรวจวัดการเรืองแสงแล้วยังสามารถตรวจวัดได้ในโหมดการตกตะกอนได้ด้วย กล่าวคือ AuNP/AgNP จะเกิดการรวมกลุ่มเมื่อมีพีเอ็นเอที่มีประจุบวกอยู่ด้วย แต่เมื่อพีเอ็นเอเกิดไฮบริดกับดีเอ็นเอคู่สมจะสูญเสียความสามารถในการตกตะกอนของอนุภาคโลหะนาโนไป ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีอย่างชัดเจนและนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจลำดับเบสของดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอได้ โดยในกรณีของอนุภาค AgNP ได้นำไปพัฒนาเป็นอุปกรณ์ตรวจวัดดีเอ็นเอฐานกระดาษซึ่งได้รับการตีพิมพ์แล้ว (เป็นงานวิจัยร่วมกับ ศ.ดร.อรวรรณ ชัยลภากุล เมธีวิจัยอาวุโส)

งานอีกส่วนหนึ่งเป็นการนำ quantum dots (QD) มาใช้ร่วมกับพีเอ็นเอโพรบที่ติดฉลากเรืองแสง เพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักการถ่ายโอนพลังงานแบบ Fluorescence resonance energy transfer (FRET) หรือกลไกการดับสัญญาณ (quenching) โดยได้สังเคราะห์ ZnO QDs ที่ตรึงด้วยพอลิเมอร์ประจุบวก PMETAC และนำไปใช้ร่วมกับ TAMRA-labeled acpcPNA probe เพื่อใช้ในการตรวจสอบลำดับของดีเอ็นเอ แต่ปัญหาที่พบคือการดูดซับแบบไม่จำเพาะเจาะจงระหว่าง PMETAC-capped citrate ZnO QDs และ TAMRA-PNA จึงได้เปลี่ยนวิธีการดัดแปรพื้นผิวของ ZnO QDs เป็นการใช้โคพอลิเมอร์ของ METAC กับ polyethylene glycol methyl ether methacrylate (PMTAC-co-PPEGMA) ที่มีอัตราส่วนของมอนอเมอร์ MTAC และ PEGMA ต่างๆ กันแทน โดยพบว่า ZnO QD ที่เตรียมได้แสดงการเรืองแสงที่ความยาวคลื่น 550 nm และแสดงการกระจายตัวในน้ำที่ดี โดยการมีสัดส่วนของ PEGMA

เพิ่มในโคพอลิเมอร์ส่งผลทำให้การเรืองแสงและความเสถียร ของ ZnO QDs เพิ่มขึ้น แต่ก็ยังพบว่ามี non-specific interaction กับ TAMRA-labeled PNA อยู่ จึงหยุดงานในส่วนของพีเอ็นเอไปก่อน และหันมาศึกษาอันตรกิริยาของ (PMTAC-co-PPEGMA)-capped ZnO กับดีเอ็นเอแทน โดยพบว่าการใช้ QD ร่วมกับ DNA ที่ติดฉลากสามารถบอกความแตกต่างของดีเอ็นเอคู่สมกับดีเอ็นเอที่ไม่เป็นคู่สมที่มีลำดับเบสผิดไปจากโพรบตั้งแต่ 2 เบสขึ้นไปได้ ซึ่งน่าจะได้ศึกษาเพิ่มเติมต่อไปเพื่อศึกษาข้อจำกัดและกลไกการเกิดการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงนี้ นอกจากนี้ยังได้ค้นพบโดยบังเอิญว่าระบบ ZnO QD ที่เคลือบผิวประจุบวกชนิด P(METAC-PEOMEMA) แสดงความจำเพาะเจาะจงในการวิเคราะห์ Fe^{2+} โดยเมื่อมี Fe^{2+} อยู่ด้วยจะเกิดการดับสัญญาณการเรืองแสงของ ZnO QDs ลง โดยที่ metal ion ชนิดอื่นๆ ไม่ทำให้การเรืองแสงของ ZnO QDs เปลี่ยนแปลง นอกจากนี้ยังสามารถแยกความแตกต่างของ Fe^{2+} และ Fe^{3+} ออกจากกันได้อย่างชัดเจน โดยมี limit of detection (LOD) และ limit of quantitation (LOQ) เท่ากับ 0.34 μM และ 0.51 μM ตามลำดับ

งานวิจัยในภาพรวมมีความก้าวหน้าช้ากว่าแผนงานเนื่องจากปัญหาในการพัฒนาระบบเร่งปฏิกิริยาและ DNA-templated reaction ที่มีประสิทธิภาพดีพอดังที่กล่าวไว้ข้างต้น อย่างไรก็ตาม โครงการนี้สามารถพัฒนาระบบตรวจวัดดีเอ็นเอใหม่ได้บรรลุวัตถุประสงค์ถึงขั้นมีผลงานตีพิมพ์แล้ว 3 เรื่องคือ strand displacement probe (2.1.1.16) และการพัฒนาระบบตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยใช้อุปกรณ์ฐานกระดาษที่อาศัยความแตกต่างของประจุของพีเอ็นเอกับดีเอ็นเอ (2.1.1.3, 2.1.1.21) นอกจากนี้ยังมีงานในส่วนของการพัฒนาพีเอ็นเอโพรบที่สามารถสร้างพันธะโคเวเลนต์กับดีเอ็นเอ และการพัฒนาระบบการตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอแบบใหม่ที่อาศัยการเลือกเกิดปฏิกิริยาที่แตกต่างกันระหว่างดีเอ็นเอและพีเอ็นเอ โดยอาศัยวัสดุนาโน เช่น graphene oxide, gold nanoparticles และ dG_n เป็นต้น ที่กำลังอยู่ระหว่างรวบรวมข้อมูลให้สมบูรณ์ ซึ่งน่าจะได้ผลงานตีพิมพ์อีกอย่างน้อย 3 เรื่อง

โครงการย่อยที่ 3: PNA-conjugated polymer brushes as platforms for DNA sequence determination

โครงการนี้เป็นการพัฒนาการดัดแประพื้นผิวของวัสดุต่างๆ เช่น อนุภาคนาโนของทอง หรือกระดาษเซลลูโลส ด้วยพอลิเมอร์บรัชที่เข้ากันได้ทางชีวภาพ และตรึงพีเอ็นเอเข้ากับพื้นผิวเหล่านี้เพื่อนำไปใช้ในการตรวจวัดดีเอ็นเอหรือนำส่งเข้าสู่เซลล์ โดยงานวิจัยแบ่งเป็น 4 หัวข้อย่อย ดังต่อไปนี้

3.1) การพัฒนาโคพอลิเมอร์ที่สามารถติดพีเอ็นเอโพรบด้วยปฏิกิริยาคลิกและการตรวจวัดดีเอ็นเอ: งานวิจัยนี้มีความสนใจในการพัฒนาแพลทฟอร์มที่สามารถใช้ในการตรึงพีเอ็นเอโพรบโดยอาศัยพอลิเมอร์บรัชของ poly(propagyl methacrylate) (PPgMA) ร่วมกับ poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (PMPC) เพื่อนำไปใช้วิเคราะห์การจับยึดกับดีเอ็นเอด้วยเทคนิค surface plasmon resonance (SPR) งานในส่วนนี้เสร็จสมบูรณ์และได้รับการตีพิมพ์แล้ว

3.2) การพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดลำดับเบสของดีเอ็นเอบนกระดาษที่ตรึงด้วยพีเอ็นเอโพรบผ่านโคพอลิเมอร์บรัช: งานวิจัยนี้จะพัฒนาการตรึงพีเอ็นเอโพรบบนกระดาษเซลลูโลสที่ดัดแปรพื้นผิวกระดาษด้วยโคพอลิเมอร์ชนิด poly[glycidyl methacrylate-co-poly(ethylene glycol) methacrylate] เพื่อนำไปใช้ในการตรึงพีเอ็นเอโดยผ่านปฏิกิริยาระหว่างหมู่อะมิโนของพีเอ็นเอกับหมู่อิพอกไซด์ และนำไปใช้ในตรวจหาลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักการของ sandwich hybridization assay โดยอาศัยพีเอ็นเอโพรบอีกตัวหนึ่งที่ติดฉลากด้วยไบโอตินเพื่อใช้ร่วมกับ streptavidin-HRP ในการขยายสัญญาณ ผลที่ได้สามารถพิสูจน์หลักการได้ว่าวิธีการที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายได้จริง โดยสามารถบอกความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอคู่สม

และดีเอ็นเอที่ไม่เป็นคู่สม รวมทั้งที่มีลำดับเบสผิดไปตำแหน่งเดียวได้ ขณะนี้กำลังอยู่ระหว่างการเตรียมต้นฉบับบทความเพื่อตีพิมพ์

3.3) การพัฒนาแท่งทองขนาดนาโน (AuNRs) ที่ดัดแปรพื้นผิวด้วย (poly[(methacrylic acid)-ran-(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)]; PMAMPC) เพื่อเพิ่มความเสถียรและความเข้ากันได้ทางชีวภาพ นอกจากนี้ยังสามารถใช้ตรึงสารออกฤทธิ์เช่นพีเอ็นเอ หรือสีย้อมเรืองแสง เพื่อการประยุกต์ใช้ในการนำส่งสารออกฤทธิ์เข้าสู่เซลล์ โดยงานวิจัยในส่วนของการตรึงและนำส่งพีเอ็นเอด้วย AuNRs ผ่าน cleavable peptide linker (-GFLG-) พิสูจน์หลักการว่าสามารถตรึงได้ และปลดปล่อยพีเอ็นเอออกมาได้จริง แต่พบว่าประสิทธิภาพของการปลดปล่อยพีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ cathepsin B ยังไม่สูงนักและยังใช้เวลาค่อนข้างนาน ส่วนการติดฉลากเรืองแสง พบว่าสามารถติดสีย้อมในกลุ่ม styryl dye (โครงการย่อยที่ 1) ไปบน AuNRs ที่ดัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิเมอร์บรัชและ cysteamine (Cys-PMAMPC) ได้โดยผ่านปฏิกิริยา thiol-ene โดยอนุภาคที่ดัดแปรดังกล่าวแสดงความเป็นพิษต่ำและสามารถนำส่งเข้าเซลล์ HepG2 ได้ดี และสามารถติดตามได้โดยเทคนิค fluorescence microscopy โดยพบว่าจะเกิดการสะสมของอนุภาค AuNRs ใน cyytoplasm เป็นหลัก

3.4) การสังเคราะห์พอลิเอทิลีนไกลคอลที่เชื่อมต่อปลายทั้งสองข้างเข้ากับพิร์โรลิดินิลพีเอ็นเอชนิด *epi*-acpcPNA ที่สามารถเกิด self-duplex จึงสามารถเกิดการ crosslink ที่ตอบสนองกับสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ตัวทำละลาย พีเอช และ acpcPNA ที่ไม่สามารถเกิด self-duplex แต่สามารถชักนำให้เกิดการ crosslink โดยการเติม DNA ซึ่งอาจนำไปประยุกต์ใช้เป็นวัสดุฉลาดหรือระบบนำส่งดีเอ็นเอ งานในส่วนนี้กำลังอยู่ระหว่างการพิสูจน์หลักการ ซึ่งพบว่าสามารถสังเคราะห์พีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับพอลิเอทิลีนไกลคอลได้จริง และยืนยันการเกิดไฮบริดกับตัวเอง (กรณีของ *epi*-acpcPNA) และกับดีเอ็นเอ (กรณีของ acpcPNA) ได้

ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์แล้วมีทั้งสิ้น 2 เรื่อง ซึ่งเกี่ยวข้องกับการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอด้วย quaternized chitosan ร่วมกับเทคนิค MALDI-TOF mass spectrometry และการพัฒนาแพลทฟอร์มที่สามารถใช้ในการตรึงพีเอ็นเอโพรบโดยอาศัยพอลิเมอร์บรัชของ poly(propagyl methacrylate) (PPgMA) ร่วมกับ poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (PMPC) เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SPR (2.1.1.5, 2.1.1.11) และกำลังอยู่ระหว่างจัดเตรียมต้นฉบับอีก 1 เรื่อง เกี่ยวกับการพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดลำดับเบสของดีเอ็นเอบนกระดาษที่ตรึงด้วยโคพอลิเมอร์บรัช (2.1.1.e) ส่วนงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ AuNRs น่าจะสามารถทำการทดลองเพิ่มเติมเพื่อรวบรวมข้อมูลให้ตีพิมพ์ได้อีก 1 เรื่อง

โครงการย่อยที่ 4: Signal enhancement in PNA based sensors by utilizing electron transfer/energy transfer upon target binding

โครงการนี้เกี่ยวเนื่องกับการพัฒนาไบโอเซนเซอร์ที่มีความไววิเคราะห์และความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดสูงโดยอาศัยพิร์โรลิดินิลพีเอ็นเอเป็นโพรบ โดยแบ่งออกเป็นสามส่วนย่อยคือ

4.1) การพัฒนาอิเล็กโทรดที่ดัดแปรด้วยกราฟีน-อนุภาคนาโนของโลหะสำหรับการตรวจวัดการเกิดไฮบริดระหว่างพีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอโดยอาศัยสัญญาณจากรีดอกซ์อินดิเคเตอร์: งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาดีเอ็นเอไบโอเซนเซอร์ (DNA biosensor) แบบติดฉลาก โดยการตรึง acpcPNA-AQ probe ที่มีแอนทราควิโนน (anthraquinone, AQ) ติดตรงตำแหน่งปลายโพรบ บนขั้วไฟฟ้าคาร์บอนพิมพ์สกรีน (screen printed carbon electrode, SPCE) ที่มีการปรับปรุงด้วยวัสดุคอมโพสิตพอลิเมอร์ชนิดนำไฟฟ้าพอลิอะนิลีน (polyaniline, PANI) PANI ร่วมกับกราฟีน (graphene, Gr) และอนุภาคนาโนเงิน (silver nanoparticles, AgNPs) เมื่อเกิดไฮบริไดเซชันระหว่าง acpcPNA-AQ probe กับดีเอ็นเอเป้าหมาย (target DNA) ทำให้ส่วน

ของ AQ ที่ติดไว้ปลายโพรบอยู่ห่างจากผิวขั้วไฟฟ้าทอง การส่งผ่านอิเล็กตรอนของ AQ มายังผิวอิเล็กโทรดจึงเกิดได้ยากขึ้น สัญญาณการตรวจวัดจึงมีค่าลดลงตามความเข้มข้นของ target DNA โดยศึกษาตัวแปรต่างๆ ได้แก่เช่น ความเข้มข้น ของ Ag ความเข้มข้นของ โพรบ PNA และ เวลาในการไฮบริไดเซชัน ภายใต้ภาวะที่เหมาะสมนี้ได้ช่วงความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 10^{-11} – 10^{-5} M และ ศึกษาประสิทธิภาพของระบบ เช่น ความจำเพาะเจาะจง ขีดจำกัดของการตรวจวัดต่ำสุด 10^{-11} M และความสามารถในการใช้งานซ้ำได้ถึง 37 ครั้ง และความสามารถในการทำซ้ำได้ นอกจากนี้ยังได้ศึกษาผลของจำนวนเบสและบริเวณที่จับยึดกับโพรบที่ต่างกันใน target DNA ที่มีผลต่อสัญญาณการตรวจวัด โดยได้ผลการทดลองเป็นที่น่าพอใจ และกำลังอยู่ระหว่างเตรียมต้นฉบับบทความเพื่อตีพิมพ์

4.2) การพัฒนาเซนเซอร์เพื่อการตรวจวัดดีเอ็นเอโดยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้าโดยอาศัยพีเอ็นเอโพรบร่วมกับวัสดุคอมโพสิตระหว่างกราฟีน-อนุภาคนาโนของโลหะ งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนา DNA biosensor แบบไม่ติดฉลากโดยการปรับปรุงขั้วไฟฟ้าด้วยเงินที่มีโครงสร้างเป็นนาโนโฟม (silver nanofoam, AgNF) ด้วยวิธีเกาะติดทางไฟฟ้า (electrodeposition) ร่วมกับการใช้พอลิเมอร์นำไฟฟ้าคือพอลิพิร์โรล (polypyrrole, PPy) งานที่ได้รายงานไปในรอบรายงานครั้งก่อนคือการศึกษาการปรับปรุงผิวหน้าขั้วด้วยชั้นของ AgNF และ PPy สำหรับตรึง PNA probes เพื่อใช้ในการตรวจวัด DNA โดยได้ยืนยันการเกิดชั้นของ AgNF และ PPy เทคนิค SEM แล้วจึงนำขั้วไฟฟ้า PPy/AgNF/Au ที่เตรียมได้มาตรึงพีเอ็นเอที่ไม่ติดฉลาก และได้ศึกษาพฤติกรรมทางไฟฟ้าของขั้ว PPy/AgNF/Au ด้วยเทคนิค electrochemical impedance spectroscopy (EIS) โดยพิจารณาค่าความต้านทานในการส่งผ่านอิเล็กตรอน (electron transfer resistance, R_{et}) จากนั้นจึงได้นำขั้วไฟฟ้าที่ตรึงด้วยพีเอ็นเอไปทดสอบการตรวจวัดสัญญาณของ DNA ที่เลียนแบบ miRNA-21 ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี (cyclic voltammetry) พบว่าค่ากระแสไฟฟ้าลดลงตามความเข้มข้นของ target DNA ที่เพิ่มขึ้น และภายใต้ภาวะที่ดีที่สุดสามารถตรวจวัด target DNA ที่มีช่วงความเป็นเส้นตรงตั้งแต่ 2.0×10^{-16} (0.20 fM) ถึง 1.0×10^{-9} M (1.0 nM) และให้ค่า LOD เท่ากับ 2.0×10^{-16} (0.20 fM) โดยให้ความจำเพาะเจาะจงที่ดีเยี่ยมตลอดช่วงความเข้มข้น 1 fM 0.1 pM และ 0.01 nM และได้นำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัด miRNA จากตัวอย่างจริง ขณะนี้กำลังอยู่ระหว่างจัดเตรียมต้นฉบับบทความเพื่อตีพิมพ์

4.3) การพัฒนาเซนเซอร์ทางแสงสำหรับการตรวจวัด DNA โดยอาศัย PNA แบบมีการขยายสัญญาณ: งานวิจัยนี้มีเป้าหมายที่จะออกแบบระบบตรวจวัดดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคฟลูออเรสเซนส์ร่วมกับการขยายสัญญาณโดยวิธีการที่เหมาะสมเช่น hybridization chain reaction (HCR) หรือ catalyzed hairpin assembly (CHA) เพื่อใช้เพิ่มความไวในการตรวจวัดโมเลกุลเป้าหมายที่เป็นดีเอ็นเอ หรือ small molecules (อาศัยดีเอ็นเอแอพตาเมอร์) โดยในช่วงแรกได้ออกแบบระบบ HCR และ CHA สำหรับตรวจสอบยีน *BRCA1* ซึ่งเกี่ยวข้องกับมะเร็งเต้านม โดยอาศัยพีเอ็นเอโพรบ แต่ไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร ผู้วิจัยได้ออกแบบระบบ CHA ใหม่สำหรับตรวจวัด cysteine ซึ่งเป็น biomarker ที่สำคัญหนึ่งสำหรับการบ่งชี้ปัญหาด้านสุขภาพ โดยได้เริ่มต้นจากการทดสอบหลักการกับระบบ catalyst ที่เป็น DNA ล้วนก่อน และ เปรียบเทียบกับการใช้ PNA catalyst เป็นตัวกระตุ้นให้เกิด CHA โดยเบื้องต้นพบว่าการเติม DNA หรือ PNA จะทำให้เกิดปฏิกิริยา CHA ได้จริงจากการเพิ่มขึ้นของสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ แต่ต้องใช้ปริมาณ PNA มากกว่า DNA จึงจะทำให้เริ่มสังเกตผลได้ การต่อมาจึงเน้นที่ระบบที่ใช้ DNA เป็น catalyst ก่อน จากนั้นจึงได้ผนวกรวมส่วน target binding และ signal amplification เข้าด้วยกัน ผลการทดลองเบื้องต้นพบว่าระบบแสดงการตอบสนองต่อ cyteine จริงแต่ยังอยู่ในช่วงความเข้มข้นที่สูง (600 μM) จึงยังต้องปรับภาวะต่อไปเพื่อเพิ่มความไวให้สูงขึ้นก่อนการนำไปทดสอบการใช้งานจริง

โครงการนี้ได้ผลิตผลงานตีพิมพ์ไปแล้ว 1 เรื่องจากการใช้พีเอ็นเอโพรบที่ตรึงผ่านชั้นของ poly(*p*-phenylenediamine) ในการตรวจลำดับเบสของ HLA-B*:5801 และ HLA-B*:5701 จากตัวอย่างจริงโดยเทคนิค capacitance (2.1.1.12) อยู่ระหว่างเตรียมต้นฉบับบทความเพื่อตีพิมพ์อีก 1 เรื่อง (2.1.1.d) และกำลังรวบรวมข้อมูลเพื่อเตรียมต้นฉบับอีก 1–2 เรื่อง

โครงการย่อยที่ 5: Bioconjugation of anionic magnetic nanoparticle with PNA for DNA purification

โครงการนี้จะมุ่งเน้นการพัฒนาอนุภาคแม่เหล็กขนาดนาโน (MNP) ที่ตรึงด้วยพิร์โรลิดินิลพีเอ็นเอโดยผ่านชั้นของพอลิเมอร์ที่มีประจุลบ เพื่อนำไปใช้ในการทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ โดยเริ่มจากการสังเคราะห์อนุภาคแม่เหล็ก การดัดแปรพื้นผิวอนุภาคด้วยพอลิเมอร์ที่มีประจุลบเช่นพอลิอะคริลิกแอซิด หรือพอลิอะไครโลอิลไกลซีน การตรึงพีเอ็นเอกับหมู่คาร์บอกซิเลตโดยตรง หรือผ่านอันตรกิริยาระหว่างไบโอติน-สเตรปตาวิดิน และนำไปศึกษาประสิทธิภาพในการจับดีเอ็นเอจากสารละลายและความสามารถในการนำกลับมาใช้ซ้ำ

งานที่ได้ดำเนินการไปตลอดโครงการแบ่งออกเป็นสองแนวทาง ในแนวทางแรกเป็นการดัดแปรพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ด้วย PNAG เพื่อนำมาใช้มาตรึงกับ acpcPNA โดยการใช้อัตรกิริยาระหว่าง streptavidin และ biotin โดยเริ่มจากการสังเคราะห์อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ดัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิเอ็นอะไครโลอิลไกลซีน (poly (*N*-acryloyl-glycine, PNAG) และการนำอนุภาคนี้ไปใช้ในการตรึงสเตรปตาวิดินลงบนพื้นผิวของอนุภาค ยืนยันการตรึงสเตรปตาวิดินบนอนุภาคด้วยเทคนิค UV-Vis spectroscopy และการเพิ่มขึ้นของขนาดไฮโดรไดนามิก (D_h) ด้วยเทคนิค PCS จากนั้นจึงนำไปตรึงด้วย acpcPNA ที่มีหมู่ปลายเป็น biotin จากการติดตามการตรึงได้โดยเทคนิค UV-vis spectrophotometry พบว่าสามารถตรึง PNA ได้อยู่ที่ 126 pmol/mg ของ MNP และได้จึงนำอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ดัดแปรด้วย PNAG มาตรึงด้วย biotinylated acpcPNA โดยผ่านอันตรกิริยาระหว่าง biotin-streptavidin แล้วนำมาดูดจับ DNA โดยได้เปรียบเทียบดีเอ็นเอ 3 ชนิดที่ติดฉลากเรืองแสง (คู่สม, มีลำดับเบสผิดไป 1 ตำแหน่ง, และไม่เป็นคู่สม) พบว่าอนุภาคที่ตรึงพีเอ็นเอจะดูดซับเฉพาะดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับพีเอ็นเอเท่านั้นโดยสามารถพิสูจน์ได้โดยเทคนิค fluorescence และ gel electrophoresis จากนั้นจึงได้นำเอาอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย pyrrolidinyl PNA-Biotin ซึ่งมีลำดับเบสที่สอดคล้องยีนสร้างโปรตีน zein ในข้าวโพด เพื่อนำมาประยุกต์ใช้เป็นอนุภาคในการทำให้ DNA บริสุทธิ์ โดยสามารถใช้อนุภาคดังกล่าวในการแยกตัวอย่างดีเอ็นเอจากข้าวโพดและสามารถพิสูจน์ได้โดยการชะดีเอ็นเอที่ถูกดูดซับออกมาทำ PCR แล้วตามด้วยการตรวจสอบโดยเทคนิค gel electrophoresis ซึ่งอาจนำอนุภาคนี้ไปประยุกต์ใช้ในการทำ enrich ดีเอ็นเอที่สนใจแต่มีอยู่ในตัวอย่างเป็นปริมาณน้อยได้ อันจะเป็นประโยชน์มากในการตรวจสอบการปนเปื้อนของอาหาร เช่น องค์ประกอบที่ก่อภูมิแพ้เช่นข้าวโพด ถั่วลิสง หรือ GMO เป็นต้น

อีกแนวทางหนึ่งจะอาศัยการดัดแปรพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ด้วยพอลิเมอร์ที่มีประจุลบอีกชนิดหนึ่งคือ polyacrylic acid (PAA) เพื่อนำใช้มาตรึงกับ acpcPNA ด้วยแรงระหว่างประจุ (electrostatic interaction) โดยเริ่มจากการทำพอลิเมอไรเซชันของอะคริลิกแอซิดบนอนุภาคที่ดัดแปรพื้นผิวด้วยอะคริลาไมด์ และพิสูจน์เอกลักษณ์โดยเทคนิค FTIR, TGA, TEM และ PCS ซึ่งสามารถยืนยันการติดของพอลิเมอร์และความเป็นประจุลบของอนุภาคได้ จากนั้นจึงนำอนุภาคมาใช้ในการตรึงพีเอ็นเอแบบนอนโคเวเลนต์ โดยอาศัยแรงกระทำระหว่างประจุ ซึ่งทำได้ง่ายกว่าวิธีแรก เพียงการนำพีเอ็นเอที่ดัดแปรด้วยไลซีนซึ่งมีประจุบวกมาผสมกับอนุภาคเท่านั้น โดยสามารถยืนยันความสำเร็จของการตรึงพีเอ็นเอได้โดยเทคนิคต่างๆ ข้างต้น และพบว่าอนุภาคที่ตรึงพีเอ็นเอแล้วยังกระจายตัวได้ดีในน้ำและสามารถชักนำให้ตกตะกอนได้โดยใช้แม่เหล็กเช่นเดียวกับ

อนุภาคก่อนตรึง จากการติดตามการตรึงได้โดยเทคนิค UV-vis spectrophotometry พบว่าสามารถตรึง PNA ได้อยู่ที่ 180 pmol/mg ของ MNP และสามารถนำอนุภาคที่ตรึงพีเอ็นเอดังกล่าวไปใช้ในการดูดจับดีเอ็นเอจากสารละลาย ซึ่งพบว่าสามารถดูดซับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับพีเอ็นเอที่ตรึงได้อย่างเลือกจำเพาะ และได้ศึกษาเบื้องต้นกับตัวอย่างดีเอ็นเอจริงเพื่อนำไปประยุกต์ใช้เช่นเดียวกับแนวทางแรก

งานวิจัยนี้มีผลสำเร็จเป็นไปตามวัตถุประสงค์ โดยได้ผลงานตีพิมพ์แล้ว 2 เรื่องได้แก่ผลงานลำดับที่ 2.1.1.13, 2.1.1.14 อยู่ระหว่างพิจารณาอีก 1 เรื่องคือผลงานลำดับที่ 2.1.1.a และยังอยู่ระหว่างการเตรียมบทความอีก 1 เรื่องคือผลงานลำดับที่ 2.1.1.f

โครงการย่อยที่ 6: A theoretical study of structural and energetic properties of peptide nucleic acid

โครงการย่อยนี้มีวัตถุประสงค์คือเพื่อการสร้างแบบจำลองของพิร์โรลิดินิลพีเอ็นเอระบบ (*2'R,4'R*)-prolyl-(1*S*,2*S*)-ACPC-PNA (acpcPNA) และ (*2'R,4'S*)-prolyl-(1*S*,2*S*)-ACPC-PNA (*epi*-acpcPNA) โดยอาศัยเทคนิคการจำลองแบบทางพลวัตเชิงโมเลกุล (molecular dynamics (MD) simulation) และการคำนวณทางเคมีควอนตัม เพื่อนำไปใช้ในการทำนายโครงสร้างและคำนวณพลังงานของระบบ และนำไปใช้อธิบายสมบัติบางประการของพิร์โรลิดินิลพีเอ็นเอ เช่น ความเสถียรที่แตกต่างกันของไฮบริดระหว่าง PNA-DNA, PNA-RNA และ PNA-PNA เป็นต้น

ในงานวิจัยได้การสร้างแบบจำลองเพื่ออธิบายความเสถียรของ PNA·PNA และ PNA·DNA duplexes ชนิดต่างๆ ซึ่งประกอบด้วยการสร้างพารามิเตอร์ (force field) โดยวิธีกลศาสตร์ควอนตัม การจำลองแบบทางพลวัตเชิงโมเลกุล และการวิเคราะห์สมบัติทางโครงสร้างและคำนวณพลังงานอิสระการยึดจับของโมเลกุลสายคู่จากการคำนวณพลังงานอิสระการยึดจับ (binding free energy, $\Delta G_{binding}$) ความเสถียรของ antiparallel hybrids ของ aegPNA·aegPNA > *epi*-acpcPNA·*epi*-acpcPNA > acpcPNA·acpcPNA และ acpcPNA·DNA > *epi*-acpcPNA·DNA ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลอง และนอกจากนี้ยังพบว่า backbone ที่แตกต่างกันของ DNA, aegPNA และ acpcPNA ไม่มีผลต่อระยะห่างและมุมของการเกิดพันธะไฮโดรเจนของคู่เบส แต่มีผลต่อความแข็งแรงของพันธะไฮโดรเจน โดย acpcPNA-DNA ให้ความแข็งแรงของพันธะไฮโดรเจนมากกว่า *epi*-acpcPNA-DNA ในขณะที่แกนหลักที่เป็น DNA และ aegPNA มีความแข็งแรงของพันธะไฮโดรเจนค่อนข้างต่ำ

ต่อมาจึงได้จำลองแบบทางพลวัตเชิงโมเลกุลของ ทั้ง antiparallel และ parallel hybrids ของ acpcPNA·acpcPNA, *epi*-acpcPNA·*epi*-acpcPNA และ aegPNA·aegPNA จากนั้นจึงได้วิเคราะห์แบบจำลองของ acpcPNA และ *epi*-acpcPNA duplexes แบบต่างๆ อย่างละเอียด โดยได้คำนวณพลังงานและวิเคราะห์ความกว้างของ minor groove ของโมเลกุลสายคู่ PNA-PNA ทุกระบบ เพื่อใช้อธิบายถึงอันตรกิริยาระหว่าง PNA ทั้งสองสาย พบว่าการคำนวณให้ผลสอดคล้องกับผลการทดลองอย่างดี กล่าวคือระบบที่มี T_m สูงก็จะให้ค่า $\Delta E_{binding}$ ต่ำกว่าระบบที่มี T_m ต่ำกว่า โดยพบว่าทิศทางการเกิดโมเลกุลสายคู่แบบ antiparallel ให้ลักษณะร่องของแกนหลักที่ลึกและแกนหลักทั้งสองสายหันเข้าด้านในโมเลกุลสายคู่ ในขณะที่ทิศทางการเกิดโมเลกุลสายคู่แบบ parallel ให้ลักษณะร่องของแกนหลักที่แบนออกนอกโมเลกุลสายคู่ สาเหตุที่ acpcPNA ไม่สามารถเข้าคู่กันเกิดเป็น PNA-PNA ในทิศทาง antiparallel เนื่องจากลักษณะทางสเตอริโอเคมีของนิวคลีโอเบสที่ต่อกับแกนหลักบังคับว่าหากต้องการให้เบสเข้าคู่กันได้ดีที่สุดจะทำให้แกนหลักลู่เข้าหากันและอยู่ใกล้กันมาก (ห่างกันประมาณ 3.5 Å) ดังนั้นเมื่อทำการจำลองแบบจึงทำให้แกนหลักผลักกันมากส่งผลให้เบสเข้าคู่กันได้ไม่ดีและการวางตัวของแกนหลักไม่เหมาะสม แต่ลักษณะดังกล่าวนี้ไม่เกิดกับ PNA ชนิด *epi*-

acpcPNA ซึ่งมีสเตอริโอเคมีที่ต่างกันทำให้ *epi*-acpcPNA เกิดเป็นโมเลกุลสายคู่ในทิศทางแบบ antiparallel ได้

งานวิจัยอีกส่วนหนึ่งคือการศึกษาโครงสร้างของโมเลกุลสายคู่ acpcPNA-DNA และ acpcPNA-RNA โดยใช้การจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุล และศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อความเสถียรของโมเลกุลสายคู่ทั้งสองในระดับโมเลกุล ซึ่งประกอบด้วยการจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุลของโมเลกุลสายคู่ acpcPNA-RNA ที่มีลำดับเบสต่างกับ 2 ระบบ ได้แก่ ระบบที่มี %(G+C) เท่ากับ 40 และ 70 รวมทั้งโมเลกุลสายคู่ acpcPNA-DNA ที่มีลำดับเบสเหมือนกันเพื่อเทียบกัน จากนั้นจึงนำโครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบมาวิเคราะห์ลักษณะการเข้าคู่ของเบส วิเคราะห์ความกว้างของ minor groove จำนวนโมเลกุลของน้ำที่ล้อมรอบโมเลกุลสายคู่ที่ระยะห่างต่างๆ และจำนวนโมเลกุลของน้ำใน minor groove และคำนวณพลังงานอิสระการยึดจับ ($\Delta G_{binding}$) ระหว่างสาย PNA กับสาย RNA และสาย PNA กับสาย DNA (ด้วยวิธี MM/GBSA) และคำนวณพลังงานยึดจับ ($\Delta E_{binding}$) ระหว่างสาย PNA กับสาย RNA และสาย PNA กับสาย DNA (ด้วยวิธี B3LYP/6-31G(d)) และคำนวณพลังงานยึดจับ ($\Delta E_{binding}$) ของ1 คู่เบสของระบบ acpcPNA-RNA และ acpcPNA-DNA (ด้วยวิธี B3LYP/6-31G(d,p)) ข้อสรุปที่ได้คือ acpcPNA สามารถเข้าคู่กับ DNA เกิดเป็นโมเลกุลสายคู่ acpcPNA-DNA ได้ดีกว่า RNA ยืนยันได้จากค่า $\Delta G_{binding}$ ของ acpcPNA-DNA ที่มีค่าเป็นลบมากกว่า acpcPNA-RNA ซึ่งสอดคล้องกับความเสถียรเชิงความร้อน (T_m) ที่ได้จากการทดลอง จากการคำนวณพลังงานยึดจับ ($\Delta E_{binding}$) ระหว่าง PNA กับ RNA และ PNA กับ DNA ในสภาวะแก๊สพบความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย ในขณะที่การคำนวณจำนวนโมเลกุลของน้ำที่ล้อมรอบแสดงให้เห็นว่า acpcPNA-RNA ถูก solvate ได้มากกว่า acpcPNA-DNA เนื่องจากโครงสร้างของ acpcPNA-RNA มีขนาดของ minor groove กว้างกว่า acpcPNA-DNA ส่งผลให้โอกาสที่น้ำจะเข้าไปอยู่ในบริเวณของ minor groove ของโมเลกุลมีมากกว่า acpcPNA-DNA ซึ่งสอดคล้องกับค่า $\Delta G_{solvation}$ ที่คำนวณได้ ดังนั้น solvation จึงน่าจะเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ความเสถียรของ acpcPNA-RNA กับ acpcPNA-DNA แตกต่างกัน

งานวิจัยนี้นำไปสู่ความเข้าใจของปัจจัยเชิงโครงสร้างที่ส่งผลกระทบต่อสมบัติการจับยึดของ acpcPNA และ *epi*-acpcPNA ทั้งในแง่ของการจับกันเอง การจับกับ DNA และ RNA ซึ่งจะเป็นประโยชน์ทั้งในแง่ของการอธิบายผลการทดลองและการเปิดมุมมองใหม่ในการออกแบบระบบพีเอ็นเอที่มีสมบัติที่ดีขึ้น เช่น การออกแบบระบบพีเอ็นเอใหม่ที่เมื่อจับกับ DNA หรือ RNA แล้วจะมีความกว้างของ minor groove ลงซึ่งน่าจะเพิ่มความเสถียรของการจับยึดได้อีกจากการลดลงของ solvation เป็นต้น ขณะนี้ได้ส่งบทความเพื่อตีพิมพ์ไปแล้ว 1 เรื่องคือผลงานลำดับที่ 2.1.1.c และกำลังอยู่ระหว่างรวบรวมข้อมูลเพื่อเตรียมต้นฉบับอีก 2 เรื่อง

2. ผลงาน

2.1 ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ/หนังสือ/สิทธิบัตร

2.1.1 ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

Published/Accepted

รอบรายงาน 6 เดือน

2.1.1.1 Stubinitzky, C.; Vilaivan, T.*; Wagenknecht, H.-A.* The base discriminating potential of pyrrolidinyl PNA demonstrated by magnetic Fe_xO_y particles. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 3586–3589. (IF 2016 = 3.564) (เป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 1)

2.1.1.2 Yotapan, N.; Charoenpakdee, C.; Wathanathavorn, P.; Ditmangklo, B.; Wagenknecht, H.-A.*; Vilaivan, T.* Synthesis and optical properties of pyrrolidinyl peptide nucleic acid carrying a clicked Nile red label. *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 2166–2174. (IF 2014 = 2.337) (เป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 1)

รอบรายงาน 12 เดือน

2.1.1.3 Jirakittiwut, N.; Panyain, N.; Nuanyai, T.; Vilaivan, T.; Praneenararat, T.* Pyrrolidinyl peptide nucleic acids immobilised on cellulose paper as a DNA sensor. *RSC Advances* **2015**, *5*, 24110–24114. (IF 2016 = 3.108) (เป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 2)

รอบรายงาน 18 เดือน

2.1.1.4 Arayachukiat, S.; Seemork, J.; Pan-In, P.; Amornwachirabodee, K.; Sangphech, N.; Sansureerungsikul, T.; Sathornsantikun, K.; Vilaivan, C.; Shigyou, K.; Pienpinijtham, P.; Vilaivan, T.; Palaga, T.; Banlunara, W.; Hamada, T.; Wanichwecharungruang, S. Bringing macromolecules into cells and evading endosomes by oxidized carbon nanoparticles. *Nano Lett.* **2015**, *15*, 3370–3376. (IF 2016 = 12.712) (เป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 1 ร่วมกับ รศ.ดร. ศุภศร วนิชเวชารุ่งเรือง)

2.1.1.5 Meebungpraw, J.; Wiarachai, O.; Vilaivan, T.; Kiatkamjornwong, S.; Hoven, V. P.* Quaternized chitosan particles for DNA absorption and applications as ion exchange supports for label-free DNA detection using PNA probe and MALDI-TOF mass spectrometry. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *131*, 80–89. (IF 2016 = 4.811) (เป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 3)

2.1.1.6 Vilaivan, T.* Pyrrolidinyl PNA with α/β-dipeptide backbone: From development to applications. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 1645–1656. (IF 2016 = 20.268) (เป็นบทความปริทรรศน์รวบรวมผลงานจากทุกโครงการย่อย และโครงการวิจัยก่อนหน้านี้ไว้ด้วยกัน)

2.1.1.7 Sriwarom, P.; Padungros, P.; Vilaivan, T.* Synthesis and DNA/RNA binding properties of conformationally constrained pyrrolidinyl PNA with a tetrahydrofuran backbone deriving from deoxyribose. *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 7058–7065. (IF 2016 = 4.849) (เป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 1)

2.1.1.8 Bohländer, P.R., Vilaivan, T.*; Wagenknecht, H.-A.* Strand displacement and duplex invasion into double-stranded DNA by pyrrolidinyl peptide nucleic acids. *Org. Biomol. Chem.* 2015, 13, 9223–9230. (IF 2016 = 3.564) (เป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 1)

2.1.1.9 Kongpeth, J.; Jampasa, S.; Chaumpluk, P.; Chailapakul, O.; Vilaivan, T.* Immobilization-free electrochemical DNA detection with anthraquinone-labeled pyrrolidinyl peptide nucleic acid probe. *Talanta* **2016**, *146*, 318–325. (IF 2016 = 4.162) (เป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 1)

รอบรายงาน 24 เดือน

2.1.1.10 Bates, R. W.; Vilaivan, T.; Apparao, S. P.; Tu, H. T. Synthesis of a tetrahydrofuranyl β-amino acid for PNA construction. *Synlett* **2016**, *27*, 93–95. (IF 2016 = 2.151) (เป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 1)

2.1.1.11 Wiarachai, O.; Vilaivan, T.; Iwasaki, Y.; Hoven, V. P.* Clickable and anti-fouling copolymer platform of poly[(propargyl methacrylate)-ran-(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)] for biosensing applications. *Langmuir* **2016**, *32*, 1181–1194. (IF 2016 = 3.833) (เป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 3)

รอบรายงาน 30 เดือน

2.1.1.12 Thipmanee, O.; Numnuam, A.; Limbut, W.; Kanatharana, P.; Vilaivan, T.; Hirankarn, N.; Thavarngkul, P.* Screening test for the detection of HLA-B*5801 and HLA-B*5701 by a highly sensitive label-free capacitive DNA sensor based on pyrrolidinyl acpcPNA probe. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *82*, 99–104. (IF 2016 = 7.780) (เป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 4)

2.1.1.13 Rutnakornpituk, B.*; Theppaleak, T.; Rutnakornpituk, M.; Vilaivan, T. Recyclable magnetite nanoparticle coated with cationic polymers for adsorption of DNA. *J. Biomat. Sci-Polym. E.* **2016**, *27*, 1200–1210. (IF 2016 = 1.900) (เป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 5)

2.1.1.14 Khadsai, S.; Rutnakornpituk, B.; Wichai, U.; Vilaivan, T.; Nakkuntod, M.; Rutnakornpituk, M.* Anionic magnetite nanoparticle conjugated with pyrrolidinyl peptide nucleic acid for DNA base discrimination. *J. Nanopart. Res.* **2016**, *18*, 263. (IF 2015 = 2.020) (เป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 5)

2.1.1.15 Dangsopon, A.; Poomsuk, N.; Siriwong, K.; Vilaivan, T.; Suparpprom, C.* Synthesis and fluorescence properties of 3,6-diaminocarbazole-modified pyrrolidinyl peptide nucleic acid. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 74314–74322. (IF 2016 = 3.108) (เป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 1)

รอบรายงานฉบับสมบูรณ์

2.1.1.16 Boonlua, C.; Charoenpakdee, C.; Vilaivan, T.; Praneenararat, T.* Preparation and performance evaluation of a pyrrolidinyl peptide nucleic-acid-based displacement probe as a DNA sensor. *ChemistrySelect* **2016**, *1*, 5691–5697. (IF 2016 = N/A) (เป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 2)

2.1.1.17 Yotapan, N.; Nim-anussornkul, D.; Vilaivan, T.* Pyrrolidinyl peptide nucleic acid terminally labeled with fluorophore and end-stacking quencher as a probe for highly specific DNA sequence discrimination. *Tetrahedron* **2016**, *72*, 7992–7999. (IF 2016 = 2.651) (เป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 1)

2.1.1.18 Teengam, P.; Siangproh, W.; Tuantranont, A.; Henry, C. S.; Vilaivan, T.; Chailapakul, O.* Electrochemical paper-based peptide nucleic acid biosensor for detecting human

papillomavirus. *Anal. Chim. Acta* **2017**, *952*, 32–40. (IF 2016 = 4.950) (เป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 1)

2.1.1.19 Seankongsuk, P.; Vchirawongkwin, V.; Bates, R. W.; Padungros, P.; Vilaivan, T.* Stereoselective synthesis of (2*S*,3*S*)-*epi*-oxetin and its incorporation into conformationally constrained pyrrolidinyl PNA with an oxetane backbone. *Asian J. Org. Chem.* **2017**, 6, 551–560. (IF 2016 = 2.788) (เป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 1)

2.1.1.20 Kanokudom, S.; Vilaivan, T.; Wikan, N.; Thepparit, C.; Smith, D.R.; Assavalapsakul, W. miR-21 promotes dengue virus serotype 2 replication in HepG2 cells. *Antivir. Res.* **2017**, *142*, 169–177. (IF 2016 = 4.271) (เป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 1)

2.1.1.21 Teengam, P.; Siangproh, W.; Tuantranont, A.; Vilaivan, T.; Chailapakul, O.; Henry, C.S. Multiplex paper-based colorimetric DNA sensor using pyrrolidinyl peptide nucleic acid-induced AgNPs aggregation for detecting MERS-CoV, MTB, and HPV oligonucleotides. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 5428–5435. (IF 2016 = 6.320) (เป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 2)

2.1.1.22 Pansuwan, H.; Ditmangklo, B.; Vilaivan, C.; Jiangchareon, B.; Pan-In, P.; Wanichwecharungruang, S.; Palaga, T.; Nuanyai, T.; Suparpprom, C. ; Vilaivan, T. Hydrophilic and cell-penetrable pyrrolidinyl peptide nucleic acid via post-synthetic modification with hydrophilic side chains. *Bioconjugate Chem.* **2017**, accepted. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00308. (IF 2016 = 4.818) (เป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 1)

Submitted

2.1.1.a Seeja, N.; Rutnakornpituk, M.; Vilaivan, T.; Nakkuntod, M.; Rutanakornpituk, B. Poly(acrylic acid)-grafted magnetite nanoparticle conjugated with pyrrolidinyl peptide nucleic acid for specific adsorption with real DNA. (เป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 5)

2.1.1.b Nim-anussornkul, D.; Vilaivan, T.* Synthesis and optical properties of pyrrolidinyl peptide nucleic acid bearing a base discriminating fluorescence nucleobase 8-(pyrene-1-yl)-ethynyladenine. (เป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 1)

2.1.1.c Poomsuk, N.; Remsungnen, T.; Vilaivan, T.; Hunt, A. J.; Siriwong, K.* Conformational and energetic properties of pyrrolidinyl PNA-DNA duplexes: a molecular dynamics simulation. (เป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 6)

2.1.1.d Jampasa, S.; Siangproh, W.; Laocharoensuk, R.; Yanatatsaneejit, P.; Vilaivan, T.; Chailapakul, O. Influence of the DNA sensor design on the performance of the multiplex detection of HPV type 16 and 18 DNA (เป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 1)

In preparation

2.1.1.e Kangkamano, T.; Numnuam, A.; Limbut, W.; Kanatharana, P.; Vilaivan, T.; Thavarungkul, T. Pyrrolidinyl PNA polypyrrole/silver nanofoam electrode as a novel label-free electrochemical miRNA-21 biosensor. (เป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 4)

2.1.1.f Leekrajang, M.; Sae-Ung, P.; Vilaivan, T.; Hoven, V. P.* Epoxidized paper for activation-free peptide nucleic acid conjugation and its application for colorimetric DNA detection. (เป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 3)
2.1.1.g Khadsai, S.; Rutnakornpituk, B.; Vilaivan, T.; Nakkuntod, M.; Rutnakornpituk, M.* Poly(N-acryloyl glycine)-grafted magnetite nanoparticle conjugated with pyrrolidinyl peptide nucleic acid for pre-concentration of real deoxyribonucleic acid. (เป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 5)
2.1.1.h Park, Y.; Nim-anussornkul, D.; Vilaivan, T.; Morii, T; Kim, B. H. Facile conversion of RNA ATP aptamer to quencher-free molecular aptamer beacon. (เป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 1)

2.1.2 หนังสือ

-

2.1.3 สิทธิบัตร

2.1.3.1 นราพร สมบูรณ์นะ, ธีรยุทธ วิไลวัลย์, ไอลดา ชูภารา, บุญส่ง ดิษมังคล้อ, วรรณสิกา เกียรติปฐมชัย, จิราภรณ์ ธนียวัน "กรรมวิธีการตรวจหายีนเอนเทอโรทอกซินชนิดเอของ Staphylococcus aureus ก่อโรคอาหารเป็นพิษในเชิงปริมาณด้วยเทคนิคลูปเมดิเอเตดไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชันร่วมกับสีย้อมเรืองแสง" เลขที่คำขออนุสิทธิบัตร 1703000138

2.2 ความก้าวหน้าในการสร้างทีมวิจัย

ได้สร้างทีมนักวิจัยระดับปริญญาเอกที่เป็นอาจารย์ในสถาบันอุดมศึกษาจำนวน 20 คนที่มีความสนใจร่วมกันในการพัฒนาและใช้ประโยชน์จากพีเอ็นเอ โดยหัวหน้าโครงการได้พบปะเพื่อสอบถามความก้าวหน้าของโครงการวิจัยและปัญหา-อุปสรรคอย่างสม่ำเสมอ ทั้งในรูปแบบตัวต่อตัวและการใช้อีเมล์ รายนามของนักวิจัยผู้ร่วมโครงการมีดังนี้

1. ศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์ หัวหน้าโครงการ
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทร: 022187627 ext 101 E-mail: vtirayut@chula.ac.th

2. ผศ.ดร.จตุรงค์ สุภาพพร้อม ผู้ร่วมวิจัย
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร โครงการย่อยที่ 1
โทร: 055963462 E-mail: chaturongs@nu.ac.th

3. ดร.ภาณุวัฒน์ ผดุงรส ผู้ร่วมวิจัย
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โครงการย่อยที่ 1
โทร: 022187582 E-mail: panuwat.p@chula.ac.th

4. ดร.ธเนศวร นวลใย ผู้ร่วมวิจัย
คณะศิลปะศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลรัตนโกสินทร์ วิทยาเขตวังไกลกังวล อ.หัวหิน จ.ประจวบคีรีขันธ์ โครงการย่อยที่ 1
โทร: 0814449908 E-mail: thanesuan_nuan@hotmail.com

5. ดร.ธนิษฐ์ ปราณีนรารัตน์ ผู้ร่วมวิจัย
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โครงการย่อยที่ 2

โทร: 022187638 E-mail: thanit.p@chula.ac.th
6. ดร.นำพล อินสิน ผู้ร่วมวิจัย
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โครงการย่อยที่ 2
โทร: 022187581 E-mail: numpon.i@chula.ac.th
7. อ.ดร.แพรทอง เหลาภา ผู้ร่วมวิจัย
หลักสูตรเคมีประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และวิศวกรรมศาสตร์ โครงการย่อยที่ 2
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ จ.สกลนคร
โทร: 042725000 ext 3511 E-mail: paethong@hotmail.com
8. Dr. Christopher Smith ผู้ร่วมวิจัย
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โครงการย่อยที่ 2
(ย้ายที่ทำงานไปมหาวิทยาลัยมหิดลตั้งแต่ตุลาคม 2558)
โทร: 0806129497 E-mail: christopher.s@chula.ac.th
9. รศ.ดร.วรวีร์ โฮเว่น หัวหน้าโครงการย่อย
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โครงการย่อยที่ 3
โทร: 022187627 ext 102 E-mail: vipavee.p@chula.ac.th
10. รศ.ดร.ปณต ถาวรังกูร หัวหน้าโครงการย่อย
ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โครงการย่อยที่ 4
โทร: 074288753 E-mail: panote.t@psu.ac.th
11. รศ.ดร.เพริศพิชญ์ คณาธารณา ผู้ร่วมวิจัย
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โครงการย่อยที่ 4
โทร: 074288420 E-mail: proespichaya.k@psu.ac.th
12. ผศ.ดร.วรากร ลิ่มบุตร ผู้ร่วมวิจัย
ภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โครงการย่อยที่ 4
โทร: 074288563 E-mail: warakorn.l@psu.ac.th
13. ดร.อาภรณ์ นุ่มน่วม ผู้ร่วมวิจัย
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โครงการย่อยที่ 4
โทร: 074288457 E-mail: apon.n@psu.ac.th
14. ผศ.ดร. ชิตนนท์ บูรณชัย ผู้ร่วมวิจัย
ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โครงการย่อยที่ 4
โทร: 074288728 E-mail: chittanon.b@psu.ac.th
15. ผศ.ดร. จงดี ธรรมเขต ผู้ร่วมวิจัย
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โครงการย่อยที่ 4
โทร: 074288429 E-mail: chongdee.t@psu.ac.th
16. รศ.ดร.เมธา รัตนากรพิทักษ์ หัวหน้าโครงการย่อย
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร โครงการย่อยที่ 5
โทร: 055963464 E-mail: methar@nu.ac.th
17. ผศ.ดร.บุญจิรา รัตนากรพิทักษ์ ผู้ร่วมวิจัย
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร โครงการย่อยที่ 5

โทร: 0865893736 E-mail: boonjirab@nu.ac.th
18. ดร.มลิวรรณ นาคขุนทด ผู้ร่วมวิจัย
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร โครงการย่อยที่ 5
โทร: 0882808717 E-mail: lotharmali@yahoo.com
19. ดร.อุทัย วิชัย ผู้ร่วมวิจัย
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร โครงการย่อยที่ 5
โทร: 0817553772 E-mail: uthaiw@nu.ac.th
20. ผศ.ดร.คัชรินทร์ ศิริวงศ์ หัวหน้าโครงการย่อย
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โครงการย่อยที่ 6
โทร: 0850007543 E-mail: skhatcha@kku.ac.th
21. อ.ดร.วรรณฑณี สิทธิวงษ์ ผู้ร่วมโครงการย่อย
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ โครงการย่อยที่ 1
โทร: 0945531395 E-mail: wantanee.sit@gmail.com

2.3 การนำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์

2.3.1 บริษัท ISIS Innovations (ปัจจุบันเปลี่ยนชื่อเป็น Oxford University Innovation Ltd.) ซึ่งเป็นตัวแทนจัดการทรัพย์สินทางปัญญาของ Oxford University ซึ่งได้รับมอบอำนาจจาก สกว. และจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยให้ดำเนินการจดและใช้ประโยชน์จากสิทธิบัตร Lowe, G.; Vilaivan, T. “Homologous peptide nucleic acids” United States Patent US7098321 (August 29, 2006) ที่มีเนื้อหาเกี่ยวเนื่องกับเทคโนโลยีของ pyrrolidinyl PNA ซึ่งได้รับการสนับสนุนอย่างต่อเนื่องจาก สกว. ตั้งแต่ทุนรุ่นกลาง ได้ license เทคโนโลยีนี้ให้แก่บริษัท AdvanDx (USA) ซึ่งเป็นผู้วิจัยทางด้านพีเอ็นเอโพรบเพื่อการตรวจวินิจฉัยรายใหญ่ของสหรัฐอเมริกา และได้มีส่วนแบ่งสิทธิประโยชน์ (royalty) โดยได้สร้างผลตอบแทนจากการถ่ายทอดเทคโนโลยีโดยบริษัท ISIS Innovations เป็นมูลค่าในส่วนที่ประเทศไทยได้รับทั้งสิ้น 535,458.24 บาท ซึ่งได้จัดสรรกลับคืนไปให้กับสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย สกว. ผ่านสำนักงานทรัพย์สินทางปัญญา มารวม 3 งวด จำนวน 77,941.75, 34,695.82 และ 36,342.42 บาท คิดเป็นมูลค่ารวมทั้งสิ้น 148,979.99 บาท ซึ่งถือว่าเป็นการแสดงศักยภาพของเทคโนโลยีนี้ แต่เนื่องจากบริษัทประสบปัญหาในการระดมทุนจึงได้ยุติการ license ไปตั้งแต่เดือนธันวาคม 2558 และเป็นที่น่าเสียดายว่า ISIS Innovations ได้ตัดสินใจยุติการต่ออายุสิทธิบัตรของโครงการเดียวกันที่จดไว้ที่ยุโรป (Pyrrolidinyl Peptide Nucleic Acids, EP1513871B1) เนื่องจากไม่สามารถหา potential licensee ได้ โดยได้โอนสิทธิ์กลับมาที่ผู้วิจัย ซึ่งได้ประสานไปที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย แต่เมื่อสำนักงานทรัพย์สินทางปัญญาแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยได้ประเมินความเป็นไปได้ของการได้ทุนคืนเปรียบเทียบกับค่าใช้จ่ายในการรักษาสิทธิบัตรแล้วตัดสินใจที่จะไม่รับโอนสิทธิ์ ดังนั้นสิทธิบัตรของเทคโนโลยีพีเอ็นเอที่ยุโรปจึงหมดอายุไปตั้งแต่วันที่ 31 สิงหาคม 2560 ณ ปัจจุบัน ISIS Innovations ถือสิทธิบัตรสหรัฐอเมริกาไว้เพียงสิทธิบัตรเดียว และยังอยู่ระหว่างดำเนินการหา potential licensee ต่อไป โดยได้มีการติดต่อประสานงานกับหัวหน้าโครงการเป็นระยะ

2.3.2 ผู้วิจัยได้มีการเข้าไปพบปะพูดคุยเพื่อสร้างความร่วมมือกับกลุ่มวิจัยหลายกลุ่มในประเทศไทยที่มีแนวโน้มที่จะใช้ประโยชน์จากพีเอ็นเอ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในด้าน diagnostic และ therapeutic applications โดยบางกลุ่มได้มีความร่วมมือกันและได้ผลงานตีพิมพ์แล้ว เช่น ศ.ดร.อรวรรณ ชัยลภากุล (จุฬาฯ), ศ.ดร.ศุภศร วนิชเวชารุ่งเรือง (จุฬาฯ), รศ.ดร.วันชัย อัศวลาภสกุล (จุฬาฯ), ศ.พญ.ณัฏฐิยา หิรัญกาญจน์ (จุฬาฯ) บางกลุ่มก็

กำลังอยู่ระหว่างทำวิจัยและขอทุนวิจัยร่วมกันได้แก่กลุ่มวิจัยของ ศ.นพ.สุทัศน์ ฟู่เจริญ (มหิดล) และกลุ่มวิจัยอื่นอีกหลายกลุ่มที่กำลังอยู่ระหว่างการเจรจาและการประเมินผลการใช้งานเบื้องต้น ได้แก่ ศ.ดร.เพทาย เย็นจิตโสมนัส (มหิดล), ดร.วรรณสิกา เกียรติปฐมชัย (BIOTEC), ดร.สุกัญญา ยงเกียรติตระกูล (BIOTEC), ดร.นราพร สมบูรณ์นะ (จุฬาฯ) เป็นต้น โดยมีรายละเอียดตามหัวข้อ 3.3

2.3.3 ผู้วิจัยได้มีการสร้างร่วมมือกับกลุ่มวิจัยหลายกลุ่มในต่างประเทศตามรายละเอียดในหัวข้อ 3.3 รวมถึงมีบริษัทเอกชนจากต่างประเทศสองแห่งหนึ่งมาขอทดลองใช้พีเอ็นเอเทคโนโลยีเพื่อการตรวจลำดับเบสของดีเอ็นเอ บริษัทแรกคือ Depixus จากประเทศฝรั่งเศส ซึ่งได้มีการให้ตัวอย่างพีเอ็นเอไปสองครั้ง แต่เมื่อทดสอบเบื้องต้นแล้วไม่ตอบโจทย์การใช้งานของบริษัท จึงไม่ได้ดำเนินการต่อ อีกบริษัทหนึ่งคือ Access Sensor Technologies จากประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งสนใจทดลองใช้พีเอ็นเอในการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอแบบใหม่ ขณะนี้กำลังอยู่ระหว่างการตกลงเรื่องรายละเอียดในการส่งตัวอย่างทดสอบและค่าใช้จ่ายที่เกี่ยวข้องรวมทั้งการทำสัญญา Materials Transfer Agreement ผ่านการดำเนินการของสำนักงานทรัพย์สินทางปัญญาแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยมีกำหนดส่งมอบตัวอย่างพีเอ็นเอเพื่อทดลองใช้ภายในเดือนตุลาคม 2560

3. กิจกรรมอื่นที่เกี่ยวข้อง ได้แก่

3.1 ผลงานอื่นๆ เช่นการไปเสนอผลงาน การได้รับเชิญไปเป็นวิทยากร การได้รับรางวัล

3.1.1 การได้รับเชิญเป็นวิทยากร

รอบรายงาน 6 เดือน

3.1.1.1 หัวหน้าโครงการ (ศ.ดร.ธีรยุทธ วีไลวัลย์) ได้รับเชิญเป็นวิทยากรบรรยายเรื่อง Peptide nucleic acid (PNA): Development and applications งานสัมมนาวิชาการเรื่องโมเลกุลที่มีความสามารถในการจดจำ (Target Recognition Molecules) เพื่อประโยชน์ในการพัฒนาเครื่องมือตรวจวัดแบบรวดเร็วและเพื่อการรักษา จัดโดยสวทช.และสวทน. จามจุรีสแควร์ (25 สิงหาคม 2557)

3.1.1.2 หัวหน้าโครงการ (ศ.ดร.ธีรยุทธ วีไลวัลย์) ได้รับเชิญเป็นวิทยากรบรรยายเรื่อง Pyrrolidinyl peptide nucleic acid with α/β-peptide backbone: Synthesis, properties and applications ในสัมมนาบัณฑิตศึกษา (Topic of Current Interest in Chemical Biology) ของสถาบันบัณฑิตศึกษาจุฬาภรณ์ (16 กันยายน 2557)

รอบรายงาน 12 เดือน

3.1.1.3 หัวหน้าโครงการ (ศ.ดร.ธีรยุทธ วีไลวัลย์) ได้รับเชิญเป็นวิทยากรบรรยายนำในกลุ่ม Chemical Science งานประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 14 เรื่อง "Pyrrolidinyl peptide nucleic acid with α/β-peptide backbone: New structures and functions"

3.1.1.4 หัวหน้าโครงการ (ศ.ดร.ธีรยุทธ วีไลวัลย์) ได้รับเชิญเป็นวิทยากรบรรยายพิเศษเรื่อง "Pyrrolidinyl peptide nucleic acid: A new DNA analogue with unusual properties" งานประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 40 (วทท 40) โรงแรมพูลแมน ขอนแก่น

รอบรายงาน 18 เดือน

3.1.1.5 หัวหน้าโครงการ (ศ.ดร.ธีรยุทธ วีไลวัลย์) ได้รับเชิญเป็นวิทยากรบรรยายเรื่อง "Pyrrolidinyl peptide nucleic acid: A new DNA analogue with unusual properties" The opening ceremony and the premier contest of The Hitachi Trophy 2015 คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย วันที่ 24 เมษายน 2558

3.1.1.6 หัวหน้าโครงการ (ศ.ดร.ธีรยุทธ วีไลวัลย์) ได้รับเชิญเป็นวิทยากรบรรยายเรื่อง "Pyrrolidinyl peptide nucleic acids: Development and Applications" งานประชุม XVI RGJ Congress 2015, 11th-13th June 2015 โรงแรมจอมเทียนปาล์มบีช รีสอร์ท

3.1.1.7 หัวหน้าโครงการ (ศ.ดร.ธีรยุทธ วีไลวัลย์) ได้รับเชิญเป็นวิทยากรบรรยายเรื่อง "Synthetic organic chemistry as a tool for exploring the unnatural world" ในงาน 9th Asian Science Camp (ASC 2015), 2nd-8th Aug 2015, Sirindhorn Science Home, NSTDA, Pathum Thani, Thailand

รอบรายงาน 24 เดือน

-

รอบรายงาน 30 เดือน

-

รอบรายงานฉบับสมบูรณ์

3.1.1.8 หัวหน้าโครงการ (ศ.ดร.ธีรยุทธ วีไลวัลย์) ได้รับเชิญเป็นวิทยากรบรรยายเรื่อง "Pyrrolidinyl peptide nucleic acids with α/β-peptide backbone: Synthesis, properties and applications" Department

of Biomolecular Engineering, Graduate School of Engineering, University of Nagoya. (13 พฤศจิกายน 2560)

3.1.2 การเสนอผลงานระดับนานาชาติ

รอบรายงาน 6 เดือน

3.1.2.1 Vilaivan, T. Pyrrolidinyl peptide nucleic acid with α/β-peptide backbone: Synthesis, properties and applications.Telluride Workshop on Nucleic Acid Chemistry 2014, 28th July-1st August 2014, The Telluride Intermediate School, Telluride, CO, USA. (oral, participation by invitation only) (โครงการย่อย 1)

3.1.2.2 Hoven, V. P. Surface-grafted polymer brushes: Tunable platform for biosensing applications.The 45th International Symposium on Macromolecules-IUPAC World Polymer Congress (MACRO 2014), July 6 - 11, 2014, Chiangmai, Thailand. (oral, invited presentation) (โครงการย่อย 3)

3.1.2.3 Leekrajang, M.; Vilaivan, T.; Hoven, V. P. Filter paper grafted with PNA-containing copolymer brushes for colorimetric DNA sequence determination.The 45th International Symposium on Macromolecules-IUPAC World Polymer Congress (MACRO 2014), July 6 - 11, 2014, Chiangmai, Thailand. (Poster) (โครงการย่อย 3)

3.1.2.4 Wiarachai, O.; Vilaivan, T.; Iwasaki, Y.; Hoven, V. P. Clickable and anti-fouling copolymer platform of poly[(propargyl methacrylate)-ran-(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)] for biosensing applications.The 45th International Symposium on Macromolecules-IUPAC World Polymer Congress (MACRO 2014), July 6 - 11, 2014, Chiangmai, Thailand. (Poster) (โครงการย่อย 3)

รอบรายงาน 12 เดือน

3.1.2.5 Leekrajang, M.; Vilaivan, T.; Hoven, V. P. Filter paper grafted with PNA-containing copolymer brushes for colorimetric DNA sequence determination.Pure and Applied Chemistry International Conference 2015, January 21st- 23rd, 2015, Amari Watergate Hotel, Bangkok, Thailand. (Poster) (โครงการย่อย 3)

3.1.2.6 Pansuwan, H.; Vilaivan, T.; Suparpprom, C. Synthesis of pyrrolidinyl peptide nucleic acid carrying novel hydrophilic β-amino acid spacer.Pure and Applied Chemistry International Conference 2015 (PACCON2015), 21st-23rd January 2015, Amari Watergate Hotel, Bangkok, Thailand. (poster) (โครงการย่อย 1)

3.1.2.7 Dangsopon, A.; Vilaivan, T.; Suparpprom, C. Synthesis and fluorescence properties of 3,6-diaminocarbazole-modified pyrrolidinyl peptide nucleic acid.Pure and Applied Chemistry International Conference 2015 (PACCON2015), 21st-23rd January 2015, Amari Watergate Hotel, Bangkok, Thailand. (oral) (โครงการย่อย 1)

3.1.2.8 Yotapan, N.; Vilaivan, T. Doubly-labeled pyrrolidinyl peptide nucleic acid as hybridization-responsive fluorescence probes.The 14th Junior International Conference on

Cutting-Edge Organic Chemistry in Asia (JICCEOCA-4), 28th-30th November 2014, Chulabhorn Research Institute Conference Center, Bangkok, Thailand. (poster) (โครงการย่อย 1)

รอบรายงาน 18 เดือน

3.1.2.9 Yotapan, N.; Vilaivan, T. DNA double duplex invasion by non-self pairing pyrrolidinyl peptide nucleic acids.The 45th World Chemistry Congress (IUPAC-2015), 09th-14th August 2015, BEXCO, Busan, Korea. (poster)

3.1.2.10 Khadsai, S.; Vilaivan, T.; Rutnakornpituk, B.; Wichai, U.; Nakkuntod, M.; Rutnakornpituk, M. Bioconjugation of Anionic Magnetite Nanoparticle (MNP) with Pyrrolidinyl Peptide Nucleic Acid (PNA) for Molecular Biology Technique.International Polymer Conference of Thailand (PCT5), 18th-19th June 2015, Patumwan Princess Hotel, Bangkok, Thailand.

3.1.2.11 Seeja, N.; Vilaivan, T.; Rutnakornpituk, M.; Wichai, U.; Rutnakornpituk, B. PNA-conjugated Magnetic Nanoclusters for Purification of DNA.International Polymer Conference of Thailand (PCT5), 18th-19th June 2015, Patumwan Princess Hotel, Bangkok, Thailand.

รอบรายงาน 24 เดือน

3.1.2.12 Arayachukeat, S.; Seemork, J.; Pan-In, P.; Amornwachirabodee, K.; Sangphech, N.; Sansureerungsikul, T.; Sathornsantikun, K.; Vilaivan, C.; Shigyou, K.; Pienpinijtham, P.; Vilaivan, T.; Palaga, T.; Banlunara, W.; Hamada, T.; Wanichwecharungruang, S. .Oxidized carbon nanoparticles as carrier to bring macromolecules across lipid bilayer membrane.Pure and Applied Chemistry International Conference 2016 (PACCON2016), 9th–11th February 2016, BITEC, Bangkok, Thailand. (invited lecture by S. Wanichwecharungruang)

3.1.2.13 Charoenpakdee, C.; Unarunotai, S.; Vilaivan, T. Demonstration of strand invasion of DNA duplex by pyrrolidinyl peptide nucleic acid using graphene oxide.Pure and Applied Chemistry International Conference 2016 (PACCON2016), 9th–11th February 2016, BITEC, Bangkok, Thailand. (poster, with best poster awards)

3.1.2.14 Jirakittiwut, N.; Supabowornsathit, K.; Faikhruea, K.; Praneenararat, T.; Vilaivan, T. Pyrrolidinyl PNA immobilized on cellulose membrane for DNA detection: A comparison of two different immobilization methods.Pure and Applied Chemistry International Conference 2016 (PACCON2016), 9th–11th February 2016, BITEC, Bangkok, Thailand. (poster)

3.1.2.15 Ratthachag, T.; Vilaivan, T. Anomalous stereochemistry-dependent thermal stability of pyrimidine-rich pyrrolidinyl peptide nucleic acid-deoxyribonucleic acid hybrids.Pure and Applied Chemistry International Conference 2016 (PACCON2016), 9th–11th February 2016, BITEC, Bangkok, Thailand. (poster)

3.1.2.16 Watcharobon, S.; Petthai, P.; Vilaivan, T.; Sittiwong, W. Synthetic investigation of cyclobutane-containing β-amino acids via [2+2] thermal cycloaddition.Pure and Applied Chemistry International Conference 2016 (PACCON2016), 9th–11th February 2016, BITEC, Bangkok, Thailand. (poster)

3.1.2.17 Khadsai, S.; Vilaivan, T.; Rutnakornpituk, B.; Wichai, U.; Nakkuntod, M.; Rutnakornpituk, M. Bioconjugation of anionic magnetite nanoparticle with pyrrolidinyl peptide nucleic acid for

deoxyribonucleic acid pre-concentration application.The 11th International Conference on Advanced Polymers via Macromolecular Engineering (APME 2015), 18th-22th October 2015, Yokohama, Japan. (oral)

รอบรายงาน 30 เดือน

3.1.2.18 Seeja, N.; Vilaivan, T.; Rutnakornpituk, M.; Rutnakornpituk, B. Poly(acrylic acid)-grafted magnetite nanocluster conjugated with pyrollidinyl peptide nucleic acid for DNA base discrimination.The 6th International Polymer Conference of Thailand (PCT6), June 30th-July 1st, 2016, Patumwan Princess Hotel, Bangkok, Thailand. (poster)

รอบรายงานฉบับสมบูรณ์

3.1.2.19 Rutnakornpituk, M.; Khadsai, S.; Rutnakornpituk, B.; Nakkuntod, M.; Vilaivan, T. PNA-conjugated magnetic nanocluster for real DNA pre-concentration.The 11th International Polymer Conference (IPC2016), Oral, 13-16 December 2016, Fukuoka, Japan. (oral)

3.1.2.20 Vilaivan, T. Pyrrolidinyl peptide nucleic acids with α/β-peptide backbone: Synthesis, properties and applications.Beilstein Organic Chemistry Symposium 2016: Nucleic Acid Chemistry, Oct 5–7, 2016, Prien am Chiemsee, Germany. (oral, invited lecture).

3.1.2.21 Donthongkwa, R.; Vilaivan, T.; Hoven, V. P. Synthesis and Hybridization Property of Peptide Nucleic Acid-Functionalized Monomer.PPC & Petromat Symposium 2017, May 23, **2017**, Pathumwan Princess Hotel, Bangkok, Thailand, Poster.

3.1.2.22 Ditmangklo, B.; Chang, Z.; Boddaert, T.; Vilaivan, T.; Aitken, D. J. Synthesis of building blocks to improve water solubility and reduce non-specific aggregation of pyrrolidinyl peptide nucleic acids.ICSN-UPSACLAY Natural Products Symposium (15ème Symposium ICSN). June 29th-30th 2017, CNRS Campus Gif-sur-Yvette, France. (poster)

3.1.2.23 Vilaivan, T. Pyrrolidinyl peptide nucleic acid: A conformationally constrained PNA with unusual hybridization properties.The 44th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (ISNAC2017), Nov 14–16, 2017, Tokyo, Japan. (oral, invited lecture)

3.1.3 การเสนอผลงานระดับชาติ

รอบรายงาน 6 เดือน

-

รอบรายงาน 12 เดือน

3.1.3.1 Nuanyai, T; Vilaivan, T. Modification of pyrrolidinyl peptide nucleic acid by poly(ethylene glycol) derivatives.The 40th Congress on Science and Technology (STT40), 2nd–4th Dec 2014, Pullman Khon Kaen Raja Orchid, Khon Kaen. (poster) (โครงการย่อย 1)

3.1.3.2 Yotapan, N.; Vilaivan, T. Doubly end-labeled pyrrolidinyl peptide nucleic acid beacons.The 40th Congress on Science and Technology (STT40), 2nd–4th Dec 2014, Pullman Khon Kaen Raja Orchid, Khon Kaen. (poster) (โครงการย่อย 1)

3.1.3.3 Seankongsuk, P.; Padungros, P.; Vilaivan, T. Synthesis of oxetane-containing β-amino acid as a building block of novel pyrrolidinyl peptide nucleic acid.The 40th Congress on

Science and Technology (STT40), 2nd–4th Dec 2014, Pullman Khon Kaen Raja Orchid, Khon Kaen. (poster) (โครงการย่อย 1)

รอบรายงาน 18 เดือน

-

รอบรายงาน 24 เดือน

3.1.3.4 Charoenpakdee, C.; Unarunotai, S.; Vilaivan, T. A rapid and specific DNA detection using pyrrolidinyl peptide nucleic acid probe and graphene oxide.The 41st Congress on Science and Technology (STT41), 6th–8th Nov 2015, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima. (oral)

3.1.3.5 Seankongsuk, P.; Padungros, P.; Vilaivan, T. AocPNA – A new pyrrolidinyl peptide nucleic acid with an oxetane-containing β-amino acid linker.The 41st Congress on Science and Technology (STT41), 6th–8th Nov 2015, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima. (poster)

รอบรายงาน 30 เดือน

3.1.3.6 Kangkamano, T.; Kanatharana, P.; Numnuam, A.; Limbut, W.; Vilaivan, T.; Thavarungkul, P. Label-free electrochemical detection of DNA using PNA probe functionalized on conducting polypyrrole/silver nanofoam modified electrode.PERCH-CIC Congress IX 2016, 26-29 June 2016, Jomtien Palm Beach Hotel & Resort, Pattaya, Chonburi, Thailand. (poster)

3.1.3.7 Chuaynukool, C.; Thipmanee, O.; Numnuam, A.; Limbut, W.; Thavarungkul, P.l Kanatharana, P. Electrochemical DNA biosensor using PNA probes immobilized on polyaniline-graphene-silver nanocomposite modified electrode.PERCH-CIC Congress IX 2016, 26-29 June 2016, Jomtien Palm Beach Hotel & Resort, Pattaya, Chonburi, Thailand. (poster)

3.1.3.8 Seeja, N.; Vilaivan, T.; Rutnakornpituk, M.; Wichai, U.; Rutnakornpituk, B. Magnetite nanoparticles grafted poly (acrylic acid) conjugated with peptide nucleic acid (PNA) for biomedical applications.The 8th National Science Research Conference, 30-31 May 2016, Payao University. (oral)

3.1.1.9 Vilaivan, T. Pyrrolidinyl peptide nucleic acids: Synthesis, properties and applications. The 5th Burapha University International Conference 2016, Jul 28–29, 2016, Dusit Thani Hotel, Pattaya, Thailand. (oral, invited lecture)

รอบรายงานฉบับสมบูรณ์

3.1.3.10 Chuaynukul, C.; Thavarungkul, P.; Numnuam, A.; Limbut, W.; Vilaivn, T.; Kanatharana, P. Development of an electrochemical DNA biosensor based on screen-printed carbon electrode modified with polyaniline, graphene-silver nanocomposite.The 13th Asian Conference on Analytical Sciences (ASIANALYSIS XIII, The Empress International Invention Center, 8th - 11th December 2016, Chiang Mai, Thailand. (poster)

3.1.3.11 Kangkamano, T.; Kanatharana, P.; Numnuam, A.; Limbut, W.; Vilaivan, T.; Thavarungkul, P. A conducting polypyrrole/silver nanofoam modified electrode for a label-free electrochemical detection of DNA: Effect of PNA probe length.The 13th Asian Conference

on Analytical Sciences (ASIANALYSIS XIII), The Empress International Invention Center, 8th - 11th December 2016 Chiang Mai, Thailand. (poster)

3.1.3.12 Faikhruea, K.; Vilaivan, T. Fluorescence and colorimetric detections of DNA by gold nanoparticles and pyrrolidinyl peptide nucleic acid probes. The 43rd Congress on Science and Technology (STT43), 17th–19th Oct 2017, Chulalongkorn University, Bangkok. (poster)

3.1.3.13 Ditmangklo, B.; Boddaert, T.; Aitken, D. J.; Vilaivan, T. Synthetic studies of amino-modified cyclobutane amino acid as a building block for novel pyrrolidinyl peptide nucleic acids.The 43rd Congress on Science and Technology (STT43), 17th–19th Oct 2017, Chulalongkorn University, Bangkok. (oral)

3.1.3.14 Muangkaew, P.; Vilaivan, T. Selective cross-linking between furan-modified PNA and DNA. The 43rd Congress on Science and Technology (STT43), 17th–19th Oct 2017, Chulalongkorn University, Bangkok. (poster)

3.1.4 การได้รับรางวัล

3.1.4.1 หัวหน้าโครงการ (ศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์) ได้รับรางวัลนักวิทยาศาสตร์ดีเด่น ประจำปี พ.ศ. 2557 จากมูลนิธิส่งเสริมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์ (สิงหาคม 2557)

3.1.4.2 ผู้ร่วมโครงการ (รศ.ดร.วรวีร์ โฮเว่น) ได้รับรางวัลนักวิจัยที่มีผลงานได้รับการอ้างอิงสูงสุด ประจำปี 2560 สาขาวิทยาศาสตร์กายภาพและคณิตศาสตร์ จากคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1.4.3 ผู้ร่วมโครงการ (รศ.ดร.วรวีร์ โฮเว่น) ได้รับรางวัลผลงานวิจัยดีมาก ประเภทอาจารย์และนักวิจัย ประจำปี 2559 จากกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 กิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์

-

3.3 การเชื่อมโยงทางวิชาการกับนักวิชาการอื่นๆ ทั้งในและต่างประเทศ

3.3.1 Professor Dr. Hans-Achim Wagenknecht, Institute for Organic Chemistry, Karlsruhe Institute of Technology (KIT), Germany เป็นผู้เชี่ยวชาญด้านการสังเคราะห์และศึกษาสมบัติทาง photophysics และ biological applications ของดีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วยฟลูออโรฟอร์ มีความร่วมมือกับหัวหน้าโครงการอย่างต่อเนื่องเกี่ยวกับการสังเคราะห์และประยุกต์ใช้งานพีเอ็นเอที่ดัดแปรด้วยฟลูออโรฟอร์ โดยได้มีนักศึกษาจากประเทศเยอรมนี (Ms. Peggy Bohländer) มาทำวิจัยที่ประเทศไทยภายใต้ความร่วมมือดังกล่าวในช่วงเดือนมกราคม - เมษายน 2557

3.3.2 ศ.นพ.สุทัศน์ ฟู่เจริญ ศูนย์วิจัยธาลัสซีเมีย สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล เป็นผู้เชี่ยวชาญทางด้านโรคธาลัสซีเมียแบบครบวงจร มีความร่วมมือกับหัวหน้าโครงการ (ศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์) ในการนำพีเอ็นเอไปใช้เป็นโพรบในการตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียด้วยเทคนิค reversed dot blot ตั้งแต่เดือนสิงหาคม 2557 โดยผลการทดลองเบื้องต้นเป็นที่น่าพอใจและได้พัฒนาเป็นโครงการวิจัยใหม่ร่วมกันโดยได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางการแพทย์ (พฤศจิกายน 2559–ตุลาคม 2561) เพื่อนำไปต่อยอดสู่การใช้ประโยชน์ในการคัดกรองโรคทาลัสซีเมีย

3.3.3 ศ.ดร.อรวรรณ ชัยลภากุล ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ Professor Charles S. Henry, Department of Chemistry, Colorado State University ทั้งสองเป็นผู้เชี่ยวชาญทางด้านการวิเคราะห์โดยเทคนิคเคมีไฟฟ้า และ paper-based devices มีความร่วมมือกับหัวหน้าโครงการ (ศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์) ในการนำพีเอ็นเอไปใช้เป็นโพรบในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ HPV ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคมะเร็งปากมดลูกโดยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า

3.3.4 รศ.ดร.ศุภศร วนิชเวชารุ่งเรือง ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็นผู้เชี่ยวชาญทางด้านวัสดุนาโนเพื่อการนำส่งยาแบบควบคุมการปลดปล่อยได้ มีความร่วมมือกับหัวหน้าโครงการ (ศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์) ในการนำส่งพีเอ็นเอเข้าเซลล์เพื่อนำไปใช้ในการควบคุมการแสดงออกของยีนเพื่อประโยชน์ในการรักษาโรค

3.3.5 Professor Dr. Yasuhiko Iwasaki, Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University, Japan มีความร่วมมือกับหัวหน้าโครงการย่อยที่ 3 (รศ.ดร.วรวีร์ โฮเว่น) อย่างต่อเนื่องในส่วนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์และประยุกต์ใช้ทางการตรวจวัดทางชีวภาพของโคพอลิเมอร์ที่มี methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) เป็นองค์ประกอบ ปัจจุบันมีนิสิตปริญญาเอกที่มีงานวิจัยส่วนหนึ่งอยู่ภายใต้โครงการนี้คือ นางสาวอรพรรณ เวียรชัย เดินทางไปทำวิจัยที่ประเทศญี่ปุ่นเป็นเวลา 9 เดือน (สิงหาคม 2557 – มีนาคม 2558)

3.3.6 Associate Professor Dr. Roderick W. Bates, Division of Chemistry and Biological Chemistry, School of Physical and Mathematical Sciences, Nanyang Technological University, Singapore เป็นผู้เชี่ยวชาญด้านการสังเคราะห์ มีความร่วมมือกับหัวหน้าโครงการ (ศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์) ในการสังเคราะห์โมโนเมอร์ของพีเอ็นเอและการพิสูจน์กลไกการเปิดวงของ aocPNA ภายใต้ภาวะกรด โดยได้ส่งนิสิตปริญญาโทคือนายภัทรเกียรติ แสนคงสุข ไปทำวิจัยระยะสั้นเกี่ยวกับการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการเปิดวงของ oxetane amino acid ที่ NTU ตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์ - พฤษภาคม 2559

3.3.7 ดร.สุกัญญา ยงเกียรติตระกูล ดร.วรรณสิกา เกียรติปฐมชัย และ ดร.ดารินทร์ คงคาสุริยะฉาย ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ มีความสนใจในการใช้เทคโนโลยีของดีเอ็นเอเพื่อการตรวจวินิจฉัยเช่น โรคกุ้ง เชื้อมาลาเรีย เป็นต้น ได้มีความร่วมมือกับหัวหน้าโครงการ (ศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์) ในการนำพีเอ็นเอไปประยุกต์ใช้เพื่อการตรวจวินิจฉัย

3.3.8 ศ.ดร.เพทาย เย็นจิตโสมนัส หน่วยอณูชีววิทยาการแพทย์ สถานส่งเสริมการวิจัย และผู้ช่วยคณบดีฝ่ายวิจัย คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มีความร่วมมือกันในการนำพีเอ็นเอไปทดสอบการยับยั้งไวรัส Dengue

3.3.9 Professor Byeang-Hyean Kim, Department of Chemistry, Pohang Institute of Science and Technology (POSTECH) เป็นผู้เชี่ยวชาญด้านการสังเคราะห์และ biological applications ของดีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วยฟลูออโรฟอร์ มีความร่วมมือกับหัวหน้าโครงการ (ศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์) โดยได้มีนิสิตปริญญาเอกคือ น.ส.ดวงรัตน์ นิ่มอนุสสรณ์กุล ไปทำวิจัยที่ POSTECH เกี่ยวกับการสังเคราะห์แอพตาเมอร์เรืองแสงเพื่อใช้ในการตรวจวัด ATP ในช่วงเดือนมกราคม - มิถุนายน 2559

3.3.10 Professor David Aitken จาก Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d’Orsay, Université Paris-Sud เป็นผู้เชี่ยวชาญด้านการสังเคราะห์ cyclobutane amino acids และ foldamers มีความร่วมมือกับหัวหน้าโครงการ (ศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์) โดยปัจจุบัน ดร.วรรณฑณี สิทธิวงษ์ (ผู้ร่วมโครงการที่ 1) ไปทำวิจัยระยะสั้นเกี่ยวกับการสังเคราะห์ cyclobutane amino acid ในช่วงเดือนกรกฎาคม - กันยายน 2559 และได้ส่งนิสิตปริญญาเอกคือ น.ส.บุญส่ง ดิษมังคล้อ ไปทำวิจัยที่ Université Paris-Sud เกี่ยวกับการสังเคราะห์ functionalized cyclobutane amino acids ในช่วงเดือนมกราคม - มิถุนายน 2560

3.3.11 ศ.พญ.ณัฏฐิยา หิรัญกาญจน์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มีความร่วมมือด้านการพัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยการแพ้ยาจากการทำ HLA genotyping โดยอาศัยพีเอ็นเอโพรบ

3.3.12 รศ.ดร.วันชัย อัศวลาภสกุล ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มีความร่วมมือในการใช้พีเอ็นเอเพื่อควบคุมการทำงานของ miRNA และการศึกษากลไกการแพร่กระจายของไวรัสเดงกี่

3.3.14 ผศ.ดร.นพ.ประทีป วรรณิสสร สาขาวิชาตจวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร มีความร่วมมือกันในการใช้พีเอ็นเอโพรบสำหรับตรวจโรค Steven-Johnson โดยใช้เทคนิค Fluorescence in situ hybridization (FISH)

3.3.15 Professor Hiroyuki Asanuma จาก Department of Biomolecular Engineering, Graduate School of Engineering, Nagoya University, Japan เป็นผู้เชี่ยวชาญด้านการออกแบบกรดนิวคลีอิกที่มีหน้าที่เฉพาะ มีความสนใจร่วมกันในการใช้พีเอ็นเอเป็นตัวช่วยให้เกิด invasion เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวัดดีเอ็นเอที่เป็นสายคู่โดยใช้โพรบเรืองแสงที่ทาง Prof. Asanuma ได้พัฒนาขึ้น

4. สรุปผลงานวิจัย

ผลการดำเนินการในภาพรวมตัวงานเสร็จสมบูรณ์ตามข้อเสนอโครงการ และบรรลุวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ ในเชิงขององค์ความรู้ที่เกิดขึ้น กล่าวคือ 1) การออกแบบ สังเคราะห์ และศึกษาสมบัติการเข้าคู่เบสของเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิด (พีเอ็นเอ) ชนิดใหม่ที่มีคอนฟอร์เมชันที่ถูกจำกัด โดยมีเป้าหมายเพื่อเพิ่มการละลายและลดการจับยึดแบบไม่จำเพาะเจาะจง โดยยังคงรักษาหรือมีสมบัติการจับยึดที่ดีขึ้น 2) การเพิ่มสมบัติและหน้าที่ใหม่ให้แก่ระบบพีเอ็นเอที่มีอยู่แล้ว ตัวอย่างเช่น พีเอ็นเอมีสมบัติการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงที่ตอบสนองต่อการเข้าคู่กับดีเอ็นเอเป้าหมาย พีเอ็นเอโพรบที่ตอบสนองทางเคมีไฟฟ้า หรือพีเอ็นเอโพรบที่สามารถเกิดปฏิกิริยาเชื่อมขวางกับดีเอ็นเอหลังการกระตุ้นที่เหมาะสม ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพสูง 3) วิธีการใหม่สำหรับการตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยใช้ acpcPNA เป็นโพรบร่วมกับเทคนิคใหม่ เช่น DNA-templated or DNA-catalyzed reaction และ/หรือวัสดุสมัยใหม่ เช่น พอลิเมอร์ และวัสดุนาโน เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ เช่น การแพทย์ อาหาร และการเกษตร 4) ความเข้าใจปัจจัยทางโครงสร้างที่ส่งผลต่อสมบัติการจับยึดของพีเอ็นเอโดยใช้ข้อมูลจากการทดลองร่วมกับการคำนวณทางทฤษฎี

ผลลัพธ์เชิงประจักษ์ที่ได้จากงานวิจัยนี้คือผลงานตีพิมพ์จำนวนกว่า 20 เรื่องในวารสารวิชาการระดับนานาชาติที่มีคุณภาพสูง นับถึงวันที่รายงานมีผลงานที่ตีพิมพ์และได้รับการตอบรับให้ตีพิมพ์ถึงวันที่รายงานจำนวนรวม 22 บทความ และอยู่ระหว่างรอผลการพิจารณาและเตรียมต้นฉบับบทความอีกไม่น้อยกว่า 8 บทความ โดยผู้วิจัยจะรีบรายงานเพิ่มเติมเมื่อครบตามเป้าหมาย ในเชิงปริมาณ ผลงานที่ได้รับการตีพิมพ์หรือตอบรับแล้วเป็นผลงานจากโครงการย่อยที่ 1 จำนวน 14 บทความ โครงการย่อยที่ 2 จำนวน 3 บทความ โครงการย่อยที่ 3 จำนวน 2 บทความ โครงการย่อยที่ 4 จำนวน 1 บทความ โครงการย่อยที่ 5 จำนวน 2 บทความ โครงการย่อยที่ 6 ยังไม่มีผลงานตีพิมพ์ ในเชิงคุณภาพ มีบทความที่ได้ลงตีพิมพ์ในวารสารที่มี IF2016 มากกว่าหรือเท่ากับ 10 จำนวน 2 บทความ, อยู่ระหว่าง 6.00–9.99 จำนวน 2 บทความ, อยู่ระหว่าง 4.00–5.99 จำนวน 6 บทความ, อยู่ระหว่าง 2.00–3.99 จำนวน 10 บทความ, ต่ำกว่า 2.00 จำนวน 2 บทความโดยหนึ่งในนี้เป็นวารสารใหม่ จึงยังไม่มีข้อมูลในฐานข้อมูล ISI องค์ความรู้ที่ได้นอกจากจะสามารถตีพิมพ์ในวารสารที่มีผลกระทบสูงแล้ว ยังมีศักยภาพในเชิงพาณิชย์ คณะผู้วิจัยได้พยายามต่อยอดโดยการสร้างความร่วมมือกับทั้งนักวิจัยและภาคเอกชนเพื่อพัฒนาสู่การนำใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ โดยได้มีบริษัทต่างประเทศที่ให้ความสนใจเทคโนโลยีนี้แล้ว 2 บริษัท และกำลังอยู่ระหว่างการทดสอบใช้งานพีเอ็นเอ

ในด้านของการสร้างคน โครงการวิจัยนี้อาศัยพิร์โรลิดินิลพีเอ็นเอเป็นจุดสนใจร่วมในการดึงนักวิจัยที่มีความเชี่ยวชาญจากหลายสาขาได้แก่ เคมีอินทรีย์สังเคราะห์ เคมีวิเคราะห์ เคมีพอลิเมอร์ นาโนเทคโนโลยี ชีววิทยาโมเลกุล เคมีคำนวณ และการเชื่อมโยงระหว่างเคมีกับชีววิทยามาทำงานร่วมกัน นอกจากนี้ยังได้มีส่วนในการสร้างบุคลากรด้านวิจัยซึ่งรวมถึงนักวิจัย 20 คนและนักศึกษาระดับปริญญาโท-เอกอย่างน้อย 20 คน จาก 7 สถาบัน และเกิดเครือข่ายงานวิจัยที่ยั่งยืนทั้งในระดับชาติและนานาชาติ และการผลิตบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญในสาขาวิจัยทางด้านเคมีอินทรีย์/เคมีวิเคราะห์/เคมีวัสดุ ทั้งในระดับปริญญาโท ปริญญาเอก และหลังปริญญาเอก รวมกันไม่น้อยกว่า 30 คน ซึ่งจะเป็นกำลังสำคัญของการพัฒนางานวิจัยของประเทศต่อไปในอนาคต

5. เอกสารแนบ

5.1 reprint หรือ manuscript

5.1.1 reprint ของผลงานหมายเลข 2.1.1.1 – 2.1.1.22 (ภาคผนวก 2)

5.1.2 บทคัดย่อของงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ (3.1.2.1 – 3.1.2.22) (ภาคผนวก 3, electronic version only)

5.1.3 บทคัดย่อของงานประชุมวิชาการระดับชาติ (3.1.2.1 – 3.1.3.11) (ภาคผนวก 3, electronic version only)

หมายเหตุ: เนื่องจากบางผลงาน ได้แก่ 3.1.2.23, 3.1.3.12–3.1.3.14 ยังไม่ถึงกำหนดจัดประชุม จึงยังไม่สามารถเผยแพร่บทคัดย่อได้ใน ณ เวลาที่ส่งรายงาน

5.2 ข้อมูลและประวัติย่อของผู้ได้รับทุนวิจัยระดับปริญญาโท/เอกจากโครงการ

โครงการย่อย	ชื่อ	ระดับ	สาขา	สังกัด	ช่วงเวลาที่รับทุน
1	นางสาวจุฑาทิพย์ คงเพ็ชร์	ผู้ช่วยวิจัย	เคมี	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	17 มี.ค. 2557 - 16 มิ.ย. 2557
1	นางสาวพิชชานันท์ ศรีวะรมย์	ผู้ช่วยวิจัย	เคมี	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	17 มิ.ย. 2557 - 16 ก.ย. 2557 17 ก.ย. 2557 - 16 พ.ย. 2557
1	นางสาวเพ็ญทิพ เมืองแก้ว	ผู้ช่วยวิจัย	เคมี	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	17 มี.ค. 2557 - 16 ส.ค. 2557
1	นางสาวหฤทัย ปัญสุวรรณ	ปริญญาโท	เคมี	มหาวิทยาลัยนเรศวร	17 พ.ย. 2557 - 16 มี.ค. 2558 17 มี.ค. 2558 - 16 ก.ค. 2558
1	นายอัครพล แดงโสภณ	ปริญญาโท	เคมี	มหาวิทยาลัยนเรศวร	17 ส.ค. 2557 - 16 ก.ย. 2557 17 ก.ย. 2557 - 16 มี.ค. 2558 17 มี.ค. 2558 - 16 ก.ค. 2558
1	นายณัฐพล จิระกิตติวุฒิ	ปริญญาโท	เคมี	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	17 ก.ค. 2558 - 16 ก.ย. 2558 17 ก.ย. 2558 - 16 มี.ค. 2559 17 มี.ค. 2559 - 16 ก.ค. 2559

โครงการย่อย	ชื่อ	ระดับ	สาขา	สังกัด	ช่วงเวลาที่รับทุน
1	นางสาวตรีชฎา รัตนจักร์	ปริญญาโท	เคมี	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	17 ก.ค. 2558 - 16 ก.ย. 2558 17 ก.ย. 2558 - 16 มี.ค. 2559 17 มี.ค. 2559 - 16 ก.ย. 2559 17 ก.ย. 2559 - 16 มี.ค. 2560
1	นางสาวบุญส่ง ดิษมังคล้อ	ปริญญาเอก (ไม่เต็มเวลา)	เคมี	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	17 ก.ค. 2559 - 16 ก.ย. 2559 17 ก.ย. 2559 - 16 มี.ค. 2560
2	นายณัฐวุฒิ โยธาพันธ์	ปริญญาเอก	เคมี	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	17 มี.ค. 2557 - 16 ก.ย. 2557 17 ก.ย. 2557 - 16 มี.ค. 2558 17 มี.ค. 2558 - 16 ก.ค. 2558
2	นางสาวดวงรัตน์ นิ่มอนุสสรณ์กุล	ปริญญาเอก	เคมี	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	17 ก.ค. 2558 - 16 ก.ย. 2558 17 ก.ย. 2558 - 16 มี.ค. 2559 17 มี.ค. 2559 - 16 ก.ย. 2559 17 ก.ย. 2559 - 16 มี.ค. 2560
3	นางสาวมาลินี ลี้กระจ่าง	ปริญญาโท	ปิโตรเคมีและวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	17 มี.ค. 2557 - 16 ก.ย. 2557 17 ก.ย. 2558 - 16 มี.ค. 2558 17 มี.ค. 2558 - 16 ก.ย. 2558
3	นางสาวพิมพ์ชนก เอี่ยมวิถีวนิช	ปริญญาโท	ปิโตรเคมีและวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	17 มี.ค. 2557 - 16 ก.ย. 2557

โครงการย่อย	ชื่อ	ระดับ	สาขา	สังกัด	ช่วงเวลาที่รับทุน
3	นางสาวพรเพ็ญ แซ่อึ้ง	ปริญญาเอก	ปิโตรเคมีและวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	17 ก.ย. 2557 - 16 มี.ค. 2558
3	นางสาวอรพรรณ เวียรชัย	ปริญญาเอก	ปิโตรเคมีและวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	17 มี.ค. 2558 - 16 ก.ย. 2558
3	นางสาวศศิธร รอดท่าไม้	ปริญญาเอก (ไม่เต็มเวลา)	เคมี	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	17 ก.ย. 2558 - 16 มี.ค. 2559 17 มี.ค. 2559 - 16 ก.ย. 2559 17 ก.ย. 2559 - 16 มี.ค. 2560
3	นางสาวรัตติยากร ดอนธงขวา	ปริญญาโท	เคมี	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	17 ก.ย. 2558 - 16 มี.ค. 2559 17 มี.ค. 2559 - 16 ก.ย. 2559 17 ก.ย. 2559 - 16 มี.ค. 2560
4	นายรสติโชติ วรรณพบ	ปริญญาเอก	เคมีวิเคราะห์	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	17 มี.ค. 2557 - 16 ก.ย. 2557 17 ก.ย. 2557 - 16 มี.ค. 2558 17 มี.ค. 2558 - 16 ก.ย. 2558 17 ก.ย. 2558 - 16 มี.ค. 2559 17 มี.ค. 2559 - 16 ก.ย. 2559 17 ก.ย. 2559 - 16 มี.ค. 2560

โครงการย่อย	ชื่อ	ระดับ	สาขา	สังกัด	ช่วงเวลาที่รับทุน
5	นางสาวสุดารัตน์ ขัดสาย	ปริญญาเอก	เคมี	มหาวิทยาลัยนเรศวร	17 มี.ค. 2557 - 16 ก.ย. 2557 17 ก.ย. 2557 - 16 มี.ค. 2558 17 มี.ค. 2558 - 16 ก.ย. 2558 17 ก.ย. 2558 - 16 มี.ค. 2559
5	นายบัณฑิต ทองอ่อน	ปริญญาเอก	เคมี	มหาวิทยาลัยนเรศวร	17 มี.ค. 2559 - 16 ก.ย. 2559 17 ก.ย. 2559 - 16 มี.ค. 2560
6	นางสาวอัมพวัน ไมตรัตน์	ปริญญาเอก	เคมี	มหาวิทยาลัยขอนแก่น	17 มี.ค. 2557 - 16 ก.ย. 2557 17 ก.ย. 2557 - 16 มี.ค. 2558 17 มี.ค. 2558 - 16 ก.ย. 2558 17 ก.ย. 2558 - 16 มี.ค. 2559 17 มี.ค. 2559 - 16 ก.ย. 2559 17 ก.ย. 2559 - 16 มี.ค. 2560
6	นางสาวณัฐวี ภูมิสุข	ปริญญาเอก	เคมี	มหาวิทยาลัยขอนแก่น	17 มี.ค. 2557 - 16 ก.ย. 2557 17 ก.ย. 2557 - 16 มี.ค. 2558 17 มี.ค. 2558 - 16 ก.ย. 2558 17 ก.ย. 2558 - 16 มี.ค. 2559 17 มี.ค. 2559 - 16 ก.ย. 2559 17 ก.ย. 2559 - 16 มี.ค. 2560

5.3 บทคัดย่อ หรือบทสรุปของบทความวิชาการ หรือเอกสารในลักษณะอื่นๆ ตลอดจนสื่อประเภทต่างๆ ที่โครงการได้จัดทำขึ้น

5.3.1 หนังสือรวมบทคัดย่องานประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 1 วันพฤหัสบดีที่ 26 กุมภาพันธ์ 2558 ณ ห้องประชุม ศ.ดร.แถบ นีละนิธิ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (ภาคผนวก 4, electronic version only)

5.3.2 หนังสือรวมบทคัดย่องานประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 2 วันศุกร์ที่ 26 กุมภาพันธ์ 2559 ณ ห้องประชุมราชมงคลชมคลื่น มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลรัตนโกสินทร์ วิทยาเขตวังไกลกังวล อ.หัวหิน จ. ประจวบคีรีขันธ์ (ภาคผนวก 4, electronic version only)

5.3.3 หนังสือรวมบทคัดย่องานประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 3 วันศุกร์ที่ 24 กุมภาพันธ์ 2560 ณ ห้องพรรณานิคม อาคาร 7 คณะวิทยาศาสตร์และวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติสกลนคร จ. สกลนคร (ภาคผนวก 4, electronic version only)

5.4 ผลงานอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง

5.4.1 รายละเอียดการดำเนินการของทั้ง 6 โครงการย่อย (ภาคผนวก 1)

5.4.2 เอกสารแสดงการรับผลประโยชน์จากการถ่ายทอดเทคโนโลยีพีเอ็นเอ (ภาคผนวก 5)

ลงนาม .....

(หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน)

ภาคผนวก 1

รายละเอียดทางวิชาการของแต่ละโครงการย่อย

ชื่อโครงการย่อย	Conformationally restricted PNA with new structures and functions
ระยะเวลาโครงการ	17 มีนาคม 2557 – 16 มีนาคม 2560 ได้รับอนุมัติให้ขยายเวลาถึง 16 กันยายน 2560
รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่	17 มีนาคม 2557 **ถึงวันที่** 16 กันยายน 2560

หัวหน้าโครงการย่อย

ศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ร่วมโครงการ

ผศ.ดร.จตุรงค์ สุภาพพร้อม ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ดร.ภาณุวัฒน์ ผดุงรส ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ดร.ธเนศวร นวลใย คณะศิลปะศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลรัตนโกสินทร์ วิทยาเขตวังไกลกังวล

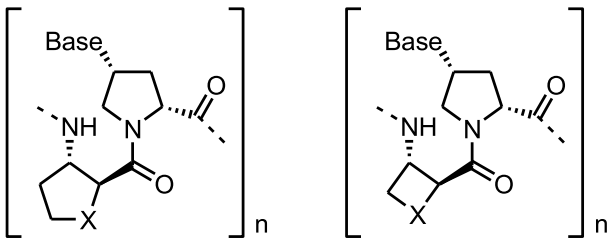
ดร.วรรณฑณี สิทธิวงษ์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

รายงานความก้าวหน้าของโครงการ

โครงการนี้เกี่ยวข้องกับการพัฒนาพีเอ็นเอที่มีโครงสร้างและสมบัติใหม่ ซึ่งสามารถสรุปความก้าวหน้าของงานวิจัยที่ได้ดำเนินการตลอดโครงการได้ดังนี้

1. Synthesis and DNA binding properties of pyrrolidinyl peptide nucleic acid carrying cyclic ether backbones

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะสังเคราะห์และศึกษาสมบัติการจับยึดกับดีเอ็นเอ/อาร์เอ็นเอของพิร์โรลิดินิลพีเอ็นเอที่มีไซคลิกอีเทอร์แทนที่วงแหวนคาร์โบไซคลิกในโครงสร้างหลัก (**รูปที่ 1**) โดยคณะผู้วิจัยมีสมมติฐานว่าการเพิ่มอะตอมของออกซิเจนเข้าไปในโครงสร้างหลักจะทำให้ได้พิร์โรลิดินิลพีเอ็นเอที่มีสภาพขั้วเพิ่มขึ้นอันจะเป็นการช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำและลดการเกิดแรงกระทำแบบไม่จำเพาะเจาะจงกับวัสดุที่ไม่ชอบน้ำ โดยไม่ทำให้ความสามารถในการจับยึดกับดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงไป

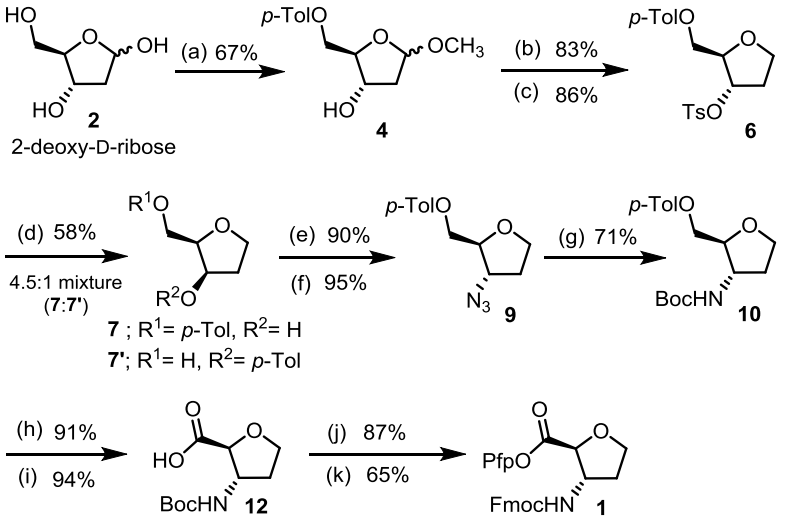


acpcPNA X = CH_2 acbcPNA X = CH_2
atfcPNA X = O aocPNA X = O

รูปที่ 1 พิร์โรลิดินิลพีเอ็นเอต้นแบบและอนุพันธ์ที่มีหมู่ไซคลิกอีเทอร์ในโครงสร้างหลักที่เป็นเป้าหมายของการสังเคราะห์

งานที่ได้ทำไปตั้งแต่เริ่มต้นโครงการคือการสังเคราะห์พีเอ็นเอที่มีตัวเชื่อมที่เป็นเบต้าอะมิโนแอซิดแบบไซคลิกอีเทอร์ชนิด 5 เหลี่ยมได้แก่ (2*S*,3*S*)-3-aminotetrahydrofuran-2-carboxylic acid (atfcPNA) และชนิด 4 เหลี่ยมได้แก่ (2*S*,3*S*)-3-amino-oxetane-2-carboxylic acid (aocPNA) จากนั้นจึงนำไปสังเคราะห์เป็น PNA เพื่อศึกษาสมบัติการจับยึดกับ DNA และ RNA

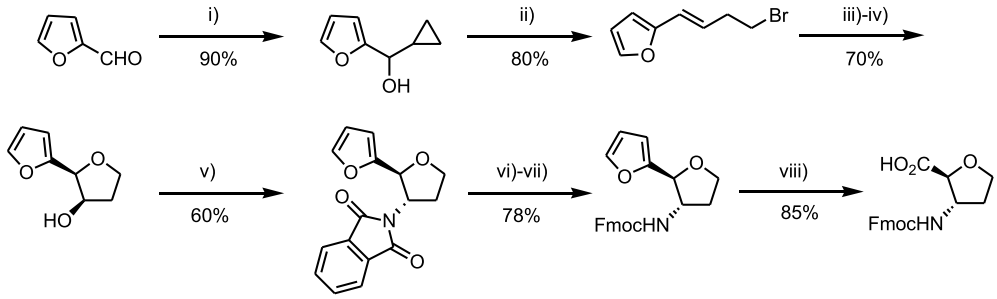
งานในส่วนของพีเอ็นเอที่มีตัวเชื่อมเป็นเบต้าอะมิโนแอซิดแบบไซคลิกอีเทอร์ชนิด 5 เหลี่ยม (atfcPNA) เริ่มต้นจากการพัฒนาวิธีการสังเคราะห์ตัวเชื่อมที่เป็น Fmoc-protected (2*S*,3*S*)-3-aminotetrahydrofuran-2-carboxylic acid ซึ่งในระยะแรกได้ใช้ 2-deoxy-D-ribose เป็นสารตั้งต้นผ่านปฏิกิริยา 13 ขั้นตอนดังแสดงใน**รูปที่ 2** โดยมีปริมาณผลผลิตรวม 6.7%



Reaction conditions: (a) i) methanesulfonic acid (cat), MeOH, rt, 30 min, ii) p-toluoyl chloride, pyridine, CH_2Cl_2, 0 °C (b) p-TsCl, DMAP (cat), Et_3N, CH_2Cl_2, 0 °C to rt (c) Et_3SiH, $BF_3{\cdot}OEt_2$, 0 °C to rt (d) $NaNO_2$, DMSO, 120 °C (e) MsCl, DMAP (cat), Et_3N, CH_2Cl_2, 0 °C (f) NaN_3, DMSO, 90-100 °C (g) Pd/C, H_2 (1 atm), Boc_2O, MeOH (h) LiOH, THF:H_2O (1:1), rt (i) TEMPO (cat), BAIB, MeCN:H_2O (1:1), rt (j) i) TFA:CH_2Cl_2 (1:1) ii) FmocOSu, $NaHCO_3$, MeCN:H_2O (1:1), pH 8, rt (k) PfpOTfa, DIEA, CH_2Cl_2

รูปที่ 2 การสังเคราะห์ Pfp-activated Fmoc-2-aminotetrahydrofurancarboxylic acid (ATFC) จาก 2-deoxy-D-ribose.

นอกจากนี้ยังได้พัฒนาวิธีการสังเคราะห์ Fmoc-protected (2*S*,3*S*)-3-aminotetrahydrofuran-2-carboxylic acid ขึ้นใหม่ โดยเป็นงานวิจัยร่วมกับ Dr. Roderick W. Bates จาก Nanyang Technological University ประเทศสิงคโปร์ วิธีการที่พัฒนาขึ้นใหม่เป็นดังแสดงใน**รูปที่ 3** ซึ่งอาศัยปฏิกิริยาเพียง 8 ขั้นตอนจากสารตั้งต้นที่มีราคาถูก และได้ปริมาณผลผลิตรวม 20%



รูปที่ 3 การสังเคราะห์ Fmoc-protected (2*S*,3*S*)-3-aminotetrahydrofuran-2-carboxylic acid (ATFC) วิธีใหม่ Conditions: i) CyclopropylMgBr ii) Me_3SiCl, LiBr, 2,6-lutidine, $^nBu_4NBr$ iii) ADmix-β, $MeSO_2NH_2$ iv) NaOH, $^nBu_4NBr$ v) phthaimide, Ph_3P, DIAD vi) N_2H_4, MeOH vii) FmocCl, $NaHCO_3$ viii) cat $RuCl_3$, $NaIO_4$

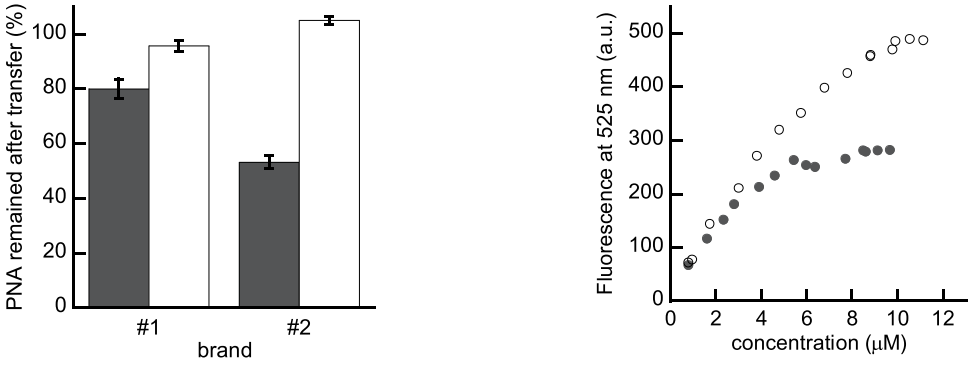
จากนั้นนำมาสังเคราะห์เป็น atfcPNA ที่มีลำดับเบสเป็น T9 (**T9**) และเบสผสม GTAGATCACT (**M10**), TATGTACTAT (**M10AT**) และ GCTACGTCGC (**M10CG**) พบว่าสามารถสังเคราะห์ได้ตามต้องการ โดยมีปริมาณผลผลิต 44, 22, 21 และ 10% ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF mass spectrometry ให้ผลสอดคล้องกับค่าที่คำนวณได้ และแสดงค่า retention time (reverse phase HPLC) ที่ต่ำกว่า acpcPNA ที่มีลำดับเบสเหมือนกัน ซึ่งสอดคล้องกับสภาพขั้วที่เพิ่มมากขึ้นของ atfcPNA เมื่อเทียบกับ acpcPNA ต่อมาจึงได้ศึกษาผลการจับยึดกับดีเอ็นเอโดยการวัดค่า T_m ผลที่ได้เมื่อ

เปรียบเทียบกับ acpcPNA เป็นดังแสดงใน**ตารางที่ 1** โดยพบว่าไฮบริดของ atfcPNA กับ DNA และ RNA มี T_m ต่ำกว่า acpcPNA เล็กน้อย ยกเว้นในกรณีของ atfcPNA ที่มีลำดับเบสเป็น **M10CG** ซึ่งจับยึดกับ RNA ได้แข็งแรงกว่า acpcPNA และที่สำคัญคือ atfcPNA ยังคงแสดงความจำเพาะเจาะจงกับการจับยึดกับ DNA และ RNA ที่สูง โดยในแทบทุกกรณีค่า T_m จะลดลงมากกว่า 20 °C เมื่อมีเบสที่ไม่เข้าคู่กันแม้เพียงตัวเดียว นอกจากนี้ atfcPNA ยังสามารถจดจำดีเอ็นเอได้เฉพาะในทิศทาง antiparallel เช่นเดียวกับ acpcPNA (**ตารางที่ 1**)

ตารางที่ 1 เสถียรภาพในการจับยึดระหว่าง aocPNA กับ DNA และ RNA

PNA (N→C)	DNA or RNA (5'→3')	T_m atfcPNA (ΔT_m)[a]	T_m acpcPNA (ΔT_m)[a,b]	Note
GTAGATCACT	dAGTGATCTAC	52.5	53.3	complementary DNA
(**M10**)	dAGTG<u>C</u>TCTAC	23.4 (–29.1)	23.8 (–29.5)	mismatched DNA
	dAGTG<u>G</u>TCTAC	23.4 (–29.1)	23.9 (–29.4)	mismatched DNA
	dAGTG<u>T</u>TCTAC	25.4 (–27.1)	29.4 (–23.9)	mismatched DNA
	dCATCTAGTGA	<20	<20	parallel DNA
	rAGUGAUCUAC	36.0	42.3	complementary RNA
	rAGUG<u>C</u>UCUAC	<20	23.6 (–18.7)	mismatched RNA
	rAGUG<u>G</u>UCUAC	<20	24.8 (–17.5)	mismatched RNA
	rAGUG<u>U</u>UCUAC	<20	<20	mismatched RNA
	rCAUCUAGUGA	<20	<20	parallel RNA
TATGTACTAT	dATAGTACATA	49.6	54.2	complementary DNA
(**M10AT**)	dATAG<u>A</u>ACATA	25.4 (–24.2)	23.4 (–30.8)	mismatched DNA
	dATAG<u>C</u>ACATA	30.2 (–19.4)	30.2 (–24.0)	mismatched DNA
	dATAG<u>G</u>ACATA	<20	24.4 (–29.8)	mismatched DNA
	dATACATGATA	<20	<20	parallel DNA
	rAUAGUACAUA	29.2	32.6	complementary RNA
	rAUACUAGAUA	<20	<20	parallel RNA
GCTACGTCGC	dGCGACGTAGC	56.4	54.5	complementary DNA
(**M10CG**)	dGCGA<u>A</u>GTAGC	23.4 (–33.0)	<20	mismatched DNA
	dGCGA<u>G</u>GTAGC	31.2 (–25.2)	30.2 (–24.3)	mismatched DNA
	dGCGA<u>T</u>GTAGC	36.0 (–20.4)	35.1 (–19.4)	mismatched DNA
	dCGATGCAGCG	<20	<20	parallel DNA
	rGCGACGUAGC	41.8	48.0	complementary RNA
	rCGAUGCAGCG	24.4 (–17.4)	39.2 (–8.8)	parallel RNA

a All T_m were measured at PNA = 1 μM,100 mM NaCl, 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, heating rate 1 °C/min; $\Delta T_m = T_m - T_m^{\text{complementary hybrid}}$ *b* The T_m data of acpcPNA are provided for comparison purposes. Except for the mismatched hybrids of **M10AT** and **M10CG**, T_m data of all acpcPNA hybrids were taken from Ref. **Error! Bookmark not defined.**d. Mismatch positions in DNA sequence are indicated by underline.

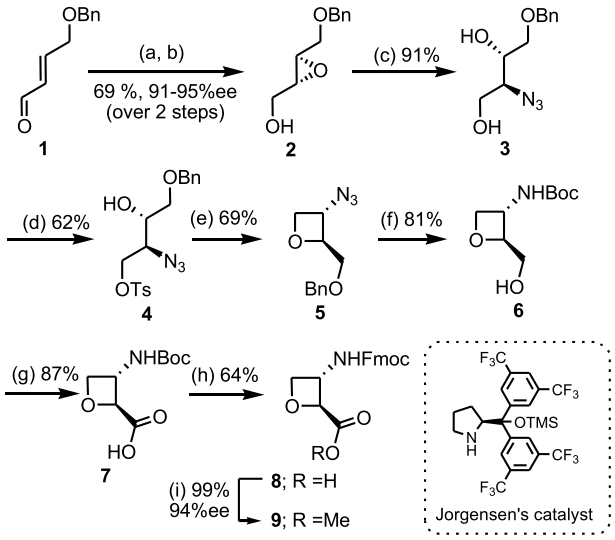


(a) (b)

รูปที่ 4 การเกิด non-specific interaction ของ fluorescein-labeled atfcPNA (สีขาว) เปรียบเทียบกับ acpcPNA (สีเทา) (a) การดูดซับบนหลอดพลาสติก (b) การเกิด self-aggregation จากการติดตามโดย fluorescence spectrophotometry

ผลการทดสอบการละลายของ atfcPNA ที่มีลำดับเบสเป็น T9 พบว่าการละลายน้ำเพิ่มขึ้นจาก acpcPNA ที่มีลำดับเบสเดียวกันเพียงเล็กน้อย (1.4 mg/mL vs 1.1 mg/mL) จากนั้นได้ศึกษาการลดการเกิด non-specific interaction ของ atfcPNA โดยได้ติดฉลาก fluorescein ที่ปลายด้าน N ของ atfcPNA ที่มีลำดับเบสเป็น M10 เพื่อใช้เป็นตัวติดตามโดยเทคนิคฟลูออเรสเซนส์ โดยในการทดลองได้วัดฟลูออเรสเซนส์ของสารละลายพีเอ็นเอทั้งสองชนิดในเซลล์ที่เป็นควอตซ์ และถ่ายเทไปยังหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่เป็นพลาสติกชนิดพอลิโพรพิลีน แล้วถ่ายกลับมายังควอตซ์เซลล์เพื่อวัดฟลูออเรสเซนส์ซ้ำ พบว่าหลังการถ่ายเทซ้ำหลายๆ ครั้ง ค่าฟลูออเรสเซนส์ของ acpcPNA ลดลงถึงเกือบ 50% ซึ่งแสดงถึงการดูดซับแบบไม่จำเพาะเจาะจง แต่ของ atfcPNA ไม่เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ การติดตามสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ของ atfcPNA เทียบกับ acpcPNA แสดงให้เห็นว่า atfcPNA เกิด self-aggregation ซึ่งนำไปสู่การดับของสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ที่ความเข้มข้นสูงกว่าของ acpcPNA ประมาณสองเท่า (**รูปที่ 4**) แสดงว่าการเพิ่มออกซิเจนอะตอมในโครงสร้างของ acpcPNA ช่วยลดความไม่ชอบน้ำ และแรงกระทำแบบไม่จำเพาะเจาะจงลงได้ โดยไม่มีผลกระทบในทางลบต่อความแข็งแรงและความจำเพาะเจาะจงต่อการจับยึดกับดีเอ็นเอ ซึ่งน่าจะช่วยส่งผลให้สามารถนำ atfcPNA ไปประยุกต์ใช้ได้กว้างขวางมากขึ้น ผลงานในส่วนนี้ได้รับการตีพิมพ์แล้วจำนวน 2 เรื่อง[1,2]

เนื่องจากได้มีการค้นพบมาก่อนหน้านี้แล้วว่าการลดขนาดของวงแหวนจาก 5 คาร์บอนใน acpcPNA เป็น 4 คาร์บอนใน acbcPNA ทำให้ความแข็งแรงของการจับยึดกับทั้ง DNA และ RNA เพิ่มขึ้น[3] งานอีกส่วนหนึ่งที่ได้ทำเพิ่มเติมคือการสังเคราะห์ four-membered analogue ของ atfcPNA ได้แก่ aocPNA (**รูปที่ 5**) ซึ่งคณะผู้วิจัยมีสมมติฐานว่าอาจทำให้ได้พีเอ็นเอที่มีความแข็งแรงในการจับยึดเช่นเดียวกับ acbcPNA แต่มีแรงกระทำแบบไม่จำเพาะเจาะจงที่ลดลง งานวิจัยเริ่มจากการพัฒนาวิธีการสังเคราะห์ (2*S*,3*S*) ไอโซเมอร์ของ Fmoc-protected *epi*-oxetin spacer (**8**) โดยเริ่มต้นจาก aldehyde **1** ขั้นตอนสำคัญในการกำหนดสเตอริโอเคมีของสารเป้าหมายอาศัยปฏิกิริยา Jorgensen's organocatalytic epoxidation ของ **1** เกิดเป็น epoxide ที่นำมา reduce ต่อเป็น alcohol **2** ทันทีโดยไม่มีการแยก intermediate epoxyaldehyde ให้บริสุทธิ์ก่อน ต่อมาเป็นขั้นตอนการเปิดวง epoxide แบบเลือกจำเพาะต่อตำแหน่งด้วย sodium azide/trimethyl borate ได้สาร **3** ตามด้วยปฏิกิริยา selective mono-tosylation ได้เป็นสาร **4** การปิดวง oxetane กระทำภายใต้สภาวะที่เป็นเบสเกิดเป็น oxetane intermediate **5** ซึ่งเปลี่ยนต่อไปเป็นโมเลกุลเป้าหมาย **8** โดยกระบวนการปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันและหมู่ปกป้อง โดยสามารถคำนวณ overall yield จากการสังเคราะห์ทั้งกระบวนการรวม 11 ขั้นตอนได้เป็น 6.7 % ดังสรุปใน**รูปที่ 5** ซึ่งจัดว่าเป็นกระบวนการที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดเท่าที่เคยมีรายงานมาในการทำ enantioselective synthesis ของ (2*S*,3*S*)-*epi*-oxetin

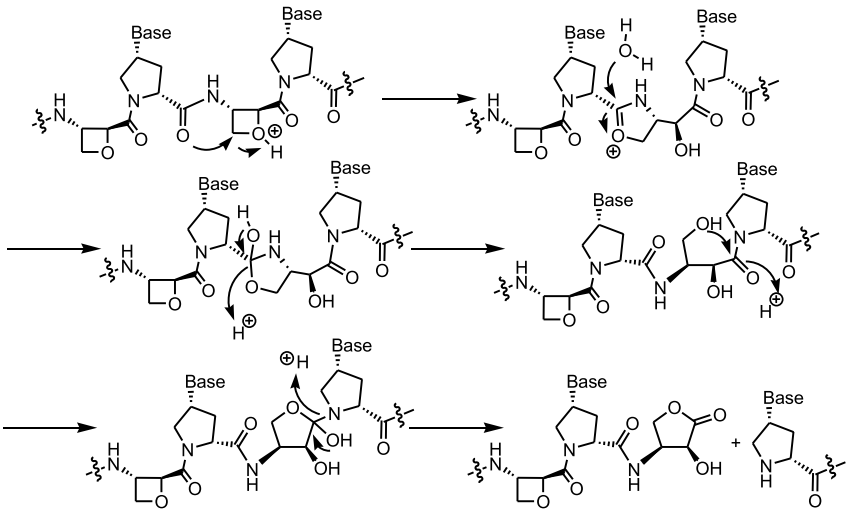


Reagents and conditions: (a) (*S*)-2-(bis(3,5-bis(trifluoromethyl) phenyl)(trimethylsilyl-oxy)methyl) pyrrolidine (Jorgensen's catalyst, 10 mol%), 30% aq. H_2O_2, CH_2Cl_2, 10-20 °C, 4.5 h; (b) $NaBH_4$, MeOH, 0 °C, 30 min; (c) NaN_3, $B(OMe)_3$, DMF, 50 °C, 5 h; (d) TsCl, DIEA, 2-aminoethyl diphenylborinate (2-ADP,10 mol%), MeCN, rt, 5 d; (e) NaOH, TBAHS (cat), toluene, H_2O, rt, 20 min; (f) $Pd(OH)_2/C$ (cat), H_2 (1 atm), MeOH, Boc_2O, 7 d; (g) DAIB, TEMPO (cat), MeCN, H_2O, rt, 24 h; (h) i. TFA, CH_2Cl_2. ii. FmocOSu, $NaHCO_3$, MeCN, H_2O, rt, 24 h; (i) CH_2N_2 (generated from Diazald and NaOH), EtOAc, rt, 30 min.

รูปที่ 5 แผนภาพแสดงการสังเคราะห์ Fmoc-protected (2*S*,3*S*)-oxetin

จากนั้นจึงได้นำสาร **8** มาใช้เป็นโมโนเมอร์สำหรับสังเคราะห์ oxetinPNA ที่มีลำดับเบสเป็น GTAGATCACT ด้วยวิธี Fmoc-SPSS สามารถหา overall coupling efficiency ได้เป็น 23 % จากการวัดปริมาณ dibenzofulvene-piperidine adduct ที่ปลดปล่อยออกมาในขั้นตอนการกำจัดหมู่ Fmoc ครั้งสุดท้าย หรือคิดเป็นประสิทธิภาพของการ coupling ต่อรอบประมาณ 93% ต่อมาจึงทำ side-chain deprotection และ cleavage สายของ PNA ออกจาก solid support ซึ่งประสบปัญหาในกระบวนการสังเคราะห์ คือ aocPNA ไม่เสถียรทั้งภายใต้สภาวะที่เป็นกรด และเบส จากการวิเคราะห์รูปแบบการแตกตัวในแมสสเปกตรัมพบว่าเกิดการขาดออกของสายเพปไทด์ตรงพันธะเอไมด์ที่เชื่อมต่อระหว่างหมู่คาร์บอกซิลของ pyrrolidinyl monomer กับหมู่อะมิโนของ oxetin ซึ่งคาดว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับการเปิดวงของ oxetin ก่อนได้เป็นแอลกอฮอล์ ซึ่งเกิดปฏิกิริยา intramolecular nucleophilic attack ต่อดังแสดงใน**รูปที่ 6**

จากปัญหาเรื่องความเสถียรของ oxetinPNA นี้จึงจำเป็นต้องศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการ deprotection และ cleavage ของ oxetinPNA ใหม่ โดยพบว่าสภาวะ 25% tert-butylamine, 25% MeOH ในน้ำ, 60 °C เป็นเวลา 2 h ให้ผลที่ดีกว่าการใช้ 1:1 aqueous ammonia:dioxane ที่ 60 °C overnight อย่างเห็นได้ชัด และภาวะที่ใช้ในการทำ cleavage ของ PNA ออกจาก Rink amide resin คือการใช้สารละลาย 50% TFA ใน CH_2Cl_2 โดยทำเป็นรอบๆละ 2 นาที เก็บแยกเป็น fraction ที่สามารถรวมเฉพาะ fraction ที่ไม่มีการสลายตัว หรือมีการสลายตัวเพียงเล็กน้อยมาทำให้บริสุทธิ์ต่อด้วยเทคนิค reverse phase HPLC ซึ่งโดยวิธีนี้จะได้ oxetinPNA ที่บริสุทธิ์ โดยมี isolated yield เพียง 1.2–1.3% อย่างไรก็ตาม ปริมาณพีเอ็นเอที่แยกได้ถือว่าเพียงพอต่อการทดสอบการจับยึดเบื้องต้น ซึ่งแสดงใน**ตารางที่ 2**



รูปที่ 6 ข้อเสนอเพื่ออธิบายกลไกการสลายตัวของ aocPNA ภายใต้ภาวะกรด

ตารางที่ 2 เสถียรภาพในการจับยึดระหว่าง aocPNA กับ DNA และ RNA

Entry	DNA/RNA sequence[a]	T_m (°C) oxetinPNA[b]	ΔT_m (°C) oxetinPNA[a,c]	T_m (°C) acbcPNA[d]	ΔT_m (°C) acbcPNA[c, d]	comment
1	5'-AGT GAT CTA C-3'	46.3	-	66.1	-	Com. DNA
2	5'-AGT GAT CTA C-3'	46.1	-	-	-	Com. DNA
3	5'-AGU GAU CUA C-3'	31.3	-	58.2	-	Com. RNA
4	5'-AGU GAU CUA C-3'	30.3	-	-	-	Com. RNA
5	5'-AGT G<u>C</u>T CTA C-3'	< 20	>26.1	39.8	26.3	mmC DNA
6	5'-AGT G<u>G</u>T CTA C-3'	< 20	>26.1	36.4	29.7	mmG DNA
7	5'-AGT G<u>T</u>T CTA C-3'	28.1	18.0	46.6	19.5	mmT DNA

[a]PNA sequence คือ H-GTAGATCACT-LysNH_2 (no N-terminal capping)

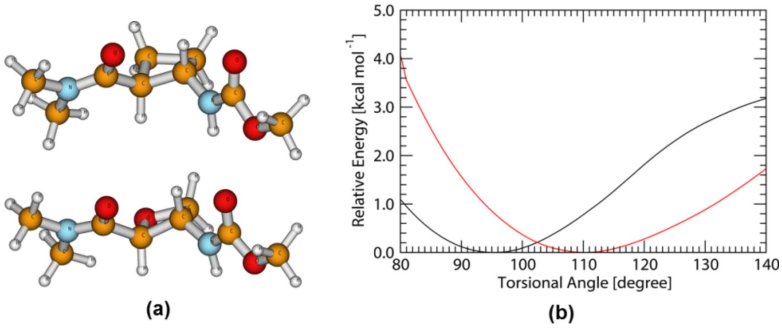
[b]สภาวะในการศึกษา T_m: 1.0 µmol PNA, 1.0 µmol DNA/RNA, 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, 100 mM NaCl. Heating rate 1 °C/ 1 min.

[c]T_m(complementary) - T_m(mismatch)

[d]การทดลองนี้อ้างอิงจาก *Org. Lett.* **2012**, *14,* 1440–1443. ที่ทดลองกับ N-acetylated acbcPNA ในสภาวะเดียวกัน โดยได้มีการยืนยันแล้วว่า N-acetylation ของ oxetinPNA ไม่ส่งผลต่อค่า T_m อย่างมีนัยสำคัญ

ผลการทดลองใน**ตารางที่ 2** แสดงให้เห็นว่า aocPNA มีความสามารถในการจับยึดกับ DNA และ RNA ที่ด้อยกว่า acbcPNA มาก โดยการจับยึดยังคงแสดงความจำเพาะเจาะจงที่สูงดังจะเห็นได้จากค่าผลต่าง T_m ที่ลดลงมากกว่า 18 °C สำหรับ mismatched DNA ซึ่งใกล้เคียงกับ acbcPNA เนื่องจากประสิทธิภาพของการจับยึดไม่ดี ประกอบกับปัญหาทางด้านเทคนิคในการสังเคราะห์ aocPNA ในปริมาณมาก จึงไม่ได้ศึกษาสมบัติด้านแรงกระทำแบบไม่จำเพาะเจาะจงต่อไป นอกจากนี้ยังได้ร่วมมือกับ และ รศ.ดร.วิวัฒน์ วชิรวงศ์กวิน ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อศึกษาแบบจำลองโมเลกุลของ (2*S*,3*S*)-3-amino-oxetane-2-carboxylic acid (AOC) เพื่อเสนอคำอธิบายว่าทำไมการเพิ่มออกซิเจนอะตอมเข้าไปในวงแหวนถึงได้ลดความเสถียรของ PNA·DNA duplex ลงค่อนข้างมาก โดยผลการคำนวณแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มออกซิเจนเข้าไปจะทำให้วงแหวนของออกซีเทนมีลักษณะแบนราบกว่าไซโคลบิวเทน และส่งผลให้มุม torsinal ของ NH/CO มีค่าเพิ่มขึ้นจากประมาณ 95 ° ซึ่งใกล้เคียงกับค่าที่เหมาะสมใน PNA·DNA duplex[3] กลายเป็น >100 ° โดยงาน

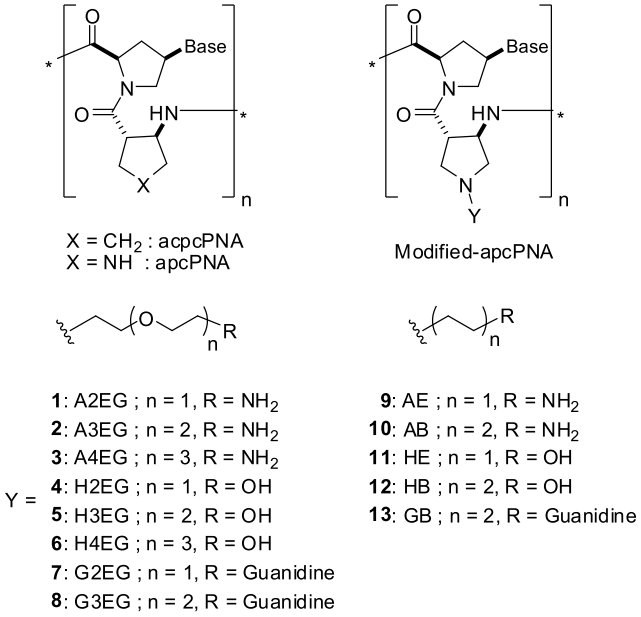
ในส่วนของ aocPNA ทั้งหมด ซึ่งเป็นผลงานร่วมกับโครงการพัฒนาอัจฉริยภาพทางวิทยาศาสตร์สำหรับเด็กและเยาวชนของนายภัทรเกียรติ แสนคงสุข ได้รับการตีพิมพ์แล้ว[4]



รูปที่ 7 (a) แบบจำลองโมเลกุลของไซโคลบิวเทน (บน) และออกซีเทน เบต้าอะมิโนแอซิด (ล่าง) และ (b) ผลการคำนวณพลังงานของไซโคลบิวเทน (เส้นสีดำ) และออกซีเทน เบต้าอะมิโนแอซิด (เส้นสีแดง) ที่เป็นฟังก์ชันกับ torsional angle

2. Pyrrolidinyl peptide nucleic acid with positively charged backbone

งานวิจัยในส่วนนี้ซึ่งมีผู้รับผิดชอบคือ ดร.จตุรงค์ สุภาพพร้อม และ ดร.ธเนศวร นวลใย มีวัตถุประสงค์เพื่อสังเคราะห์ pyrrolidinyl PNA ที่มี hydrophilic modifier เป็นหมู่ไฮดรอกซิล อะมิโน หรือหมู่กัวนิดิโน ที่เชื่อมต่อกับโครงสร้างหลักของ acpcPNA ผ่านหมู่แอลคิลหรือ polyethylene glycol (PEG) โดยอาศัยปฏิกิริยารีดักทีฟแอลคิลเลชันบนพีเอ็นเอที่ดัดแปรด้วย 3-aminopyrrolidine-4-carboxylic acid (APC) spacer (apc/acpcPNA) โดยมีเป้าหมายเพื่อให้ได้พีเอ็นเอที่ละลายน้ำได้ดีขึ้นและอาจจับยึดกับดีเอ็นเอได้แข็งแรงขึ้นเนื่องจากแรงดึงดูดระหว่างประจุบวกบนสายของพีเอ็นเอกับประจุลบของดีเอ็นเอ อีกทั้งหมู่ที่มีประจุบวกยังอาจช่วยให้พีเอ็นเอสามารถนำเข้าสู่เซลล์ได้อีกด้วย



รูปที่ 8 โครงสร้างของ backbone-modified acpcPNA ที่สังเคราะห์ในงานวิจัยนี้

สรุปงานวิจัยที่ได้ทำมาทั้งหมดคือการสังเคราะห์ acpcPNA ที่ถูกดัดแปรด้วยหมู่ hydrophilic modifier ต่างๆ ดังแสดงใน**รูปที่ 8** จำนวนตั้งแต่ 1–3 หมู่ต่อสายพีเอ็นเอ และได้ศึกษาการจับยึดกับดีเอ็นเอ ซึ่งพบว่าความสามารถในการจับยึดของ acpcPNA ที่ผ่านการดัดแปรด้วย hydroxy-terminated PEG จะใกล้เคียงหรือลดลงเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับ acpcPNA ที่ไม่ได้มีการดัดแปร แต่พีเอ็นเอที่ผ่านการดัดแปรด้วย amino- และ guanidine-terminated PEG จะมีความเสถียรเพิ่มขึ้น โดยการเพิ่มขึ้นของ T_m จะเป็นไปตามจำนวนของหมู่ที่ดัดแปร และจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของเกลือ ซึ่ง

เสนอแนะว่าความเสถียรที่เพิ่มขึ้นเกิดจากแรงกระทำทางไฟฟ้าสถิตของหมู่ NH_2 และหมู่ guanidinium ซึ่งมีประจุบวกภายใต้ภาวะของการทดลอง กับหมู่ฟอสเฟตของดีเอ็นเอซึ่งมีประจุลบ โดยในทุกกรณียังแสดงความจำเพาะเจาะจงต่อการจับยึดกับดีเอ็นเอที่สูง (**ตารางที่ 3** และ **ตารางที่ 4**)

ตารางที่ 3 เสถียรภาพในการจับยึดระหว่าง backbone-modified acpcPNA กับ DNA

PNA	Sequence (N → C)	Modifier (X)	t_R min[a]	*m/z* (calcd)[b]	*m/z* (found)[c]	T_m[e,f] (°C)	ΔT_m[f,g] (°C)	T_m[e,h] (°C)	ΔT_m[g,h] (°C)
PNA1	Ac-TTTT$^{(NX)}$TTTTT-LysNH$_2$	**none**	36.2	3180.4	3180.3	77.7	-	71.9	-
PNA2	Ac-TTTT$^{(NX)}$TTTTT-LysNH$_2$	**A2EG**	34.6	3267.5	3268.3	79.7	+2.0	71.9	0.0
PNA3	Ac-TTTT$^{(NX)}$TTTTT-LysNH$_2$	**A3EG**	35.2	3311.5	3309.5	78.7	+1.0	72.9	+1.0
PNA4	Ac-TTTT$^{(NX)}$TTTTT-LysNH$_2$	**A4EG**	28.9	3355.5	3356.0	78.7	+1.0	70.9	-1.0
PNA5	Ac-TTTT$^{(NX)}$TTTTT-LysNH$_2$	**AE**	31.1	3224.4	3228.0	81.9	+4.2	73.8	+1.9
PNA6	Ac-TTTT$^{(NX)}$TTTTT-LysNH$_2$	**AB**	31.8	3251.5	3250.3	79.7	+2.0	71.9	0.0
PNA7	Ac-TTTT$^{(NX)}$TTTTT-LysNH$_2$	**H2EG**	34.8	3268.4	3266.4	71.9	-5.8	68.0	-3.9
PNA8	Ac-TTTT$^{(NX)}$TTTTT-LysNH$_2$	**H3EG**	30.7	3312.5	3314.5	70.9	-6.8	67.1	-4.8
PNA9	Ac-TTTT$^{(NX)}$TTTTT-LysNH$_2$	**H4EG**	36.5	3356.5	3355.5	70.9	-6.8	67.1	-4.8
PNA10	Ac-TTTT$^{(NX)}$TTTTT-LysNH$_2$	**HE**	32.9	3225.4	3228.5	71.5	-6.2	67.0	-4.9
PNA11	Ac-TTTT$^{(NX)}$TTTTT-LysNH$_2$	**HB**	31.9	3252.4	3253.5	71.9	-5.8	67.1	-4.8
PNA12	Ac-TTTT$^{(NX)}$TTTTT-LysNH$_2$	**G2EG**	29.8	3309.5	3313.4	79.7	+2.0	68.0	-3.9
PNA13	Ac-TTTT$^{(NX)}$TTTTT-LysNH$_2$	**G3EG**	28.6	3353.5	3351.6	79.7	+2.0	70.9	-1.0
PNA14	Ac-TTTT$^{(NX)}$TTTTT-LysNH$_2$	**GB**	33.2	3293.5	3293.6	80.6	+2.9	72.9	+1.0
PNA15	Bz-GTAGA$^{(NX)}$TCACT-LysNH$_2$	**none**	29.9	3621.9	3619.5	57.4	-	51.5	-
PNA16	Ac-GTAGA$^{(NX)}$TCACT-LysNH$_2$	**A3EG**	29.2	3690.9	3691.3	63.2	+5.8	55.4	+3.9
PNA17	Ac-GTAGA$^{(NX)}$TCACT-LysNH$_2$	**AE**	29.6	3603.8	3604.7	65.4	+8.0	58.4	+6.9
PNA18	Ac-GTAGA$^{(NX)}$TCACT-LysNH$_2$	**AB**	25.2	3630.9	3628.1	66.1	+8.7	58.3	+6.8
PNA19	Ac-GTAGA$^{(NX)}$TCACT-LysNH$_2$	**H3EG**	29.4	3691.9	3690.8	56.4	-1.0	53.5	+2.0
PNA20	Ac-GTAGA$^{(NX)}$TCACT-LysNH$_2$	**HE**	29.8	3604.8	3605.4	58.7	+1.3	54.2	+2.7
PNA21	Ac-GTAGA$^{(NX)}$TCACT-LysNH$_2$	**HB**	29.1	3631.9	3629.9	59.3	+1.9	53.5	+2.0
PNA22	Ac-GTAGA$^{(NX)}$TCACT-LysNH$_2$	**GB**	29.7	3672.9	3671.0	67.1	+9.7	58.3	+6.8
PNA23	Bz-GT$^{(NX)}$AGA$^{(NX)}$TCA$^{(NX)}$CT-LysNH$_2$	**none**	28.5	3623.9	3617.2	60.3	-	52.5	-
PNA24	Ac-GT$^{(NX)}$AGA$^{(NX)}$TCA$^{(NX)}$CT-LysNH$_2$	**A3EG**	27.0	3954.7	3955.9	74.8	+14.5	63.2	+10.7
PNA25	Ac-GT$^{(NX)}$AGA$^{(NX)}$TCA$^{(NX)}$CT-LysNH$_2$	**AB**	29.9	3775.2	3776.9	78.7	+18.4	65.1	+12.6
PNA26	Ac-GT$^{(NX)}$AGA$^{(NX)}$TCA$^{(NX)}$CT-LysNH$_2$	**H3EG**	28.5	3958.0	3958.4	58.3	-2.0	53.5	+1.0
PNA27	Ac-GT$^{(NX)}$AGA$^{(NX)}$TCA$^{(NX)}$CT-LysNH$_2$	**HB**	27.4	3778.0	3779.2	61.2	+0.9	54.4	+1.9
PNA28	Ac-GT$^{(NX)}$AGA$^{(NX)}$TCA$^{(NX)}$CT-LysNH$_2$	**GB**	26.9	3901.1	3898.6	78.7	+18.4	66.8	+14.3
PNA29	Flu-GT$^{(NX)}$AGA$^{(NX)}$TCA$^{(NX)}$CT-LysNH$_2$	**H3EG**	30.9	4274.3	4274.9	50.0	-10.3	46.7	-5.8
PNA30	Flu-GT$^{(NX)}$AGA$^{(NX)}$TCA$^{(NX)}$CT-LysNH$_2$	**A3EG**	30.7	4271.3	4271.8	67.1	+6.8	56.4	+3.9
PNA31	Flu-GT$^{(NX)}$AGA$^{(NX)}$TCA$^{(NX)}$CT-LysNH$_2$	**HB**	30.3	4094.2	4095.9	53.5	-6.8	48.6	-3.9
PNA32	Flu-GT$^{(NX)}$AGA$^{(NX)}$TCA$^{(NX)}$CT-LysNH$_2$	**AB**	30.6	4091.3	4089.5	70.0	+9.7	57.4	+4.9
PNA33	Flu-GT$^{(NX)}$AGA$^{(NX)}$TCA$^{(NX)}$CT-LysNH$_2$	**GB**	29.6	4217.3	4217.3	68.0	+7.7	56.4	+3.9

[a]HPLC conditions: C18 column, 4.6 × 150 mm, 3 μ, gradient 0.1% TFA in H_2O:MeOH 90:10 for 5 min then linear gradient to 10:90 over 30 min, flow rate 0.5 mL/min, 260 nm

[b]Average mass of $M + H^+$

[c]MALDI-TOF

[d]Isolated yield after HPLC purification, spectrophotometrically determined

[e]With complementary DNA (dA_9 for **PNA1-PNA14**; dAGTGATCTAC for **PNA15-PNA33**)

[f]Conditions: 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.00, 0 mM NaCl, [PNA] = 1.0 μM and [DNA] = 1.2 μM

[g]$\Delta T_m = T_m$(modified PNA) – T_m(unmodified PNA). Unmodified PNA refers to apc-modified acpcPNA (X = none).

[h]Conditions: 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.00, 100 mM NaCl, [PNA] = 1.0 μM and [DNA] = 1.2 μM

ตารางที่ 4 specificity ของการจับยึดระหว่าง backbone-modified acpcPNA กับ DNA ที่ความเข้มข้นเกลือต่ำและสูง

PNA[a]	Modifiers (X)	0 mM NaCl		100 mM NaCl	
		T_m (°C)[b]	ΔT_m (°C)[c]	T_m (°C)[b]	ΔT_m (°C)[c]
PNA21	HB	59.3	+1.9	53.5	+0.9
PNA27	3×HB	61.2		54.4	
PNA19	H3EG	56.4	+1.9	53.5	0.0
PNA26	3×H3EG	58.3		53.5	
PNA18	AB	66.1	+12.6	58.3	+6.8
PNA25	3×AB	78.7		65.1	
PNA16	A3EG	63.2	+11.6	55.4	+7.8
PNA24	3×A3EG	74.8		63.2	
PNA22	GB	67.1	+11.6	58.3	+8.5
PNA28	3×GB	78.7		66.8	

[a]PNA sequence = Ac-GTAGA$^{(NX)}$TCACT-LysNH_2 or Ac-GT$^{(NX)}$AGA$^{(NX)}$TCA$^{(NX)}$CT-LysNH_2

[b]Conditions: 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.00, 0 or 100 mM NaCl, [PNA] = 1.0 μM and [DNA] = 1.2 μM

[c]ΔT_m = T_m(triply-modified PNA) – T_m(singly-modified PNA).

ตารางที่ 5 ความสามารถในการละลายของ backbone-modified acpcPNA เปรียบเทียบกับ acpcPNA ที่ไม่ได้ผ่านการดัดแปลงโครงสร้าง

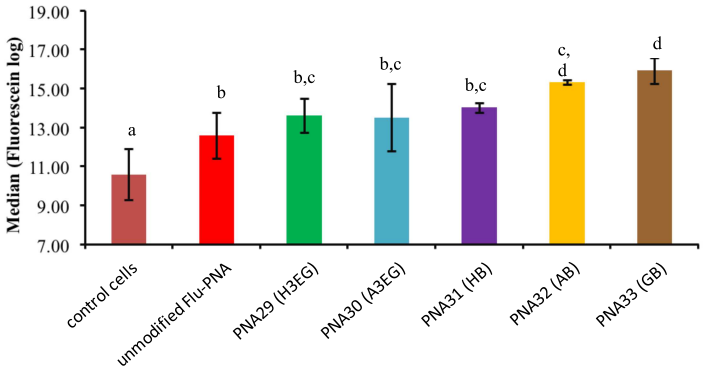
PNA	Modifier (X)	Saturated concentration (mM)	Saturated concentration (mg/mL)
Unmodified[a]	-	3.3±0.2	10.5±0.6
PNA3	**A3EG**	59.6±2.4	197.4±7.9
PNA6	**AB**	>12.0±0.2	>39.0±0.7
PNA8	**H3EG**	64.1±0.5	212.3±1.7
PNA11	**HB**	31.8±0.9	103.4±2.9
PNA14	**GB**	>13.3±0.4	>43.8±1.3

[a]unmodified acpcPNA; Ac-TTTTTTTTT-LysNH_2.

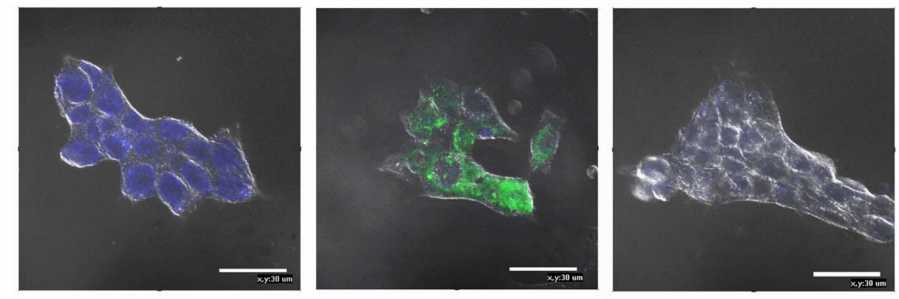
นอกจากนี้ยังได้ศึกษาความสามารถในการละลายของ PNA ที่มี hydrophilic modifier พบว่าการเพิ่มหมู่เหล่านี้แม้เพียงหมู่เดียวในโมเลกุลของพีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเป็น T_9 ก็ช่วยให้การละลายน้ำเพิ่มขึ้นถึงกว่า 10 เท่า (**ตารางที่ 5**) และยังได้ศึกษาการเข้าสู่เซลล์ของ modified PNA (เป็นงานวิจัยร่วมกับ รศ.ดร.ศุภศร วนิชเวชารุ่งเรือง ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ รศ.ดร.ธนาภัทร ปาลกะ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) โดยได้เลือกตัวแทนที่นำไปศึกษาคือ acpcPNA ความยาว 10 เบสที่มีลำดับเบสผสม GTAGATCACT ที่ผ่านการ modify ด้วย R = -$(CH_2)_4OH$, -$(CH_2)_4NH_2$, -$(CH_2)_4NHC(=NH)NH_2$, -$(CH_2CH_2O)_2CH_2CH_2OH$, -$(CH_2CH_2O)_2CH_2CH_2NH_2$, -$(CH_2CH_2O)_2CH_2CH_2NHC(=NH)NH_2$ และติดฉลากเรืองแสงฟลูออเรสซีนที่ปลายด้าน N- ของโมเลกุล ผลการทดสอบเบื้องต้นโดยเทคนิค flow cytometry แสดงให้เห็นว่าพีเอ็นเอที่ผ่านการดัดแปรไม่ว่าจะด้วยหมู่ใดสามารถเข้าสู่เซลล์ของคน

(HEK293T) ได้ดีกว่าพีเอ็นเอที่ไม่ได้ผ่านการดัดแปร โดยเฉพาะอย่างยิ่งพีเอ็นเอที่ผ่านการดัดแปรด้วยหมู่กัวนิดีน (-$(CH_2)_4NHC(=NH)NH_2$) และหมู่อะมิโน (-$(CH_2)_4NH_2$) ให้ผลการเข้าเซลล์ที่ดีที่สุด (**รูปที่ 9**)

การศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้เทคนิคการดัดแปรที่พัฒนาขึ้นในการสังเคราะห์ acpcPNA ที่มีโซ่ข้างแบบชอบน้ำได้อย่างมีประสิทธิภาพ และพีเอ็นเอที่ได้แสดงสมบัติที่พึงประสงค์ ได้แก่ การจับยึดกับดีเอ็นเออย่างแข็งแรงและจำเพาะเจาะจง โดยเมื่อมีโซ่ข้างที่มีประจุบวกจะทำให้ความแข็งแรงของการจับยึดของพีเอ็นเอที่ถูกดัดแปรกับดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นจากผลของแรงกระทำทางไฟฟ้าสถิต และพีเอ็นเอที่ถูกดัดแปรด้วยโซ่ข้างที่เป็นกัวนิดีนและอะมิโนสามารถเข้าสู่เซลล์ได้ด้วยตัวเอง ซึ่งเป็นการปูพื้นฐานของการนำพิร์โรลิดินิลพีเอ็นเอไปประยุกต์ใช้ในเซลล์ต่อไป โดยงานวิจัยในส่วนนี้ได้รับการตีพิมพ์แล้ว[5]



(A)



(B)

รูปที่ 9 เปรียบเทียบการเข้าเซลล์ HEK293T ของพิร์โรลิดินิลที่ผ่านการดัดแปรด้วยหมู่แทนที่แบบไฮโดรฟิลิกบนโครงสร้างหลัก 3 ตำแหน่ง โดยลำดับเบสของพีเอ็นเอที่ใช้คือ Flu-GT*AGA*TCA*CT-$LysNH_2$; * คือตำแหน่งที่ถูกดัดแปร (ดูความหมายของรหัสแสดงการดัดแปรในรูปที่ 8) โดยเทคนิค flow cytometry (A) และภาพถ่ายจาก confocal fluorescence microscope ของเซลล์ที่ผ่านการ incubate กับ PNA33 ที่ถูกดัดแปรด้วยหมู่ -$(CH_2)_4NHC(=NH)NH_2$ (กลาง) เทียบกับพีเอ็นเอที่ไม่ได้ถูกดัดแปร (ขวา) และบัฟเฟอร์ (ขวา)

3. Pyrrolidinyl peptide nucleic acids with dye-modified backbone

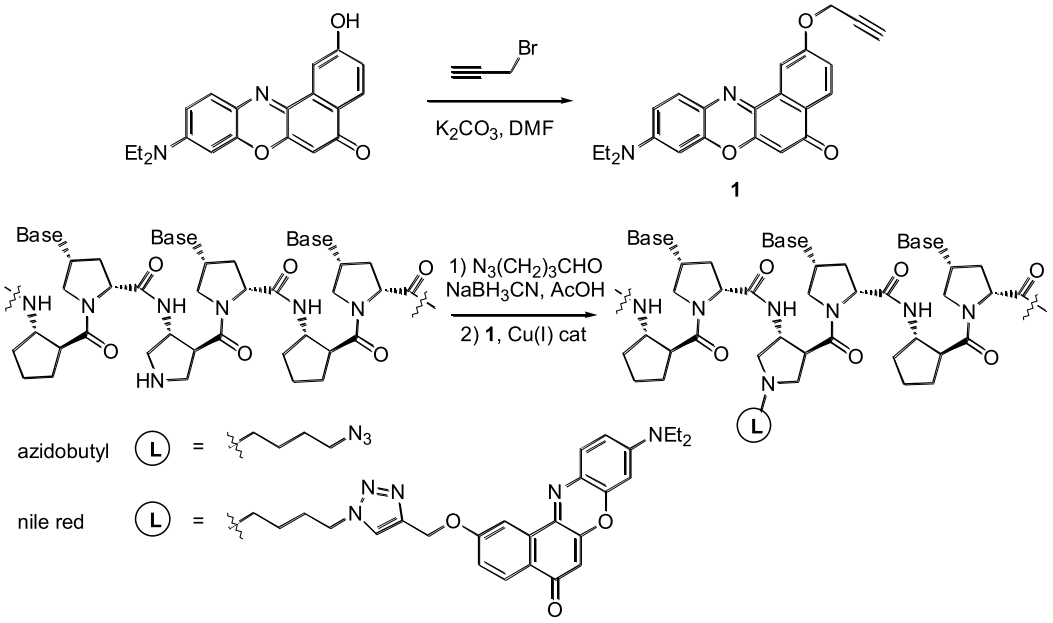
งานวิจัยในส่วนนี้เป็นการพัฒนาพีเอ็นเอที่ติดฉลากเรืองแสงที่สามารถเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงที่ตอบสนองต่อการเกิดไฮบริดระหว่างพีเอ็นเอกับดีเอ็นเอ โดยแบ่งเป็น 4 ส่วนดังนี้

3.1 Pyrrolidinyl peptide nucleic acids with Nile red label

ฉลากเรืองแสงตัวแรกที่ได้ศึกษาคือ Nile red ซึ่งเป็นสีย้อมในกลุ่ม benzophenoxazine ที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพขั้วของตัวทำละลาย (solvatochromic dye) ที่เป็นที่รู้จักกันดี[6] มีผู้ศึกษาดีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วย Nile red และสีย้อมอื่นในกลุ่มเดียวกันเช่น Nile blue อยู่บ้าง[7] โดยมีการติดฉลากในรูปแบบต่างๆ กัน เช่น ติดอยู่บนนิวคลีโอเบส ต่อแทนที่นิวคลีโอเบส หรือต่อกับโครงหลักของดีเอ็นเอ ทุกกรณีไม่พบการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงอย่างมีนัยสำคัญระหว่างดีเอ็นเอสายเดี่ยวและเมื่อเป็นสายคู่ เว้นแต่จะใช้ร่วมกับฉลากเรืองแสงชนิดอื่นเป็น Energy transfer pair[8] อย่างไรก็ตามพีเอ็นเอมีสภาพประจุ

และคอนฟอร์เมชันที่แตกต่างจากดีเอ็นเอ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่พีเอ็นเอที่ติดฉลากดังกล่าวจะแสดงสมบัติเชิงแสงที่แตกต่างจากดีเอ็นเอ

งานวิจัยเริ่มต้นจากการสังเคราะห์ Nile red ที่ดัดแปลงโดยการเติมหมู่ propargyloxy ที่ตำแหน่ง 2 จากนั้นนำไปต่อเข้ากับโมเลกุลของ acpcPNA ที่ถูกดัดแปลงโดยการแทนที่ ACPC หน่วยหนึ่งด้วย APC ซึ่งจะทำให้มีตำแหน่งของไนโตรเจนอะตอมอยู่ในโครงสร้างหลัก โดยอาศัยปฏิกิริยารีดักทีฟแอลคิลเลชัน-คลิก ที่กลุ่มวิจัยได้พัฒนาขึ้นก่อนหน้านี้[9] ดังแสดงใน**รูปที่ 10** และได้สังเคราะห์พีเอ็นเอที่ติดฉลาก Nile red ที่ตรงกลางสายทั้งหมด 5 ชนิดดังแสดงในตารางที่ 6



รูปที่ 10 การสังเคราะห์ propargyl nile red (**1**) และการติดฉลาก Nile red บนพีเอ็นเอโดยวิธี sequential reductive alkylation-Click chemistry

ตารางที่ 6 ลำดับเบสและข้อมูลเฉพาะของพีเอ็นเอที่ติดฉลาก Nile red ที่สังเคราะห์ขึ้น

PNA	sequence (N to C)[a]	t_R (min)[b]	%yield[c]	*m/z*[d] (calcd)	*m/z*[e] (found)
10mer-Nr	GTAGA(Nr)TCACT	33.6	6.3	4157.5	4155.1
11merAA-Nr	CATAA(Nr)AATACG	34.2	18.5	4491.9	4491.1
11merCC-Nr	CATAC(Nr)CATACG	34.6	11.4	4443.9	4441.8
11merGG-Nr	CATAG(Nr)GATACG	32.8	15.2	4523.9	4523.2
11merTT-Nr	CATAT(Nr)TATACG	34.3	8.4	4473.9	4473.0

[a]All sequences were end-capped at N- and C-termini with N-acetyl-L-lysine and L-lysinamide, respectively.
[b]HPLC conditions: C18 column 4.6×50 mm 3 μ, gradient 0.1% TFA in H_2O:MeOH 90:10 for 5 min then linear gradient to 10:90 over 30 min, flow rate 0.5 mL/min, 260 nm
[c]Isolated yield (determined spectrophotometrically) after HPLC purification
[d]Average mass of $[M{\cdot}H]^+$
[e]MALDI-TOF

พีเอ็นเอที่ติดฉลาก Nile red แสดงสมบัติ solvatochromic กล่าวคือมีการเปลี่ยนแปลงความยาวคลื่นของ λ_{max} ใน absorption และ fluorescence spectra ตัวอย่างเช่น พีเอ็นเอ **10mer-Nr** ใน 10 mM sodium phosphate buffer แสดง λ_{abs} และ λ_{em} อยู่ที่ 575 และ 656 nm ตามลำดับ เมื่อลดขั้วของตัวทำละลายโดยการเติมอะซิโตไนไตรล์ จะทำให้ทั้ง λ_{abs} และ λ_{em} เลื่อนไปในทิศทางที่มีความยาวคลื่นสั้นลง (blue shift) มากขึ้นตามลำดับ (20% MeCN: λ_{abs} 592 nm,

λ_{em} 654 nm; 50% MeCN: λ_{abs} 569 nm, λ_{em} 647 nm; 100% MeCN: λ_{abs} 544 nm, λ_{em} 634 nm) และเมื่อให้เข้าคู่กับดีเอ็นเอ พบว่า **10mer-Nr** มีการเรืองแสงที่เพิ่มขึ้นจากในสภาพที่เป็นสายเดี่ยวประมาณ 36 และ 72% สำหรับดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมและมีลำดับเบสผิดไป 1 ตำแหน่ง ตามลำดับ (**ตารางที่ 7**) โดยในทั้งสองกรณีมีการเกิด blue shift ของ fluorescence spectra ประมาณ 10 nm สิ่งที่น่าสนใจคือเมื่อดีเอ็นเอมีเบสเกินมาทำให้เกิดโครงสร้างที่เรียกว่า bulged duplex จะทำให้การเรืองแสงเพิ่มขึ้นถึงเกือบ 3 เท่า โดยไม่จำกัดว่าเบสที่เกินมาจะเป็นเบสอะไร การเรืองแสงของ Nile red ที่เพิ่มขึ้นมากนี้เสนอแนะว่าตัวฉลาก Nile red แทรกเข้าไปอยู่ในส่วนของ bulge ซึ่งทำให้เกิด hydrophobic environment[10] ที่ทำให้ quantum yield ของฉลาก Nile red เพิ่มขึ้น และเกิด blue shift ของ fluorescence spectra ไปถึง 13 nm ส่วนในกรณีของไฮบริดกับดีเอ็นเอที่เป็นคู่สม Nile red น่าจะแทรกตัวอยู่ในบริเวณ groove ของ PNA-DNA duplex อย่างไรก็ตาม การเรืองแสงที่เพิ่มขึ้นในกรณีของ complementary และ bulged duplex นั้นขึ้นอยู่กับลำดับเบสที่อยู่ข้างเคียงด้วย (ตารางที่ 2) แต่การเปลี่ยนแปลงของ λ_{em} จะเป็นไปในทิศทางเดียวกันเสมอคือ bulged duplex จะเกิด blue shift มากกว่า complementary duplex ซึ่งเป็นการยืนยันว่าสิ่งแวดล้อมของฉลาก Nile red ในทั้งสองกรณีนี้แตกต่างกัน ดังนั้นพีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วย solvatochromic dye เช่น Nile red จึงมีศักยภาพในการนำไปใช้เป็นโพรบสำหรับศึกษาโครงสร้างของดีเอ็นเอได้ งานในส่วนนี้ได้รับการตีพิมพ์แล้ว[11]

ตารางที่ 7 ข้อมูล T_m และสมบัติเชิงแสงของ Nile red-labeled acpcPNA[a]

PNA	DNA (5′ to 3′)[b]	T_m (°C)[c]	λ_{abs}	λ_{em}[d]	Φ_F[e]	F/F_0[f]
10mer-Nr	none	-	575	656	0.11	-
	AGTGATCTAC	58.8 (56.9)	598	647	0.15	1.36
	AGTG<u>C</u>TCTAC	37.5 (36.7)	585	648	0.17	1.72
	AGTGA**C**TCTAC	46.9 (52.0)	589	643	0.29	2.91
	AGT**C**GATCTAC	N.D.[g]	591	648	0.14	1.16
	AGTG<u>C</u>**C**TCTAC	N.D.[g]	585	648	0.17	1.45
11merAA-Nr	none	-	598	657	0.15	-
	CGTATTTTATG	76.0	600	651	0.23	1.55
	CGTATT**C**TTATG	74.7	593	645	0.33	2.34
11merCC-Nr	none	-	594	656	0.08	-
	CGTATGGTATG	67.4	594	646	0.19	2.49
	CGTATG**C**GTATG	71.2	598	644	0.13	1.79
11merGG-Nr	none	-	599	660	0.04	-
	CGTATCCTATG	(62.3)	599	655	0.15	3.27
	CGTATC**C**CTATG	(62.3)	599	652	0.10	2.46
11merTT-Nr	none	-	588	655	0.09	-
	CGTATAATATG	76.6	602	654	0.19	2.05
	CGTATA**C**ATATG	76.0	590	646	0.29	3.44

[a]All measurements were carried out in 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, [PNA] = 1.0 μM; [DNA] = 1.2 μM at 20 °C.

[b]Underlined and boldface letters in DNA sequences indicate the position of mismatch and base insertion, respectively.

[c]Determined by UV-vis (260 nm) and/or fluorescence spectrophotometry (643 nm, shown in parentheses)

[d]λ_{ex} = 580 nm

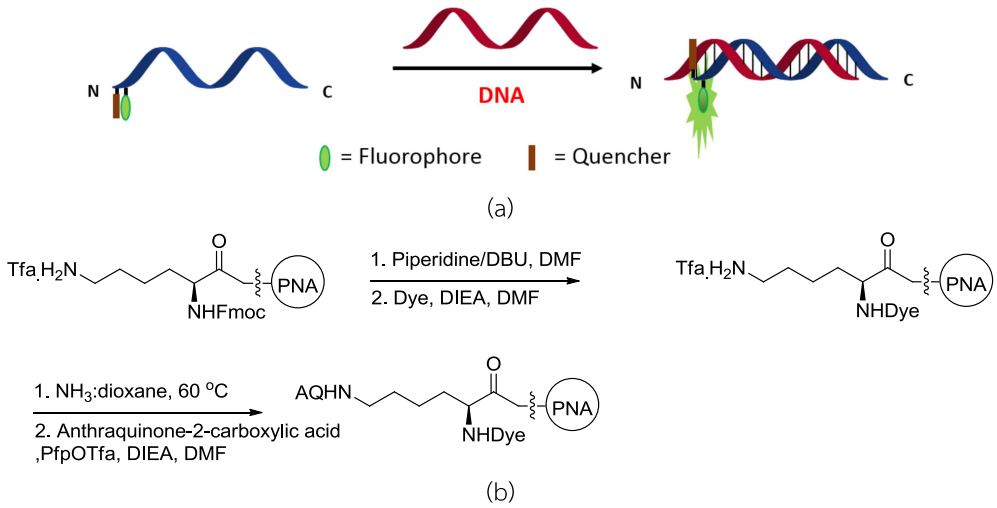
[e]Cresyl violet was used as a standard (Φ = 0.54 in MeOH).

[f]F/F_0 was calculated from the ratio of fluorescence of duplex divided by the single stranded PNA at 643 nm.

[9]Not determined

3.2 Doubly-end-labeled PNA beacon

งานในส่วนนี้เกี่ยวข้องกับการพัฒนา end-labeled PNA beacon โดยอาศัยการติดฉลากเรืองแสงร่วมกับตัวดับแสงที่มีความสามารถในการเกิด end-stacking กับ terminal base pairs ของ PNA-DNA duplex ได้ โดยปกติ การออกแบบ molecular beacon probe แบบที่ติดฉลากสองชนิดจำเป็นจะต้องให้การจัดวางตัวของฉลากทั้งสองในโพรบอิสระ และโพรบที่เกิดการไฮบริไดซ์กับเป้าหมายแตกต่างกัน ซึ่งจะทำให้การเกิดอันตรกิริยาระหว่างฉลากทั้งสองเช่น contact quenching หรือ กระบวนการ FRET เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งจะส่งผลต่อถึงการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสง โดยในกรณีของดีเอ็นเอมักจะต้องออกแบบโครงสร้างให้เป็นห่วงและก้านโดยฉลากทั้งสองจะติดอยู่ที่ปลายทั้งสองข้างของโพรบตรงบริเวณที่เกิดเป็นส่วนก้าน[12] แต่ในกรณีของพีเอ็นเอที่ติดฉลากเรืองแสงโดยทั่วไปจะอยู่ในสภาพที่พับตัวเป็นโครงสร้างที่ทำให้เกิดการสัมผัสของฉลากได้ด้วยตัวเองอยู่แล้ว การออกแบบให้มีโครงสร้างเป็นห่วงและก้านจึงไม่จำเป็น[13] แต่ยังจำเป็นต้องมีการติดฉลากสองตัวที่ปลายด้านตรงข้ามกันของโมเลกุลของพีเอ็นเอ ในงานนี้ได้มีแนวคิดในการติดฉลากสองชนิดที่ปลายด้านเดียวกันของพีเอ็นเอโพรบ แต่อาศัยการเลือกคู่ฉลากที่เหมาะสม กล่าวคือ ในสภาพที่เป็นสายเดี่ยว ฉลากทั้งสองจะอยู่ใกล้กันจึงสามารถเกิดอันตรกิริยาได้โดยไม่ขึ้นกับคอนฟอร์เมชันหรือโครงสร้างทุติยภูมิของตัวโพรบ และถ้าเลือกฉลากตัวหนึ่งที่มีสมบัติในการเกิด end-stacking การเกิด duplex จะทำให้ฉลากทั้งสองแยกตัวออกจากกัน ซึ่งอันตรกิริยาที่เปลี่ยนแปลงไปก็จะส่งผลให้การเรืองแสงเปลี่ยนไปด้วย ดังแสดงในรูปที่ 11 หลักการนี้ได้เคยมีผู้รายงานมาก่อนหน้านี้ในระบบของดีเอ็นเออยู่บ้าง โดยคู่ฉลากที่น่าสนใจคือ fluorescein/anthraquinone แต่ผลที่ได้ยังไม่ค่อยน่าพอใจนัก กล่าวคือการเรืองแสงที่เปลี่ยนแปลงไปยังค่อนข้างต่ำ (ไม่เกิน 4–5 เท่า) และความจำเพาะเจาะจงยังไม่ดี[2-4] ผู้วิจัยจึงประยุกต์ใช้แนวคิดนี้มาใช้ในการพัฒนา end-labeled acpcPNA beacon โดยคาดหวังว่าจะให้การเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงที่ชัดเจนและมีความจำเพาะเจาะจงที่ดีขึ้นกว่าโพรบที่เป็นดีเอ็นเอ



รูปที่ 11 หลักการทำงาน (a) และ วิธีการสังเคราะห์ doubly-end-labeled PNA beacon (b)

คู่ฉลากที่เลือกมาศึกษาคือ fluorescein (FAM) ซึ่งทำหน้าที่เป็นฉลากเรืองแสง และ anthraquinone (AQ) ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวดับแสง โดย anthraquinone มีความสามารถในการเกิด intercalation/end-stacking ที่ดี โดยจากการ optimize โครงสร้างพบว่าควรจะติดฉลากทั้งสองจะติดผ่าน lysine ที่ปลายด้านอะมิโนของ acpcPNA ที่มีลำดับเบสเป็น GTAGATCACT โดยให้ FAM อยู่ที่ตำแหน่ง N_{α} และ AQ อยู่ที่ตำแหน่ง N_{ε} หากผิดไปจากนี้การเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงจะลดลง พีเอ็นเอที่ติดฉลากแสดงการจับยึดกับ DNA ได้ตามปกติ โดยมีค่า T_m อยู่ที่ 57.5 °C ซึ่งใกล้เคียงกับพีเอ็นเอที่ไม่ได้ติดฉลาก ในสภาพที่เป็นสายเดี่ยว PNA probe จะมีการเรืองแสงที่ต่ำเนื่องจากเกิด quenching ของ FAM ด้วย AQ โดยการเปรียบเทียบระหว่าง FAM/AQ-PNA กับ FAM-PNA แสดงให้เห็นว่า AQ สามารถ quench การเรืองแสงของ FAM ได้ถึง 95% และเมื่อเติม complementary DNA สัญญาณ fluorescence จะเพิ่มขึ้นจาก 19 เป็น 365 a.u (18.8 เท่า) แต่เมื่อทำการเติม mismatched DNA ที่ตำแหน่งกลางสายและปลายสาย หรือ non-complementary DNA จะพบว่าสัญญาณเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย (6.0, 7.0 และ 1.1 เท่า ตามลำดับ) แสดงว่าการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงเกิดขึ้นอย่างจำเพาะเจาะจง

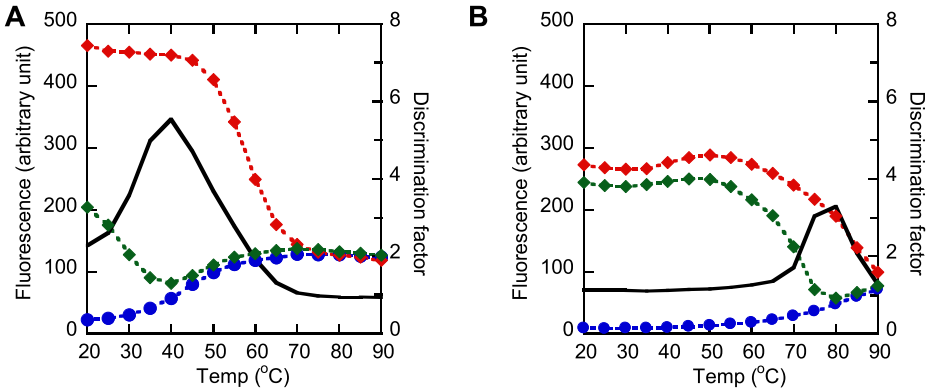
และเป็นไปตามหลักการออกแบบที่วางไว้ คือต้องมีการเข้าคู่เบสที่ปลายสายเท่านั้นจึงจะทำให้เกิด end-stacking ได้ดี เมื่อเปลี่ยนฉลากเรืองแสงจาก FAM เป็น tetramethylrhodamine (TAMRA) ก็ให้ผลในทำนองเดียวกัน (**ตารางที่ 8**) แสดงว่าการออกแบบนี้สามารถใช้กับฉลากเรืองแสงได้หลายชนิดโดยไม่ต้องคำนึงถึง spectral overlap ระหว่างฉลากเรืองแสงและตัว quencher

ตารางที่ 8 ค่าการเรืองแสงของ doubly-end-labeled PNA beacon[a]

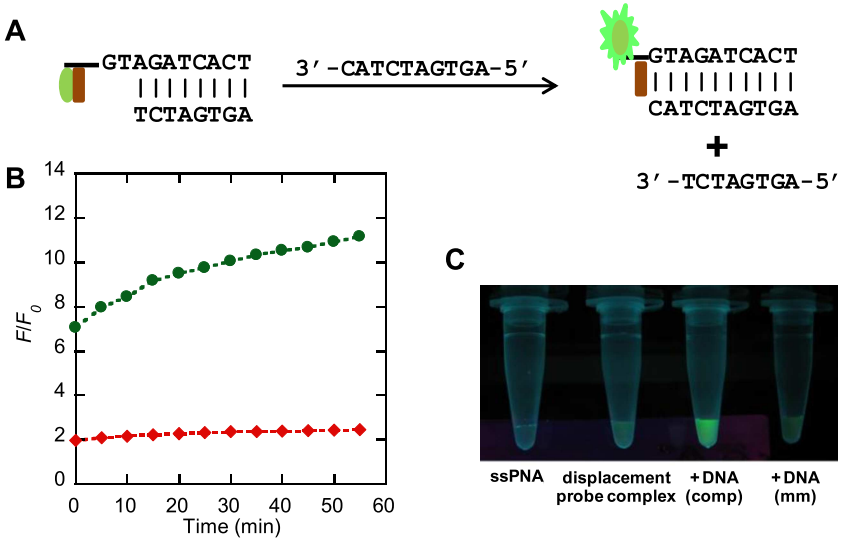
PNA	DNA sequence (5′⟶3′)	F_{ss} (a.u)	F_{ds} (a.u)	F_{ds}/F_{ss}
(AQ/Flu)-GTAGATCACT	AGTGATCTAC (complementary)	19.4	365.9	18.8
	AGTGCTCTAC (internal mismatched)	19.0	114.3	6.0
	AGTGATCTAA (terminal mismatched)	18.5	129.8	7.0
	TCTGCATTTAG (noncomplementary)	19.0	20.5	1.1
(AQ/TMR)-GTAGATCACT	AGTGATCTAC (complementary)	17.0	307.2	18.1
	AGTGCTCTAC (internal mismatched)	17.4	84.7	4.9
	AGTGATCTAA (terminal mismatched)	17.6	52.3	3.0
	TCTGCATTTAG (noncomplementary)	18.0	5.0	0.3

[a]Fluorescence were measured in 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, [PNA] = 1 μM and [DNA] = 1.2 μM, excitation wavelength = 490 nm, PMT voltage = medium.

อย่างไรก็ตาม แม้พีเอ็นเอโพรบที่ได้จะแสดงการเรืองแสงที่เปลี่ยนแปลงไปอย่างชัดเจนเมื่อเทียบระหว่าง complementary duplex กับพีเอ็นเอสายเดี่ยว แต่ความแตกต่างระหว่าง complementary และ single mismatch ยังค่อนข้างต่ำ จึงได้พัฒนาวิธีการที่จะช่วยให้สามารถบอกความแตกต่างได้ดีขึ้นสองวิธี วิธีแรกคือการเพิ่มอุณหภูมิ ซึ่ง single mismatched PNA·DNA duplex จะถูกทำลายก่อน complementary PNA·DNA duplex สัญญาณจึงลดลงเร็วกว่า ซึ่งผลการทดลองเป็นดังสรุปได้ใน**รูปที่ 12** ซึ่งแสดงให้เห็นว่าที่อุณหภูมิสูงขึ้นจะสามารถบอกความแตกต่างระหว่าง complementary กับ single mismatched DNA ได้ดีกว่าที่อุณหภูมิห้อง โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมจะขึ้นกับลำดับเบสของพีเอ็นเอที่เกี่ยวข้อง



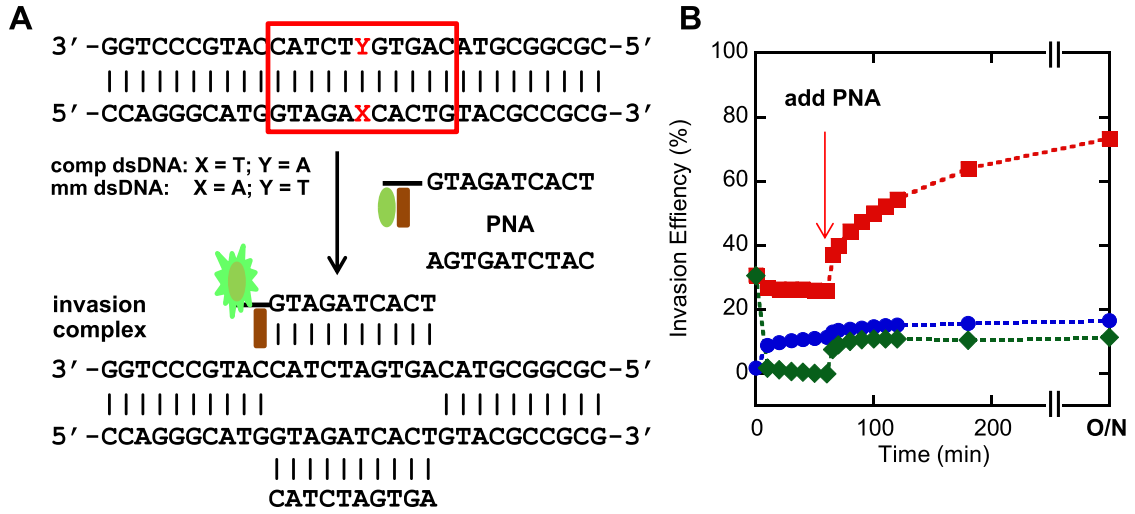
รูปที่ 12 การเพิ่ม specificity ของ doubly-end-labeled PNA beacon โดยอาศัยการเพิ่มอุณหภูมิ กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่หักลบ background ของ A) (AQ/Flu)-GTAGATCACT และ B) (AQ/Flu)-GAACAAGCTGGGAA-LysNH$_2$ สีน้ำเงิน: PNA probe; สีแดง: PNA probe + complementary DNA; สีเขียว: PNA probe + mismatched DNA; สีดำ: discrimination factor [$F_{ds(comp)}/F_{ds(mm)}$] (Conditions: 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, [PNA] = 0.1 μM and [DNA] = 0.12 μM, excitation wavelength = 490 nm, PMT voltage = high



รูปที่ 13 A) การเพิ่ม specificity ของ doubly-end-labeled PNA beacon โดยอาศัยหลักการของ strand displacement B) ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่เปลี่ยนแปลงไปเทียบกับเวลา (complementary สีน้ำเงิน, mismatched สีแดง). Conditions: 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, [PNA] = 0.1 μM and [DNA] = 0.12 μM, excitation wavelength 490 nm, PMT voltage = high และ C) ภาพถ่ายภายใต้แสง UV (365 nm)

ในอีกวิธีหนึ่งในการเพิ่ม specificity จะอาศัยหลักการแทนที่ของดีเอ็นเอสายสั้นๆ ที่จับอยู่กับโพรบ ดังแสดงใน**รูปที่ 13** โดยดีเอ็นเอสายสั้นนี้ได้ออกแบบให้มีปลายด้าน 3' หดสั้นลง 2-3 เบส ทำให้ AQ ไม่สามารถเกิด end-stacking กับ duplex ที่เกิดขึ้นได้ ดังนั้นสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของไฮบริดระหว่างโพรบและดีเอ็นเอสายสั้นนี้จะต่ำ แต่เมื่อเกิดการแทนที่ด้วยดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีสายยาวจะทำให้ AQ กลับมาเกิด end-stacking ได้อีกครั้ง โดยความสามารถในการแทนที่จะขึ้นกับความเสถียรของไฮบริดที่เกิดขึ้น ดังนั้น complementary DNA จึงสามารถแทนที่ดีเอ็นเอสายสั้นได้เร็วและสมบูรณ์กว่า single mismatched DNA สัญญาณจึงเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วกว่ามาก

จากข้อมูลทั้งหมดได้แสดงให้เห็นว่า doubly-end-labeled PNA beacon ที่ใช้ฉลากเรืองแสงตัวใดตัวหนึ่งเช่น FAM หรือ TAMRA ร่วมกับตัวดับแสงที่มีสมบัติ end-stacking เช่น AQ แสดงความสามารถในการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงที่สูง (>10 เท่า) และจำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยสามารถบอกความแตกต่างของ complementary และ single mismatched DNA ได้ และสามารถเพิ่มความจำเพาะให้ดียิ่งขึ้นโดยการเพิ่มอุณหภูมิหรือการใช้หลักการของ displacement probe อย่างไรก็ตาม ในการใช้งานจริงยังมีข้อจำกัดเนื่องจากดีเอ็นเอปกติจะอยู่ในรูปของสายคู่ (dsDNA) จึงได้พยายามพัฒนางานวิจัยนี้ต่อโดยการนำมาใช้ในการตรวจวัด dsDNA โดยตรง

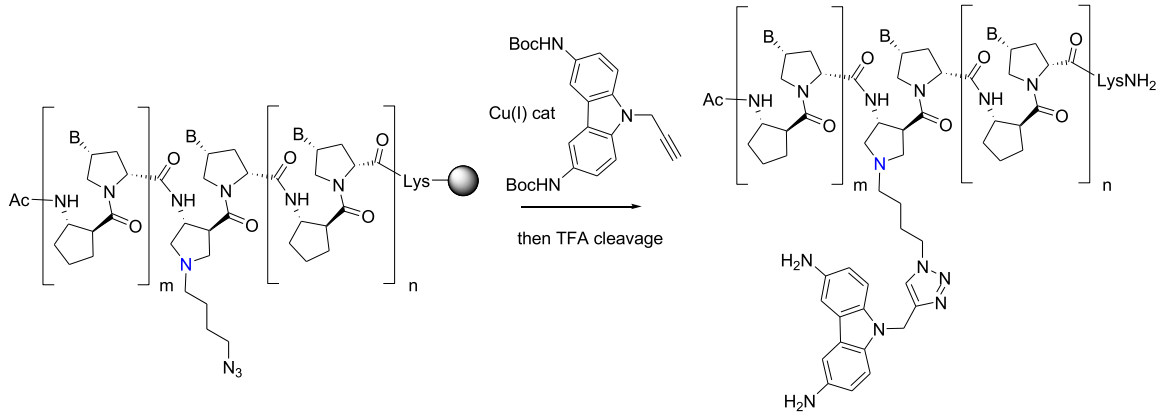


รูปที่ 14 A) การออกแบบการทดลอง DNA duplex invasion รวมทั้งลำดับเบสของพีเอ็นเอและดีเอ็นเอที่เกี่ยวข้อง B) % invasion ที่ได้จากการคำนวณการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่ 520 nm สีน้ำเงิน: dsDNA+(AQ/Flu)-PNA(Lys1); สีแดง: dsDNA+(AQ/Flu)-PNA(Lys5); สีเขียว: mismatched dsDNA+(AQ/Flu)-PNA(Lys5) ก่อนและหลังเติม PNA ตัวที่สอง

ในการทดลองตรวจวัดดีเอ็นเอสายคู่ได้เลือกดีเอ็นเอสายคู่ที่มีความยาว 30 เบส และมีลำดับเบสช่วงตรงกลาง 10 เบสตรงกับลำดับเบสของพีเอ็นเอโพรบดังแสดงใน**รูปที่ 14A** ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า (AQ/Flu)-PNA อย่างเดียวไม่มีความสามารถในการแย่งจับกับดีเอ็นเอใน dsDNA ได้ จึงไม่เกิดการเพิ่มขึ้นของการเรืองแสง แต่เมื่อใส่พีเอ็นเอที่ไม่ติดฉลากซึ่งมีลำดับเบสคู่สมกับ DNA อีกเส้นหนึ่งในบริเวณเดียวกับที่พีเอ็นเอโพรบตัวแรกจับ พบว่าการเรืองแสงจะเพิ่มขึ้นอย่างมาก ทั้งนี้บนพีเอ็นเอทั้งสองสายต้องมี Lysine จำนวน 5 ตัวเพื่อเพิ่มความแข็งแรงของการจับยึดกับดีเอ็นเอ โดยการเรืองแสงจะเริ่มคงที่หลังเติมพีเอ็นเอตัวที่สองประมาณ 100 นาที ดัง**รูปที่ 14B** ซึ่งการทดลองควบคุมโดยการผสมพีเอ็นเอทั้งสองสายไม่พบว่าเกิดการเรืองแสงที่เพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าการใช้พีเอ็นเอสองตัวร่วมกันจะช่วยให้เกิดการ invade เข้าไปใน dsDNA ได้ดีขึ้น ซึ่งการใช้พีเอ็นเอสองสายร่วมกันในการทำ duplex invasion นี้นับเป็นการใช้ประโยชน์จากจุดเด่นของ acpcPNA ที่ไม่สามารถเกิด self complementary duplex ได้ ทำให้ไม่ต้องมีการดัดแปรโมเลกุลของพีเอ็นเอดังที่จำเป็นต้องทำกับพีเอ็นเอระบบอื่น[14] งานในส่วนนี้ได้รับการตีพิมพ์แล้ว[15]

3.3 Diaminocarbazole-labeled PNA

งานในส่วนนี้เป็นการสังเคราะห์และศึกษาสมบัติเชิงแสงของพีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วย 3,6-diaminocarbazole (DAC) โดยมีจุดมุ่งหมายเพื่อพัฒนาพีเอ็นเอโพรบเรืองแสงที่ตอบสนองต่อการเกิดไฮบริดกับดีเอ็นเอ โดยเริ่มต้นจากการสังเคราะห์ Boc-protected DAC ที่มีหมู่แอลไคน์ (DAC-alkyne) และนำไปทำปฏิกิริยา Cu-catalyzed Click reaction เพื่อติด DAC ไปบน backbone ของ acpcPNA T9 (TTTTTTTTT), M10AT (GTAGATCACT) และ , M10CG (GTAGCGCACT) ที่ผ่านการดัดแปรด้วย 4-azidobutyl group ตรง apc spacer ที่ต่อระหว่างเบสคู่ที่ขีดเส้นใต้ไว้ ได้เป็น DAC-modified acpcPNA 3 ชนิดคือ $T9^{DAC}$, $M10AT^{DAC}$ และ $M10CG^{DAC}$ (**รูปที่ 15 และ ตารางที่ 9**)



รูปที่ 15 การเชื่อมต่อ DAC-alkyne กับ acpcPNA โดยอาศัย Click chemistry

จากนั้นจึงได้ศึกษาการจับยึดกับดีเอ็นเอโดย thermal denaturation และ fluorescence experiment ผลที่ได้เป็นดังสรุปใน**ตารางที่ 5**

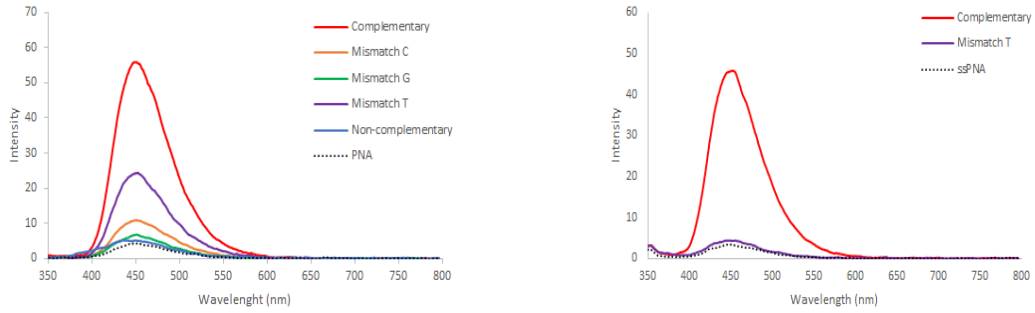
ตารางที่ 9 ค่า T_m และการเรืองแสงของ diaminocarbazole-modified acpcPNA[a]

PNA	DNA (5'→ 3')	T_m(°C)	ΔT_m(°C)	F/F_0 (25°C)	F/F_0 (45°C)	Note
T9^{DAC}	AAA AAA AAA	65.2	-	35.5	-	Comp.
T9^{DAC}	AAA ACA AAA	33.7	31.5	18.6	-	SM-C
T9^{DAC}	AAA AGA AAA	23.6	41.6	6.0	-	SM-G
T9^{DAC}	AAA ATA AAA	38.2	27.0	15.7	-	SM-T
T9^{DAC}	TTT TTT TTT	-	-	1.1	-	Non-comp.
M10AT^{DAC}	AGT GAT CTA C	53.4	-	13.2	12.9	Comp.
M10AT^{DAC}	AGT GCT CTA C	29.0	24.4	2.7	1.2	SM-C
M10AT^{DAC}	AGT GGT CTA C	24.5	28.9	1.7	-	SM-G
M10AT^{DAC}	AGT GTT CTA C	35.0	18.4	6.5	1.2	SM-T
M10AT^{DAC}	GGG GGG GGG G	-	-	1.2	-	Non-comp.
M10CG^{DAC}	AGT GCG CTA C	59.0	-	11.4	10.2[a]	Comp.
M10CG^{DAC}	AGT GAG CTA C	30.8	28.2	4.9	-	SM-A
M10CG^{DAC}	AGT GGG CTA C	33.4	25.6	7.0	1.0[b]	SM-G
M10CG^{DAC}	AGT GTG CTA C	39.2	19.8	9.1	1.7[b]	SM-T
M10CG^{DAC}	GGG GGG GGG G	-	-	0.9	-	Non-comp.

[a]Fluorescence were measured in 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, [PNA] = 1 μM and [DNA] = 1.2 μM, excitation wavelength = 315 nm, PMT voltage = medium

จากการศึกษาสมบัติการเรืองแสงของ DAC-labeled acpcPNA ทั้ง 3 sequence คือ T9^{DAC}, M10AT^{DAC} และ M10CG^{DAC} พบว่าเมื่อเกิดการเข้าคู่กับดีเอ็นเอคู่สม การเรืองแสงเพิ่มมากขึ้นถึง 35.5, 13.2 และ 11.4 เท่า ตามลำดับ แต่เมื่อเข้าคู่กันกับ single mismatch DNA ชนิดต่างๆ จะพบว่าการเรืองแสงจะมีค่าลดต่ำลงแต่ยังไม่สามารถบอกความแตกต่างได้อย่างแน่ชัด แต่จากการเปรียบเทียบค่า T_m ของ complementary กับ mismatched PNA·DNA duplexes พบว่ามีค่า ΔT_m ที่มากกว่า 20 °C แสดงว่าพีเอ็นเอที่มีการติด DAC ลงไปมีความจำเพาะเจาะจงในการเลือกจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายได้เป็นอย่างดี จึงได้ศึกษาการเพิ่มสัญญาณการเรืองแสงโดยการใช้อุณหภูมิเข้าช่วยพบว่าที่อุณหภูมิ 45–50 °C การเรืองแสงของ

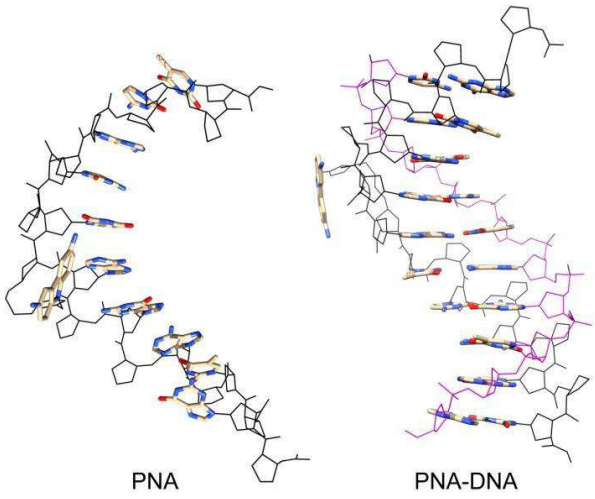
single mismatch ของ M10AT^{DAC} และ M10CG^{DAC} ลดลงเหลือเพียง 1.0–1.7 เท่า ทำให้สามารถบอกความแตกต่างระหว่าง complementary และ single mismatch ได้อย่างชัดเจน (**รูปที่ 16**)



(a) (b)

รูปที่ 16 ฟลูออเรสเซนส์สเปกตรัมของ DAC-modified acpcPNA M10AT^{DAC} ที่ (a) 20 ^{o}C และ (b) 45 ^{o}C ภาวะของการทดลอง: 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, [PNA] = 1 μM and [DNA] = 1.2 μM, excitation wavelength = 315 nm, PMT voltage = medium

เพื่อเป็นการอธิบายผลการทดลองที่ได้ จึงได้ทำการคำนวณทางทฤษฎีที่จะทำนายการจัดวางตัวของ DAC ใน PNA·DNA duplexes ซึ่งงานในส่วนหลังสุดนี้เป็นความร่วมมือกับโครงการย่อยที่ 6 ของ ผศ.ดร.คัชรินทร์ ศิริวงศ์ โดยผลการคำนวณโดยเทคนิค molecular dynamics simulations ช่วยยืนยันว่าในสภาวะที่เป็นพีเอ็นเอสายเดี่ยว DAC จะเกิดอันตรกิริยากับนิวคลีโอเบสของพีเอ็นเอได้ดี และอันตรกิริยานี้จะลดลงเมื่อเกิดไฮบริดกับดีเอ็นเอ โดยหมู่ DAC จะถูกผลักออกไปอยู่ข้างนอกโครงสร้างของ duplex (**รูปที่ 17**) ดังนั้นกลไกของการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงของ DAC-labeled PNA น่าจะใกล้เคียงกับของ pyrene-labeled PNA ที่คณะผู้วิจัยได้ศึกษามาก่อนหน้านี้แล้ว[16] แต่จุดเด่นของ DAC-labeled PNA คือมีการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงที่สูงกว่ามาก งานในส่วนนี้ ซึ่งอยู่ในความรับผิดชอบของผู้ร่วมโครงการคือ ผศ.ดร.จตุรงค์ สุภาพ พร้อม ได้รับการตีพิมพ์แล้ว[17]

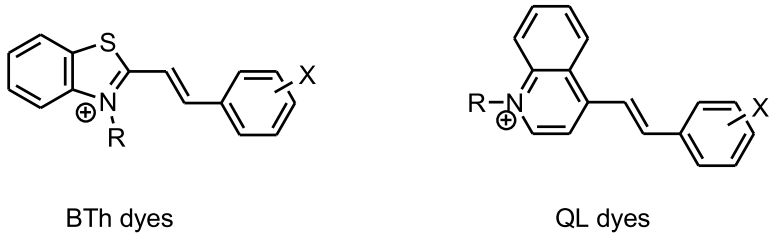


รูปที่ 17 ค่าเฉลี่ยของ MD structures ของ DAC-modified acpcPNA ในสภาพที่เป็นสายเดี่ยวและเมื่อเข้าคู่กับดีเอ็นเอ

3.4 PNA labeled with styryl dyes

งานในส่วนนี้เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์และศึกษาสมบัติเชิงแสงของพีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วย styryl dyes ซึ่งมีสูตรโครงสร้างทั่วไปดังแสดงใน**รูปที่ 18** โดยเริ่มจากการสังเคราะห์ clickable styryl dye ที่มีหมู่แอลไคน์ต่ออยู่ที่ตำแหน่งต่างๆ ของโมเลกุล แล้วนำไปต่อเข้ากับ azide-modified acpcPNA โดยผ่านปฏิกิริยา reductive alkylation/click reaction

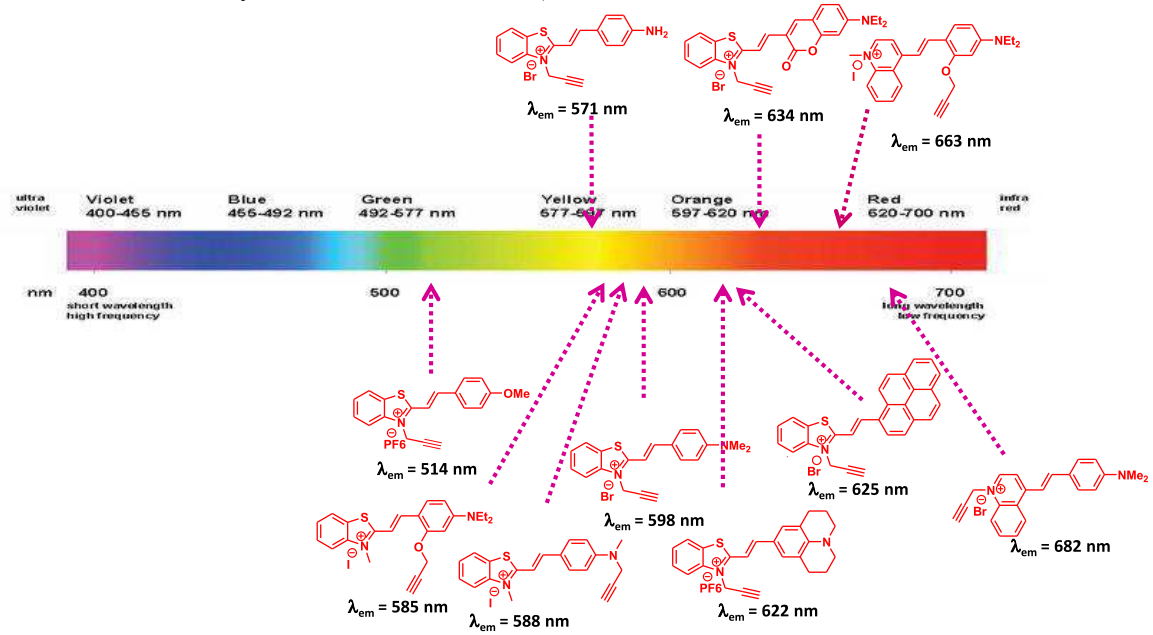
จากนั้นจึงนำไปศึกษาสมบัติเชิงแสงในสภาพที่เป็นพีเอ็นเอสายเดี่ยวเทียบกับเมื่อจับกับดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยคาดหมายว่าจะเกิดการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงเนื่องจากมีรายงานว่า styryl dye แสดงสมบัติ solvatochromic กล่าวคือสามารถเปลี่ยนแปลงสมบัติการเรืองแสงได้ตามสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนไป



BTh dyes QL dyes

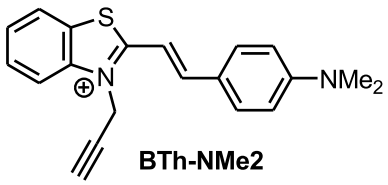
รูปที่ 18 โครงสร้างทั่วไปของ styryl dyes ที่ได้ศึกษาในงานวิจัยนี้ (R = Me, propargyl; X = OMe, NMe_2, NH_2 etc.)

งานที่ได้ดำเนินการไปคือการสังเคราะห์ clickable styryl dye โดยให้ quaternized methylbenzothiazole (BTh) หรือ quaternized 4-methylquinoline (QL) ทำปฏิกิริยากับ electron-rich aromatic aldehyde ตัวอย่างของ dye ที่สังเคราะห์ได้ และ λ_{em} ของมันแสดงอยู่ใน**รูปที่ 19** ซึ่งพบว่าการเรืองแสงของ dye ในกลุ่มนี้ครอบคลุมสเปกตรัมในช่วง 500 ถึง 700 nm โดยความยาวคลื่นของการเรืองแสงจะขึ้นกับทั้งโครงสร้างของโมเลกุลทั้งสองฝั่ง โดย dye ในกลุ่ม QL จะให้การเรืองแสงที่อยู่ในช่วงคลื่นที่ยาวกว่า dye ในกลุ่ม Bth

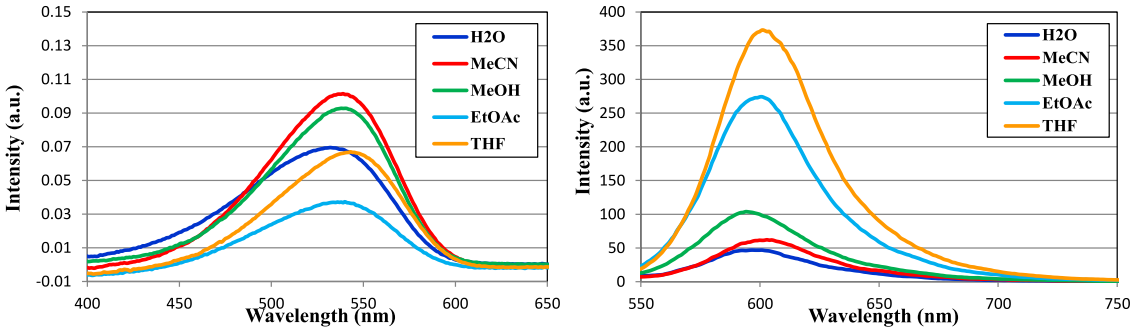


รูปที่ 19 โครงสร้างและ λ_{em} ของ styryl dye บางชนิดที่สังเคราะห์ได้ (วัดที่ความเข้มข้น 1 μM ใน methanol)

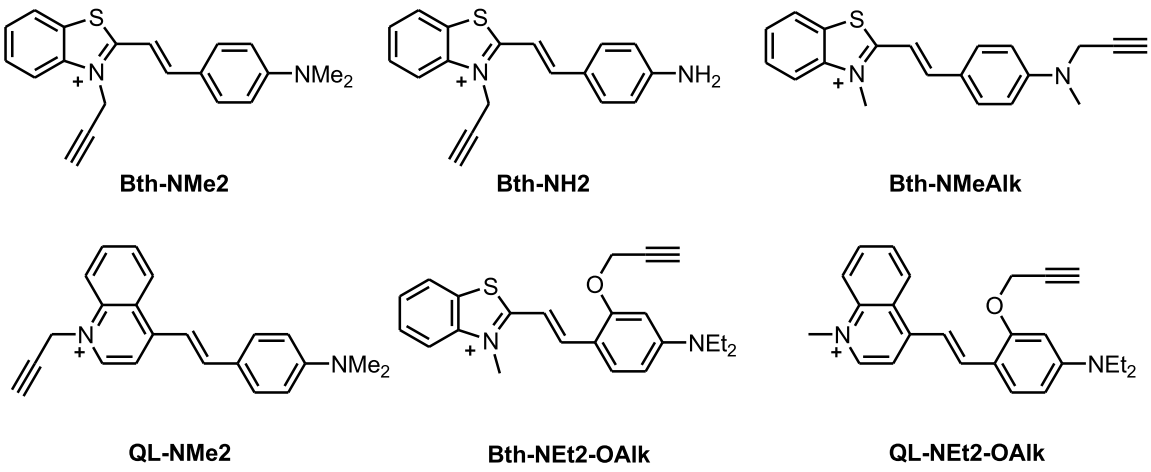
จากนั้นจึงได้ศึกษาสมบัติ solvatochromic ของ styryl dye โดยใช้ dye **BTh-NMe2** เป็นตัวแทน พบว่าจะเกิด red shifting ของทั้ง UV และ fluorescence spectrum เมื่อสภาพขั้วของตัวทำละลายลดลง นอกจากนี้ความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์จะเพิ่มขึ้นด้วย ดังแสดงใน**รูปที่ 20**



BTh-NMe2



รูปที่ 20 UV and fluorescence spectra ของ dye **BTh-NMe2** ที่ความเข้มข้น 1 μM และ λ_{ex} = 525 nm



รูปที่ 21 โครงสร้างของ styryl dyes ที่ได้นำไปทดลองต่อกับพีเอ็นเอ

ข้อมูลประสิทธิภาพการเรืองแสงของ styryl dye ที่จะนำไปศึกษาโดยวัดจากค่า quantum yield (Φ) ในตัวทำละลายที่เป็นน้ำและ THF รวมทั้งความสามารถในการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงเมื่อมี dsDNA อยู่ด้วยเป็นดังสรุปใน**ตารางที่ 10**

ตารางที่ 10 แสดงสมบัติการเรืองแสงของ styryl dye ใน THF และในน้ำ และการเพิ่มขึ้นของประสิทธิภาพการเรืองแสงเมื่อมีดีเอ็นเออยู่ด้วย

Dye	λ_{abs} (ε)[a]	λ_{em}[b]	Φ(THF)	Φ(H_2O)	Φ(dsDNA)[c]	Φ(dsDNA)/Φ(H_2O)
Bth-NMe2	539 (4.9×10^4)	608	0.0177	0.0013	0.0316	24.5
QL-NMe2	575 (6.6×10^4)	702	N.D.	0.0006	0.0237	40.4
Bth-NH2	517 (4.8×10^4)	565	0.0164	0.0031	0.0356	11.3
Bth-NMeAlk	500 (5.3×10^4)	579	N.D.	0.0088	0.1418	16.1
Bth-NEt2-OAlk	533 (7.9×10^4)	584	N.D.	0.0030	0.1343	44.8
QL-NEt2-OAlk	568 (5.4×10^4)	668	0.0121	0.0012	0.1021	85.4

[a] วัดใน MeOH [b]วัดใน H_2O [c]dsDNA = dCGCGGCGTACAGTGATCTACCATGCCC TGG + dCCAGGGCATGGTAGATCACTGTACGCC, Conditions; [alkSTR] = 2 μM [dsDNA] = 1 μM, Fluorescence were measured in 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0

จะเห็นได้ว่า styryl dye เมื่ออยู่ในน้ำจะมีประสิทธิภาพการเรืองแสงต่ำ แต่ประสิทธิภาพจะดีขึ้นเมื่ออยู่ในตัวทำละลาย THF ซึ่งมีขั้วต่ำกว่า เมื่อเติมดีเอ็นเอลงไปจะทำให้ประสิทธิภาพการเรืองแสงในน้ำเพิ่มขึ้นอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง **QL-NMe2**, **QL-NEt2-OAlk** และ **BTh-NEt2-OAlk** ซึ่งแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของ dye กลุ่มนี้ในการนำไปใช้เป็นตัวตรวจวัดดีเอ็นเอ งานจะทำต่อไปคือการศึกษาอันตรกิริยาของ **QL-NEt2-OAlk** และ **BTh-NEt2-OAlk** เพิ่มเติม รวมทั้งศึกษาความเป็นไปได้ในการนำไปใช้เป็นสีย้อมเพื่อการตรวจวัดดีเอ็นเอด้วย

นอกจากนี้ยังได้สังเคราะห์พีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเป็น TTTTTTTTT (T9) และ GTAGATCACT (M10) ที่เชื่อมต่อกับ styryl dye ตรงตำแหน่งระหว่างเบสคู่ที่ขีดเส้นใต้โดยอาศัยปฏิกิริยา reductive alkylation-click ที่เคยพัฒนาขึ้นมาก่อนหน้านี้[9] พบว่าสามารถเชื่อมต่อ dye ได้เพียงบางชนิดเท่านั้นเนื่องจากในบางกรณีจะเกิดปฏิกิริยาข้างเคียงที่ยังไม่ทราบแน่ชัดว่าคืออะไร แต่ทำให้ส่วนของ dye ถูกทำลายไป ข้อมูลของพีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้สำเร็จ รวมทั้งสมบัติเชิงแสงในสภาวะที่มีดีเอ็นเอคู่สมและดีเอ็นเอลำดับอื่นๆ ที่เป็น mismatch, base insertion และ abasic site ดังสรุปใน**ตารางที่ 11** และ **12**

ผลการศึกษาสมบัติเชิงแสงเบื้องต้นพบว่าเมื่อมีดีเอ็นเอคู่สมอยู่ด้วยกลับไม่พบการเพิ่มขึ้นของการเรืองแสงอย่างมีนัยสำคัญ และในหลายกรณีสัญญาณจะลดลงด้วย ซึ่งแสดงให้เห็นถึงพฤติกรรมของ styryl dye ที่แตกต่างจาก dye ในกลุ่ม thiazole orange อย่างชัดเจน สิ่งที่น่าสังเกตคือ styryl dye เมื่อเชื่อมต่อกับ PNA แล้วกลับมีค่า quantum yield ที่สูงกว่า styryl dye อิสระอยู่ถึงกว่า 10 เท่า ซึ่งอาจเกิดจากสิ่งแวดล้อมของ dye ที่เปลี่ยนไป และเมื่อนำพีเอ็นเอโพรบนี้ไปตรวจวัดกับดีเอ็นที่เป็น mismatch จะให้สัญญาณการเรืองแสงที่มากกว่าในสภาวะที่มีดีเอ็นเอคู่สมและจะมีการเรืองแสงเพิ่มขึ้นมากเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็น base insertion และ abasic site ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากโมเลกุลของ styryl dye สามารถแทรกไปอยู่ในช่องว่างของเกลียวคู่พีเอ็นเอดีเอ็นเอ (PNA·DNA duplex) ตรงตำแหน่งที่เป็น base insertion (BL) หรือตรงตำแหน่งที่ไม่มีเบส (abasic) โดยคาดว่าโมเลกุลของ styryl dye จะเข้าไปแทรกตรงที่ว่าง ทำให้การเรืองแสงก็จะเพิ่มขึ้น ซึ่งจากการศึกษาพีเอ็นเอโพรบทั้งหมดพบว่า **M10-BTh-NH2** และ **M10-BTh-NMe2** สามารถบอกความแตกต่างของดีเอ็นเอคู่สม mismatch, base insertion และ abasic site ได้ดีสุด โดยเมื่อเกิดไฮบริดกับ DNA ที่มี base insertion (**D10BL(C)**) ให้สัญญาณการเรืองแสงสูงถึง 11.9 และ 10.4 เท่า ตามลำดับ (**รูปที่ 22**) สัญญาณจาก CD สเปกตรัม (**รูปที่ 23**) ยืนยันว่าพีเอ็นเอสามารถเกิดไฮบริดกับดีเอ็นเอคู่สมและกับดีเอ็นเอที่มี base insertion ได้จริง ดังเห็นได้จากสัญญาณที่เปลี่ยนไปจากผลรวมของสัญญาณจากพีเอ็นเอและดีเอ็นเอที่เป็นสายเดี่ยว และไฮบริดทั้งสองมีโครงสร้างต่างกัน โดยในกรณีของ base insertion จะเห็นสัญญาณที่เป็น positive ที่บริเวณ 280 nm ซึ่งไม่พบในกรณีของดีเอ็นเอคู่สม งานในส่วนนี้กำลังอยู่ระหว่างเตรียมต้นฉบับบทความเพื่อตีพิมพ์

ตารางที่ 11 แสดงข้อมูลของ TTTTTTTTT (T9) ที่ติดฉลากด้วย styryl dye ที่สังเคราะห์ได้ และสมบัติการเรืองแสงเมื่อมีและไม่มีดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมอยู่ด้วย ที่ [PNA] =1 μM [DNA] = 1.2 μM ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 10 mM pH 7.0

PNA	dye	*m/z* found (calcd)	$\Phi_{(ssPNA)}$	DNA[a]	$\Phi_{(ds)}/\Phi_{(ss)}$	E/F_0	T_m (°C)
T9	**Bth-NMe2**	3599.8 (3597.9)	0.0183	**D9comp**	0.7	0.7 (598 nm)	72.8
				D9smT	2.1	2.4	44.8
				D10BL(T)	3.2	3.7	50.8
				D10BL(A)	0.7	0.8	76.6
				D10BL(C)	5.6	5.6	50.3
				D10BL(G)	3.8	3.6	44.8
				D8abasic	6.8	5.8	49.0
T9	**QL-NMe2**	3594.6 (3591.8)	0.0058	**D9comp**	1.4	1.1 (682 nm)	72.9
				D9smC	2.9	2.4	45.4
				D10BL(C)	3.8	4.6	57.2
				D8abasic	4.8	3.2	48.0

PNA	dye	*m/z* found (calcd)	$\Phi_{(ssPNA)}$	DNA[a]	$\frac{\Phi_{(ds)}}{\Phi_{(ss)}}$	$\frac{E}{F_0}$	T_m (°C)
T9	**Bth-NH2**	3571.0 (3570.0)	0.0267	**D9comp**	0.9	0.7 (571 nm)	73.4
				D9smC	6.2	5.2	46.1
				D10BL(C)	8.7	7.6	53.2
				D8abasic	8.6	6.5	49.8
T9	**Bth-OMe**	3587.1 (3584.8)	0.0065	**D9comp**	0.6	0.5 (514 nm)	70.7
				D9smC	1.0	0.9	44.5
				D10BL(C)	1.0	0.8	52.2
				D8abasic	0.9	0.9	49.9
T9	**Bth-NEt2-OAlk**	3656.5 (3655.9)	0.0401	**D9comp**	0.8	0.7 (586 nm)	72.6
				D9smC	1.1	1.0	42.5
				D10BL(C)	1.4	1.1	55.6
				D8abasic	1.1	0.9	47.7
T9	**QL-NEt2-OAlk**	3651.6 (3649.9)	0.0228	**D9comp**	0.7	0.6 (665 nm)	71.4
				D9smC	1.0	0.8	41.2
				D10BL(C)	0.8	0.7	45.1
				D8abasic	1.1	1.0	49.8

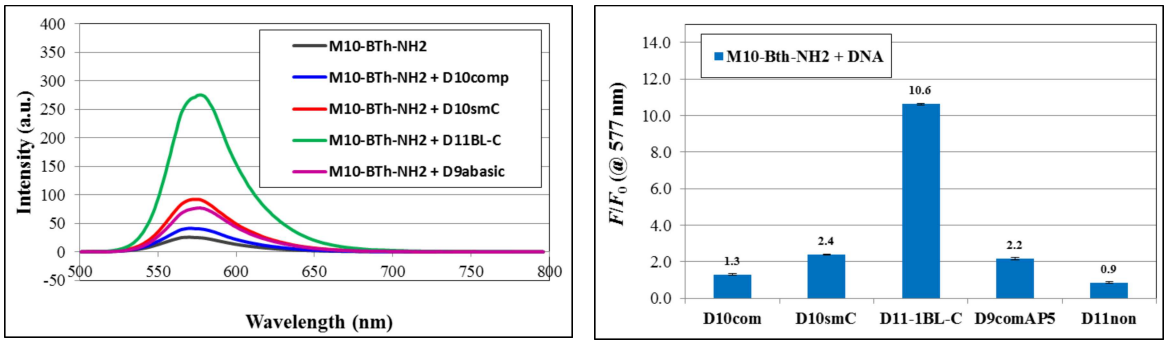
[a]DNA sequence (5'→3'); **D9comp** = dAAAAAAAAA, **D9smT** = dAAAATAAAA, **D9smC** = dAAAACAAAA, **D10BL(T):** dAAAATAAAAA, **D10BL(A):** dAAAAAAAAAA, **D10BL(C):** dAAAACAAAAA, **D10BL(G):** dAAAAGAAAAA, **D9abasic:** dAAAA_AAAA,

ตารางที่ 12 แสดงข้อมูลของ GTAGATCACT (M10) ที่ติดฉลากด้วย styryl dye ที่สังเคราะห์ได้ และสมบัติการเรืองแสงเมื่อมีและไม่มีดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมอยู่ด้วย ที่ [PNA] =1 μM [DNA] = 1.2 μM ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 10 mM pH 7.0

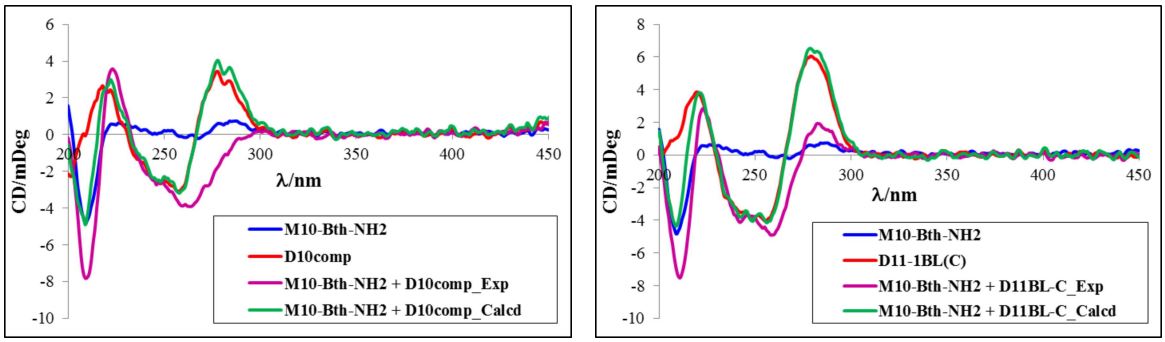
PNA	dye	*m/z* found (calcd)	$\Phi_{(ssPNA)}$	DNA[a]	$\frac{\Phi_{(ds)}}{\Phi_{(ss)}}$	$\frac{E}{F_0}$	T_m (°C)
M10	**Bth-NMe2**	3980.7 (3977.3)	0.0186	**D10comp**	3.2	2.5 (603 nm)	52.1
				D10smC	4.1	3.8	35.0
				D11BL(C)	11.9	10.4	32.7
				D11BL(A)	7.2	6.6	40.0
				D11BL(T)	9.4	8.2	41.6
				D11BL(G)	7.3	7.4	35.2
				D9abasic	3.6	5.1	36.4
				D11non	1.2	1.1	<20
M10	**QL-NMe2**	3594.6 (3591.8)	0.0072	**D10comp**	1.6	1.3 (692 nm)	58.6
				D10smC	2.3	1.8	34.3
				D11BL(C)	3.6	2.9	44.8
				D9abasic	2.2	2.6	32.6
M10	**Bth-NH2**	3571.0 (3570.0)	0.0261	**D10comp**	1.8	1.5 (577 nm)	59.3
				D10smC	4.2	3.7	37.9
				D11BL(C)	14.5	11.9	53.5
				D9abasic	3.6	3.1	40.4

PNA	dye	*m/z* found (calcd)	Φ(ssPNA)	DNA[a]	$\frac{\Phi(ds)}{\Phi(ss)}$	$\frac{E}{F_0}$	T_m (°C)
M10	Bth-OMe	3587.1 (3584.8)	0.0054	D10comp	1.2	0.9 (509 nm)	58.4
				D10smC	0.7	0.6	37.4
				D11BL(C)	1.1	0.8	51.0
				D9abasic	0.6	0.5	38.2
M10	Bth-NMeAlk	3980.7 (3977.3)	0.0650	D10comp	1.5	1.3 (588 nm)	57.4
				D10smC	2.4	2.1	39.8
				D11BL(C)	3.1	2.3	40.6
				D9abasic	3.3	2.3	38.4
				D11non	1.3	1.0	<20
M10	Bth-NEt2-OAlk	4034.7 (4035.4)	0.0486	D10comp	1.5	1.4 (592 nm)	59.2
				D10smC	2.9	2.4	34.9
				D11BL(C)	4.5	3.6	41.8
				D9abasic	3.3	2.6	39.7
				D11non	1.1	0.8	<20
M10	QL-NEt2-OAlk	4029.1 (4029.3)	0.0253	D10comp	1.6	1.4 (663 nm)	60.2
				D10smC	2.9	2.6	35.4
				D11BL(C)	2.0	2.0	49.1
				D9abasic	3.3	2.4	37.3
				D11non	0.9	0.9	<20

[a]DNA sequence (5'⟶3'); **D10comp** = dAGTGATCTAC, **D10smC** = dAGTG<u>C</u>TCTAC, **D11BL(C):** dAGTGA<u>C</u>TCTAC, **D11BL(A):** dAGTGA<u>A</u>TCTAC, **D11BL(T):** dAGTGA<u>T</u>TCTAC, **D11BL(G):** dAGTGA<u>G</u>TCTAC, **D9abasic:** dAGTG_TCTAC, **D11non** = dTCTGCATTTAG



รูปที่ 22 สัญญาณการเรืองของ **M10-BTh-NH2** ในสภาวะที่มี DNA ต่างๆ ที่ [PNA] =1 μM [DNA] = 1.2 μM (Left) และ [PNA] =0.1 μM [DNA] = 0.12 μM (Right) ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 10 mM pH 7.0 และ λ_{ex} = 487 nm

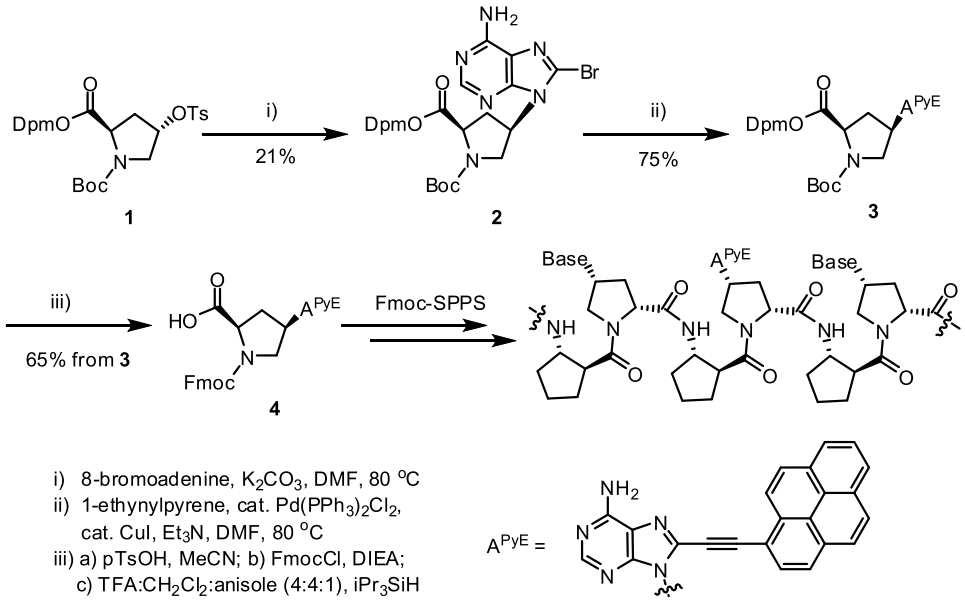


รูปที่ 23 CD spectra ของ **M10-BTh-NH2** ในสภาวะที่มี D10comp (Left) และ D11BL(C) (Right) ที่ [PNA] =2.5 μM [DNA] = 3.0 μM ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 10 mM pH 7.0

4. Pyrrolidinyl peptide nucleic acids with non-canonical nucleobases

4.1 Pyrrolidinyl peptide nucleic acids with 8-(pyren-1-yl)ethynyl adnine as a fluorescence nucleobase

งานวิจัยนี้เป็นการสังเคราะห์ acpcPNA ที่มีนิวคลีโอเบสที่ถูกดัดแปรด้วยฟลูออโรฟอร์และการศึกษาสมบัติเชิงแสงของมัน โดยในช่วงแรกได้ใช้วิธีสังเคราะห์พีเอ็นเอโมโนเมอร์ที่มีเบสที่ถูกดัดแปร แล้วค่อยนำมาสังเคราะห์พีเอ็นเอต่อไป โดย modified base ที่สนใจคือ pyrenylethynyl adenine (A^{PyE}) ที่ประกอบด้วยฟลูออโรฟอร์คือไพรีน ต่อคอนจูเกตกับวงแหวนอะดีนีนที่ตำแหน่ง C8 ผ่านพันธะแอลไคน์ ซึ่งเป็นการผนวกสมบัติการเรืองแสงกับการจดจำนิวคลีโอเบสเข้าไว้เป็นเหตุการณ์เดียวกัน ผลการศึกษาก่อนหน้านี้ในดีเอ็นเอและแอลเอ็นเอพบว่าเบส A^{PyE} ไม่สามารถแยกแยะความแตกต่างของเบสได้ดีนัก[18] ซึ่งคาดว่าเกิดจากการที่เบส A^{PyE} จัดตัวอยู่ใน *syn* คอนฟอร์เมชัน ทำให้ด้านที่เกิดพันธะไฮโดรเจนหันออกไปข้างนอก DNA helix ทำให้งานวิจัยส่วนใหญ่ใช้งาน A^{PyE} ในฐานะฉลากเรืองแสงโดยไม่ได้ใช้ประโยชน์จากสมบัติการเข้าคู่เบสของมันมากนัก งานวิจัยนี้มีสมมติฐานว่า A^{PyE} อาจแสดงพฤติกรรมที่เปลี่ยนไปเมื่ออยู่ในพีเอ็นเอซึ่งมีความสามารถในการจับยึดกับดีเอ็นเอได้ดีกว่าดีเอ็นเอจับกันเอง และอาจทำให้สามารถใช้ A^{PyE} เป็น base discriminating fluorescence nucleobase ได้ โดยเริ่มจากการสังเคราะห์โมโนเมอร์ A^{PyE} (**รูปที่ 24**) แล้วค่อยนำมาสังเคราะห์พีเอ็นเอต่อไปโดยวิธีการสังเคราะห์พีเอ็นเอบนวัฏภาคของแข็งตามปกติ



รูปที่ 24 แผนภาพแสดงการสังเคราะห์ A^{PyE} monomer ของ acpcPNA

โดยได้สังเคราะห์ acpcPNA ที่ผ่านการดัดแปรด้วย A^{PyE} monomer พร้อมทั้งผลการศึกษาสมบัติเชิงแสงเป็นดังแสดงใน**ตารางที่ 13**

ตารางที่ 13 ค่า T_m และสมบัติเชิงแสงของ A^{PyE}-modified acpcPNA probes และไฮบริดกับดีเอ็นเอ (condition: 1.0 μM PNA, 1.2 μM DNA, 10 mM phosphate buffer pH 7.0, λ_{ex} 376 nm).

Entry	PNA	DNA[a] (5′ to 3′)	T_m (°C)	F/F_0[b]	$\lambda_{abs}/\lambda_{em}$[c] (nm)	Φ_F[d]	Notes
1		-	-	-	416/455	0.1870	ss
2		CAG TAT ATG ACT	74.7	2.68	414/447	0.3742	ds, complementary
3	**M12T(A^{PyE})T**	CAG TA<u>A</u> ATG ACT	48.6	1.17	420/453	0.3126	ds, mismatched A
4	**AGT CAT A^{PyE}TA CTG**	CAG TA<u>G</u> ATG ACT	38.0	0.77	423/455	0.2206	ds, mismatched G
5		CAG TA<u>C</u> ATG ACT	40.0	1.02	425/455	0. 2668	ds, mismatched C
6		-	-	-	417/457	0.1628	ss
7		CAG TTT TTG ACT	59.0	2.71	413/448	0.2643	ds, complementary
8	**M12A(A^{PyE})A**	CAG TT<u>A</u> TTG ACT	47.3	1.25	423/454	0.2285	ds, mismatched A
9	**AGT CAA A^{PyE}AA CTG**	CAG TT<u>G</u> TTG ACT	45.7	1.10	423/454	0.2201	ds, mismatched G
10		CAG TT<u>C</u> TTG ACT	47.7	1.11	423/455	0.2345	ds, mismatched C
11		-	-	-	419/498	0.0503	ss
12		CAG TCT CTG ACT	60.6	2.78	419/457	0.0770	ds, complementary
13	**M12G(A^{PyE})G**	CAG TC<u>A</u> CTG ACT	38.8	1.27	423/482	0.0621	ds, mismatched A
14	**AGT CAG A^{PyE}TG CTG**	CAG TC<u>G</u> CTG ACT	55.3	0.99	423/496	0.0534	ds, mismatched G
15		CAG TC<u>C</u> CTG ACT	59.4	1.25	421/495	0.0606	ds, mismatched C
16		-	-	-	414/455	0.0780	ss
17		CAG TGT GTG ACT	64.2	1.52	412/451	0.1130	ds, complementary
18	**M12C(A^{PyE})C**	CAG TG<u>A</u> GTG ACT	59.0	0.35	425/455	0.0420	ds, mismatched A
19	**AGT CAC A^{PyE}CA CTG**	CAG TG<u>G</u> GTG ACT	55.2	0.28	421/456	0.0332	ds, mismatched G
20		CAG TG<u>C</u> GTG ACT	61.2	0.42	426/457	0.0589	ds, mismatched C

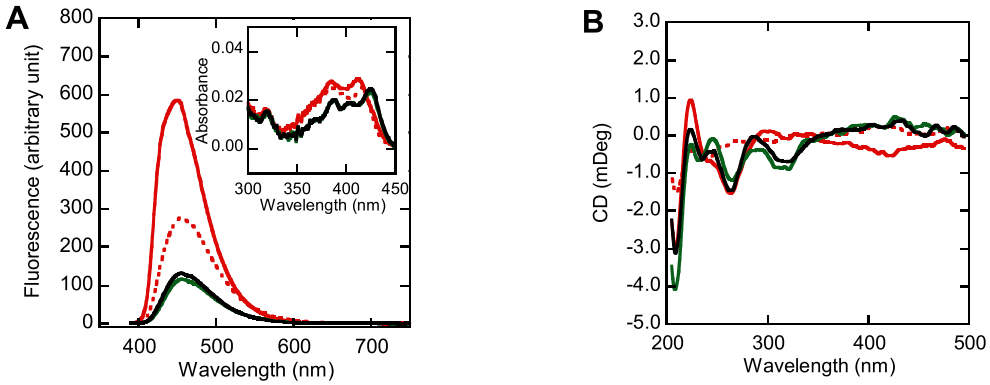
Entry	PNA	DNA[a] (5′ to 3′)	T_m (°C)	F/F_0[b]	$\lambda_{abs}/\lambda_{em}$[c] (nm)	Φ_F[d]	Notes
21		CAG TGT GAG ACT	58.2	1.01	412/450	0.0921	ds, indirect mismatch
22		CAG AGT GTG ACT	44.7	0.73	417/454	0.0674	ds, indirect mismatch
23		CAG TTT TTG ACT	33.1	0.62	417/456	0.0628	ds, double mismatched
24	M10A(A^{PyE})C GTA GAA^{PyE} CAC T	-	-	-	416/455	0.2265	ss
25		AGT GTT CTA C	54.4	2.27	412/449	0.3887	ds, complementary
26		AGT GAT CTA C	46.0	0.68	422/452	0.2106	ds, mismatched A
27		AGT GGT CTA C	42.8	0.57	421/455	0.1391	ds, mismatched G
28		AGT GCT CTA C	48.8	0.40	425/455	0.1452	ds, mismatched C
29		AGT GΦT CTA C	48.6	0.44	424/455	0.1674	ds, direct abasic site
30	M10G(A^{PyE})T GTA GA^{PyE}T CAC T	-	-	-	416/457	0.0936	ss
31		AGT GAT CTA C	49.6	5.18	415/449	0.3040	ds, complementary
32		AGT GAA CTA C	37.8	1.37	419/455	0.1608	ds, mismatched A
33		AGT GAG CTA C	36.2	1.33	419/454	0.1640	ds, mismatched G
34		AGT GAC CTA C	39.0	1.83	422/455	0.2022	ds, mismatched C

[a]Mismatched bases in the DNA sequence are indicated by underlining.

[b]**M12T(A^{PyE})T**, λ_{em} = 447 nm, **M12A(A^{PyE})A**, λ_{em} = 448 nm, **M12G(A^{PyE})G**, λ_{em} = 455 nm, **M12C(A^{PyE})C**, λ_{em} = 451 nm, **M10A(A^{PyE})C**, λ_{em} = 449 nm, **M10G(A^{PyE})T**, λ_{em} = 449 nm, **A^{PyE}M12**, λ_{em} = 476 nm

[c]Only the longest wavelength was shown for λ_{abs}. For complete list of absorption peaks, see **Table S1**.

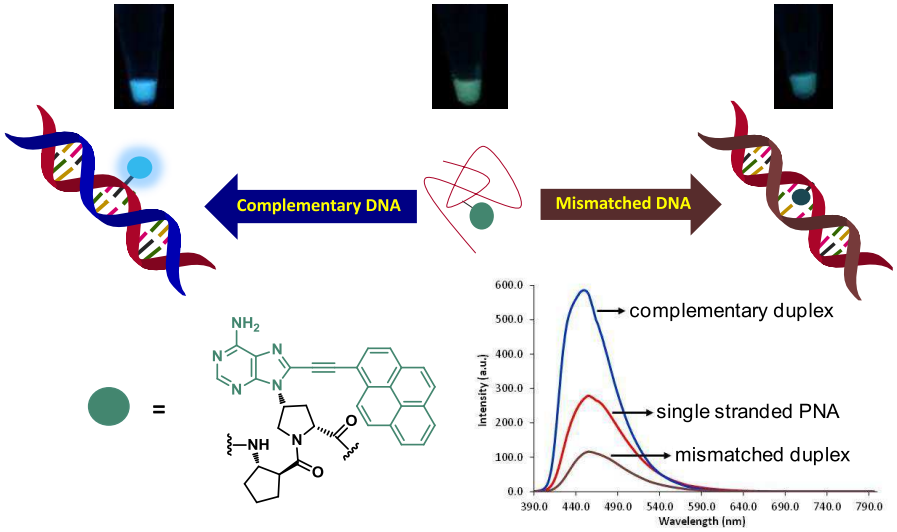
[d]Quantum yields were measured by using quinine sulfate as a standard (Φ_F = 0.546).[19]



รูปที่ 25 Fluorescence และ UV absorption spectra ของ **M10A(A^{PyE})C** (เส้นประสีแดง) และไฮบริดกับดีเอ็นเอต่างๆ: สีแดง = dAGTGTTCTAC (comp.); สีเขียว = dAGTGCTCTAC (mismatched); สีดำ = AGTGΦTCTAC (abasic); ภาวะ: [PNA] = 1.0 μM และ [DNA] = 1.2 μM ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 10 mM pH 7.0, λ_{ex} = 376 nm.

จากข้อมูลใน**ตารางที่ 13** จะเห็นได้ว่า A^{PyE} เบสที่อยู่ในพีเอ็นเอสายเดี่ยวจะมีประสิทธิภาพในการเรืองแสงค่อนข้างสูง และขึ้นกับเบสข้างเคียง โดยเบสข้างเคียงที่เป็น G และ C จะทำให้ประสิทธิภาพของการเรืองแสงลดลง และเมื่อเกิดการ

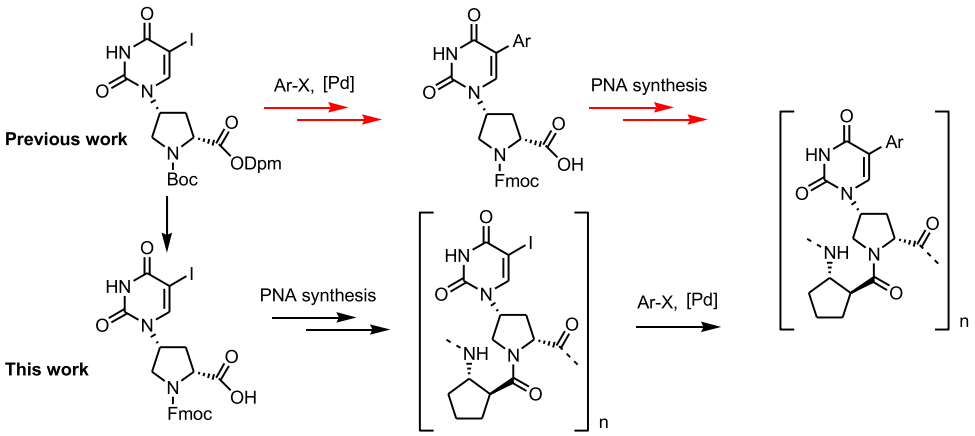
เข้าคู่กับดีเอ็นเอที่เป็นคู่สม การเรืองแสงจะเพิ่มขึ้นในทุกกรณี แม้ว่าจะไม่มากนัก แสดงว่าการเข้าคู่ระหว่าง A^{PyE} บน PNA กับ dT บน DNA ทำให้เกิดการเรืองแสงเพิ่มขึ้น จากนั้นจึงได้ศึกษาต่อกับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสผิดไป 1 ตำแหน่งตรงบริเวณที่ตรงกับเบส A^{PyE} ซึ่งพบว่าการเรืองแสงจะต่ำกว่าในกรณีที่เป็นคู่สม นอกจากนี้ยังพบการเลื่อนของ λ_{max} ใน absorption และ fluorescence spectra ไปทางช่วงคลื่นที่ยาวขึ้น (red shift) ดังแสดงใน**รูปที่ 25** ซึ่งอธิบายได้ว่าเกิดจากการที่เมื่อเบสไม่เข้าคู่กัน เบส A^{PyE} จะหันเอาส่วนของไพรีนที่ไม่ชอบน้ำเข้าไปใน PNA-DNA duplex ทำให้เกิด π-π stacking ขึ้น จึงส่งผลให้สัญญาณการเรืองแสงลดลงและเกิด red shift ดังกล่าว ซึ่งปรากฏการณ์นี้สามารถยืนยันได้โดย CD spectra ดัง**รูปที่ 25B** โดยพบว่าเมื่อในสายของดีเอ็นเอเป็นตำแหน่ง abasic คือไม่มีเบสอยู่ตรงข้ามก็จะได้ผลเช่นเดียวกันกับกรณีที่เป็น mismatch base ดังนั้น A^{PyE} ใน modified acpcPNA จึงสามารถบอกความแตกต่างระหว่าง complementary กับ single mismatched DNA ได้อย่างชัดเจนซึ่งเป็นสมบัติที่แตกต่างจากดีเอ็นเอ และสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นโพรบในการตรวจวัดดีเอ็นเอ ซึ่งนอกจากจะมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มของการเรืองแสงแล้วยังเห็นการเปลี่ยนแปลงสีจากเขียวเป็นฟ้าได้อีกด้วย ดังแสดงใน**รูปที่ 26** งานในส่วนนี้ค่อนข้างเสร็จสมบูรณ์แล้ว กำลังอยู่ระหว่างเตรียมบทความเพื่อตีพิมพ์



รูปที่ 26 สรุปการทำงานของ APyE-modified acpcPNA probe

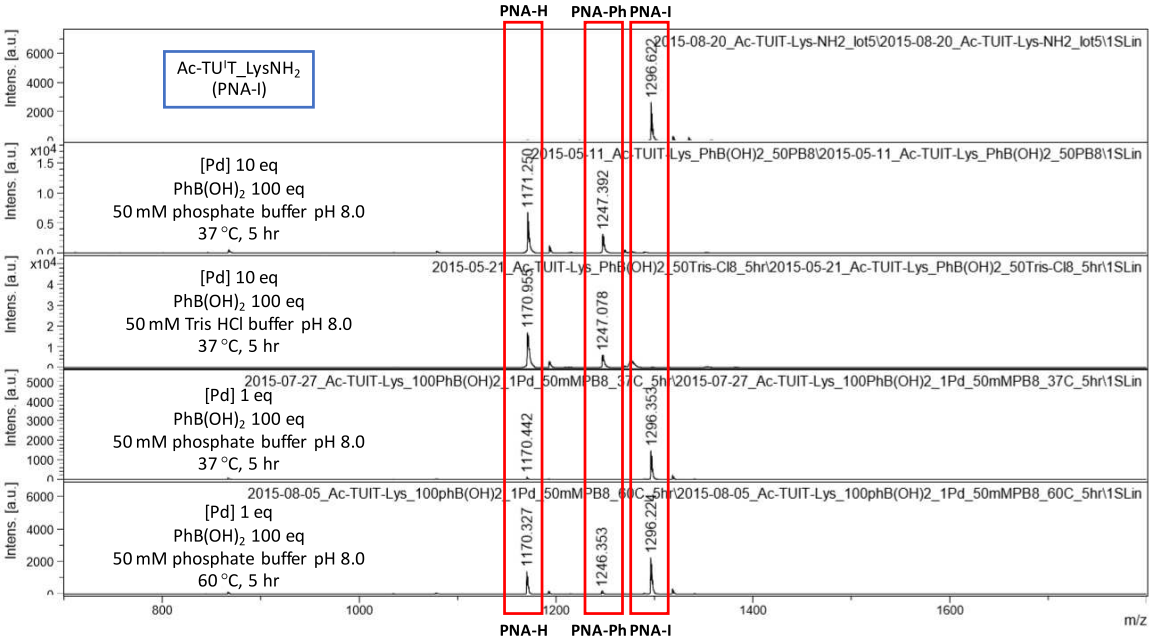
4.2 Pyrrolidinyl peptide nucleic acids with fluorescence 5-modified uracil *via* post-synthetic modification

งานวิจัยนี้มีเป้าหมายเพื่อสังเคราะห์ acpcPNA ที่มีนิวคลีโอเบสที่ถูกดัดแปรด้วยฟลูออโรฟอร์ โดยงานวิจัยก่อนหน้านี้[20] เสนอแนะว่าพีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วยฟลูออโรฟอร์เช่นไพรีนบนนิวคลีโอเบสสามารถเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงที่ตอบสนองต่อการเกิดไฮบริดกับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สมกันได้ อย่างไรก็ตามการสังเคราะห์พีเอ็นเอดังกล่าวยังมีขั้นตอนที่ค่อนข้างยุ่งยากซับซ้อน กล่าวคือต้องเริ่มต้นจากการติดฉลากที่พีเอ็นเอโมโนเมอร์ก่อน จากนั้นจึงนำโมโนเมอร์ที่ได้ไปสังเคราะห์พีเอ็นเอต่อไป วิธีนี้ทำให้การเปลี่ยนชนิดของฉลากทำได้ยากเนื่องจากต้องเริ่มสังเคราะห์พีเอ็นเอใหม่ ส่วนแนวคิดใหม่ (**รูปที่ 27**) คือการสังเคราะห์พีเอ็นเอที่มีนิวคลีโอเบสที่มีหมู่เฮโลเจนเช่น 5-iodouracil อยู่ที่ตำแหน่งที่ต้องการจะติดฉลากก่อน จากนั้นจึงใช้ปฏิกิริยา palladium catalyzed cross coupling ในการติดฉลากแบบ post synthetic modification ซึ่งวิธีการนี้จะทำให้สามารถสังเคราะห์พีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเหมือนกัน มีการติดฉลากที่ตำแหน่งเดียวกัน แต่เปลี่ยนชนิดของฉลากเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของฉลากหลายๆ ชนิดได้อย่างรวดเร็วโดยไม่ต้องเริ่มต้นสังเคราะห์ตัวโมโนเมอร์และพีเอ็นเอใหม่ ถ้าประสิทธิภาพของปฏิกิริยาที่ใช้ในการติดฉลากดีพอ ซึ่งแนวคิดนี้ได้รับการพิสูจน์มาเมื่อไม่นานมานี้ในเรื่องของดีเอ็นเอ[21]

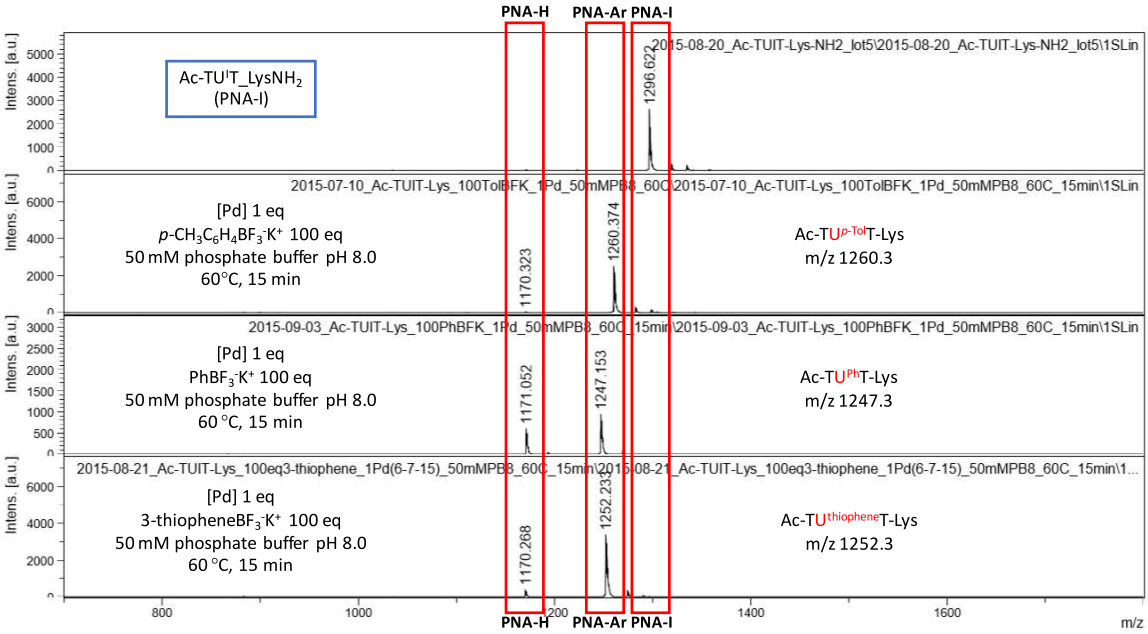


รูปที่ 27 เปรียบเทียบวิธีการสังเคราะห์พีเอ็นเอที่มีนิวคลีโอเบสที่ถูกดัดแปรด้วยฟลูออโรฟอร์

ในช่วงเริ่มต้นเป็นการพิสูจน์หลักการ โดยเริ่มจากการสังเคราะห์พีเอ็นเอที่มีลำดับเบสง่ายๆ คือ Ac-TU^{I}T-LysNH$_2$ (PNA-I; *m/z* = 1297.3) และนำไปทำปฏิกิริยา Suzuki cross coupling กับฟีนิลบอโรนิกแอซิด [PhB(OH)$_2$] โดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเป็น Pd(OAc)$_2$ ร่วมกับลิแกนด์ 2-amino-4,6-dihydroxypyrimidine (ADHP) ซึ่งมีรายงานว่าเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่มีประสิทธิภาพในการทำปฏิกิริยาที่คล้ายคลึงกันในดีเอ็นเอในตัวทำละลายที่เป็นน้ำ[21] อย่างไรก็ตาม ระบบตัวเร่งปฏิกิริยาดังกล่าวไม่ค่อยมีประสิทธิภาพมากนักเมื่อนำมาใช้กับพีเอ็นเอ กล่าวคือจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS พบว่าสารตั้งต้นทำปฏิกิริยาไปหมด แต่ได้ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการกำจัดไอโอดีนคือ Ac-TUT-LysNH$_2$ (PNA-H; *m/z* = 1170.3) เป็นส่วนใหญ่ มีผลิตภัณฑ์ที่ต้องการคือ Ac-TU^{Ph}T-LysNH$_2$ (PNA-Ph; *m/z* = 1247.3) เกิดขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น โดยการเพิ่มปริมาณตัวเร่งปฏิกิริยา สับสเตรต อุณหภูมิ และการเปลี่ยนชนิดและพีเอชของตัวทำละลายไม่สามารถลดการเกิด PNA-H ให้อยู่ในระดับที่น่าพอใจได้ (**รูปที่ 28**) แต่อย่างน้อยการทดลองนี้ได้แสดงให้เห็นว่าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นค่อนข้างจะสะอาดเนื่องจากไม่พบผลิตภัณฑ์ข้างเคียงอื่น และการที่เกิด PNA-H ขึ้นได้ก็แสดงว่ามีการเกิด oxidative insertion ของแพลเลเดียมเกิดเป็น palladated PNA intermediate จริง เพียงแต่ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาต่อไปเป็น cross coupling product ที่ต้องการได้

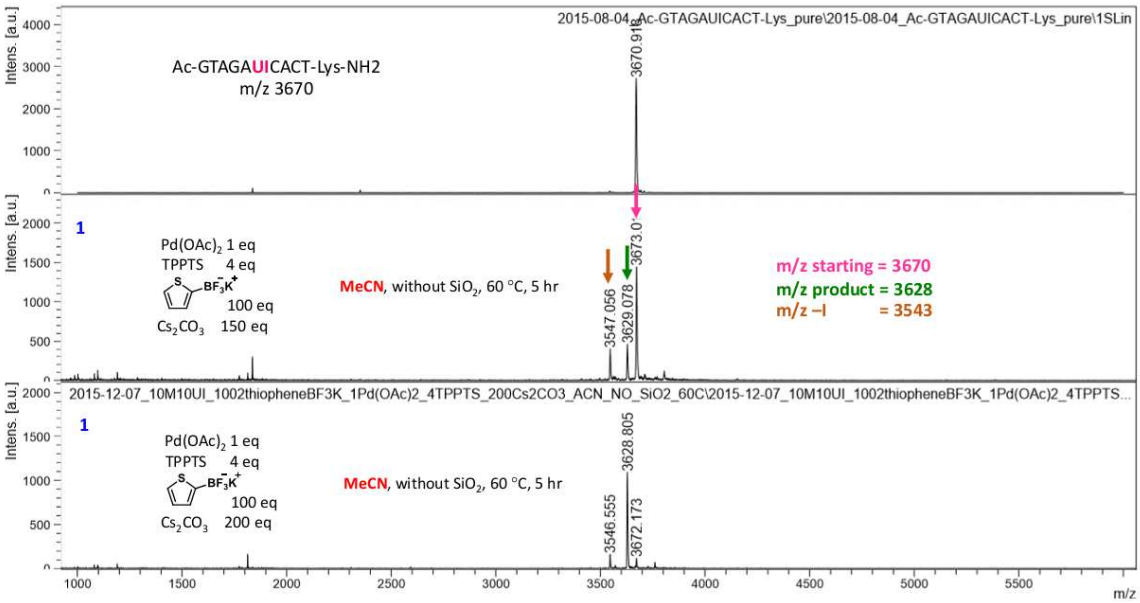


รูปที่ 28 การใช้ MALDI-TOF MS spectra เพื่อติดตามปฏิกิริยา Suzuki cross coupling ระหว่าง acpcPNA Ac-TU^{I}T-Lys กับ PhB(OH)$_2$ บน solid support ที่ภาวะต่างๆ



รูปที่ 29 การใช้ MALDI-TOF MS spectra เพื่อติดตามปฏิกิริยา Suzuki cross coupling ระหว่าง PNA Ac-TU^{I}T-Lys กับ $ArBF_3K$ บน solid support

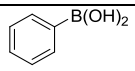
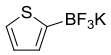
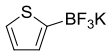
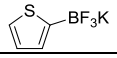
ในขั้นตอนต่อมาจึงมีแนวคิดที่จะเพิ่มความว่องไวของตัวนิวคลีโอไฟล์โดยการเปลี่ยนเป็นเอริลไตรฟลูออโรบอเรต [$ArBF_3K$] ซึ่งมีรายงานว่าเป็นนิวคลีโอไฟล์ที่มีประสิทธิภาพมากกว่าเอริลบอโรนิกแอซิดแทน[6] อย่างไรก็ตาม แม้ electron rich เอริลไตรฟลูออโรบอเรตเช่น p-$CH_3C_6H_4BF_3K$ และ 3-thiophene BF_3K จะให้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการคือ PNA-Ar เป็นหลัก แต่เมื่อใช้ $PhBF_3K$ ก็ยังให้ผลที่ไม่ดีกว่า $PhB(OH)_2$ มากนัก กล่าวคือยังพบการเกิด PNA-H อยู่ค่อนข้างมาก (**รูปที่ 29**) แสดงว่าการเปลี่ยนนิวคลีโอไฟล์ยังไม่ใช่ปัจจัยสำคัญเพียงประการเดียวที่ทำให้การทำ cross coupling ประสบความสำเร็จ นอกจากนี้เมื่อใช้พีเอ็นเอที่มีลำดับเบสยาวขึ้นหรือเมื่อใช้พีเอ็นเอที่มีลำดับเบสผสมประสิทธิภาพจะยิ่งต่ำลงไปอีก จึงได้ทดลองเปลี่ยนตัวเร่งปฏิกิริยาเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของแพลเลเดียมชนิดอื่น โดยพบว่าการใช้ $Pd(OAc)_2$ (1 equiv) ร่วมกับ TPPTS (4 equiv) เป็นลิแกนด์ และ aryl trifluoroborate (100 equiv) เป็นนิวคลีโอไฟล์ โดยมี Cs_2CO_3 (200 equiv) และมี acetonitrile เป็นตัวทำละลาย ทำให้สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ค่อนข้างสมบูรณ์ โดยมี deiodination product เกิดขึ้นค่อนข้างน้อย (**รูปที่ 30**)

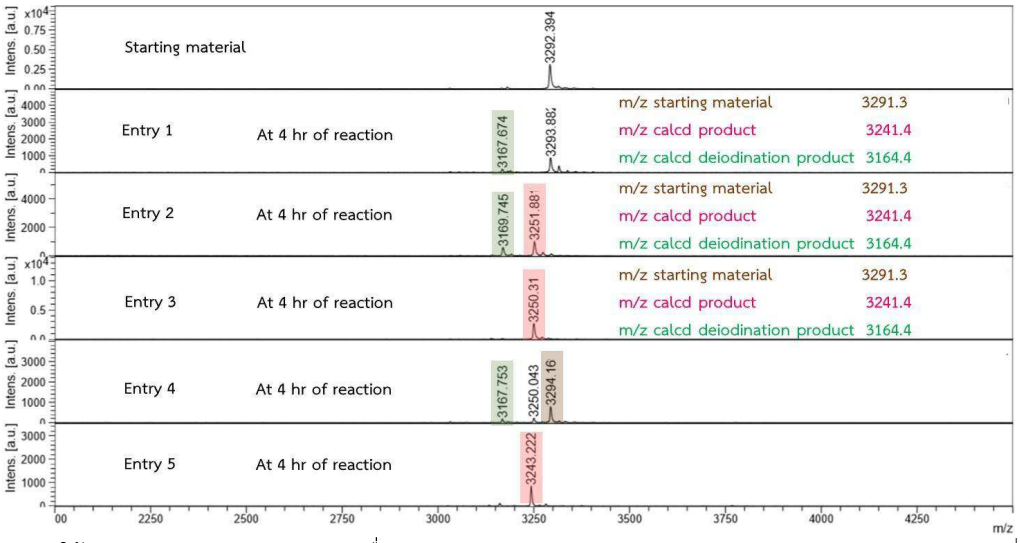


รูปที่ 30 การใช้ MALDI-TOF MS spectra เพื่อติดตามปฏิกิริยา Suzuki cross coupling ระหว่าง mix base acpcPNA Ac-GTAGAU^{I}CACT-Lys กับ $ArBF_3K$

จากนั้นจึงได้ทำการสังเคราะห์พีเอ็นเอในระดับสเกลที่มากขึ้นสำหรับนำไปศึกษาสมบัติเชิงแสงและความเสถียรของพีเอ็นเอเมื่อเกิดการจับยึดกับดีเอ็นเอ จากการทดลองพบความเข้มข้นที่เหมาะสมในการสังเคราะห์คือ 500 □M ร่วมกับการใช้ aryl trifluoroborate (100 equiv) เป็นนิวคลีโอไฟล์ ร่วมกับการใช้ 2 equiv. $Pd(OAc)_2$ และ 4 equiv. TPPTS โดยมี Cs_2CO_3 (3 equiv) ใน H_2O:acetonitrile (2:1) เป็นตัวทำละลายร่วมกับการใส่ซิลิกาเจลที่อุณหภูมิ 60 °C ซึ่งปฏิกิริยายังคงเกิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยพบ PNA-H น้อย โดย**ตารางที่ 14** และ**รูปที่ 31** แสดงการหาสภาวะการสังเคราะห์ปฏิกิริยา Suzuki cross coupling ที่เหมาะสม

ตารางที่ 14 สภาวะของการทำปฏิกิริยา Suzuki cross coupling บน U^{I} PNA บนวัฏภาคของแข็ง

Entry	scale (nmol)	Ar	$Pd(OAc)_2$ (eq)	TPPTS (eq)	Condition
1	0.1		10	40	50 mM phosphate buffer pH 8.0, 60 °C
2	0.1		1	4	50 mM phosphate buffer pH 8.0, 60 °C
3	0.1		1	4	3 eq. Cs_2CO_3, H_2O:MeCN (1:2), SiO_2, 60 °C
4	0.1		1	4	3 eq. Cs_2CO_3, H_2O:MeCN (1:2), without SiO_2, 60 °C
5	250		1	4	3 eq. Cs_2CO_3, H_2O:MeCN (2:1), SiO_2, 60 °C

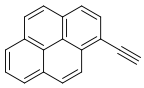
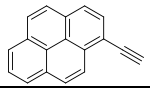


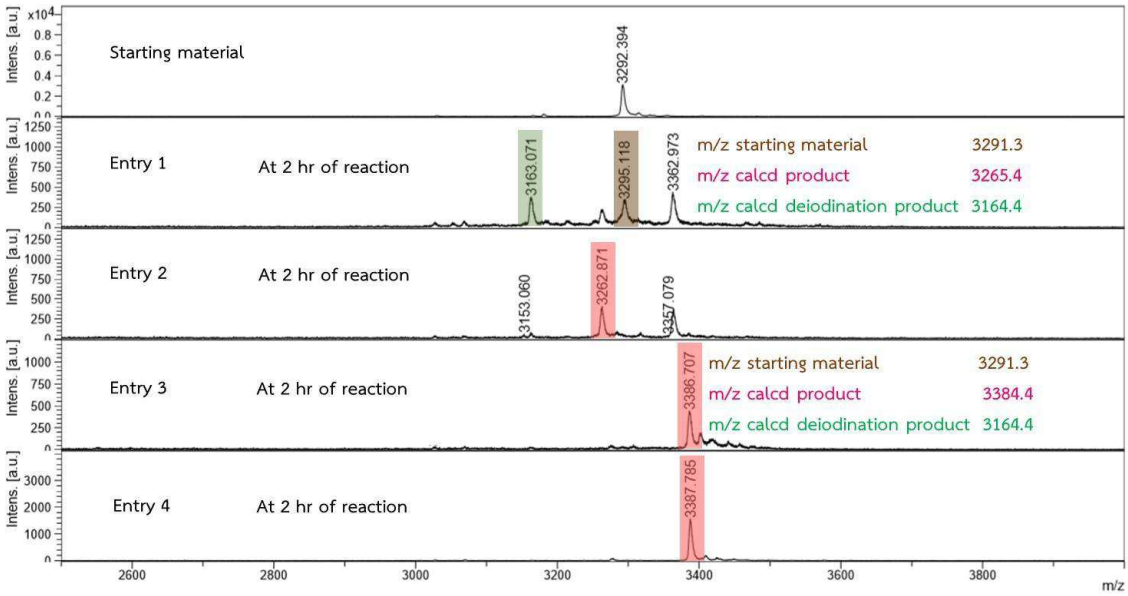
รูปที่ 31 การใช้ MALDI-TOF MS spectra เพื่อติดตามปฏิกิริยา Suzuki cross coupling ระหว่าง PNA Ac-T4U^{I}T4-Lys กับ $ArBF_3K$

เมื่อได้สภาวะการทดลองที่เหมาะสมคือตาม Entry ที่ 5 ใน**รูปที่ 31** จึงได้สังเคราะห์พีเอ็นที่มีติดฉลากด้วยหมู่แทนที่ของอนุพันธ์ของไทโอฟีนและฟิวแรนแล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค reversed-phase HPLC

นอกจากนี้ยังทำการศึกษาการติดฉลากพีเอ็นเอด้วยหมู่แทนที่ที่เป็นอะโรมาติกแอลคายน์ด้วยปฏิกิริยา Sonogashira cross coupling โดยทำการทดลองหาสภาวะการสังเคราะห์ที่เหมาะสมแสดงดัง**ตารางที่ 15** และใช้ MALDI-TOF MS ในการติดตามปฏิกิริยาดัง**รูปที่ 32** ในกรณีนี้จะทำปฏิกิริยาในภาวะสารละลายเนื่องจาก 5-arylalkynyluracil สามารถเกิด cyclization เป็น furanopyrimidine ได้ในภาวะกรดที่จำเป็นสำหรับการปลดพีเอ็นเอออกจากวัฏภาคของแข็ง

ตารางที่ 15 สภาวะในการสังเคราะห์ปฏิกิริยา Sonogashira cross coupling ระหว่าง PNA Ac-T4U┗T4-Lys กับอะโรมาติกแอลคายน์ในสารละลาย

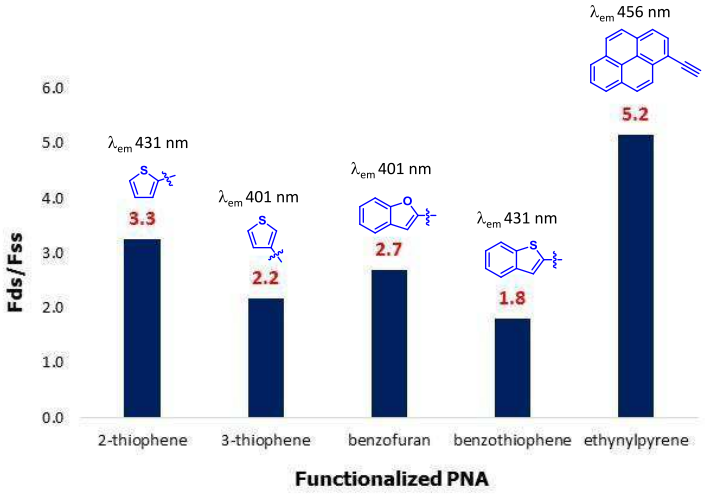
Entry	scale (nmol)	Ar	Condition
1	10	100 eq. 	2.5 eq. $Pd(PPh_3)_2Cl_2$, 3 eq. CuI, 16.3 eq. TEA, DMF, 80 °C
2	10	500 eq. 	2.5 eq. $Pd(PPh_3)_2Cl_2$, 3 eq. CuI, 16.3 eq. TEA, DMF, 80 °C
3	10	500 eq. 	2.5 eq. $Pd(PPh_3)_2Cl_2$, 3 eq. CuI, 16.3 eq. TEA, DMF, 80 °C
4	250	500 eq. 	2.5 eq. $Pd(PPh_3)_2Cl_2$, 3 eq. CuI, 16.3 eq. TEA, DMF, 80 °C



รูปที่ 32 การใช้ MALDI-TOF MS spectra เพื่อติดตามปฏิกิริยา Sonogashira cross coupling ระหว่าง PNA Ac-T4U┗T4-Lys กับ aromatic alkyne ในสภาวะสารละลาย

โดยสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์พีเอ็นเอเพื่อติดฉลากอะโรมาติกแอลคายน์คือสภาวะการทดลองที่ 4 จากนั้นจึงนำพีเอ็นเอ T9 ที่ติดฉลากด้วย 1-ethynylpyrene โดยวิธี post-synthetic modification ไปศึกษาสมบัติการจับยึดกับดีเอ็นเอคู่สมพบว่าให้ค่าอุณหภูมิการหลอมเหลวที่ค่อนข้างสูง (T_m 65.0 °C) เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสผิดไปหนึ่งตำแหน่ง (mismatched A: 35.1 °C; mismatched G: <20.0 °C; mismatched C: 40.5 °C) แสดงว่าพีเอ็นเอโพรบดังกล่าวสามารถแยกแยะลำดับเบสของดีเอ็นเอได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ การเรืองแสงที่ 456 nm ของพีเอ็นเอเมื่อเข้าคู่กับดีเอ็นเอคู่สมจะสูงกว่าพีเอ็นเอสายเดี่ยวถึง 5.2 เท่า ซึ่งเป็นการตอบสนองสูงกว่าพีเอ็นเอตัวอื่นที่ได้จากปฏิกิริยา Suzuki ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงแสดงให้เห็นว่าสามารถใช้วิธี palladium-catalyzed cross coupling ในการทำ post-synthetic modification ของพีเอ็นเอได้ และพีเอ็นที่มีการติดฉลากด้วยหมู่ ethynylpyrene ที่ตำแหน่ง 5 ของยูริดีนให้การตอบสนองเชิงแสงต่อการเกิดไฮบริดกับดีเอ็นเอได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับพีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วยหมู่ไทโอฟีน เบนโซฟิวแรน และเบนโซไทโอ

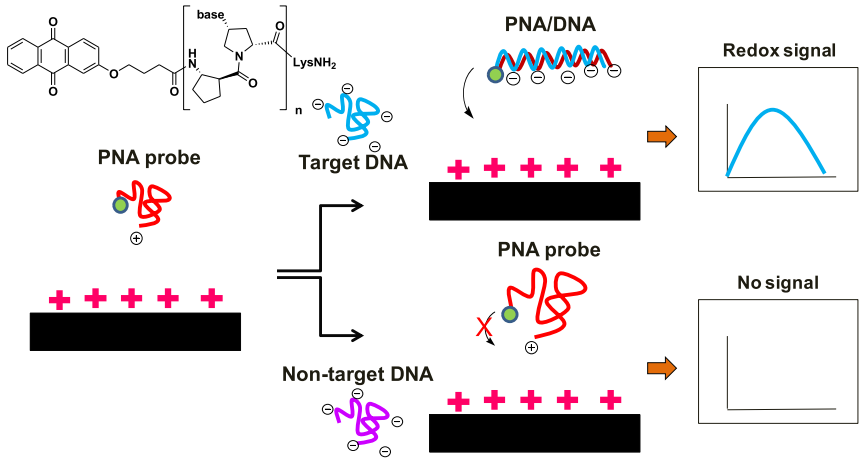
ฟีน (**รูปที่ 33**) งานที่จะทำต่อไปคือการศึกษา specificity และการศึกษากับ mix sequence PNA เพื่อให้ได้ข้อมูลสมบูรณ์พอที่จะนำไปตีพิมพ์ต่อไป



รูปที่ 33 อัตราส่วนของ Fluorescence (ที่ λ_{em}) ของ T9 PNA ที่ผ่านการดัดแปรด้วยหมู่ต่างๆ ที่ตำแหน่ง 5 ของยูริดีนที่อยู่กลางสาย ในสภาพที่เข้าคู่กับดีเอ็นเอคู่สม (dA9) ต่อพีเอ็นเอสายเดี่ยว (condition: 1.0 μM PNA, 1.2 μM DNA, 10 mM phosphate buffer pH 7.0, λ_{ex} 376 nm).

5. Electrochemically active pyrrolidinyl peptide nucleic acids

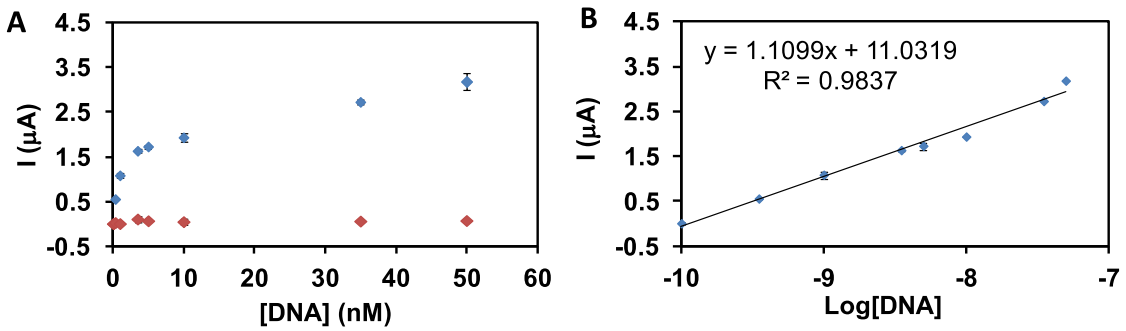
งานวิจัยในส่วนนี้เกี่ยวข้องกับการพัฒนา apcpPNA ที่ติดฉลากด้วย anthraquinone เพื่อเป็น redox-active probe สำหรับการนำไปประยุกต์ใช้กับการตรวจวัดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า ตัวอย่างเช่น การตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้าร่วมกับขั้วไฟฟ้าชนิด screen printed carbon electrode (SPCE) ที่ดัดแปรด้วยพอลิเมอร์ที่มีประจุบวก และการนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจดีเอ็นเอของไวรัสโรคกุ้ง (WSSV) ที่ผ่านการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค LAMP (เป็นงานวิจัยที่ทำร่วมกับ ศ.ดร.อรวรรณ ชัยลภากุล ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ ผศ.ดร.ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) งานวิจัยเริ่มจากการสังเคราะห์พีเอ็นเอที่ติดฉลากที่สามารถให้สัญญาณรีดอกซ์ได้ คือ 4-(anthraquinone-2-yl)oxybutyryl ทางปลายด้าน N ของ acpcPNA ที่มีลำดับเบสเป็น 2AQ-CTAAATTCAGA-LysNH_2 (AQ-WSSV) และได้พัฒนาวิธีการตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยอาศัยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้าแบบที่ไม่ต้องมีการตรึงโพรบลงบนขั้วไฟฟ้า[22] โดยมีหลักการดังแสดงใน**รูปที่ 34**



รูปที่ 34 หลักการของ immobilization-free electrochemical DNA biosensor ที่อาศัย anthraquinone-labeled acpcPNA เป็นโพรบ

ขั้วไฟฟ้าที่ใช้เป็นขั้วชนิด screen printed carbon electrode (SPCE) ที่ผ่านการดัดแปรด้วยพอลิเมอร์ที่มีประจุบวกคือ poly-quaternized-(dimethylaminoethyl)methacrylate (PQDMAEMA) เมื่อนำไปตรวจวัด AQ-WSSV โดยเทคนิค square wave voltammetry (SWV) ในภาวะที่ไม่มีดีเอ็นเอจะไม่เห็นสัญญาณเนื่องจากพีเอ็นเอมีประจุบวกเนื่องจากหมู่ไลซีนที่เติมเข้าไปช่วยการละลายจะเกิดการผลักทางไฟฟ้าสถิตกับขั้ว แต่เมื่อมีดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สม (5'-TCTGAATTTAG -3') อยู่ด้วย จะทำให้เกิดพีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอไฮบริดที่มีประจุสุทธิเป็นลบ ซึ่งจะเกิดแรงดึงดูดกับขั้วไฟฟ้า ทำให้ AQ-PNA เข้ามาอยู่ในระยะที่ทำให้เกิดการถ่ายโอนอิเล็กตรอนกับขั้วไฟฟ้าเกิดเป็นสัญญาณทางเคมีไฟฟ้าขึ้น

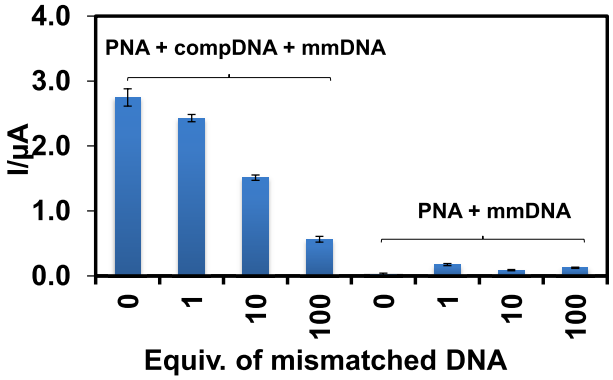
ในงานวิจัยได้มีการปรับปรุงภาวะของการตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอ โดยเริ่มจากชนิดและปริมาณของพอลิเมอร์ และตัวแปรต่างๆ ในการทำ SWV เมื่อได้ภาวะที่ดีที่สุดแล้วจึงนำมาทำคาลิเบรชันกราฟเทียบกับดีเอ็นเอที่ความเข้มข้นต่างๆ (ให้ความเข้มข้นของพีเอ็นเอโพรบคงที่ที่ 50 nM) ได้กราฟดังแสดงใน**รูปที่ 35** โดยมีช่วงที่เป็นเส้นตรงที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอระหว่าง 0.35-50 nM โดยมีค่า LOD ($3SD_{blank}$/Slope) เป็น 0.1. nM (S/N = 10) ตัวเลขนี้แม้จะไม่ต่ำมากนัก แต่ก็อยู่ในช่วงใกล้เคียงกับเทคนิคการตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอเชิงไฟฟ้าที่ไม่ได้อาศัยการขยายสัญญาณอื่นๆ และเนื่องจากขั้วที่ใช้มีขนาดเล็ก เทคนิคนี้จึงใช้ตัวอย่างปริมาณน้อยมาก เทียบเท่ากับ <10 fmol หรือ <1 ng สำหรับ ssDNA ที่มีความยาว 300 เบส ซึ่งน่าจะว่องไวพอที่จะนำไปใช้ตรวจวัดดีเอ็นเอที่ผ่านการเพิ่มปริมาณมาแล้ว และที่สำคัญคือเทคนิคนี้แสดงการเลือกจำเพาะที่สูงมาก ดังจะเห็นได้จากการที่ single mismatched DNA (5'-TCTGACTTTAG -3') ไม่ให้สัญญาณ SWV เลยที่ทุกช่วงความเข้มข้นที่ศึกษา (**รูปที่ 36**) อย่างไรก็ตาม ที่ความเข้มข้นของ non-target DNA สูงๆ จะทำให้สัญญาณจากขั้วไฟฟ้าลดลง คาดว่าเนื่องจากการแข่งขันกับ target DNA-PNA hybrid ในการยึดเกาะกับขั้วไฟฟ้า แต่แม้ที่ความเข้มข้นของ non-target DNA สูงถึง 100 เท่าของดีเอ็นเอเป้าหมายก็ยังเห็นสัญญาณของพีเอ็นเอโพรบได้อย่างชัดเจน



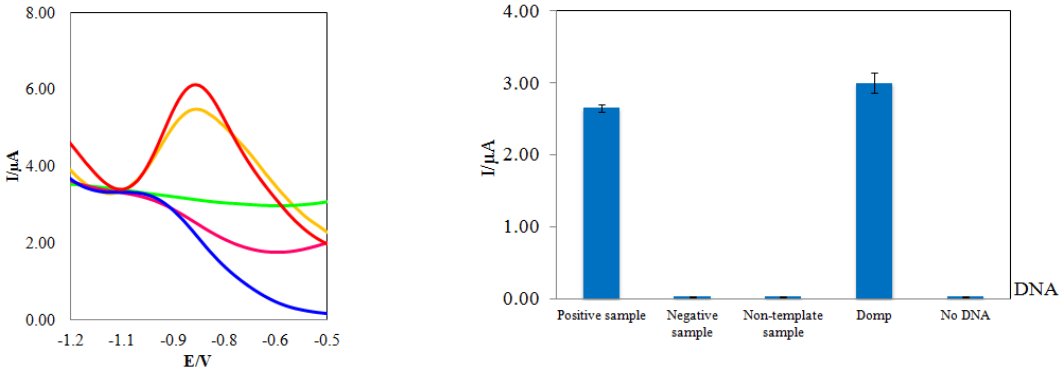
รูปที่ 35 การหาช่วงของการวัดที่ให้สัญญาณเป็นเส้นตรงของพีเอ็นเอโพรบ AQ-WSSV (50 nM) หลังเติม complementary DNA (สีน้ำเงิน) และ non-complementary DNA (สีแดง) ที่ 0.1, 0.35, 1, 3.5, 10, 35 และ 100 nM (ปริมาตรรวม 20 μL ใน 10 mM Tris-HCl buffer pH 8.0) บนขั้วไฟฟ้า PQDMAEMA-modified SPCE (มีพอลิเมอร์ 0.26 % ในหมึกคาร์บอนที่ใช้ในการสกรีนขั้วไฟฟ้า) ภายใต้ภาวะที่ดีที่สุด (frequency 40 Hz, step potential 0.075 V, amplitude 0.100 V) กราฟ A แสดงความเข้มข้นของดีเอ็นเอในสเกลปกติ กราฟ B แสดงในสเกล logarithmic

จากนั้นจึงได้นำเทคนิคดังกล่าวไปประยุกต์ใช้กับการตรวจหาดีเอ็นเอที่มาจากไวรัส WSSV ที่พบในกุ้ง โดยมีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอก่อนด้วยเทคนิค Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)[23] แล้วนำดีเอ็นเอที่ได้มา denature โดยการให้ความร้อน ก่อนผสมกับพีเอ็นเอโพรบแล้วหยดลงไปบนอิเล็กโทรด ก่อนจะนำไปตรวจวัดโดยเทคนิค SWV ซึ่งพบว่าสามารถตรวจวัด WSSV DNA ได้อย่างจำเพาะเจาะจง (**รูปที่ 37**) โดยสามารถตรวจวัด DNA เริ่มต้นได้ต่ำถึง 10 copies ซึ่งดีกว่าขีดจำกัดของการตรวจวัดโดยเทคนิคอื่นที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้ งานวิจัยในส่วนนี้ได้รับการตีพิมพ์เรียบร้อยแล้ว[24]

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่เกี่ยวเนื่องกันซึ่งได้อาศัย redox-active acpcPNA probe ที่ติดฉลากด้วยแอนทราควิโนนที่พัฒนาขึ้นนี้ร่วมกับเทคนิคทางเคมีไฟฟ้าของ ศ.ดร.อรวรรณ ชัยลภากุล เมธีวิจัยอาวุโส เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดดีเอ็นเอของ HPV type 16 ที่เป็น marker ที่สำคัญของโรคมะเร็งปากมดลูก[25]



รูปที่ 36 อิทธิพลของ non-targetDNA ที่มีต่อสัญญาณของพีเอ็นเอโพรบ (50 nM) ที่ความเข้มข้นของ complementary DNA target (dTCTGAATTTAG) = 50 หรือ 0 nM และของ single mismatched DNA (d TCTGACTTTAG) = 0, 50, 500 and 5,000 nM (0, 1, 10 and 100 equiv.) in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) under optimized conditions



(A) (B)

รูปที่ 37 เปรียบเทียบสัญญาณ SWV (ข้อมูลดิบในกราฟ A และแสดงในรูปกราฟแท่ง B) ที่ได้จากการตรวจวัด LAMP-amplified WSSV samples: มี (สีส้ม), ไม่มี (สีชมพู), ชุดการทดลองควบคุมที่ไม่ใส่เทมเพลตดีเอ็นเอ (สีเขียว), ดีเอ็นเอสังเคราะห์ที่เป็นคู่สม (สีเขียว) และไม่มีดีเอ็นเอ (สีน้ำเงิน).

---

[1] Sriwarom, P.; Padungros, P.; Vilaivan, T. *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 7058–7065.

[2] Bates, R. W.; Vilaivan, T.; Apparao, S. P.; Hoa, T. T. *Synlett* **2016**, *27*, 93–95.

[3] Mansawat, W.; Vilaivan, C.; Balázs, Á.; Aitken, D.; Vilaivan, T. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 1440–1443.

[4] Seankongsuk, P.; Vchirawongkwin, V.; Bates, R.W.; Padungros, P.; Vilaivan, T. *Asian J. Org. Chem.* **2017**, *6*, 551–560.

[5] Pansuwan, H.; Ditmangklo, B.; Vilaivan, C.; Jiangchareon, B.; Pan-In, P.; Wanichwecharungruang, S.; Palaga, T.; Nuanyai, T.; Suparpprom, C.; Vilaivan, T. *Bioconjugate Chem.* DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00308.

[6] Jose, J.; Burgess, K. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 11021–11037.

[7] a) Varghese, R.; Gajula. P. K.; Chakraborty, T. K.; Wagenknecht, H.-A. *Synlett* **2009**, *20*, 3252–3257.; b) Okamoto, A.; Tainaka, K.; Fujiwara, Y. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 3592–3598.; c) Prokhorenko, I. A.; Dioubankova, N. N.; Korshun, V. A. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* **2004**, *23*, 509–520.; d) Wenge, U.; Ehrenschwender, T.; Wagenknecht, H.-A. *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24*, 301–304.

[8] Varghese, R.; Wagenknecht, H.-A. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 526–528.; Varghese, R.; Wagenknecht, H.-A. *Chem. – Eur. J.* **2009**, *15*, 9307–9310.

[9] Ditmangklo, B.; Boonlua, C.; Suparpprom C.; Vilaivan T. *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24*, 614–625.

[10] Okamoto, A.; Ichiba, T.; Saito, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8364–8365.

[11] Yotapan, N.; Charoenpakdee, C.; Wathanathavorn, P.; Ditmangklo, B.; Wagenknecht, H.-A.; Vilaivan, T. *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 2166–2174.

[12] Tyaki, S.; Kramer, F. R. *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 303–308.

[13] a) Seitz, O. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3249–3252.; b) Kuhn, H.; Demidov, V. V.; Coull, J. M.; Fiandaca, M. J.; Gildea, B. D.; Frank-Kamenetskii, M. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1097–1103.

[14] Lohse, J.; Dahl, O.; Nielsen, P. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 11804–11808.

[15] Yotapan, N.; Nim-anussornkul, D.; Vilaivan, T. *Tetrahedron* **2016**, *72*, 7992–7999.

[16] Boonlua, C.; Ditmangklo, B.; Reenabthue, N.; Suparpprom, C.; Poomsuk, N.; Siriwong, K.; Vilaivan, T. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 8817–8827.

[17]Dangsopon, A.; Poomsuk, N.; Siriwong, K.; Vilaivan, T.; Suparpprom, C. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 74314–74322.

[18] a) Kaura, M.; Kumar, P.; Hrdlicka, P. J. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 6256–6268.; b) Mayer, E.; Valis, L.; Wagner, C.; Rist, M.; Amann, N.; Wagenknecht, H.-A. *ChemBiochem* **2004**, *5*, 865–868.

[19] Brouwer, A. M. *Pure Appl. Chem.* **2011**, *83*, 2213–2228.

[20] Boonlua, C.; Vilaivan, C.; Wagenknecht, H.-A.; Vilaivan, T. *Chem. Asian J.* **2011**, *6*, 3251–3259.

[21] Lercher, L.; McGouran, J.F.; Kessler, B.M.; Schofield, C.J.; Davis, B.G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 10553–10558.

[22] Luo, X.; Lee, T.H.; Hsing, I.M. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 7341–7346.

[23] Notomi, T.; Okayama, H.; Masubuchi, H.; Yonekawa, T.; Watanabe, K.; Amino, N.; Hase, T. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, e63.

[24] Kongpeth, J.; Jampasa, S.; Chaumpluk, P.; Chailapakul, O.; Vilaivan, T. *Talanta* **2016**, *146*, 318–325.

[25] Teengam, P.; Siangproh, W.; Tuantranont, A.; Henry, C.S.; Vilaivan, T.; Chailapakul, O. *Anal. Chim. Acta.* **2017**, *952*, 32–40.

ชื่อโครงการย่อย New approaches to improve the sensitivity of PNA-based DNA sequence detection
ระยะเวลาโครงการ 17 มีนาคม 2557 – 16 มีนาคม 2560 ได้รับอนุมัติให้ขยายเวลาถึง 16 กันยายน 2560
รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 17 มีนาคม 2557 **ถึงวันที่** 16 กันยายน 2560

หัวหน้าโครงการย่อย

ศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ร่วมโครงการ

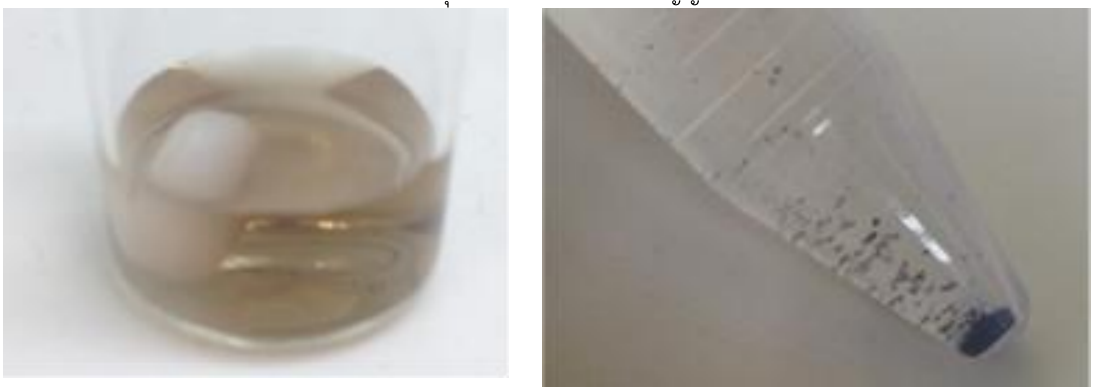
ดร.ธนิษฐ์ ปราณีนรารัตน์	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ดร.นำพล อินสิน	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ดร.แพรทอง เหลาภา	หลักสูตรเคมีประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ จ.สกลนคร
Dr. Christopher Smith	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (ย้ายที่ทำงานไปมหาวิทยาลัยมหิดลตั้งแต่ตุลาคม 2558)

รายงานความก้าวหน้าของโครงการ

โครงการนี้เกี่ยวข้องกับการพัฒนาพีเอ็นเอโพรบที่มีสมบัติเชิงหน้าที่เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในระบบตรวจวัดลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยอาศัยพีเอ็นเอโพรบโดยอาศัยสมบัติที่โดดเด่นของพีเอ็นเอ เช่น ความสามารถในการยึดจับอย่างจำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอเป้าหมาย และการที่พีเอ็นเอปราศจากประจุลบ ซึ่งสามารถสรุปผลงานวิจัยที่ได้ดำเนินการมาตลอดโครงการได้ดังนี้

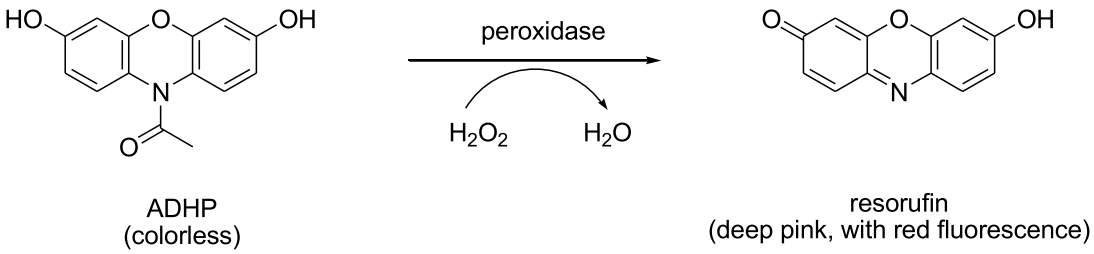
1. Catalytically active pyrrolidinyl peptide nucleic acids

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนาโพรบที่มีความสามารถในการจับยึดกับดีเอ็นเอเป้าหมายอย่างจำเพาะเจาะจง และแสดงความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา โดยการดัดแปรพีเอ็นเอ(หรือดีเอ็นเอ)ให้มี catalytic function โพรบดังกล่าวอาจจะนำไปใช้ในการตรวจวัดลำดับเบสของสารพันธุกรรมแบบมีการขยายสัญญาณได้ โดยไม่ต้องอาศัยเอนไซม์



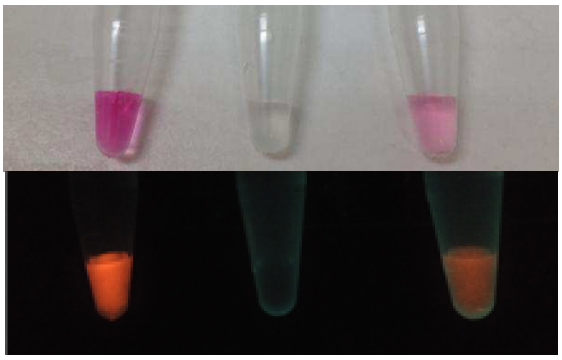
Before adding EtOH After adding EtOH

รูปที่ 1 อนุภาค PtNP ที่ถูกทำให้เสถียรด้วย DNA ในสารละลายน้ำ และการตกตะกอนเมื่อเติม EtOH



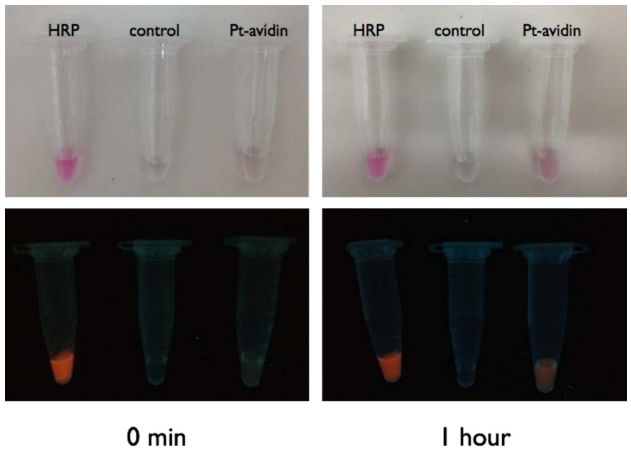
ADHP
(colorless)

resorufin
(deep pink, with red fluorescence)

Tube1 : ADHP + HRP + H_2O_2	
Tube2 : ADHP + H_2O_2	
Tube3 : ADHP + Pt-DNA + H_2O_2	

รูปที่ 2 เปรียบเทียบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของเปอร์ออกซิเดสสับสเตรต (ADHP) ด้วย horse radish peroxidase (HRP) กับด้วยอนุภาค PtNP-DNA ที่ถูกทำให้เสถียรด้วย DNA (บน: ภายใต้แสงขาว, ล่าง: ภายใต้แสงยูวี)

งานวิจัยนี้ได้มีความพยายามที่จะออกแบบระบบพีเอ็นเอหรือดีเอ็นเอที่จะแสดงความสามารถในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เพื่อนำมาใช้เป็นตัวขยายสัญญาณของการจับยึดกับดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นที่คาดหมายว่าจะทำให้ได้สัญญาณที่เพิ่มขึ้นมากกว่าการใช้ฉลากเรืองแสง โดยตัวเร่งปฏิกิริยาหนึ่งที่น่าสนใจคืออนุภาคขนาดนาโนของ Pt (PtNP) ซึ่งเป็นที่ทราบกันมาก่อนหน้านี้ว่าสามารถแสดงความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาคล้ายเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส [1,2,3] นอกจากนี้ยังมีผู้รายงานว่าสามารถสังเคราะห์คอมโพสิตของ PtNP ที่ถูกทำให้เสถียรด้วยดีเอ็นเอ (PtNP-DNA) ได้ และนำไปใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาต่างๆ เช่น ไฮโดรจิเนชัน[4] แต่ยังไม่ได้ศึกษาว่าอนุภาค PtNP-DNA นี้ยังคงสมบัติสมบัติในการจับยึดกับดีเอ็นเออยู่หรือไม่ ในงานวิจัยได้ทดลองเบื้องต้นโดยการสังเคราะห์ โดยการรีดิวส์ของผสมระหว่าง K_2PtCl_4 กับดีเอ็นเอ (5'-AACCTGCGGATCGCGCTCCGCTACTACAAC-3') ด้วย $NaBH_4$ ตามวิธีการในเอกสารอ้างอิง[4] ซึ่งพบว่าสามารถเตรียมอนุภาค PtNP-DNA ดังกล่าวได้จริง และสามารถทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยเอทานอล และทำให้กระจายตัวกลับไปในสารละลายได้อย่างอิสระ (รูปที่ 1) ผลการทดสอบเบื้องต้นพบว่าอนุภาคที่ได้แสดงสมบัติการเร่งปฏิกิริยาคล้ายกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส กล่าวคือ สามารถเร่งการเกิดการออกซิไดส์ของ 10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (ADHP, Amplex red) ซึ่งไม่มีสี ไปเป็น resorufin ซึ่งมีสีชมพูเข้ม และเรืองแสงสีส้มได้ภายใต้ UV light (**รูปที่ 2**) งานที่จะทำต่อไปคือศึกษาสมบัติการจับยึดของอนุภาค PtNP-DNA กับดีเอ็นเอที่เป็นคู่สม ถ้ายังคงความสามารถในการจับยึดอยู่จะนำไปใช้เป็นตัวขยายสัญญาณร่วมกับพีเอ็นเอในการตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอต่อไป แต่ถ้าไม่ก็จะหาวิธีอื่นในการตรึงดีเอ็นเอหรือพีเอ็นเอลงไปบนอนุภาค PtNP โดยวิธีอื่น เช่น การใช้หมู่ thiol ต่อไป ซึ่งวิธีหลังนี้มีขั้นตอนยุ่งยากกว่า แต่ได้มีการพิสูจน์มาแล้วว่าดีเอ็นเอโพรบที่ถูกตรึงโดยวิธีดังกล่าวยังคงความสามารถในการจับยึดและเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้ แต่ของพีเอ็นเอยังไม่มีผู้ศึกษา

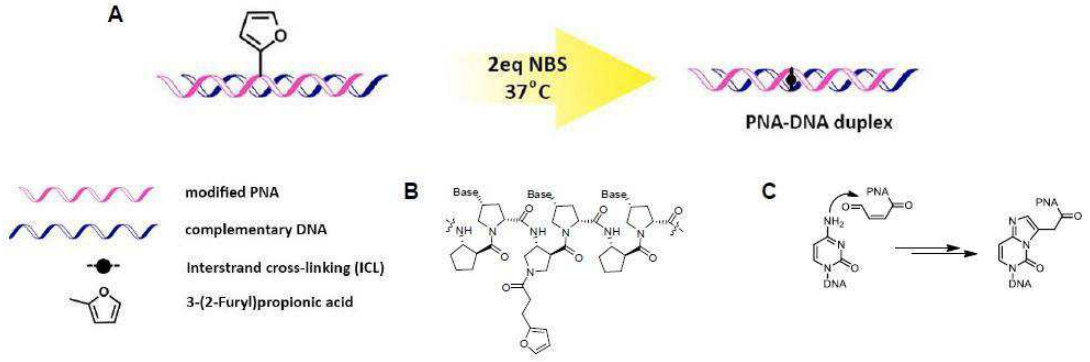
Tube1 : ADHP + HRP + H_2O_2	
Tube2 : ADHP + H_2O_2	
Tube3 : ADHP + Pt-avidin + H_2O_2	

รูปที่ 3 เปรียบเทียบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของเปอร์ออกซิเดสสับสเตรต (ADHP) ด้วย horse radish peroxidase (HRP) กับด้วยอนุภาค PtNP-avidin

นอกจากนี้ผู้วิจัยได้สังเคราะห์คอมโพสิตของ PtNP ที่ถูกทำให้เสถียรด้วยโปรตีน avidin (PtNP-avidin) และนำไปทดสอบใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเบื้องต้น โดยผลการทดสอบเบื้องต้น (**รูปที่ 3**) พบว่าอนุภาคได้แสดงสมบัติเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาคล้ายกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเช่นเดียวกัน แต่ยังไม่มีประสิทธิภาพยังค่อนข้างต่ำ จึงยังต้องมีการศึกษาต่อไป อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองเบื้องต้นนี้แสดงให้เห็นว่าอาจใช้อนุภาค PtNP เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาคล้ายเปอร์ออกซิเดสเพื่อขยายสัญญาณในการตรวจวัดดีเอ็นเอได้

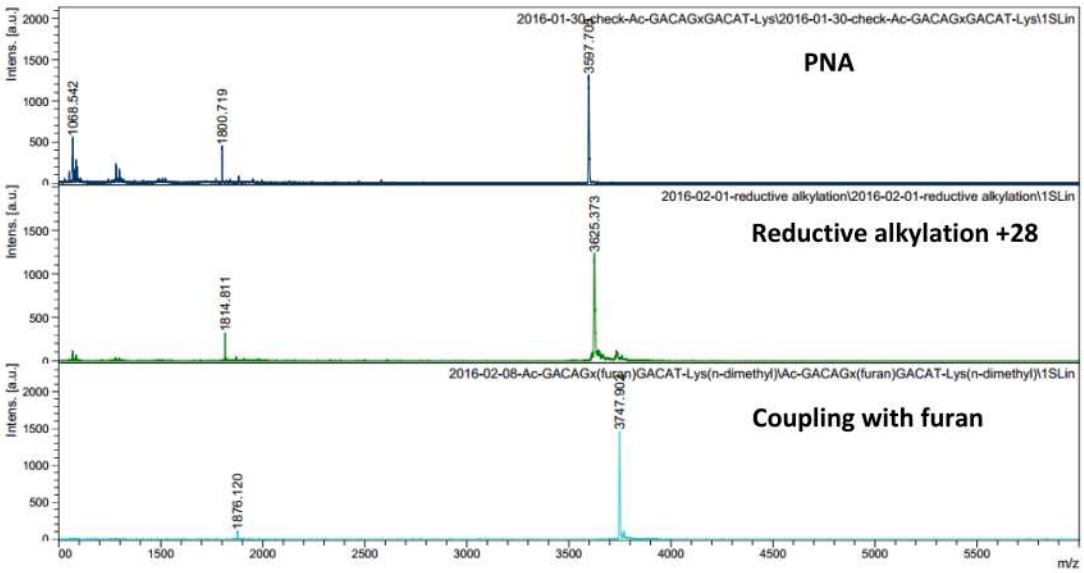
2. Pyrrolidinyl PNA probes with inducible cross-linking properties

งานอีกส่วนหนึ่งที่ได้ดำเนินการไปภายใต้หัวข้อวิจัยนี้คือการขยายขอบเขตของหัวข้อวิจัยไปสู่ functional PNA probe ชนิดอื่นๆ นอกเหนือจากการเป็น catalyst เช่น ฟังก์ชันนัลพีเอ็นเอโพรบที่สามารถสร้างพันธะโคเวเลนต์กับดีเอ็นเอคู่สมเมื่อผ่านการกระตุ้นที่เหมาะสม เพื่อนำไปใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอ โดยในงานวิจัยนี้ได้พัฒนา PNA probe ที่ติดฉลากด้วย furan ซึ่งมีรายงานมาก่อนหน้านี้ในระบบของ DNA ว่าเมื่อกระตุ้นด้วยตัวออกซิไดส์ที่เหมาะสม วง furan จะเปิดออก และจะทำปฏิกิริยา cross-link กับ DNA ได้[5,6]

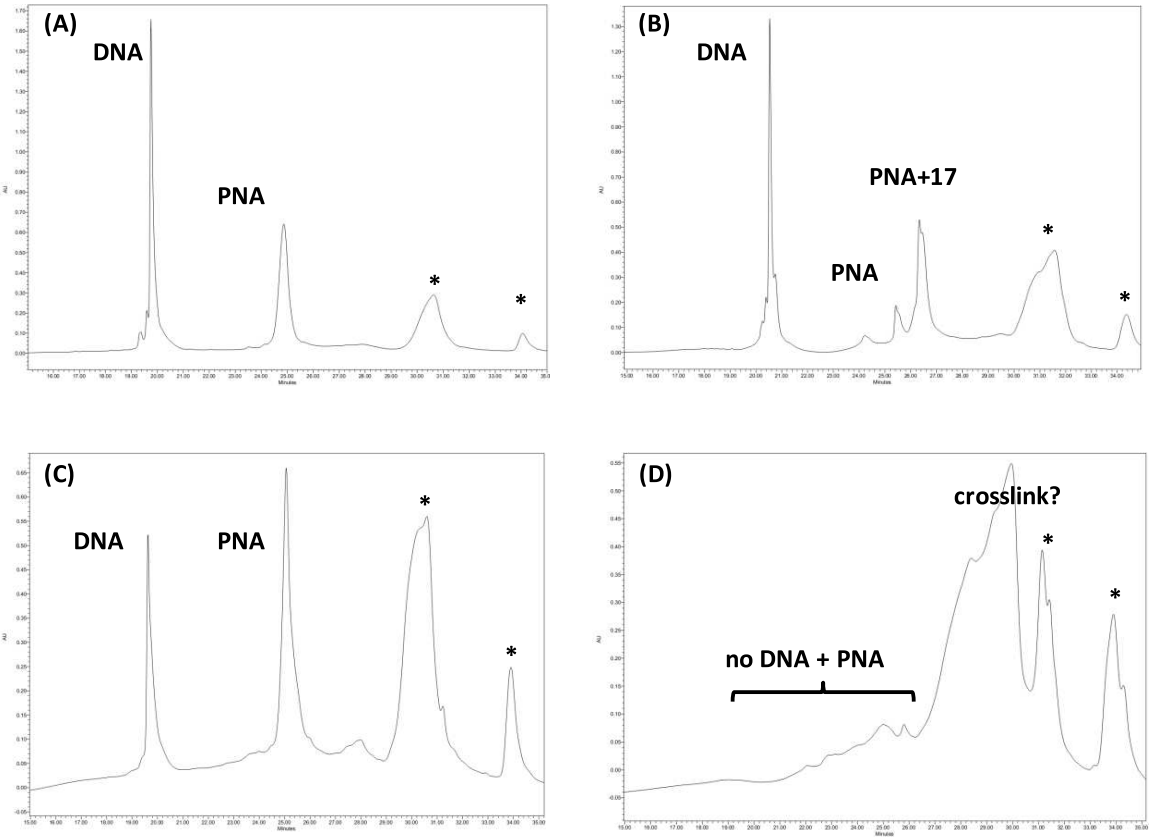


รูปที่ 4 แสดงโครงสร้างของ furan-modified acpcPNA (**A,B**) และการเกิด crosslink (**C**)

งานวิจัยเริ่มต้นจากการสังเคราะห์ acpcPNA ที่ติดฉลากด้วย furan ที่ตำแหน่งกลางสาย (**รูปที่ 4**) โดยการเปลี่ยน ACPC spacer ให้เป็น APC spacer จากนั้นจึงต่อ 3-(2-furyl)propionic acid เข้าไปโดยปฏิกิริยา amide coupling แต่พบปัญหาในขั้นตอนของการ cleavage ของ furan-modified PNA ออกจาก solid support กล่าวคือภายใต้ภาวะกรด วงแหวน furan จะถูกทำลาย ซึ่งยืนยันโดยการให้ 3-(2-furyl)propionic acid ทำปฏิกิริยากับ trifluoroacetic โดยพบว่าจะเกิดปฏิกิริยาอย่างรวดเร็ว ความพยายามแก้ปัญหาโดยการลดความเข้มข้นของกรดลง หรือการเปลี่ยน linker จาก Rink amide เป็น Sieber amide linker ซึ่งสามารถ cleave ออกได้ภายใต้ภาวะกรดที่ไม่แรงมากนักไม่ประสบความสำเร็จ แต่ในที่สุดสามารถแก้ปัญหาโดยการเชื่อมต่อ 3-(2-furyl)propionic acid เข้าไปกับพีเอ็นเอในสภาวะสารละลาย โดยเริ่มจากการสังเคราะห์ APC-modified acpcPNA ตามปกติก่อน แต่เนื่องจากพีเอ็นเอจะต้องดัดแปรที่ปลายด้าน C ด้วย lysine เพื่อเพิ่มการละลาย จึงไม่สามารถนำมา coupling ในภาวะสารละลายได้โดยตรง เนื่องจากหมู่อะมิโนของ lysine ก็เป็นตำแหน่งที่สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ด้วย จึงต้องทำปฏิกิริยา reductive alkylation บน solid support เพื่อเปลี่ยน lysine นี้ให้กลายเป็น dimethyllysine[3] ซึ่งไม่สามารถเกิดปฏิกิริยา amide coupling ต่อไปได้ ในขณะที่ยังคงสามารถไอออไนซ์เป็นประจุบวกเพื่อช่วยในการละลายของพีเอ็นเอได้เช่นเดียวกับ lysine จากนั้นจึงกำจัดหมู่ปกป้องของนิวคลีโอเบสและของ APC ออก แล้วจึง cleave พีเอ็นเอออกจาก solid support จากนั้นจึงนำมาทำปฏิกิริยาต่อกับ Pfp-activated 3-(2-furyl)propionic acid ในตัวทำละลาย DMF แล้วตกตะกอนพีเอ็นเอด้วยอีเทอร์ โดยวิธีการดังกล่าวสามารถสังเคราะห์ furan-modified acpcPNA ได้เป็นผลสำเร็จ ซึ่งสามารถพิสูจน์ทราบโดยเทคนิค MALDI-TOF mass spectrometry (รูปที่ 1) พีเอ็นเอที่ผ่านการดัดแปรแสดงการจับยึดกับดีเอ็นเอโดยแสดงค่า T_m = 44 °C ซึ่งลดลงจากพีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการดัดแปรค่อนข้างมาก

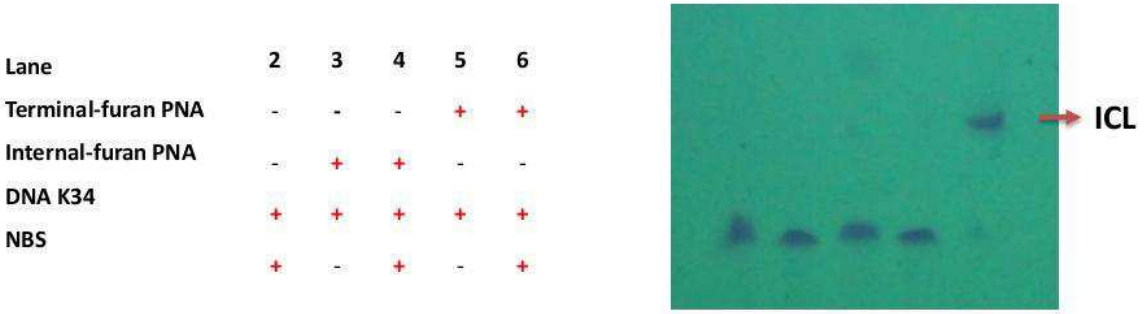


รูปที่ 5 การใช้ MALDI-TOF MS เพื่อติดตามการเกิด methylation ของ lysine และการเชื่อมต่อของพีเอ็นเอกับ Pfp-activated 3-(2-furyl)propionic acid ในสภาวะสารละลาย



รูปที่ 6 HPLC chromatogram แสดงการติดตามการเกิดปฏิกิริยา crosslink ระหว่าง furan-modified acpcPNA ที่ตำแหน่งกลางสาย (A: ก่อนเติม NBS; B: หลังเติม NBS) และตำแหน่งปลายสาย (C: ก่อนเติม NBS; D: หลังเติม NBS) ลำดับเบสของ PNA และ DNA ที่ใช้ในการทดลอง A, B คือ Ac-GACAG^{furan}GACAT-Lys(NMe_2) และการทดลอง C, D คือ furan-O-GTAGATCACT-Lys(NMe_2) และ 5'-AGTGATCTACCCCCC-3' พีกที่มีเครื่องหมาย * คือ impurity

ผลการทดสอบการทำปฏิกิริยา crosslink กับดีเอ็นเอหลังการ activate ด้วย N-bromosuccinimide (NBS) ตามวิธีการที่เคยมีรายงานมาในกรณีของ DNA และติดตามการเกิดปฏิกิริยาด้วยเทคนิค HPLC, T_m และ gel electrophoresis พบว่าแม้จะเกิดปฏิกิริยาการเปิดวงของ furan เป็น dialdehyde จากการเกิดพีกที่ *m/z* = PNA +17 ขึ้น แต่ไม่พบว่าเกิดการ crosslink แต่อย่างใด ซึ่งคาดว่าอาจเกิดจากการที่คู่เบสระหว่างพีเอ็นเอกับดีเอ็นเอค่อนข้างเสถียร แต่เนื่องจากการเกิด crosslink จำเป็นต้องใช้หมู่อะมิโนของนิวคลีโอเบสมาทำปฏิกิริยากับหมู่แอลดีไฮด์ที่เกิดจากการเปิดวงแหวนของฟิวแรน ดังนั้นจึงเกิดปฏิกิริยาได้ยากกว่าในกรณีของดีเอ็นเอ จากสมมติฐานนี้ผู้วิจัยจึงได้ย้ายตำแหน่งการติดหมู่ฟิวแรนมาไว้ที่ปลายสายด้าน N-terminus ของ acpcPNA แทน และให้ทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอที่ยาวกว่าสายพีเอ็นเอ โดยคาดว่าดีเอ็นเอส่วนที่ยาวเกินกว่าสายพีเอ็นเอจะเกิดปฏิกิริยา crosslink ได้ง่ายกว่าเนื่องจากนิวคลีโอเบสที่อยู่ในสายดีเอ็นเอไม่ได้อยู่ในสภาพที่เข้าคู่เบส ซึ่งในที่นี้ได้กำหนดให้เบสส่วนเกินเป็น dC เนื่องจากมีรายงานมาก่อนหน้านี้ว่าเบส C และ A สามารถเกิดปฏิกิริยา crosslink ได้ดีกว่าเบสอื่น[6] ซึ่งผลการทดสอบด้วยเทคนิค HPLC (**รูปที่ 6**) พบว่าสมมติฐานนี้น่าจะถูกต้องกล่าวคือ พีกของ PNA และของ DNA หายไป และเกิดพีกใหม่ขึ้น ซึ่งเสนอแนะว่าน่าจะเกิดปฏิกิริยา crosslink ได้ และสามารถยืนยันผลได้โดยการทำ T_m ซึ่งพบว่าก่อนและหลังการ activate ด้วย NBS มีลักษณะของ T_m curve ที่เปลี่ยนแปลงไปอย่างชัดเจน นอกจากนี้ยังได้ยืนยันการเกิด crosslink โดยเทคนิค gel electrophoresis (**รูปที่ 7**) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเฉพาะในกรณีที่ furan อยู่ตรงปลายสายเท่านั้นที่จะทำให้เกิดการ crosslink ได้



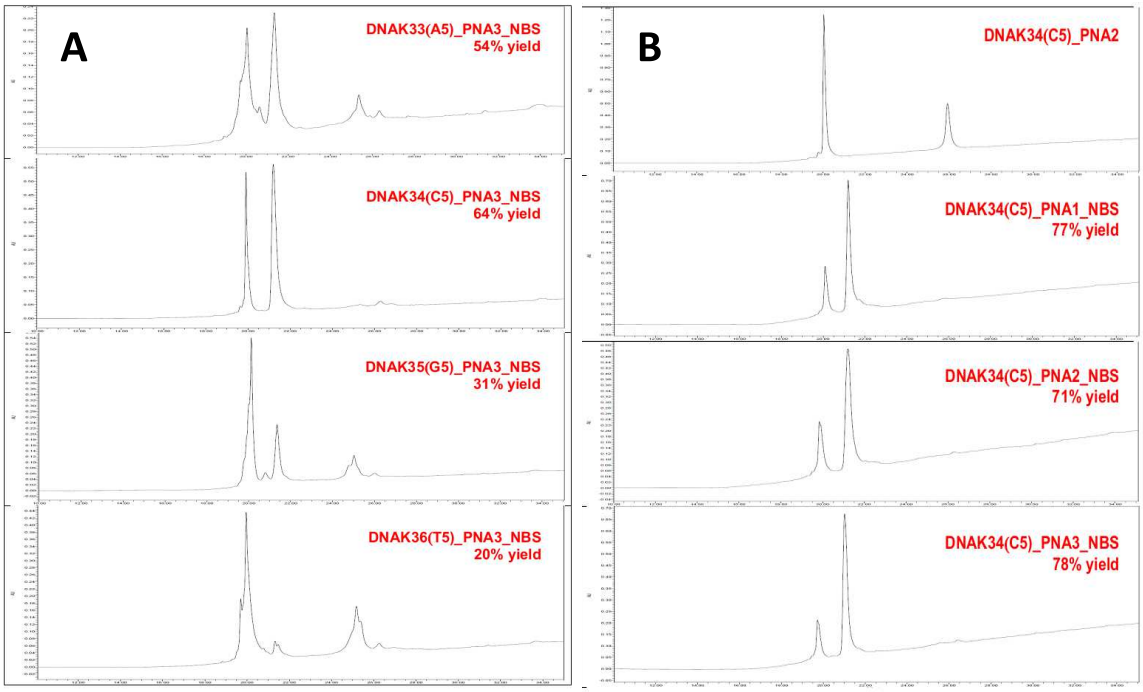
รูปที่ 7 Denaturing PAGE แสดงการเกิด crosslink ของ furan-modified PNA (กลางสายและปลายสาย) กับดีอ็นเอคู่สม โดยใช้อัตราส่วนของ DNA = PNA เป็น 1 nmol, 5 uL ของ formamide , prerun 300v = 3h, run at 225v = 60 min, และลำดับเบสของ PNA และ DNA ที่ใช้ในการทดลอง คือ furan-O-GTAGATCACT-Lys(NMe_2) สำหรับปลายสาย, Ac-GACAG^{furan}GACAT-Lys(NMe_2) สำหรับกลางสาย และดีเอ็นเอ 5'-AGTGATCTACCCCCC-3'

จากนั้นจึงได้เปรียบเทียบความสามารถในการเกิด crosslink โดยใช้ดีเอ็นเอที่ปลายเป็นเบสต่างๆ กัน โดยใช้เทคนิค HPLC และใช้วิธีจำกัดปริมาณพีเอ็นเอ พบว่าความสามารถในการเกิด crosslink เรียงลำดับได้จาก C > A > G > T (**รูปที่ 8**) และได้ศึกษาอิทธิพลของ spacer ที่เชื่อมระหว่างฟิวแรนกับ PNA ซึ่งไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยในทุกกรณีจะเกิดการ crosslink ได้ใกล้เคียงกันหากเบนที่ปลายสายดีเอ็นเอเป็น C

นอกจากนี้ได้ศึกษาตำแหน่งของการเกิด crosslink กับ DNA ที่มีเบส T ซ้ำๆ กันตรงปลายสายซึ่งได้ยืนยันมาก่อนหน้านี้แล้วว่าไม่สามารถเกิดการ crosslink โดยอาศัยการแทนที่ด้วยเบส C ทีละตำแหน่ง จากผลของ denaturing PAGE ใน **รูปที่ 9** พบว่าการแทนที่เบส C ในทุกตำแหน่งสามารถเกิด crosslink ได้ คาดว่าการติด furan ไว้ที่ปลายสายของ PNA ผ่าน linker ที่ค่อนข้างยืดหยุ่น ประกอบกับโครงสร้างของดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่ค่อนข้างยืดหยุ่นด้วย ทำให้สามารถเกิดการ crosslink ได้หลายตำแหน่ง จึงอาจต้องปรับโครงสร้างต่อไปหากต้องการให้เกิดปฏิกิริยาที่ตำแหน่งที่จำเพาะเจาะจง และสุดท้ายได้มีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการเกิด double duplex invasion พร้อมกับการเกิด crosslink ระหว่าง furan-modified acpcPNA กับ dsDNA โดยได้ทำการสังเคราะห์ furan-modified acpcPNA ตามวิธีการที่ได้กล่าวไปข้างต้นแต่มีการเพิ่มหมู่ไลซีนจาก 1 ตำแหน่งเป็น 5 ตัวเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการ invade ดังที่ได้ทราบมาจากการศึกษาก่อนหน้านี้[7] จากติดตามโดยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส ทั้งแบบปกติและแบบ denature พบว่าพีเอ็นเอระบบนี้สามารถเกิด invasion กับ dsDNA ได้ดังแสดงในรูปที่ 7 ซ้าย เลนที่ 7 และ 8 แต่ยังไม่สามารถชักนำให้เกิดการ crosslink ได้เนื่องจากไม่พบแบนด์ที่อยู่เหนือ dsDNA จาก denaturing PAGE ดังแสดงใน**รูปที่ 10** ขวาเลนที่ 8 ซึ่งอาจเกิดจากการที่ตำแหน่งของเบส C ที่เป็นเป้าหมาย

ของการเกิด crosslink บนสายของดีเอ็นเอนั้นยังอยู่ในสภาพที่เข้าคู่กับเบส G บนดีเอ็นเอสายตรงกันข้าม จึงไม่มีโอกาสที่จะเกิดปฏิกิริยา crosslink ซึ่งจำเป็นต้องอาศัยหมู่อะมิโนของ C คาดว่าหากทำให้มีช่องว่างตรงตำแหน่งที่จะเกิดปฏิกิริยาโดยการเลื่อนการเข้าคู่กันของพีเอ็นเอ 4 กับดีเอ็นเอ N24 ไป 1-2 ลำดับเบสน่าจะทำให้เกิดการ crosslink ได้ โดยการเกิด duplex invasion ในดีเอ็นเอสายยาวพร้อมการเกิด crosslink ยังไม่เคยมีผู้รายงานมาก่อน หากสามารถทำสำเร็จก็จะเป็นความก้าวหน้าอย่างมาก และเน้นให้เห็นสมบัติที่โดดเด่นของพิร์โรลิดินิลพีเอ็นเออย่างชัดเจน

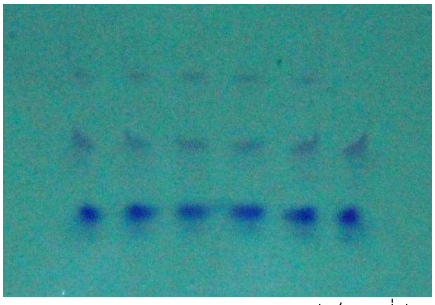
งานที่จะทำต่อไปคือการ characterize ผลิตภัณฑ์จากการ crosslink โดยเทคนิค mass spectrometry จากนั้นจึงจะนำพีเอ็นเอโพรบนี้ไปใช้ในการตรวจวัดดีเอ็นเอต่อไป โดยจะเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับ non-crosslink probe ด้วย



รูปที่ 8 HPLC chromatogram แสดงการเกิด crosslink ของ PNA3 กับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสปลายสายเป็น A5, C5, G5, T5 (A) และการเกิด crosslink ของดีเอ็นเอที่ปลายสายเป็น C5 กับพีเอ็นเอที่มีความยาวต่างกัน (B) และลำดับเบสของ PNA และ DNA ที่ใช้ในการทดลองเป็นดังนี้ PNA1 = furan-nox-GTAGATCACT-K(NMe_2) PNA2 = furan-GTAGATCACT-K(NMe_2), PNA3 = furan-o-GTAGATCACT-K(NMe_2), DNA K33 = AGT GAT CTA CCA AAA, DNA K34 = AGT GAT CTA CCC CCC, DNA K35 = AGT GAT CTA CGG GGG, DNA K36 = AGT GAT CTA CTT TTT

Lane	1	2	3	4	5	6
PNA3	+	+	+	+	+	+
DNA K44	+	-	-	-	-	-
DNA K45	-	+	-	-	-	-
DNA K46	-	-	+	-	-	-
DNA K47	-	-	-	+	-	-
DNA K48	-	-	-	-	+	+
NBS	+	+	+	+	+	-

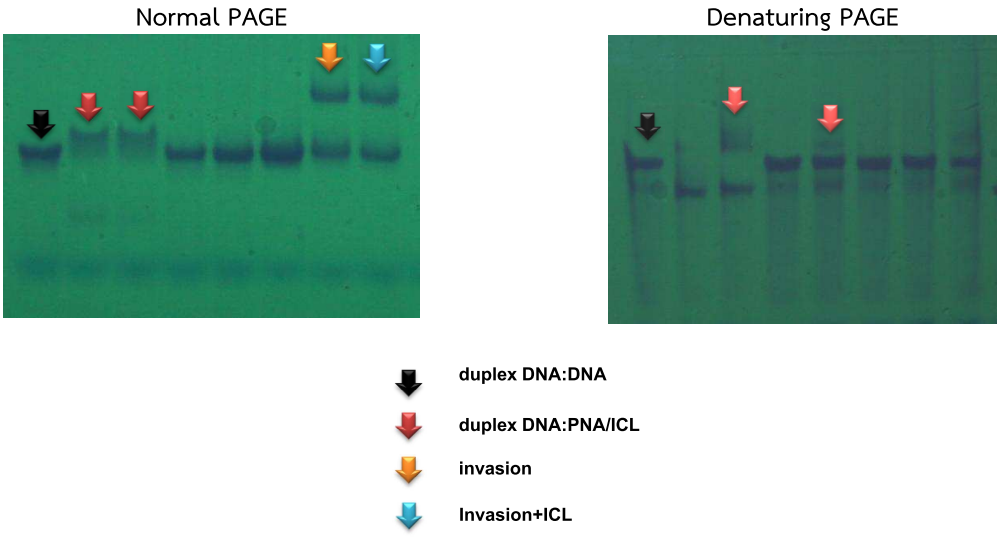
DNA K44 = AGT GAT CTA CCT TTT
DNA K45 = AGT GAT CTA CTC TTT
DNA K46 = AGT GAT CTA CTT CTT
DNA K47 = AGT GAT CTA CTT TCT
DNA K48 = AGT GAT CTA CTT TTC



รูปที่ 9 Denaturing PAGE แสดงผลการเกิด crosslink ของ PNA3 และดีเอ็นเอที่มีการแทนที่เบส T ด้วยเบส C บนปลายสายที่ตำแหน่งต่างกัน โดยใช้ DNA = PNA = 0.5 nmol, 5 uL ของ formamide, prerun 300v = 1h, run at 225v = 45 min, PNA3 = furan-o-GTAGATCACT-Lys(NMe_2).

PNA 4 : K_5-CA TCT AGT GA-Ac
DNA N24 : CCA GGG CAT GGT AGA TCA CTG TAC GCC GCG
DNA N25 : GGT CCC GTA CCA TCT AGT GAC ATG CGG CGC
PNA 5 : furan-GT AGA TCA CT-K_5(NMe_2)

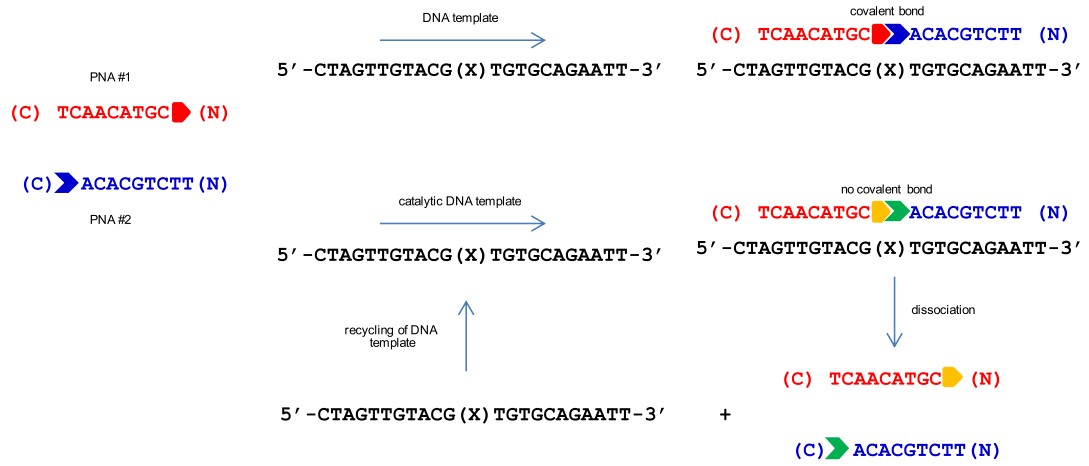
Lane	1	2	3	4	5	6	7	8
PNA 4	-	-	-	-	-	+	+	+
DNA N24	+	-	-	+	+	+	+	+
DNA N25	+	+	+	+	+	+	+	+
PNA 5	-	+	+	+	+	-	+	+
NBS	-	-	+	-	+	-	-	+



รูปที่ 10 Denaturing PAGE แสดงผลการเกิด invasion และการเกิด crosslink ของ furan-modified acpcPNA กับ ดีเอ็นเอสายคู่ โดยใช้ DNA = 0.2 nmol และ PNA = 0.4 nmol, 5 uL ของ formamide, prerun 300v = 1h, run at 225v = 60 min สำหรับ denature 120 min สำหรับ PAGE ปกติ

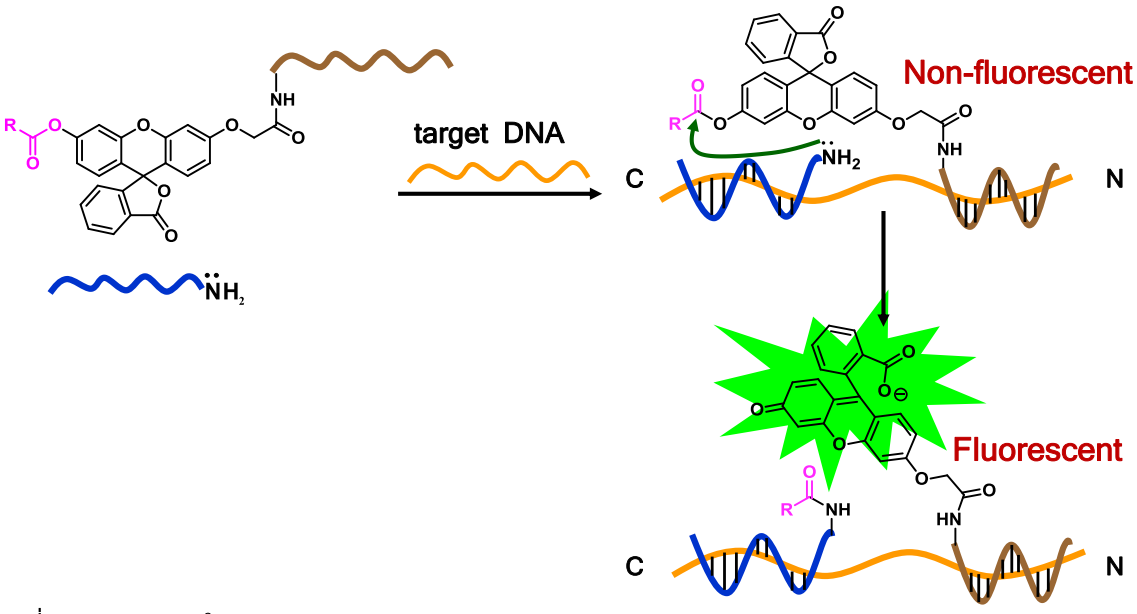
3. DNA-templated and DNA-catalyzed reactions of pyrrolidinyl peptide nucleic acids

งานวิจัยนี้พยายามจะพัฒนาระบบที่จะเร่งการทำปฏิกิริยาระหว่างพีเอ็นเอสองสาย ซึ่งติดฉลากด้วยหมู่ที่ว่องไวต่อปฏิกิริยาไว้ที่ปลายคนละด้าน โดยอาศัย DNA template ซึ่งจะนำพีเอ็นเอทั้งสองสายมาอยู่ใกล้กัน จึงทำให้หมู่ที่ว่องไวต่อปฏิกิริยามาอยู่ใกล้กันด้วย จึงเกิดปฏิกิริยาได้เร็วขึ้น[8] ซึ่งมีความเป็นไปได้อยู่สองรูปแบบดังแสดงใน**รูปที่ 11** กล่าวคือ DNA-templated reaction ที่ทำให้เกิดพันธะโคเวเลนต์เชื่อมต่อพีเอ็นเอทั้งสองสายเข้าด้วยกัน โดยทั่วไปรูปแบบนี้เมื่อเกิดปฏิกิริยาแล้ว DNA template จะไม่สามารถทำงานต่อไปได้เนื่องจากเกิด product inhibition (พีเอ็นเอสายยาวจะจับกับดีเอ็นเอได้แน่นกว่าพีเอ็นเอสายสั้น) และอีกรูปแบบหนึ่งคือ DNA-catalyzed reaction ที่ไม่มีการเกิดพันธะโคเวเลนต์ระหว่างพีเอ็นเอทั้งสอง ทำให้ตัว DNA template เมื่อทำหน้าที่เสร็จแล้วสามารถกลับไปเร่งปฏิกิริยาในรอบต่อไปได้ ซึ่งน่าจะมีประสิทธิภาพกว่าแบบแรก ปฏิกิริยาเหล่านี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้หลากหลาย เช่นในการตรวจวัดดีเอ็นเอ การสังเคราะห์พีเอ็นเอที่เป็นสายยาว หรือการสังเคราะห์พีเอ็นเอที่คอนจูเกตกับดีเอ็นเอ เป็นต้น



รูปที่ 11 แสดงแนวคิดในการทำ DNA-templated/DNA-catalyzed reaction ของพีเอ็นเอสองสาย

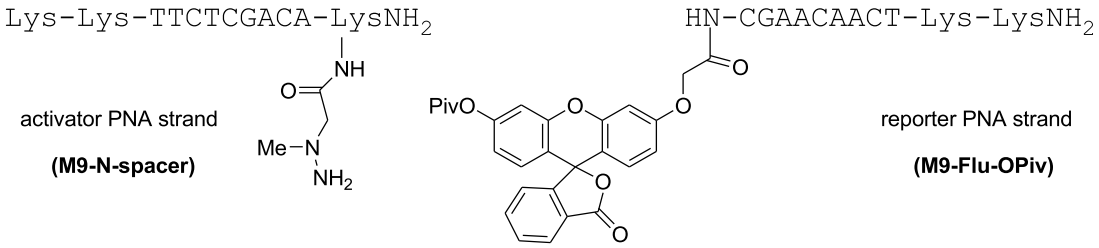
งานวิจัยนี้ต้องการที่จะออกแบบ DNA-catalyzed reaction ของพีเอ็นเอ โดยอาศัยหลักการถ่ายโอนหมู่เอซิลที่อยู่บน masked fluorophore จากพีเอ็นเอสายหนึ่งไปยังพีเอ็นเออีกสายหนึ่ง โดยปฏิกิริยาแทนที่แบบนิวคลีโอฟิลิก ซึ่งการถ่ายโอนนี้จะถูกเร่งด้วยดีเอ็นเอเทมเพลต (proximity effect) ข้อดีของการออกแบบนี้คือเมื่อปฏิกิริยาเกิดแล้ว ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจะไม่จับแน่นกับดีเอ็นเอเทมเพลตซึ่งจะทำให้เกิด product inhibition ได้ดังที่พบใน DNA-templated reaction ส่วนใหญ่ และผลิตภัณฑ์ยังสามารถเกิดการแลกเปลี่ยนกับพีเอ็นเอที่ยังไม่เกิดปฏิกิริยา ทำให้ดีเอ็นเอเทมเพลต 1 ตัวสามารถทำงานได้หลายครั้ง โดยในการออกแบบนี้ได้เลือกติดฉลาก Fluorescein ที่มีออกซิเจนอะตอมหนึ่งถูกปกป้องด้วยหมู่เอซิล ให้กับพีเอ็นเอสายหนึ่ง (reporter PNA) และมีพีเอ็นเออีกสายหนึ่งที่มีหมู่ที่เป็นนิวคลีโอไฟล์อยู่ (activator PNA) ในตอนเริ่มต้น reporter ควรจะให้การเรืองแสงที่ต่ำ เนื่องจาก masked Fluorescein จะอยู่ในโครงสร้างที่เป็น spiropyran ที่ไม่เรืองแสง เมื่อออกแบบให้หมู่ที่จะเข้าทำปฏิกิริยากันมีระยะห่างที่เหมาะสม การจับกันอย่างจำเพาะเจาะจงระหว่าง reporter PNA, activator PNA และ DNA template เกิดเป็น ternary complex จะทำให้เกิดการถ่ายโอนหมู่เอซิลจาก reporter PNA ไปยัง activator PNA และทำให้เกิดการ unmasked ของ Fluorescein บน reporter PNA ซึ่งจะส่งผลให้การเรืองแสงเพิ่มขึ้น ดังแสดงใน**รูปที่ 12**



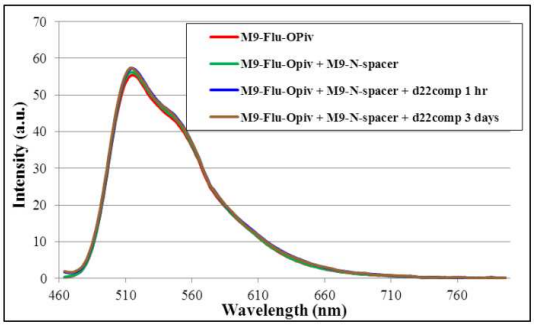
รูปที่ 12 แสดงแนวคิดในการทำ DNA-templated fluorogenic reaction ของ PNA

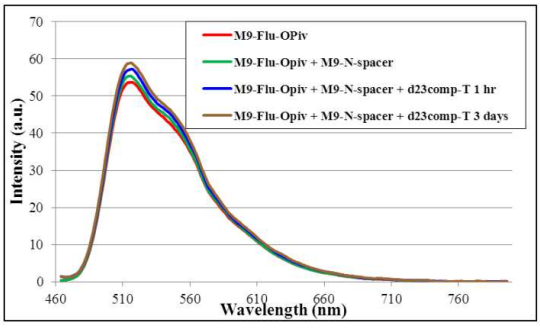
ในงานวิจัยได้เลือก *O*-pivaloyl Fluorescein เป็น masked fluorophore เนื่องจากความเสถียรที่ดี และเมื่อปลดหมู่ O-pivaloyl ออกภายใต้ภาวะเบสจะเห็นการเรืองแสงเพิ่มขึ้นถึงกว่า 100 เท่า จากนั้นจึงได้ทดสอบปฏิกิริยาโดยการสังเคราะห์ acpcPNA ที่มีความยาว 9 เบสสองสาย สายหนึ่งคือ reporter strand (M9-FAM-OPiv) ถูกดัดแปรที่ปลายด้าน N ด้วย *O*-pivaloyl Fluorescein และอีกสายหนึ่งคือ activator strand (M9-N-spacer) จะถูกดัดแปรที่ปลายด้าน C ด้วย N-amino-N-methylglycine ผ่าน side chain ของ lysine และใช้เทมเพลตเป็นดีเอ็นเอซึ่งมีลำดับเบสดังแสดงใน**รูปที่ 13**

d22comp: 5'-CTAGTTGTACGTGTGCAGAATT-3'
d23compT: 5'-CTAGTTGTACGTTGTGCAGAATT-3'
d24compTT: 5'-CTAGTTGTACGTTTGTGCAGAATT-3'

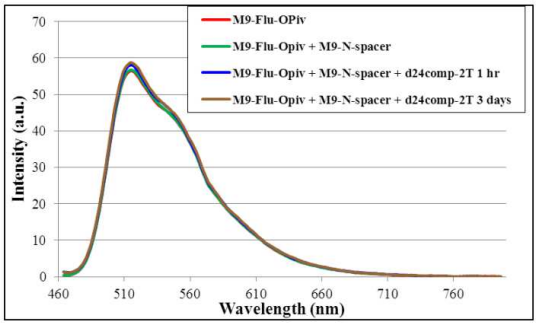


รูปที่ 13 ลำดับเบสของดีเอ็นเอและพีเอ็นเอที่ใช้ในการศึกษา DNA-templated fluorogenic reaction





(a) (b)



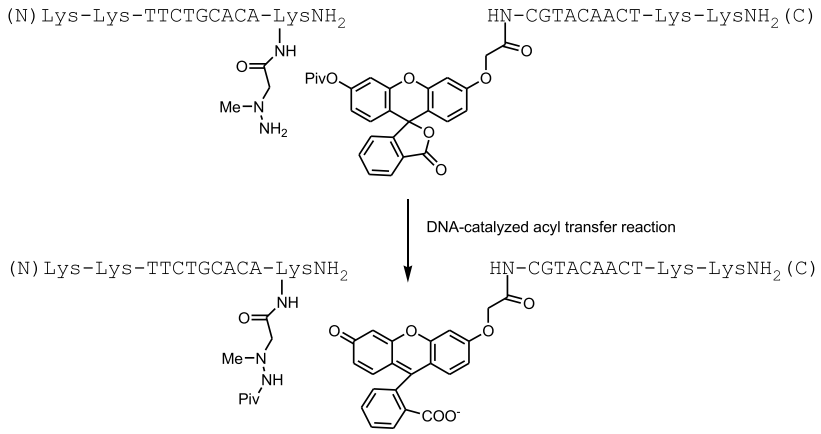
(c)

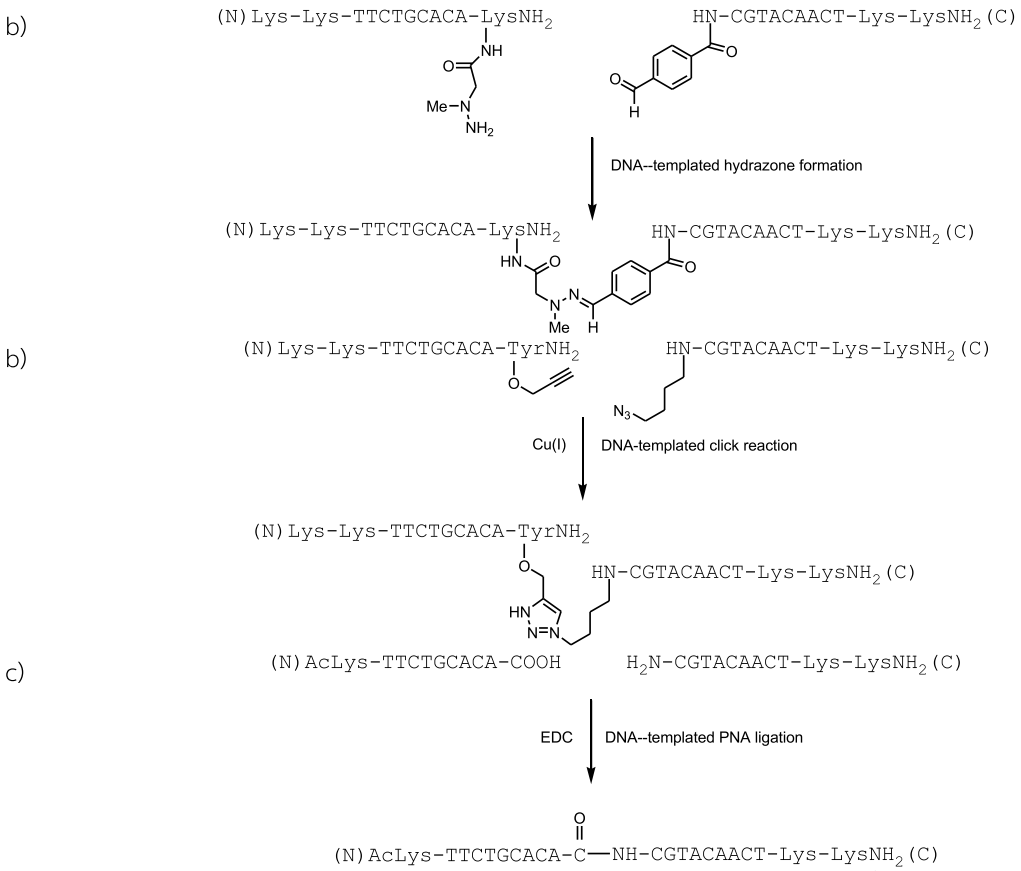
รูปที่ 14 ฟลูออเรสเซนต์สเปกตรัมของ M9-FAM-OPiv (1 μM), M9-N-spacer (1 μM) และ DNA template (1 μM) λem = 515 nm, λex = 450 nm, PMT voltage = medium) หลังจากทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง และ 3 วัน ใน 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0

เป็นที่น่าเสียดายว่าในทุกกรณีไม่มีการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงที่ 450 nm (Fluorescein emission) อย่างมีนัยสำคัญ (**รูปที่ 14**) ซึ่งได้ยืนยันด้วยวิธีอื่น ได้แก่ HPLC และ MALDI-TOF MS ซึ่งไม่พบปฏิกิริยา acyl transfer ระหว่างพีเอ็นเอทั้งสองสาย ซึ่งอาจเกิดจากระยะห่างระหว่าง reacting partner ทั้งสองยังไม่เหมาะสม หรือ *O*-pivaloyl group ที่เป็นหมู่ปกป้องอาจจะเสถียรเกินไปจนไม่สามารถหลุดออกได้ตามที่วางแผนไว้แม้จะมี DNA template อยู่ด้วย นอกจากนี้อีกปัญหาที่พบคือหมู่ pivaloyl เมื่อทิ้งไว้ในสารละลายเป็นระยะเวลานานจะมีการหลุดออกของหมู่ pivaloyl ได้ด้วยทำให้มี fluorescence background สูง ผลการทดลองเบื้องต้นถึงอิทธิพลของระยะห่าง โดยการปรับเปลี่ยน linker X ที่เชื่อมระหว่างดีเอ็นเอสองส่วน จาก T0-T2 ไม่พบว่ามีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงอย่างมีนัยสำคัญ

นอกจากนี้ยังได้ศึกษาปฏิกิริยาDNA-templated/DNA-catalyzed reaction อื่นๆ อีก ดังสรุปใน**รูปที่ 15** อย่างไรก็ตาม จากการวิเคราะห์โดยเทคนิค MALDI-TOF MS พบผลิตภัณฑ์ที่ต้องการเฉพาะในกรณีของ hydrazone formation (entry b; *m/z* ligation product = 6754) และ click reaction (entry c; *m/z* ligation product = 6728) แต่ในปฏิกิริยา click พบว่ามี background reaction ด้วย กล่าวคือแม้ไม่มี DNA template ก็ยังพบผลิตภัณฑ์ อย่างไรก็ตาม ในทุกกรณียังถือว่าเกิดผลิตภัณฑ์ที่ต้องการในปริมานน้อยมาก จากปัญหาดังกล่าวทั้งหมด ประกอบกับ impact ของงานที่อาจจะไม่สูงมากนักเมื่อเทียบกับงานที่ใช้ DNA ที่มีผู้ศึกษากันมาค่อนข้างมากแล้ว คณะผู้วิจัยจึงได้หยุดดำเนินการโครงการย่อยนี้และจะไปเพิ่มเนื้องานโดยการขยายขอบเขตของงานในหัวข้อย่อยอื่นต่อไป

a)

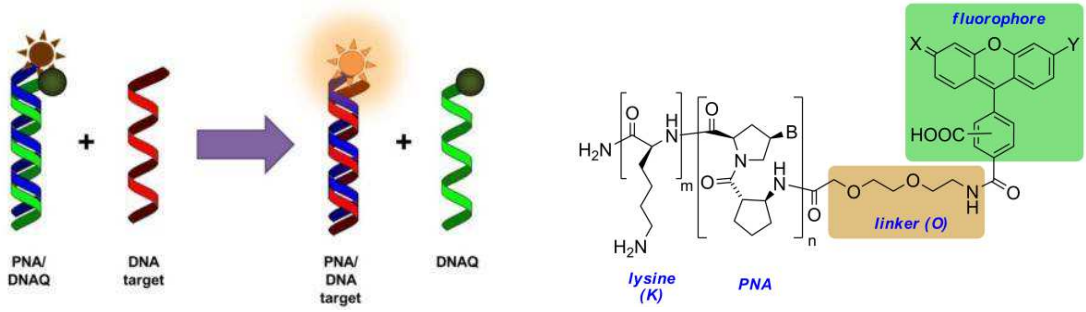




รูปที่ 15 ปฏิกิริยา DNA-templated reaction ระหว่างพีเอ็นเอสองสายที่ได้ศึกษาในงานวิจัยนี้

4. PNA-based strand displacement probes

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนา self-reporting fluorescence PNA probe สำหรับการตรวจวัดลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักการของ strand displacement ซึ่งตัวโพรบจะประกอบด้วยสองส่วนคือ sensor strand ซึ่งเป็นพีเอ็นเอโพรบที่ติดฉลากเรืองแสง กับ quencher strand ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่ติดด้วยตัวดับแสง โดยโพรบนี้จะออกแบบให้เข้าคู่กัน ซึ่งจะทำให้เกิดการระงับสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ในภาวะปกติ เมื่อมีดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สมกับ PNA ที่เป็น sensor strand อยู่ด้วย ดีเอ็นเอจะเข้าไปแทนที่ quencher strand เกิดเป็นไฮบริดคู่ใหม่ การแทนที่ของ quencher strand นี้จะทำให้สัญญาณฟลูออเรสเซนต์เพิ่มขึ้น (**รูปที่ 16**) หลักการนี้เคยมีผู้ศึกษากับดีเอ็นเอ[9,10,11] และพีเอ็นเอระบบดั้งเดิม[12,13]มาบ้างแล้ว

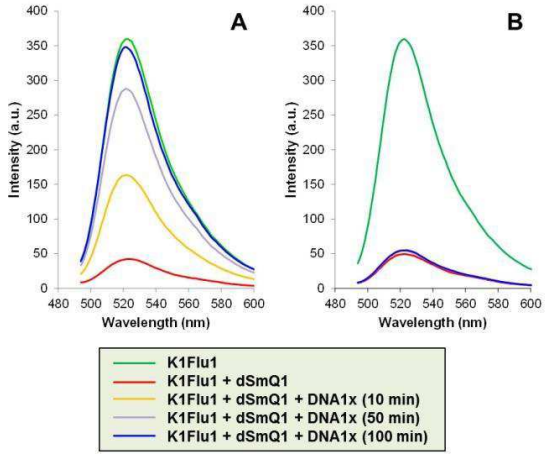


(A) (B)

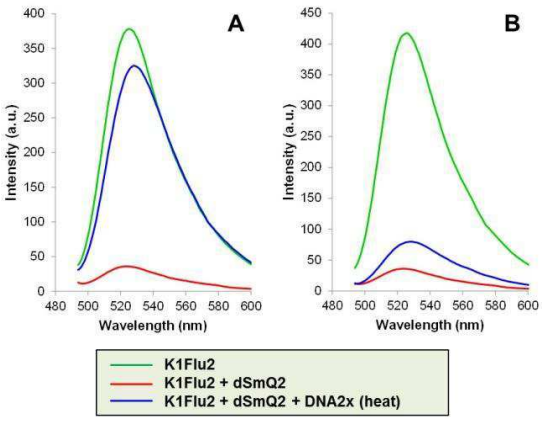
รูปที่ 16 หลักการทำงานของ PNA-based strand displacement probe และโครงสร้างของ labeled acpcPNA ที่ใช้เป็น sensor strand

การเกิดการแทนที่จะถูกกำหนดโดยความเสถียรของไฮบริดระหว่าง PNA sensor strand กับ DNA target เทียบกับความเสถียรของไฮบริดระหว่าง PNA sensor strand กับ DNA quencher strand เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาไปข้างหน้าได้ โดย

หลักการจะต้องออกแบบให้ไฮบริดของ PNA sensor strand กับ DNA quencher strand ไม่เสถียรเกินไปจนไม่เกิดการแทนที่ แต่ก็ต้องเสถียรพอเพื่อให้เกิดการระงับสัญญาณอย่างมีประสิทธิภาพ จึงจำเป็นต้อง optimize DNA quencher และภาวะที่เหมาะสมของการแทนที่ก่อน โดยผลการทดลองพบว่าการใช้ FAM หรือ TAMRA-labeled PNA probe ร่วมกับ quencher DNA ที่มี single mismatch base หรือที่มีลำดับเบสสั้นกว่า sensor strand ในอัตราส่วนที่เท่ากันจะทำให้เกิดการระงับแสงอย่างมาก (76–94%) และเมื่อมีดีเอ็นเอคู่สมจะเกิดการแทนที่ พร้อมกับการคืนสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ (**รูปที่ 17, 18)** โดยให้ค่า F/F_0 อยู่ในช่วง 8.3–14.6 ในขณะที่ดีเอ็นเอที่ไม่เป็นคู่สม รวมทั้งที่มีลำดับเบสผิดไปหนึ่งตำแหน่งจะให้การคืนสัญญาณที่น้อยกว่ามาก โดยให้ค่า F/F_0 อยู่ในช่วง 1.0–2.4 เมื่อ F_0 คือสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของ displacment probe complex เมื่อเริ่มต้น และค่าdiscrimination factor ($[(F/F_0)_{comp}/(F/F_0)_{mismatch}]$) อยู่ในช่วง 3.6–13.3 (**ตารางที่ 1**) และสามารถตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายที่เป็นสายคู่ได้โดยตรงโดยไม่ต้องทำ denaturation ก่อน



รูปที่ 17 สัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของ displacement probe K1Flu1/dSmQ1 ในการแยกแยะความแตกต่างของ A) complementary DNA (DNA1x = 3'-AATTTAAGTCT-5') และ B) single mismatched DNA (DNA1x = 3'-AATTTACGTCT-5'). ลำดับเบสของ sensor probe K1Flu1 คือ FAM-O-CTAAATTCAGA-KNH_2 และลำดับเบสของ quencher probe dSmQ1 คือ Dabcyl-GATTTACGTCT-5'; [K1Flu1] = 0.05 μM, [dSmQ1] = [DNA1x] = 0.50 μM, excitation wavelength = 480 nm. การวัดทั้งหมดทำที่ 20 °C.



รูปที่ 18 สัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของ displacement probe K1Flu2/dSmQ2 ในการแยกแยะความแตกต่างของ A) complementary DNA (DNA2x = 3'-TCAATAGGGACG-5') และ B) single mismatched DNA (DNA2x = 3'-TCAATTGGGACG-5'). ลำดับเบสของ sensor probe K1Flu2 คือ FAM-O-AGTTATCCCTGC-KNH_2 และลำดับเบสของ quencher probe dSmQ2 คือ Dabcyl-TCAATTGGGACG-5'; [K1Flu2] = 0.05 μM, [dSmQ2] = [DNA2x] = 0.50 μM, excitation wavelength = 480 nm. การวัดทั้งหมดทำที่ 20 °C.

ตารางที่ 1 อัตราส่วนการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของ PNA-based displacement probe[a,b]

Probe1	F/F_0[c,d]					
	DNA1a	DNA1b	DNA1c	DNA1d	DNA1e	DNA1f
K1Flu1+dSmQ1	8.3	1.1 (7.5)	2.3 (3.6)	1.7 (4.9)	1.1 (7.5)	1.8 (4.6)
K4Flu1+dSmQ1	13.8	1.4 (9.9)	2.4 (5.8)	2.2 (6.3)	1.2 (11.5)	1.7 (8.1)
K4TMR1+dSmQ1	14.6	1.2 (12.2)	2.3 (6.3)	1.9 (7.7)	1.1 (13.3)	1.9 (7.7)
Probe2	DNA2a	DNA2b	DNA2c	DNA2d	DNA2e	DNA2f
K1Flu2+dSmQ2	8.9	2.2 (4.0)	1.2 (7.4)	1.4 (6.4)	1.0 (8.9)	2.1 (4.2)
K1Flu2+d9Q2	11.2	1.8 (6.2)	1.4 (8.0)	1.2 (9.3)	1.1 (10.2)	1.6 (7.0)

[a]ลำดับเบสของพีเอ็นเอและดีเอ็นเอที่เกี่ยวข้อง

Sensor probes

K1Flu1: FAM-O-CTAAATTCAGA-KNH_2

K4Flu1: FAM-O-CTAAATTCAGA-$KKKKNH_2$

K4TMR1: TMR-O-CTAAATTCAGA-$KKKKNH_2$

K1Flu2: FAM-O-AGTTATCCCTGC-KNH_2

Quencher probes

dSmQ1: Dabcyl-GATTTA<u>C</u>GTCT-5'

dSmQ2: Dabcyl-TCAAT<u>T</u>GGGACG-5'

d9Q2: Dabcyl-TCAATAGGG-5'

DNA targets

DNA1a: 3'-AATTTAAGTCT-5'

DNA1b: 3'-AATTTA<u>C</u>GTCT-5'

DNA1c: 3'-AATTTAAG<u>A</u>CT-5'

DNA1d: 3'-AATTT<u>T</u>AGTCT-5'

DNA1e: 3'-AATT<u>G</u>AAGTCT-5'

DNA1f: 3'-AA<u>C</u>TTAAGTCT-5'

DNA2a:3'-TCAATAGGGACG-5'

DNA2b : 3'-TCAAT<u>T</u>GGGACG-5'

DNA2c: 3'-TCAAT<u>C</u>GGGACG-5'

DNA2d : 3'-TCAAT<u>G</u>GGGACG-5'

DNA2e: 3'-TCAA<u>A</u>AGGGACG-5'

DNA2f: 3'-TCAATAG<u>C</u>GACG-5'

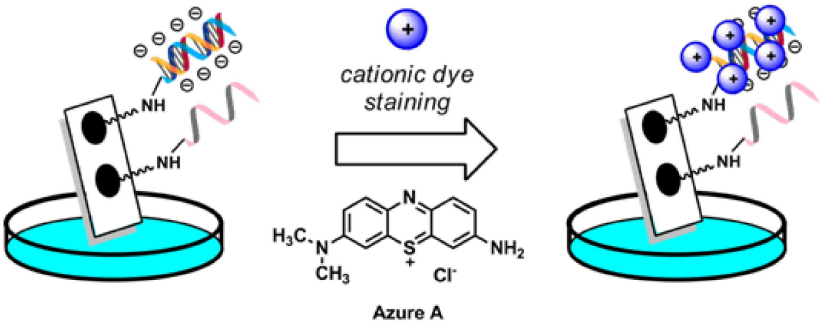
[b][sensor probe] = 0.05 μM, [quencher probe] = [DNA target] = 0.50 μM, excitation wavelength = 480 nm (FAM) or 550 nm (TAMRA). การวัดทั้งหมดทำที่ 20 °C

[c] F0 คือสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของ displacment probe complex เมื่อเริ่มต้น

[d] ตัวเลขในวงเล็บคือค่า discrimination factor ซึ่งนิยามว่าเป็น $[(F/F_0)_{comp}/(F/F_0)_{mismatch}]$

ระบบนี้ยังมีข้อจำกัดคือต้องใช้ปริมาณ quencher probe และ DNA เป้าหมายในปริมาณที่สูงจึงจะตรวจวัดได้ และ kinetics ของการแทนที่ยังค่อนข้างช้า ใช้เวลาในหลักชั่วโมงการแทนที่จึงจะถึงสมดุล ซึ่งสามารถเร่งได้ด้วยการให้ความร้อน อย่างไรก็ตามวิธีการให้ความร้อนนี้ไม่สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการตรวจวัด in vivo ได้ จึงยังต้องมีการพัฒนาต่อไป อย่างไรก็ตามงานวิจัยในส่วนนี้ได้รับการตีพิมพ์แล้ว[14]

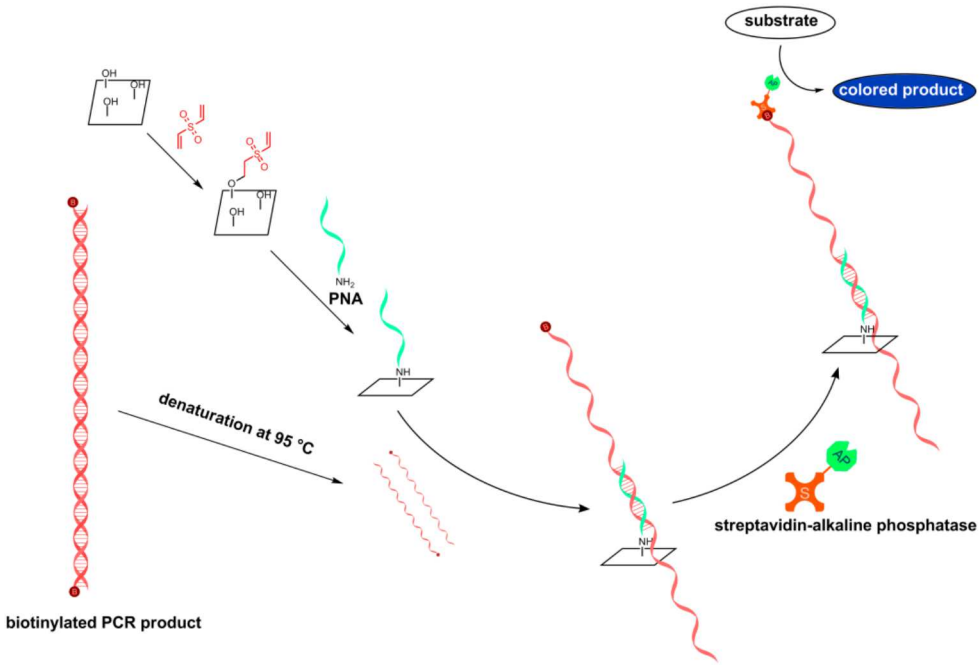
5. Paper-based device for DNA detection



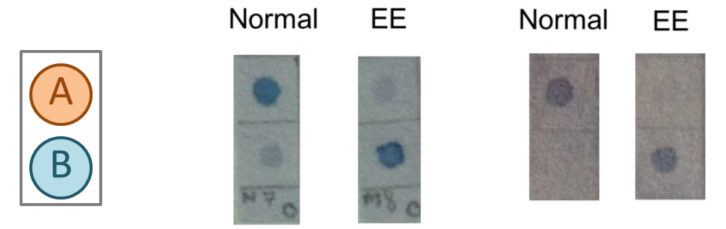
รูปที่ 19 หลักการตรวจวัดดีเอ็นเอโดยใช้พีเอ็นเอที่ตรึงบนกระดาษเซลลูโลสร่วมกับการย้อมสีด้วย cationic dye ซึ่งจะเลือกจับเฉพาะบริเวณที่มีดีเอ็นเออยู่

งานวิจัยในส่วนนี้เป็นพัฒนากระบวนการตรึงพีเอ็นเอบน solid support ที่เป็นกระดาษเซลลูโลสเพื่อนำไปพัฒนาเป็นอุปกรณ์ในตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ใช้งานได้ง่าย โดยในเบื้องต้นได้มีการพัฒนาวิธีการตรึงพีเอ็นเอโพรบบน โดยผ่านกระบวนการเชื่อมขวางด้วย divinyl sulfone (DVS) หรือโดยผ่านกระบวนการ reductive amination ของ lysine-modified PNA กับกระดาษเซลลูโลสที่ผ่านกระบวนการออกซิไดส์ให้เป็นแอลดีไฮด์ และตรวจวัดการจับยึดกับดีเอ็นเอที่ติดฉลากเรืองแสง (Fluorescein) และดีเอ็นเอที่ไม่ติดฉลากร่วมกับการย้อมด้วยสี Azure A ซึ่งมีประจุบวก และจะติดเฉพาะกับส่วนของดีเอ็นเอซึ่งมีประจุลบเท่านั้น (**รูปที่ 19**) แต่พบปัญหาคือความไวของการตรวจวัดที่ยังไม่สูงนัก คืออยู่ที่ 40 ng ซึ่งเทียบเท่ากับ 3 pmol ของดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่ความยาว 40nt แม้จะได้ตีพิมพ์ผลงานไปแล้วในลักษณะของ proof-of-concept paper[15] (เป็นผลงานวิจัยร่วมกับโครงการ "การตรึงพิร์โรลิดินิลเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิดบนกระดาษเพื่อใช้เป็นอุปกรณ์ตรวจวัดดีเอ็นเอ" ของ ดร.ธนิษฐ์ ปราณีนรารัตน์ สัญญาเลขที่ DBG5580007) ซึ่งให้ specificity ที่เป็นที่น่าพอใจ กล่าวคือสามารถบอกความแตกต่างของ mismatch แต่ sensitivity ยังไม่เพียงพอต่อการนำไปใช้งานกับตัวอย่างดีเอ็นเอจริง

ต่อมาจึงได้พัฒนาระบบตรวจวัดให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นโดยอาศัยเทคนิคการขยายสัญญาณด้วยเอนไซม์ และการนำไปใช้กับตัวอย่างจริง ซึ่งเป็นงานวิจัยร่วมกับกลุ่มวิจัยของ ศ.ดร.สุทัศน์ ฟูเจริญ ศูนย์วิจัยธาลัสซีเมีย สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล เพื่อพัฒนาระบบ reversed dot blot สำหรับการตรวจวัดรูปแบบของโรค thalassemia ชนิดต่างๆ จากดีเอ็นเอ โดยตัวอุปกรณ์ตรวจวัดยังคงสร้างขึ้นจากการตรึงพีเอ็นเอโพรบบนกระดาษเซลลูโลสเช่นเดิม แต่เปลี่ยนวิธีการตรวจวัดเป็นการใช้ biotinylated DNA target ร่วมกับปฏิกิริยาการสร้างสีด้วยเอนไซม์ alkaline phosphatase ที่เชื่อมต่อกับ streptavidin ดังแสดงใน**รูปที่ 20** ซึ่งเป็นวิธีการที่กลุ่มวิจัยของ ศ.ดร.สุทัศน์ ได้พัฒนาขึ้นมาก่อนหน้านี้แล้วโดยอาศัยดีเอ็นเอโพรบ[16] แต่ระบบดังกล่าวมีข้อจำกัดที่สำคัญคือการควบคุมอุณหภูมิที่ต้องจำเพาะมาก มิฉะนั้นจะไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่าง single mismatched DNA targets ได้ การใช้พีเอ็นเอโพรบซึ่งสามารถบอกความแตกต่างของ single mismatch ได้ดีกว่าน่าจะช่วยแก้ปัญหานี้ได้



รูปที่ 20 หลักการทำงานของ paper-based device for DNA detection โดยใช้การขยายสัญญาณด้วยเอนไซม์



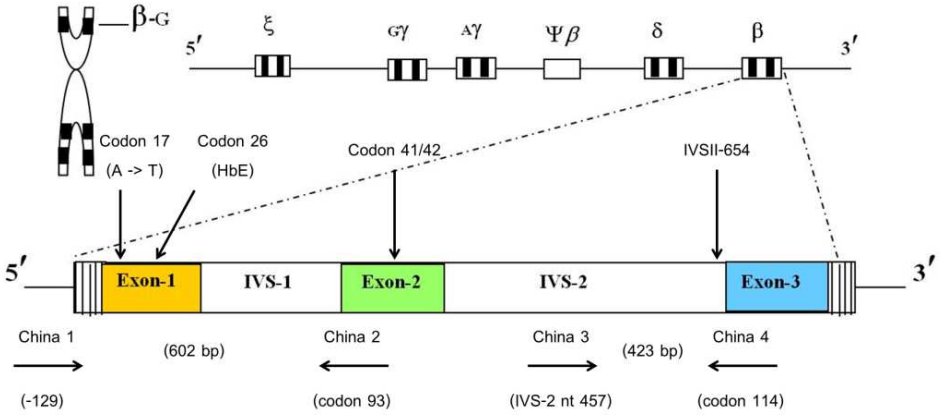
PNA probe A: R06 normal AcLys-GCCTCACCACCA-NH_2

B: R06 mutant AcLys-GCCTTACCACCA-NH_2

รูปที่ 21 การจำแนกความแตกต่างของดีเอ็นเอปกติ (normal) กับ HbE (EE) โดยใช้ paper-based device ที่พัฒนาขึ้น a) device layout b) detection of synthetic oligonucleotides c) detection of 279bp PCR products โดยทำที่อุณหภูมิห้อง

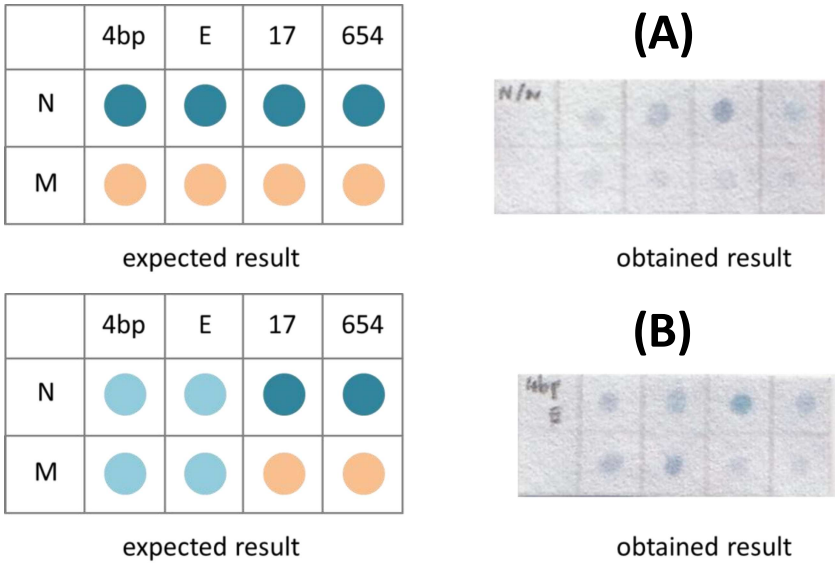
งานที่ได้ทำในเบื้องต้นเพื่อพิสูจน์หลักการคือการตรึงพีเอ็นเอโพรบสองชนิดสำหรับแยกแยะดีเอ็นเอ HbE (G->A mutation ที่ตำแหน่ง codon 26) จากดีเอ็นเอปกติบนกระดาษเซลลูโลสผ่าน DVS จากนั้นจึงนำไปไฮบริไดซ์กับ biotinylated oligodeoxynucleotide target และทำปฏิกิริยาสร้างสีด้วย ALP-streptavidin ซึ่งจะพบจุดสีในตำแหน่งที่คาดไว้จริง แต่พบปัญหากับตัวอย่างดีเอ็นเอจริงที่ได้จากกระบวนการ PCR กล่าวคือจะได้สภาพไวที่ไม่ดีนักเมื่อเทียบกับเมื่อใช้ดีเอ็นเอเป็นโพรบ และยิ่งแย่ลงเมื่อตัวอย่างมีความยาวเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม เมื่อเปลี่ยนชนิดของพีเอ็นเอโพรบจาก acpcPNA เป็น *epi*-acpcPNA ซึ่งแสดงความสามารถในการจับยึดกับ DNA ที่เป็น GC rich sequence ได้ดีกว่า พบว่าให้ผลที่ดีขึ้น กล่าวคือสามารถตรวจวัดดีเอ็นเอที่ได้จาก PCR ที่ความยาว 279 คู่เบสได้ โดยสามารถแยกแยะความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอปกติกับ HbE ได้อย่างชัดเจนที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งไม่สามารถทำได้โดยดีเอ็นเอโพรบปกติ ดังแสดงใน**รูปที่ 21**

จากผลเบื้องต้นนี้ได้ขยายขอบเขตของงานต่อไปโดยการสังเคราะห์และตรึงพีเอ็นเอโพรบที่ออกแบบมาสำหรับการตรวจวัดการกลายพันธุ์บนดีเอ็นเอที่เกี่ยวเนื่องกับธาลัสซีเมียชนิดอื่นๆ อีก 3 ตำแหน่ง (**รูปที่ 22**) บนอุปกรณ์ตรวจวัดชิ้นเดียวกันเพื่อการตรวจสอบรูปแบบของโรคธาลัสซีเมียชนิดต่างๆ ได้ในครั้งเดียว โดยได้ตรึงโพรบทั้งหมด 4 คู่



รูปที่ 22 บริเวณของ β-gene ที่สนใจจะศึกษา mutation ซึ่งประกอบด้วยสองส่วน (602bp และ 423bp)

อย่างไรก็ตาม ผลการตรวจสอบเบื้องต้นโดยวิธีเดียวกันที่อุณหภูมิห้อง (**รูปที่ 23**) พบว่าการใช้โพรบทั้งสี่คู่ร่วมกันยังไม่สามารถแยกแยะความแตกต่างของดีเอ็นเอได้ไม่เป็นที่น่าพอใจนัก การทดลองที่จะทำต่อไปคือการปรับภาวะของการไฮบริไดซ์และการทำให้เกิดสัญญาณเพิ่มเติมเพื่อให้แยกแยะความแตกต่างได้ชัดเจนยิ่งขึ้น จากนั้นจะนำไปทดสอบประสิทธิภาพกับตัวอย่างจริงเทียบกับวิธีมาตรฐานต่อไป โดยงานในส่วนนี้กำลังอยู่ระหว่างการพัฒนาเพื่อต่อยอดงานวิจัยนี้ให้ออกไปสู่เป็นผลิตภัณฑ์ตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียที่ใช้งานได้จริงต่อไป โดยได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยเพิ่มเติมจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางการแพทย์ (CEMB) ปีงบประมาณ 2560



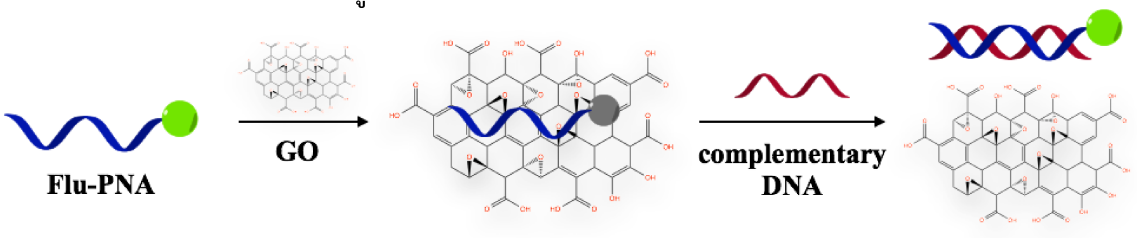
รูปที่ 23 การจำแนกความแตกต่างของดีเอ็นเอปกติและที่มีมิวเตชันที่ทำให้เกิดโรคธาลัสซีเมียโดยใช้ paper-based device ที่พัฒนาขึ้น A) ตัวอย่างดีเอ็นเอชนิด normal/normal B) ตัวอย่างดีเอ็นเอชนิด βE/β4bp หมายเหตุ: เนื่องจากบริเวณที่จะศึกษาอยู่คนละช่วงกัน จึงต้องมีการแยกทำ PCR เป็นสองส่วน (600+400bps)

6. DNA detection using nanomaterials and PNA probes

งานวิจัยภายใต้หัวข้อนี้เกี่ยวข้องกับการพัฒนาระบบตรวจลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยใช้วัสดุนาโนร่วมกับพีเอ็นเอโพรบ ซึ่งทั้งหมดจะอาศัยหลักการเดียวกันคือการเกิดอันตรกิริยาทางไฟฟ้าสถิตที่แตกต่างกันระหว่างวัสดุนาโนที่มีประจุลบกับพีเอ็นเอที่มีประจุบวก และกับพีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอไฮบริดซึ่งมีประจุลบ ซึ่งเป็นการใช้สมบัติที่โดดเด่นของพีเอ็นเอที่ไม่สามารถทำได้กับดีเอ็นเอหรือโอลิโกนิวคลีโอไทด์โพรบอื่นๆซึ่งมีประจุลบ โดยจะแยกอภิปรายตามชนิดของวัสดุนาโนที่ใช้

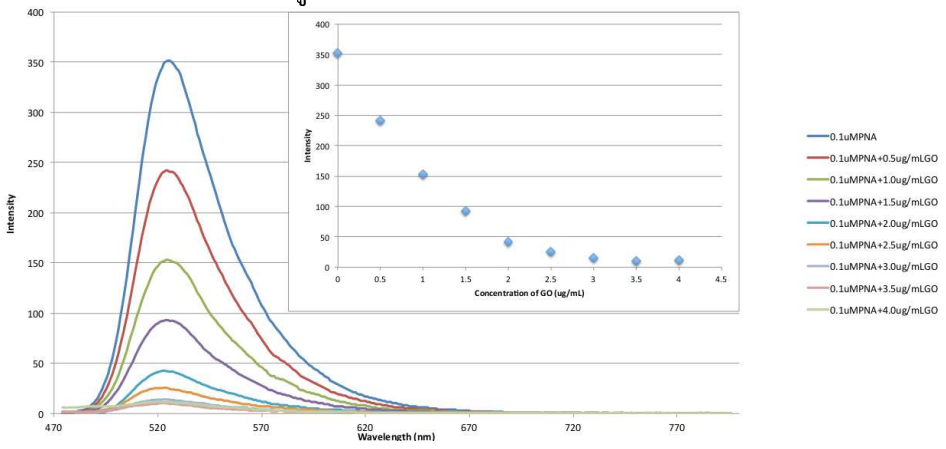
a) Graphene oxide (GO)

กราฟีนออกไซด์ (GO) เป็นวัสดุนาโนที่ได้รับความสนใจอย่างมากเนื่องจากสามารถสังเคราะห์ได้ง่าย สามารถกระจายตัวในน้ำได้ดี และมีสมบัติโดดเด่นหลายประการ เช่น ความสามารถในการดูดซับดีเอ็นเอสายเดี่ยวได้ดีกว่าดีเอ็นเอที่เข้าคู่กันเป็น duplex มาก นอกจากนี้ GO ยังแสดงสมบัติเป็นตัวเควนเชอร์ที่ดี ทำให้ดีเอ็นเอที่ติดฉลากเรืองแสงเมื่อถูกดูดซับบน GO จะมีการเรืองแสงที่ลดลง แต่เมื่อเติมดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมลงไปจะทำให้เกิด DNA duplex ซึ่งถูกดูดซับโดย GO ได้น้อยลง ดังนั้นการเรืองแสงก็จะเพิ่มมากขึ้น หลักการดังกล่าวได้ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยใช้ดีเอ็นเอ[17] หรือพีเอ็นเอชนิดดั้งเดิม (aegPNA)[18] ที่ติดฉลากเรืองแสงเป็นโพรบ อย่างไรก็ตามยังพบข้อจำกัดอยู่ในงานวิจัยนี้จะใช้ GO ร่วมกับ acpcPNA ที่ติดฉลากเรืองแสงเพื่อเป็นโพรบแทน DNA โดยคาดหมายว่าจะให้ความจำเพาะเจาะจงที่ดีขึ้น โดยมีหลักการทำงานดัง**รูปที่ 24**

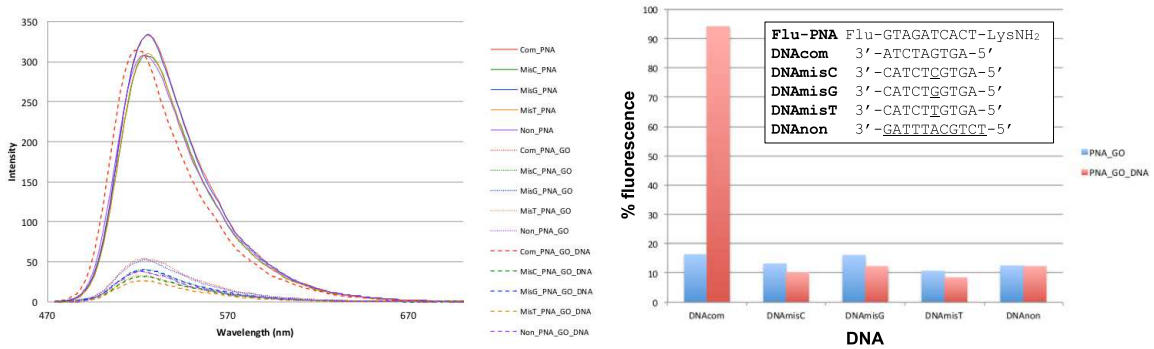


รูปที่ 24 หลักการทำงานของ GO-PNA DNA sensor ที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้

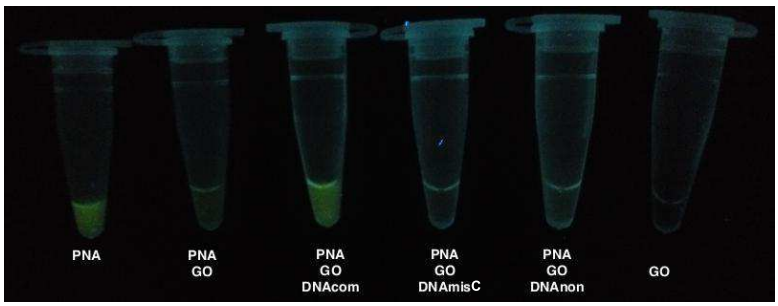
ในเบื้องต้นได้ทดลองเพื่อพิสูจน์หลักการโดยการไทเทรตสารละลายของพีเอ็นเอที่ติดฉลากเรืองแสง FAM-PNA (ดูลำดับเบสใน**รูปที่ 26B**) ที่ความเข้มข้น 0.1 μM ด้วย GO (ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.สกุลสุข อุ่นอรุโณทัย ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน และติดตามการเรืองแสงด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์ พบว่าการเรืองแสงของ FAM-PNA จะลดลงตามปริมาณของ GO ที่เติมเข้าไป เช่นเดียวกับที่เคยมีรายงานมาก่อนในกรณีของดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่ติดฉลากเรืองแสง โดยการเรืองแสงที่ลดลงจะเริ่มคงที่ที่ความเข้มข้นของ GO ประมาณ 3.5 μg/mL โดยคิดเทียบเป็นการเรืองแสงที่ลดลงถึงกว่า 90% (**รูปที่ 25**)



รูปที่ 25 การเรืองแสงของ FAM-PNA (ดูลำดับเบสในรูปที่ 8B) ที่ความเข้มข้น 0.1 μM ด้วย GO ที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0-4 μg/mL ใน 10 mM Tris-HCl pH 7.4, λ_{exc} 460 nm



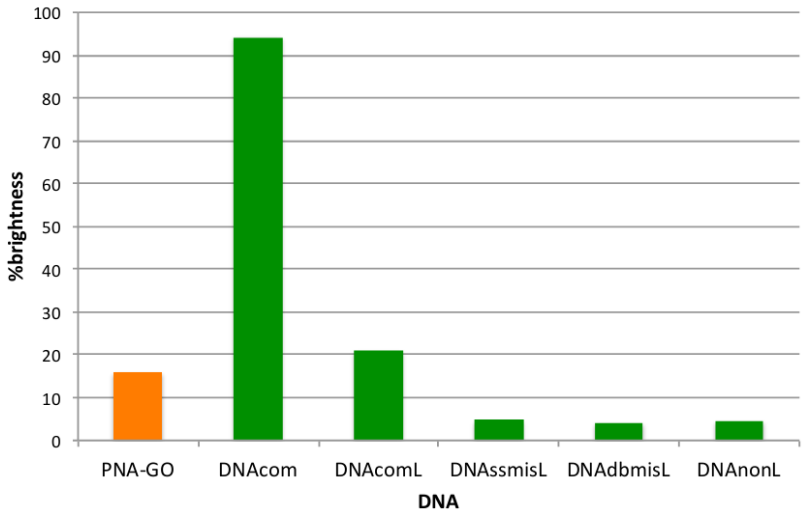
(A) (B)



(C)

รูปที่ 26 การเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงของ FAM-PNA เมื่อมี GO และ DNA ชนิดต่างๆ อยู่ด้วย (ดูลำดับเบสในรูปที่ 8B) รูป (A) และ (B) ทำที่ [PNA] = 0.1 μM, [DNA] = 0.12 μM; [GO] = 1.25 μg/mL ใน 10 mM Tris-HCl pH 7.4, λ_{exc} 460 nmรูป (C) ทำที่ [PNA] = 20 μM, [DNA] = 24 μM; [GO] = 150 μg/mL ใน 10 mM HEPES buffer pH 7.4 containing 25 mM NaCl, photographed under black light

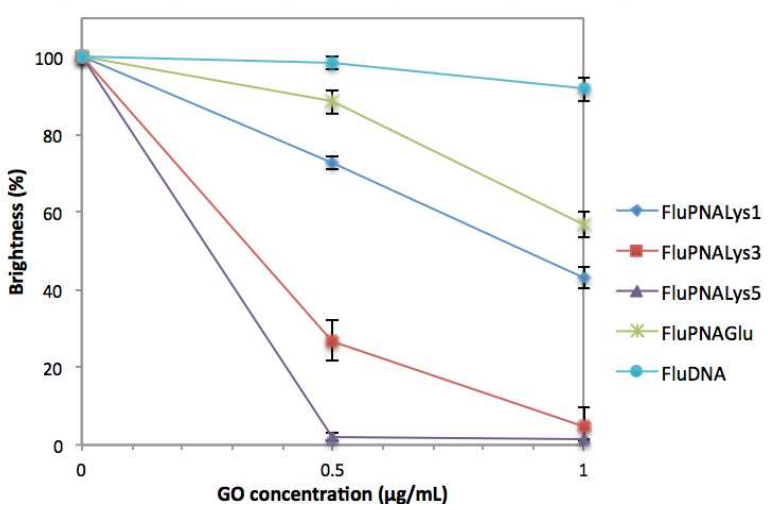
การทดลองต่อมาเป็นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงของ PNA-GO เมื่อมีดีเอ็นเออยู่ด้วย โดยเปรียบเทียบทั้งดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สม (DNAcom) และเมื่อมีลำดับเบสผิดไปหนึ่งตำแหน่ง (DNAmisC, DNAmisG และ DNAmisT) ผลที่ได้คือเฉพาะในกรณีที่มีดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สมเท่านั้นที่การเรืองแสงกลับเพิ่มขึ้นไปจนเกือบเท่ากับเมื่อก่อนเติม GO ส่วนในกรณีอื่นการเรืองแสงจะไม่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิมมากนัก (รูปที่ 26A และ **26B**) ซึ่งสามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่าภายใต้แสงยูวีถ้าความเข้มข้นสูงพอ (**รูปที่ 26C**) โดยที่ kinetics ของการเกิดปฏิกิริยาเกิดอย่างรวดเร็ว ซึ่งแสดงถึงศักยภาพของ acpcPNA ในการนำไปใช้ร่วมกับ GO เป็นเครื่องมือในการตรวจลำดับเบสของดีเอ็นเอที่อย่างรวดเร็วและให้ความแม่นยำสูง



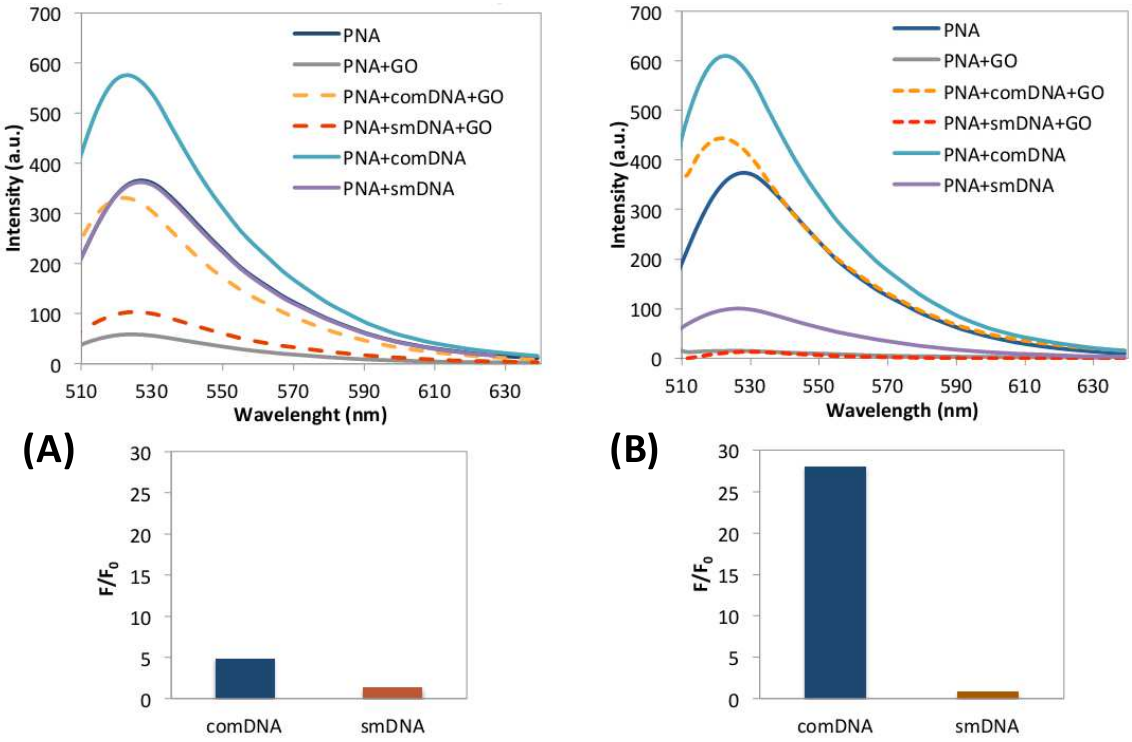
รูปที่ 27 การเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงของ **PNA1**+GO ก่อน และหลังการเติม DNA ชนิดต่างๆ ภาวะของการทดลองคือ [PNA] = 0.1 μM, [DNA] = 0.12 μM, [GO] = 1.5 μg/mL ใน 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4, λ_{ex} 460 nm ลำดับเบสของ PNA และ DNA ที่เกี่ยวข้องเป็นดังนี้: **PNA1:** FAM-GTAGATCACT-LysNH$_2$; **DNAcom:** 3'-CATCTAGTGACA-5'; **DNAcomL:** 3'-GGTCCCGTACCATCTAGTGACATGCGGCGC-5'; **DNAssmmL:** 3'-GGTCCCGTACCATCTTGTGACA TGCGGCGC-5'; **DNAdbmmL:** 3'-GGTCCCGTACCATCGCGTGACATGCGGCGC-5'; **DNAnonL:** 3'- GCGCCGCATGT CACTAGATGGTACGGGACC -5'

นอกจากนี้ยังได้ศึกษาการตรวจวัดกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีลำดับเบสยาวขึ้น (30 เบส) และการศึกษาการตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายที่เป็น dsDNA ซึ่งจะสอดคล้องกับสถานการณ์ของการนำไปประยุกต์ใช้จริงมากกว่า ปัญหาที่พบเมื่อใช้ดีเอ็นเอที่ยาวขึ้นคือการเรืองแสงของ Fluorescein-labeled PNA probe ไม่กลับคืนสู่จุดเดิมเมื่อเติมดีเอ็นเอคู่สมลงไป แต่ยังคงแสดงความจำเพาะเจาะจงอยู่ (**รูปที่ 27**) คาดว่าเกิดจากการ quench ของฉลาก Fluorescein โดยนิวคลีโอเบสของ DNA คู่สม ส่วนที่เป็น extra hanging nucleotides ทางปลายด้าน 3' ที่จะอยู่ในระยะที่สามารถเกิด interaction กับ Fluorescein ที่อยู่ตรงปลายด้าน N ของพีเอ็นเอโพรบ แนวทางในการแก้ปัญหาคือการใช้ฉลากชนิดอื่นที่ไม่เปลี่ยนแปลงการเรืองแสงเมื่อเกิดการเข้าคู่ระหว่างพีเอ็นเอกับดีเอ็นเอ หรืออาจเกิดจากการที่ดีเอ็นเอส่วนที่เป็น overhang สายเดี่ยวสามารถถูกดูดซับบน GO ได้บ้าง

สิ่งที่ได้ค้นพบเพิ่มเติมต่อมาคืออิทธิพลของประจุบวกบนสายพีเอ็นเอ โดยได้พบว่าพีเอ็นเอโพรบที่มีประจุบวกเพิ่มขึ้น (FAM-PNA-Lys5) จะถูกระงับแสงโดย GO ได้ดีกว่าพีเอ็นเอโพรบปกติ (FAM-PNA-Lys1) โดยพบว่าใช้ GO เพียง 0.5 μg/mL ก็ทำให้เกิดการ quench ของสัญญาณของ FAM-PNA-Lys5 อย่างสมบูรณ์เมื่อเทียบกับ FAM-PNA-Lys1 ซึ่งถูก quench ไปเพียง 60% ในทำนองเดียวกันพีเอ็นเอที่มีประจุเป็นลบ (FAM-PNA-Glu) และดีเอ็นเอโพรบ (FAM-DNA) จะถูก quench ได้น้อยกว่าพีเอ็นเอโพรบปกติ (FAM-PNA-Lys1) ดังแสดงใน**รูปที่ 28** ซึ่งสอดคล้องกับกลไกของการระงับแสงที่คาดว่าจะถูกควบคุมโดยแรงกระทำทางไฟฟ้าสถิตร่วมกับอันตรกิริยาระหว่างนิวคลีโอเบสและพื้นผิวของ GO เป็นหลัก นอกจากนี้การแยกแยะความแตกต่างของดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับที่ผิดไปหนึ่งตำแหน่งโดย FAM-PNA-Lys5 probe จะดีกว่า FAM-PNA-Lys1 probe มาก ดังแสดงในรูปที่ 29 และยังมี detection limit ที่ต่ำลงกว่า 40 เท่า กล่าวคือ 0.11±0.3 nM ซึ่งถือว่าเป็นการพัฒนาที่สำคัญ และเป็นสิ่งที่ยังไม่เคยมีผู้รายงานมาก่อนในบทความวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ PNA-GO ทั้งหมดที่ผ่านมา[17,18]



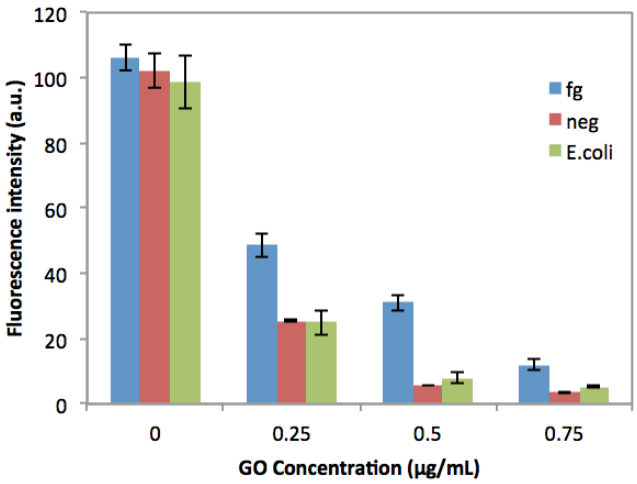
รูปที่ 28 กราฟแสดงการระงับสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ของพีเอ็นเอ FAM-PNA-Lys, FAM-PNA-Lys3, FAM-PNA-Lys5, FAM-PNA-Glu ซึ่งมีลำดับเบสเดียวกันคือ GTAGATCACT และ FAM-DNA โดย GO ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน; [PNA] = 0.1 μM ใน 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4



รูปที่ 29 เปรียบเทียบการแยกแยะความแตกต่างของดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีลำดับเบสเป็นคู่สม (comDNA: 5'-AGTGATCTAC-3') กับที่มีลำดับเบสผิดไปหนึ่งตำแหน่ง (misDNA: 5'-AGTGCTCTAC-3') โดย FAM-PNA-Lys1 (A) และ FAM-PNA-Lys5 (B) ที่มีลำดับเบสเป็น GTAGATCACT ที่ความเข้มข้นของ GO = 1.25 μg/mL (FAM-PNA-Lys1) หรือ 0.5 μg/mL (FAM-PNA-Lys5); [PNA] = 0.1 μM ใน 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4

การทดลองที่ได้ทำต่อมาคือการหา detection limit จาก 3SD(blank)/slope ของ calibration curve ซึ่งพบว่าขึ้นกับปริมาณของ GO ที่ใส่เข้าไป สำหรับ FAM-PNA-Lys1 การใช้ปริมาณ GO ที่ความเข้มข้น 1.0 μg/mL จะให้ตัวเลขที่ดีที่สุดคือ 0.70±0.02 nM ขณะที่ FAM-PNA-Lys5 นั้นใช้ปริมาณ GO เพียง 0.5 μg/mL และได้ค่าขีดจำกัดในการตรวจวัดต่ำลงถึง 0.073±0.009 nM

สำหรับการศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ FAM-PNA-Lys5 probe ที่มีลำดับเบสเป็น GCTTTTTTACA ร่วมกับ GO เพื่อทดสอบกับดีเอ็นเอตัวอย่างจริงซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากการทำพีซีอาร์ โดยเปรียบเทียบความแตกต่างของสัญญาณหลังจากเติม GO ระหว่างดีเอ็นเอคู่สม (fg) กับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสผสม (neg และ *E. coli*) พบว่าการเรืองแสงของโพรบถูกระงับเกือบสมบูรณ์เมื่อใช้ปริมาณ GO เพียง 0.5 μg/mL และแม้ว่าการเรืองแสงจะให้สัญญาณที่ต่ำ แต่ก็เพียงพอต่อการแยกความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอคู่สมกับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสผสมดัง**รูปที่ 10** ซึ่งจากผลข้างต้นแสดงให้เห็นได้ว่าเราสามารถบ่งชี้ลำดับเบสของดีเอ็นเอจากตัวอย่างจริงได้ในระบบตรวจวัดที่ไม่ซับซ้อน นอกจากนี้ยังคาดว่าน่าจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของการตรวจวัดโดยการปรับภาวะเช่น ความเข้มข้นของเกลือ การใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ หรือการเพิ่มอุณหภูมิ



รูปที่ 30 เปรียบเทียบความแตกต่างของการเรืองแสงของดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีลำดับเบสเป็นคู่สม (fg) กับที่มีลำดับเบสผสม (neg และ E. Coli) ใช้พีเอ็นเอโพรบมีลำดับเบสเป็น GCTTTTTTACA ที่ความเข้มข้นของ GO = 0.5 µg/mL; [PNA] = 0.1 µM ใน 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4

นอกจากนี้ยังได้ศึกษาถึงความเป็นไปได้เบื้องต้นในการตรวจสอบลำดับเบสของ double stranded DNA target โดยตรง ซึ่งพบว่าจำเป็นต้องใช้พีเอ็นเอโพรบสองสาย ที่ออกแบบให้จับกับดีเอ็นเอในบริเวณเดียวกันแต่เป็นคนละสายตามหลักการของ DNA double duplex invasion และพีเอ็นเอทั้งสองสายจะต้องมี lysine หลายๆ หน่วยเพื่อเพิ่มความแข็งแรงในการจับยึดกับดีเอ็นเอ จึงจะทำให้สามารถสามารถตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายที่เป็นสายคู่ได้โดยตรง ซึ่งจะเห็นได้จากหลังเติม GO ไปแล้วจะยังเหลือค่า residual fluorescence ที่สูงถึง 79% ซึ่งใกล้เคียงกับกรณีของการตรวจวัด DNA สายเดี่ยวที่มีค่า % residual fluorescence 93% โดยตัวเลขนี้นิยามว่าคือ (Fluorescence after adding GO/Fluorescence before adding GO) × 100 โดยค่าที่มากแสดงถึงว่ามี PNA probe อยู่ในสารละลายมาก (100% = complete restoration) ส่วนตัวเลขที่น้อยในกรณีของ unrelated DNA duplex และเมื่อมี PNA probe เพียงตัวเดียว แสดงว่า PNA probe ไม่ได้จับอยู่กับดีเอ็นเอ จึงถูกดูดซับโดย GO มาก (**ตารางที่ 3**) แต่ยังพบปัญหาคือการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงยังไม่ชัดเจนเท่ากับกรณีของการตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายที่เป็นสายเดี่ยวซึ่งอาจเกิดจากการเกิด invasion ที่ยังไม่สมบูรณ์ จึงยังต้องมีการพัฒนาต่อไป

ตารางที่ 3 การเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงของพีเอ็นเอโพรบกับดีเอ็นเอชนิดต่างๆ ก่อนและหลังเติม GO (แสดงในรูปของ residual fluorescence - ดูนิยามใน footnote)

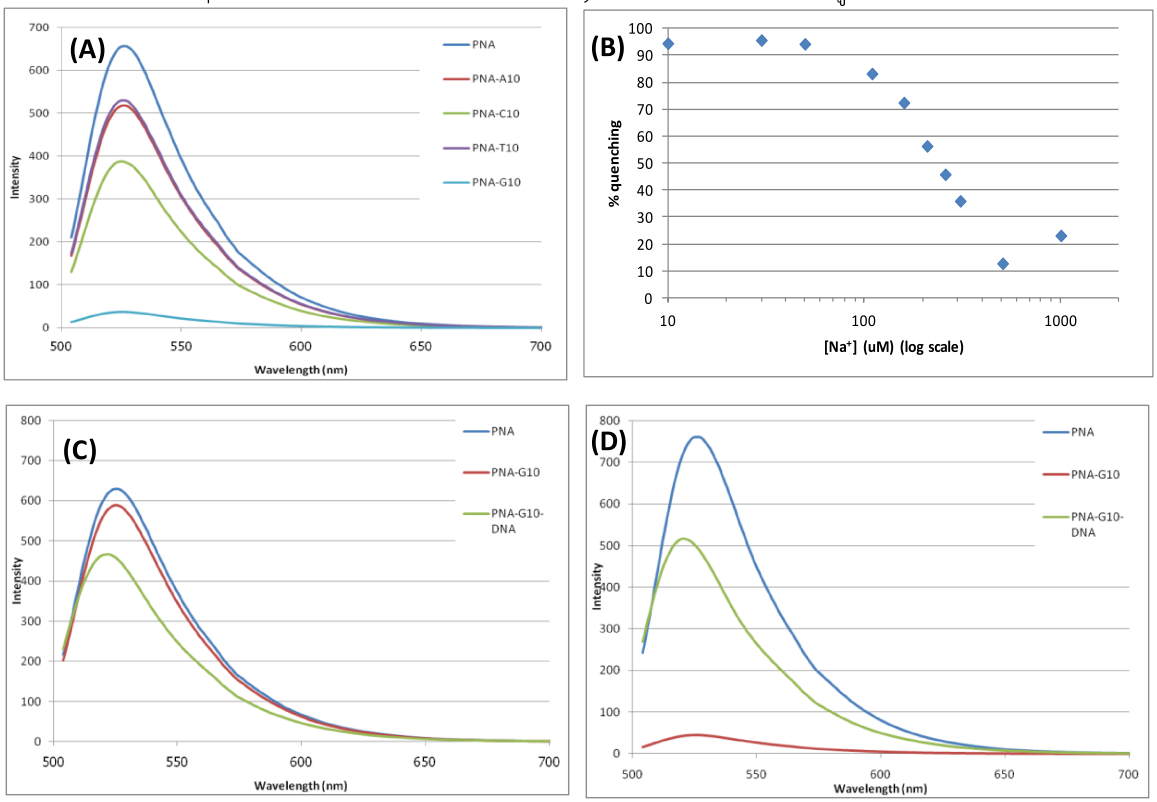
System[a]	Residual fluorescence (%)[b]	Remarks
PNA1+**DNA1**	93	complementary ssDNA
PNA1+(**DNA1**+**DNA2**)	10	complementary dsDNA, one PNA probe
PNA1+(**DNA1**+**DNA2**)+**PNA2**	79	complementary dsDNA, two PNA probes
PNA1+(**DNA3**+**DNA4**)+**PNA2**	11	unrelated dsDNA, two PNA probes

[a]**PNA1**: FAM-GTAGATCACT-$(Lys)_5NH_2$; PNA2: Ac-AGTGATCTAC-$(Lys)_5NH_2$; **DNA1**: 3'-GGTCCCGTACCATCTAGTGA CATGCGGCGC-5'; DNA2: 5'-CCAGGGCATGGTAGATCACTGTACGCCGCG-3'; **DNA3**: 3'-GGATGTTCGCGGCTGACAA CCGCGGCCCCG-5'; DNA4: 5'-CCTACAAGCGCCGACTGTTGGCGCCGGGGC-3'; conditions: [PNA] = 1 µM; [DNA] = 1.2 µM; [GO] = 5 µg/mL in 10 mM Tris-HCl pH 7.4

[b](Fluorescence after adding GO/Fluorescence before adding GO) × 100; 100% = complete restoration of fluorescence

b) Olidodeoxyguanosine

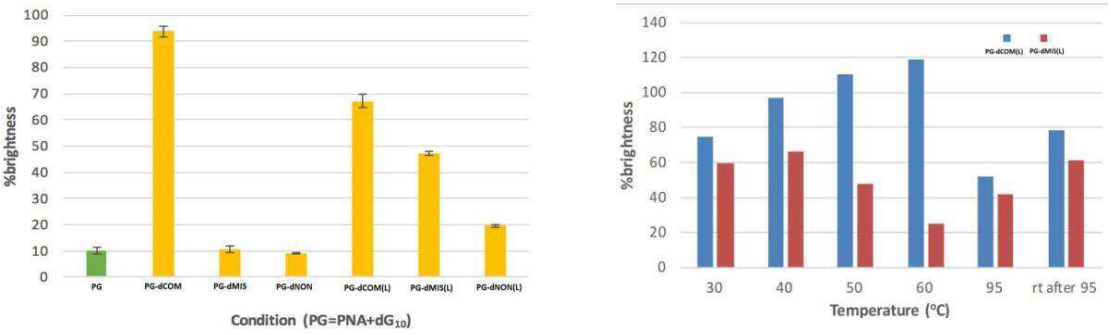
ในการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการเรืองแสงของ FAM-PNA-Lys1 และ FAM-PNA-Lys5 มีความสัมพันธ์กับดีเอ็นเอที่มาเข้าคู่กัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อดีเอ็นเอมี extra hanging bases ที่ปลายด้าน 3' (ซึ่งจะอยู่ใกล้กับฉลาก FAM) ซึ่งคาดว่าจะเกิดจาก อันตรกิริยาระหว่างนิวคลีโอเบสกับฟลูออเรสซีน ซึ่งเป็นสิ่งที่ทราบกันดีอยู่แล้ว แต่ในบางกรณี แม้ว่าลำดับเบสของดีเอ็นเอและพีเอ็นเอจะไม่เกี่ยวข้องกันเลยก็ยังพบว่ามีการเกิดการระงับแสงของฉลากฟลูออเรสซีนที่ติดอยู่กับพีเอ็นเอได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับ FAM-PNA-Lys5 ซึ่งมีความหนาแน่นของประจุบวกมาก จึงนำไปสู่สมมติฐานว่าการระงับแสงนี้เกิดจากอันตรกิริยาทางไฟฟ้าสถิตระหว่างพีเอ็นเอกับดีเอ็นเอแบบไม่จำเพาะเจาะจง ซึ่งส่งผลให้ฉลากเรืองแสงและนิวคลีโอเบสมาอยู่ใกล้กัน โดยเริ่มต้นจากการศึกษาผลของลำดับเบสของโอลิโกนิวคลีโอไทด์กับการระงับการเรืองแสงของ FAM-PNA-Lys5 ซึ่งพบว่า oligo(dG) มีความสามารถในการระงับแสงได้ถึงกว่า 95% เมื่อเติมลงไปในสัดส่วนโมลที่เท่ากับ FAM-PNA-Lys5 เปรียบเทียบกับ oligo(dC) ซึ่งระงับแสงได้ไม่ดีนัก (ไม่ถึง 50%) และ oligo(dA) และ oligo(dT) ซึ่งแสดงการระงับแสงที่น้อยมาก (รูปที่ 6A) โดยที่การเกิดการระงับแสงนี้ขึ้นกับความเข้มข้นของเกลือ (**รูปที่ 31B**) กล่าวคือถ้าความเข้มข้นของเกลือสูงกว่า 50 mM ประสิทธิภาพในการระงับแสงจะลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการเกิดอันตรกิริยาทางไฟฟ้าสถิตระหว่างพีเอ็นเอกับดีเอ็นเอ และความยาวของ oligo(dG) ที่ใช้มีผลต่อการระงับแสง กล่าวคือสายยาวจะมีประสิทธิภาพในการระงับแสงได้ดีกว่าสายสั้น และ dG เฉยๆ ไม่แสดงการระงับแสงของ FAM-PNA-Lys5 แม้จะใช้ที่ความเข้มข้นสูง



รูปที่ 31 (A) แสดงผลของ oligonucleotide $(dN)_{10}$ (N = A, T, C, G) ที่มีต่อการระงับแสงของ FAM-PNA-Lys5 (B) ผลของความเข้มข้นของ NaCl ที่มีต่อการระงับแสง (C) และ (D) การระงับและการคืนสัญญาณของ FAM-PNA-Lys (C) และ FAM-PNA-Lys5 (D) เมื่อเติม $(dG)_{10}$ และตามด้วยดีเอ็นเอคู่สม ตามลำดับ; ลำดับเบสของ PNA คือ GTAGATCACT และดีเอ็นเอคือ 5'-AGTGATCTAC-3'; sodium phosphate buffer pH 7.0; รูป A, C, D ใช้ [PNA] = 0.10 μM, [DNA] = $[(dG)_{10}]$ = 0.12 μM; รูป B ใช้ [PNA] = 1.0 μM, $[(dG)_{10}]$ = 1.2 μM; λ_{excit} = 490 nm

เมื่อเติมดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สมลงไปในของผสมระหว่าง FAM-PNA-Lys5 กับ $(dG)_{10}$ พบว่าจะเกิดการคืนสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ขึ้น (**รูปที่ 31D**) ในขณะที่ FAM-PNA-Lys ไม่พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับก่อนเติม DNA และ $(dG)_{10}$ (รูปที่ 6C) ผลการทดลองเบื้องต้นนี้น่าสนใจมาก และเสนอแนะว่าอาจใช้ oligo(dG)

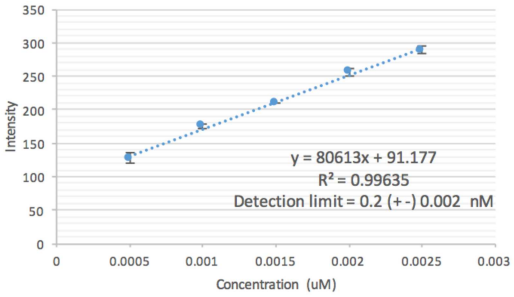
เป็นตัวระงับแสงในลักษณะเดียวกับ graphene oxide หรือวัสดุนาโนอื่นๆ เพื่อใช้ร่วมกับพีเอ็นเอโพรบที่ติดฉลากเรืองแสง สำหรับการตรวจลำดับเบสของดีเอ็นเอ



(A) (B)

รูปที่ 32 (A) แสดงผลของความเลือกจำเพาะของดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีผลต่อการคืนสัญญาณของ FAM-PNA-Lys5 กับ oligonucleotide $(dG)_{10}$ (B) แสดงผลของอุณภูมิที่ใช้ในการแยกความแตกต่างของดีเอ็นเอเป้าหมายสายยาว ลำดับเบสของ PNA คือ GTAGATCACT และลำดับเบสของดีเอ็นเอคือ dCOM: 5'-AGTGATCTAC-3'; dMIS: 5'-AGTGCTCTAC-3' (dMIS); dNON: 5'-TCTGAATTTAA-3'; dCOM(L): 5'-CGCGGCGTACAGTGATCTACCATGCCCTGG-3'; dMIS(L): 5'-CGCGGCGTACAGTGTTCTACCATGCCCTGG-3'; dNON(L): 5'-CCAGGGCATGGTAGATCACTGTACGCCGCG-3'; sodium phosphate buffer pH 7.0; [PNA] = 1.0 μM, $[(dG)_{10}]$ = 1.2 μM; λ_{excit} = 490 nm

นอกจากนี้ได้นำการตรวจวัดชนิดนี้ไปตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมาย (รูปที่ 33) พบว่า ในกรณีที่ดีเอ็นเอเป้าหมายมีจำนวนเบสเท่ากับตัวตรวจวัด สามารถแยกความแตกต่างได้อย่างชัดเจน โดยเมื่อเติมดีเอ็นเอคู่สมลงไปจะให้สว่างกลับคืนมาจากประมาณร้อยละ 10 เป็นร้อยละ 90 เมื่อเทียบกับความสว่างของพีเอ็นเอสายเดี่ยว ในทางกลับกันดีเอ็นเอที่มีตำแหน่งเบสผิดไปหรือดีเอ็นเอลำดับเบสผสม ไม่สามารถคืนสัญญาณกลับมาได้ แต่ในกรณีที่ดีเอ็นเอเป้าหมายมีจำนวนเบสมากกว่าตัวโพรบนั้นยังให้ผลการตรวจวัดที่ยังไม่ชัดเจนนัก เนื่องจากเกิดการรบกวนของเบสที่เกินออกมา ในกรณีนี้สามารถแก้ไขได้ด้วยการเพิ่มอุณหภูมิให้กับการตรวจวัด โดยพบว่าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสสามารถแยกความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอคู่สมสายยาวออกจากดีเอ็นที่มีตำแหน่งเบสผิดไปหนึ่งตำแหน่งได้อย่างชัดเจน

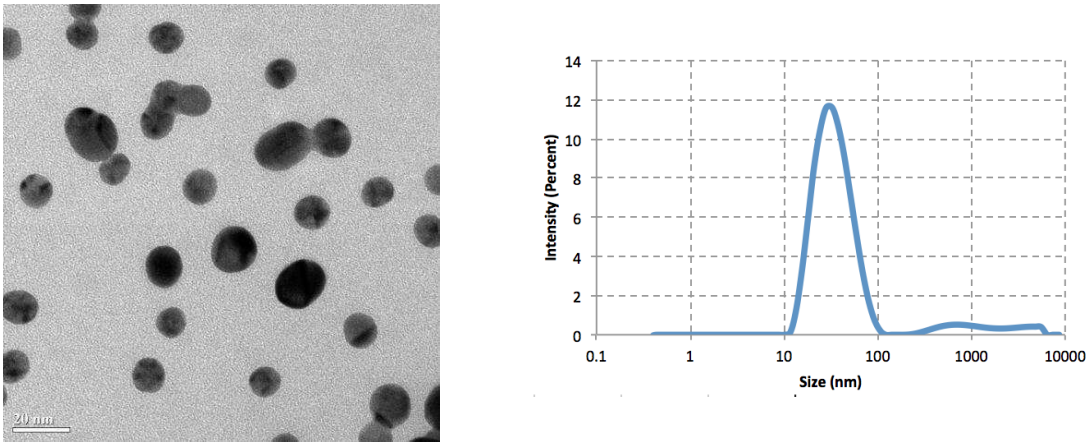


รูปที่ 34 แสดงขีดจำกัดของการตรวจวัดของ FAM-PNA-Lys5 กับ oligonucleotide $(dG)_{10}$ เพื่อตรวจวัดดีเอ็นเอคู่ ลำดับเบสของ PNA คือ GTAGATCACT และดีเอ็นเอคือ 5'-AGTGATCTAC-3' ; sodium phosphate buffer pH 7.0; [PNA] = 0.05 μM, $[(dG)_{10}]$ = 0.5-2.5 nM; λ_{excit} = 490 nm

นอกจากนี้ที่ความเข้มข้นความเข้มข้นของตัวโพรบเรืองแสง 0.05μM สามารถนำไปตรวจดีเอ็นเป้าหมายที่มีความเข้มข้นต่ำได้ถึง 0.2 nM (**รูปที่ 34**) ขณะนี้กำลังอยู่ระหว่างการศึกษาขอบเขตการใช้งาน/ข้อจำกัดของระบบใหม่นี้ รวมทั้งการศึกษากลไกของการระงับและการคืนสัญญาณของฉลากเรืองแสงต่อไป ซึ่งเมื่อเสร็จสมบูรณ์แล้วคาดว่าจะได้ผลงานตีพิมพ์อย่างน้อย 1 เรื่อง

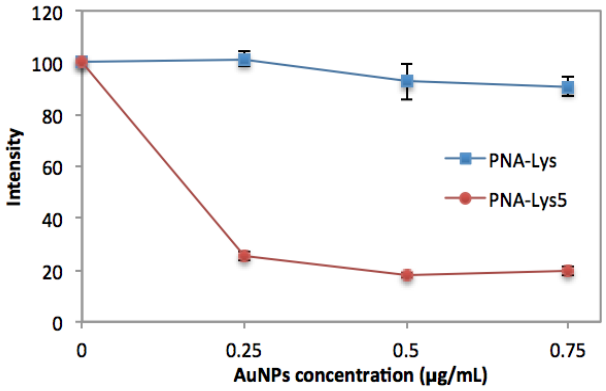
c) Gold nanoparticles **(AuNPs)**

อนุภาคขนาดนาโนของทอง (AuNPs) เป็นอีกหนึ่งวัสดุนาโนที่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายเนื่องจากวัสดุดังกล่าวมีคุณสมบติเด่นพิเศษเฉพาะตัวในหลายๆด้านซึ่งขึ้นกับขนาดและรูปร่างของอนุภาค อีกทั้งยังสังเคราะห์ได้ง่าย ไม่ยุ่งยากซับซ้อน ในงานวิจัยเลือกวิธีการสังเคราะห์อนุภาคขนาดนาโนของทองรูปทรงกลมด้วยวิธีของ Turkevich[19] โดยใช้โซเดียมซิเตรตเป็นตัวรีดิวซ์และเพิ่มความเสถียรของอนุภาค สามารถยืนยันรูปร่างและขนาดของอนุภาคด้วย Transmission electron microscopy (TEM) ได้ขนาดโดยประมาณ 13 nm และ Dynamic light scattering (DLS) ได้ขนาดโดยประมาณ 28 nm (**รูปที่ 35**)



(A) (B)

รูปที่ 35 อนุภาคนาโนทรงกลมของทองจาก TEM **(A)** และการกระจายขนาดของอนุภาคจาก DLS **(B)**

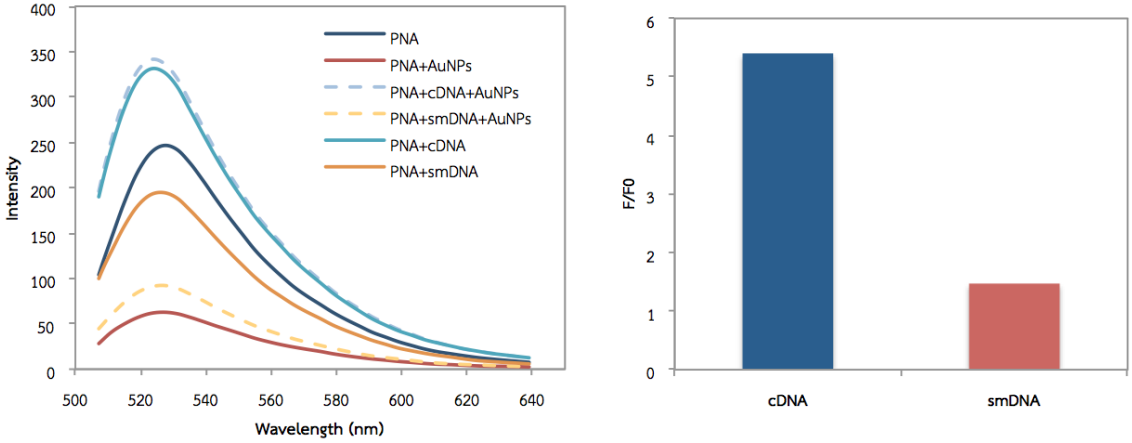


รูปที่ 36 การเรืองแสงของ FAM-PNA ที่ความเข้มข้น 0.1 µM ด้วย AuNPs ที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0-0.75 µg/mL ใน 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4

ในช่วงหลายปีที่ผ่านมามีการประยุกต์ใช้วัสดุขนาดนาโนในงานเทคโนโลยีชีวภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำมาใช้ตรวจลำดับเบสของสารพันธุกรรมอย่างหลากหลาย ซึ่งคุณสมบัติพิเศษอย่างหนึ่งของอนุภาคขนาดนาโนของทองที่สนใจนำมาศึกษาคือการดับสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ของโพรบ ทำให้ดีเอ็นเอโพรบติดฉลากเรืองแสงให้สัญญาณได้ลดลงและจะคืนกลับมาเมื่อเกิดการเข้าคู่กันระหว่างโพรบกับดีเอ็นเป้าหมายเช่นเดียวกับหลักการของ GO หลักการนี้มีผู้ศึกษามาแล้วพอสมควรในกรณีของดีเอ็นเอ แต่มีตัวอย่างค่อนข้างจำกัดในกรณีของพีเอ็นเอ เพื่อพิสูจน์หลักการดังกล่าว เบื้องต้นได้ทดลองไทเทรตเติมพีเอ็นเอโพรบลงไปในอนุภาคนาโนของทองที่ความเข้มข้นต่างๆ และติดตามสัญญาณการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนส์โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการดับสัญญาณระหว่างพีเอ็นเอที่มีประจุบวกต่างกันได้แก่ FAM-PNA-Lys1 กับ FAM-PNA-Lys5 ดัง**รูปที่ 36** พบว่าการเรืองแสงของโพรบจะลดลงเมื่อเติม AuNPs ลงไป โดยพีเอ็นเอ FAM-PNA-Lys5 ที่มีประจุบวก

มากกว่าจะถูกดับสัญญาณได้ถึง 80% เมื่อใช้ AuNPs เพียง 0.25 μg/mL ซึ่งเป็นผลมาจากแรงดึงดูดทางไฟฟ้าบนผิวของ AuNPs ที่มีซิเตรตไอออนประจุลบกับประจุบวกบนพีเอ็นเอโพรบ

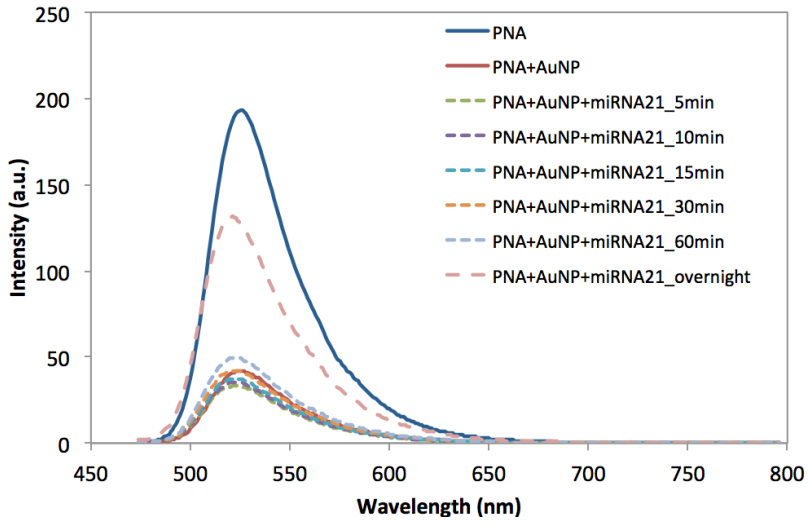
การทดลองต่อมาเป็นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงของโพรบเมื่อเติมดีเอ็นเอลงไป โดยเปรียบเทียบกันระหว่างดีเอ็นเอคู่สม (cDNA) กับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสผิดไป 1 ตำแหน่ง (smDNA) ผลที่ได้คือเฉพาะกรณีที่เติมดีเอ็นเอคู่สมเท่านั้นที่จะสามารถทำให้การเรืองแสงของโพรบคืนกลับมา ขณะที่ดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสผิดไป 1 ตำแหน่งจะให้การคืนสัญญาณที่น้อยกว่ามากภายในระยะเวลาอันสั้นดัง**รูปที่ 37** แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของ acpcPNA ที่ทำงานร่วมกับ AuNPs ได้อย่างว่องไวและมีความเลือกจำเพาะสูง



(A) (B)

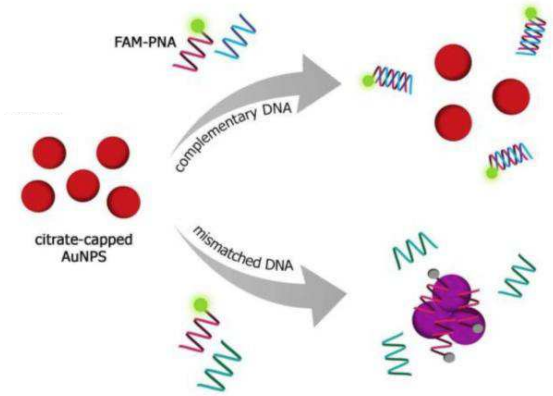
รูปที่ 37 การเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงของ FAM-PNA เมื่อมี AuNPs และ DNA ชนิดต่างๆ อยู่ด้วย โดยใช้ FAM-PNA-Lys5 ที่มีลำดับเบส GTAGATCACT ที่ [PNA] = 0.1 μM, [AuNPs] = 0.5 μg/mL ใน 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4

นอกจากนี้ยังได้ศึกษาการประยุกต์ใช้ acpcPNA probe กับ AuNPs ในการทดสอบสารพันธุกรรมชนิดอื่นเพื่อขยายขีดจำกัดในการตรวจวัด โดยได้ทำการทดลองเติมอาร์เอ็นเอสายสั้น (microRNA21) ซึ่งเป็นตัวตรวจวัดทางชีวภาพที่มีความสำคัญโดยเฉพาะอย่างยิ่งในเซลล์มะเร็ง จากนั้นวัดการคืนสัญญาณการเรืองแสงด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนส์ สำหรับ FAM-PNA-Lys5 probe ที่ใช้มีลำดับเบส AGTCTGATAAGC พบว่าสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ค่อยๆคืนกลับมาหลังจากเติมอาร์เอ็นเอลงไป แต่ปัญหาที่พบคืออัตราในการคืนสัญญาณช้ากว่าการเติมดีเอ็นเอมาก แต่อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองดังกล่าวพอชี้ให้เห็นถึงการตอบสนองของการเรืองแสงของ PNA-AuNPs ต่ออาร์เอ็นเอดัง**รูปที่ 38** ซึ่งก็พอจะเป็นแนวทางในการพัฒนาประสิทธิภาพการตรวจวัดอาร์เอ็นเอในอนาคตโดยการเพิ่มอุณหภูมิหรือเติม additive ต่างๆ เช่น เกลือโซเดียมคลอไรด์ หรือ Bovine serum albumin (BSA) เป็นต้น



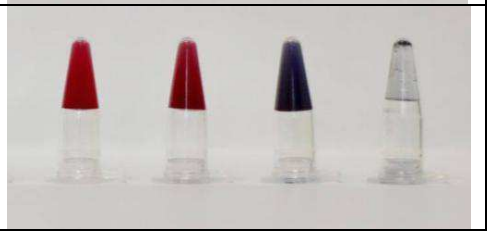
รูปที่ 38 การเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงของ FAM-PNA เมื่อมี AuNPs และ microRNA21 อยู่ด้วย โดยใช้ FAM-PNA-Lys5 ที่มีลำดับเบส AGTCTGATAAGC ที่ [PNA] = 0.1 μM, [AuNPs] = 0.5 μg/mL ใน 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4; miRNA21 = 5'-UAG CUU AUC AGA CUG AUG UUG A-3'

อีกหนึ่งการทดลองคือการศึกษาการเปลี่ยนสีของ AuNPs ซึ่งอย่างที่กล่าวไปแล้วข้างต้นว่าวัสดุนาโนนั้นมีคุณสมบัติพิเศษที่ต่างไปจากวัสดุชนิดเดียวกันที่มีขนาดใหญ่ เป็นผลจากอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวและปริมาตรสูงขึ้น ทำให้วัสดุนาโนสามารถแสดงคุณสมบัติ Surface plasmon resonance (SPR) ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวนี้ขึ้นอยู่กับรูปร่างและขนาดของอนุภาค กล่าวคือเมื่อ AuNPs มีขนาดอนุภาคที่ใหญ่ขึ้น จะสามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่างไปจากเดิม ซึ่งเคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้ว่าเฉพาะ ssPNA สามารถเหนี่ยวนำให้ AuNPs เกิดการจับตัวกัน (aggregation) ขณะที่ DNA-DNA, PNA-DNA duplex หรือ ssDNA ไม่มีผลต่อการจับตัวกันของ AuNPs[20] หลักการดังกล่าวได้ถูกนำมาพัฒนาร่วมกับ acpcPNA โดยคาดว่าจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจวัดได้ดียิ่งขึ้นโดยมีหลักการดัง**รูปที่ 39**



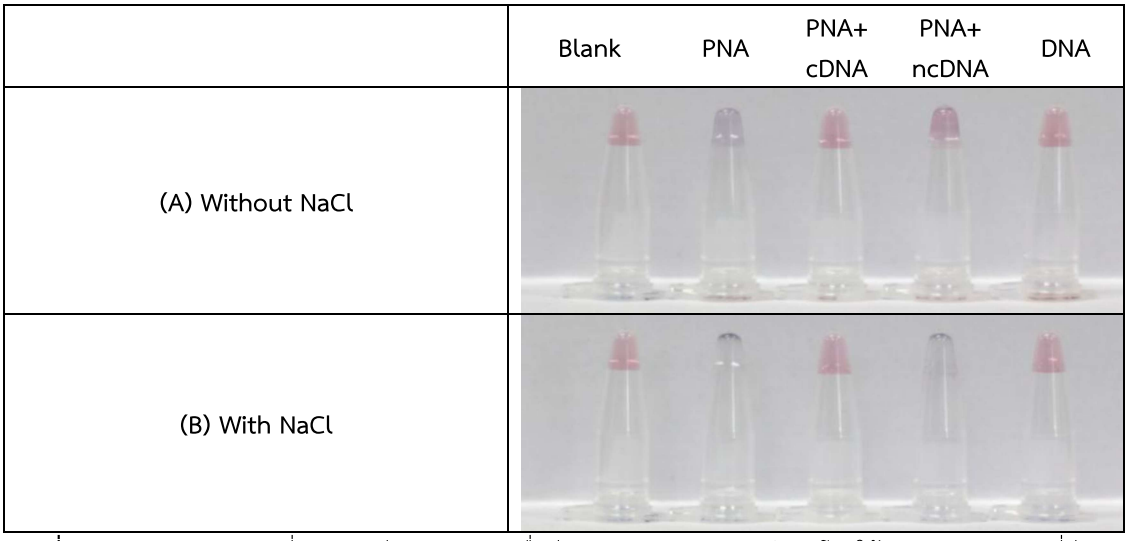
รูปที่ 39 หลักการทำงานของ PNA-AuNPS ในการตรวจดีเอ็นเอแบบ dual mode (fluorescence & aggregation)

เพื่อเป็นการพิสูจน์หลักการดังกล่าว เบื้องต้นได้ศึกษาผลของ PNA probe ต่อการจับตัวของ AuNPs โดยใช้พีเอ็นเอที่มีประจุบวกต่างกัน คือ FAM-PNA-Lys1 และ FAM-PNA-Lys5 ที่มีลำดับเบสเดียวกันคือ GTAGATCACT พบว่า ปริมาณเพียง 0.5 μM ของพีเอ็นเอที่มีประจุบวกมากกว่าจะเหนี่ยวนำให้เกิดการจับตัวที่ดีและรวดเร็วกว่าโดยซึ่งสังเกตได้จากสีของสารละลาย AuNPs ที่เปลี่ยนไปดัง**รูปที่** 40

[PNA] (μM)	Blank	0.1	0.5	1.0
PNA-Lys				
PNA-Lys5				

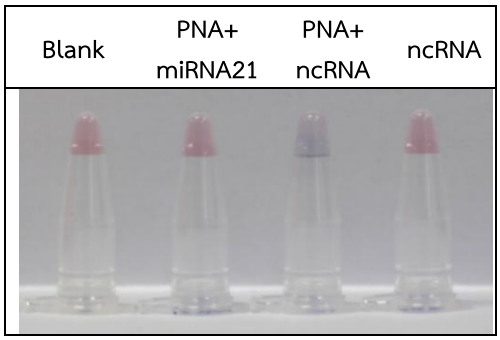
รูปที่ 40 การเปลี่ยนแปลงสีที่เกิดขึ้นจากการจับตัวของ AuNPs หลังจากเติมพีเอ็นเอลงไป โดยทำที่ [AuNPs] = 1 mM

ต่อมาได้ศึกษาการจับตัวของ AuNPs เมื่อมีดีเอ็นเออยู่ด้วย โดยเปรียบเทียบกันระหว่างดีเอ็นเอคู่สม (cDNA) กับ ดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสผสม (ncDNA) ผลที่ได้คือสภาวะที่มี ssPNA และ PNA+ncDNA จะเหนี่ยวนำให้ AuNPs จับตัวกันและเกิดการเปลี่ยนสี ขณะที่ ssDNA และ PNA+cDNA ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง (**รูปที่ 41A**) อย่างไรก็ตาม เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการแยกแยะการเปลี่ยนสี ผู้วิจัยได้ทดลองเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ลงไปเพื่อเร่งการเหนี่ยวนำการจับตัวของ AuNPs จากผลการทดลองพบว่าในสภาะที่มี ionic strength สูงขึ้น ความว่องไวของการจับตัวของ AuNPs เกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วขึ้น การเปลี่ยนแปลงสีสามารถสังเกตได้ชัดเจนมากขึ้นด้วย (**รูปที่ 41B**) ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า acpcPNA และ AuNPs สามารถใช้ทดสอบแยกแยะการเปลี่ยนแปลงสีด้วยตาเปล่าได้



รูปที่ 41 การแยกแยะการเปลี่ยนแปลงสีของ AuNPs เมื่อมี PNA และ DNA ชนิดต่างๆ โดยใช้ FAM-PNA-Lys5 ที่มีลำดับเบส GTAGATCACT; [PNA] = 0.5 μM, [DNA] = 0.6 μM; [AuNPs] = 0.1 mM ใน 1 mM sodium phosphate buffer (pH 7) และ [NaCl] = 50 mM

นอกจากการทดสอบดีเอ็นเอแล้ว ต่อมาได้ศึกษาการแยกแยะสีในระบบที่มีอาร์เอ็นเอสายสั้น (miRNA21) โดยใช้ FAM-PNA-Lys5 ที่มีลำดับเบส AGTCTGATAAGC ซึ่งจากผลการทดสอบพบว่า สามารถแยกแยะสีของ AuNPs ระหว่าง microRNA21 กับอาร์เอ็นเออื่นได้ดัง**รูปที่ 42**

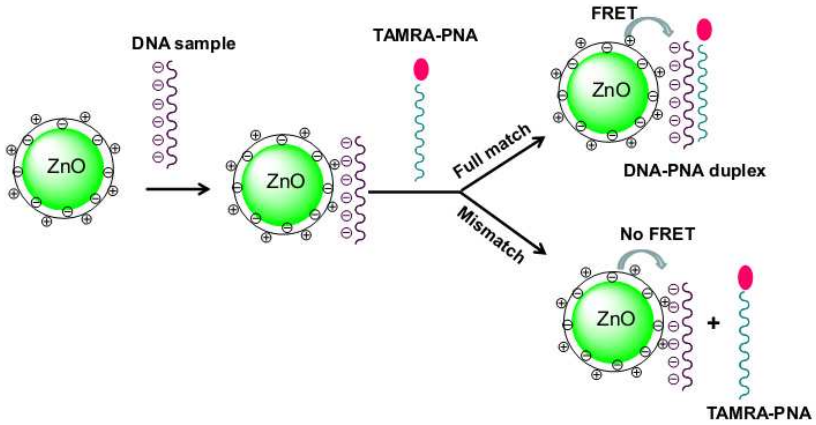


รูปที่ 42 การแยกแยะการเปลี่ยนสีของ AuNPs เมื่อมี PNA และ RNA ชนิดต่างๆโดยใช้ FAM-PNA-Lys5 AGTCTGATAAGC; [PNA] = 0.5 μM, [DNA] = 0.6 μM; [AuNPs] = 0.1 mM ใน 1 mM sodium phosphate buffer (pH 7) และ [NaCl] = 50 mM; ลำดับเบส miRNA21 = 5'-UAG CUU AUC AGA CUG AUG UUG A-3'; ncRNA = AGUGCUCUAC

d) Quantum dots

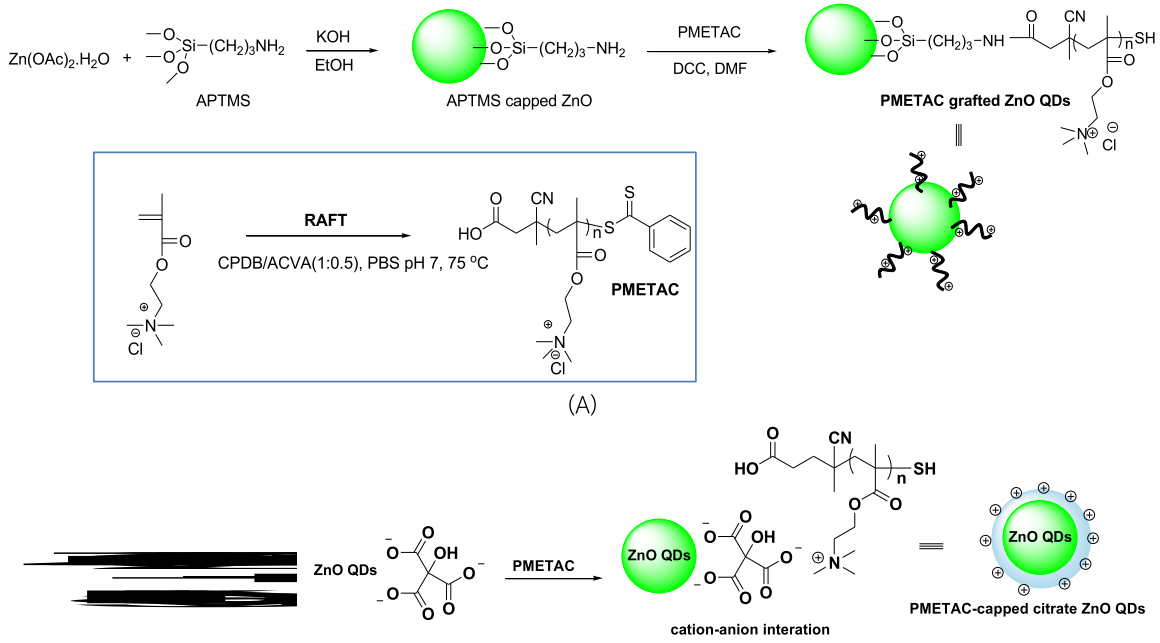
1. ZnO QDs

งานวิจัยในส่วนแรกอยู่ภายใต้ความรับผิดชอบของ ดร.แพรทอง เหลาภา จากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ สกลนคร ซึ่งมีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนา ZnO quantum dot (ZnO QDs) ที่มีการดัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิเมอร์ที่มีประจุบวกเช่น poly(methacryloyloxy)ethyl]-trimethylammonium chloride (PMETAC) เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักการถ่ายโอนพลังงานแบบ Fluorescence resonance energy transfer (FRET) หรือกลไกการดับสัญญาณ (quenching) ระหว่างพีเอ็นเอโพรบที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงดังแสดงใน**รูปที่ 43** ซึ่งแม้จะเคยมีผู้พัฒนาวิธีการที่ใกล้เคียงกันในการวิเคราะห์ DNA โดยอาศัยดีเอ็นเอโพรบที่ติดฉลากเรืองแสง[21] แต่ก็ยังไม่เคยมีผู้ศึกษากับพีเอ็นเอมาก่อน



รูปที่ 43 แสดงหลักการตรวจหาลำดับเบสของดีเอ็นเอด้วยพีเอ็นเอโพรบร่วมกับ PMETAC grafted ZnO QDs โดยใช้เทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปีอาศัยหลักการ FRET หรือกลไกการดับสัญญาณ (quenching)

งานวิจัยเริ่มจากการสังเคราะห์ ZnO QDs ที่ตรึงด้วยพอลิเมอร์ประจุบวก PMETAC (**รูปที่ 44**) โดยวิธีแรก (**รูปที่ 44A**) สังเคราะห์ผ่าน aminopropyltriethoxy silane (APTMS)-capped ZnO QDs ด้วยวิธี co-precipitation ของ zinc acetate ในเมทานอลที่มี APTMS อยู่ด้วย และใช้เบส KOH เป็นตัวทำหน้าที่ให้เกิด APTMS-capped ZnO QDs ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง มีงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้รายงานว่า APTMS capped ZnO QDs นี้มีขนาดอนุภาค 5.7 nm และมีความเสถียรสูง[22] ซึ่งในงานวิจัยนี้พบว่า APTMS capped ZnO QDs สามารถเก็บรักษาในลักษณะอนุภาคแห้งได้เป็นเวลานานโดยที่ไม่สูญเสียสมบัติการเรืองแสง หลังจากนั้นจึงสังเคราะห์พอลิเมอร์ poly(methacryloyloxy)-ethyl]trimethylammonium chloride (PMETAC) ด้วยปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันแบบ Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer (RAFT) ซึ่งเมื่อนำพอลิเมอร์ที่ได้ไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ATR FT-IR และ ^{1}H NMR พิสูจน์ได้ว่าสามารถสังเคราะห์ PMETAC ได้ และพบว่า PMETAC มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 5 kDa แต่อย่างไรก็ตามเพื่อให้ทราบน้ำหนักโมเลกุลที่แน่นอนของ QPDMAEMA จำเป็นจะต้องนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GPC เพิ่มเติม ในขั้นตอนสุดท้ายนำ APTMS capped ZnO มาทำปฏิกิริยาที่หมู่ $-NH_2$ กับปลายคาร์บอกซิลิกของ PMETAC ซึ่งจะได้ PMETAC-grafted ZnO QDs ที่มีพอลิเมอร์ยึดติดที่ในลักษณะเป็นเส้นตรงออกจากผิวของอนุภาค

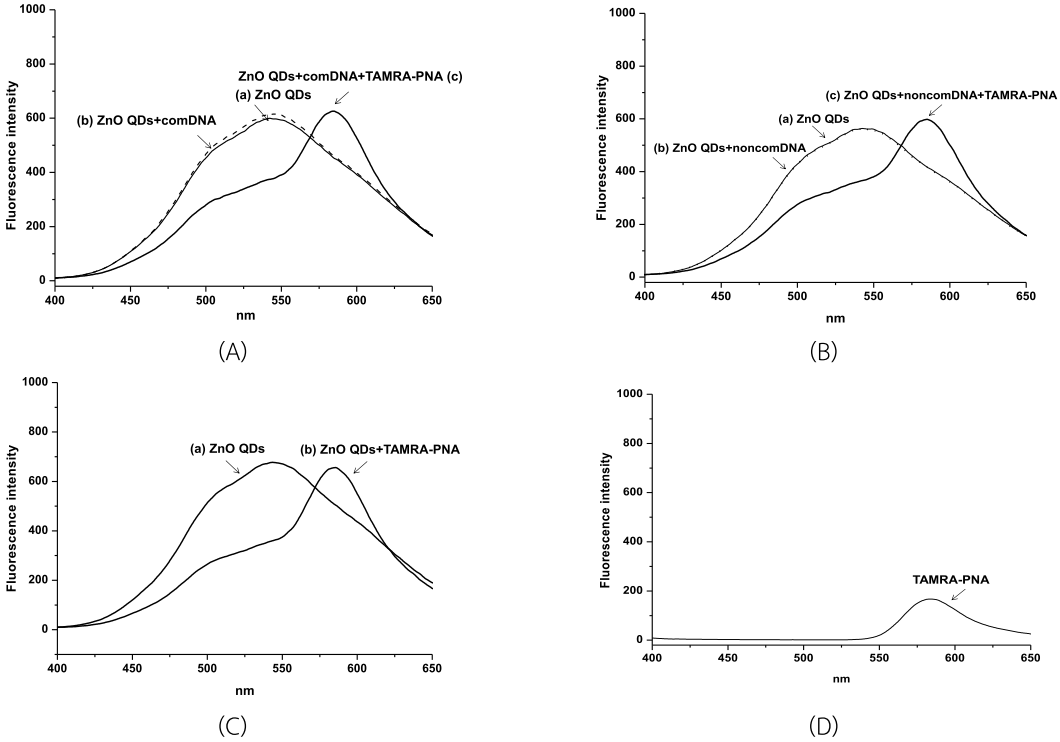


รูปที่ 44 การสังเคราะห์ ZnO QDs ที่ตรึงด้วยพอลิเมอร์ประจุบวก PMETAC โดยวิธี graft onto APTMS-capped ZnO QDs (A) และโดยวิธี electrostatic interaction กับ citrate-stabilized ZnO QDs (B)

เมื่อนำอนุภาค ZnO QDs ที่สังเคราะห์ได้จากวิธีแรกไปทดสอบสมบัติการตรวจหาลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยใช้ร่วมกับ TAMRA-PNA probe นั้น พบว่าไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สมหรือลำดับเบสผิดไปกับโพรบได้ โดยผู้วิจัยมีสมมติฐานว่าเนื่องจากพอลิเมอร์ PMETAC ที่ตรึงบนผิวของ ZnO QDs มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ทำให้ระยะทางระหว่างแกนกลางของ ZnO QDs กับ TAMRA-PNA โพรบอยู่ห่างกันมากเกินไปจึงไม่สามารถถ่ายโอนพลังงานให้แก่กันได้ดังนั้นจึงไม่เกิดปรากฏการณ์ FRET หรือการดับสัญญาณ (quenching) เพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าวผู้วิจัยได้พยายามนำ PMETAC ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 2-3 kDa มาใช้ โดยพบว่าเมื่อเติม DNA ตัวอย่างผสมกับ ZnO QDs จะเกิดการดับสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของ ZnO QDs ตามปริมาณของ DNA ตัวอย่างที่ใส่เข้าไป แต่เมื่อเติม TAMRA-PNA จะไม่เกิดการ FRET หรือ quench เพราะ DNA เข้าไปรบกวนสัญญาณฟลูออเรสเซนต์แล้วจึงไม่เหลือพลังงานที่จะไปกระตุ้น TAMRA-PNA

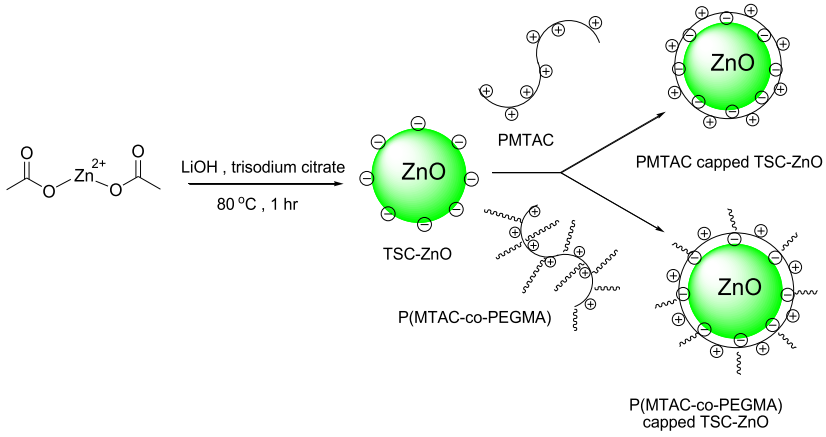
เพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าว ผู้วิจัยยังได้สังเคราะห์ ZnO QDs ที่เคลือบผิวด้วยพอลิเมอร์ประจุบวกอีกระบบหนึ่งเพื่อลดระยะทางระหว่างแกนกลางของ ZnO QDs กับ TAMRA-PNA เพื่อให้เกิดกระบวนการถ่ายโอนพลังงานได้ โดยสังเคราะห์ ZnO QDs ที่เคลือบผิวด้วยพอลิเมอร์ประจุบวกชนิด PMETAC ซึ่งสังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันกลไกแบบ RAFT เช่นเดียวกับ ZnO QDs ระบบแรก โดยระบบนี้จะอาศัย citrate ion เป็นตัวเคลือบผิวของ ZnO QDs แล้วหมู่คาร์บอกซิเลตที่เป็นอิสระจะเชื่อมประสานกับประจุบวกของพอลิเมอร์ (PMETAC) ได้โดยตรงผ่านแรงกระทำทางไฟฟ้าสถิต โดยวิธีการสังเคราะห์ได้ดัดแปลงมาจากวิธีการสังเคราะห์ของ Joshi, P. และคณะ[23] (**รูปที่ 44B**) คือ นำ zinc acetate ทำปฏิกิริยากับ LiOH ในเอทานอลซึ่งจะเกิดเป็น ZnO QDs ขึ้นจากนั้นเติม trisodium citrate เพื่อเคลือบผิว ZnO QDs ไว้จากนั้นนำไปเซนติฟิวจ์แล้วล้างด้วยน้ำ 3 รอบ นำตะกอนที่ได้มา disperse ในน้ำ แล้วจึงค่อยๆ เติม PMETAC (Mw~5 kDa) พร้อมกับการคนสารละลาย และปล่อยให้ปฏิกิริยาดำเนินไปเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารละลายมาเซนติฟิวจ์แล้วนำ dispersion ในน้ำอีกครั้ง

จากนั้นจึงนำ PMETAC-capped citrate ZnO QDs ที่ได้ไปศึกษาการเกิด FRET กับพีเอ็นเอ TAMRA-O-CTAAATTCAGA-$(Lys)_4NH_2$ (TAMRA-PNA) เมื่อมีและไม่มีดีเอ็นเอคู่สมอยู่ด้วย (**รูปที่ 45A-C**) ซึ่งพบว่าในทั้งทุกกรณีจะเกิดปรากฏการณ์ FRET ได้โดยสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของ ZnO QDs จะลดลงเมื่อ excite ที่ 340 nm และพบการเรืองแสงของ TAMRA-PNA เพิ่มขึ้น แต่ปัญหาที่พบคือมีการเกิด non-specific interaction ระหว่าง QD กับ TAMRA-PNA กล่าวคือแม้ไม่มีดีเอ็นเออยู่ด้วยเลยก็ยังพบการเกิด FRET (**รูปที่ 3C**) และเพื่อเป็นการยืนยันว่าสัญญาณของ TAMRA-PNA ที่เพิ่มขึ้นไม่ได้เกิดจากการกระตุ้นโดยตรงที่ 340 nm จึงได้ทำการทดลองควบคุมดัง**รูปที่ 3D** โดยไม่ใส่ ZnO QDs และ DNA ซึ่งพบว่าสัญญาณที่ได้ต่ำกว่าเมื่อมี ZnO QDs อยู่ด้วย



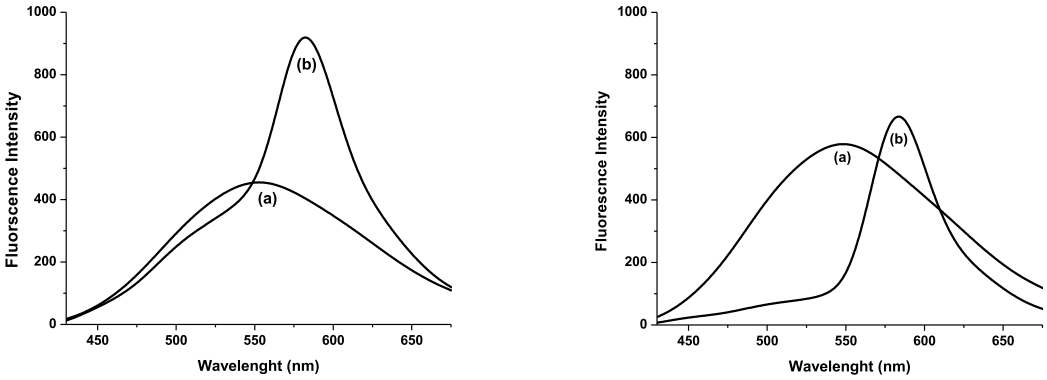
รูปที่ 45 สัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของ PMETAC-capped citrate ZnO QDs และ 0.5uM TMR-PNA (TAMRA-O-CTAAATTCAGA-Lys_4NH_2) เมื่อมี (A) และไม่มี (B) ดีเอ็นเอที่เป็นคู่สม (5'-TCTGAATTTAG-3') อยู่ด้วย (C) PMETAC-capped citrate ZnO QDs และ 0.5 μM TMR-PNA (D) 0.5 μM TMR-PNA ในสารละลาย 10 mM tris-HCl pH 9 และ λ_{excit} ที่ 340 nm

งานวิจัยที่ได้ทำต่อมาคือการพยายามแก้ปัญหาการดูดซับแบบไม่จำเพาะเจาะจงระหว่าง PMETAC-capped citrate ZnO QDs และ TAMRA-PNA โดยการดัดแปรพื้นผิวของ ZnO QDs ด้วยโคพอลิเมอร์ของ METAC กับ polyethylene glycol methyl ether methacrylate (PEGMA) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่มีสมบัติที่มีสมบัติชอบน้ำ จึงน่าจะช่วยลดการดูดซับแบบไม่จำเพาะจงกับพีเอ็นเอลงได้ โดยเริ่มจากการสังเคราะห์ P(MTAC-co-PEGMA) ด้วยปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันแบบ RAFT ที่ DP เป้าหมายเท่ากับ 100 และศึกษาอัตราส่วนโคพอลิเมอร์ MTAC ต่อ PEGMA โดยควบคุมอัตราส่วนโมล ของมอนอเมอร์ MTAC และ PEGMA เท่ากับ 100:0, 80:20, 70:30, 60:40, 40:60, 30:70 และ 20:80 จากนั้นจึงนำพอลิเมอร์ที่ได้มาตรึงบน citrate-capped ZnO QD (**รูปที่ 46**) และได้พิสูจน์ว่าการตรึงประสบความสำเร็จโดยใช้เทคนิค ATR-IR ซึ่งแสดงพีกของ C=O จากพอลิเมอร์ที่ 1720 cm^{-1}



รูปที่ 46 แสดงการสังเคราะห์ ZnO ควอนตัมดอทที่เคลือบผิวด้วย PMTAC และ P(MTAC-co-PEGMA)

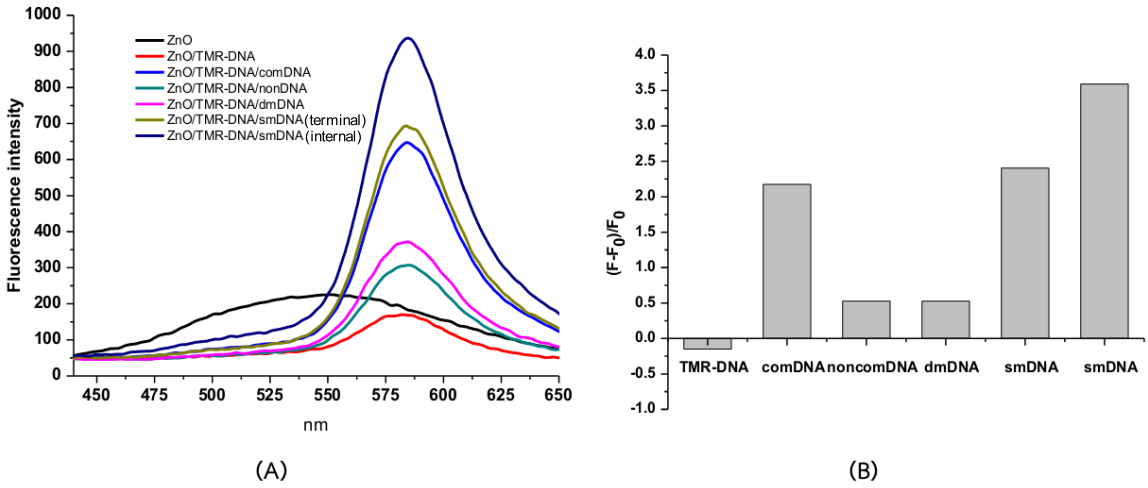
P(MTAC-co-PEGMA)-capped ZnO QD ที่เตรียมได้แสดงการเรืองแสงที่ความยาวคลื่น 550 nm และแสดงการกระจายตัวในน้ำที่ดี โดยการมีสัดส่วนของ PEGMA เพิ่มในโคพอลิเมอร์ส่งผลทำให้การเรืองแสงและความเสถียร ของ ZnO QDs ในน้ำและใน Tris buffer เพิ่มขึ้น ผลการทดสอบเบื้องต้นกับ TAMRA-labeled DNA พบว่าสามารถเกิดการ FRET ได้ อย่างไรก็ตาม เมื่อทดสอบกับ TAMRA-labeled PNA ยังพบว่ามี non-specific interaction อยู่ (**รูปที่ 47**)



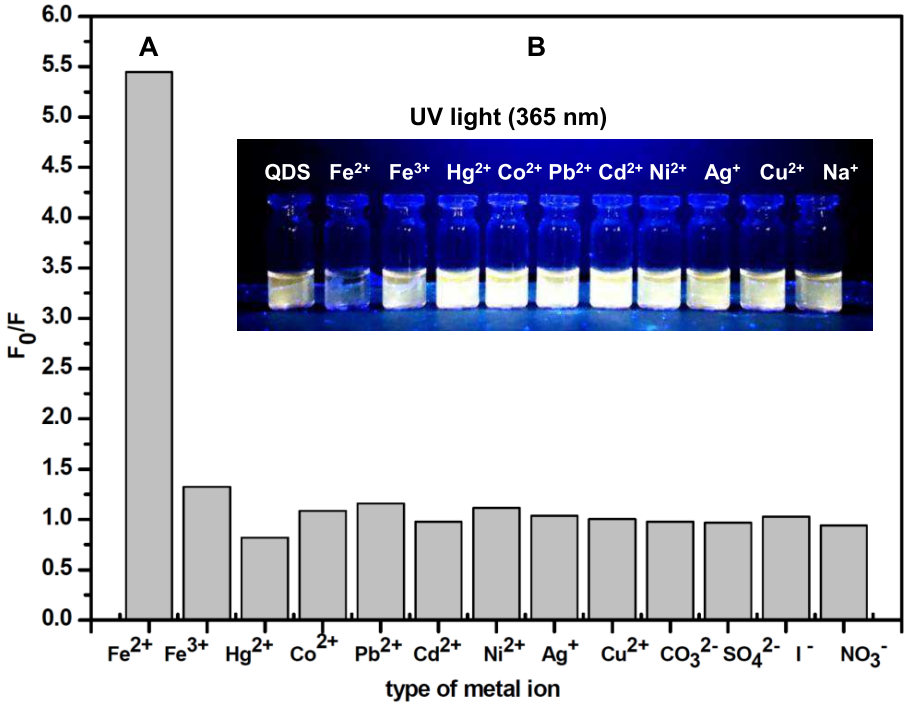
(A) (B)

รูปที่ 47 สัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของ P(MTAC-co-PEGMA) (20:80) capped citrate-ZnO QDs และ (a) 0.5 μM TAMRA-labeled DNA (TAMRA-CTAAATTCAGA) (b) TAMRA-labeled PNA (TAMRA-O-CTAAATTCAGA-Lys_4NH_2) ในสารละลาย 100 mM tris-HCl pH 9 และ λ_{excit} ที่ 350 nm

ต่อมาจึงได้ศึกษา ZnO QDs ที่ถูกดัดแปรด้วย PMTAC-co-PPEGMA เพิ่มเติม โดยพบว่า ZnO ที่มีอัตราส่วนพอลิเมอร์ต่อ Zn เท่ากับ 10:1 เป็นอัตราส่วนที่ทำให้ ZnO มีค่า fluorescence intensity คงที่ได้นานมากกว่า 6 เดือน เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพการตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอร่วมกับพีเอ็นเอโพรบที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง TAMRA หรือ Flu โดยอาศัยหลักการ FRET พบว่า ZnO QDs ที่เคลือบผิวด้วย PMTAC-co-PPEGMA ยังไม่มีประสิทธิภาพในการบอกความแตกต่างของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สมและผิดไปหนึ่งตำแหน่งเท่าใดนัก จึงได้ชะลองานส่วนที่เกี่ยวข้องกับ PNA ไว้ก่อน และหันมาศึกษาอันตรกิริยาของ (PMTAC-co-PPEGMA)-capped ZnO กับดีเอ็นเอแทน โดยผู้วิจัยได้ศึกษาอันตรกิริยาของ (PMTAC-co-PPEGMA)-capped ZnO กับ short DNA oligonucleotide (11-mer) จากการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ที่ 575 nm พบว่าในทั้งสองกรณีที่ศึกษา (ที่อัตราส่วนของ MTAC:PEGMA = 40:60 และ 60:40) การเติม DNA ลงไปจะทำให้สัญญาณลดลงเล็กน้อย โดยการลดลงของสัญญาณมีความสัมพันธ์เชิงเส้นกับปริมาณของ DNA ที่เติมลงไป และ (PMTAC-co-PPEGMA)-capped ZnO ที่อัตราส่วนของ MTAC:PEGMA = 60:40 จะเกิดการ quench น้อยกว่า จึงเลือกที่อัตราส่วนนี้ไปใช้ในการศึกษาการเกิด FRET กับ TAMRA-labeled DNA ต่อไป ได้ผลการทดลองดัง**รูปที่ 48A** และ **48B** ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการถ่ายโอนพลังงานจาก QD ไปยัง TMR ดังจะเห็นได้จากสัญญาณของ QD ลดลงหรือหายไป และสัญญาณของ TMR ที่ 575 nm เพิ่มขึ้น โดยสัญญาณที่เพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์กับการเข้าคู่กันของดีเอ็นเอ โดย TAMRA-DNA สายเดี่ยวจะสว่างน้อยที่สุด ใกล้เคียงกับการ excite ฉลาก TMR โดยตรง โดยที่ไม่มี QD อยู่ด้วย ส่วนดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สมทั้งสายและมีลำดับเบสผิดไปเพียง 1 ตำแหน่งทั้งที่ปลายสายและกลางสายจะให้สัญญาณของ TAMRA ที่สูงมาก แสดงถึงการถ่ายโอนพลังงานที่มีประสิทธิภาพ แต่เมื่อดีเอ็นเอมีลำดับเบสผิดไปตั้งแต่ 2 เบสขึ้นไปสัญญาณจะกลับลดลงมาใกล้เคียงกับ TAMRA-DNA แสดงให้เห็นว่าการใช้ QD ร่วมกับ DNA ที่ติดฉลากสามารถบอกความแตกต่างของดีเอ็นเอคู่สมกับดีเอ็นเอที่ไม่เป็นคู่สมที่มีลำดับเบสผิดไปจากโพรบตั้งแต่ 2 เบสขึ้นไปได้ ซึ่งเป็นผลการทดลองเบื้องต้นที่น่าสนใจ และคาดว่าเกิดจากความแตกต่างของความสามารถในการจับกันระหว่าง ssDNA และ dsDNA กับ ZnO QD ซึ่งน่าจะได้ศึกษาเพิ่มเติมต่อไปเพื่อศึกษาข้อจำกัดและกลไกการเกิดการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงนี้



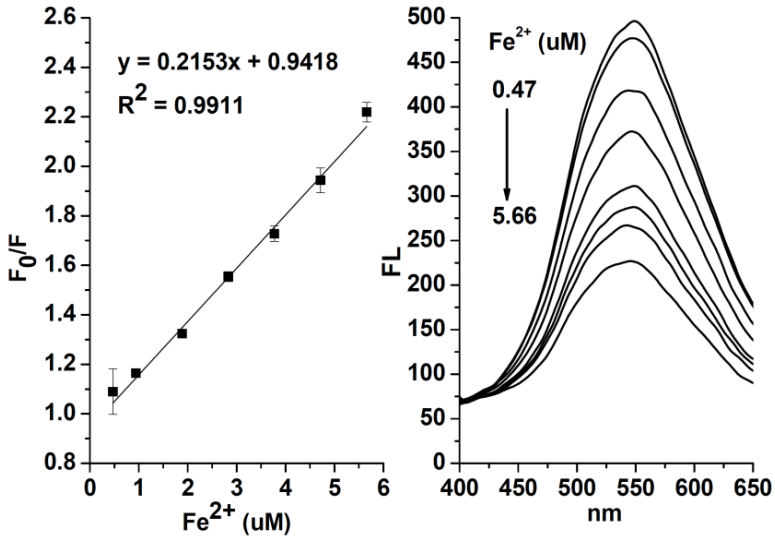
รูปที่ 48 (A) แสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของ 230 μM PMTAC-co-PPEGMA (60:40) capped TSC-ZnO และ 154 nM TMR-DNA (TAMRA-CTAAATTCAGA) เมื่อมีดีเอ็นเอที่เป็นคู่สม (comDNA: (5'-TCTGAATTTAG-3'), ลำดับเบสผิดไปทั้งสาย (nonDNA: 5'-ACATTTAAAAC-3'), ลำดับเบสผิดไป 2 เบส (dmDNA: 5'-TCTGTATTTAA-3') และมีลำดับเบสผิดไป 1 เบส ที่ปลายสาย (smDNA (terminal): 5'-TCTGAATTTAA-3') และกลางสาย (smDNA (internal): 5'-TCTAAATTTAA-3')) ในสารละลาย 100 mM tris-HCl pH 9 และ λ_{excit} = 340 nm (B) แสดงความแตกต่างสัญญาณฟูออเรสเซนต์ $(F_0\text{-}F)/F_0$ จากรูป A (F_0 = fluorescence intensity of ZnO QD at 575 nm, F = fluorescence intensity of TAMRA-DNA+ZnO QD+DNA at 575 nm)



รูปที่ 49 สเปกตรัมฟลูออเรสเซนส์ของ ZnO ที่เคลือบผิวด้วย P(METAC-PEOMEMA) [อัตราส่วน META:PEOMEMA เท่ากับ 30:70) กับ 5.6 μM metal ion **(B)** เมื่อส่องใต้แสง UV ความยาวคลื่น 365 nm

นอกจากนี้ยังได้นำ QDs ที่เคลือบผิวด้วยพอลิเมอร์ประจุบวกชนิด PMETAC และ P(METAC-PEOMEMA) ที่สังเคราะห์ได้มาประยุกต์ใช้ในการนำมาตรวจวิเคราะห์ metal ion พบว่า ZnO QDs ที่เคลือบผิวด้วยพอลิเมอร์ประจุบวก P(METAC-PEOMEMA) ที่อัตราส่วน METAC:PEOMEMA เท่ากับ 30:70 แสดงความจำเพาะเจาะจงในการวิเคราะห์ Fe^{2+} โดยเมื่อมี Fe^{2+} อยู่ด้วยจะเกิดการดับสัญญาณการเรืองแสงของ ZnO QDs ลง โดยที่ metal ion ชนิดอื่นๆ ไม่ทำให้การเรือง

แสงของ ZnO QDs เปลี่ยนแปลง (**รูปที่ 49**) นอกจากนี้ยังสามารถแยกความแตกต่างของ Fe^{2+} และ Fe^{3+} ออกจากกันได้อย่างชัดเจน โดยระบบของสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณ Fe^{2+} กับ Fe^{3+} คือ 100 mM Tris.HCl pH9



รูปที่ 50 (A) ฟลูออเรสเซนส์สเปกตรัม ของ ZnO QDs ที่เคลือบผิวด้วย P(METAC-PEOMEMA) (30:70) เมื่อมีปริมาณ Fe^{2+} ที่ความเข้มข้น 0.47, 0.94, 1.89, 2.83, 3.77, 4.62, และ 5.66 μM ตามลำดับ (B) กราฟเส้นตรงของ F_0/F กับความเข้มข้นของ Fe^{2+} โดยที่ F_0 คือ ZnO QDs ที่เคลือบผิวด้วย P(METAC-PEOMEMA) (30:70) ก่อน และ F คือหลัง เติม Fe^{2+}

การดับสัญญาณการเรืองแสงของ ZnO QDs ที่เคลือบผิวด้วย P(METAC-PEOMEMA) มีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของ Fe^{2+} เพิ่มขึ้น (**รูปที่ 50**) เมื่อคำนวณค่า F_0/F พล็อตกราฟระหว่าง F_0/F กับความเข้มข้นของ Fe^{2+} พบว่าให้กราฟเส้นตรงมีค่า R^2 เท่ากับ 0.9912 โดยคำนวณจากสมการเส้นตรง $F_0/F = 0.2153 [Fe^{2+}$ μM] + 0.9418 จะสามารถคำนวณค่า limit of detection (LOD) และ limit of quantitation (LOQ) เท่ากับ 0.34 μM และ 0.51 μM ตามลำดับ เมื่อศึกษาความแม่นยำในการวิเคราะห์สารตัวอย่าง Fe^{2+} ที่ความเข้มข้น 1.89 μM จำนวน 5 ซ้ำ พบความคลาดเคลื่อนเพียง 4.1% ซึ่งอยู่ในช่วงที่สามารถยอมรับได้ ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ZnO QDs ที่เคลือบผิวด้วยพอลิเมอร์ประจุบวก อาจนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ Fe^{2+} ได้ อย่างเลือกจำเพาะ

2. CdS QDs

งานวิจัยในส่วนนี้อยู่ภายใต้ความรับผิดชอบของ ดร.นำพล อินสิน จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งเป็นการศึกษาระบบของ CdSe และ CdTe QD เพื่อใช้ร่วมกับพีเอ็นเอในการตรวจลำดับเบสของดีเอ็นเอควบคู่กันไปด้วย โดยได้เริ่มจากการสังเคราะห์ CdSe/ZnS core shell QD ที่มีประจุบวก ความท้าทายของการเตรียม QD ชนิดนี้คือการทำให้มันสามารถกระจายตัวอยู่ได้ในน้ำโดยยังคงความเสถียรและความสามารถในการเรืองแสงอยู่ แนวคิดใหม่ที่พัฒนาขึ้นคือการเคลือบผิวอนุภาค QD ที่เตรียมภายใต้ภาวะปราศจากน้ำ โดยใช้ surfactant ที่มีประจุบวกได้แก่ octanoic acid-modified polyethyleneimine (octPEI) ซึ่งสามารถสังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาระหว่าง octanoyl chloride และ PEI ขณะนี้สามารถสังเคราะห์ trioctylphosphine-stabilized CdSe/ZnS core shell QD ใน organic phase ได้แล้วโดยใช้วิธีการตามเอกสารอ้างอิง[24] โดย QD ดังกล่าวมีขนาดเฉลี่ย 3.2 nm และแสดงการเปล่งแสงอยู่ที่ช่วงคลื่น 569 nm โดยมีค่าประสิทธิภาพการเรืองแสงอยู่ที่ 3% จากนั้นจึงนำไปคอนจูเกตกับ octPEI[25] โดยพบว่าอัตราส่วนของควอนตัมดอต : mPEI ที่เหมาะสมที่สุดคือ 1:7 และพีเอชที่เหมาะสมคือ 6 ขณะนี้สามารถสังเคราะห์อนุภาคควอนตัมดอทที่มีประจุบวกที่สามารถกระจายตัวในน้ำได้แล้ว กำลังอยู่ในกระบวนการหาสภาวะที่เหมาะสมที่จะนำไปศึกษาการใช้งานร่วมกับพีเอ็นเอและดีเอ็นเอต่อไป

---

[1] Chen, L.; Wang, N.; Wang, X.; Ai, S. *Microchim. Acta* **2013**, *180*, 1517–1522.

[2] Gao, Z.; Xu, M.; Hou, Li.; Chen, G.; Tang, D. *Anal. Chim. Acta.* **2013**, *776*, 79–86.

[3] Polsky, R.; Gill, R.; Kaganovsky, L.; Willner, I. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 2268–2271.
[4] Wang, Y.; Ouyang, G.; Zhang, J.; Wang, Z. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 7912–7914.
[5] Stevens, K.; Claeys, D. D.; Catak, S.; Figaroli, S.; Hocek, M.; Tromp, J. M.; Schürch, S.; van Speybroeck, V.; Madder, A. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 6940–6953.
[6] Op de Beeck, M.; Madder, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 796–807.
[7] Yotapan, N.; Nim-anussornkul, D.; Vilaivan, T. *Tetrahedron* **2016**, *72*, 7992–7999.
[8] Percivalle, C.; Bartolo, J.-F.; Ladame, S. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 16–26.
[9] Li, Q. Q.; Luan, G. Y.; Guo, Q. P.; Liang, J. X. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, e5.
[10] Cheng, J. P. ; Zhang, Y. Y.; Li, Q. G. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, e61.
[11] Mo, Z. H. ; Yang, X. C. ; Guo, K. P. ; Wen, Z. Y. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *389*, 493-497.
[12] Kushon, S. A.; Bradford, K.; Marin, V.; Suhrada, C.; Armitage, B. A.; McBranch, D.; Whitten, D. *Langmuir* **2003**, *19*, 6456–6464.
[13] Habl, G.; Böhm, H.; Marmé, N.; Knemeyer, J. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* **2005**, *85*, 613–623.
[14] Boonlua, C.; Charoenpakdee, C.; Vilaivan, T.; Praneenararat, T. *ChemistrySelect* **2016**, *1*, 5691–5697.
[15] Jirakittiwut, N.; Panyain, N.; Nuanyai, T.; Vilaivan, T.; Praneenararat, T. *RSC Advances* **2015**, *5*, 24110–24114.
[16] Winichagoon, P.; Saechan, V.; Sripanich, R.; Nopparatana, C.; Kanokpongsakdi, S.; Maggio, A.; Fucharoen, S. *Prenat. Diagn.* **1999**, *19*, 428–435.
[17] a) Lu, C.-H.; Yang, H.-H.; Zhu, C.-L.; Chen, X.; Chenparing, G.-N. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4785–4787. b) He, S.; Song, B.; Li, D.; Zhu, C.; Qi, W.; Wen, Y.; Wang, L.; Song, S.; Fang, H.; Fan, C. A. *Adv. Func. Mater.* **2010**, *10*, 453–459. c) Wu, M.; Kempaiah, R.; Huang, P.J.; Maheshwari, V.; Liu, J. *Langmuir* **2011**, *27*, 2731–2738.
[18] a) Guo, S.; Du, D.; Tang, L.; Ning, Y.; Yao, Q.; Zhang , G.J. *Analyst* **2013**, *138*, 3216–3220. b) Sabale, P.M.; George, J.T.; Srivatsan, S. G. *Nanoscale* **2014**, *6*, 10460–10469. c) Kotikam, V.; Fernandes, M.; Kumar, V.A. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 15003–15006.
[19] Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J. *Discuss Faraday Soc.* **1951**, *11*, 55–75.
[20] Su X.; Kanjanawarut S. *ACS Nano* **2009**, *3*, 27512–759.
[21] Lee, J.; Choi, Y.; Kim, J.; Park, E.; Song, R. *ChemPhysChem* **2009**, *10*, 806–811.
[22] Costenaro, D.; Carniato, F.; Gatti, G.; Marchese, L.; Bisio, C. *New J. Chem.* **2013**, *37*, 2103–2109.
[23] Joshi, P.; Ansari, Z.A.; Singh, S.P.; Shanker V. *Adv. Sci. Lett.* **2009**, *2*, 360–363.
[24] Yang, P.; Zhou, G. *Materials Research Bulletin* **2011**, *46*, 2367–2372.
[25] Nann, T. *Chem. Commun.* **2005**, 1735–1736.

ชื่อโครงการย่อย PNA-conjugated polymer brushes as platforms for DNA sequence determination
ระยะเวลาโครงการ 17 มีนาคม 2557 – 16 มีนาคม 2560 ได้รับอนุมัติให้ขยายเวลาถึง 16 กันยายน 2560
รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 17 มีนาคม 2557 **ถึงวันที่** 16 กันยายน 2560

หัวหน้าโครงการย่อย
รศ.ดร.วรวีร์ โฮเว่น ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หลักการและเหตุผล

พอลิเมอร์เป็นวัสดุที่ได้รับความสนใจในการนำมาเป็นส่วนหนึ่งของการพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดทางชีวภาพ (biosensor) และการประยุกต์ทางชีวการแพทย์ (biomedical applications) ทั้งนี้เป็นผลเนื่องมาจากการที่พอลิเมอร์มีหน่วยซ้ำตามความยาวของโซ่พอลิเมอร์ หากหมู่ข้างของหน่วยซ้ำมีหมู่ว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาเคมีเป็นองค์ประกอบก็สามารถนำมาใช้ในการติดสารที่จะทำหน้าที่เป็นโพรบในการตรวจวัดทางชีวภาพได้เป็นจำนวนมากต่อหนึ่งหน่วยพื้นที่ที่มีการปกคลุมด้วยพอลิเมอร์นั้นๆ นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มหน้าที่ที่เป็นประโยชน์ต่อการตรวจวัดให้กับพอลิเมอร์ เช่น การเพิ่มหน่วยซ้ำที่มีสมบัติชอบน้ำสูงเพื่อป้องกันการดูดซับอย่างไม่จำเพาะเจาะจง ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการตรวจวัดในกรณีที่มีสิ่งเจือปนในสารตัวอย่างที่สามารถเกิดอันตรกิริยาอย่างไม่จำเพาะเจาะจงได้ ในงานวิจัยนี้สนใจพัฒนาโคพอลิเมอร์ 2 ชนิดเพื่อใช้เป็นแพลทฟอร์มในการตรึง pyrrolidinyl peptide nucleic acid bearing D-prolyl-2-aminocyclopentanecarboxylic acid (ACPC) backbones) หรือ acpcPNA เป็นโพรบ เพื่อใช้ในการตรวจวัดดีเอ็นเอ ดังมีรายละเอียดในรายงานตอนที่ 1 และ 2 นอกจากนี้ผู้วิจัยยังสนใจที่จะพัฒนาพอลิเมอร์ที่ทำหลายหน้าที่ (multifunctional polymer) โดยเป็นทั้งสารทำให้แท่งนาโนทอง (gold nanorods; AuNRs) เสถียร เป็นสารที่ใช้ในการติดพีเอ็นเอ และสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ เพื่อจะพัฒนาอนุภาคดังกล่าวเป็นพาหะในการนำส่งพีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ที่สามารถตรวจติดตามได้ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สำหรับการประยุกต์ทาง antisense/antigene ต่อไปได้ในอนาคต ซึ่งแสดงรายละเอียดไว้ในรายงานตอนที่ 3 สำหรับรายงานตอนที่ 4 เป็นงานวิจัยใหม่ที่นำเสนอเพิ่มเติมจากในข้อเสนอโครงการคือ การพัฒนามอนอเมอร์ที่มีพีเอ็นเอเป็นองค์ประกอบ และการศึกษาสมบัติการเกิดไฮบริไดเซชันกับตัวมันเองได้หรือดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สมเกิดเป็นโครงสร้างที่มีสมบัติน่าสนใจในการพัฒนาไปใช้ทางชีวการแพทย์ต่อไปได้ในอนาคต

ตอนที่ 1 งานวิจัยเกี่ยวข้องกับการใช้โคพอลิเมอร์ชนิด poly[(propargyl methacrylate)-*ran*-(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)] (PPgMAMPC) ที่สามารถควบคุมอัตราส่วนของมอนอเมอร์แต่ละชนิดได้ตรึงบนสับสเตรทที่เป็นกระจกเคลือบทองด้วยวิธี “grafting to” ตามด้วยการตรึง และวิเคราะห์การจับยึดกับดีเอ็นเอด้วยเทคนิค surface plasmon resonance (SPR) ทั้งนี้แนวคิดดังกล่าวเกิดจากความสนใจในการพัฒนาแพลทฟอร์มที่สามารถใช้ในการตรึงโพรบพีเอ็นเอผ่านการทำปฏิกิริยาของหมู่แอลไคน์ในหน่วยซ้ำส่วน poly(propagyl methacrylate) (PPgMA) ของโคพอลิเมอร์กับพีเอ็นเอโพรบที่สังเคราะห์ให้มีหมู่ปลายเป็นเอไซด์ผ่านปฏิกิริยาคลิก (click reaction) แบบ Huisgen 1,3-dipolar azide – alkyne cycloaddition ซึ่งจัดเป็นปฏิกิริยาที่ให้เปอร์เซนต์ผลผลิตสูง สามารถทำได้ที่อุณหภูมิห้อง นอกจากนี้มีความคาดหวังว่าการมีพอลิเมทาคริโลอิลออกซีเอทิลฟอสโฟริลโคลีน (poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine); PMPC) อยู่ในโคพอลิเมอร์น่าจะช่วยลดการดูดซับอย่างไม่จำเพาะเจาะจงโดยเฉพาะอย่างยิ่งกับดีเอ็นเอที่ไม่ได้เป้าหมายในการตรวจวัด

ตอนที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับพัฒนาวิธีการตรวจหาลำดับเบสของดีเอ็นเอบนกระดาษที่ตรึงด้วยโคพอลิเมอร์บรัชชนิด poly[glycidyl methacrylate-co-poly(ethylene glycol) methacrylate] หรือ P(GMA-*co*-PEGMA) ซึ่งมีหมู่อิพ็อกไซด์ สามารถเกิดปฏิกิริยาการเปิดวงด้วยหมู่แอมิโนของโพรบ acpcPNA ทั้งนี้จะตรวจวัดการจับยึดระหว่างโพรบกับดีเอ็นเอเป้าหมายจากการเกิดสีที่สามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า โดยใช้เอนไซม์ขยายสัญญาณในรูปแบบ sandwich hybridization โดยใช้โพรบ acpcPNA 2 ชนิด ทำหน้าที่เป็น capture probe ในการจับกับดีเอ็นเอเป้าหมาย

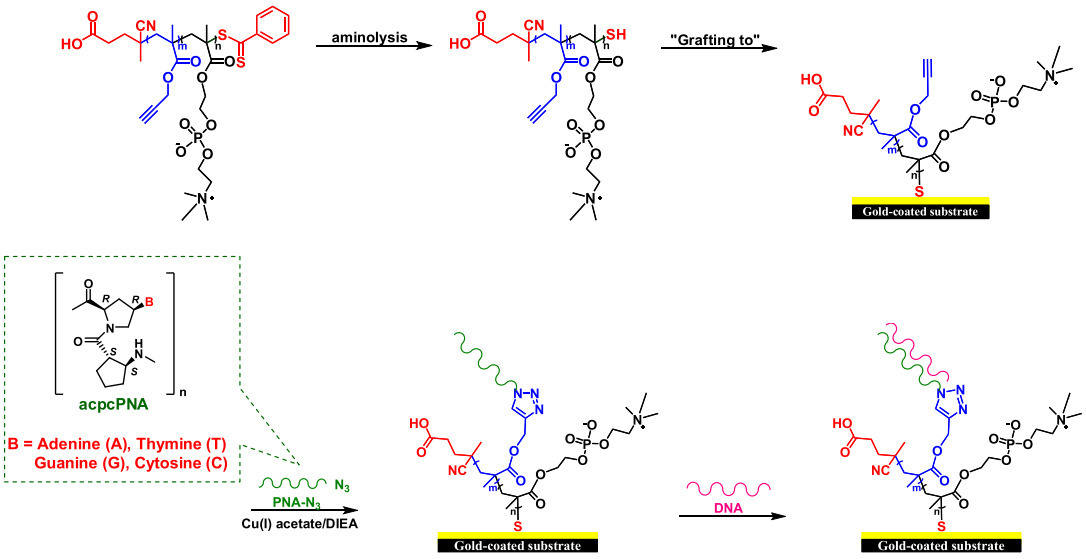
และ reporter probe ซึ่งใช้ในการขยายสัญญาณ แนวทางที่พัฒนาขึ้นนี้ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือในห้องปฏิบัติการ และสามารถพัฒนาต่อยอดไปสู่การวิเคราะห์ในรูปแบบ high throughput analysis ได้ในอนาคต โดยในงานวิจัยนี้สนใจตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายคือ human leukocyte antigen (HLA) ชนิด HLA-B*1502 alleles

ตอนที่ 3 ในงานวิจัยนี้มีเป้าหมายที่จะพัฒนาแท่งนาโนทอง (gold nanorods; AuNRs) เป็นพาหะ (carrier) ในการนำส่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ยา กรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก (deoxyribonucleic acid ; DNA) หรือเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิด (peptide nucleic acid; PNA) เข้าสู่เซลล์อย่างมีประสิทธิภาพ แต่อย่างไรก็ตามในการสังเคราะห์ AuNRs จำเป็นต้องมีการใช้ cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) เพื่อทำหน้าที่เป็น template ควบคุมให้อนุภาคมีรูปร่างตามต้องการ ดังนั้น AuNRs ที่สังเคราะห์ได้เริ่มต้นจะมี CTAB เป็นสารทำให้เสถียร (CTAB-AuNRs) ซึ่งจะส่งผลให้อนุภาคดังกล่าวมีความเป็นพิษ ไม่เหมาะสมในการนำมาประยุกต์ใช้งานทางการแพทย์ ในงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจที่จะแทนที่ CTAB ด้วยพอลิเมอร์ที่มีสมบัติเข้ากันได้ทางชีวภาพ เพื่อลดความเป็นพิษของอนุภาค ในที่นี้เลือกใช้โคพอลิเมอร์ของเมทาคริลิกแอซิดและ2-เมทาคริโลอิลออกซีเอทิลฟอสโฟริลโคลีน (poly[(methacrylic acid)-*ran*-(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)]; PMAMPC) เนื่องจากในโครงสร้างของ PMAMPC จะประกอบด้วย MA ซึ่งมีหมู่คาร์บอกซิลในโครงสร้างสามารถใช้ในการตรึงสารที่ต้องการนำส่งและส่วนของ MPC ที่มีความเข้ากันได้ดีทางชีวภาพสามารถลดความเป็นพิษให้กับ AuNRs ในงานวิจัยนี้เลือกใช้ acpcPNA เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่จะทำหน้าที่ยับยั้งการแสดงออกของยีน (gene silencing) ได้ โดยตรึงพีเอ็นเอเข้ากับหมู่คาร์บอกซิลของพอลิเมอร์ด้วย tetrapeptide (-Gly-Phe-Leu-Gly-) ที่จะถูกย่อยสลายได้ด้วยเอนไซม์ cathepsin B ที่มีอยู่ในเซลล์ นอกจากนี้ยังอาศัยหมู่คาร์บอกซิลในการศึกษาการตรึงสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ ทำให้สามารถติดตามการเข้าสู่เซลล์ได้อีกด้วย

ตอนที่ 4 เป็นการสังเคราะห์มอนอเมอร์ชนิดใหม่ที่มีพีเอ็นเอเป็นองค์ประกอบ โดยสนใจจะทำผ่าน 2 แนวทาง แนวทางแรกเป็นการสังเคราะห์มอนอเมอร์ที่เป็นอนุพันธ์ของเอทิลีนออกไซด์ที่มีปลาย 2 ข้างเป็นพีเอ็นเอชนิด epi-acpcPNA ซึ่งจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าพีเอ็นเอระบบดังกล่าวที่มีสเตอริโอเคมีของหมู่แทนที่ในวงไพโรลิดินิลต่างจาก acpcPNA 1 ตำแหน่ง สามารถเกิดการเข้าคู่กันเองได้ ลักษณะดังกล่าวจะทำให้สามารถสร้างพันธะระหว่างมอนอเมอร์เกิดเป็นพอลิเมอร์ได้โดยอาศัยการเข้าคู่ระหว่างเบสที่เป็นคู่สมกันของพีเอ็นเอ ลักษณะดังกล่าวเรียกว่าการเกิดซุปราโมเลคิวลาร์พอลิเมอไรเซชัน (supramolecular polymerization) เนื่องจากพันธะที่เชื่อมต่อมอนอเมอร์เข้าด้วยกันเกิดเป็นพอลิเมอร์เป็นพันธะไฮโดรเจน สมบัติของพอลิเมอร์ควรจะแปรเปลี่ยนแบบผันกลับได้ตามการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ตัวทำละลาย pH เป็นต้น นับเป็นการพัฒนา responsive polymer จากพีเอ็นเอ ซึ่งเป็นรูปแบบที่ยังไม่มีรายงานมาก่อน แนวทางที่สองเป็นการสังเคราะห์อนุพันธ์ของเอทิลีนออกไซด์ที่มีปลาย 2 ข้างเป็นพีเอ็นเอชนิด acpcPNA จะทำให้ได้พอลิเมอร์ชนิดใหม่ที่มีพีเอ็นเอเป็นองค์ประกอบ ที่สามารถเชื่อมขวางกับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สมกันเกิดเป็นพอลิเมอร์คอมเพล็กซ์ (polymer complex) ที่อาจจะพัฒนาไปเป็นระบบนำส่งดีเอ็นเอเพื่อประยุกต์ใช้ทางด้าน antisense/antigene ได้ในอนาคต

<u>ตอนที่ 1 การพัฒนาโคพอลิเมอร์ที่สามารถติดพีเอ็นเอโพรบด้วยปฏิกิริยาคลิกและการตรวจวัดดีเอ็นเอ</u>

งานวิจัยในส่วนนี้เป็นการนำโคพอลิเมอร์ของ PPgMAMPC ที่มีอัตราส่วนของโคพอลิเมอร์แตกต่างกันมาเตรียมให้อยู่ในรูปของโคพอลิเมอร์บรัช โดยตรึงลงบนสับสเตรทกระจกเคลือบทองด้วยวิธี “grafting to” เพื่อศึกษาการประยุกต์ใช้เป็นแพลทฟอร์มสำหรับตรึงพีเอ็นเอโพรบที่ปลายสายดัดแปรด้วยหมู่เอไซด์สำหรับการตรวจวัดลำดับเบสของดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค surface plasmon resonance (SPR) ซึ่งแสดงขั้นตอนการตรึงและการจับยึดกับดีเอ็นเอใน**รูปที่ 1.1**



รูปที่ 1.1 ขั้นตอนการตรึงโคพอลิเมอร์บรัชของ PPgMAMPC บนสับสเตรทกระจกเคลือบทองเพื่อประยุกต์ใช้เป็นแพลทฟอร์มในการตรึงพีเอ็นเอโพรบสำหรับการตรวจวัดลำดับเบสของดีเอ็นเอ

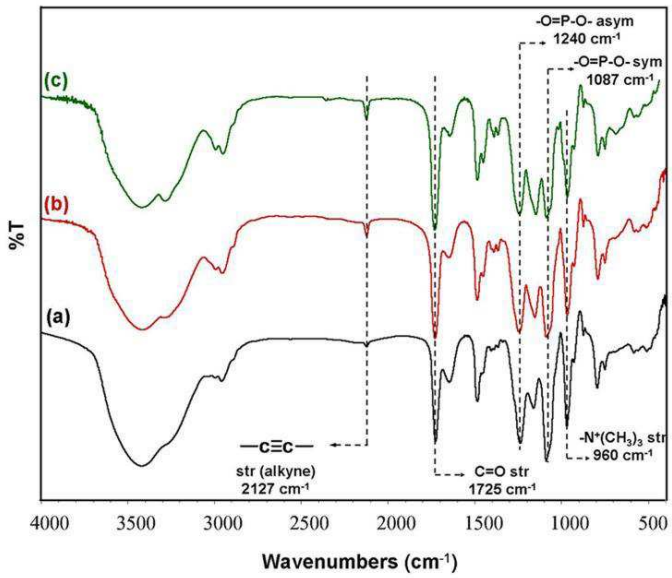
จากการศึกษาพบว่าสามารถสังเคราะห์โคพอลิเมอร์แบบสุ่มของ PPgMAMPC ที่กำหนดให้มีอัตราส่วนระหว่างมอนอเมอร์ PgMA:MPC ที่ใส่เข้าไป (copolymer ratio in feed) 3 อัตราส่วนคือ 70:30, 50:50 และ 30:70 ซึ่งจะทำให้ได้โคพอลิเมอร์ที่มีอัตราส่วนของโคพอลิเมอร์ในผลิตภัณฑ์ (copolymer ratio) เป็น $PPgMA_{65}MPC_{35}$, $PPgMA_{45}MPC_{55}$ และ $PPgMA_{38}MPC_{62}$ โดยมีน้ำหนักโมเลกุล (วิเคราะห์ด้วยเทคนิค ^{1}H NMR) ดังแสดงใน**ตารางที่ 1.1** และทำการพิสูจน์ทราบโครงสร้างของโคพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค ^{1}H NMR และ FT-IR จากนั้นทำการเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันที่ปลายของ PPgMAMPC จากหมู่ dithioester ให้เป็นหมู่ thiol โดยผ่านการทำปฏิกิริยา aminolysis (ขั้นที่ 1 ใน**รูปที่ 1.1**) ด้วยการทำปฏิกิริยากับ hydrazine ในสารละลายผสมระหว่างเอทานอลกับเททราไฮโดรฟิวแรน (1:1 (v/v)) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ซึ่งสามารถวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของหมู่ฟังก์ชันได้ด้วยเทคนิค ^{1}H-NMR และ UV-visible spectroscopy

ตารางที่ 1.1 องค์ประกอบของโคมอนอเมอร์และน้ำหนักโมเลกุลของโคพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้ (Target DP = 200)

Monomer composition in feed (mol%)		Monomer composition in copolymer (mol%)[a]		$\overline{M}_n$ [a] (kDa)	DP[a]	Copolymer abbreviation
PgMA	MPC	PgMA	MPC			
70	30	65	35	38.4	208	$PPgMA_{65}MPC_{35}$
50	50	45	55	46.7	213	$PPgMA_{45}MPC_{55}$
30	70	38	62	40.0	173	$PPgMA_{38}MPC_{62}$

[a] Calculated from ^{1}H NMR data

นอกจากนี้ยังสามารถยืนยันหมู่ฟังก์ชันในโครงสร้างของโคพอลิเมอร์ด้วย FTIR spectroscopy จาก**รูปที่ 1.2** สามารถสังเกตเห็นพีกที่เป็นลักษณะเฉพาะของหน่วยซ้ำ MPC คือ C=O (ester) stretching ที่ตำแหน่ง 1725 cm^{-1}, asymmetric O=P-O stretching ที่ตำแหน่ง 1240 cm^{-1}, symmetric O=P-O stretching, ที่ตำแหน่ง 1087 cm^{-1} และ -$N^{+}(CH_3)_3$ ที่ตำแหน่ง 960 cm^{-1} ส่วนพีกที่เป็นลักษณะเฉพาะของ PgMA สังเกตได้จากการปรากฏของพีก –C≡C– stretching ที่ตำแหน่ง 2127 cm^{-1} โดยความเข้มของพีกดังกล่าวเพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนกับองค์ประกอบ PgMA ที่เพิ่มขึ้นในโคพอลิเมอร์



รูปที่ 1.2 FTIR spectra ของ (a) $PPgMA_{38}MPC_{62}$ (40.0 kDa), (b) $PPgMA_{45}MPC_{55}$ (46.7 kDa) และ (c) $PPgMA_{65}MPC_{35}$ (38.4 kDa)

จากนั้นจึงนำโคพอลิเมอร์ที่เตรียมได้ไปตรึงลงบนแผ่นสับสเตรทกระจกเคลือบทองด้วยวิธี “grafting to” ผ่านการเกิดพันธะระหว่างหมู่ไทออลที่ปลายโซ่ของโคพอลิเมอร์กับพื้นผิวทอง โดยทำการแช่แผ่นสับสเตรทที่เคลือบทองหลังการทำความสะอาดด้วยสารละลายผสมระหว่าง H_2SO_4:H_2O_2 ที่อัตราส่วน 7:3 และ air plasma ลงในสารละลายพอลิเมอร์เข้มข้น 0.2 mM เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการติดตามความสำเร็จในการตรึงโคพอลิเมอร์บรัชด้วยเทคนิคการวัดมุมสัมผัสของน้ำ (water contact angle; WCA) และเทคนิค SPR (**ตารางที่ 1.2**) จากผลการทดลองพบว่าการตรึงโคพอลิเมอร์ $PPgMA_{65}MPC_{35}$ ลงบนพื้นผิวของวัสดุ ทำให้สามารถตรวจวัดมุมสัมผัสของน้ำได้มากที่สุด (87.9 ± 4.2 degree) แสดงให้เห็นถึงสมบัติความไม่ชอบน้ำของพื้นผิว เนื่องจากการตรึงโคพอลิเมอร์ที่มีอัตราส่วนของ PgMA ที่มีสมบัติไม่ชอบน้ำในปริมาณมาก และเมื่อตรึงโพรบพีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคือ N_3-TTT TTT TTT-$LysNH_2$ สำหรับการตรวจวัดดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สมกัน (complementary DNA) คือ 5’-AAA AAA AAA-3’ ลงบนพื้นผิวของวัสดุที่มีการตรึงโคพอลิเมอร์ $PPgMA_{65}MPC_{35}$ ผ่านปฏิกิริยาคลิก ระหว่างหมู่แอลไคน์ของโคพอลิเมอร์และเอไซด์ของพีเอ็นเอ พบว่ามุมสัมผัสของน้ำมีค่าลดลง (74.5 ± 2.2 degree) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงความสำเร็จในการตรึงพีเอ็นเอลงบนโคพอลิเมอร์แพลทฟอร์มได้ ในขณะที่สับสเตรทที่มีการตรึงด้วยโคพอลิเมอร์ที่มีอัตราส่วนของมอนอเมอร์ PgMA น้อยกว่า ได้แก่ $PPgMA_{38}MPC_{62}$ และ $PPgMA_{45}MPC_{55}$ นั้นพบว่ามุมสัมผัสของน้ำมีค่าเพิ่มขึ้นหลังจากทำการตรึงพีเอ็นเอ จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นความสำเร็จทั้งในขั้นตอนการตรึงโคพอลิเมอร์ของ PPgMAMPC ลงบนสับสเตรทที่เคลือบทองและขั้นตอนการตรึงโพรบพีเอ็นเอลงบนโคพอลิเมอร์บรัชผ่านปฏิกิริยาคลิกได้ นอกจากนี้ได้ทำการติดตาม

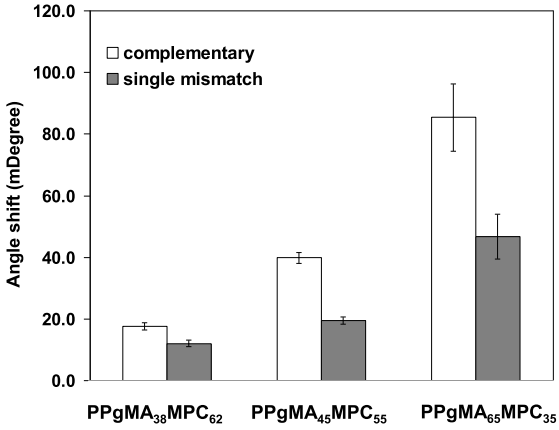
การเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวด้วยเทคนิค SPR โดยจากผลการทดลองที่แสดงใน**ตารางที่ 1.2** พบว่าสามารถติดตามการเกิดปฏิกิริยาในแต่ละขั้นตอนได้โดยวิเคราะห์จากค่ามุม SPR ที่เปลี่ยนไป (SPR angle shift) และจากข้อมูลดังกล่าวทำให้สามารถคำนวณหาปริมาณของโคพอลิเมอร์และโพรบพีเอ็นเอที่ถูกตรึงอยู่บนพื้นผิวของวัสดุได้

ตารางที่ 1.2 ค่ามุมสัมผัสของน้ำและค่า SPR angle shift ที่เปลี่ยนแปลงไปหลังจากการตรึงโคพอลิเมอร์ PPgMAMPC ที่มีอัตราส่วนแตกต่างกันลงบนสับสเตรทกระจกเคลือบทองตามด้วยการตรึงพีเอ็นเอโพรบ

Entry	Sample	Water contact angle (degree)	SPR data	
			Angle shift (mDegree)	Quantity ng/cm^2
1	Au	71.9 ± 1.3	-	-
2	Au-$PPgMA_{38}MPC_{62}$	44.6 ± 0.9	1024.8 ± 81.8	854.0 ± 68.1
3	Au-$PPgMA_{45}MPC_{55}$	46.6 ± 3.5	882.1 ± 166.6	735 ± 138.9
4	Au-$PPgMA_{65}MPC_{35}$	87.9 ± 4.2	1323.1 ± 56.1	1102 ± 46.8
5	Au-$PPgMA_{38}MPC_{62}$-PNA	66.5 ± 2.8	102.0 ± 0.0	85 ± 0.0
6	Au-$PPgMA_{45}MPC_{55}$-PNA	60.6 ± 2.2	74.8 ± 5.9	62.3 ± 6.3
7	Au-$PPgMA_{65}MPC_{35}$-PNA	74.5 ± 2.2	132.6 ± 113.1	110.5 ± 0.1

หลังจากตรึงโพรบพีเอ็นเอ (N_3-TTT TTT TTT-LysNH_2) ลงบนโคพอลิเมอร์แล้วจึงนำไปการตรวจวัดลำดับเบสของดีเอ็นเอ ทั้งแบบที่มีลำดับเบสคู่สมกัน (complementary DNA) และแบบที่ลำดับเบสผิดไป 1 ตำแหน่ง (single mismatch DNA) ด้วยเทคนิค SPR เบื้องต้นได้ทำการตรวจวิเคราะห์กับดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 50 μM ในสารละลาย phosphate buffer saline (pH = 7.4) ที่มีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 100 mM โดยจากผลการทดลองใน**รูปที่ 1.3** พบว่าแพลทฟอร์มที่เตรียมจากโคพอลิเมอร์ที่มีอัตราส่วนของมอนอเมอร์ PgMA ที่มีหมู่แอลไคน์ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยาคลิกกับเอไซด์ของโพรบพีเอ็นเอปริมาณมากจะสามารถตรวจวัดดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สมกันได้ในปริมาณที่มากตามไปด้วย โดยสับสเตรทที่ถูกตรึงด้วย $PPgMA_{65}MPC_{35}$ สามารถตรวจวัดดีเอ็นเอได้ในปริมาณมากที่สุด (85.5±10.9 mDegree) รองลงมาคือ $PPgMA_{45}MPC_{55}$ (39.9±1.8 mDegree) และ $PPgMA_{38}MPC_{62}$ (17.6±1.1 mDegree) ตามลำดับ อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าแพลทฟอร์มที่เตรียมจากโคพอลิเมอร์ที่มีอัตราส่วนของมอนอเมอร์ PgMA มาก ไม่เพียงแต่จะตรวจวัดปริมาณดีเอ็นที่มีลำดับเบสคู่สมได้ในปริมาณมากเท่านั้น แต่ยังตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสผิดไป 1 ตำแหน่งได้มากเช่นเดียวกัน ซึ่งอาจมีสาเหตุเนื่องมาจากการที่แอลไคน์บนโคพอลิเมอร์ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาคลิกกับโพรบพีเอ็นเอได้ทั้งหมดดังนั้นจึงทำให้หมู่แอลไคน์ที่เหลือนี้ไปเกิดดูดซับอย่างไม่จำเพาะเจาะจง (non-specific adsorption) กับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสผิดไป 1 ตำแหน่งได้

PNA probe	N_3-TTT TTT TTT-LysNH_2
Complementary DNA	5'-AAA AAA AAA-3'
Single mismatch DNA	5'-AAA ATA AAA-3'



รูปที่ 1.3 SPR angle shift ที่เปลี่ยนแปลงไปบนแพลทฟอร์มที่เตรียมจากโคพอลิเมอร์ PPgMAMPC ที่มีอัตราส่วนระหว่างมอนอเมอร์แตกต่างกันเมื่อนำไปตรวจวัดลำดับเบสของดีเอ็นเอทั้งที่เป็นคู่สมกัน (complementary DNA) และแบบที่มีลำดับเบสผิดไป 1 ตำแหน่ง (single mismatch DNA)

ตารางที่ 1.3 ค่า %hybridization efficiency และค่า %mismatch discrimination ในการตรวจวัดลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยของแพลทฟอร์มที่เตรียมจากโคพอลิเมอร์ PPgMAMPC และตรึงด้วยพีเอ็นเอโพรบ

Sample	$\%HE_{com}$	%MD
Au-PPgMA_{38}MPC_{62}-PNA	20%	32%
Au-PPgMA_{45}MPC_{55}-PNA	61%	52%
Au-PPgMA_{65}MPC_{35}-PNA	71%	58%
Au-S-PNA (Biosens. Bioelectron. 2009, *24*, 3544-3549)	20%	54%
Au-biotin-SA-biotin-PNA (Biosens. Bioelectron. 2010, *25*, 1064-1069)	58%	>90%

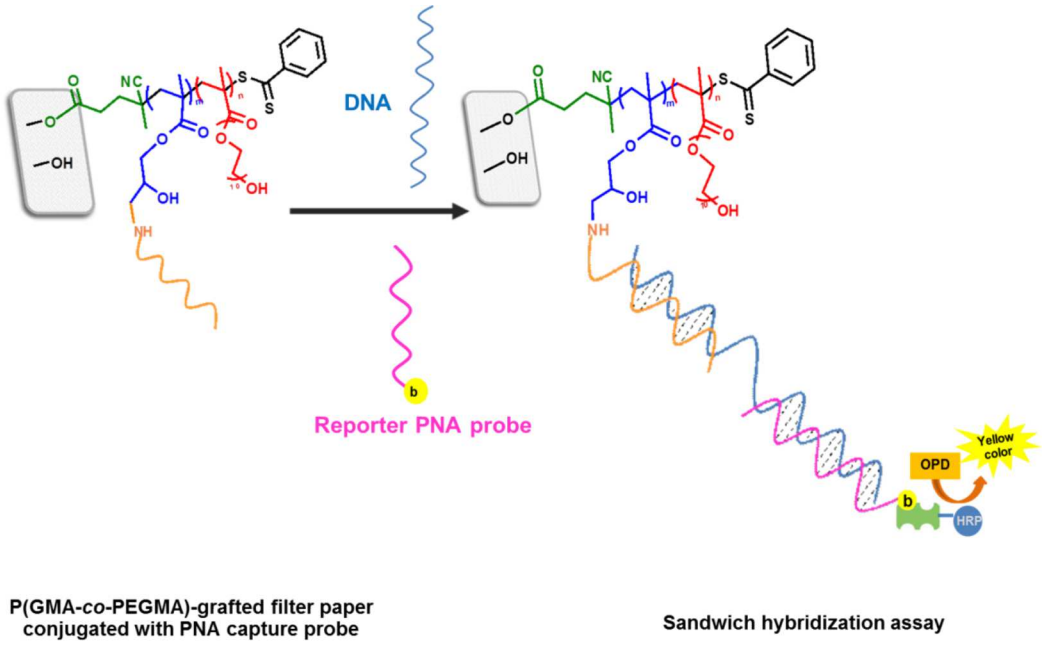
$$\%HE = \frac{\text{target density}}{\text{probe density}} \times 100$$

$$\%MD = \frac{\%HE \text{ of complementary DNA} - \%HE \text{ of mismatched DNA}}{\%HE \text{ of complementary DNA}} \times 100$$

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้จากเทคนิค SPR มาคำนวณค่าประสิทธิภาพในการจับยึดกับดีเอ็นเอ ในรูปของ %hybridization efficiency (%HE) และ %mismatch discrimination (%MD) (**ตารางที่ 1.3**) พบว่าการตรึงโพรบพีเอ็นเอลงบนแพลทฟอร์มที่เตรียมจากโคพอลิเมอร์ $PPgMA_{65}MPC_{35}$ มีค่า %HE สูงที่สุด (71%) เมื่อเปรียบเทียบกับแพลทฟอร์มที่เตรียมจากโคพอลิเมอร์สัดส่วนอื่น และยังมีค่าสูงกว่าระบบที่ทำการตรึงโพรบพีเอ็นเอ็นเอลงบนสับสเตรทที่เคลือบทองโดยตรงผ่านการเกิด self-assembly ระหว่างพีเอ็นเอที่มีหมู่ปลายเป็นหมู่ thiol กับพื้นผิวของทอง (Au-S-PNA) รวมถึงระบบที่มีการตรึงพีเอ็นเอผ่านไบโอติน (Au-biotin-PNA) แต่เมื่อพิจารณาค่า %MD พบว่ายังมีค่าต่ำกว่าระบบ Au-biotin-PNA ทั้งนี้มีสาเหตุเนื่องมาจากการที่แพลทฟอร์มที่เตรียมจากโคพอลิเมอร์ $PPgMA_{65}MPC_{35}$ นั้นสามารถเกิดการดูดซับอย่างไม่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสผิดไป 1 ตำแหน่งได้ดังเหตุผลที่กล่าวข้างต้นนั่นเอง

<u>ส่วนที่ 2 การพัฒนากระดาษที่ตรึงด้วยโคพอลิเมอร์บรัชและพีเอ็นเอสำหรับการตรวจวัดลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์ขยายสัญญาณ</u>

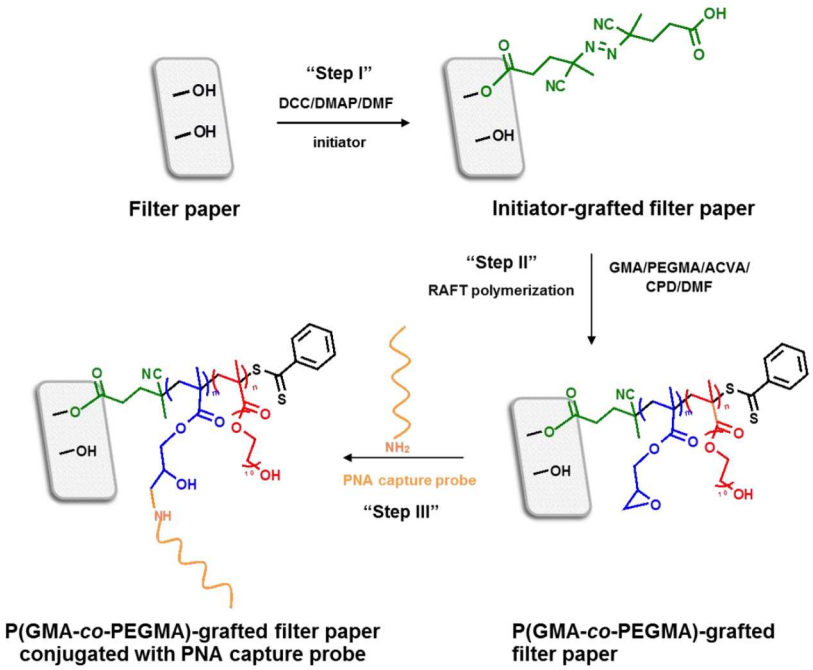
เป็นงานวิจัยที่สนใจจะพัฒนาวิธีการตรวจหาลำดับเบสของดีเอ็นเอบนกระดาษที่ตรึงด้วยโคพอลิเมอร์ชนิด poly[glycidyl methacrylate-co-poly(ethylene glycol) methacrylate] หรือ P(GMA-*co*-PEGMA) ซึ่งมีหมู่อิพ็อกไซด์สามารถเกิดปฏิกิริยาการเปิดวง (ring opening reaction) ด้วยหมู่แอมิโนของโพรบ ซึ่งในงานวิจัยนี้เลือกใช้ acpcPNA เป็นโพรบ ทั้งนี้จะตรวจวัดการจับยึดระหว่างโพรบกับดีเอ็นเอเป้าหมายจากการเกิดสีที่สามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า โดยแนวทางที่ใช้ในการขยายสัญญาณเป็นการใช้เอนไซม์ขยายสัญญาณในรูปแบบ sandwich hybridization โดยใช้โพรบ acpcPNA 2 ชนิด ชนิดหนึ่งทำหน้าที่เป็น capture probe ในการจับกับดีเอ็นเอเป้าหมาย และอีกชนิดหนึ่งทำหน้าที่เป็น reporter probe ซึ่งใช้ในการขยายสัญญาณ ตามรูปแบบที่แสดงใน**รูปที่ 2.1**



รูปที่ 2.1 สมการแสดงการตรวจวัดลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยใช้ acpcPNA เป็น capture probe และ reporter probe ร่วมกับกระดาษที่ตรึงด้วย P(GMA-*co*-PEGMA) brushes และใช้การใช้เอนไซม์ขยายสัญญาณ ในรูปแบบ sandwich hybridization

2.1 การเตรียมและพิสูจน์เอกลักษณ์ของกระดาษกรองที่ตรึงด้วยโคพอลิเมอร์บรัช

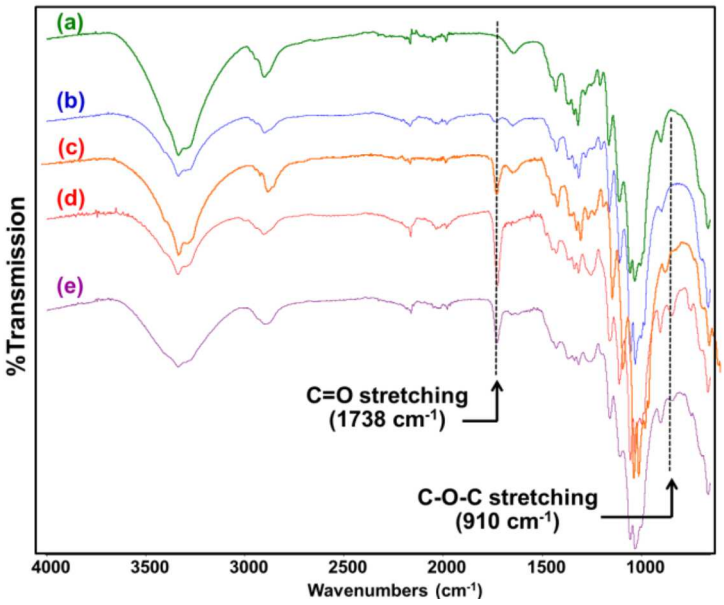
สามารถเตรียมกระดาษกรองที่ตรึงด้วยโคพอลิเมอร์บรัช หรือ P(GMA-co-PEGMA)-grafted filter paper โดยเริ่มจากการตรึงหมู่ริเริ่มปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันผ่านปฏิกิริยาระหว่าง 4,4'-azobis(4-cyanovaleric acid) (ACVA) กับหมู่ไฮ ดรอกซิลของเซลลูโลสบนพื้นผิวกระดาษกรอง โดยใช้ *N,N*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) เป็นรีเอเจนต์คู่ควบ และใช้ 4-dimethylaminopyridine (DMAP) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา หลังจากนั้นนำกระดาษกรองที่ติดหมู่ริเริ่มปฏิกิริยาที่เตรียมได้ข้างต้นไปทำปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันริเริ่มจากพื้นผิว (surface-initiated polymerization) ผ่านกลไกแบบ reversible addition fragmentation chain transfer (RAFT) โดยใช้ ACVA เป็นสารริเริ่มปฏิกิริยา และ 4-cyanopentanoic acid dithiobenzoate (CPD) เป็นสารถ่ายโอนโซ่ โดยใช้อัตราส่วนโดยโมลระหว่าง GMA:PEGMA เป็น 70:30 และ 30:70 ทั้งนี้กำหนดให้ degree of polymerization (DP) มีค่าเท่ากับ 200 แสดงรายละเอียดของการเตรียมใน **Step I-II รูปที่ 2.2** ในขั้นตอนการตรึง PNA capture probe ลงบน P(GMA-co-PEGMA)-grafted filter paper ทำได้โดยอาศัยปฏิกิริยาการเปิดวงอิพอกไซด์ในโครงสร้างของโคพอลิเมอร์ในหน่วยซ้ำส่วนที่เป็น GMA (**Step III รูปที่ 2.2**)



รูปที่ 2.2 สมการแสดงการเตรียม P(GMA-*co*-PEGMA)-filter paper ผ่านปฏิกิริยา RAFT polymerization (Step I-II) และการตรึง PNA capture probe โดยอาศัยปฏิกิริยาการเปิดวงอิพอกไซด์

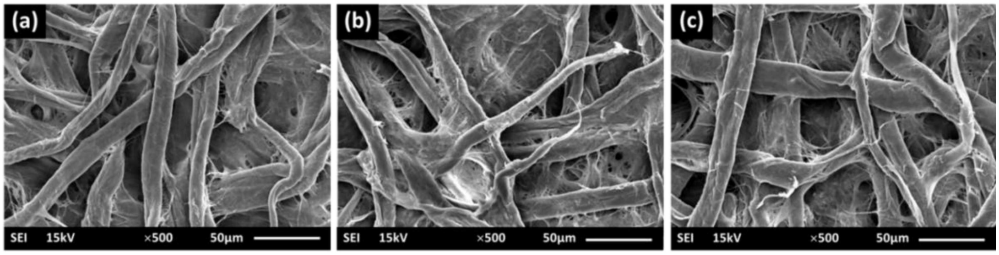
จากการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันบนพื้นผิวกระดาษกรองด้วยเทคนิค FT-IR spectroscopy (**รูปที่ 2.3**) พบพีก C=O stretching ของหมู่เอสเทอร์ของตัวริเริ่มปฏิกิริยาที่ตำแหน่ง 1738 cm^{-1} ในสเปกตรัม **2.3b** หลังจากการดัดแปรพื้นผิวกระดาษด้วยหมู่ริเริ่มปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน ซึ่งไม่พบพีกดังกล่าวบนกระดาษกรองที่ยังไม่ได้ดัดแปรพื้นผิว (**2.3a**) แสดงให้เห็นว่าสามารถตรึงหมู่ริเริ่มปฏิริยาลงไปได้ และจากสเปกตรัม **2.3c** จะพบพีกในตำแหน่งดังกล่าวที่มีความเข้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัด พร้อมกับปรากฏพีก C-O-C stretching ของวงอิพ็อกไซด์ในโครงสร้างของ GMA ที่ตำแหน่ง 910 cm^{-1} แสดงให้เห็นว่าสามารถตรึงโคพอลิเมอร์ลงบนพื้นผิวกระดาษกรองได้ ทั้งนี้อัตราส่วนระหว่าง C-O-

C stretching ที่ตำแหน่ง 910 cm^{-1}และ C=O stretching ที่ตำแหน่ง 1738 cm^{-1} จะแปรผันตามอัตราส่วนที่เพิ่มขึ้นของ GMA ในโคพอลิเมอร์จาก 30 เป็น 70% (**2.3c เทียบกับ 2.3d**) สามารถยืนยันการมีอยู่ของ PNA capture probe บนพื้นผิวของ P(GMA-co-PEGMA)-grafted filter paper หลังจากคอนจูเกตกับพีเอ็นเอแล้ว โดยอาศัยการติดตามการลดลงของพีก C-O-C stretching ของวงอิพ็อกไซด์ ที่ตำแหน่ง 910 cm^{-1} ในพีก **2.3e**



รูปที่ 2.3 FT-IR สเปกตรัมของกระดาษกรอง: (a) ก่อนการดัดแปร, (b) หลังจากการติดหมู่ริเริ่ม, หลังจากกราฟต์ด้วย P(GMA-*co*-PEGMA) ที่มี GMA:PEGMA เท่ากับ (c) 30:70 and (d) 70:30, และ (e) หลังจากคอนจูเกตกับ PNA capture probe

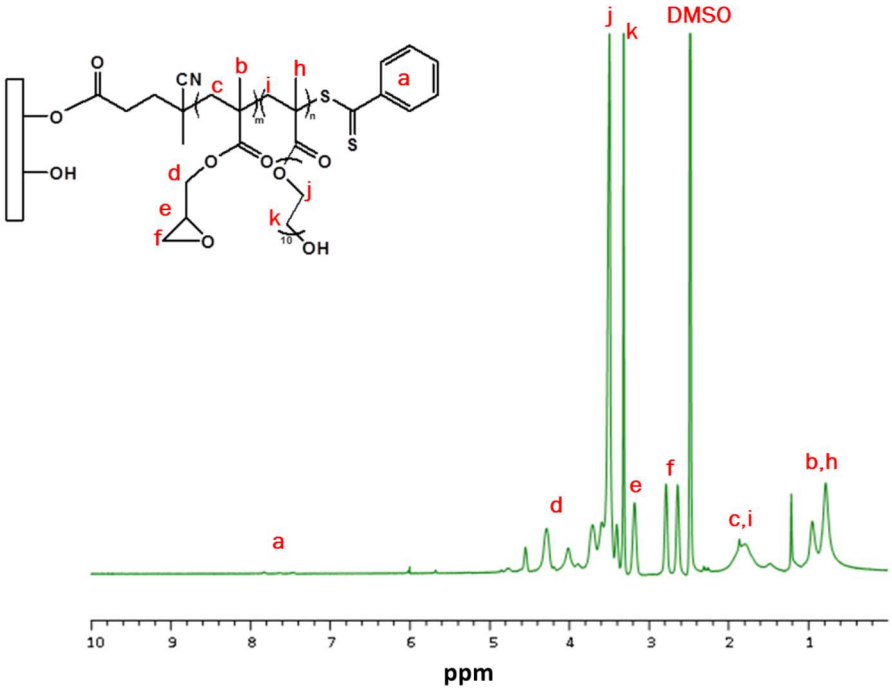
จาก**รูปที่ 2.4** จะเห็นได้ว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาของกระดาษในระดับไมโครเมตรหลังจากการตรึงหมู่ริเริ่มและการกราฟต์ด้วยโคพอลิเมอร์ แสดงให้เห็นว่าชั้นโคพอลิเมอร์ที่เคลือบอยู่มีความบางมาก นอกจากนี้ยังพบว่ากระดาษที่กราฟต์ด้วยโคพอลิเมอร์มีความทนต่อการฉีกขาด (tear resistance) ได้ดีกว่ากระดาษเริ่มต้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งหลังจากการสัมผัสกับสารละลายหลายชนิดระหว่างขั้นการติดพีเอ็นเอและการตรวจวัดดีเอ็นเอ นับเป็นข้อดีอีกอย่างหนึ่งของวัสดุที่พัฒนาขึ้น



รูปที่ 2.4 เอสอีเอ็มไมโครกราฟต์ของกระดาษกรอง (a) ก่อนการดัดแปร, (b) หลังจากการตรึงหมู่ริเริ่ม และ (c) หลังจากการกราฟต์ด้วย P(GMA-*co*-PEGMA) (GMA:PEGMA of 70:30)

2.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของโดพอลิเมอร์ P(GMA-*co*-PEGMA) ที่สังเคราะห์ได้ในสารละลาย

จากการตรวจสอบโครงสร้างทางเคมีของ P(GMA-*co*-PEGMA) ที่สังเคราะห์ได้ในสารละลายด้วยเทคนิค ^{1}H-NMR (**รูปที่ 2.5**) พบว่า P(GMA-*co*-PEGMA) จะแสดงสัญญาณโปรตอนของหมู่เมทิลีน (CH_2) ในโซ่หลัก (H_c และ H_i) ที่ตำแหน่ง 1.6-1.9 ppm สัญญาณโปรตอนของหมู่เมทิล (CH_3) (H_b และ H_h) ที่ตำแหน่ง 0.8-1.0 ppm สัญญาณโปรตอนของเมทิลีนของวงอิพ็อกไซด์ (H_f) ที่ตำแหน่ง 2.6-2.8 ppm สัญญาณโปรตอน e , k , j และ d (H_e ,H_k H_j และ Hd) ที่ตำแหน่ง 3.2, 3.4, 3.6 และ 4.2 ppm ตามลำดับ ในขณะที่โปรตอนของหมู่ dithiobenzoate (H_a) จะปรากฏสัญญาณในช่วง 7.4-8.0 ppm และสามารถคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลและสัดส่วนระหว่าง GMA:PEGMA ในโคพอลิเมอร์ได้ตามสมการที่ 1-6 โดยคำนวณจากพื้นที่ใต้พีกในสเปกตรัมของ P(GMA-*co*-PEGMA) ทั้งนี้แสดงน้ำหนักโมเลกุล และอัตราส่วนโดยโมลของ GMA:PEGMA ใน P(GMA-*co*-PEGMA) ที่สังเคราะห์ได้เทียบกับค่าเป้าหมายใน **ตารางที่ 2.1** ซึ่งพบว่าค่าที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับค่าเป้าหมายแสดงให้เห็นว่าสามารถควบคุมการเกิดปฏิกิริยา RAFT polymerization ได้ดี



รูปที่ 2.5 ^{1}H-NMR spectra ของ P(GMA-*co*-PEGMA) เมื่อใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย

$$\text{จำนวนหน่วยซ้ำทั้งหมด} = \left\{ \frac{\text{intergral of the Hb และ Hh/6}}{\text{intergral of the Ha/5}} \right\} \times 2 \qquad \text{สมการที่ 2.1}$$

$$\text{จำนวนหน่วยซ้ำของ GMA} = \left\{ \frac{\text{intergral of the Hf/2}}{\text{intergral of the Ha/5}} \right\} \qquad \text{สมการที่ 2.2}$$

$$\text{จำนวนหน่วยซ้ำของ GMA} = \text{จำนวนหน่วยซ้ำทั้งหมด} - \text{จำนวนหน่วยซ้ำของ PEGMA} \qquad \text{สมการที่ 2.3}$$

$$\text{Mn} = [\text{จำนวนหน่วยซ้ำของ GMA} \times \text{MW ของ GMA (142 g/mol)} + \text{จำนวนหน่วยซ้ำของ PEGMA} \times \text{MW ของ PEGMA (360 g/mol)}] \qquad \text{สมการที่ 2.4}$$

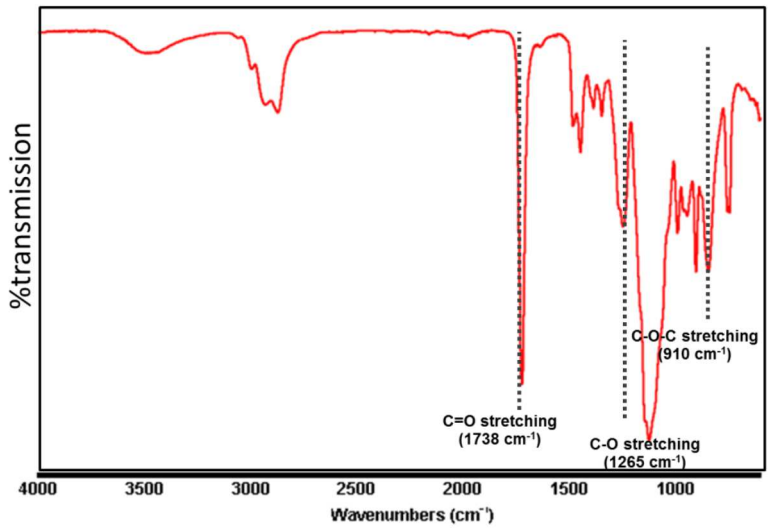
$$\text{สัดส่วนของ GMA ในโคพอลิเมอร์ (\%)} = \left\{ \frac{\text{จำนวนหน่วยซ้ำของ GMA}}{\text{จำนวนหน่วยซ้ำทั้งหมด}} \right\} \times 100 \qquad \text{สมการที่ 2.5}$$

$$\text{สัดส่วนของ PEGMA ในโคพอลิเมอร์ (\%)} = \left\{ \frac{\text{จำนวนหน่วยซ้ำของ PEGMA}}{\text{จำนวนหน่วยซ้ำทั้งหมด}} \right\} \times 100 \qquad \text{สมการที่ 2.6}$$

ตารางที่ 2.1 น้ำหนักโมเลกุล และอัตราส่วนโดยโมลของ GMA:PEGMA ใน P(GMA-*co*-PEGMA) ที่สังเคราะห์ได้เทียบกับค่าเป้าหมาย

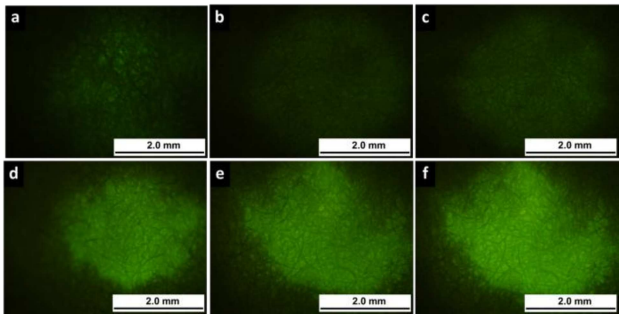
	ค่าเป้าหมาย	ค่าที่ได้จาก ^{1}H-NMR
น้ำหนักโมเลกุล (g/mol)	41760	42171
สัดส่วน GMA:PEGMA ในโคพอลิเมอร์ (%)	70:30	56:44

นอกจากนี้ยังสามารถตรวจสอบโครงสร้างทางเคมีของ P(GMA-*co*-PEGMA) ด้วยเทคนิค FT-IR (**รูปที่ 2.6**) จากสเปกตรัมจะพบพีกที่แสดงลักษณะเฉพาะดังนี้ C=O stretching ของเอสเทอร์ที่ตำแหน่ง 1738 cm^{-1}, C-O stretching ที่ตำแหน่ง 1265 cm^{-1} และพีก C-O-C stretching ของวงอิพอกไซด์ในโครงสร้างของ GMA ที่ตำแหน่ง 910 cm^{-1} แสดงให้เห็นว่าสามารถสังเคราะห์ P(GMA-*co*-PEGMA) ได้

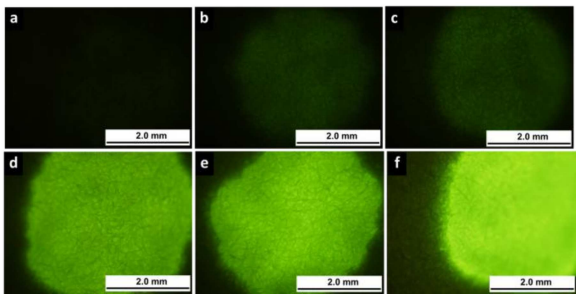


รูปที่ 2.6 FTIR spectrum ของ P(GMA-*co*-PEGMA)

2.3 การตรึง PNA capture probe



รูปที่ 2.7 ภาพถ่ายฟลูออเรสเซนต์ของกระดาษกรองหลังจากคอนจูเกตกับ flu-o-PNA(T9)-LysNH$_2$ ในสารละลาย 0.1 M PBS pH 7.4 ที่มีการเติม TEA ความเข้มข้นต่างๆ: (a,d) 0.1, (b,e) 0.2, and (c,f) 0.3 μM : (a-c) กระดาษกรองก่อนการดัดแปร; (d-f) P(GMA-*co*-PEGMA)-grafted filter paper (GMA:PEGMA ,70:30)



รูปที่ 2.8 ภาพถ่ายฟลูออเรสเซนต์ของกระดาษกรองหลังจากคอนจูเกตกับ flu-o-PNA(T9)-LysNH$_2$ ในสารละลายบัฟเฟอร์ของ 0.1 M $NaCO_3$-$NaHCO_3$ buffer ที่มี pH ต่างๆ: (a,d) 8.0, (b,e) 9.0, และ (c,f) 10.0: (a-c) กระดาษกรองก่อนการดัดแปร; (d-f) P(GMA-*co*-PEGMA)-grafted filter paper (GMA:PEGMA ,70:30)

จากหลักการที่ว่าปฏิกิริยาเปิดวงอิพ็อกไซด์จะเกิดได้ดีในสารละลายเบส ผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาการปรับเปลี่ยนความเป็นเบสของสารละลายในขั้นการคอนจูเกตกับพีเอ็นเอ โดยการเติม triethylamine (TEA) ความเข้มข้นต่างๆ (0.1, 0.2 and 0.3 μM) หรือการใช้สารละลายบัฟเฟอร์ (0.1 M $NaCO_3$-$NaHCO_3$ buffer). ที่มี pH ในช่วง 8-10 ทั้งนี้ใช้พีเอ็นเอที่ติดฉลากฟลูออเรสเซนต์ คือ flu-o-PNA(T9)-LysNH_2 เป็นแบบจำลองในการศึกษานี้ เพื่อสามารถติดตามการคอนจูเกตได้ด้วย Fluorescence microscope จากผลการทดลองที่แสดงใน**รูปที่ 2.7-2.8** พบว่าปริมาณพีเอ็นเอที่คอนจูเกตบนกระดาษมีเพิ่มขึ้นตามความเป็นเบสของสารละลายที่เพิ่มขึ้น ทั้งโดยการเพิ่มความเข้มข้นของ TEA และการเพิ่ม pH ของสารละลายบัฟเฟอร์

2.4 การนำกระดาษที่ตรึงด้วยโคพอลิเมอร์บรัชไปใช้ในการตรวจวัดดีเอ็นเอ

จากผลการทดลองข้างต้นผู้วิจัยได้เลือกสภาวะที่ให้ปริมาณการตรึงพีเอ็นเอที่แตกต่างกันจากน้อยไปมาก 3 สภาวะ ได้แก่ 0.1 M PBS pH 7.4 ที่มีการเติม TEA 0.1 และ 0.3 μM และ 0.1 M $NaCO_3$-$NaHCO_3$ buffer ที่มี pH 10 ไปใช้ในการคอนจูเกต PNA capture probe (PNA (Cap)) บน P(GMA-*co*-PEGMA)-grafted filter เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอตามรูปแบบที่แสดงใน**รูปที่ 2.1** ต่อไป ทั้งนี้แสดงรายละเอียดของพีเอ็นเอทั้งหมดที่ใช้ในงานวิจัยนี้ไว้ใน**ตารางที่ 2.1**

ตารางที่ 2.1 ข้อมูลของพีเอ็นเอที่ใช้ในงานวิจัยนี้

Name	sequence	m/z (target)	m/z (observed)	T_m (°C)
PNA (Cap)	*N*-Ac-GGAACCTGCGCG-LysNH_2-*C*	4259.55	4259.38	77.6
b-PNA (Ser)	*N*-biotin-$(egl)_2$-AACACACAG ACT- SerOH -*C*	4630.02	4630.99	62.2
b-PNA (Lys)	*N*-biotin-$(egl)_2$-AACACACAG ACT- LysNH_2 -*C*	4670.12	4669.21	not measured
PNA (T9) [a]	*N*-flu-(egl)-TTTTTTTTT-LysNH_2-*C*	-	-	-

พีเอ็นเอโพรบที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้รับการออกแบบให้มีลำดับเบสสัมพันธ์กับลำดับเบสของดีเอ็นเอใน human leukocyte antigen (HLA) alleles โดยจำเพาะเจาะจงไปที่ HLA-B*1502 alleles ที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติรุนแรงของผิวหนังผู้ป่วยที่เป็นโรค Stevens-Johnson syndrome เมื่อได้รับยา carbamazepine ซึ่งเป็นยาที่ใช้บำบัดรักษาอาการชัก ทั้งนี้จะทำการตรึง PNA(Cap) บนพื้นผิวของ P(GMA-*co*-PEGMA)-grafted filter paper เพื่อจะได้จับกับดีเอ็นเอเป้าหมาย จากนั้นจึงใช้ b-PNA (Ser) ซึ่งเป็นพีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วยไบโอตินเป็น reporter probe ที่จะทำให้เกิดการขยายสัญญาณด้วยเอนไซม์ Horseradish peroxidase ที่คอนจูเกตกับสเตรปทาวิดิน (SA-HRP) ลำดับเบสของทั้งพีเอ็นเอและดีเอ็นเอที่ใช้ในงานวิจัยนี้แสดงไว้ใน**ตารางที่ 2.2**

ตารางที่ 2.2 ลำดับเบสของพีเอ็นเอและดีเอ็นเอที่ใช้ในงานวิจัยนี้

Code	Sequence	Description
PNA (Cap)	Ac-GGAACCTGCGCG-LysNH_2	Capture probe
b-PNA (Lys)	b-o-o-AACACACAGACT-LysNH_2	Positive control
b-PNA (Ser)	b-o-o-AACACACAGACT-SerOH	Reporter probe
b-DNA	d(5'-CGCGCAGGTTCC-b-3')	Positive control
DNA 1	d(5'-**CGCGCAGGTTCC**GCTAA GTCTGTGTGTT-3')	Complementary to PNA(Cap)
DNA 2	d(5'-CGCGC**T**GGTTCCGCTAAGT CTGTGTGTT-3')	Single mismatch to PNA(Cap)
DNA 3	d(5'-TATATCAAGGTTGCTACAG TGAGAGAGG-3')	Non-complementary PNA(Cap)

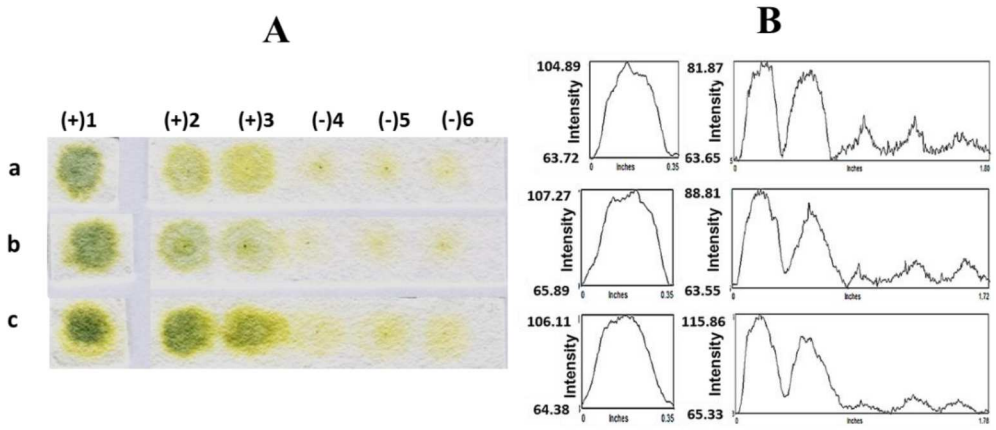
ส่วนรายละเอียดของพีเอ็นเอและดีเอ็นเอที่ใช้ทดสอบในแต่ละตำแหน่งแสดงไว้ใน**ตารางที่ 2.3** มีการใช้ b-PNA(Lys) ที่มีลำดับเบสเช่นเดียวกับ b-PNA(Ser) ที่เป็น reporter probe หยดบนตำแหน่งที่ 1 เป็นตัวควบคุมผลทดสอบบวก (positive control) เพื่อแสดงการขยายสัญญาณด้วยเอนไซม์ที่ให้ความเข้มมากที่สุด ส่วน b-DNA ใช้หยดบนตำแหน่งที่ 2 เพื่อแสดงให้เห็นว่าการขยายสัญญาณด้วยเอนไซม์ผ่านการเกิดไฮบริไดเซชันนั้นจะเกิดขึ้นได้ก็ต่อเมื่อดีเอ็นเอมีลำดับเบสคู่สมกับพีเอ็นเอเท่านั้น ทั้งนี้ผลการทดสอบจะแสดงใน 2 รูปแบบคือ (1) scanned images (column A) และ (2) profile images (column B).

ตารางที่ 2.3 รายละเอียดของพีเอ็นเอและดีเอ็นเอที่ใช้ทดสอบในแต่ละตำแหน่งสำหรับผลที่แสดงในรูปที่ 15-16

Spot position	DNA	PNA	Remark[a]
1	-	b-PNA(Lys)	(+)
2	b-DNA HLA-B*1502	-	(+)
3	DNA 1 HLA-B*1502	b-PNA (Ser)	(+)
4	DNA 3	b-PNA (Ser)	(-)
5		b-PNA (Ser)	(-)
6	-	-	(-)

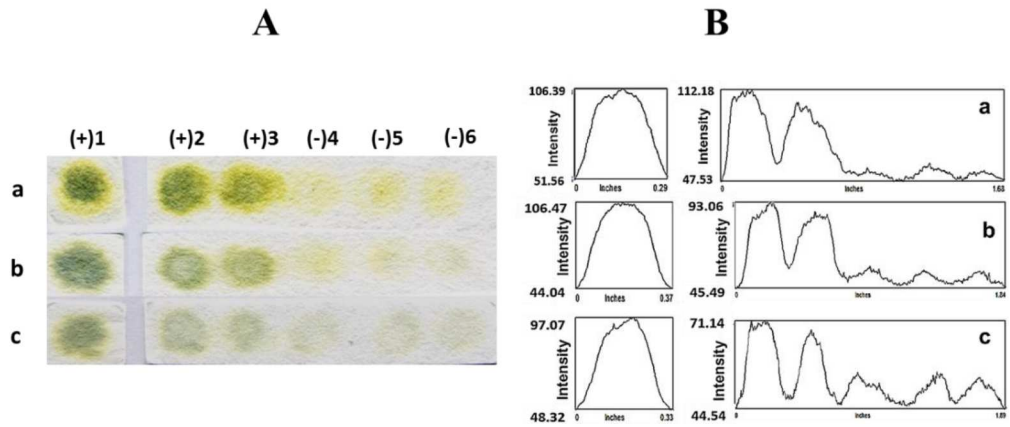
[a](+) = positive result, (-) = negative result

ประสิทธิภาพในการตรวจวัดพิจารณาได้จากการปรากฏสัญญาณเข้มที่ตำแหน่ง 3 ซึ่งมีการหยด DNA1 [(+3)] ซึ่งมีลำดับเบสคู่สมกับ b-PNA (Ser) แต่ไม่ปรากฏสัญญาณที่ตำแหน่ง 4 ที่มีการหยด DNA3 [(-4)] ซึ่งมีลำดับเบสผิดไปทุกตำแหน่ง และความสามารถในการป้องกันการดูดซับอย่างไม่จำเพาะเจาะจงในตำแหน่งที่ 5 และ 6 ของ b-PNA(Ser) [(-5)] และ SA–HRP [(-6)], ตามลำดับ การทดสอบแรกเป็นการศึกษาผลของ ionic strength ที่มีต่อการจับกับดีเอ็นเอ ทั้งนี้เลือกใช้ P(GMA-*co*-PEGMA)-grafted filter paper ที่คอนจูเกตกับ PNA(Cap) ใน 0.1 M PBS pH 7.4 ที่มีการเติม TEA 0.1 μM จาก**รูปที่ 2.9** จะเห็นได้ว่าสัญญาณที่ตำแหน่ง 1 และ 2 ซึ่งมีการหยด b-PNA(Lys) เป็นตัวควบคุมสำหรับ reporter probe มีความเข้มมากแสดงให้เห็นว่าการขยายสัญญาณที่เกิดจาก biotin-SA-HRP conjugation มีประสิทธิภาพดี สัญญาณเข้มที่จุด 3 แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะเจาะจงของการทดสอบ เมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของ NaCl จาก 10 เป็น 50 และ 100 mM ไม่เพียงแต่จะช่วยเพิ่มความเข้มของสัญญาณในตำแหน่งที่เป็นผลทดสอบบวกแล้ว ยังช่วยลดความเข้มที่เกิดจากการดูดซับอย่างไม่จำเพาะเจาะจงที่เกิดจาก non-complementary DNA sequence [(-4)], reporter probe [(-5)], and SA-HRP [(-6)] อีกด้วย ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกสารละลายที่ใช้ในขั้นการจับยึดกับดีเอ็นเอ เป็น 0.5 mM phosphate buffer pH 7.0 และมีการเติม 100 mM NaCl ไปใช้ในการทดสอบในลำดับต่อไป



รูปที่ 2.9 ภาพแสดงผลการทดสอบ (column A: scanned image and column B: profile image) ในการตรวจวัดดีเอ็นเอบน P(GMA-*co*-PEGMA)-grafted filter paper ที่ผ่านการคอนจูเกตกับ PNA(Cap) ในสารละลาย 0.1 M PBS pH 7.4 ที่มีการเติม TEA 0.1 μM, และทดสอบการจับกับดีเอ็นเอใน 0.5 mM phosphate buffer pH 7.0 ที่มีการเติม NaCl ความเข้มข้น (a) 10 mM, (b) 50 mM และ (c) 100 mM ร่วมกับการใช้ b-PNA(Ser) เป็น reporter probe ในการแยกความแตกต่างของดีเอ็นเอที่มีเบสคู่สมกันออกจากดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสผิดไปทุกตำแหน่ง โดยใช้เอนไซม์ในการขยายสัญญาณตามรูปแบบ sandwich hybridization

จากผลการทดสอบแสดงใน**รูปที่ 2.10** พบว่าประสิทธิภาพดังกล่าวจะแปรผกผันกับปริมาณพีเอ็นเอที่ตรึงได้ กล่าวคือสภาวะที่ให้ปริมาณการตรึงพีเอ็นเอต่ำที่สุดคือใช้ 0.1 M PBS pH 7.4 ที่มีการเติม 0.1 μM TEA ให้ผลที่ดีกว่าสภาวะที่ให้ปริมาณการตรึงพีเอ็นเอสูงกว่าคือ 0.1 M PBS pH 7.4 ที่มีการเติม 0.3 μM TEA และ สารละลายบัฟเฟอร์ของ 0.1 M $NaCO_3$-$NaHCO_3$ buffer ที่มี pH 10 ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ 0.1 M PBS pH 7.4 ที่มีการเติม 0.1 μM TEA เป็นสารละลายในการตรึง PNA(Cap) สำหรับการทดสอบในลำดับต่อไป



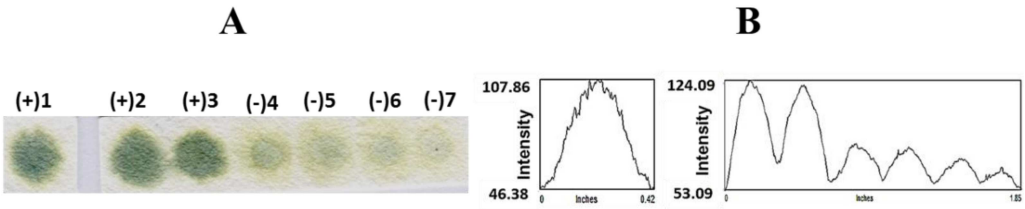
รูปที่ 2.10 ภาพแสดงผลการทดสอบ (column A: scanned image and column B: profile image) ในการตรวจวัดดีเอ็นเอบน P(GMA-*co*-PEGMA)-grafted filter paper ที่ผ่านการคอนจูเกตกับ PNA(Cap) โดยใช้สภาวะต่างๆ: 0.1 M PBS pH 7.4 ที่มีการเติม TEA: (a) 0.1 and (b) 0.3 μM, และ (c) ในสารละลายบัฟเฟอร์ของ 0.1 M $NaCO_3$-$NaHCO_3$ buffer ที่มี pH 10 ร่วมกับการใช้ b-PNA(Ser) เป็น reporter probe ในการแยกความแตกต่างของดีเอ็นเอที่มีเบสคู่สมกันออกจากดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสผิดไปทุกตำแหน่ง โดยใช้เอนไซม์ในการขยายสัญญาณตามรูปแบบ sandwich hybridization

นอกจากนี้ผู้วิจัยเลือกใช้ DNA2 ในการทดสอบเพื่อแสดงความสามารถในการบอกความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสที่ผิดไป 1 ตำแหน่งกับดีเอ็นเอที่เป็นเบสคู่สม (DNA1) รายละเอียดของพีเอ็นเอและดีเอ็นเอที่ใช้ทดสอบในแต่ละตำแหน่งแสดงไว้ใน**ตารางที่ 2.4** จากผลการทดสอบที่แสดงใน**รูปที่ 2.11** พบว่าสัญญาณที่ปรากฏในจุดที่ 3 ซึ่งเป็นของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สม DNA1 [(+3)] กับ PNA(Cap) มีความเข้มเท่ากับสัญญาณของจุดที่ 1 และ 2 ซึ่งเป็นของตัวควบคุมผลทดสอบบวกของ PNA(Lys) [(+1)] และ b-DNA [(+2)] ตามลำดับ ในขณะที่สัญญาณ background ที่ปรากฏในจุดที่ 4 ซึ่งเป็นของ DNA2 [(-4)] ที่มีลำดับเบสผิดไป 1 ตำแหน่ง มีความเข้มอยู่ในระดับเดียวกับสัญญาณที่ปรากฏในจุดที่ 5 ซึ่งเป็นของ DNA3 [(-5)] ที่มีลำดับเบสผิดไปทุกตำแหน่ง ผลการทดลองในส่วนนี้แสดงให้เห็นประสิทธิภาพของแพลทฟอร์มที่พัฒนาขึ้นในการตรวจวัดลำดับเบสของดีเอ็นเอ นอกจากนี้ผลใน**รูปที่ 2.12** ยังแสดงให้เห็นว่าปริมาณต่ำสุดของดีเอ็นเอที่ยังสามารถตรวจวัดได้อยู่ที่ 100 fmol

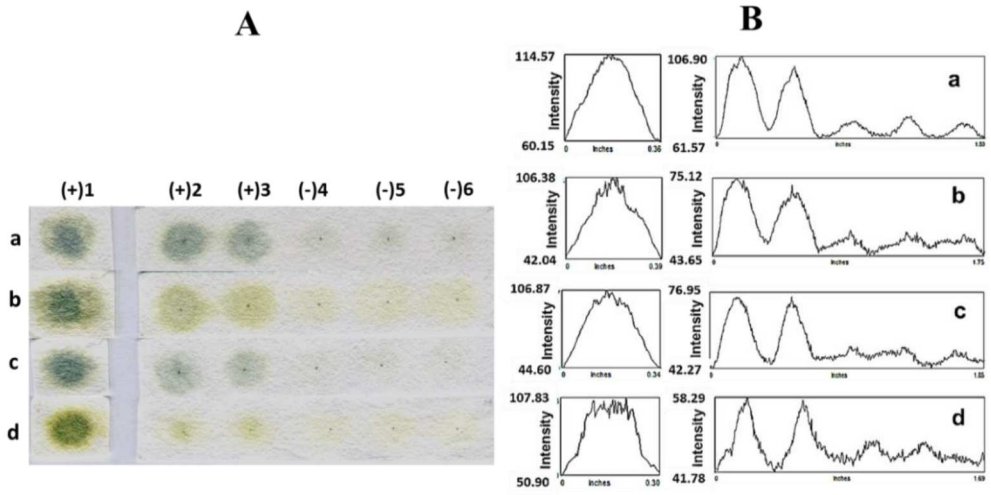
ตารางที่ 2.4 รายละเอียดของพีเอ็นเอและดีเอ็นเอที่ใช้ทดสอบในแต่ละตำแหน่งสำหรับผลการทดสอบที่แสดงในรูปที่ 2.11

Sequence	Spot position						
	1	2	3	4	5	6	7
DNA	-	b-DNA	DNA 1	DNA 2	DNA 3	-	-
PNA	b-PNA (Lys)	-	b-PNA (Ser)	b-PNA (Ser)	b-PNA (Ser)	b-PNA (Ser)	-
[a]Remark	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)

[a](+) = positive result, (-) = negative result



รูปที่ 2.11 ภาพแสดงผลการทดสอบ (column A: scanned image and column B: profile image) ในการตรวจวัดดีเอ็นเอบน P(GMA-*co*-PEGMA)-grafted filter paper ที่ผ่านการคอนจูเกตกับ PNA(Cap) ร่วมกับการใช้ b-PNA(Ser) เป็น reporter probe ในการแยกความแตกต่างของดีเอ็นเอที่มีเบสคู่สมกันออกจากดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสผิดไป 1 ตำแหน่ง และทุกตำแหน่ง โดยใช้เอนไซม์ในการขยายสัญญาณตามรูปแบบ sandwich hybridization

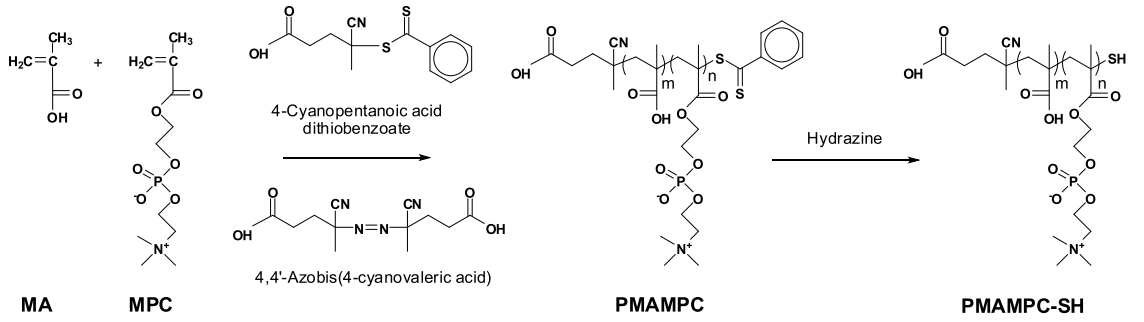


รูปที่ 2.12 ภาพแสดงผลการทดสอบ (column A: scanned image and column B: profile image) ในการตรวจวัดดีเอ็นเอบน P(GMA-*co*-PEGMA)-grafted filter paper ที่ผ่านการคอนจูเกตกับ PNA(Cap) ร่วมกับการใช้ b-PNA(Ser) เป็น reporter probe ในการแยกความแตกต่างของดีเอ็นเอที่มีเบสคู่สมกันออกจากดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสผิดไป 1 ตำแหน่ง ที่ความเข้มข้นต่างๆ (a) 2 pmol (2 μL of 1 μM), (b) 1 pmol (1 μL of 1 μM), (c) 100 fmol (1 μL of 100 nM), and (d) 50 fmol (0.5 μL of 100 nM) โดยใช้เอนไซม์ในการขยายสัญญาณตามรูปแบบ sandwich hybridization

<u>ตอนที่ 3 การพัฒนาแท่งนาโนทองเป็นพาหะในการนำส่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ</u>

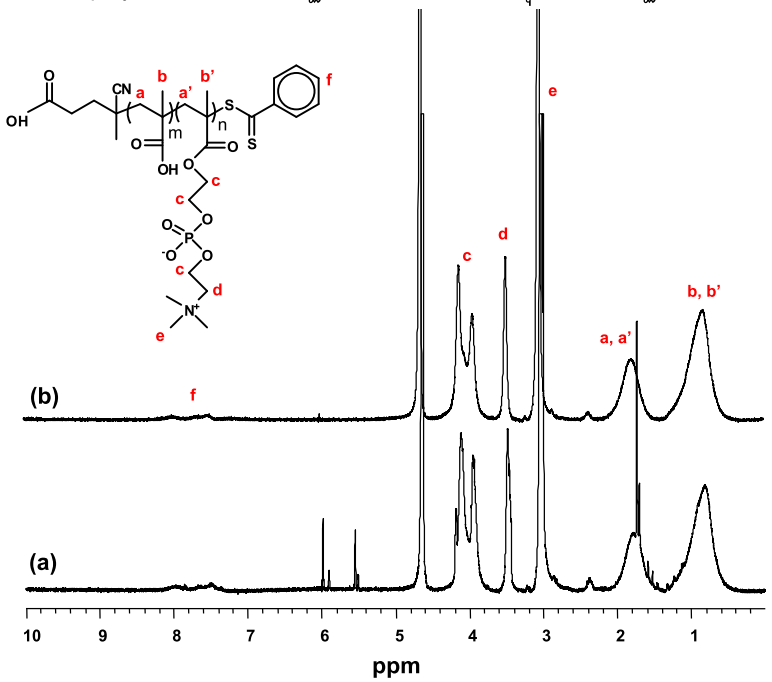
3.1 การเตรียมและพิสูจน์เอกลักษณ์ของแท่งนาโนทองที่ทำให้เสถียรด้วย PMAMPC

ขั้นแรกเป็นการสังเคราะห์ PMAMPC ที่มี degree of polymerization (DP) = 30 และอัตราส่วนระหว่าง MA และ MPC = 70:30 ด้วยปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันแบบ reversible addition fragmentation chain transfer (RAFT) ตามด้วยการเปลี่ยนหมู่ dithiobenzoate ที่ปลายโซ่พอลิเมอร์ให้เป็นหมู่ thiol โดยการทำปฏิกิริยา aminolysis ด้วย hydrazine ดังแสดงใน**รูปที่ 3.1**



รูปที่ 3.1 การสังเคราะห์ PMAMPC–SH ผ่านปฏิกิริยา RAFT polymerization

จากการตรวจสอบโครงสร้างทางเคมีของ PMAMPC ที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค ^{1}H-NMR (**รูปที่ 3.2**) พบว่า PMAMPC จะแสดงสัญญาณโปรตอนของ CH_2 ในโครงสร้างหลัก (H_a และ $H_{a'}$) ที่ตำแหน่ง 1.4-2.0 ppm สัญญาณโปรตอนของ CH_3 (H_b และ $H_{b'}$) ที่ตำแหน่ง 0.6-1.2 ppm สัญญาณโปรตอนของ $N^{+}(CH_3)_3$ (H_e) ที่ตำแหน่ง 2.8-3.2 ppm สัญญาณโปรตอน c และ d (H_c และ H_d) ที่ตำแหน่ง 3.8-4.2 ppm และ 3.4-3.6 ppm ตามลำดับ และโปรตอนของหมู่ dithiobenzoate (H_f) ที่ตำแหน่ง 7.4-8.2 ppm โดยสามารถนำค่าพื้นที่ใต้พีกในสเปกตรัมของ PMAMPC ก่อนทำให้บริสุทธิ์มาคำนวณหา % conversion ได้ โดยการเปรียบเทียบอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีกของ Ha และ Ha' (1.4-2.0 ppm) ใน PMAMPC backbone กับผลรวมพื้นที่ใต้พีกของ H_a และ $H_{a'}$ ใน PMAMPC backbone และในโครงสร้างมอนอเมอร์ (H_a และ $H_{a'}$ ในโครงสร้างมอนอเมอร์จะปรากฏที่ตำแหน่ง 5.5 และ 6.0 ppm) นอกจากนี้ สามารถคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลและสัดส่วนระหว่าง MA:MPC ในโคพอลิเมอร์ได้ตามสมการที่ 4 และ 5-6 ตามลำดับ โดยคำนวณจากพื้นที่ใต้พีกในสเปกตรัมของ PMAMPC หลังทำให้บริสุทธิ์ **ตารางที่ 3.1** แสดง % conversion น้ำหนักโมเลกุล และสัดส่วนระหว่าง MA:MPC ของ PMAMPC ที่สังเคราะห์ได้เทียบกับค่าเป้าหมาย ซึ่งพบว่าค่าที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับค่าเป้าหมาย แสดงให้เห็นว่าปฏิกิริยา RAFT polymerization เป็นปฏิกิริยาที่สามารถควบคุมการเกิดปฏิกิริยาได้ดี



รูปที่ 3.2 ^{1}H-NMR spectra ของ (a) PMAMPC ก่อนทำให้บริสุทธิ์ และ (b) PMAMPC หลังทำให้บริสุทธิ์ เมื่อใช้ D_2O เป็นตัวทำละลาย

$$\text{จำนวนหน่วยซ้ำทั้งหมด} = \left\{ \frac{\text{intergral of the Hb และ Hb'/6}}{\text{intergral of the Hf/5}} \right\} \times 2 \qquad \text{สมการที่ 3.1}$$

$$\text{จำนวนหน่วยซ้ำของ MPC} = \left\{ \frac{\text{intergral of the Hd/2}}{\text{intergral of the Hf/5}} \right\} \times \qquad \text{สมการที่ 3.2}$$

$$\text{จำนวนหน่วยซ้ำของ MA} = \text{จำนวนหน่วยซ้ำทั้งหมด} - \text{จำนวนหน่วยซ้ำของ MPC} \qquad \text{สมการที่ 3.3}$$

$$\text{Mn} = [\text{จำนวนหน่วยซ้ำของ MA} \times \text{MW ของ MA (86.06 g/mol)} + \text{จำนวนหน่วยซ้ำของ MPC} \times \text{MW ของ MPC (295.68 g/mol)}] \qquad \text{สมการที่ 3.4}$$

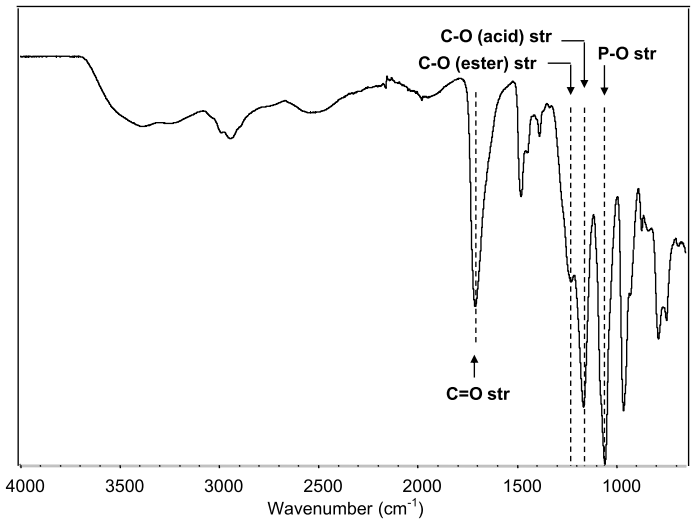
$$\text{สัดส่วนของ MA ในโคพอลิเมอร์ (\%)} = \left\{ \frac{\text{จำนวนหน่วยซ้ำของ MA}}{\text{จำนวนหน่วยซ้ำทั้งหมด}} \right\} \times 100 \qquad \text{สมการที่ 3.5}$$

$$\text{สัดส่วนของ MPC ในโคพอลิเมอร์ (\%)} = \left\{ \frac{\text{จำนวนหน่วยซ้ำของ MPC}}{\text{จำนวนหน่วยซ้ำทั้งหมด}} \right\} \times 100 \qquad \text{สมการที่ 3.6}$$

ตารางที่ 3.1 % conversion น้ำหนักโมเลกุล และสัดส่วนระหว่าง MA:MPC ของ PMAMPC ที่สังเคราะห์ได้เทียบกับค่าเป้าหมาย

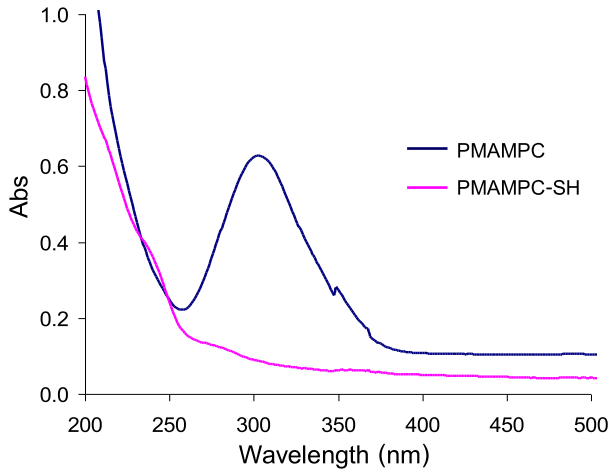
	ค่าเป้าหมาย	ค่าที่ได้จาก ^{1}H-NMR
% conversion (%)	-	61.1
น้ำหนักโมเลกุล (g/mol)	4468.38	5498.03
สัดส่วน MA:MPC ในโคพอลิเมอร์ (%)	70:30	64:36

จากการตรวจสอบโครงสร้างทางเคมีของ PMAMPC ด้วยเทคนิค FT-IR (**รูปที่ 3.3**) จะพบพีกที่แสดงลักษณะเฉพาะดังนี้ ในส่วนของ MPC จะพบพีก C=O ของเอสเทอร์ที่ตำแหน่ง 1706 cm^{-1}, C-O ที่ตำแหน่ง 1222 cm^{-1}, P-O ที่ตำแหน่ง 1056 cm^{-1} และ $-N^{+}(CH_3)_3$ ที่ตำแหน่ง 962 cm^{-1} สำหรับส่วนของ MA จะพบพีก C=O ของ carboxylic acid ที่ตำแหน่ง 1706 cm^{-1} และ C-O ที่ตำแหน่ง 1162 cm^{-1} แสดงให้เห็นว่าสามารถสังเคราะห์ PMAMPC ได้



รูปที่ 3.3 FTIR spectrum ของ PMAMPC

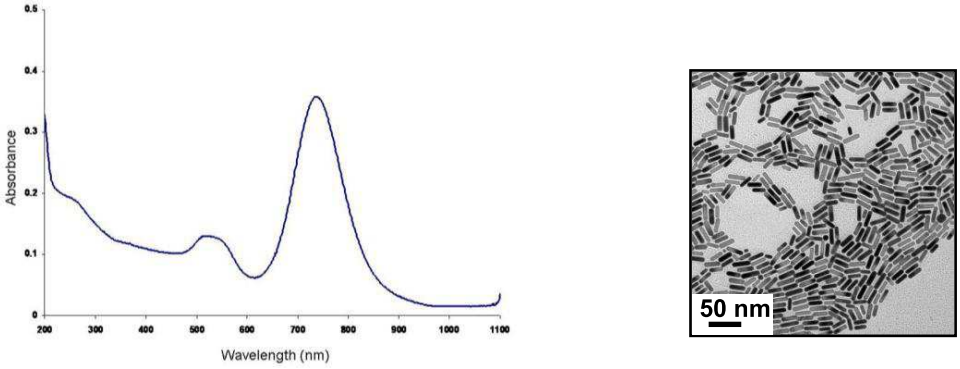
หมู่ dithioester ที่ปลายโซ่พอลิเมอร์สามารถเปลี่ยนให้เป็นหมู่ thiol ได้โดยการทำปฏิกิริยา aminolysis กับ hydrazine และสามารถยืนยันการเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวได้จากการหายไปของพีกการดูดกลืนแสงของหมู่ dithioester เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค UV-Vis spectroscopy ดังแสดงใน**รูปที่ 3.4** พบว่า PMAMPC ก่อนการทำปฏิกิริยา aminolysis จะแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นประมาณ 300 nm ซึ่งเป็นค่าการดูดกลืนแสงของหมู่ dithioester ที่ปลายสายโซ่พอลิเมอร์ และพีกดังกล่าวจะหายไปหลังจากทำปฏิกิริยากำจัดหมู่ dithioester แสดงถึงการเกิดปฏิกิริยา aminolysis อย่างสมบูรณ์



รูปที่ 3.4 UV-Vis spectra ของ PMAMPC ก่อนและหลังการทำปฏิกิริยา aminolysis

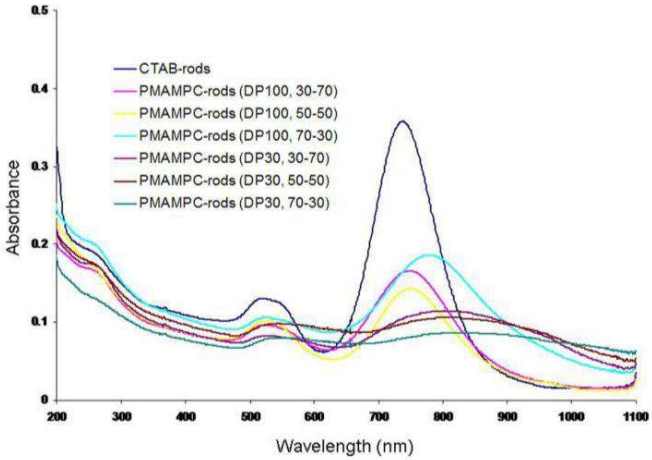
สำหรับ AuNRs ที่ทำให้เสถียรด้วย cetyltrimethylammonium bromide (CTAB-AuNRs) ซึ่ง CTAB ทำหน้าที่เป็น template ควบคุมให้อนุภาคมีรูปร่างเป็นแท่งด้วยนั้น สามารถสังเคราะห์ได้ด้วยวิธี seed-mediated growth โดยจากผลการทดลองที่ได้พบว่าเมื่อวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาค CTAB-AuNRs ด้วยเทคนิค UV-vis. spectroscopy (**รูปที่ 3.5a**) จะพบพีกการดูดกลืนแสง 2 ช่วงได้แก่ ที่ช่วงประมาณ 500 nm ซึ่งจะเป็นการดูดกลืนแสงในทิศทางด้านขวางของอนุภาค และที่ช่วงความยาวคลื่นในช่วงของ NIR คือประมาณ 800 nm ซึ่งจะเป็นการดูดกลืน

แสงในทิศทางด้านยาวของอนุภาค และเมื่อพิจารณารูปร่างของอนุภาคด้วยเทคนิค TEM (**รูปที่ 3.5b**) พบว่าอนุภาคมีรูปร่างเป็นแท่งเกือบทั้งหมด และมีขนาดใกล้เคียงกัน โดยมีขนาดในแนวยาวและแนวขวางเท่ากับ 24.6± 3.15 nm และ 8.53±1.42 nm ตามลำดับ



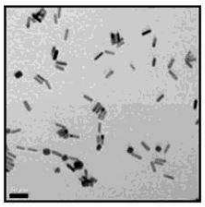
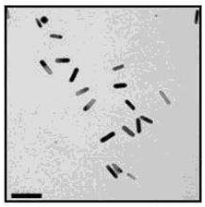
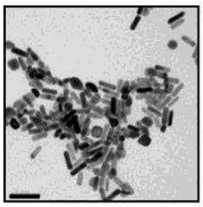
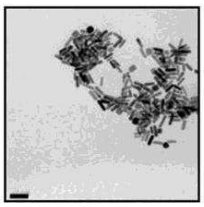
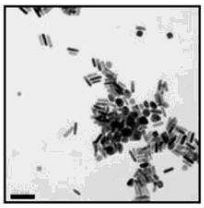
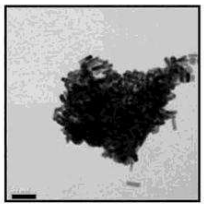
รูปที่ 3.5 (a) UV-Vis spectrum และ (b) ภาพถ่าย TEM ของ CTAB-AuNRs

จากนั้นสามารถเตรียม PMAMPC-AuNRs ได้โดยการนำ PMAMPC-SH มาแทนที่ CTAB บนพื้นผิวของ CTAB-AuNRs ที่สังเคราะห์ได้ข้างต้น (ligand exchange) ด้วยวิธี grafting-to ผ่านการเกิดพันธะ Au-S ระหว่างพื้นผิวทองและโคพอลิเมอร์ โดยจากผลการทดลองพบว่าทั้งน้ำหนักโมเลกุลและสัดส่วนโคมอนอเมอร์ในโคพอลิเมอร์มีผลต่อความเสถียรของอนุภาคที่สังเคราะห์ได้ หากพิจารณาจาก UV-visible spectra (**รูปที่ 3.6**) และข้อมูลจากการวิเคราะห์ TEM (**ตารางที่ 3.2**) จะเห็นว่าการใช้พอลิเมอร์ที่มี DP เท่ากับ 100 จะได้อนุภาคที่ยังคงมีเสถียรภาพดี ซึ่งจะสังเกตได้จากการที่อนุภาคมีความยาวคลื่นในการดูดกลืนแสงใกล้เคียงกับ CTAB-AuNRs เริ่มต้นและมีการกระจายตัวที่ดี ยกเว้นในกรณีที่โคพอลิเมอร์มีสัดส่วน MPC น้อยคือ MA:MPC เท่ากับ 70:30 อนุภาคบางส่วนจะเกิดการรวมกลุ่มกัน (aggregation) ซึ่งพิจารณาได้จากพีกการดูดกลืนแสงที่กว้างมากขึ้นและเกิดการเปลี่ยนแปลงไปปรากฏที่ความยาวคลื่นที่สูงขึ้น สำหรับการใช้โคพอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำลง (DP=30) พบว่าอนุภาคจะเกิดการรวมกลุ่มของอนุภาคในทุกสัดส่วนของโคมอนอเมอร์

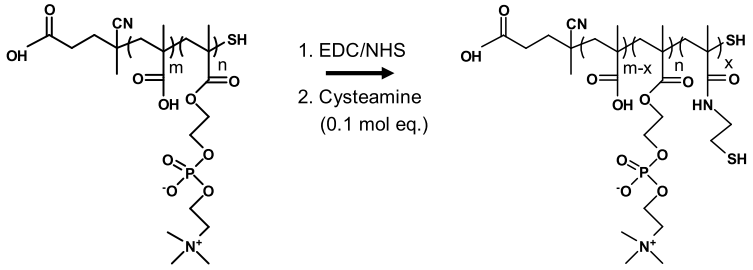


รูปที่ 3.6 UV-Vis spectra ของ PMAMPC-AuNRs ที่เตรียมจาก PMAMPC ที่มีน้ำหนักโมเลกุลและสัดส่วนโคมอนอเมอร์ต่างๆ

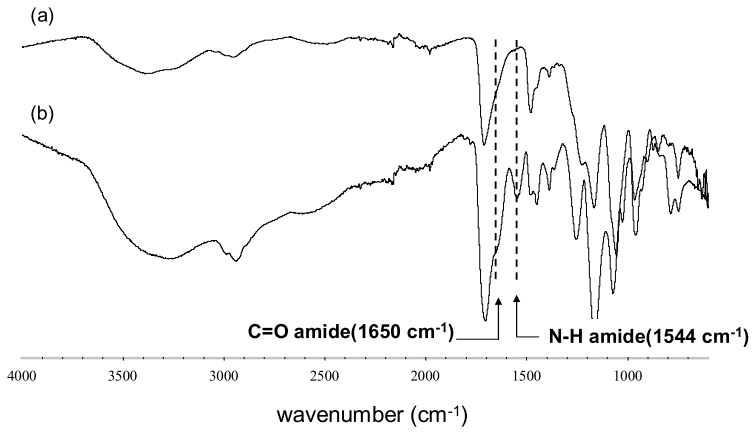
ตารางที่ 3.2 ภาพถ่าย TEM ของ PMAMPC-AuNRs ที่เตรียมจาก PMAMPC ที่มีน้ำหนักโมเลกุลและสัดส่วนโคมอนอเมอร์ต่างๆ (scale bar = 50 nm)

สัดส่วน (MA:MPC)	30:70	50:50	70:30
DP= 100			
DP = 30			

จากการทำการทดลองพบว่า การเพิ่มหมู่ไทออลลงในโครงสร้างของโคพอลิเมอร์ก่อนจะทำการตรึงบนอนุภาคจะทำให้ได้อนุภาคที่มีความเสถียรสูงขึ้น เนื่องจากเป็นหมู่ฟังก์ชันที่ใช้ในการติดพอลิเมอร์ลงไปบนพื้นผิวของ AuNRs จึงทำให้เกิดการติดสายโซ่พอลิเมอร์บน AuNRs ได้ดีขึ้น ทั้งนี้สามารถเพิ่มหมู่ไทออลได้โดยการทำปฏิกิริยาระหว่างหมู่คาร์บอกซิลบางส่วนในโครงสร้างของโคพอลิเมอร์กับ cysteamine (0.10 mol eq. to COOH in MA units) โดยใช้ EDC/NHS เป็นรีเอเจนต์คู่ควบ (**รูปที่ 3.7**) ทั้งนี้สามารถยืนยันการเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวได้จากเทคนิค FTIR (**รูปที่ 3.8**) โดยจะพบสัญญาณของ C=O stretching และ N-H bending ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของพันธะเอไมด์ที่ตำแหน่ง 1650 และ 1544 cm^{-1} ตามลำดับ

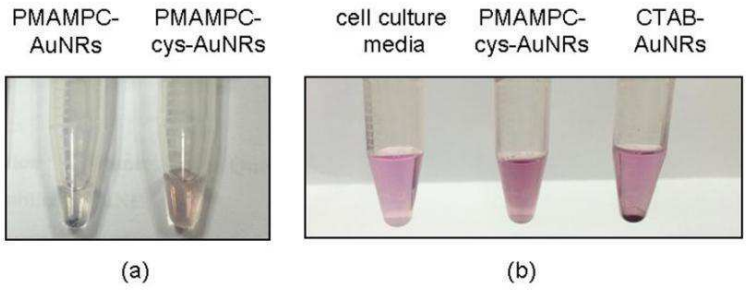


รูปที่ 3.7 สมการแสดงการทำปฏิกิริยาระหว่าง PMAMPC กับ cysteamine



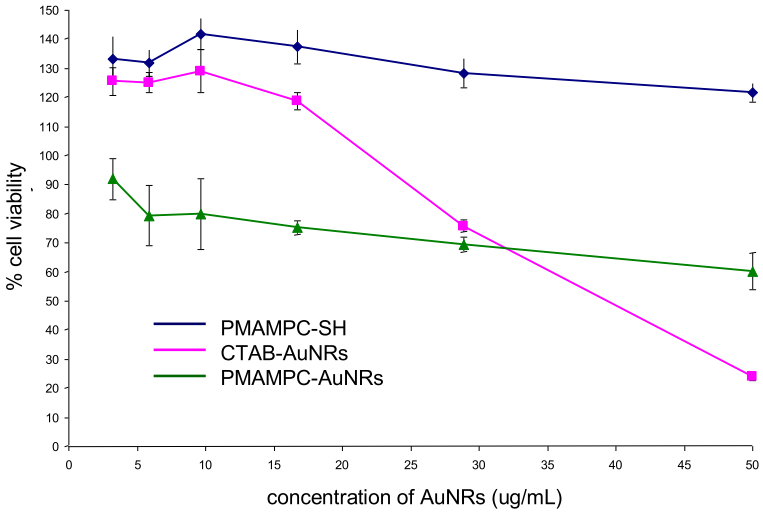
รูปที่ 3.8 FTIR spectra ของ PMAMPC-SH (a) ก่อน และ (b) หลังการทำปฏิกิริยากับ cysteamine

จากการพิจารณาเสถียรภาพของ AuNRs ที่ติดด้วย PMAMPC-SH ที่มีการเพิ่มหมู่ไทออลไปในโครงสร้าง (PMAMPC-cys-AuNRs) ดังแสดงในภาพถ่ายใน**รูปที่ 3.9** พบว่าจะได้อนุภาคที่มีความเสถียรสูง ไม่เกิดการรวมกลุ่มกัน เมื่อนำไปกระจายตัวทั้งใน 10 mM PBS (pH 7.4) และอาหารเลี้ยงเซลล์ (cell culture media) ที่มีองค์ประกอบที่ซับซ้อนก็ตาม



รูปที่ 3.9 ภาพถ่ายของ AuNRs เมื่อกระจายตัวอยู่ใน (a) 10 mM PBS (pH 7.4) (b) cell culture media

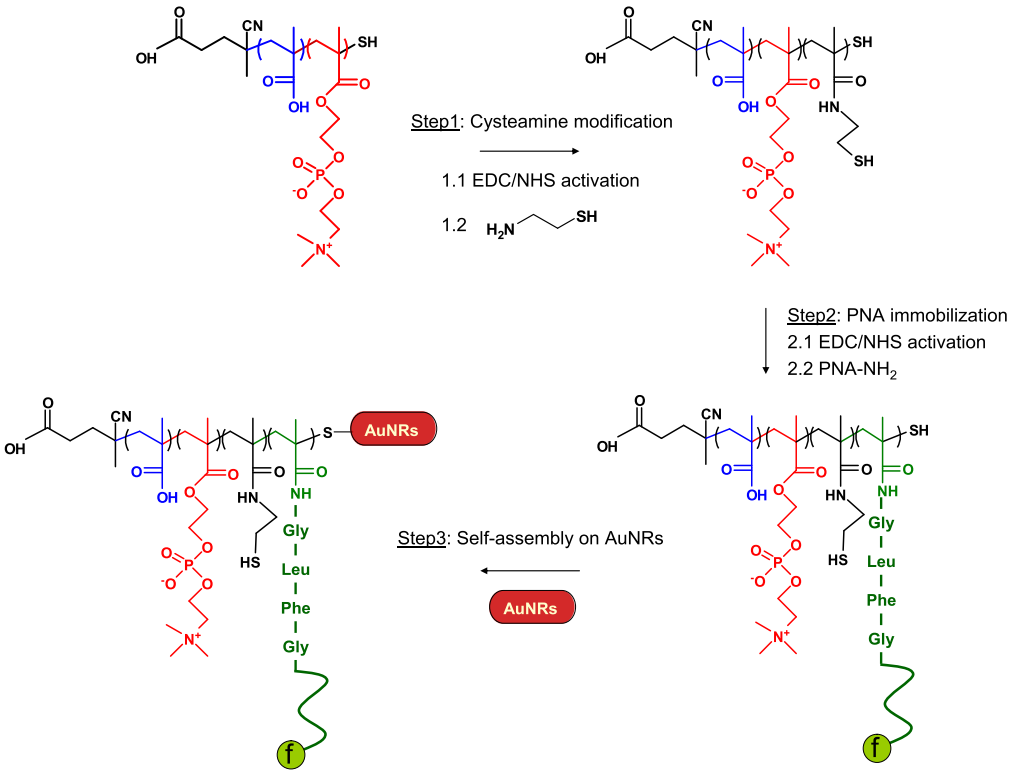
นอกจากนี้ยังได้ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ของ PMAMPC-AuNRs ที่เตรียมได้ ด้วยเทคนิค MTT assay (**รูปที่ 3.10**) พบว่า CTAB-AuNRs เริ่มต้นมีความเป็นพิษ เนื่องจากเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอนุภาคจะทำให้การรอดชีวิตของเซลล์ (%cell viability) ลดลง ในขณะที่เมื่อทำการติดอนุภาคด้วย PMAMPC-SH ที่มีการเพิ่มหมู่ไทออลไปในโครงสร้างจะสามารถลดความเป็นพิษให้กับ AuNRs ได้ โดยจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตยังอยู่ในช่วง 70-90% ทำให้อนุภาคมีความเหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้เป็นพาหะสำหรับนำส่ง PNA เข้าสู่เซลล์ได้



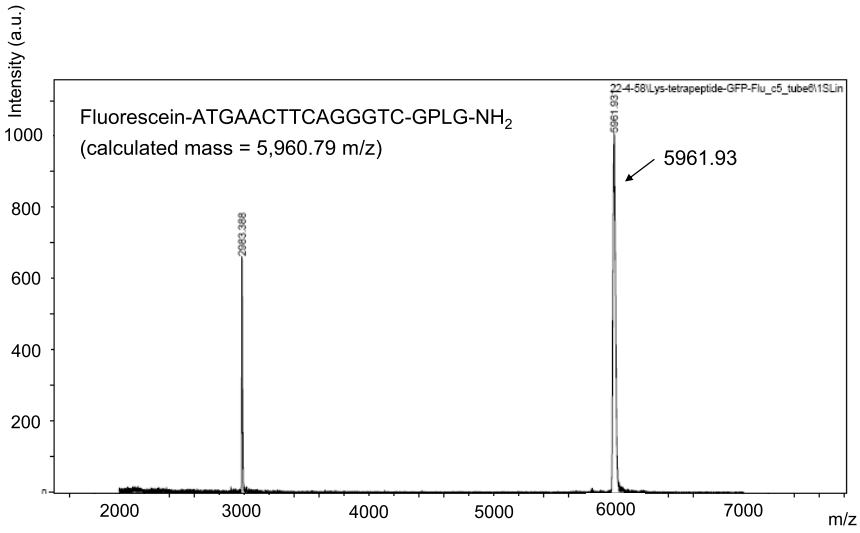
รูปที่ 3.10 กราฟแสดงจำนวนเซลล์ HepG2 ที่รอดชีวิต (cell viability) เมื่อทดสอบกับ AuNRs ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2 การเตรียมและพิสูจน์เอกลักษณ์ของแท่งนาโนทองที่ทำให้เสถียรด้วย PMAMPC และตรึงด้วย PNA (PNA-PMAMPC-AuNRs)

ในขั้นตอนการเตรียม PNA-PMAMPC-AuNRs ประกอบไปด้วย 2 ขั้นตอนย่อย ในขั้นแรกจะทำการปรับปรุงโครงสร้างของ PMAMPC ด้วย cysteamine เพื่อเพิ่มหมู่ไทออลและตรึงด้วย PNA ตามลำดับ โดยในการปรับปรุงโครงสร้างพอลิเมอร์ทั้ง 2 ขั้นตอนจะตรึงผ่านพันธะเอไมด์ (amidation) ระหว่างหมู่คาร์บอกซิลในโครงสร้างของ PMAMPC และหมู่แอมิโนในโครงสร้างของ cysteamine และ PNA โดยใช้ EDC/NHS เป็นรีเอเจนต์คู่ควบ (coupling agent) จากนั้นในขั้นตอนที่ 2 จะนำ PMAMPC ที่ผ่านการติด cysteamine และ PNA (PNA-Cys-PMAMPC) แล้วมาตรึงลงบนพื้นผิวของ AuNRs ผ่านวิธี grafting-onto ดังแสดงใน**รูปที่ 3.11** โดยสภาวะที่ใช้ในการตรึง PNA-Cys-PMAMPC จะใช้สภาวะเช่นเดียวกับการตรึง PMAMPC ลงบน AuNRs ที่ได้มีการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมแล้วในก่อนหน้านี้ โดยในงานวิจัยนี้สนใจที่จะใช้ PNA ที่มีลำดับเบสที่จำเพาะเจาะจงกับ mRNA ที่ทำหน้าที่สร้าง Green Fluorescein Protein (GFP) ในเซลล์ HepG2 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งตับเพื่อให้ง่ายต่อการติดตามการทำหน้าที่เป็น antisense oligonucleotide ของ PNA โดยสามารถติดตามได้จากการลดลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของ GFP เนื่องจากสาย PNA ที่ถูกปลดปล่อยออกจากอนุภาคจะไปจับกับ mRNA ที่ทำหน้าที่สร้าง GFP ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการสร้าง GFP นอกจากนี้ในโครงสร้างของ PNA จะมีการปรับปรุงปลายสายด้านหนึ่งให้มี tetrapeptide (-Gly-Phe-Leu-Gly-) เพื่อควบคุมการปลดปล่อยสาย PNA จากอนุภาค AuNRs ด้วยเอนไซม์ cathepsin B ซึ่งจะพบมากในเซลล์มะเร็ง และปลายสายอีกด้านหนึ่งจะทำการติดฉลากด้วยสารเรืองแสง fluorescein เพื่อที่จะสามารถติดตามการเกิดปฏิกิริยาได้ สามารถยืนยันความสำเร็จในการสังเคราะห์ PNA ที่มีโครงสร้างดังกล่าวได้ด้วยเทคนิค Mass spectrometry ดังแสดงใน**รูปที่ 3.12** โดยจะพบว่า PNA ที่สังเคราะห์ได้มีค่า m/z = 5,961.93 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับมวลโมเลกุลที่ได้จากการคำนวณซึ่งมีค่าเท่ากับ m/z = 5960.79



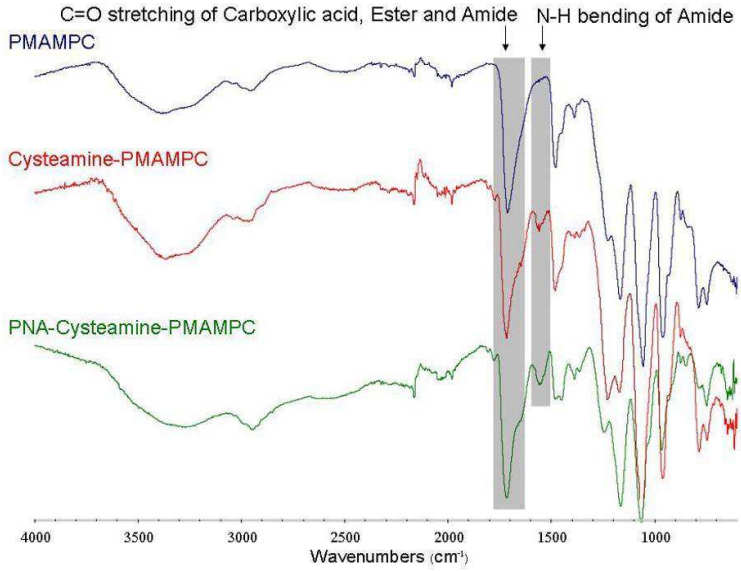
รูปที่ 3.11 แผนภาพแสดงขั้นตอนการเตรียม PNA-PMAMPC-AuNRs



รูปที่ 3.12 Mass spectrum ของ PNA ที่สังเคราะห์ได้

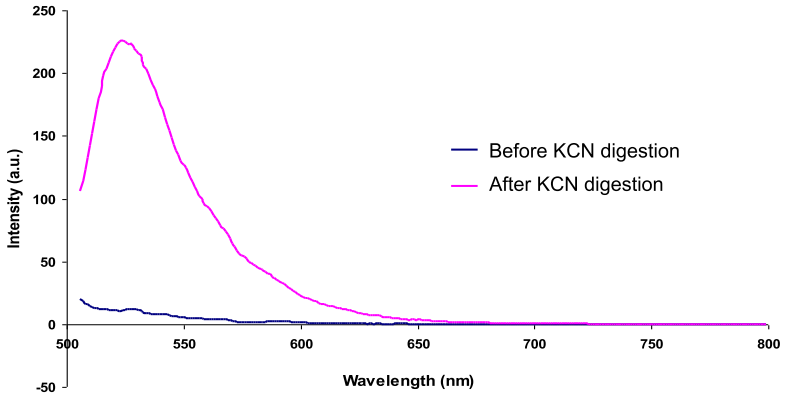
สามารถยืนยันการปรับปรุงโครงสร้าง PMAMPC-SH ด้วย cysteamine และ PNA ตามลำดับได้ด้วยเทคนิค FTIR (**รูปที่ 3.13**) โดยจะพบการเกิดพันธะเอไมด์ซึ่งจะปรากฏสัญญาณของ N-H bending ที่ตำแหน่ง 1544 cm^{-1} ในขั้นตอนแรกของการปรับปรุงโครงสร้างพอลิเมอร์ด้วย cysteamine และพบการเพิ่มขึ้นของสัญญาณดังกล่าวหลังจากทำการปรับปรุงโครงสร้างของพอลิเมอร์ด้วย PNA ในขั้นต่อไป โดยสามารถคำนวณเปอร์เซ็นต์การเข้าทำปฏิกิริยาได้จากการเปรียบเทียบพื้นที่ใต้พีกของ N-H bending ของ amide ที่ตำแหน่ง 1544 cm^{-1} กับพื้นที่ใต้พีกของ C=O

stretching ของ carboxylic acid, ester และ amide ที่ขึ้นรวมกันในช่วง 1600-1800 cm^{-1} และจากผลการทดลองพบว่าหลังการทำปฏิกิริยากับ cysteamine จะให้เปอร์เซ็นต์การเข้าทำปฏิกิริยาเท่ากับ 3.8% ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่าที่ต้องการคือ 5.0% เนื่องจากต้องการให้หมู่คาร์บอกซิลในโครงสร้างของ MA เพียงบางส่วนทำปฏิกิริยากับ cysteamine เพื่อเพิ่มหมู่ไทออลและยังคงเหลือหมู่คาร์บอกซิลที่มากพอเพื่อไปทำปฏิกิริยาการติด PNA ในขั้นต่อไป และพบว่าหลังทำปฏิกิริยาการตรึง PNA จะให้เปอร์เซ็นต์การเข้าทำปฏิกิริยาที่เพิ่มขึ้นเป็น 9.1% จึงสามารถยืนยันการติดของสาย PNA ได้

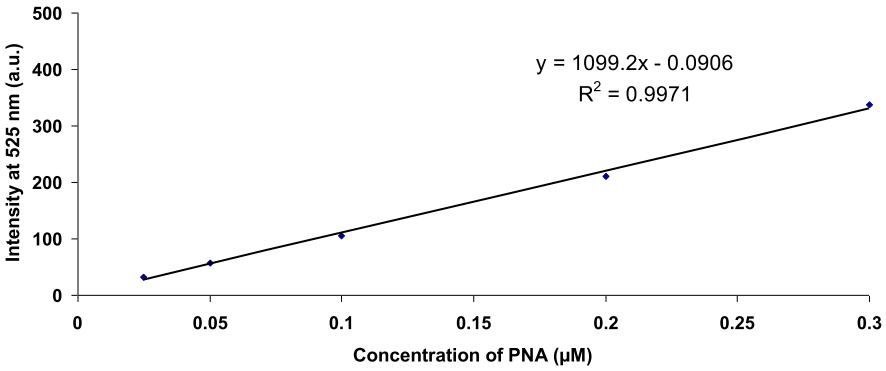


รูปที่ 3.13 FTIR spectra ของ PMAMPC หลังการทำปฏิกิริยากับ cysteamine และ PNA ตามลำดับ

นอกจากนี้ยังสามารถยืนยันการมีอยู่ของ PNA และคำนวณประสิทธิภาพการตรึง PNA-Cys-PMAMPC บน AuNRs ได้ด้วยเทคนิค fluorescence spectroscopy **รูปที่ 3.14** แสดง fluorescence spectra ของ PNA-PMAMPC-AuNRs ก่อนและหลังทำการย่อย AuNRs ด้วย KCN โดยพบว่าก่อนการย่อยจะไม่พบการเรืองแสงของ PNA เนื่องจาก AuNRs สามารถระงับสัญญาณ fluorescence ของ fluorescein ซึ่งเป็นสารเรืองแสงที่ติดอยู่ในโครงสร้างของ PNA จากนั้นเมื่อทำการย่อย AuNRs จะพบสัญญาณ fluorescence ของสารเรืองแสงปรากฏขึ้นอย่างชัดเจน แสดงให้เห็นว่าสามารถติด PNA ลงในโครงสร้างของ PMAMPC ที่ล้อมรอบบน AuNRs ได้ และเมื่อทำการคำนวณประสิทธิภาพการตรึง PNA-PMAMPC-SH ลงบน AuNRs เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (calibration curve) (**รูปที่ 3.15**) พบว่าได้เปอร์เซ็นต์การตรึงเท่ากับ 85.1%



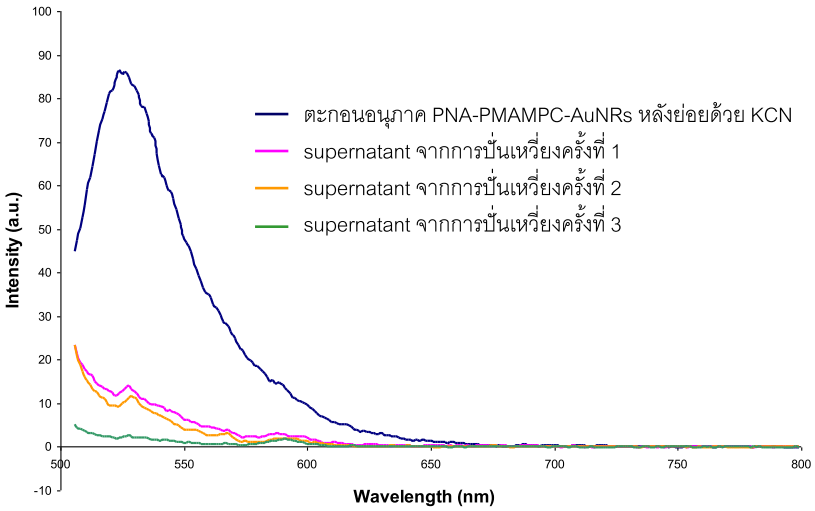
รูปที่ 3.14 Fluorescence spectra ของ PNA-PMAMPC-AuNRs ก่อนและหลังทำการย่อย AuNRs ด้วย KCN



รูปที่ 3.15 Calibration curve ของ PNA ที่สร้างด้วยการวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์

จากที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้นว่า PNA ที่ใช้ศึกษาในงานวิจัยนี้จะมีการปรับปรุงปลายสายด้านหนึ่งให้มี tetrapeptide (Gly-Phe-Leu-Gly) เพื่อควบคุมการปลดปล่อยสาย PNA จากอนุภาค AuNRs ด้วยเอนไซม์ cathepsin B ได้ ดังนั้นในเบื้องต้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการปลดปล่อยในหลอดทดลอง (*in vitro* release) โดยในการทดลองจะทำการ incubate PNA-PMAMPC-AuNRs (12.64 μg/mL) ที่สังเคราะห์ได้กับเอนไซม์ catehpsin B (1U/mL) ในสารละลาย phosphate buffer (0.1 M, pH 6) 1.0 mL ที่ประกอบด้วย NaCl (0.05 M) EDTA (1 mM) และ reduced glutathione (5 mM) ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที แยกเก็บส่วนสารละลายด้านบน (supernatant) และนำตะกอนด้านล่างมาทำการล้างด้วยการปั่นเหวี่ยงเช่นเดียวกันอีก 2 รอบ นำ supernatant จากการปั่นเหวี่ยงในแต่ละรอบมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค fluorescence spectroscopy และเปรียบเทียบกับ calibration curve เพื่อหาปริมาณ PNA ที่ถูกปลดปล่อยออกจากอนุภาค โดยจากผลการทดลอง (**รูปที่ 3.16**) พบว่ามี PNA เพียงบางส่วนที่ถูกปลดปล่อยออกจากอนุภาคและการล้างอนุภาคจำนวน 2 รอบมากเพียงพอที่จะนำ PNA ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากอนุภาคได้หมด เนื่องจากใน supernatant จากการล้างครั้งที่ 2 จะไม่พบสัญญาณฟลูออเรสเซนต์แสดงให้เห็นว่า PNA ที่ถูกปลดปล่อยถูกล้างออกจากอนุภาคหมดแล้ว จากนั้นจะทำการวิเคราะห์หาปริมาณ PNA ที่เหลืออยู่บนอนุภาคซึ่งสามารถหาได้จากการนำตะกอนอนุภาคไปย่อยด้วย KCN และวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์เปรียบเทียบกับ calibration curve โดยเมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณ PNA ที่ถูกปลดปล่อยกับปริมาณที่ PNA ที่เหลืออยู่บนอนุภาคจะได้เปอร์เซ็นต์การปลดปล่อยเท่ากับ 22.9% ซึ่งผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาที่ได้ทำการติดยา doxorubicin (DOX) ลงบนเพปไทด์ Tat

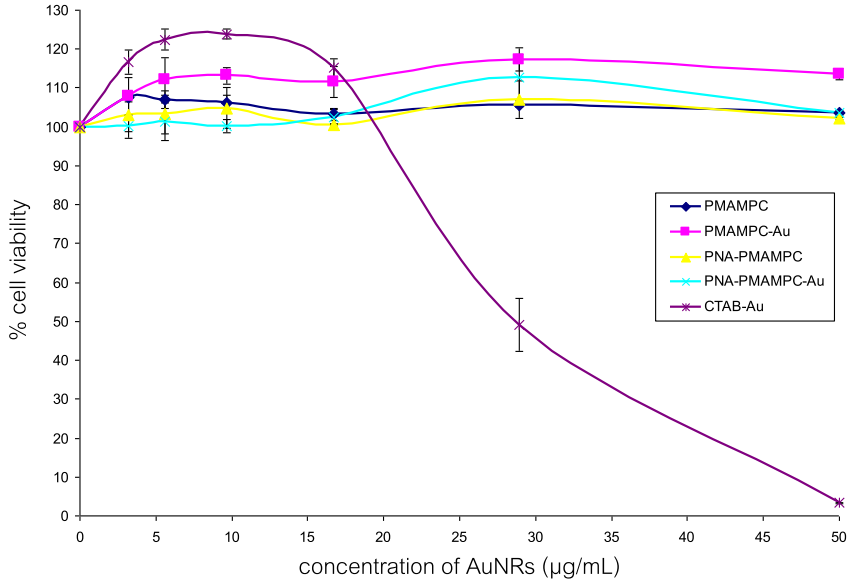
ผ่าน tetrapeptide linker (Gly-Phe-Leu-Gly) เพื่อช่วยนำส่งยาเข้าสู่เซลล์ โดยได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบการปลดปล่อยยาระหว่างโมเลกุลที่มีการติดยา 1, 2 และ 4 โมเลกุลลงบนเพปไทด์ 1 โมเลกุลซึ่งพบว่า ในโมเลกุลที่มีการติดยา 4 โมเลกุลจะให้เปอร์เซ็นต์การปลดปล่อยน้อยที่สุดเท่ากับ 40.0% เนื่องจากมีความเกะกะสูงทำให้การเข้าถึงของเอนไซม์ไปที่ tetrapeptide linker เกิดได้ยากขึ้น นอกจากนี้จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ยังได้มีการศึกษาการติดยาลงบนพอลิเมอร์ผ่าน tetrapeptide linker ดังกล่าว และจากผลการทดลองพบว่าความเกะกะของสายโซ่พอลิเมอร์จะขัดขวางการย่อย tetrapeptide linker ด้วยเอนไซม์ดังกล่าวโดยจะต้องใช้เวลานานถึง 80 ชั่วโมงจึงจะเกิดการปลดปล่อยอย่างสมบูรณ์ ดังนั้นในการทดลองส่วนนี้ผู้วิจัยจำเป็นจะต้องการทำการศึกษาต่อเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการปลดปล่อย เช่น ระยะเวลาหรือความเข้มข้น เพื่อให้ได้เปอร์เซ็นต์การปลดปล่อยที่เพิ่มขึ้นต่อไป



รูปที่ 3.16 Fluorescence spectra แสดงการปลดปล่อย PNA ออกจากอนุภาค PNA-PMAMPC-AuNRs ด้วยเอนไซม์ cathepsin B

3.3 การนำ PNA-PMAMPC-AuNRs ที่สังเคราะห์ได้ไปศึกษาความเข้ากันได้กับเซลล์

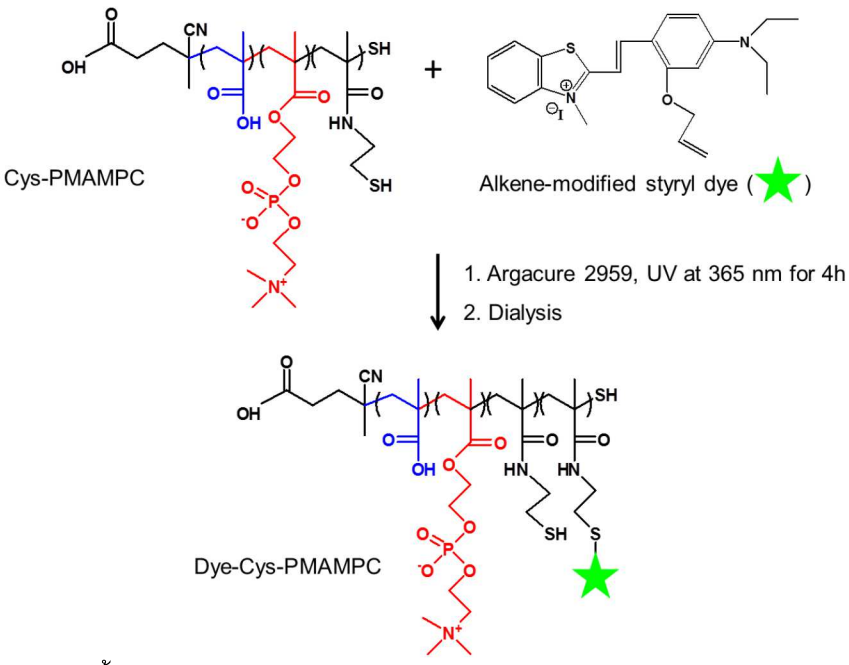
ในเบื้องต้นจะทำการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของอนุภาค AuNRs หลังการเคลือบด้วยพอลิเมอร์และพอลิเมอร์ที่ติด PNA (Cys-PMAMPC และ PNA-Cys-PMAMPC) ด้วยเทคนิค MTS assay (**รูปที่ 3.17**) โดยจะทำการศึกษากับเซลล์ HepG2 ที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น และทำการ incubate กับอนุภาคที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยจากผลการทดลองพบว่า อนุภาค CTAB-AuNRs เริ่มต้นมีความเป็นพิษเนื่องจากเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอนุภาคจะทำให้การรอดชีวิตของเซลล์ (cell viability) ลดลงอย่างเห็นได้ชัด ในขณะที่พอลิเมอร์และพอลิเมอร์ที่ติด PNA ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์และเมื่อนำมาเคลือบลงบน AuNRs จะสามารถช่วยลดความเป็นพิษให้กับ AuNRs ได้



รูปที่ 3.17 กราฟแสดง cell viability ของเซลล์ HepG2 เมื่อ incubate กับอนุภาคที่ความเข้มข้นต่างๆเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

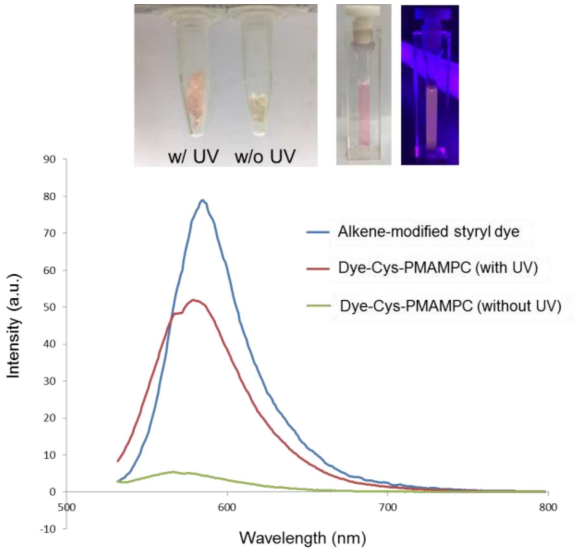
3.4 การเตรียมแท่งนาโนทองที่ติดสารเรืองแสงสามารถตรวจติดตามได้ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์

สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ที่สนใจนำมาศึกษาในการทดลองนี้ได้แก่สีย้อมในกลุ่ม styryl ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นในกลุ่มวิจัยของ ศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์ และมีการศึกษาวิจัยก่อนหน้านี้ว่าสามารถเกิดการเรืองแสงเมื่อจับกับ DNA หรือ RNA ดังนั้นสีย้อมดังกล่าวจึงน่าจะสามารถนำมาใช้ติดฉลากบนแท่งนาโนทองได้ โดยคาดว่าเมื่อเข้าสู่เซลล์จะเกิดการจับกับ RNA หรือ DNA ใน cytoplasm หรือ nucleus ทำให้เกิดการเรืองแสงสามารถตรวจติดตามได้ โดยในขั้นตอนการเตรียม PMAMPC-AuNRs ที่ติดฉลากด้วยสีย้อม (Dye-PMAMPC-AuNRs) จะประกอบไปด้วย 2 ขั้นตอนย่อย เช่นเดียวกับการตรึง PNA ลงบน PMAMPC-AuNRs ที่ได้รายงานไว้ข้างต้น โดยจะเริ่มจากการนำ PMAMPC ที่มีการปรับปรุงโครงสร้างด้วย cysteamine (Cys-PMAMPC) เพื่อเพิ่มหมู่ไทออลสำหรับเพิ่มประสิทธิภาพในการติดลงบนพื้นผิวอนุภาคทองมาทำการตรึงสีย้อมผ่านการเกิดปฏิกิริยา thiol-ene ระหว่างพันธะคู่ในโครงสร้างของสีย้อมและหมู่ไทออลบางส่วนในโครงสร้างของ PMAMPC ดังแสดงใน**รูปที่ 3.18** จากนั้นจึงนำ Cys-PMAMPC ที่ผ่านการติดสีย้อม (Dye-Cys-PMAMPC) มาตรึงลงบนพื้นผิวของ AuNRs ผ่านวิธี grafting-onto โดยใช้สภาวะในการตรึงที่เหมาะสมที่ได้ทำการศึกษาและรายงานมาก่อนหน้านี้



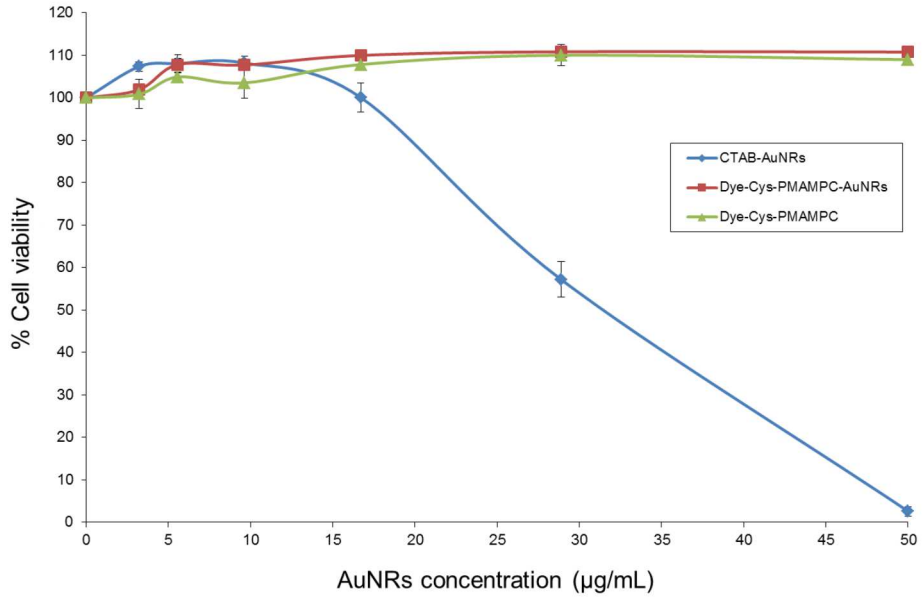
รูปที่ 3.18 สมการแสดงขั้นตอนการเตรียม Dye-Cys-PMAMPC

ทั้งนี้สามารถยืนยันการติดสีย้อมลงบน Cys-PMAMPC ได้ด้วยเทคนิค fluorescence spectroscopy ดังแสดงใน **รูปที่ 3.19** โดยจะพบพีกการเรืองแสงของสีย้อมในโครงสร้างของ Dye-Cys-PMAMPC ที่ค่าความยาวคลื่นประมาณ 576 nm ซึ่งเป็นตำแหน่งเดียวกับการเรืองแสงของสีย้อมเริ่มต้น นอกจากนี้ยังสามารถยืนยันได้ว่าสีย้อมดังกล่าวติดลงบนโครงสร้างพอลิเมอร์ผ่านปฏิกิริยา thiol-ene ไม่ได้เกิดการติดผ่าน nonspecific interaction โดยการทำการทดลองควบคุมที่ไม่มีการฉายแสงยูวี ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าไม่ปรากฏพีกการเรืองแสงของสีย้อมจึงสามารถยืนยันการเกิดปฏิกิริยา thiol-ene ได้ ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวยังสอดคล้องกับลักษณะทางกายภาพของพอลิเมอร์ที่เตรียมได้ซึ่งจะปรากฏสีส้มจากสีย้อมเฉพาะในกรณีที่มีการฉายแสงยูวีเพื่อให้เกิดปฏิกิริยา thiol-ene เท่านั้นและพบการเรืองแสงของสารละลาย Dye-Cys-PMAMPC ที่เตรียมได้



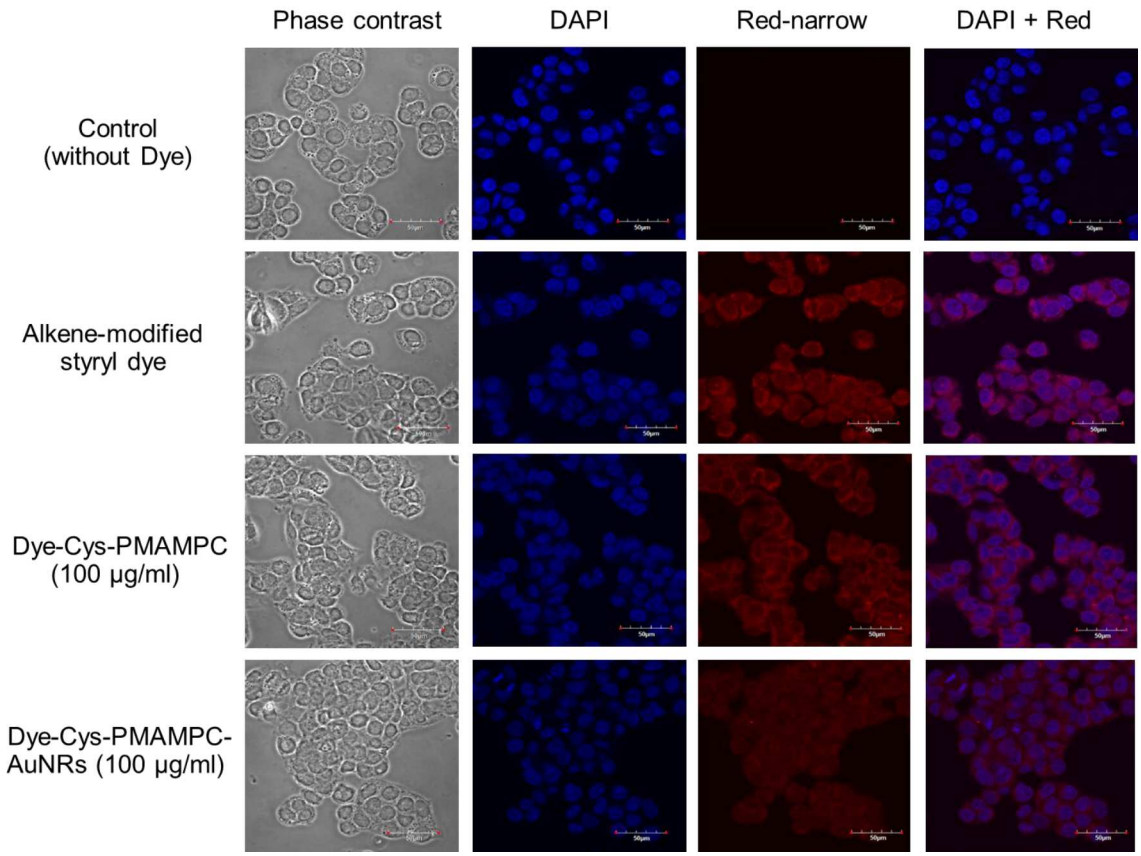
รูปที่ 3.19 Fluorescence spectra และลักษณะทางกายภาพของ Dye-Cys-PMAMPC

จากนั้นจะทำการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของอนุภาค AuNRs หลังการเคลือบด้วยพอลิเมอร์ที่มีการติดสีย้อม (Dye-Cys-PMAMPC) ด้วยเทคนิค MTS assay โดยจะทำการศึกษากับเซลล์ HepG2 และทำการ incubate กับอนุภาคที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากผลการทดลองที่แสดงใน **รูปที่ 3.20** พบว่า อนุภาค CTAB-AuNRs เริ่มต้นมีความเป็นพิษเนื่องจากเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอนุภาคจะทำให้การรอดชีวิตของเซลล์ (cell viability) ลดลงอย่างเห็นได้ชัด ในขณะที่อนุภาค AuNRs ที่เคลือบด้วยพอลิเมอร์ที่ติดสีย้อมจะไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ แสดงให้เห็นว่าสีย้อมดังกล่าวไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ สามารถนำมาใช้เพื่อติดฉลากบนแท่งนาโนทองเพื่อพัฒนาเป็นพาหะในการนำส่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถตรวจติดตามได้ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์ และการเคลือบ Dye-Cys-PMAMPC ลงบน CTAB-AuNRs สามารถลดความเป็นพิษให้กับ AuNRs ได้



รูปที่ 3.20 กราฟแสดง cell viability ของเซลล์ HepG2 เมื่อ incubate กับอนุภาคที่ความเข้มข้นต่างๆเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

โดยเมื่อพบว่าอนุภาค AuNRs ที่มีการติดฉลากด้วยสีย้อมดังกล่าวไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ในขั้นตอนต่อไปจะเป็นการศึกษาว่าสีย้อมที่ติดอยู่บนอนุภาคสามารถเกิดการเรืองแสงเพื่อใช้ในการตรวจติดตามเมื่อเข้าสู่เซลล์ HepG2 ด้วยการศึกษาการเข้าเซลล์ (cellular uptake) ด้วยเทคนิค confocal fluorescence microscopy โดยการย้อมนิวเคลียสของเซลล์ด้วยสีย้อม DAPI และทำการ incubate กับอนุภาคที่ความเข้มข้น 100 μg/mL เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากผลการทดลองดังแสดงใน**รูปที่ 3.21** พบการเรืองแสงของสีย้อมบนอนุภาค Dye-Cys-PMAMPC-AuNRs ภายในเซลล์ โดยจะมีการเรืองแสงในลักษณะเดียวกับการใช้สีย้อมเพียงอย่างเดียวในการนำเข้าเซลล์ คือพบการเรืองแสงในบริเวณส่วน cytoplasm ของเซลล์มากกว่าในบริเวณส่วนนิวเคลียสของเซลล์แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้สีย้อมดังกล่าวในการติดฉลากบน PMAMPC-AuNRs เพื่อเตรียมพาหะในการนำส่งที่มีเสถียรภาพสูง ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ สามารถตรวจติดตามได้ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์ นอกจากนี้เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพแท่งนาโนทองที่พัฒนาขึ้น ในการเป็นพาหะในการนำส่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพไปที่นิวเคลียสของเซลล์ได้อย่างจำเพาะเจาะจง ผู้วิจัยสนใจที่จะติดเพปไทด์ nuclear localization signal (NLS) เข้าไปที่หมู่คาร์บอกซิลที่เหลือในโครงสร้างของโคพอลิเมอร์ ซึ่งขณะนี้อยู่ระหว่างทำการทดลอง

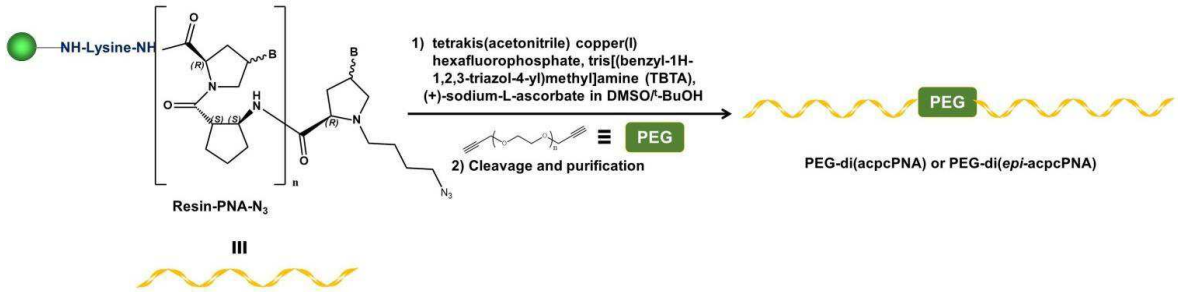


รูปที่ 3.21 ภาพถ่ายจากเทคนิค confocal fluorescence microscopy ของเซลล์ HepG2 เมื่อ incubate กับอนุภาคที่ความเข้มข้น 100 µg/mL เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (scale bar = 50 µm)

<u>ตอนที่ 4 การสังเคราะห์ พิสูจน์เอกลักษณ์ และการประกอบตัวเองของมอนอเมอร์ที่มีเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิดเป็นองค์ประกอบ</u>

4.1. การสังเคราะห์พอลิเอทิลีนไกลคอลที่มีหมู่ปลายเป็น acpcPNA หรือ *epi*-acpcPNA

มอนอเมอร์ที่ถูกเตรียมขึ้นประกอบด้วยกัน 2 ส่วน ส่วนที่หนึ่งคือ linker โดยเลือกใช้ linker ที่มีความยาวของหน่วยซ้ำเอทิลีนออกไซด์ 3 ชนิด ได้แก่ tetra(ethylene glycol) (TEG), octa(ethylene glycol) (OEG) และ polyethylene glycol ที่มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 600 $gmol^{-1}$ (PEG 600) ส่วนที่สองคือ acpcPNA ที่มีลำดับเบสเป็น N'-TTT TTT TT-C' (P1) หรือ *epi*-acpcPNA ที่มีลำดับเบสคือ N'-GCG CGC GC-C' (P2) ในกรณีที่ linker เป็น TEG และ OEG มอนอเมอร์จะถูกเตรียมผ่านปฏิกิริยา copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC) click reaction (**รูปที่ 4.1**) ระหว่าง TEG-di(alkyne) ที่มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 270 $gmol^{-1}$ หรือ OEG-di(alkyne) ที่มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 446 $gmol^{-1}$ กับ azide-modified PNA (N_3-PNA) น้ำหนักโมเลกุลของสารที่ใช้ในการสังเคราะห์มอนอเมอร์ในส่วนนี้แสดงรายละเอียดไว้ใน**ตารางที่ 4.1**

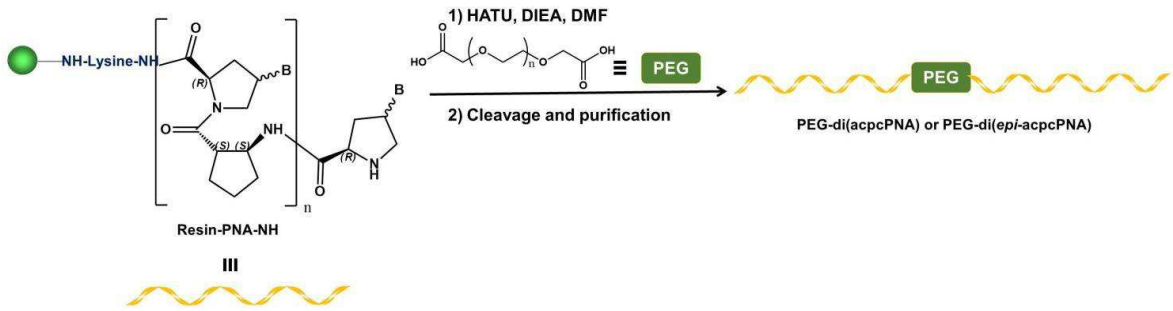


รูปที่ 4.1 ปฏิกิริยา copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC) click reaction ของ PEG-di(alkyne) และ N_3-PNA

ตารางที่ 4.1 น้ำหนักโมเลกุลของ PEG-di(alkyne), วิเคราะห์โดยเทคนิค MALDI-TOF mass spectrometry.

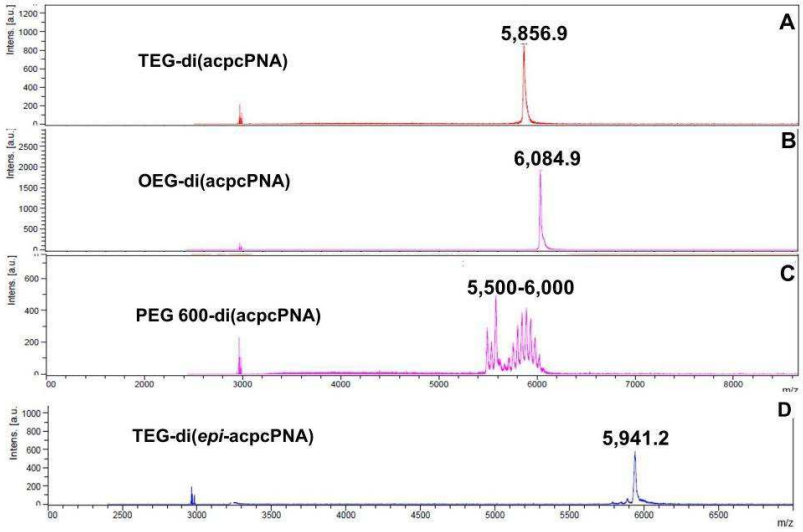
Sample	Sequence (N to C)	m/z (cald)	m/z
TEG-di(alkyne)	-	270.0	270.0
OEG-di(alkyne)	-	446.0	446.0
P1	TTT TTT TT	2693.9	2691.3
P2	GCG CGC GC	2733.9	2729.8
N_3-P1	TTT TTT TT	2791.9	2791.0
N_3-P2	GCG CGC GC	2831.9	2831.9

ในกรณีที่ linker เป็น PEG 600 มอนอเมอร์จะถูกเตรียมผ่านปฏิกิริยา amidation ของ PEG-di(acid) และ NH-PNA (**รูปที่ 4.2**) โดยใช้ 1-[is(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate (HATU) เป็น peptide coupling reagent และ *N,N*-diisopropylethylamine (DIEA) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งทั้งสองปฏิกิริยาเกิดขึ้นบนตัวรองรับของแข็ง (solid support) หลังปฏิกิริยาเสร็จสิ้นผลิตภัณฑ์ถูกปลดออกจาก ตัวรองรับด้วย trifluoroacetic acid (TFA) ตกตะกอนด้วย diethyl ether (DE) และทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค high-performance liquid chromatography (HPLC)



รูปที่ 4.2 ปฏิกิริยา amidation ของ PEG-di(acid) และ NH-PNA

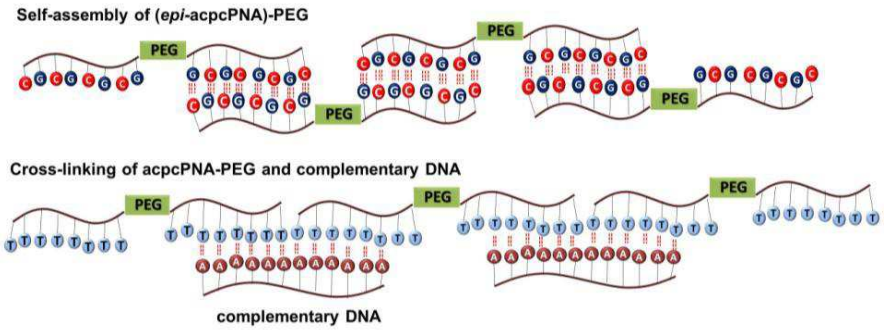
หลังปฏิกิริยาเสร็จสิ้น พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF mass spectrometry พบว่าสามารถสังเคราะห์มอนอเมอร์ของ TEG-di(acpcPNA), OEG-di(acpcPNA), PEG 600-di(acpcPNA) และ TEG-di(*epi*-acpcPNA) ได้ โดยพบพีกมวลโมเลกุลของมอนอเมอร์ที่ต้องการ (**รูปที่ 4.3**) คือ 5,856.9, 6,084.9, 5,500-6,000 และ 5,941.2 M/Z ตามลำดับ สำหรับ PEG 600-di(acpcPNA) ที่มีมวลโมเลกุลในช่วง 5,500-6,000 M/Z เนื่องจาก PEG 600 มีมวลโมเลกุลอยู่ในช่วง 300-700 M/Z โดยแต่ละพีกของมวลโมเลกุลมีค่าห่างกัน 44 M/Z ซึ่งเป็นมวลโมเลกุลของเอทิลีน ($-CH_2-CH_2-$)



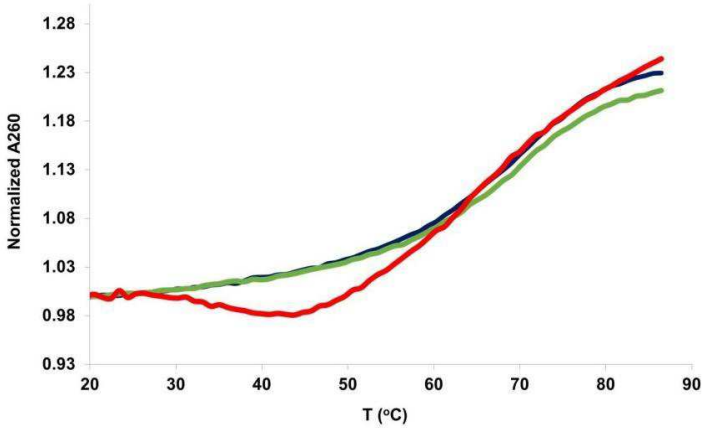
รูปที่ 4.3 แมสสเปกตรัมของ TEG-di(acpcPNA) (A), OEG-di(acpcPNA) (B), PEG 600-di(acpcPNA) (C) และ TEG-di(*epi*-acpcPNA)(D)

4.2 การศึกษาสมบัติไฮบริไดเซชันของมอนอเมอร์

ทำการศึกษาหา melting temperature (T_m) ซึ่งเป็นค่าอุณหภูมิที่ทำให้ 50% โมเลกุลที่เข้าคู่แยกออกจากกัน ดังนั้นการมี T_m จึงสามารถยืนยันในเบื้องต้นได้ว่ามอนอเมอร์สามารถเกิด hybridization ได้ ทั้งนี้สามารถหา T_m โดยใช้เทคนิค UV-vis spectroscopy ที่มีการให้อุณหภูมิในช่วง 20- 90°C ในอัตราการให้ความร้อนที่ 1°C/นาที สำหรับ TEG-di(acpcPNA), OEG-di(acpcPNA) จะทำการเติมดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สม คือ 5'-AAA AAA AAA AAA-3' (DNA A12) เพื่อให้เกิดการเข้าคู่กันของมอนอเมอร์และดีเอ็นเอคู่สม (**รูปที่ 4.4**) โดยใช้ความเข้มข้นของมอนอเมอร์และดีเอ็นเอคู่สมคือ 1 μM ในสภาวะที่มี phosphate buffer pH 7.4 ความเข้มข้น 10 mM และสารละลาย sodium chloride ความเข้มข้น 100 mM สำหรับ TEG-di(*epi*-apcpPNA) จะศึกษาการเกิด self-hybridization ของมอนอเมอร์โดยใช้ความเข้มข้นของมอนอเมอร์คือ 2 μM ในสภาวะเดียวกัน จากกราฟของ melting curve (**รูปที่ 4.5**) พบ single transition ในกรณีที่ TEG-di(apcpPNA) และ OEG-di(acpcPNA) เกิดไฮบริไดเซชันกับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สม และเมื่อทำ derivative plot จะพบ T_m เท่ากับ 70 °C และพบ single transition ที่อุณหภูมิเท่ากับ 65 °C แสดงการเกิด self-hybridization ของ TEG-di(*epi*-apcpPNA) (**รูปที่ 4.4**)

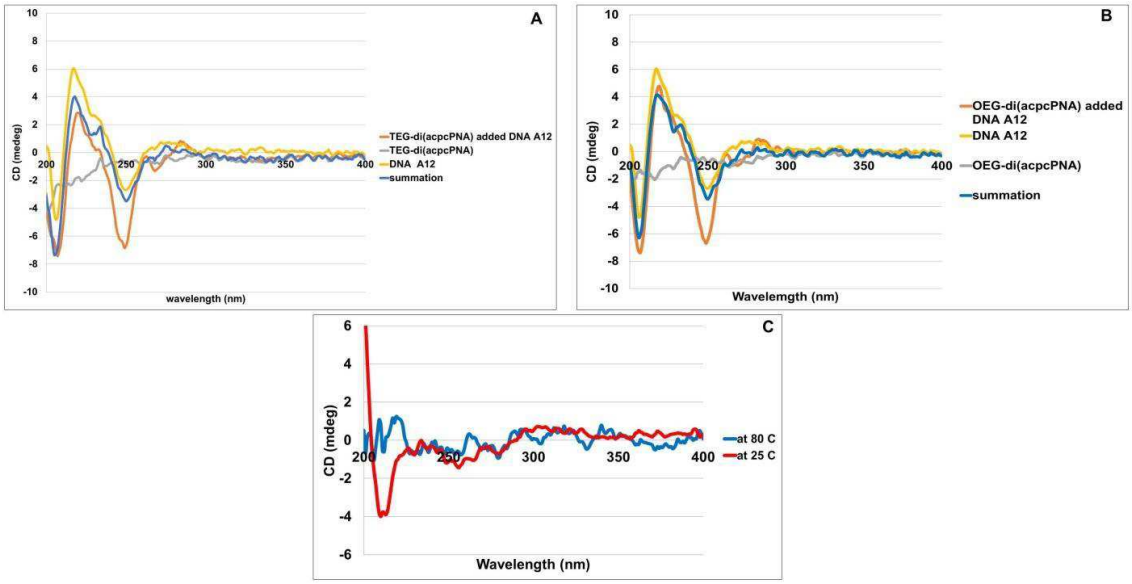


รูปที่ 4.4 การเกิดไฮบริไดเซชันของมอนอเมอร์ที่เป็นอนุพันธ์ของพีเอ็นเอ



รูปที่ 4.5 กราฟ melting curve ของ TEG-di(acpcPNA) (เส้นสีเขียว), OEG-di(acpcPNA) (เส้นน้ำเงิน) ที่เกิดไฮบริไดเซชันกับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สม และการเกิด self-hybridization ของ TEG-di(*epi*-apcpPNA) (เส้นสีแดง)

ทำการศึกษาโครงสร้างทุติยภูมิของมอนอเมอร์ที่เตรียมได้โดยใช้เทคนิค circular dichroism (CD) โดยใช้ความเข้มข้นและสภาวะเช่นเดียวกับการศึกษาหา T_m ของมอนอเมอร์ จาก CD spectra ของ TEG-di(acpcPNA) และ OEG-di(acpcPNA) ที่มีการเติมดีเอ็นเอคู่สม (**รูปที่ 4.6**) พบว่ามี intensity ใน negative region ที่ความยาวคลื่น 208 และ 250 nm มากกว่า intensity ของ CD spectra ของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สม (A12) แสดงว่ามีอันตรกิริยาระหว่างมอนอเมอร์และดีเอ็นเอคู่สมเกิดขึ้นและเมื่อเปรียบเทียบกับ CD spectra ของผลรวมระหว่างมอนอเมอร์และดีเอ็นเอคู่สม (summation) มีความแตกต่างกัน จึงสรุปได้ว่ามอนอเมอร์และดีเอ็นเอคู่สมสามารถเกิดไฮบริไดเซชันได้จริง สำหรับมอนอเมอร์ TEG-di(*epi*-acpcPNA) ได้ทำการทดลองที่ 2 อุณหภูมิคือ 25 และ 80 $^{\circ}$C เพื่อเปรียบเทียบลักษณะของ CD spectra พบว่า CD spectra ของ TEG-di(*epi*-acpcPNA) มีลักษณะโครงสร้างแบบ helix สังเกตจากการมีพีกใน negative region ที่ตำแหน่ง 210 และ 260 nm ที่ 25 $^{\circ}$C ซึ่งเป็นอุณหภูมิต่ำกว่า T_m(65 $^{\circ}$C) แต่ไม่พบลักษณะดังกล่าวที่อุณหภูมิ 80 $^{\circ}$C ซึ่งเป็นอุณหภูมิสูงกว่า T_mจึงสามารถสรุปได้ว่ามอนอเมอร์ TEG-di(*epi*-acpcPNA) มีสมบัติ self-hybridization

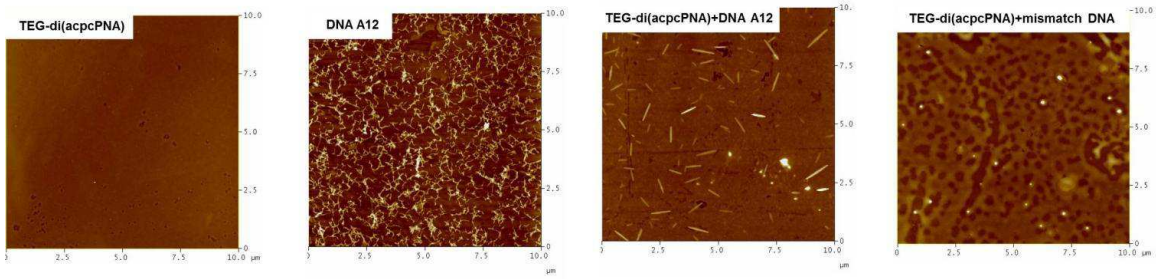


รูปที่ 4.6 CD spectra ของ TEG-di(acpcPNA) (A), OEG-di(acpcPNA) (B) ทั้งก่อนและหลังการเติมดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สม และ TEG-di(*epi*-acpcPNA) ที่อุณหภูมิ 25 และ 80 $^{\circ}$C (C)

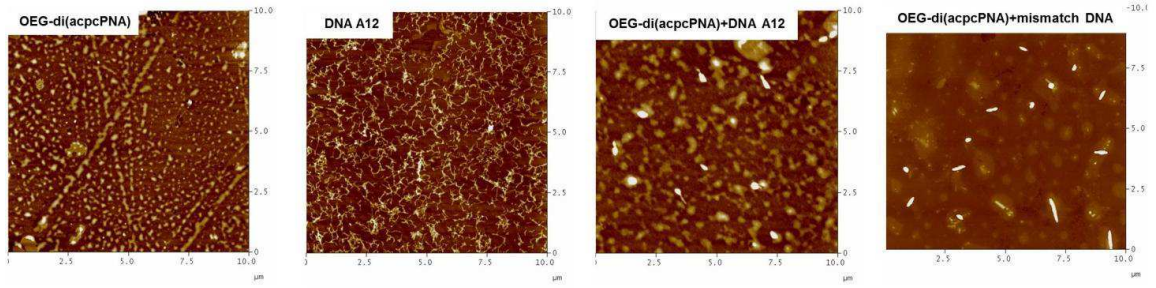
4.3 การศึกษาสัณฐานวิทยาของโครงสร้างที่เกิดจากไฮบริไดเซชันของมอนอเมอร์

เพื่อยืนยันการเกิดเป็นอนุภาคของมอนอเมอร์ผ่านการเกิดไฮบริไดเซชัน จึงได้ทำการศึกษาสัณฐานวิทยา (morphology) ของโครงสร้างที่คาดว่าเกิดขึ้นด้วยเทคนิค Atomic force microscopy (AFM) และ Field emission-scanning electron microscopy (FE-SEM) เพื่อหาขนาดและรูปร่างของโครงสร้างที่เกิดขึ้น เพื่อหลีกเลี่ยงผลกระทบของการใช้บัฟเฟอร์ที่มีเกลือเป็นองค์ประกอบ ในการทดลองนี้จึงทำการปรับพีเอช ของสารละลายมอนอเมอร์ด้วยการเติมสารละลายแอมโมเนีย หลังจากนั้นกำจัดแอมโมเนียออกด้วยวิธี freeze drying ในการเตรียมตัวอย่างของ AFM และ FESEM ใช้ความเข้มข้นของมอนอเมอร์และดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สมเท่ากับ 10 μM ปริมาตร 30 μL หยดลงบนแผ่น silicon wafer ขนาด 1x1 cm จากนั้นทำให้ตัวอย่างบนแผ่น silicon wafer แห้งด้วยการ vacuum drying ทั้งนี้ไม่ได้มีการเติมสารละลาย NaCl ในชั้นไฮบริไดเซชันเพื่อหลีกเลี่ยงผลกระทบของการเกิดผลึกของเกลือที่อาจรบกวนการสังเกตสัณฐานวิทยาของโครงสร้างที่เกิดขึ้นจากการเกิดไฮบริไดเซชัน

จากรูปภาพของ AFM (**รูปที่ 4.7**) พบว่า ดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สม A12 มีลักษณะเป็นเส้นใยสั้นขนาดเล็ก ในขณะที่มอนอเมอร์ TEG-di(acpcPNA) ที่ผสมกับ DNA A12 พบอนุภาคมีลักษณะเป็นแท่งและแตกต่างกับตัวอย่างของมอนอเมอร์ที่ผสมกับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสผิดไป (mismatched DNA) คือ 5'-GCA GGA CTA ACT-3'สำหรับมอนอเมอร์ OEG-di(acpcPNA) (**รูปที่ 4.8**) มีลักษณะเป็นเม็ดทรงกลม หลังจากเติมดีเอ็นเอคู่สม DNA A12 พบลักษณะของการรวมกลุ่มกันของอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ขึ้นและแตกต่างจากมอนอเมอร์ที่ผสมกับดีเอ็นเอแบบที่มีลำดับเบสผิดไป จากผลของ AFM สามารถยืนยันในเบื้องต้นได้ว่ามอนอเมอร์ TEG-di(acpcPNA) และ OEG-di(acpcPNA) สามารถเกิดไฮบริไดเซชันกับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สม เกิดเป็นอนุภาคที่มีรูปร่างแตกต่างกันได้

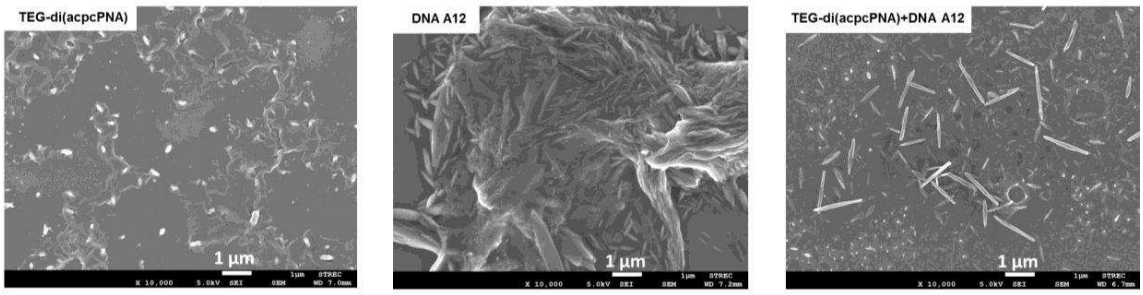


รูปที่ 4.7 AFM micrographs ของ TEG-di(acpcPNA), ดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สม DNA A12, TEG-di(acpcPNA) ที่ผสมกับ DNA A12 และ TEG-di(acpcPNA) ที่ผสมกับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสผิดไป



รูปที่ 4.8 AFM micrographs ของ OEG-di(acpcPNA), ดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สม DNA A12, OEG-di(acpcPNA) ที่ผสมกับ DNA A12 และ OEG-di(acpcPNA) ที่ผสมกับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสผิดไป

จากรูปภาพของ FE-SEM (**รูปที่ 4.9**) พบว่ามอนอเมอร์ TEG-di(acpcPNA) มีลักษณะเป็นแบบวงรีขนาด 0.2 μm ดีเอ็นเอคู่สม DNA A12 มีลักษณะเป็นทรงเมล็ดข้าวขนาด 0.6 μm แต่จากรูปภาพพบว่ามีการรวมกลุ่มกันของดีเอ็นเอเนื่องจากความผิดพลาดในการเตรียมตัวอย่างทำให้อนุภาคกระจายตัวไม่ดี สำหรับมอนอเมอร์ TEG-di(acpcPNA) ที่ผสมกับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สม DNA A12 มีลักษณะเป็นแท่งซึ่งสอดคล้องกับรูปภาพ AFM มีขนาดเฉลี่ยประมาณ 1.6 μm



รูปที่ 4.9 FESEM micrographs ของ TEG-di(acpcPNA), ดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สม DNA A12 และ TEG-di(acpcPNA) ที่ผสมกับ DNA A12

จากข้อมูลในการวิเคราะห์ด้วยการหา Tm และ CD และสัณฐานวิทยาของโครงสร้างที่เกิดขึ้นจากไฮบริไดเซชันสามารถใช้ในการยืนยันเบื้องต้นได้ว่ามอนอเมอร์ที่มีพีเอ็นเอเป็นองค์ประกอบที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถเกิดไฮบริไดเซชันเป็นโครงสร้างเฉพาะได้ ในขณะนี้อยู่ระหว่างการปรับเปลี่ยนลำดับเบสของพีเอ็นเอ การศึกษาผลของอุณหภูมิ

ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างที่เกิดขึ้น ร่วมทั้งการปรับเปลี่ยน linker ให้เป็นโอลิโกเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงขึ้น เช่น oligomeric poly(lactic acid) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาโครงสร้างดังกล่าวในการนำไปประยุกต์ทางด้านการแพทย์ต่อไปได้ในอนาคต

ชื่อโครงการย่อย Signal enhancement in PNA based sensors by utilizing electron transfer/energy transfer upon target binding

ระยะเวลาโครงการ 17 มีนาคม 2557 – 16 มีนาคม 2560 ได้รับอนุมัติให้ขยายเวลาถึง 16 กันยายน 2560

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 17 มีนาคม 2557 **ถึงวันที่** 16 กันยายน 2560

หัวหน้าโครงการวิจัยย่อย

รองศาสตราจารย์ ดร.ปณต ถาวรังกูร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ผู้ร่วมวิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร.เพริศพิชญ์ คณาธารณา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรากร ลิ่มบุตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อาภรณ์ นุ่มน่วม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชิตนนท์ บูรณชัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จงดี บูรณชัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อพัฒนาเซนเซอร์ทางเคมีไฟฟ้าสำหรับการตรวจวัด PNA-DNA hybridization ผ่านตัวส่งผ่านอิเล็กตรอน โดยการปรับปรุงผิวหน้าอิเล็กโทรดด้วยวัสดุคอมโพสิตระหว่างกราฟีน-อนุภาคนาโนของโลหะ
2. เพื่อพัฒนาเซนเซอร์ทางแสงสำหรับการตรวจวัด cysteine โดยอาศัยเทคนิค catalyzed hairpin assembly (CHA) ร่วมกับ PNA

รายละเอียดผลการดำเนินงานของโครงการ

การดำเนินงาน

กิจกรรม/เดือน	เดือน					
	1-6	7-12	13-18	19-24	25-30	31-36
1. Graphene-conducting polymer-metal nanoparticle nanocomposite modified electrode for ultrasensitive detection of PNA-DNA hybridization based on the electrical signal of a redox						
1.1 Comparative study of the electrical signal of electroactive redox indicator with different modification of electrodes for detection of PNA-DNA hybridization	←→ / ←- -→					
1.2 Optimization		←→ / ←- -→	←→ / ←- -→	←- -→		
1.3 Study of analytical performances				←→ / ←- -→	←→ / ←- -→	←- -→
2. Electrochemical DNA biosensor based on the PNA probe/polypyrrole/Siver nanoforam modified electrode						
2.1 Fabrication of PNA probe/Polypyrrole/ Silver nanofoam modified gold electrode		←→ / ←- -→	←→ / ←- -→			
2.2 PNA probe/Polypyrrole/ Silver nanofoam modified gold electrode			←→ / ←- -→	←→ / ←- -→		
2.3 Optimization of a electrochemical DNA biosensor system				←→ / ←- -→	←→ / ←- -→	
2.4 Study of analytical performances					←→ / ←- -→	←→ / ←- -→
3. A PNA-assisted highly selective cysteine sensor based on catalyzed hairpin assembly						
3.1 Designing DNA hairpins (H1, H2, DNA sensing strand) and PNA hairpin (PNA sensing strand) and testing the sensor response to target DNA			←→ / ←- -→			
3.2 optimization of parameters affecting the performance of the sensor, such as the length of hairpin stem, the length of toehold region, probes concentration, buffer concentration and incubation time				←→ / ←- -→	←→ / ←- -→	
3.3 Study of analytical performances					←→	←- -→

←→ กิจกรรมขั้นตอนการดำเนินงานที่วางแผนไว้

←- -→ กิจกรรมขั้นตอนการดำเนินการแล้ว

การดำเนินงาน

โครงการที่ 4: Signal enhancement in PNA based sensors by utilizing electron transfer/energy transfer upon target binding

โครงการนี้พัฒนาไบโอเซนเซอร์ที่มีความไววิเคราะห์สูงและความจำเพาะต่อการตรวจวัดสูง โดยใช้พิร์โรดินิลพีเอ็นเอเป็นโพรบ แบ่งงานวิจัยเป็นสามส่วนย่อยตามรายละเอียดดังนี้

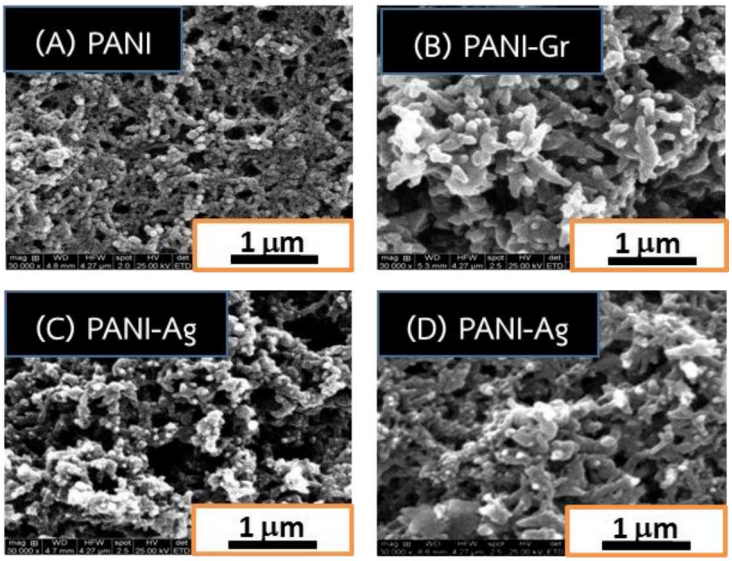
โครงการย่อยที่1: การพัฒนาอิเล็กโทรดที่ดัดแปรด้วยกราฟีน-อนุภาคนาโนของโลหะสำหรับการตรวจวัดการเกิดไฮบริไดเซชันระหว่างพีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอโดยอาศัยสัญญาณจากรีดอกซ์อินดิเคเตอร์

งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาดีเอ็นเอไบโอเซนเซอร์ (DNA biosensor) แบบติดฉลาก โดยการตรึง acpcPNA-AQ probe ที่มีแอนทราควิโนน (anthraquinone, AQ) ติดตรงตำแหน่งปลายโพรบบนขั้วไฟฟ้าคาร์บอนพิมพ์สกรีน (screen printed carbon electrode, SPCE) ที่มีการปรับปรุงด้วยวัสดุคอมโพสิตพอลิเมอร์ชนิดนำไฟฟ้าพอลิอะนิลีน (polyaniline, PANI) ร่วมกับกราฟีน (graphene, Gr) และอนุภาคนาโนเงิน (silver nanoparticles, AgNPs) เมื่อเกิดไฮบริไดเซชันระหว่าง acpcPNA-AQ probe กับดีเอ็นเอเป้าหมาย (target DNA) ทำให้ส่วนของ AQ ที่ติดไว้ปลายโพรบอยู่ห่างจากผิวขั้วไฟฟ้าทอง การส่งผ่านอิเล็กตรอนของ AQ มายังผิวอิเล็กโทรดจึงเกิดได้ยากขึ้น สัญญาณการตรวจวัดจึงมีค่าลดลงตามความเข้มข้นของ target DNA ซึ่งงานวิจัยที่ได้ดำเนินการ ประกอบด้วย

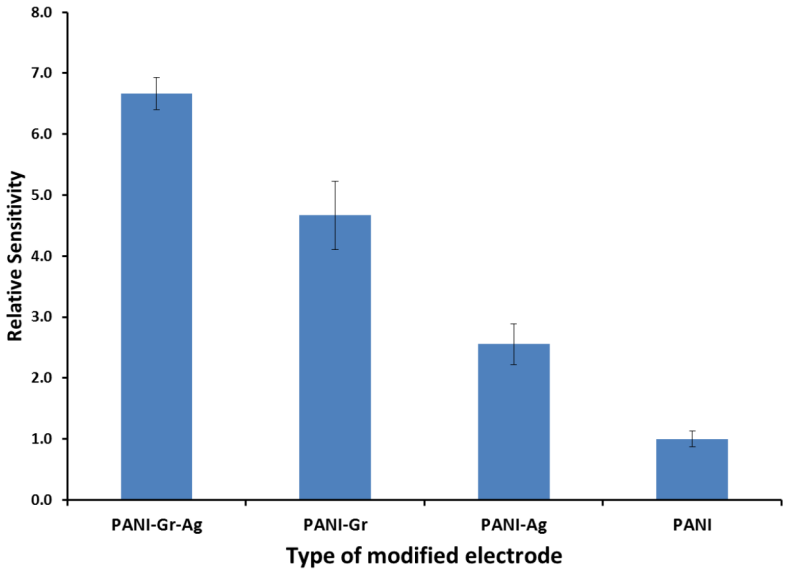
1.1 ศึกษาการเตรียมขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วยวัสดุที่แตกต่างกัน

เปรียบเทียบสัญญาณไฟฟ้าจากการตรึง lysine acpcPNA-AQ probe (AQ-GCT CCG TCC TC-LysNH_2) ที่มี AQ ติดตรงตำแหน่งปลายโพรบ บนขั้วไฟฟ้าที่มีการปรับปรุงด้วยวัสดุที่แตกต่างกัน 4 แบบ ได้แก่ พอลิเมอร์ชนิดนำไฟฟ้า PANI PANI ที่คอมโพสิตกับกราฟีน (PANI-Gr) PANI ที่คอมโพสิตกับอนุภาคนาโนเงิน (PANI-Ag) และ PANI ที่คอมโพสิตกับกราฟีนร่วมกับอนุภาคนาโนเงิน (PANI-Gr-Ag) จากภาพ SEM (รูปที่ 1.1) ขั้วที่ปรับปรุงด้วย PANI (A) พบว่าจะมีท่อ PANI ปกคลุมพื้นผิวของขั้วไฟฟ้า ขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วย PANI-Gr (B) จะมีแผ่นกราฟีนเคลือบบนท่อ PANI ที่ปกคลุมอยู่บนขั้ว ส่วนขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วย PANI-Ag (C) พบว่าผิวของท่อ PANI จะมีก้อนของอนุภาคนาโนเงินเกาะอยู่ และขั้วที่ปรับปรุงด้วย PANI-Gr-Ag (D) พบว่าผิวของท่อ PANI จะมีทั้งแผ่นกราฟีนและก้อนของอนุภาคนาโนเงินเกาะอยู่ด้วย

เมื่อเกิดไฮบริไดเซชันระหว่าง acpcPNA-AQ probe กับ target DNA ทำให้ส่วนของ AQ ที่ติดไว้ปลายโพรบอยู่ห่างจากผิวขั้วไฟฟ้าทอง ดังนั้น การส่งผ่านอิเล็กตรอนของ AQ มายังผิวอิเล็กโทรดจึงเกิดได้ยากขึ้น สัญญาณการตรวจวัดจึงมีค่าลดลงตามความเข้มข้นของ target DNA ซึ่งจากการจากการเปรียบเทียบค่าความไววิเคราะห์ ของขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงทั้ง 4 แบบ (รูปที่ 1.2) พบว่า ขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วยคอมโพสิตของ PANI-Gr-Ag จะให้ค่าความไววิเคราะห์สูงที่สุด (มากกว่า PANI-Gr PANI-Ag และ PANI ประมาณ 6.7 , 4.7 และ 2.5 เท่า ตามลำดับ) เนื่องจากคอมโพสิทของวัสดุนาโนดังกล่าวช่วยเพิ่มการนำไฟฟ้าทำให้สัญญาณการตรวจวัดสูงที่สุด



รูปที่ 1.1 SEM ของขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วย (A) PANI (B) PANI-Gr (C) PANI-Ag และ (D) PANI-Gr-Ag ด้วยวิธี electrodeposition ในช่วงศักย์ไฟฟ้า -0.2 ถึง 1.0 โวลต์ ด้วยอัตราการสแกน 50 mV/s

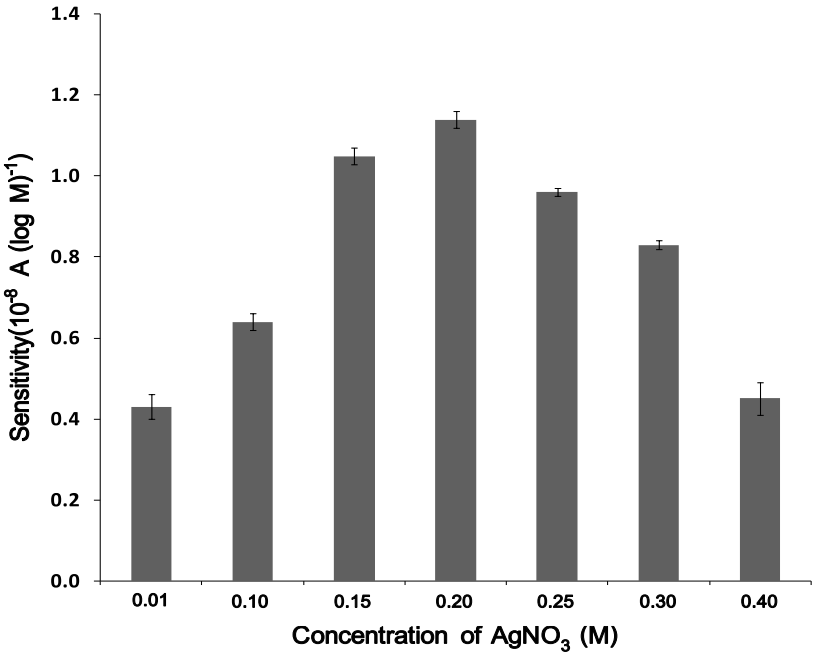


รูปที่1.2 ค่าความไววิเคราะห์จากการไฮบริไดซ์ระหว่าง PNA-AQ probe กับ DNA ที่ความเข้มข้น 1.0×10^{-10} ถึง 1.0×10^{-7} M บนขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วย PANI PANI-Gr PANI-Ag และ PANI-Gr-Ag

1.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสม

1.2.1 ความเข้มข้นของ Ag

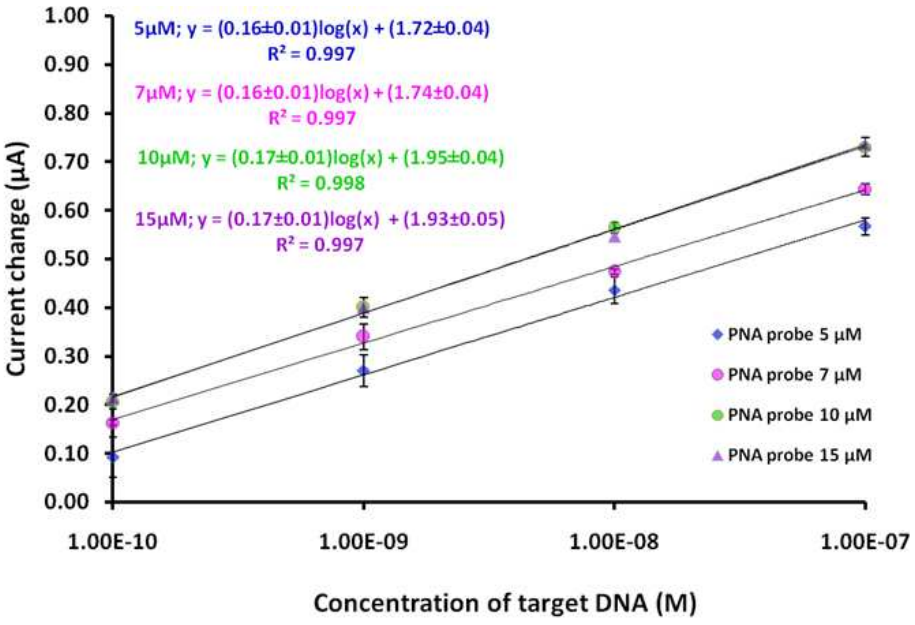
ปริมาณของ Ag ใน PANI-Gr-Ag ที่อยู่บนขั้วไฟฟ้าเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อสัญญาณไฟฟ้า เพราะ Ag ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งการเกิดปฏิกิริยาและช่วยในการส่งผ่านอิเล็กตรอน จึงได้ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลาย $AgNO_3$ ที่ใช้ในขั้นตอน electrodeposition (โดยใช้เทคนิคไซคลิกโวลแทมมิทรี) และเปรียบเทียบค่าความไววิเคราะห์ของไฮบริไดเซชันระหว่างโพรบกับ target DNA ที่ตรึงอยู่บนผิวขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วย PANI-Gr-Ag ที่ความเข้มข้นของ $AgNO_3$ ที่ 0.010 0.10 0.20 0.25 0.30 และ 0.40 โมลาร์พบว่า เมื่อความเข้มข้นของ $AgNO_3$ เพิ่มจาก 0.010 ถึง 0.20 โมลาร์ สัญญาณไฟฟ้าจะเพิ่มขึ้น เนื่องจาก Ag nanoparticles ที่เพิ่มขึ้นทำให้มีพื้นที่ผิวมากขึ้น จึงช่วยเพิ่มสัญญาณไฟฟ้าให้สูงขึ้น แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นสูงกว่า 0.20 โมลาร์ อาจจะเกิดการจับตัวเป็นกลุ่มก้อนทำให้พื้นที่ผิวน้อยลงจึงทำให้สัญญาณไฟฟ้าลดลง (รูปที่ 1.3)



รูปที่ 1.3 ผลของความเข้มข้น $AgNO_3$ ต่อความไวไวิเคราะห์จากการไฮบริไดซ์ระหว่าง PNA-AQ probe กับ target DNA ที่ความเข้มข้น 1.0×10^{-10} ถึง 1.0×10^{-7} M บนขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วย PANI-Gr-Ag

1.2.2 **ความเข้มข้นของ PNA probe**

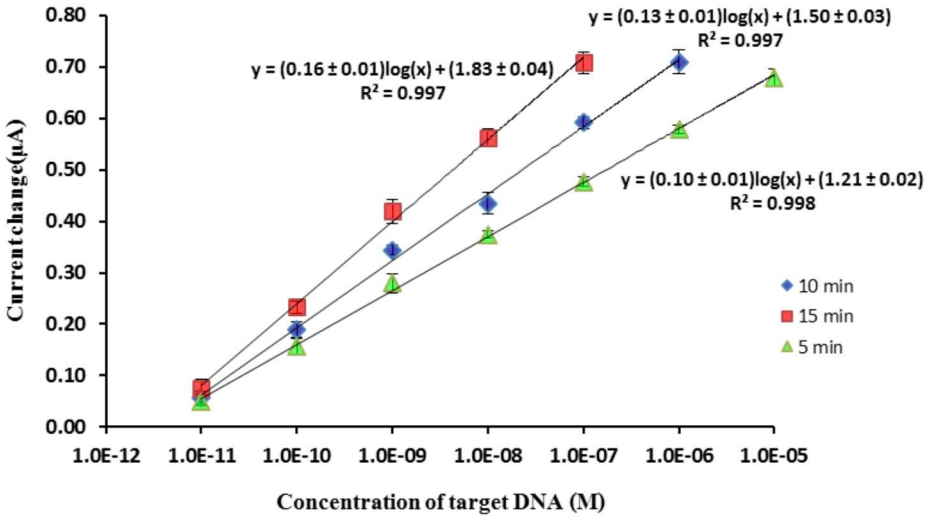
โดยได้ศึกษาความเข้มข้นของ PNA probe ที่ความเข้มข้นดังนี้ 5, 7, 10, 15 ไมโครโมลาร์ ในการตรึงบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าที่ผ่านการปรับปรุงผิวหน้าด้วย PANI-Gr-Ag จากผลการทดลองพบว่าความไววิเคราะห์เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ PNA-AQ เพิ่มจาก 5.0 ถึง 10 ไมโครโมลาร์ เนื่องจาก PNA-AQ ที่เพิ่มขึ้นจะไฮบริไดซ์กับ DNA ได้มากขึ้น ทำให้สัญญาณไฟฟ้าเพิ่มสูงขึ้น แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ probe สูงกว่า 10 ไมโครโมลาร์ สัญญาณจะมีค่าคงที่ (รูปที่ 1.4) นั่นคือความเข้มข้นที่เหมาะสมของ PNA-AQ probe คือ 10 ไมโครโมลาร์



รูปที่ 1.4 ผลของความเข้มข้นของ PNA-AQ probe ต่อความไววิเคราะห์ของการตรวจวัด

1.2.3 **เวลาที่ใช้ในการไฮบริไดซ์ระหว่าง PNA-DNA**

ได้ศึกษาระยะเวลาในการไฮบริดไดเซชันระหว่าง PNA-DNA ที่เวลา 5, 10 และ 15 นาที โดยใช้ขั้วไฟฟ้าที่ผ่านการปรับปรุงผิวหน้าด้วย PANI-Gre-Ag จากผลการทดลองดังรูปที่ 1.5 พบว่าเมื่อใช้เวลาในการไฮบริดไดซ์ที่เวลา 15 นาที จะให้ค่าความไววิเคราะห์สูงที่สุด แต่อย่างไรก็ตามพบว่าที่เวลา 5 10 และ 15 นาที มีค่าขีดจำกัดการตรวจวัดต่ำสุดเท่ากัน คือ 10^{-11} โมลาร์ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้เวลาในการไฮบริไดซ์ 5 นาที เนื่องจากที่เวลานี้มีช่วงความเป็นเส้นตรงที่กว้าง มีค่าขีดจำกัดการตรวจวัดต่ำสุดที่ดี และใช้เวลาในการไฮบริไดซ์ที่สั้น

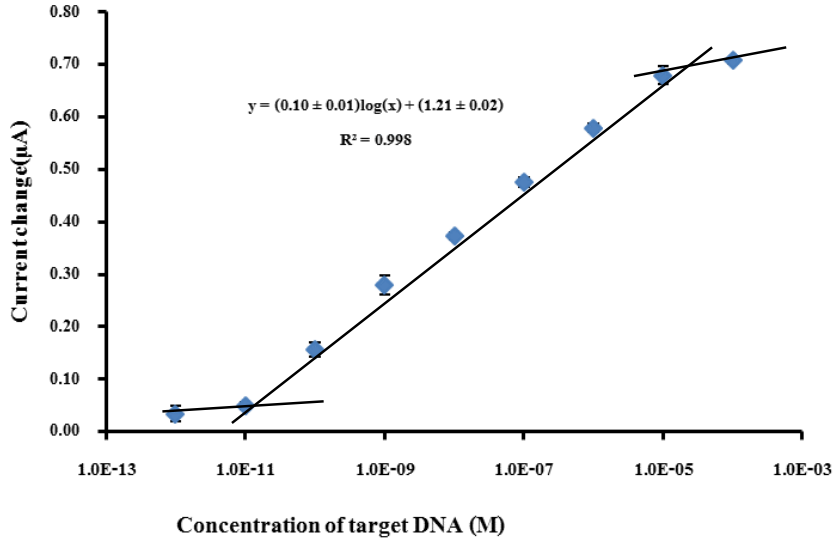


รูปที่ 1.5 ค่าความไววิเคราะห์จากการไฮบริไดซ์ระหว่าง PNA-AQ probe กับ DNA บนขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วย PANI-Gr-Ag โดยเวลาที่ใช้ในการไฮบริดไดเซชันระหว่าง PNA-DNA ที่ระยะเวลา 5 10 และ 15 นาที

1.3 ประสิทธิภาพของเซนเซอร์

1.3.1 ช่วงความเป็นเส้นตรง และ ขีดจำกัดการตรวจวัดต่ำสุด

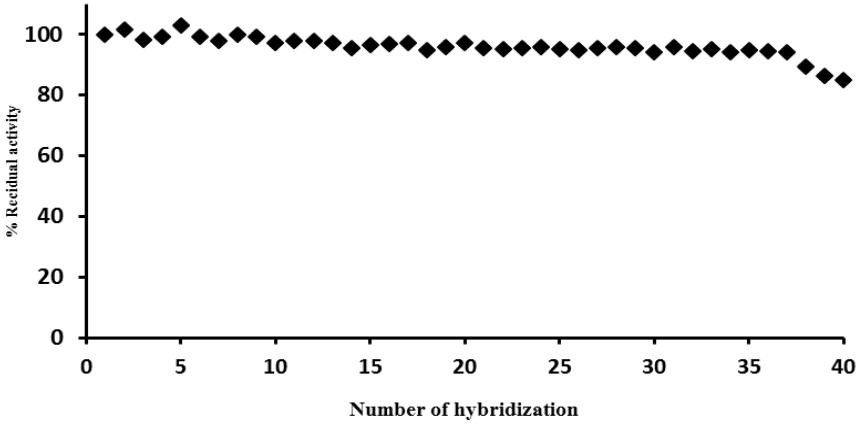
ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมได้ศึกษาประสิทธิภาพของเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นในการวิเคราะห์ DNA ที่ความเข้มข้น 10^{-12} ถึง 10^{-5} โมลาร์ ได้ช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ระหว่าง 10^{-11} - 10^{-5} โมลาร์ ดังรูปที่ 1.6 และให้ค่าขีดจำกัดการตรวจวัดต่ำสุด 10^{-11} โมลาร์



รูปที่ 1.6 สัญญาณการตรวจวัดกับความเข้มข้นของ Target DNA ที่ 10^{-12} ถึง 10^{-5} โมลาร์

1.3.2 เสถียรภาพของขั้วไฟฟ้า

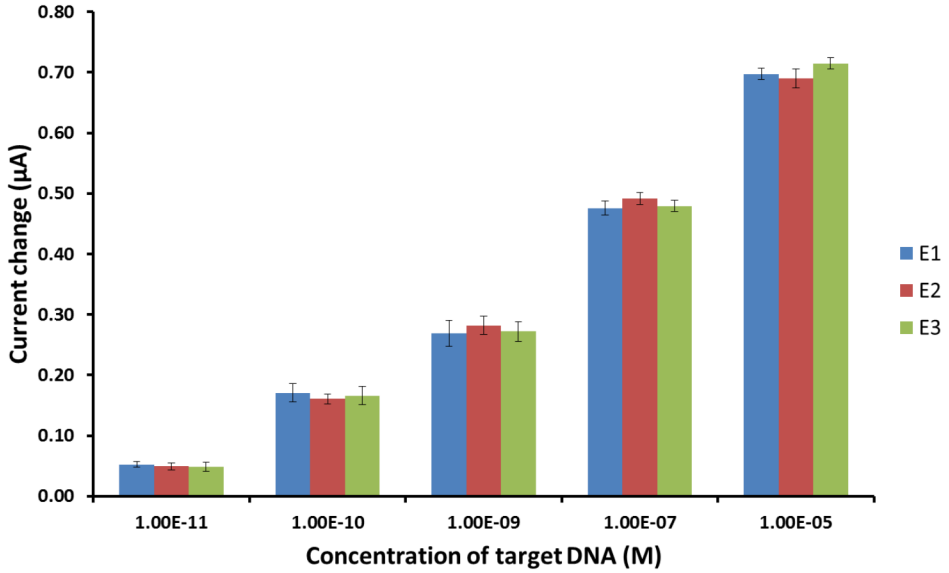
ได้ศึกษาความเสถียรในการใช้งานของขั้วไฟฟ้าสำหรับการตรวจวัด PNA-DNA hybridization ด้วยเทคนิคดิฟเฟอร์เรนเชียสพัลส์โวลแทมเมทรี (differential pulse voltammetry, DPV) จากนั้นจะใช้สารทำลายพันธะระหว่าง PNA probe กับ DNA เพื่อให้ PNA probe ที่ตรึงไว้บนขั้วไฟฟ้าสามารถใช้งานซ้ำได้ แล้วเปรียบเทียบการลดลงของสัญญาณการตอบสนองที่ได้กับการวิเคราะห์ครั้งที่ 1 ขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงนี้สามารถใช้ซ้ำได้ถึง 37 ครั้ง (รูปที่ 1.7) หลังจากนั้นสัญญาณไฟฟ้าจะลดลง ทั้งนี้อาจเกิดจากบางส่วนของชั้นคอมโพสิต PANI-Gr-Ag หลุดไปพร้อมกับโพรบทำให้การนำไฟฟ้าลดลง



รูปที่ 1.7 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณการตรวจวัดและจำนวนของการไฮบริไดซ์ระหว่างโพรบและ target DNA (จำนวนการใช้ซ้ำของขั้วไฟฟ้า)

1.3.3 การทำซ้ำ

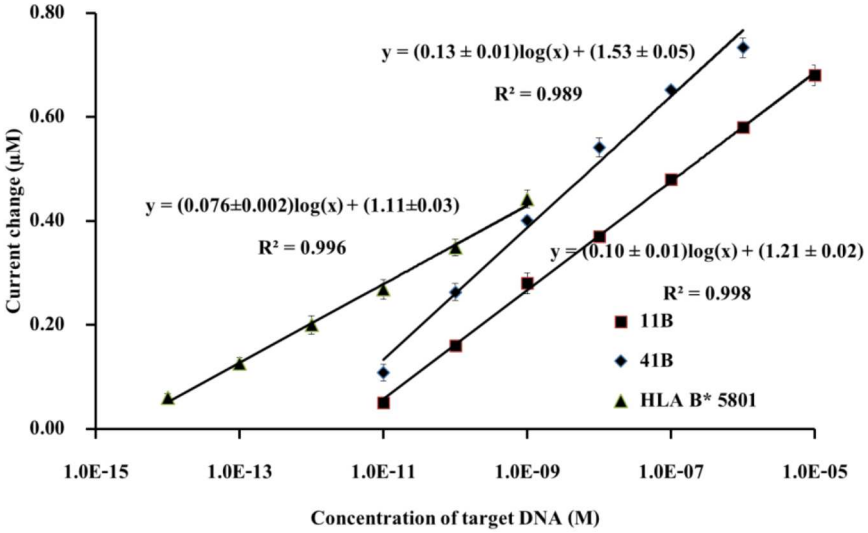
ศึกษาการเตรียมขั้วไฟฟ้าซ้ำที่ต่างกัน จำนวน 3 ขั้วไฟฟ้า และตรวจวัด Target DNA ที่ความเข้มข้น 10^{-11} 10^{-10} 10^{-9} 10^{-7} และ 10^{-5} M จากรูปที่ 1.8 พบว่าค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในแต่ละความเข้มข้น มีค่า 1.7-3.5 % ซึ่งเป็นค่ามาตรฐานที่ยอมรับได้ตาม AOAC (a3.3 %) ซึ่งสรุปได้ว่ามีการทำซ้ำที่ดี



รูปที่ 1.8 ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณการตรวจวัดและความเข้มข้นของ Target DNA ที่ตรวจจากขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วย PANI-Gr-Ag จำนวน 3 ขั้ว

1.3.4 ผลของความยาวสาย DNA

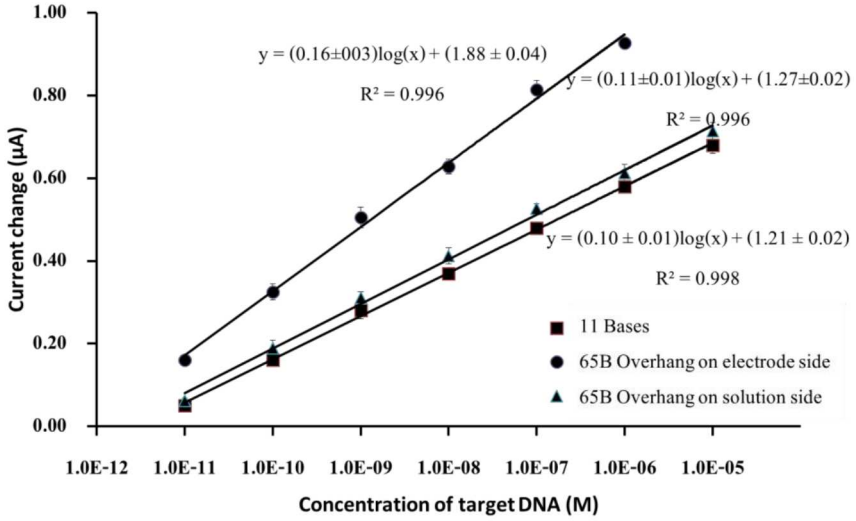
ศึกษาผลของจำนวนเบสในสายของ DNA ที่มีผลต่อการ hybridization โดยใช้ DNA 3 สายที่มีความยาวหรือจำนวนเบสแตกต่างกันคือ ยีน HLA-B*58:01 ซึ่งมีจำนวนเบส 200 เบส, DNA 41 เบส และ 11 เบส พบว่า DNA ที่มีจำนวนเบส 41 เบส จะมีความไวไวเคราะห์ที่สูงกว่า 11 เบส เนื่องมาผลของ overhang เมื่อเกิดการ hybridization ระหว่าง PNA-DNA ทำให้ AQ ที่ติดอยู่ที่ปลาย โพรบเกิดการส่งผ่านอิเล็กตรอนได้ยากขึ้น จึงทำให้การเปลี่ยนแปลงของกระแสไฟฟ้าที่ได้มีค่าที่สูงขึ้น ในส่วนของยีน HLA-B*58:01 จะเห็นได้ว่าให้ค่าขีดจากัดการตรวจวัดต่ำสุด (10^{-14} M) แต่ให้ค่าความไวไวเคราะห์ที่ต่ำลง (ดังรูปที่ 1.9) อาจเนื่องมาจากเหตุผล 2 ประการคือ ยีน HLA-B*58:01 เป็น DNA ที่มีความยาวเบส 200 เบส ซึ่งมีขนาดที่ใหญ่ทำให้ตัวมันเองเกิดความแออัดซึ่งอาจไปลดความสามารถในการเข้าไปจับ PNA บนผิวหน้าขั้วไฟฟ้า และเหตุผลที่สองคือ DNA ซึ่งจะมีประจุลบ เมื่อมีจำนวน overhang ที่ยาวอาจทำให้เกิดการผลักกันเองทำให้ความสามารถในการเข้าไปจับกับ PNA บริเวณผิวหน้าขั้วลดลงเช่นกัน



รูปที่ 1.9 ผลความยาวของสาย target DNA ที่มีจำนวนเบสแตกต่างกัน ต่อสัญญาณการตรวจวัด

1.3.5 ผลของตำแหน่ง overhang ของ target DNA

ศึกษาตำแหน่งของ overhang ที่แตกต่างกันโดยใช้ target DNA ที่มีความยาวเบส 65 เบส จากรูปที่ 1.10 พบว่า target DNA ที่มีตำแหน่งของ overhang อยู่บนหัวอิเล็กโทรดมีความไววิเคราะห์สูงกว่า target DNA ที่มีตำแหน่งของ overhang อยู่ในสารละลาย เนื่องมาจากตำแหน่งของ overhang อยู่บนหัวอิเล็คโทรดทำให้ผิวหน้าของอิเล็กโทรดหนาขึ้นจึงทำให้การส่งผ่านอิเล็กตรอนยากขึ้น



รูปที่ 1.10 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณการตรวจวัดกับความเข้มข้นของ target DNA ตำแหน่งของ overhangs ที่แตกต่างกัน

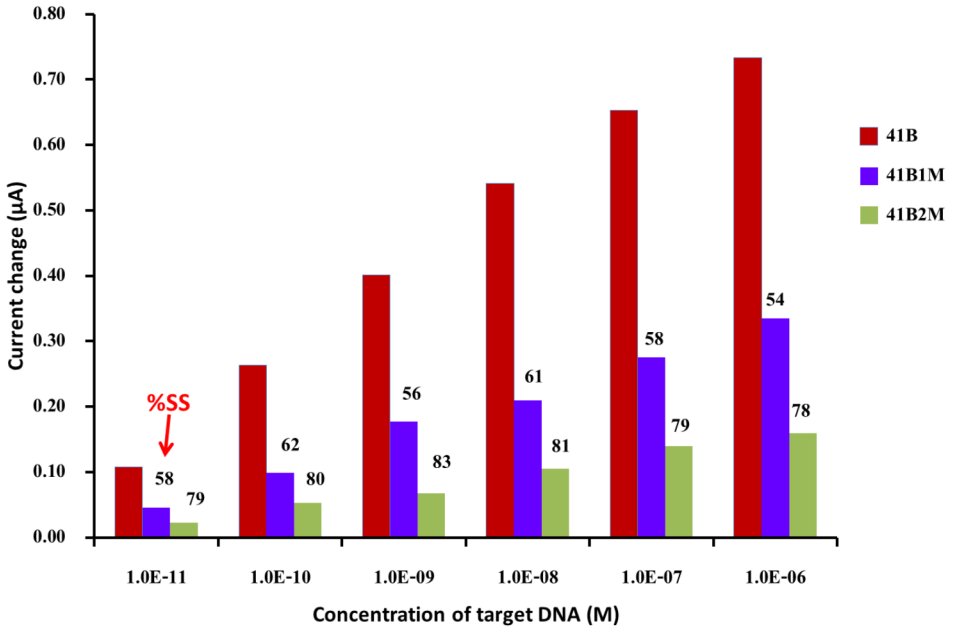
นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบความไววิเคราะห์ของ complementary DNA (11 เบส) กับ target DNA ที่มีตำแหน่งของ overhang อยู่ในสารละลาย พบว่า ความไววิเคราะห์ของ DNA ทั้งสองสายมีค่าที่ใกล้เคียงกัน (รูปที่ 10) แสดงให้เห็นว่า ตำแหน่งของ overhang ซึ่งอยู่ในสารละลายไม่ส่งผลต่อสัญญาณการวิเคราะห์

1.3.6 ความจำเพาะเจาะจง

โดยนำขั้วไฟฟ้าที่ผ่านการปรับปรุงผิวหน้าด้วย PANI-Gr-Ag ตรวจวัด target DNA ที่มีความยาวของเบส 41 เบส ซึ่งเป็น complementary target DNA และ DNA ที่มีเบสแตกต่าง จำนวน 1 เบส (single mismatch) และ 2 เบส (double mismatch) ในช่วงความเข้มข้น 1.0×10^{-11} ถึง 1.0×10^{-6} โมลาร์ แล้วนำค่าผลต่างของกระแสไฟฟ้าที่ได้มาคำนวณเป็นค่า %signal suppression(%SS) ดังสมการที่ 2 โดยถ้า %SS แสดงว่าเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะเจาะจงสูง

$$\%ss = \frac{\Delta C_{complementy\ DNA} - \Delta C_{mismatched\ DNA}}{\Delta C_{complementry\ DNA}} \times 100$$

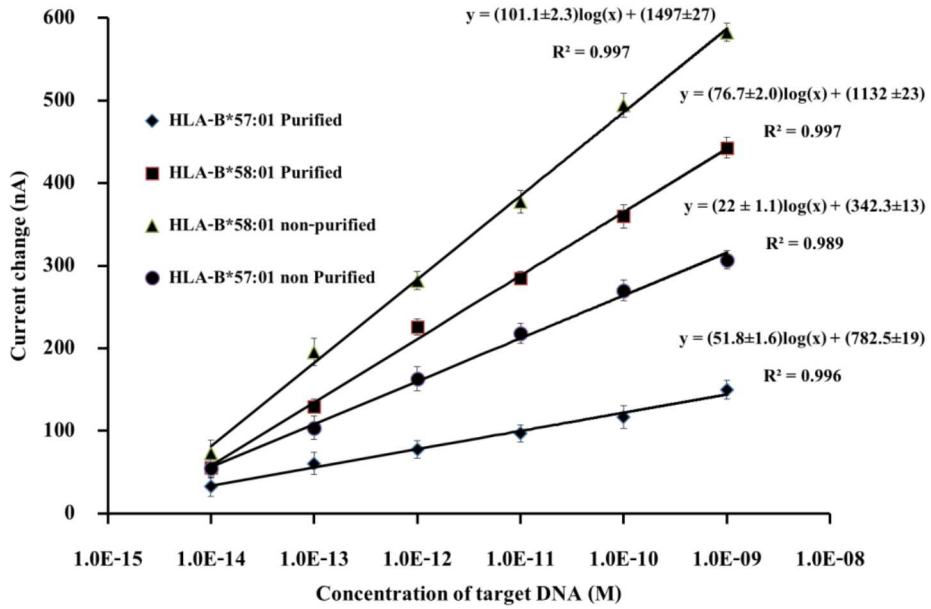
จากรูปที่ 1.11 พบว่า complementary target DNA ให้ค่าความไววิเคราะห์สูงสุด ส่วน %SS ของเบสที่ต่างจำนวน 1 เบส มีค่าเท่ากับ 54-62% และ %SS ของเบสที่แตกต่าง จำนวน 2 เบส มีค่าเท่ากับ 78-83% แสดงให้เห็นว่าเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะเจาะจงต่อ target DNA



รูปที่ 1.11 ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณการตรวจวัดกับความเข้มข้น DNA ที่เป็นcomplementary target DNA และ DNA ที่มีเบสแตกต่างจำนวน 1 เบส และ 2 เบส

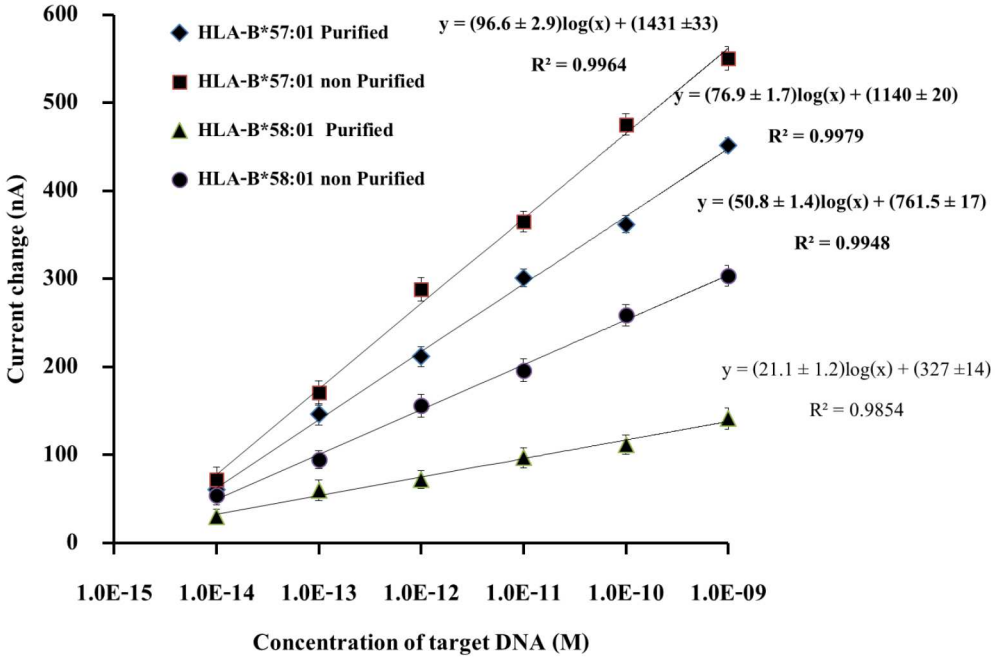
1.3.7. การวิเคราะห์ตัวอย่าง purified และ unpurified PCR ของยีนต์ HLA-B*58:01 และ HLA-B*57:01genes

โดยนำขั้วไฟฟ้าที่ผ่านการปรับปรุงด้วย PANI-Gr-Ag ที่มีการตรึงโพรบที่แตกต่างกัน 2 ชนิด คือ โพรบ P1 ซึ่งจำเพาะกับยีน HLA-B*58:01 และ โพรบ P2 ซึ่งจำเพาะกับยีน HLA-B*57:01 ยีนทั้งสองชนิดนี้มีจำนวนเบสเท่ากัน แต่มีเบสแตกต่างกันจำนวน 2 เบส โดยนำทั้งสองขั้วไฟฟ้าไปวิเคราะห์ตัวอย่าง purified และ unpurified PCR ของยีน HLA-B*58:01 และ HLA-B*57:01 ที่ทราบความเข้มข้น ซึ่งในกรณีของการใช้ขั้วไฟฟ้าที่ตรึงด้วยโพรบ P1 (รูปที่ 1.12) พบว่า ค่าความไววิเคราะห์ของ purified PCR HLA-B*58:01 มีค่าต่ำกว่า unpurified PCR HLA-B*58:01 เนื่องจากในตัวอย่าง unpurified PCR มีองค์ประกอบของสารอื่นที่เหลือมาจากขั้นตอนการ PCR ซึ่งอาจไปเกาะอยู่บนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าทำให้ AQ ที่ติดอยู่ที่ปลายโพรบเกิดการส่งผ่านอิเล็กตรอนได้ยากขึ้นจึงทำให้สัญญาณการตรวจวัดลดลง และเมื่อพิจารณาการตรวจวัดในตัวอย่าง purified PCR ของยีน HLA-B*57:01 พบว่าให้ค่าความไววิเคราะห์ที่ต่ำสุด เนื่องมาจากยีน HLA-B*57:01 มีลำดับเบสที่ต่าง 2 ตำแหน่งจึงทำให้ความสามารถในการเกิด hybrization ลดลง ส่วน unpurified PCR ของยีน HLA-B*57:01 ให้ค่าความไววิเคราะห์ที่สูงกว่า purified PCR ของยีนต์ HLA-B*57:01 ซึ่งเหตุผลเช่นเดียวกับกรณีของ unpurified PCR ในยีนต์ HLA-B*58:01



รูปที่ 1.12 สัญญาณการตรวจวัดกับความเข้มข้นของเซนเซอร์ที่พัฒนา ขึ้นในการวิเคราะห์ตัวอย่าง purified และ unpurified PCR ของยีน HLA-B*58:01 และ ยีน HLA-B*57:01 โดย probe P1

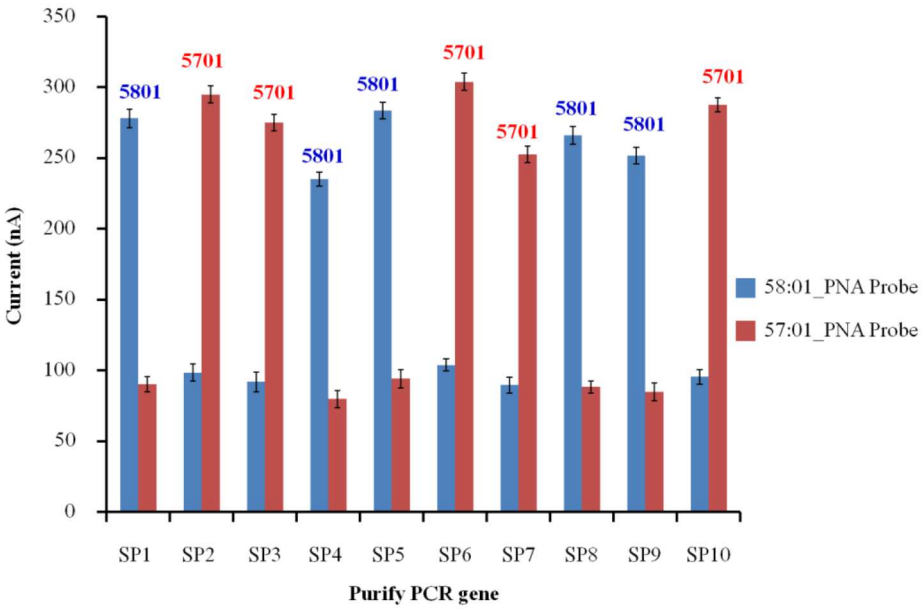
สำหรับกรณีของการใช้ขั้วไฟฟ้าที่ตรึงด้วยโพรบ P2 ซึ่งมีความจำเพาะต่อยีน HLA-B*57:01 มากกว่า HLA-B*58: 01 จากรูปที่ 1.13 จะเห็นได้ว่าค่าความไววิเคราะห์ที่ได้จากการค่าความไววิเคราะห์ของ purified PCR HLA-B*57:01 มีค่าต่ำกว่า unpurified PCR HLA-B*57:01 และ purified PCR ของยีน HLA-B*58:01 พบว่าให้ค่าความไววิเคราะห์ที่ต่ำสุด ซึ่งสามารถอธิบายได้เช่นเดียวกับการใช้โพรบ P1



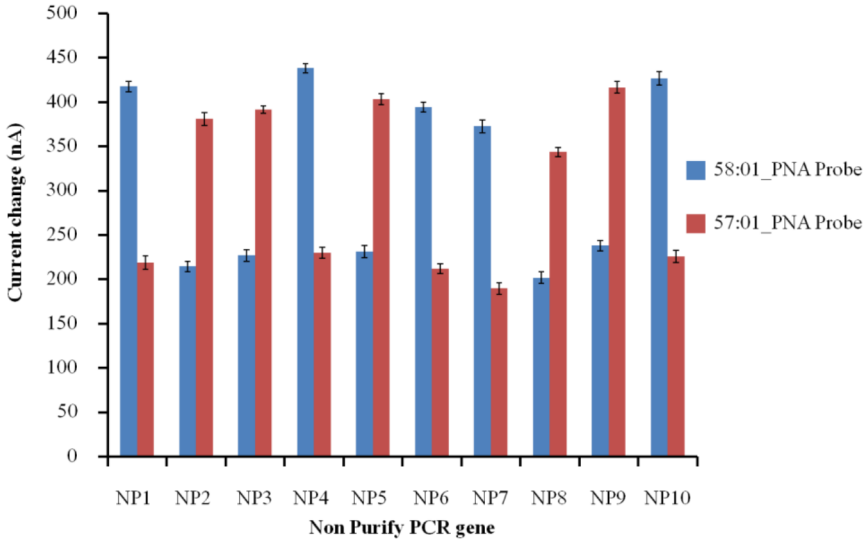
รูปที่ 1.13 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณการตรวจวัดกับความเข้มข้นของเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นในการวิเคราะห์ตัวอย่าง purified และ unpurified PCR ของยีน HLA-B*58:01 และ
ยีน HLA B*57:01genes โดย probe P2

1.4 การวิเคราะห์ตัวอย่างจริง

นำขั้วไฟฟ้าที่ผ่านการปรับปรุงด้วย PANI-Gr-Ag ที่มีการตรึงโพรบ P1 และ P2 ตรวจวัด DNA ในตัวอย่างจริง ที่ผ่านการ purified และ unpurified PCR ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าโพรบ P1 จะให้สัญญาณการตรวจวัดต่อ ยีน HLA-B*58:01 สูงกว่า ยีน HLA-B*57:01 ประมาณ 3 เท่า ในตัวอย่าง purified PCR และ 2 เท่า ในตัวอย่าง unpurified PCR (ดังรูปที่ 1.14 และ 1.15) ส่วนกรณีการใช้โพรบ P2 ให้ผลการทดลองที่คล้ายกัน คือจะให้สัญญาณการตอบสนอง ต่อยีน HLA-B*57:01 สูงกว่า ยีน HLA-B*58:01 ประมาณ 3 เท่า ในตัวอย่าง purified PCR และ 2 เท่า ในตัวอย่าง unpurified PCR จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นสามารถแยกสัญญาณการตอบสนองของยีนทั้งสองชนิดชนิดได้



รูปที่ 1.14 สัญญาณการตรวจวัดในตัวอย่าง purified PCR ด้วยเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น โดยใช้ probe P1 และ P2



รูปที่ 1.15 สัญญาณการตรวจวัดในตัวอย่าง unpurified PCR ด้วยเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้น โดยใช้ probe P1 และ P2

แผนงานของโครงการที่จะศึกษาต่อไปในอนาคต

เขียนบทความตีพิมพ์

โครงการย่อยที่ 2: การพัฒนาเซนเซอร์เพื่อการตรวจวัดดีเอ็นเอโดยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้าโดยอาศัยพีเอ็นเอโพรบโดยอาศัยวิธียึดเกาะทางไฟฟ้า (electrodeposition) ของอนุภาคนาโนเงินที่มีลักษณะโครงสร้างนาโนโนโฟมร่วมกับพอลิเมอร์นำไฟฟ้า

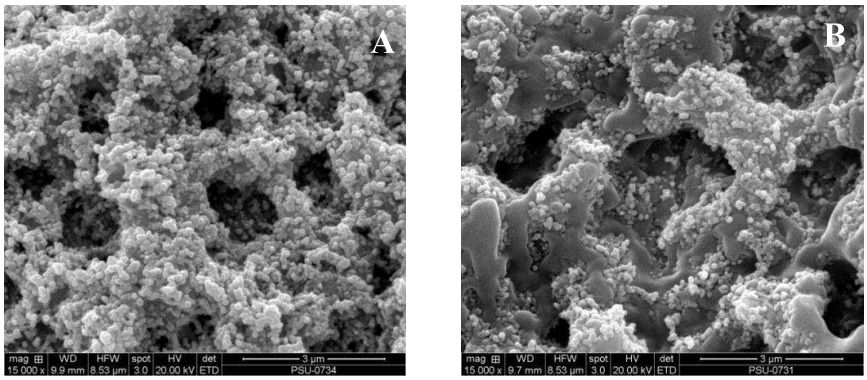
งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาดีเอ็นเอไบโอเซนเซอร์ (DNA biosensor) แบบไม่ติดฉลากโดยอาศัยวิธียึดเกาะทางไฟฟ้า (electrodeposition) ของอนุภาคนาโนเงินที่มีลักษณะโครงสร้างเป็นนาโนโฟม (silver nanofoam, AgNF) ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวเพิ่มพื้นที่ผิว เป็นตัวเพิ่มสัญญาณ และทำหน้าที่เป็น redox probe ไปด้วยในขณะเดียวกัน ร่วมด้วยการใช้การพอลิไพโรล (polypyrrole, PPy) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์นำไฟฟ้า (conducting polymer) ที่มีหมู่เอมีน เพื่อเพิ่มปริมาณ active site ของ PNA probe ซึ่งนำไปสู่การเพิ่มปริมาณของการ hybridization ของ complementary PNA-DNA ต่อไป โดยการตรวจวัดสัญญาณจะตรวจวัดผ่านสัญญาณที่ลดลงของ redox probe (silver nanofoam) ก่อนและหลังการเกิด PNA-DNA hybridization

เนื่องด้วยงานวิจัยนี้สนใจที่จะนำเซนเซอร์ที่พัฒนามาประยุกต์ใช้ตรวจวัดไมโครอาร์เอ็นเอ (miRNA) ซึ่งเป็นอาร์เอ็นเอขนาดเล็กที่ถูกถอดรหัสจากจีโนมในบริเวณที่ไม่กำหนดการสร้างโปรตีน มีขนาดประมาณ 18-25 นิวคลิโอไทด์ มีบทบาทควบคุมการทำงานของเซลล์โดยควบคุมการแสดงออกของยีน หลายงานวิจัยแสดงให้เห็นว่า miRNA มีส่วนร่วมในการควบคุมกระบวนการก่อมะเร็งในการบ่งชี้ระดับความรุนแรง การแพร่กระจาย การพยากรณ์โรค และการตอบสนองต่อการรักษาโรคมะเร็ง ดังนั้นสามารถใช้ miRNA เป็นตัวบ่งชี้ชีวภาพ (biomarker) ได้ (Wen et al., 2013; Yin et al., 2012; Kumarswamy et al., 2011) miRNA มีหลายชนิด แต่ในงานวิจัยนี้สนใจศึกษาที่จะตรวจวัด miRNA-21 เนื่องจากปริมาณของ miRNA-21 สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ชีวภาพในมะเร็งหลายชนิด โดย miRNA-21 มีจำนวนเบสทั้งหมด 22 เบส โดยงานวิจัยที่ได้ดำเนินการ ประกอบด้วย

2.1 **การเตรียมขั้ว PPy/AgNF/Au และการทดสอบคุณลักษณะ**

ปรับปรุงผิวขั้วไฟฟ้าทองด้วยชั้นของ AgNF (electrodeposition) ด้วยเทคนิค chronopotentiometry โดยให้กระแสไฟฟ้าคงที่ ที่ -0.010 A เป็นเวลา 20 วินาที จากนั้นปรับปรุงด้วยชั้น polypyrrole ด้วยเทคนิค ไซคลิกโวลแทมเมทรี ที่ช่วงศักย์ไฟฟ้า 0.4-0.9 โวลต์ จำนวน 3 รอบ

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่าพื้นผิวของขั้วไฟฟ้า AgNF/Au มีลักษณะเป็นรูพรุนคล้ายโฟมปกคลุมทั่วบริเวณผิวขั้วไฟฟ้าทอง (รูปที่ 2.1 A) กรณีขั้ว PPy/AgNF/Au จะสังเกตเห็นการเกิดเป็นฟิล์มพอลิมเมอร์ของ PPy เข้าไปปกคลุมชั้นของ AgNF (รูปที่ 2.1B)

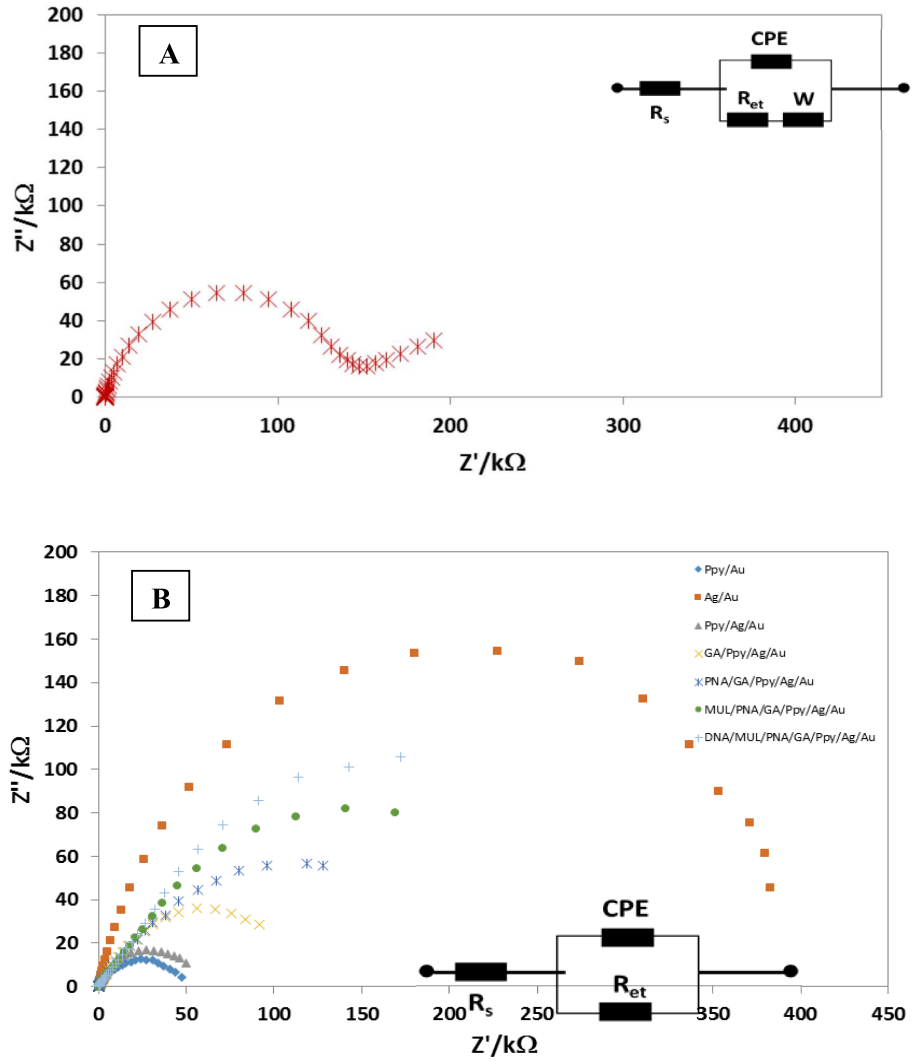


รูปที่ 2.1 ภาพ SEM จากการปรับปรุงขั้วไฟฟ้าด้วย (A) AgNF/Au และ (B) PPy/AgNF/Au

ได้ศึกษาพฤติกรรมทางไฟฟ้าของขั้วไฟฟ้าในขั้นตอนของปรับปรุงผิวหน้าด้วยวัสดุทางเคมีและขั้นตอนการตรึง PNA probe ขั้วที่ถูกปรับปรุงในแต่ละขั้นถูกนำมาตรวจวัดด้วยเทคนิคอิเล็กโตรเคมิคัลอิมพีแดนซ์ สเปคโตรสโคปี (Electrochemical Impedance Spectroscopy,EIS) ในสารละลาย 0.3 M phosphate buffer (pH 7) โดยใช้ความถี่ของศักย์ไฟฟ้าในช่วง 10 kHz-1 mHz โดยขั้วที่ทำการศึกษาได้แก่

1. Bare Au electrode
2. AgNF/Au electrode
3. PPy/Au electrode
4. PPy/AgNF/Au electrode
5. GA/PPy/AgNF/Au electrode *GA คือ glutaraldehyde เป็นตัว cross-linker
6. PNA/GA/PPy/AgNF/Au electrode
7. MUL/PNA/GA/PPy/AgNF/Au electrode *MUL คือ 11-mercapto-1-undecanol เป็นตัว blocking
8. DNA/MUL/PNA/GA/PPy/AgNF/Au electrode

จากการทดลอง ลักษณะของ impedance spectra ของขั้วไฟฟ้าในแต่ละขั้นตอนของการปรับปรุง แสดงดังรูปที่ 2.2

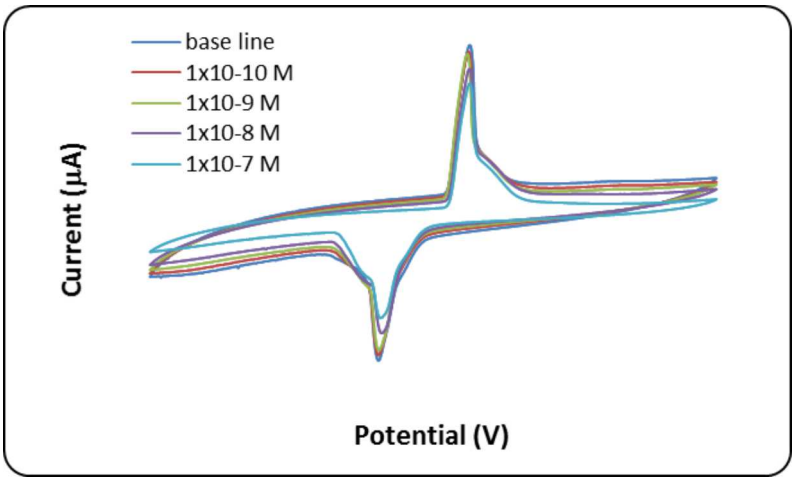


รูปที่ 2.2 แสดงลักษณะ impedance spectra และวงจรที่เป็นไปได้ของ (A) Bare Au electrode (B) PPy/Au electrode, AgNF/Au electrode, PPy/AgNF/Au electrode, GA/PPy/AgNF/Au electrode, PNA/GA/PPy/AgNF/Au electrode, MUL/PNA/GA/PPy/AgNF/Au electrode และ DNA/MUL/PNA/GA/PPy/AgNF/Au electrode

จากรูปที่ 2.2A ขั้ว bare Au ให้ค่าความต้านทานของการส่งผ่านอิเล็กตรอน (electron transfer resistance (R_{et}) 136.7 kΩ และจากรูปที่ 2.2B หลังจาก electrodeposite silver nanofoam ลงบนขั้วทอง (AgNF/Au electrode) ขั้วดังกล่าวให้ค่า R_{et} เพิ่มขึ้น(R_{et} = 0.401 MΩ) ซึ่งเป็นผลมาจากการที่พื้นผิวขั้วมีลักษณะเป็นรูพรุนของอนุภาคนาโนเงินซึ่งรูพรุนที่มีขนาดเล็ก จะส่งผลให้ electrical double layer ที่เกิดขึ้นภายในรูพรุนอยู่ใกล้กัน ทำให้ไอออนของอิเล็กโทรไลต์เคลื่อนที่ภายในขั้วได้ยาก ส่งผลให้

ความต้านทานของระบบเพิ่มขึ้น แต่เมื่อปรับปรุงขั้วดังกล่าวด้วย polypyrrole ซึ่งเป็น conducting polymer (PPy/AgNF/Au electrode) ค่า R_{et} ลดลง (R_{et} = 57.0 kΩ) เนื่องจาก PPy ที่ไปเคลือบบนผิวเพิ่มการนำไฟฟ้า ในขณะที่ R_{et} เพิ่มขึ้น (R_{et} = 115.6 kΩ) เมื่อขั้วถูกปรับปรุงด้วยกลูตารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde, GA) (GA/PPy/AgNF/Au electrode) ในขั้นถัดไป เนื่องมาจากการมีสมบัติเป็นฉนวนของ GA และเมื่อ PNA probe ถูกตรึงไว้บนผิวหน้าขั้วโดยสารเชื่อมไขว้ที่เป็น GA ซึ่งเป็นการเพิ่มความเป็นฉนวนให้กับขั้วส่งผลให้ค่า R_{et} เพิ่มขึ้น (Ret = 163.1 kΩ) และเมื่อ block ด้วย 11-MUL ค่า R_{et} เพิ่มขึ้นเช่นกัน (R_{et} = 0.332 MΩ) ซึ่งเป็นผลของสมบัติความเป็นฉนวนของ 11-MUL และหลังจากการ hybridization กับ target DNA ขั้วไฟฟ้าให้ค่า R_{et} เพิ่มขึ้นอีก (R_{et} = 0.466 MΩ) ผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการปรับปรุงขั้วในแต่ละขั้นเป็นไปตามจุดประสงค์ของการปรับปรุง

ได้ทดสอบเบื้องต้นการตรวจวัดสัญญาณจากการเกิด hybridization ระหว่าง probe และ target DNA ด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมมีทรี (cyclic voltammetry) พิจารณาจากการลดลงของค่ากระแสไฟฟ้าในปฏิกิริยา redox ของ silver อันเนื่องมาจากสมบัติความเป็นฉนวนที่เพิ่มขึ้น พบว่าการลดลงของค่ากระแสไฟฟ้าเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ target DNA ดังรูปที่ 2.3



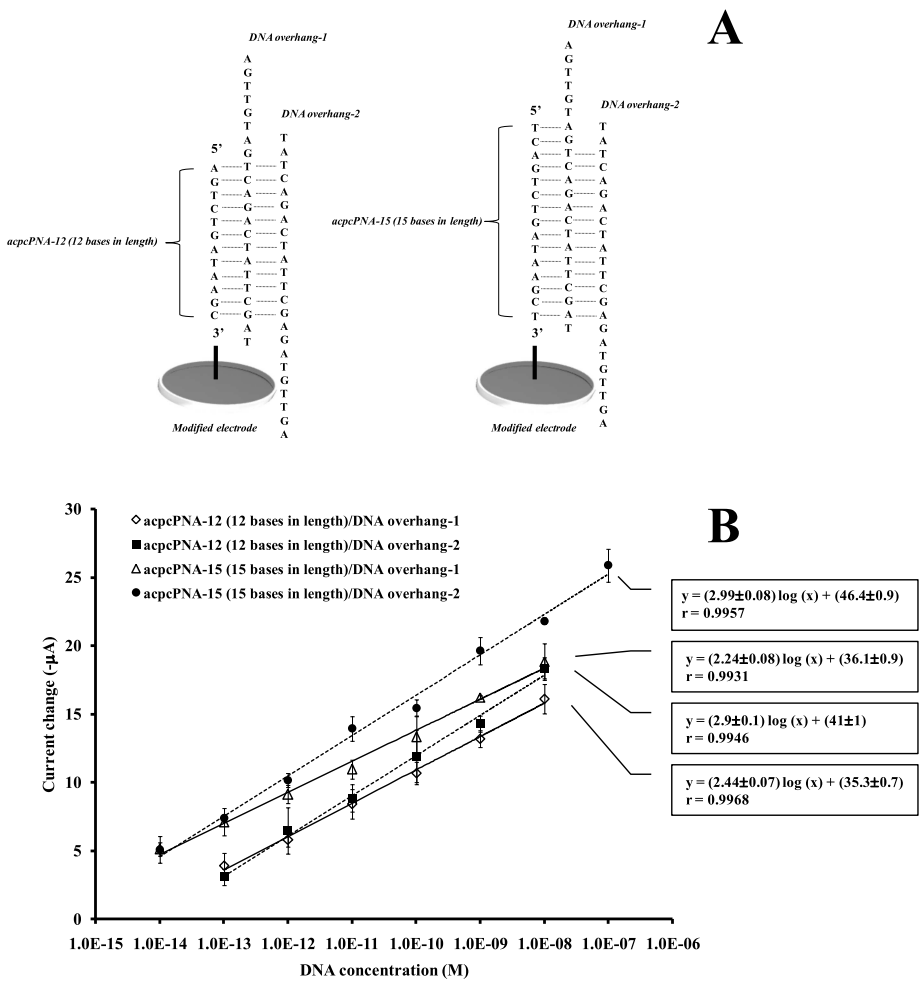
รูปที่ 2.3 สัญญาณการตรวจวัดที่ได้เมื่อความเข้มข้นของ target DNA ที่แตกต่างกัน ($1x10^{-10}$-$1x10^{-7}$ M)

2.2. การศึกษาผลความยาวของ acpcPNA probe และผลของ overhang

ศึกษาผลของความยาว probe ที่มีต่อการตรวจวัด target นั้น acpcPNA probe ที่มีความยาว 12 bases (acpcPNA-12) และ acpcPNA probe ที่มีความยาว 15 bases (acpcPNA-15) ซึ่งนำมาใช้ในการตรวจวัด target DNA (ทดสอบเบื้องต้น) ซึ่ง DNA ที่ใช้นี้มีจำนวนและลำดับเบสเหมือนกับ target miRNA-21 (ใช้เบส T แทนเบส U) ลักษณะการเข้าคู่กันระหว่าง PNA กับ target DNA ที่คาดว่าจะเป็นแสดงดังรูปที่ 2.4 A

จากการทดลองพบว่าการใช้ acpcPNA-12 และ acpcPNA-15 ในการตรวจวัด DNA-overhang 1 (DNA ที่มีตำแหน่งเบสคู่สมและส่วนของ overhang เหมือนกับ miRNA-21) ให้ช่วงความเป็นเส้นตรง 2 ช่วงคือ 1.0×10^{-13}-5.0×10^{-8} M และ 5.0×10^{-8} -1.0×10^{-5} M (สำหรับการใช้ acpcPNA-12) และ ให้ 1.0×10^{-14}-1.0×10^{-7} M และ 1.0×10^{-7} -1.0×10^{-5} M (สำหรับการใช้ acpcPNA-15) พฤติกรรมดังกล่าวอาจเนื่องมาจากในกรณีช่วงความเข้มข้นของ DNA ต่ำ การจับกันระหว่าง PNA probe กับ DNA บนผิวหน้าขั้วมีปริมาณน้อยมากส่งผลให้ค่า ΔI เพิ่มขึ้นทีละน้อย แต่เมื่อความเข้มข้นของ DNA เพิ่มสูงขึ้นที่ระดับความเข้มข้นช่วงหนึ่ง จะส่งผลให้เกิดเบสคู่สมมากขึ้น เบสคู่สมที่เกิดขึ้นนี้จะทำให้เกิดการยืดตัว (rigid) ของเกลียวสายคู่มากขึ้น ส่งผลให้ DNA สามารถเข้าไปจับกับ PNA probe ได้ง่ายและมากขึ้น ซึ่งนำมาสู่การเปลี่ยนแปลงของค่า ΔI ที่มากขึ้นดังผลที่ได้ข้างต้น (Li et al., 2014) อย่างไรก็ตามเพื่อให้สอดคล้องกับปริมาณของ miRNA-21 ในตัวอย่างพลาสม่าหรือซีรัมที่พบในช่วงประมาณ fM ถึง nM (Komatsu *et al*., 2010; Tsujiura *et al*., 2010) ดังนั้น ช่วงความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นต่ำจะถูกนำมาใช้พิจารณาในการศึกษาพารามิเตอร์อื่น และจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าจำนวนเบสที่มากกว่าของ probe ส่งผลต่อสัญญาณการตรวจวัดที่สูงขึ้น และให้ช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวัดกว้างกว่า ดังนั้น acpcPNA-15 จึงถูกเลือกใช้ในการศึกษาในพารามิเตอร์อื่นต่อไป

นอกจากนี้เนื่องจาก target มีความยาวมากกว่า PNA probe ที่ใช้ในการตรวจวัดส่งผลให้มีส่วนของ overhang (รูปที่ 2.4A) ดังนั้น ได้มีการศึกษาผลของ target overhang ด้วย จากผลการทดลองดังรูปที่ 2.4B พบว่าทั้งการใช้ acpcPNA-12 และ acpcPNA-15 ในการตรวจวัด DNA-overhang 2 ซึ่งมีส่วน overhang ที่ยาวอยู่บนผิวหน้าขั้วให้สัญญาณการตรวจวัดที่สูงกว่าการตรวจวัด DNA-overhang 1 ซึ่งมีส่วน overhang ที่ยาวอยู่ในสารละลาย อาจเนื่องจากเมื่อเกิด hybridization ทำให้ความเป็นฉนวนที่บริเวณผิวหน้าขั้วมากกว่า ส่งผลให้ค่าการเปลี่ยนของกระแสหลังการตรวจวัดเห็นความแตกต่างมากกว่า



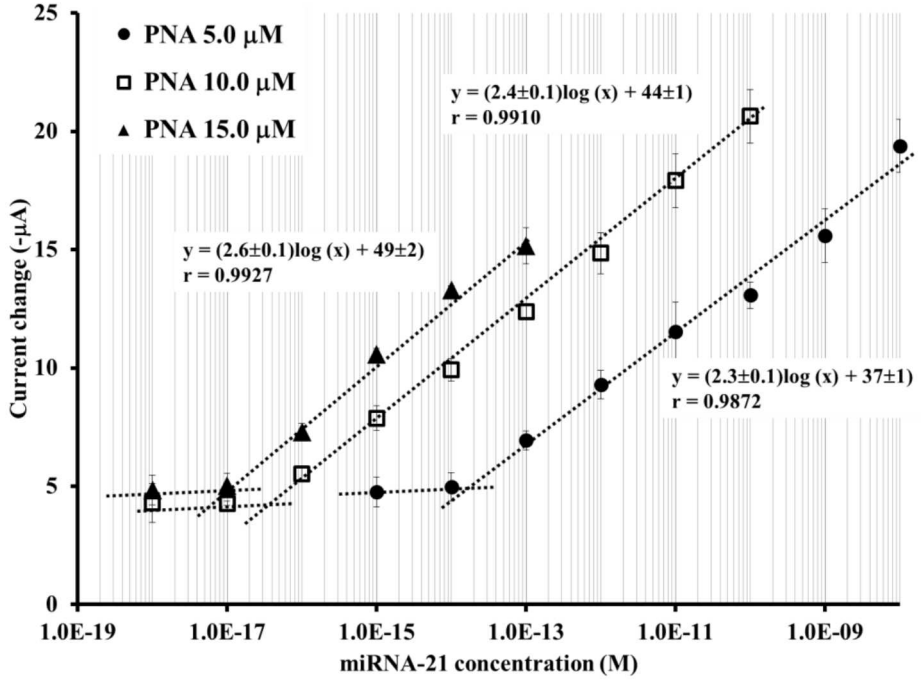
รูปที่ 2.4 (A) แบบจำลองการเข้าคู่กันระหว่าง acpcPNA-12 และ acpcPNA-15 กับ DNA-overhang 1 และ DNA-overhang 2 (B) กราฟมาตรฐานที่ได้จากการตรวจวัด DNA-overhang 1 และ DNA-overhang 2 ด้วยขั้วที่ปรับปรุงด้วย acpcPNA-12 และ acpcPNA-15 probe

2.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสม

2.3.1 ความเข้มข้นของ acpcPNA probe

ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ PNA probe ในการใช้ตรวจวัด target miRNA-21 นั้น acpcPNA-15 ความเข้มข้น 5.0, 10.0 และ 15.0 μM ถูกนำมาปรับปรุงขั้ว PPy/AgNF/Au จากนั้นนำมาใช้ในการตรวจวัด miRNA-21 ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน จากการทดลอง (รูปที่ 2.5) พบว่าทั้งความไววิเคราะห์ (ความชันกราฟ) และค่า LOD มีค่าที่ดีขึ้นเมื่อใช้ความเข้มข้น probe ที่สูงขึ้น อย่างไรก็ตาม ที่ความเข้มข้น 15.0 μM acpcPNA-15 probe ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดให้ช่วงความเป็นเส้นตรงที่สั้น เนื่องจากปริมาณ probe ที่มากเกินไปส่งผลให้สัญญาณแรก (original signal) มีค่าต่ำ ทำให้ช่วงการ

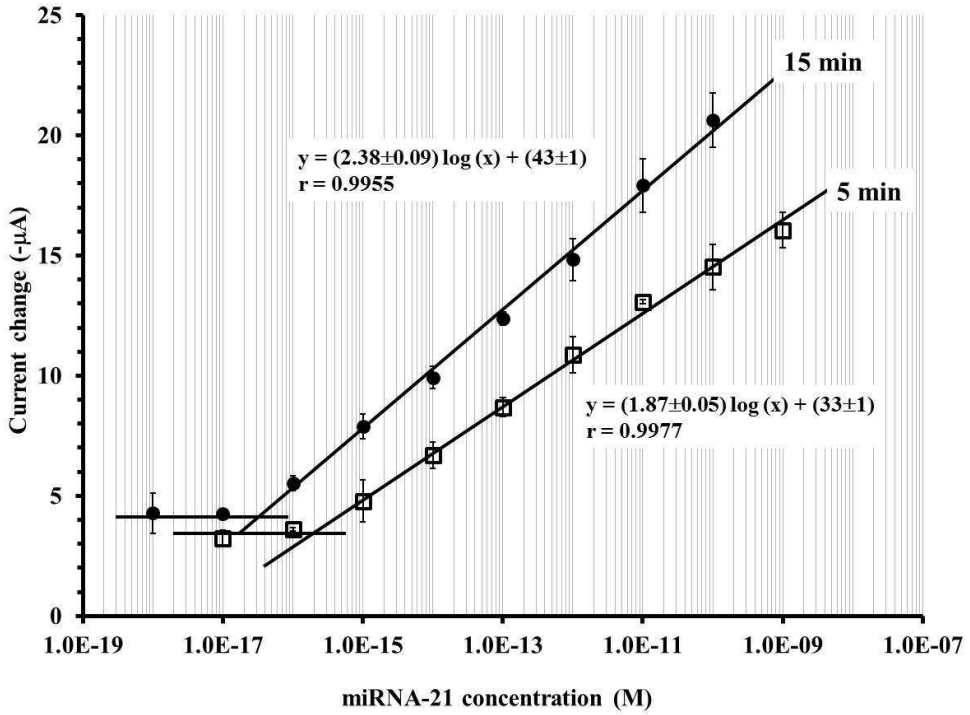
ตรวจวัดระหว่างสัญญาณเริ่มต้นกับสัญญาณสูงสุดที่จะตรวจวัดได้เมื่อมี target (saturated condition) แคบลง ดังนั้น เพื่อให้ได้ค่า LOD ที่ต่ำร่วมกับการมีช่วงความเป็นเส้นตรงที่กว้าง 10.0 μM acpcPNA-15 probe จึงถูกเลือกนำมาใช้ในการศึกษาต่อไป



รูปที่ 2.5 ผลของความเข้มข้นของ acpcPNA-15 probe ที่ความเข้มข้น 5.0, 10.0 และ 15.0 μM ต่อสัญญาณการตรวจวัด miRNA-21

2.3.2 เวลาที่ใช้ในการไฮบริไดซ์ระหว่าง PNA-DNA

ได้ศึกษาระยะเวลาในการไฮบริดไดเซชันระหว่าง PNA-DNA ที่เวลา 5 และ 15 นาที จากผลการทดลองดังรูปที่ 2.6 พบว่า ที่เวลา 5 นาที เซนเซอร์ให้ค่า LOD เพิ่มขึ้นเล็กน้อยจาก 0.030 fM เป็น 0.20 fM อย่างไรก็ตาม LOD ดังกล่าวก็ยังเพียงพอต่อการตรวจวัด miRNA-21 ที่อาจพบในตัวอย่างพลาสม่าหรือซีรัมในช่วงประมาณ fM ถึง nM (Komatsu *et al*., 2010; Tsujiura *et al*., 2010) ดังนั้น เวลา 5 นาทีในการเกิด hybridization จึงถูกนำมาใช้ในการตรวจวัด miRNA-21 ด้วยขั้วที่พัฒนานี้



รูปที่ 2.6 ผลของเวลาในการเกิด hybridization ที่ 5 และ 15 นาที ต่อสัญญาณการตรวจวัด miRNA-21

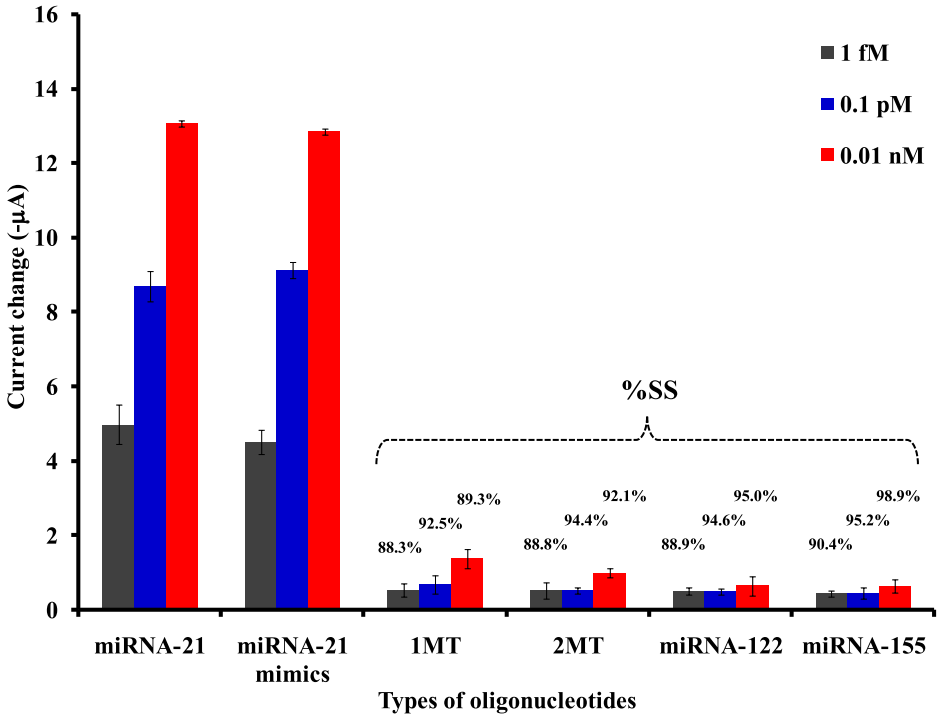
2.4 ประสิทธิภาพของเซนเซอร์

2.4.1 ช่วงความเป็นเส้นตรง และ ขีดจำกัดการตรวจวัดต่ำสุด

ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (ด้วยเวลาในการเกิด hybridization 5 นาที) เซนเซอร์ที่พัฒนาให้ช่วงความเป็นตรงอยู่ในช่วง $2.0x10^{-16}$ (0.20 fM) ถึง $1.0x10^{-9}$ M (1.0 nM) ด้วยค่า LOD เท่ากับ $2.0x10^{-16}$ (0.20 fM) (ดังรูปที่ 2.6)

2.4.2 ความจำเพาะเจาะจง

ศึกษาความจำเพาะเจาะ (specificity) โดยนำเซนเซอร์ที่พัฒนาไปใช้ตรวจวัด oligonucleotide interferences ประกอบไปด้วย single mismatch target (1 MT) double mismatch (2MT) miRNA-122 และ miRNA-155 ซึ่งในการศึกษากรณีดังกล่าวใช้ DNA สังเคราะห์ (miRNA-21 mimics) โดยที่ส่วนของ backbone เหมือน DNA แต่เปลี่ยนเบส A เป็นเบส U จากการทดลอง (รูปที่ 2.7) พบว่าเซนเซอร์ที่พัฒนามีความสามารถในการแยกแยะความแตกต่างระหว่าง target miRNA-21 และ oligonucleotide interferences ได้ดี โดยสามารถพิจารณาได้จากค่า %SS ที่สูงหลังจากการตรวจวัด

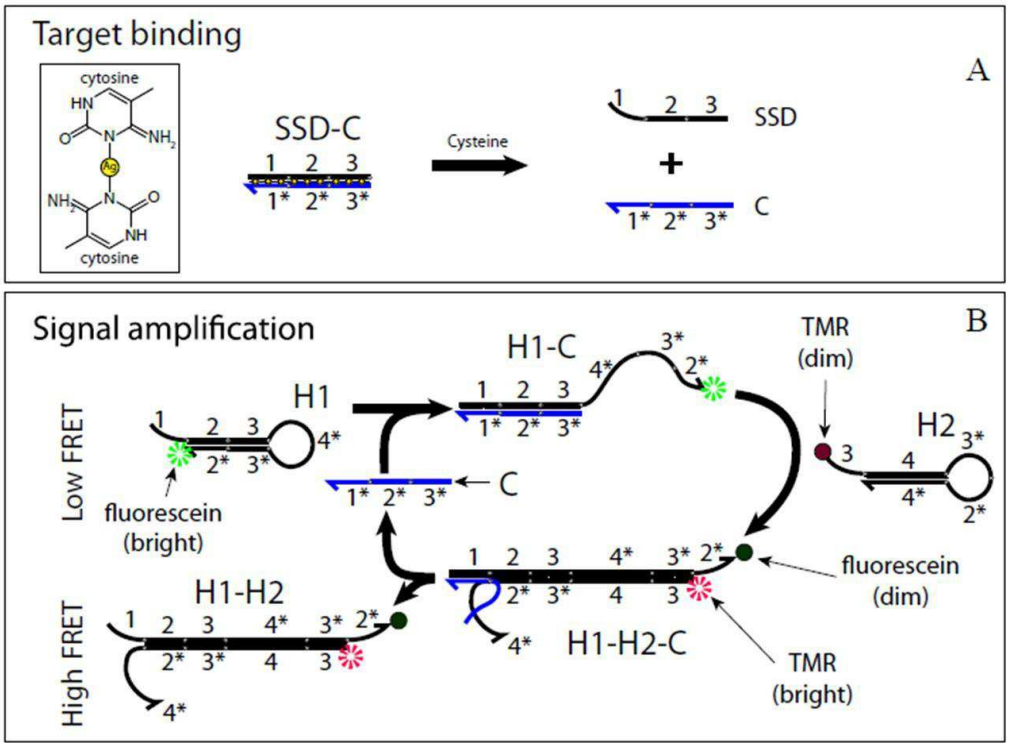


รูปที่ 2.7 สัญญาณการตอบสนองจากการตรวจวัด miRNA-21 miRNA-21 mimics และ oligonucleotide interferences (single mismatch target (1 MT) double mismatchtarget (2MT) miRNA-122 และ miRNA-155) ความเข้มข้น 1 fM 0.1 pM และ 0.01 nM ด้วยขั้วที่ปรับปรุงด้วย acpcPNA-15 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

แผนงานของโครงการที่จะศึกษาต่อไปในอนาคต

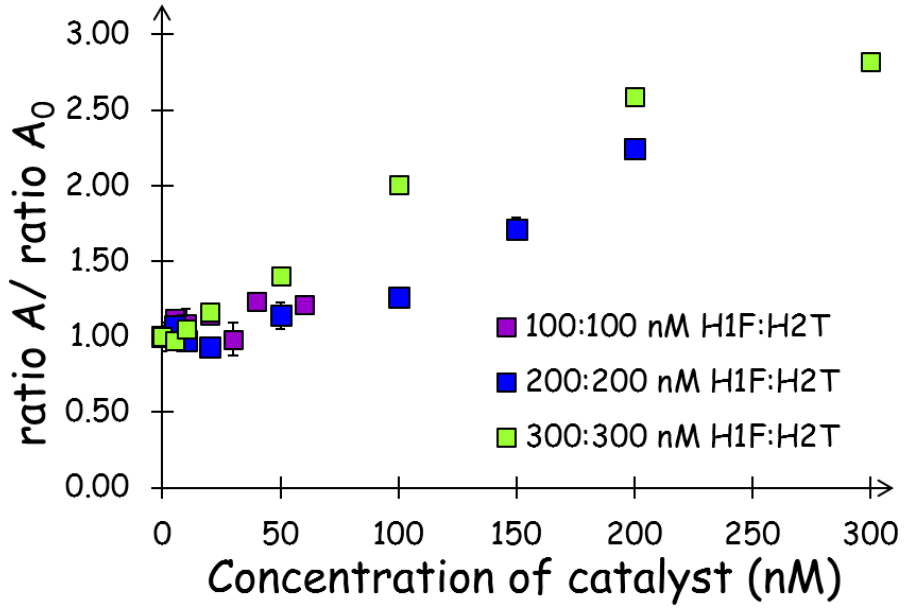
ศึกษาการประยุกต์ใช้เซนเซอร์ในการตรวจวัด target miRNA-21 ในตัวอย่างจริงซึ่งเป็นตัวอย่างพลาสม่า และเขียน manuscript

โครงการย่อยที่ 3: พัฒนาเซนเซอร์ทางแสงสำหรับการตรวจวัด cysteine โดยอาศัย PNA และเทคนิค catalyzed hairpin assembly (CHA)

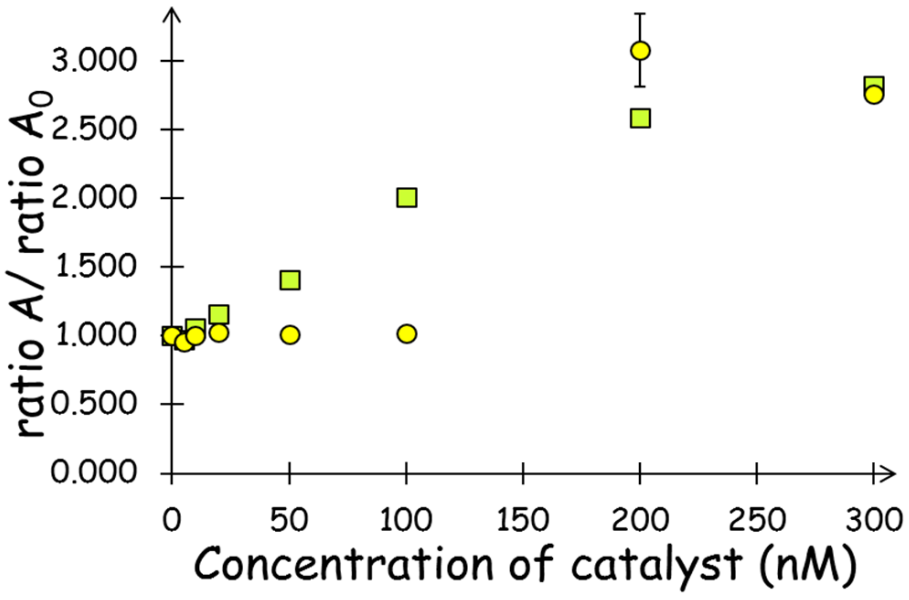


รูปที่ 3.1 แสดงหลักการทำงานของเซนเซอร์ ซึ่งประกอบด้วยสองส่วนคือส่วน Target binding และส่วน Signal amplification

ในช่วง 6 เดือนนี้ ได้ทดลองเพิ่มเติมเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของเซนเซอร์ในขั้นตอนที่ 2 (Signal amplification) (รูปที่ 3.1) ในบัฟเฟอร์ชนิดใหม่คือ HEPES เนื่องจากโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ใช้อยู่เดิมจะทำปฏิกิริยากับไอออนเงินทำให้เกิดการตกตะกอนและขัดขวางการทำงานของเซนเซอร์ (ตามคำแนะนำของ ศ. ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์) โดยควบคุมให้ pH มีค่า 7.4 เท่าเดิม แต่ลดความเข้มข้นของบัฟเฟอร์เหลือ 10 mM เติม 200 mM $NaNO_3$ และ 1.5 μM $AgNO_3$ จากการทดสอบเบื้องต้นพบว่าในบัฟเฟอร์ชนิดใหม่เซนเซอร์มีการตอบสนองต่อ DNA catalyst ได้ดีไม่แตกต่างกับกรณีที่ใช้โพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จากนั้นทำการศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ H1 และ H2 โดยใช้ DNA catalyst เป็นโมเลกุลเป้าหมาย พบว่าค่าที่ได้คือ 300 nM ทั้ง H1 และ H2 ได้ช่วงความเป็นเส้นตรงคือ 10 – 100 nM (catalyst) และค่าความไววิเคราะห์คือ $10.51 \pm 0.64\ \mu M^{-1}$ ดังแสดงในรูปที่ 3.2

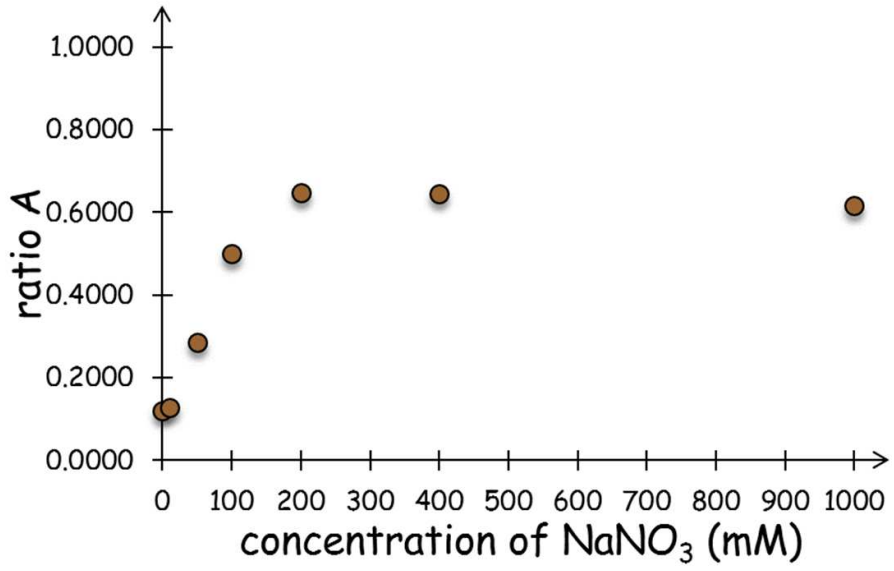


รูปที่ 3.2 แสดงการตอบสนองของเซนเซอร์ต่อ DNA catalyst ที่ความเข้มข้นของ H1 และ H2 แตกต่างกัน



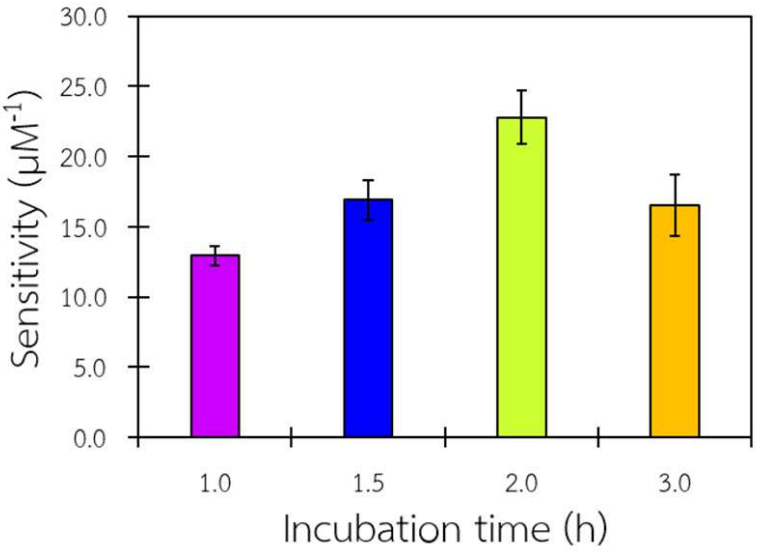
รูปที่ 3.3 แสดงการตอบสนองของเซนเซอร์ต่อ PNA catalyst ที่ 300 nM H1 และ 300 nM H2

จากนั้นทดสอบการตอบสนองของเซนเซอร์ต่อ PNA catalyst โดยใช้เงื่อนไขเดียวกัน พบว่าเริ่มเห็นการตอบสนองที่ค่ามากกว่า 100 nM (ดังรูปที่ 3.3) จึงสรุปได้ว่า DNA catalyst ทำหน้าที่ได้ดีกว่า PNA catalyst ภายใต้เงื่อนไขดังกล่าว ทั้งนี้การที่ PNA catalyst ไม่สามารถทำหน้าที่ได้ดีเท่า DNA catalyst อาจมีสาเหตุมาจากความเข้มข้นของเกลือในบัฟเฟอร์สูงเกินไป จึงได้ทดสอบการตอบสนองของเซนเซอร์ต่อ PNA catalyst ที่ความเข้มข้นของ $NaNO_3$ แตกต่างกัน ตั้งแต่ 0 - 1000 mM พบว่าเซนเซอร์มีการตอบสนองสูงสุดเมื่อ $NaNO_3$ มีความเข้มข้น 200 mM เป็นต้นไป (ดังรูปที่ 3.4) จึงสรุปว่าเซนเซอร์ตอบสนองต่อ DNA catalyst ได้ดีกว่า PNA catalyst จึงใช้ DNA catalyst ในการพัฒนาเซนเซอร์ต่อไป

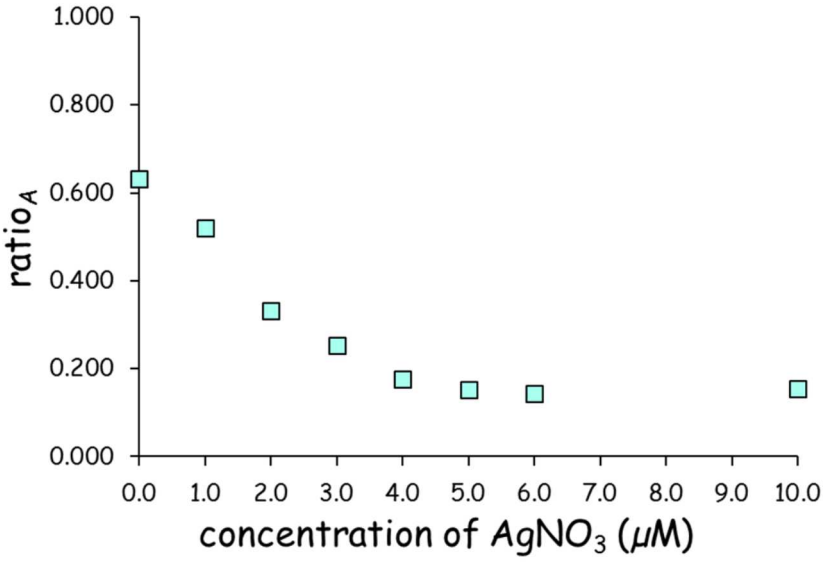


รูปที่ 3.4 แสดงการตอบสนองของเซนเซอร์ต่อ 200 nM PNA catalyst ในบัฟเฟอร์ที่มี $NaNO_3$ ความเข้มข้นต่างๆ

ขั้นตอนถัดไปคือการทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ $NaNO_3$ จากการทดลองพบว่าค่าที่ได้คือ 200 mM ทดสอบหา incubation time ที่เหมาะสม พบว่าได้ค่า 2 ชั่วโมง (รูปที่ 3.5) จากนั้นทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ $AgNO_3$ ซึ่งวัดจากค่าที่น้อยที่สุดที่สามารถทำให้ค่า FRET efficiency (วัดผ่านค่า $(ratio)_A/(ratio)_{A0}$) มีค่าต่ำที่สุด พบว่าได้ค่า 5 μM (รูปที่ 3.6)

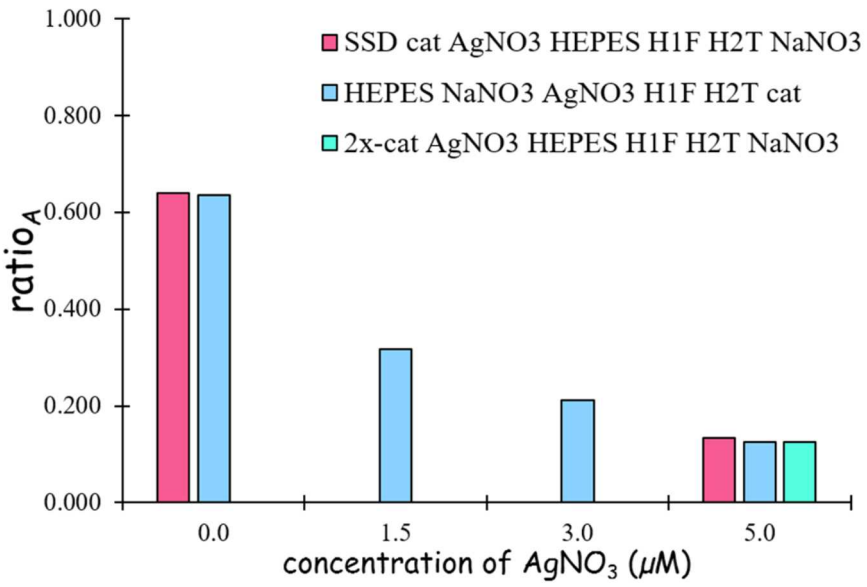


รูปที่ 3.5 แสดงผลของ incubation time ต่อการตอบสนองของเซนเซอร์ต่อ DNA catalyst



รูปที่ 3.6 แสดงผลของความเข้มข้นของ $AgNO_3$ ต่อค่า FRET efficiency (วัดผ่านค่า $(ratio)_A/(ratio)_{A0}$)

นอกจากนั้นยังพบว่าในกรณีที่มี C เพียงอย่างเดียว เซนเซอร์ก็มีการตอบสนองต่อการเพิ่มขึ้นของ $NaNO_3$ ไม่แตกต่างกับกรณีที่มีทั้ง C และ SSD (ดังแสดงในรูปที่ 3.7) เบื้องต้นตั้งสมมติฐานว่าน่าจะมาจากสาเหตุที่ C มี cytosine อยู่จำนวนมากพอที่สามารถเข้าคู่เบสแบบ self-complementary ได้เมื่อมีไอออนเงิน เพื่อลดความซับซ้อนของเซนเซอร์ ในการทดลองหลังจากนี้จึงใช้ C เพียงอย่างเดียวในขั้นตอน Target binding



รูปที่ 3.7 แสดงการตอบสนองของเซนเซอร์ในกรณีที่ใช้ C เพียงอย่างเดียว เทียบกับ ใช้ทั้ง C และ SSD ในขั้นตอน Target binding

แผนงานของโครงการที่จะศึกษาต่อไปในอนาคต

ขณะนี้อยู่ในระหว่างการทดสอบการทำงานของเซนเซอร์โดยใช้ cysteine เป็น target analyte ซึ่งเป็นการผนวกรวมการสองส่วนเข้าด้วยกัน (ส่วน Target binding และส่วน Signal amplification) จากการทดลองพบว่าเซนเซอร์มีการตอบสนองต่อ cysteine ที่ความเข้มข้นสูง (ประมาณ 600 μM) และกำลังทำการศึกษาการตอบสนองของเซนเซอร์ต่อ cysteine ที่ความเข้มข้นต่างๆ ก่อนจะทดสอบการใช้งานของเซนเซอร์กับตัวอย่างจริง และเขียน manuscript เพื่อส่งผลงานตีพิมพ์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Kant, K., Priest, C., Shapter, J.G. and Losic, D. 2014. The Influence of Nanopore Dimensions on the Electrochemical Properties of Nanopore Arrays Studied by Impedance Spectroscopy. *Sensors.*, *14*, 21316-21328.

Wen, Y., Liu, G., Pei, H., Li, L., Xu Q., Liang, W., Li, Y., Xu, Li., Ren, S. and Fan, C. 2013. DNA nanostructure-based ultrasensitive electrochemical microRNA biosensor. Methods. 64: 276–282.

Kumarswamy, R., Volkmann, I. and Thum, T. 2011. Regulation and function of miRNA-21 in health and disease. RNA Biology. 8 (5): 706-713.

Yin, H., Zhou, Y., Zhang, H., Meng, X., Ai, S. 2012. Electrochemical determination of

microRNA-21 based on graphene, LNA integrated molecular beacon, AuNPs and biotin multifunctional bio bar codes and enzymatic assay system. Biosensors and Bioelectronics. 33: 247-253.

Li, F., Peng, J., Wang, J., Tang, H., Tan, L., Xie, Q., Yao, S. 2014. Carbon nanotube-based label-free electrochemical biosensor for sensitive detection of miRNA-24. Biosensors and Bioelectronics. 54: 158-164

Komatsu, S., Ichikawa, D., Takeshita, H., Tsujiura, M., Morimura, R., Nagata, H., Kosuga, T., Iitaka, D., Konishi, H., Shiozaki, A., Fujiwara, H., Okamoto, K., Otsuji, E., 2010. Circulating microRNAs in plasma of patients with oesophageal squamous cell carcinoma. Br J Cancer 105(1), 104-111.

Tsujiura, M., Ichikawa, D., Komatsu, S., Shiozaki, A., Takeshita, H., Kosuga, T., Konishi, H., Morimura, R., Deguchi, K., Fujiwara, H., Okamoto, K., Otsuji, E., 2010. Circulating microRNAs in plasma of patients with gastric cancers. Br J Cancer 102(7), 1174-1179.

ชื่อโครงการย่อย Surface-functionalized magnetite nanoparticles for immobilization of PNA and DNA)
ระยะเวลาโครงการ 17 มีนาคม 2557 – 16 มีนาคม 2560 ได้รับอนุมัติให้ขยายเวลาถึง 16 กันยายน 2560
รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 17 มีนาคม 2557 **ถึงวันที่** 16 กันยายน 2560

หัวหน้าโครงการย่อย
รศ.ดร.เมธา รัตนากรพิทักษ์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
ผู้ร่วมโครงการ
ผศ.ดร.บุญจิรา บุญทา ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
ดร.อุทัย วิชัย ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวรลัย
ดร.มลิวรรณ นาคขุนทด ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

หลักการและเหตุผล

ปัจจุบัน การศึกษาเกี่ยวกับอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ (MNP) กำลังได้รับความสนใจจากนักวิจัยอย่างแพร่หลายเนื่องจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์มีขนาดเล็กระดับนาโน และมีสมบัติการตอบสนองต่อสนามแม่เหล็กภายนอก จึงได้มีการนำอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ไปใช้ประโยชน์หลายด้านเช่น การพัฒนาวัสดุทางอิเล็คโทรนิค แผ่นเก็บข้อมูลแม่เหล็กและการประยุกต์ใช้ทางการแพทย์จากงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการศึกษาการใช้สารชีวโมเลกุลเช่น DNA หรือ เปปไทด์ ตรึงบนพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทท์เพื่อใช้ในการทำให้ DNA หรือเปปไทด์บริสุทธิ์ขึ้นโดยการแยกอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่มีการตรึงสารเหล่านี้ออกมาโดยใช้สนามแม่เหล็กจากภายนอก

จากผลงานวิจัยจากความร่วมมือระหว่างกลุ่มวิจัยของกลุ่มศาสตราจารย์ ดร. ธีรยุทธ วิไลวัลย์ ในการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ลำดับเบสในสายโซ่ DNA โดยการใช้ pyrrolidinyl PNA (acpcPNA) เป็นโพรบร่วมกับกลุ่มวิจัยของ รศ.ดร.เมธา รัตนากรพิทักษ์ ที่มีความสนใจการดัดแปรและการเพิ่มหมู่ฟังก์ชันบนพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทท์นั้น จึงเป็นที่มาของงานวิจัยนี้ ซึ่งจะศึกษาการดัดแปรพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ด้วยพอลิเมอร์ชนิด พอลิเอ็นอะไครโลอิลไกลซีน (poly(*N*-acryloyl-glycine), PNAG) และ พอลิอะไครลิกแอซิด (poly(acrylic acid), PAA) โดยมีแนวทางงานวิจัย 2 แนวทางได้แก่

1) การดัดแปรพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ด้วย PNAG ซึ่งเป็นประจุลบเพื่อใช้ตรึงสารสเตรปตาวิดิน (streptavidin) ลงบนพื้นผิวของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ เนื่องจาก streptavidin เป็นโปรตีนที่มีอัตรกิริยาที่จำเพาะเจาะจงกับสาร biotin ดังนั้นการดูดจับ acpcPNA ที่มีสารbiotin ที่ปลาย (biotin-terminated PNA) จะเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ

2) การดัดแปรพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ด้วย PAA เพื่อนำมาใช้มาตรึงกับ acpcPNA ด้วยแรงระหว่างประจุ (electrostatic interaction)

โดยอนุภาคที่มี acpc PNA บนพื้นผิวนี้จะนำไปใช้เป็นโพรบในการทำให้ DNA บริสุทธิ์ขึ้นโดยอาศัยหลักการของการเข้าคู่กันระหว่าง PNA กับ DNA ที่มีลำดับเบสที่เป็นคู่สมกันและแยก DNA ที่ไม่เป็นคู่สมกันออกโดยใช้แท่งแม่เหล็กแยกอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ออกมาจากสารละลาย และสามารถวิเคราะห์

ผลการทดลองที่ได้ด้วยเทคนิคต่างๆ เช่น UV-Vis spectrophotometer, Thermogravimetric Analysis (TGA),Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) เป็นต้น

<u>วัตถุประสงค์</u>

สังเคราะห์อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่มีการดัดแปรพื้นผิวด้วย PNAG หรือ PAA และศึกษาการประยุกต์ใช้โดยการตรึง acpc PNA บนพื้นผิวของอนุภาค และนำไปใช้เป็นโพรบในการทำให้ DNA บริสุทธิ์

ดังนั้น ในการรายงานผลการทดลอง จะแบ่งการรายงานเป็น 2 แนวทาง ดังนี้

แนวทางที่ 1 การดัดแปรพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ด้วย PNAG เพื่อนำมาใช้มาตรึงกับ acpcPNA โดยการใช้อัตรกิริยาระหว่าง streptavidin และ biotin

แนวทางที่ 2 การดัดแปรพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ด้วย PAA เพื่อนำใช้มาตรึงกับ acpcPNA ด้วยแรงระหว่างประจุ (electrostatic interaction)

แนวทางที่ 1 การดัดแปรพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ด้วย PNAG เพื่อนำมาใช้มาตรึงกับ acpcPNA โดยการใช้อัตรกิริยาระหว่าง streptavidin และ biotin

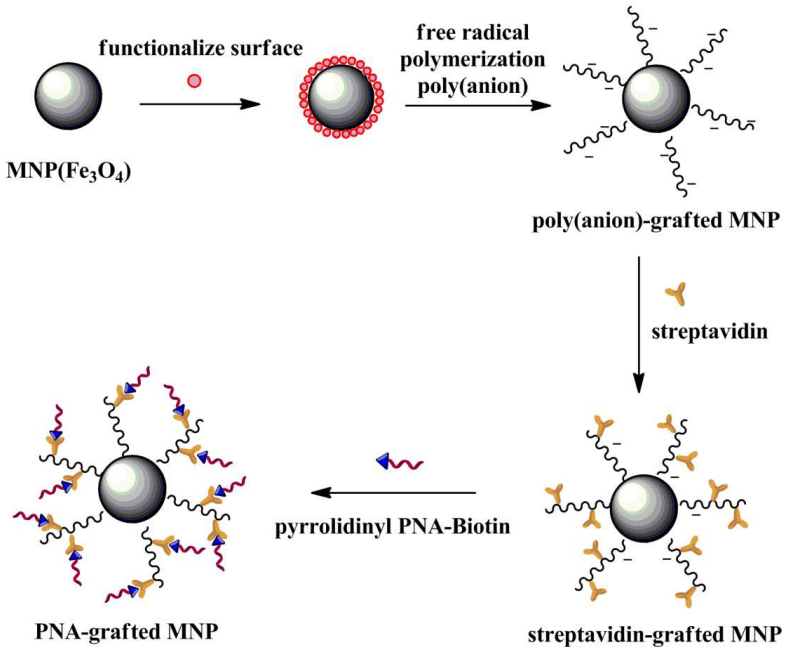
<u>วิธีการทดลอง</u>

วิธีดำเนินการทดลองในแนวทางที่ 1 แบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอนดังนี้ (ภาพ 1)

ขั้นตอนที่ 1 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ดัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิเอ็นอะไครโลอิลไกลซีน (poly(*N*-acryloyl-glycine)(PNAG)

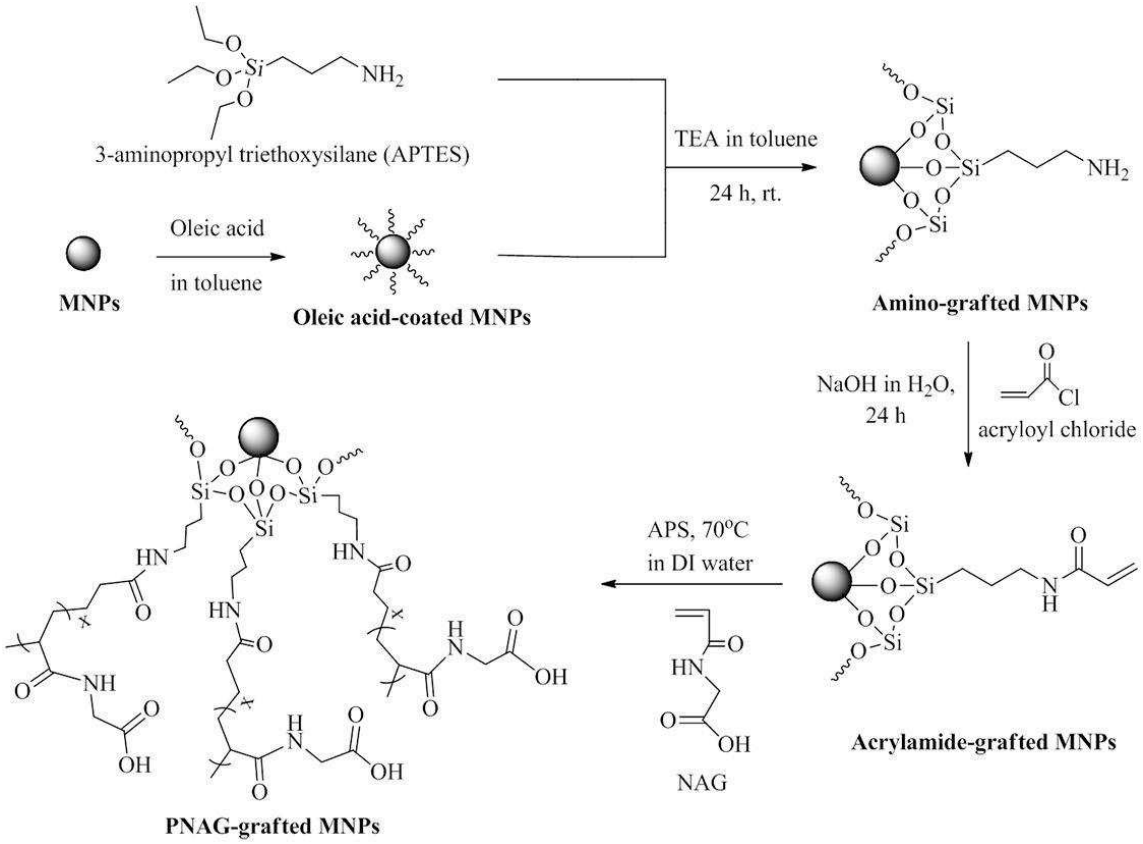
ขั้นตอนที่ 2 การตรึงสเตรปตาวิดิน (Streptavidin) ลงบนพื้นผิวอนุภาค ตามด้วยการตรึง acpcPNA-Biotin บนพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงสเตรปตาวิดินแล้ว

ขั้นตอนที่ 3 การประยุกต์ใช้อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง acpcPNA-Biotinแล้ว ใช้ในการทำให้ DNA บริสุทธิ์



ภาพ 1 การดัดแปรพื้นผิวของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์เพื่อใช้ในการตรึง acpcPNA-Biotin

ขั้นตอนที่ 1 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ดัดแปรบนพื้นผิวด้วยพอลิเอ็นอะไครโลอิลไกลซีน (poly(*N*-acryloyl-glycine) (ภาพ 2)

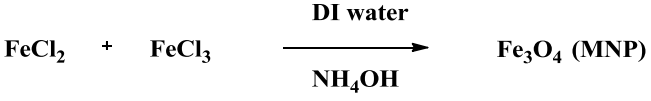


ภาพ 2 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ดัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิเอ็นอะไครโลอิลไกลซีน (PNAG)

โดยขั้นตอนที่ 1 แบ่งการทดลองออกเป็น 5 ส่วนย่อยดังนี้

1. การสังเคราะห์อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ด้วยปฏิกิริยาการตกตะกอนร่วม (co-precipitation) (ภาพ 3)

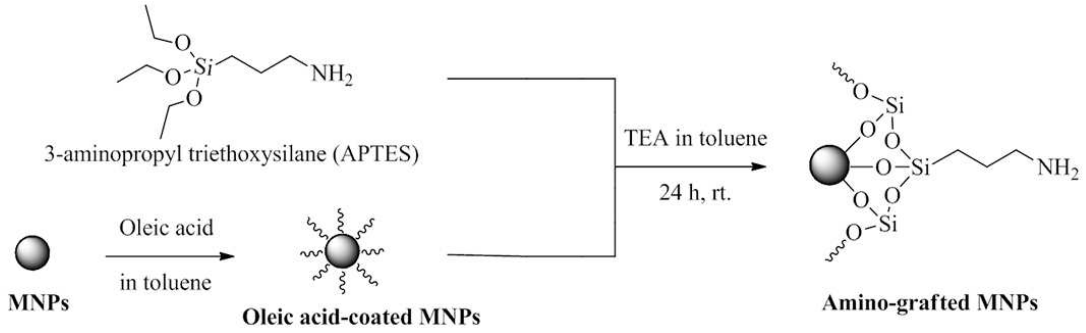
ทำปฏิกิริยาระหว่างเฟอรัสคลอไรด์ ($FeCl_2$) และเฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3$) ในน้ำ (DI water) ในสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (25% NH_4OH) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที หลังสิ้นสุดปฏิกิริยานำสารละลายที่ได้ล้างด้วยน้ำ (DI water) 2-3 ครั้ง ทำให้แห้งและพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคด้วยเทคนิค FTIR และ TGA



ภาพ 3 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ด้วยปฏิกิริยาการตกตะกอนร่วม

2. การตรึงอะมิโนโพรพิลไตรเอททอกซีไซเลน (3-aminopropyl triethoxysilane, APTES) บนพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ (ภาพ 4)

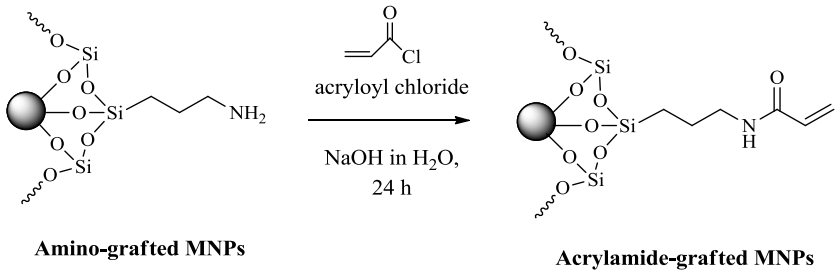
กระจายอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่เคลือบด้วยโอเลอิคแอซิดในเฮกเซน ล้างอนุภาคด้วยอะซิโตนหลายๆครั้ง จากนั้นกระจายตัวอีกครั้งในโทลูอีน เติมไตรเอททิลลามิน (triethoxylamine, TEA) และหยด APTES ลงในสารละลายช้า ๆ ภายใต้สภาวะไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 0 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำปฏิกิริยาต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังสิ้นสุดปฏิกิริยาทำการแยกอนุภาคแมกนีไทท์ออกจากสารละลายโดยใช้แท่งแม่เหล็ก ล้างอนุภาคด้วยเอทานอลหลายๆครั้ง เพื่อกำจัด TEA และ APTES ที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก ทำให้แห้งและพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคด้วยเทคนิค FTIR และ TGA



ภาพ 4 การตรึงอะมิโนโพรพิลไตรเอททอกซีไซเลน (3-aminopropyl triethoxysilane, APTES) บนพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทท์

3. การฟังก์ชันนอลไลซ์หมู่อะคริลาไมด์ (Acrylamide) บนพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ (ภาพ 5)

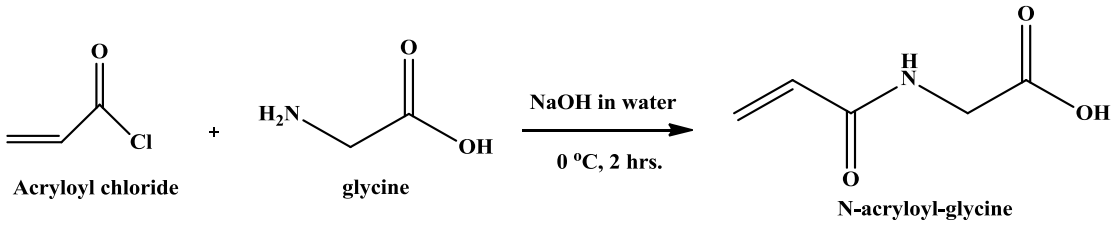
นำอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย APTES กระจายตัวอีกครั้งในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ หยดอะไครโลอิลคลอไรด์ (Acryloyl chloride) อย่างช้าๆลงในสารละลาย (NaOH: Acryloyl chloride = 2:1) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 0 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมงและทำปฏิกิริยาต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แยกอนุภาคด้วยแท่งแม่เหล็กออกแล้วล้างด้วยน้ำ (DI water) 3-4 ครั้ง เพื่อกำจัดอะไครโลอิลคลอไรด์ (Acryloyl chloride) ที่ไม่ทำปฏิกิริยาและผลิตภัณฑ์อื่นที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการทำปฏิกิริยา ทำให้แห้งและพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคด้วยเทคนิค FTIR และ TGA



ภาพ 5 การฟังก์ชันนอลไลซ์หมู่อะคริลาไมด์ (acrylamide) บนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์

4. การสังเคราะห์เอ็นอะไครโลอิลไกลซีน (*N*-acryloyl-glycine) เพื่อเป็นมอนอเมอร์ (ภาพ 6)

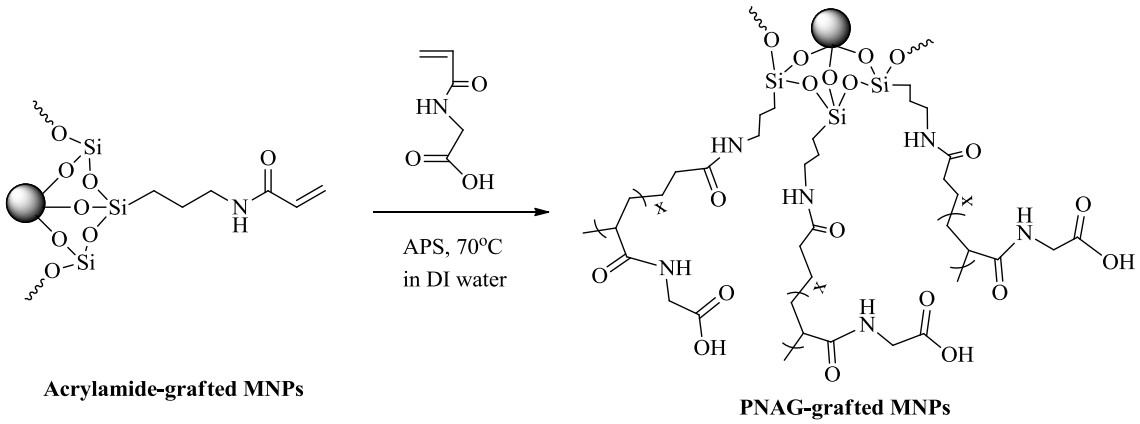
เตรียมสารละลายไกลซีนความเข้มข้น 10 mmol ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 M จำนวน 10 mL หยดอะไครโลอิลคลอไรด์ (Acryloyl chloride) 1 mL (อัตราส่วน NaOH: Acryloyl chloride = 2:1) อย่างช้าๆลงในสารละลายที่อุณหภูมิ 0 °C ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องต่อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างสารละลายด้วยไดเอททิลอีเทอร์ 2-3 ครั้ง (ครั้งละ 20 mL) และปรับค่า pH ชั้นน้ำด้วยกรดไฮโดรคลอริคเข้มข้นจนได้ค่า pH เท่ากับ 3 จากนั้นสกัดสารละลายด้วยเอททิลอะซิเตท 3-4 ครั้ง เติมแม็กนีเซียมซัลเฟต($MgSO_4$) เพื่อกำจัดน้ำที่อยู่ในสารละลาย ระเหย ethyl acetate ออกจากสารผลิตภัณฑ์ สารผลิตภัณฑ์เอ็นอะไครโลอิลไกลซีน (*N*-acryloyl-glycine) มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค NMR



ภาพ 6 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอ็นอะไครโลอิลไกลซีน (*N*-acryloyl-glycine)

5. การดัดแปรบนพื้นผิวอนุภาคด้วยพอลิเอ็นอะไคโลอิลไกลซีน(PNAG)โดยใช้ปฏิกิริยาคอนเวนชั่นนอลฟรีแรดิคัล พอลิเมอร์ไรซ์เซชั่น (conventional free radical polymerization) (ภาพ 7)

ละลายเอ็นอะไครโลอิลไกลซีน (N-acryloyl-glycine) ในน้ำ เติมแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (APS) เพื่อเป็น radical initiator ในอัตราส่วนโมลเป็น 100:1 (N-acryloyl-glycine:APS) จากนั้นเติมอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ถูกตรึงด้วยหมู่อะคริลาไมด์ (Acrylamide) ลงในสารละลายภายใต้สภาวะไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 75 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงครึ่ง แยกอนุภาคออกด้วยแท่งแม่เหล็กแล้วล้างอนุภาคด้วยน้ำ 3-4 ครั้ง เพื่อกำจัดเอ็นอะไครโลอิลไกลซีน (N-acryloyl-glycine) ที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก ทำให้แห้งและพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคด้วยเทคนิค FTIR, TGA และ Zetasizer (ZS)



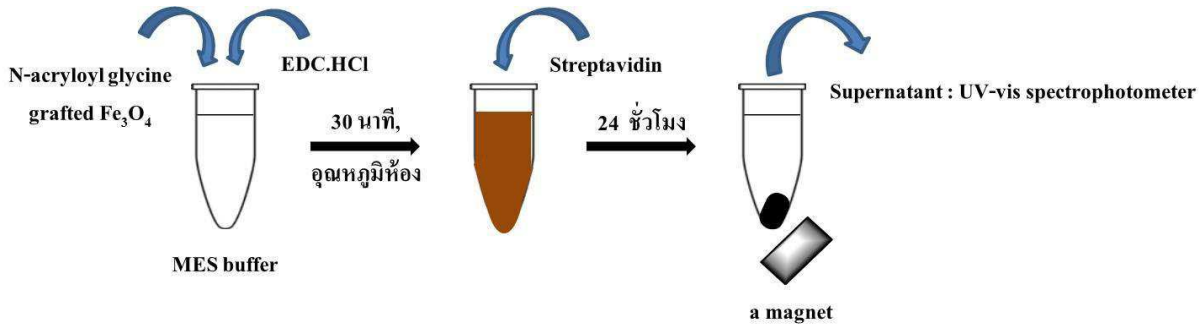
ภาพ 7 การดัดแปรบนพื้นผิวอนุภาคด้วยพอลิเอ็นอะไครโลอิลไกลซีน (PNAG)

ขั้นตอนที่ 2 การตรึงสเตรปตาวิดิน (Streptavidin) ลงบนพื้นผิวอนุภาค ตามด้วยการตรึง pyrrolidinyl PNA-Biotin บนพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงสเตรปตาวิดินแล้ว

แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ส่วนย่อยดังนี้

1. การตรึงสเตรปตาวิดินลงบนพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ (ภาพ 8)

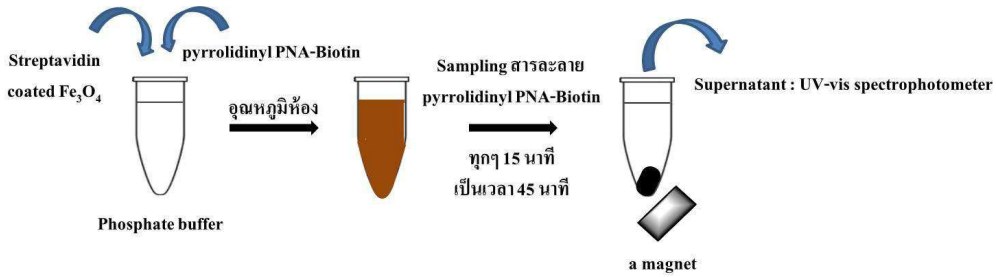
นำอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่เคลือบด้วยพอลิเอ็นอะไคโลอิลไกลซีน (PNAG-grafted MNP) ที่กระจายตัวใน 2-(N-morpholino)ethanesul-fonic acid buffer (MES buffer) pH 5.2 จากนั้นเติม N-ethylcarbo diimide hydrochloride (EDC.HCl) ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นใส่สารละลายสเตรปตาวิดินลงไปและทำปฏิกิริยาต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาทำการแยกอนุภาคออกแล้วล้างด้วย MES buffer ทำให้แห้งและวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยเทคนิค UV-Vis spectrophotometer และ photocorrelation spectroscopy (PCS)



ภาพ 8 การตรึงสเตรปตาวิดินลงบนพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทท์

2. การตรึง acpcPNA-Biotin ลงบนพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วยสเตรปตาวิดิน (ภาพ 9)

เติมอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วยสเตรปตาวิดิน 5 mg ลงในสารละลายของ acpcPNA-Biotin (Biotin-CTACAAGCATAT-lys-NH_2) ความเข้มข้น 32.15 µM ใน phosphate buffer pH 7 ทำการปั่นเหวี่ยง จากนั้น sampling สารละลาย acpcPNA-Biotin ตัวอย่างทุก ๆ 15 นาที เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นนำสารละลาย acpcPNA-Biotin ที่ได้จากการ sampling มาทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค UV-Vis spectrophotometry



ภาพ 9 การตรึง acpcPNA-Biotin ลงบนพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทท์

ขั้นตอนที่ 3 การประยุกต์ใช้อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง acpcPNA-Biotin แล้วมาใช้ในการทำให้ DNA บริสุทธิ์

โดยขั้นตอนที่ 3 นี้ได้ทำการทดสอบกับ PNA จำนวน 2 ลำดับเบส ได้แก่ PNA1 และ PNA2 โดยมีรายละเอียดการทดลองดังนี้

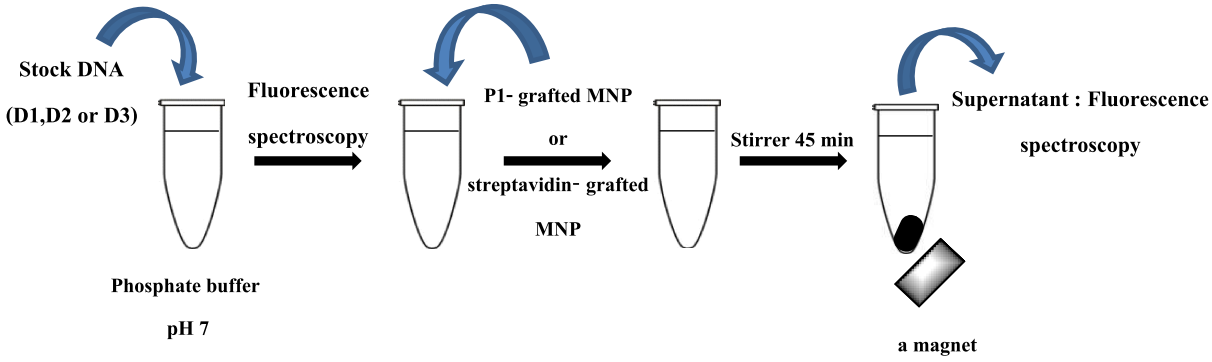
1) การทดลองการใช้ PNA1 เพื่อเป็น probe

ขั้นตอนนี้ได้นำเอาอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึง acpcPNA-Biotin (P1) มายึดจับกับ DNA แต่ละลำดับเบส ทั้งหมด 3 ลำดับเบส โดยลำดับเบสของ acpcPNA-Biotin และ DNA ที่ใช้แสดงดัง**ตาราง 1**

ตาราง 1 ลำดับเบสของ Biotin-conjugated PNA (P1) และ DNA สังเคราะห์ที่ใช้ในการทดลอง

Biotin-conjugated PNA (P1)	Sequence of DNA
Biotin-O-O-CTACA AGCATAT-lys-NH_2	D1 : 5'-ATATgCTTgTAg-FAM (Fully match) D2 : 5'-CACgTTCCAggA-TAMRA (Fully mismatch) D3 : 5'-ATATgCATgTAg-TAMRA (Single -based mismatch)

ทำการศึกษาความจำเพาะเจาะจง (specificity) ของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึง PNA(P1) และอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ก่อนตรึง PNA(P1) (ตัวควบคุม) ในการยึดจับกับ DNA แต่ละลำดับเบส คือ DNA(D1, fully match), DNA(D2, fully mismatch) หรือ DNA(D3, single based mismatch โดยเตรียมสารละลายของ DNA แต่ละลำดับเบส คือ DNA (D1), DNA (D2) หรือ DNA (D3) ที่ความเข้มข้น 0.8 μM ใน phosphate buffer pH 7 จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Fluorescence spectroscopy (ภาพ 10) โดยทำการวิเคราะห์ที่ความยาวคลื่นในการกระตุ้น(excitation wavelength) และความยาวคลื่นในการคายแสง (emission wavelength) ที่เหมาะสมของแต่ละ Fluorophor ของ DNA เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบก่อนและหลังจากการยึดจับกันบนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึง PNA(P1) และอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P1) (ตัวควบคุม) จากนั้นเติมอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึง PNA(P1) 2 มิลลิกรัม หรืออนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P1)(ตัวควบคุม) 2 มิลลิกรัม ลงในสารละลายของ DNA (D1), DNA (D2) หรือ DNA (D3) ที่เตรียมไว้แล้ว ทั้งนี้เพื่อเปรียบเทียบผลของการจับยึด DNA และศึกษาถึง non-specificity ระหว่างอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P1)(ตัวควบคุม) กับ DNA แต่ละชนิด จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 45 นาที หลังจากนั้นทำการแยกส่วนสารละลาย (supernatant) ออกจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Fluorescence spectroscopy และ Gel electrophoresis (agarose gel)



ภาพ 10 การใช้อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึง PNA(P1) แล้ว และอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA (P1) (ตัวควบคุม) ยึดจับกับ DNA แต่ละลำดับเบส (D1, D2 หรือ D3)

2) การใช้ PNA2 (มีลำดับเบสสอดคล้องกับลำดับเบสของ zein gene ของข้าวโพด) เพื่อเป็น probe

2.1) เป็นการประยุกต์ใช้อนุภาคนาโนแมกนีไทท์มาใช้เป็นตัวดูดซับในการทำให้ DNA บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยชนิด DNA ที่สนใจศึกษาเป็น DNA ของโปรตีน zein ที่พบในเฉพาะข้าวโพด โดยจะเป็นการศึกษาการใช้อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึง PNA มายึดจับกับ DNA แบบผสม 3 ลำดับเบส ที่มีลำดับเบสที่สอดคล้องกับ DNA ตัวอย่างจริง (synthetic DNA) และ

2.2) การศึกษาการนำเอาอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย PNA มาประยุกต์ใช้กับ DNA จริง (real DNA) ที่สกัดมาจากข้าวโพด

โดยลำดับเบสของ Biotin-conjugated PNA (P2) และ DNA สังเคราะห์ที่มีลำดับเบสสอดคล้องลำดับเบสของ DNA จริง ที่ใช้แสดงดังตาราง 2

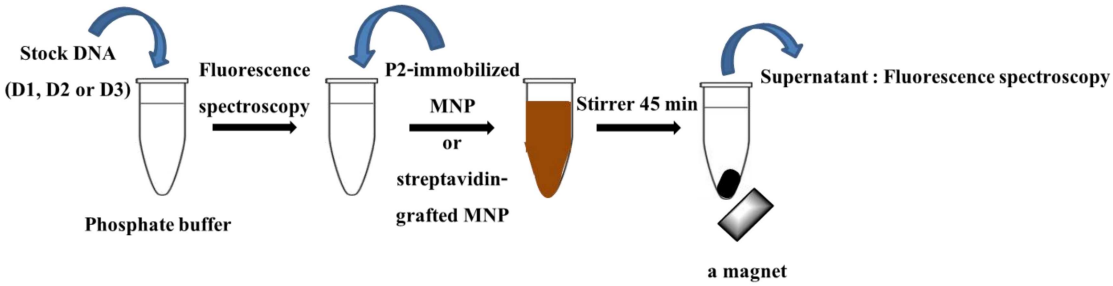
ตาราง 2 ลำดับเบสของ Biotin-conjugated PNA (P2) และ DNA สังเคราะห์ที่มีลำดับเบสสอดคล้องลำดับเบสของ DNA จริง ที่ใช้

Biotin-conjugated PNA(P2)	Sequence of DNA
Biotin-O-ATGCCACAATGT-lys-NH_2	D1 : 5'-ACATTgTggCAT-FAM (Fully match) D2 : 5'-TgCgATCCATgC-TAMRA (Fully mismatch) D3 : 5'- ACATTATggCAT-Cy5 (Single based mismatch)

รายละเอียดการทดลองแบ่งออกเป็น 3 ส่วนย่อยดังนี้

1. *การศึกษาความจำเพาะเจาะจง (specificity) ของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึง PNA(P2) และอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P2) (ตัวควบคุม) ในการยึดจับกับ DNA แต่ละลำดับเบส คือ DNA(D1), DNA(D2) หรือ DNA(D3) (ภาพ 11)*

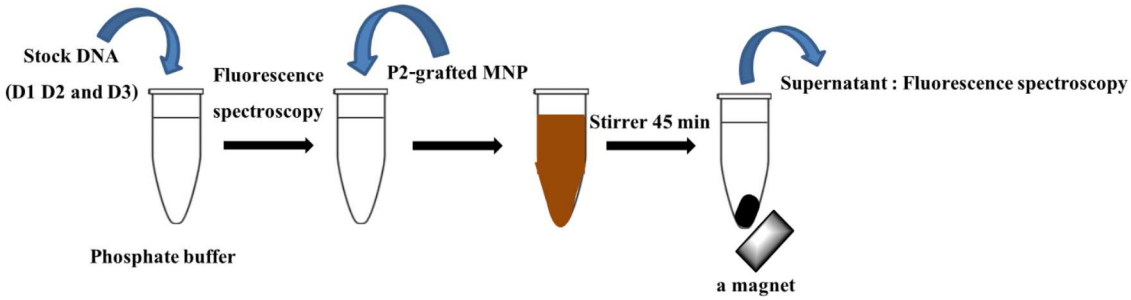
โดยทำเตรียมสารละลายของ DNA แต่ละลำดับเบส คือ DNA(D1), DNA(D2) หรือ DNA(D3) ที่ความเข้มข้น 0.9 µM ใน phosphate buffer pH 7 จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Fluorescence spectrophotometry โดยทำการวิเคราะห์ที่ความยาวคลื่นในการกระตุ้น (excitation wavelength) และความยาวคลื่นในการคายแสง (emission wavelength) ที่เหมาะสมของแต่ละ Fluorophore ของ DNA เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบก่อนและหลังจากการยึดจับกันบนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึง PNA(P2) และอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P2) (ตัวควบคุม) จากนั้นเติมอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึง PNA(P2) 2 มิลลิกรัม หรืออนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P2)(ตัวควบคุม) 2 มิลลิกรัม ลงในสารละลายของ DNA(D1), DNA(D2) หรือ DNA(D3) ที่เตรียมไว้แล้ว ทั้งนี้เพื่อเปรียบเทียบผลของการจับยึด DNA และศึกษาถึง non-specificity ระหว่างอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P2)(ตัวควบคุม) กับ DNA แต่ละชนิด จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 45 นาที หลังจากนั้นทำการแยกส่วนสารละลาย (supernatant) ออกจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Fluorescence spectrophotometry และ Gel electrophoresis (agarose gel)



ภาพ 11 การใช้อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึง PNA(P2) แล้วและอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P2)(ตัวควบคุม) ยึดจับกับ DNA แต่ละลำดับเบส (D1, D2 หรือ D3)

2. การศึกษาการใช้อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึง PNA(P2) มายึดจับกับ DNA แบบผสม 3 ลำดับเบส ระหว่าง DNA(D1), DNA(D2) และ DNA(D3) (ภาพ 12)

เตรียมสารละลายของ DNA แบบผสม 3 ลำดับเบสคือ DNA(D1), DNA(D2) และ DNA(D3) โดยความเข้มข้นของ DNA แต่ละลำดับเบสที่ 0.9 µM ใน phosphate buffer pH 7 จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Fluorescence spectrophotometry เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบก่อนและหลังจากการยึดจับกันบนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึง PNA(P2) จากนั้นเติมอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึง PNA(P2) 2 มิลลิกรัม ลงในสารละลายของ DNA แบบผสม 3 ลำดับเบสคือ DNA(D1), DNA(D2) หรือ DNA(D3) ที่เตรียมไว้แล้ว ทำการปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 45 นาที หลังจากนั้นทำการแยกส่วนสารละลาย (supernatant) ออกจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Fluorescence spectrophotometry



ภาพ 12 การใช้อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึง PNA(P2) แล้ว มายึดจับกับ DNA แบบผสม 3 ลำดับเบส คือ DNA(D1), DNA(D2) และ DNA(D3)

3. การศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการยึดจับของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย PNA(P2) กับ DNA จริงของข้าวโพด (real DNA)

ตัวอย่าง DNA จริงของข้าวโพดจำนวน 30 ไมโครลิตร ถูกนำทำให้เสียสภาพ (Denaturation) เพื่อให้อยู่ในรูปของ DNA สายเดี่ยว โดยน้ำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที และทำให้เย็นตัวลงอย่างรวดเร็วด้วยอ่างน้ำแข็ง จากนั้นนำมาเติมลงในอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย PNA (2 มิลลิกรัมกระจายตัวใน 10 ไมโครลิตร ของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์) เขย่าเป็นเวลา 30 นาที แล้วทำการแยกส่วนของอนุภาคออกจากสารละลายและล้างอนุภาคด้วยน้ำ DI หลายๆครั้ง หลังจากนั้นนำส่วนของอนุภาคซึ่งมี DNA ถูกดูดซับอยู่ มาทำการล้างด้วย 7 % acetonitrile เพื่อล้างเอาส่วนของ DNA ที่ถูกดูดซับอยู่บนพื้นผิวของอนุภาคออกแล้วนำไปทำการเพิ่มปริมาณของ DNA โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase chain reaction ; PCR)

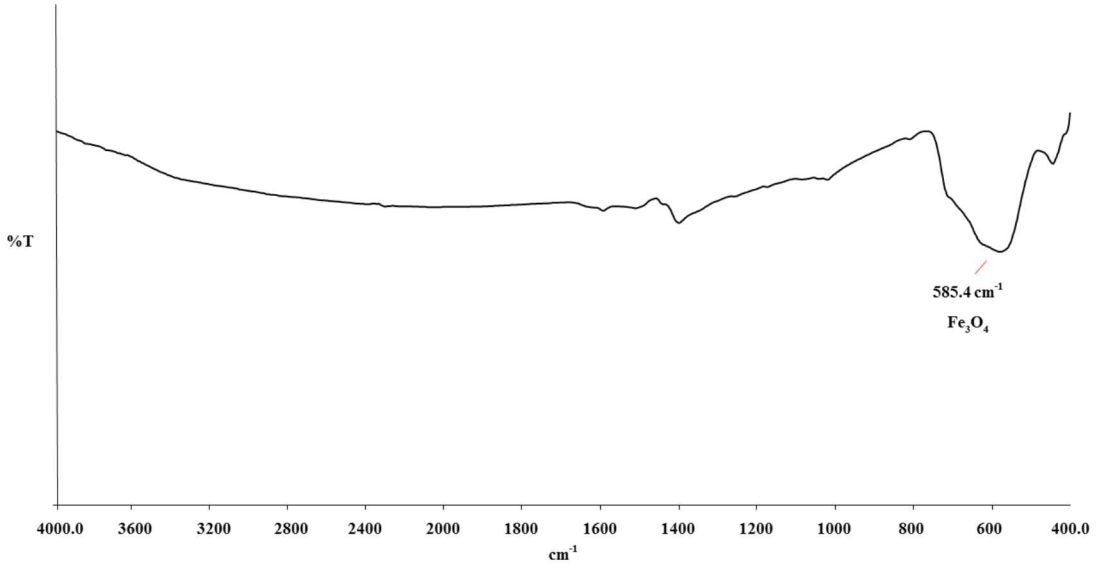
โดยการเพิ่มปริมาณของตัวอย่าง DNA ที่ถูกล้างออกมาจากอนุภาค เพื่อตรวจสอบหายีน zein ของข้าวโพดจะใช้คู่ไพรเมอร์ ze-1 (5′-TGCTTGCATTGTTCGCGCTCTCCTAG-3′) และ ze-2 (5′-GTCGCAGTGACATTGTGGCAT-3') สำหรับสภาวะในการทำพีซีอาร์นั้นจะให้ความร้อนเริ่มต้น (preheat) ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำให้ DNA เสียสภาพ (Denaturation) ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 วินาที ไพรเมอร์จะเข้าจับกับ DNA ต้นแบบ (Annealing) ที่ 62 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และจะสังเคราะห์ DNA สายใหม่ (Extension) ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที จำนวน 50 รอบ จากนั้นให้ DNA สังเคราะห์สายใหม่ต่อ (final extension) ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังสิ้นสุดการทำ PCR นำสารละลาย DNA ที่ได้ไปตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟริซิส(Electrophoresis) โดยใช้อะกาโรสเจลที่ความเข้มข้น 1% ใน 1X TAE buffer ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์

<u>ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง</u>

ขั้นตอนที่ 1 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ดัดแปรพื้นผิวด้วย PNAG

1. การสังเคราะห์อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ด้วยปฏิกิริยาการตกตะกอนร่วม

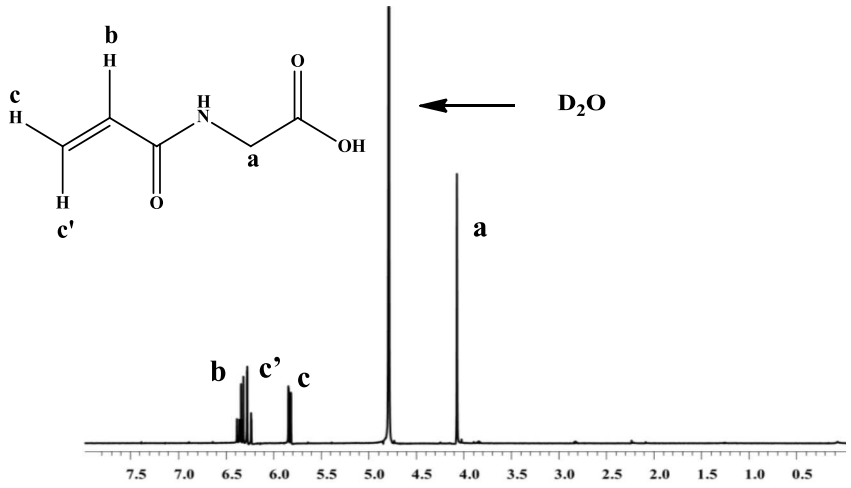
จากการสังเคราะห์อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ด้วยปฏิกิริยาการตกตะกอนร่วมแล้วนำอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่แห้งแล้วมาพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค FTIR (ภาพ 13) พบว่าปรากฏสัญญาณ Fe-O ที่ตำแหน่ง 585.4 cm^{-1} ซึ่งเป็นของสารประกอบเหล็กออกไซด์



ภาพ 13 สเปคตรัม FTIR ของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์

2. การสังเคราะห์เอ็นอะไครโลอิลไกลซีนมอนอเมอร์ (N-acryloyl-glycine monomer)

เอ็นอะไครโลอิลไกลซีน (N-acryloyl-glycine) มีลักษณะเป็นผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาว สังเคราะห์ได้น้ำหนัก 2.6426 g คิดเป็นร้อยละของผลผลิต (% yield) เท่ากับ 51.15 เปอร์เซ็นต์ และพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค NMR โดยพบสัญญาณของเมทิลลีนโปรตอนที่ตำแหน่ง 4.080 ppm (สัญญาณ a) และสัญญาณของโปรตอนตำแหน่งพันธะคู่ที่ 5.84 ppm (สัญญาณ c) , 6.27 ppm (สัญญาณ c') และ 6.35 ppm (สัญญาณ b)(ภาพ 14)

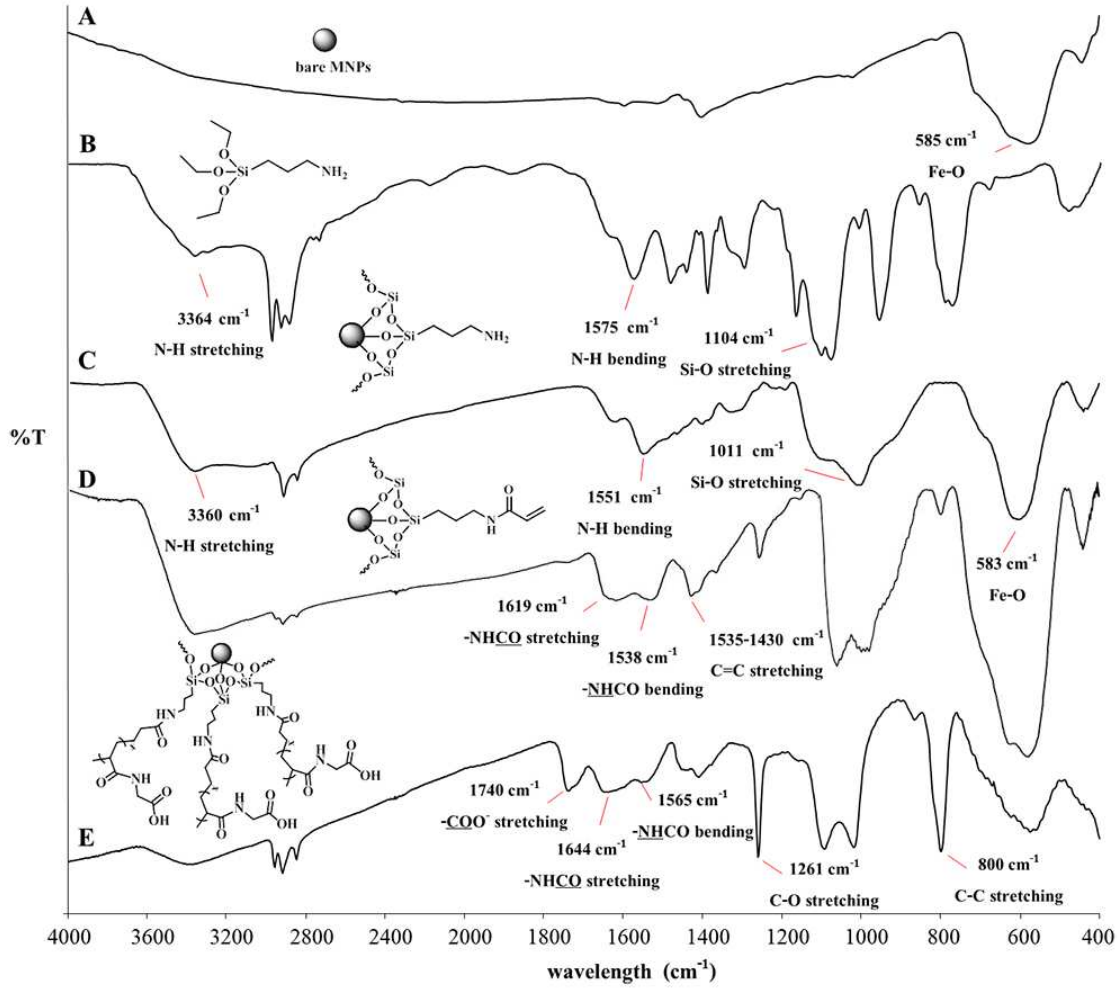


ภาพ 14 สเปคตรัม ^{1}H NMR ของเอ็นอะไครโลอิลไกลซีน (*N*-acryloyl-glycine) ใน D_2O

3. การดัดแปรพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ด้วย PNAG

3.1 Fourier Transform Infrared Spectrometer (FTIR) (ภาพ 15)

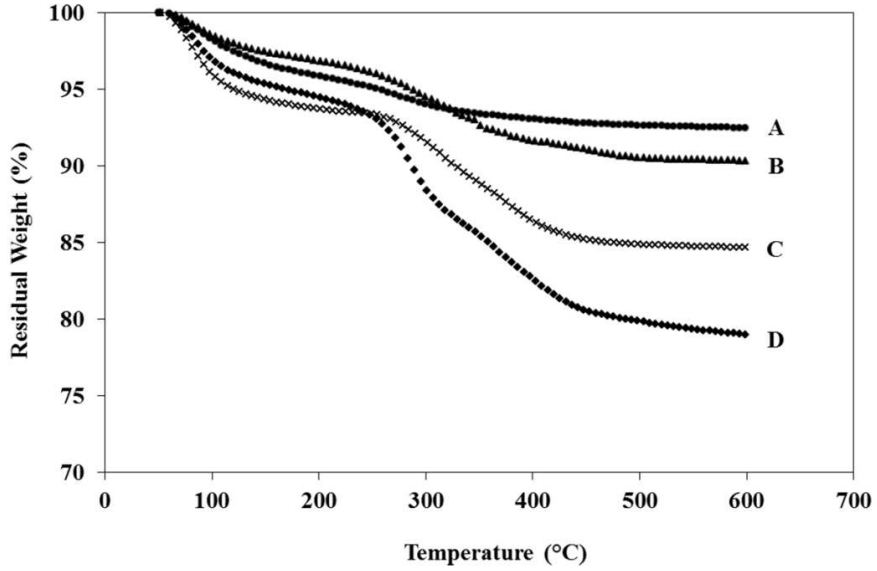
จากสเปคตรัม A พบสัญญาณ Fe-O (585.4 cm^{-1}) ของสารประกอบเหล็กออกไซด์ สเปคตรัม B และ C พบสัญญาณของหมู่ฟังก์ชันเอมีนของ APTES ที่อยู่บนพื้นผิวอนุภาค ได้แก่ N-H stretching (3368 cm^{-1}) C-H stretching (2926 cm^{-1}) และ Si-O stretching (1116-1040 cm^{-1}) สเปคตรัม D พบสัญญาณของหมู่ฟังก์ชันเอไมด์ของอะคริลาไมด์ (Acrylamide) ได้แก่ -NH-CO- stretching (1615 cm^{-1}) และ N-H bending (1557 cm^{-1}) ส่วนสเปคตรัม E พบสัญญาณของหมู่ฟังก์ชันคาร์บอกซิลิคของพอลิเอ็นอะไครโลอิลไกลซีน คือ C=O stretching (1740 cm^{-1}) และ C-O stretching (1261 cm^{-1})



ภาพ 15 สเปคตรา FTIR ของ A) bare MNP , B) APTES, C) APTES-coated MNP ,D) acrylamide-coated MNP และ E) PNAG-grafted MNP

3.2 Thermogravimetric Analysis (TGA) (ภาพ 16)

จาก TGA curves จะพบว่า %weight residue ของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ดัดแปรพื้นผิวด้วยหมู่ฟังก์ชันต่างๆ มีค่าลดลงในแต่ละขั้นตอน ได้แก่ A) bare MNP , B) APTES-coated MNP , C) acrylamide-coated MNP และ D) PNAG-grafted MNP มีน้ำหนักที่เหลือเท่ากับ 92.49, 90.34, 84.69 และ 79.01 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดย %weight residue เป็นเปอร์เซ็นต์เหล็กออกไซด์ (inorganic component) ที่เหลือจากการออกซิไดซ์ที่อุณหภูมิสูง ส่วน %weight loss เป็นส่วนของสารประกอบอินทรีย์บนอนุภาคที่น้ำหนักหายไปจากการเผาที่อุณหภูมิสูงภายใต้บรรยากาศออกซิเจน จากผลของ TGA แสดงว่าการดัดแปรพื้นผิวอนุภาคด้วยหมู่ฟังก์ชันต่างๆหรือดัดแปรด้วยพอลิเมอร์ ทำให้มีส่วนของสารประกอบอินทรีย์บนอนุภาคมากขึ้นในแต่ละขั้นตอน



ภาพ 16 เทอร์โมแกรม TGA ของ A) bare MNP, B) APTES-coated MNP, C) acrylamide-coated MNP และ D) PNAG-grafted MNP

3.3 Zetasizer (ZS) (ตาราง 3)

เนื่องจากพอลิเอ็นอะไคโลอิลไกลซีน (Poly(*N*-acryloyl-glycine) เป็นพอลิเมอร์ที่สามารถตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของค่า pH ของสารละลายได้เนื่องจากผลของหมู่คาร์บอกซิลิคอยู่บนสายโซ่ จึงได้ทำการวิเคราะห์หค่าา hydrodynamic size (D_h) และค่าประจุลบของอนุภาคในสารละลาย pH ต่างๆ โดยใช้เทคนิค Zetasizer (ZS) แสดงผลดังตาราง 3

จากตารางจะพบว่า hydrodynamic size (D_h) ของอนุภาคในสารละลาย pH ต่างๆไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่าอยู่ในช่วง 334-495 นาโนเมตร ส่วนจากการวิเคราะห์ประจุลบของอนุภาคพบว่า

เมื่อสารละลายมีค่า pH เพิ่มขึ้น (เป็นเบสมากขึ้น) ทำให้ดีกรีของประจุลบบนพื้นผิวของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์มีค่าเพิ่มมากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจาก COOH จากหน่วยของ *N*-acryloyl glycine บนพื้นผิวอนุภาคอยู่ในฟอร์ม COO- เพิ่มมากขึ้น เมื่อ pH ของสารละลายเป็นเบสมากขึ้น จึงทำให้ดีกรีของประจุลบบนพื้นผิวของอนุภาคมีค่าเพิ่มมากขึ้น

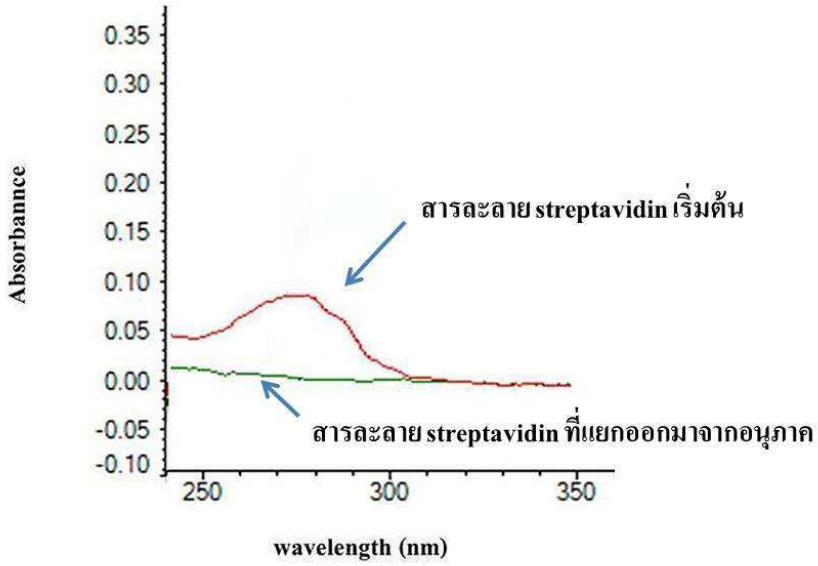
ตาราง 3 การหา hydrodynamic size (Dh) และค่าประจุลบของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่เคลือบด้วย PNAG ในสารละลาย pH ต่างๆ

pH	D_h (nm)	Zeta potential (mV)
3.00	458.2	-26.1
4.00	367.2	-41.6
5.01	424.8	-44.4
6.02	453.4	-46.4
7.08	400.3	-54.1
8.02	399.4	-59.6
9.09	494.5	-60.8
10.04	460.5	-64.0
11.01	334.6	-74.6
DI water	473.8	-45.4

ขั้นตอนที่ 2 การตรึงสเตรปตาวิดิน (Streptavidin) ลงบนพื้นผิวอนุภาค ตามด้วยการตรึง acpcPNA-Biotin บนพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงสเตรปตาวิดินแล้ว

1) การตรึงสเตรปตาวิดินลงบนพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทท์

จากการทดลองเมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาการตรึงสเตรปตาวิดินบนอนุภาคนาโนแมกนีไทด์แล้วทำการแยกอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ออกจากสารละลายสเตรปตาวิดินโดยการปั่นเหวี่ยง หลังจากนั้นนำสารละลายสเตรปตาวิดินที่แยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค UV-Vis spectrophotometry ที่ความยาวคลื่น 280 nm โดยเทียบกับสารละลายสเตรปตาวิดินเริ่มต้น ผลการทดลองแสดงดังภาพ 17



ภาพ 17 สเปคตรัมยูวีของสารละลายสเตรปตาวิดินเริ่มต้นและสารละลายสเตรปตาวิดินที่แยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์

จากสเปคตรัมยูวีพบว่าสารละลายสเตรปตาวิดินเริ่มต้นมีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.093 ส่วนสารละลายสเตรปตาวิดินที่แยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ พบว่ามีค่าการดูดกลืนแสง เท่ากับ 0.006 จากผลการวิเคราะห์พบว่าปริมาณของสารละลายสเตรปตาวิดินลดลงหลังจากแยกออกจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ ซึ่งเป็นสเตรปตาวิดินที่ถูกบนพื้นผิวของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์โดยวิเคราะห์จากค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลง

นอกจากนี้ส่วนของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วยสเตรปตาวิดินจะถูกนำมาวิเคราะห์ขนาดไฮโดรไดนามิก (hydrodynamic size, D_h) ด้วยเทคนิค photocorrelation spectroscopy (PCS) ผลการวิเคราะห์แสดงดังตาราง 4

ตาราง 4 การหาขนาดไฮโดรไดนามิกของอนุภาคนาโนแม็กนีไทท์ที่ถูกตรึงด้วยสเตรปตาวิดิน

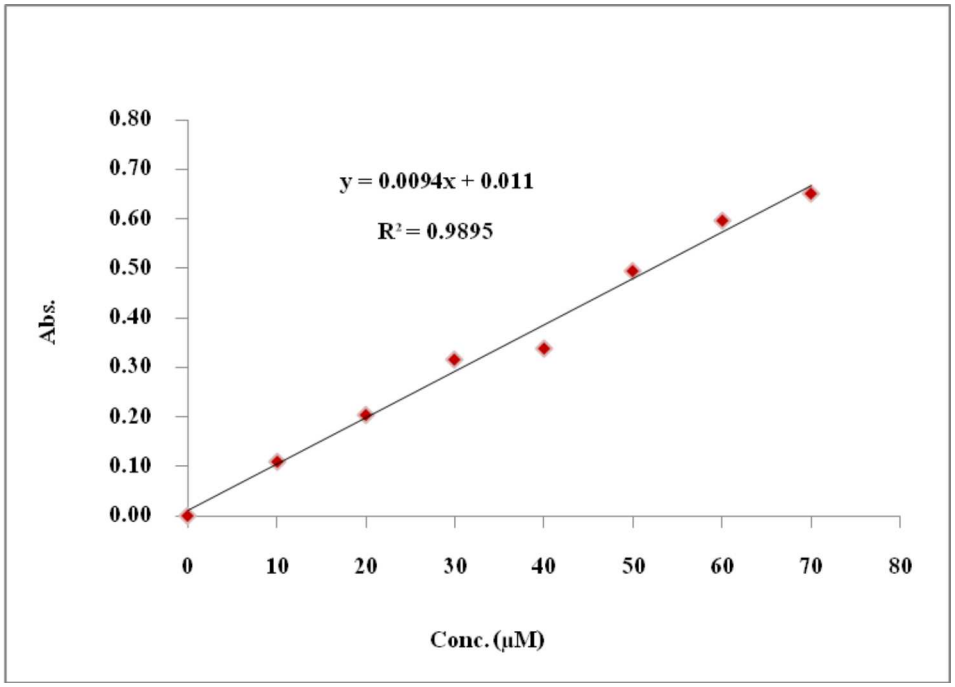
PNAG-grafted MNP		Streptavidin-grafted MNP	
pH(mV)	D_h (nm)	pH(mV)	D_h (nm)
DI water	474	DI water	736.5
7.08	400	7.08	730.7

จากผลการวิเคราะห์พบว่าอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ถูกตรึงด้วยสเตรปตาวิดินจะมีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อเทียบกับอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนถูกตรึงด้วยสเตรปตาวิดิน ทั้งในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 7.08 และในน้ำ ดังนั้นผลการทดลองนี้จึงสามารถใช้ในการยืนยันว่าสเตรปตาวิดินถูกตรึงลงบนพื้นผิวของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์

2) การตรึง acpcPNA-Biotin ลงบนพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ถูกตรึงด้วยสเตรปตาวิดิน แบ่งเป็น 2 ขั้นตอนย่อยดังนี้

2.1) การทำกราฟมาตรฐานของ acpcPNA-Biotin (Biotin-CTACAAGCATAT-lys-NH_2)

โดยทำที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 µM โดยวิเคราะห์ด้วยเทคนิค UV-Vis spectrophotometry ที่ความยาวคลื่น 260 nm ดังภาพ 18



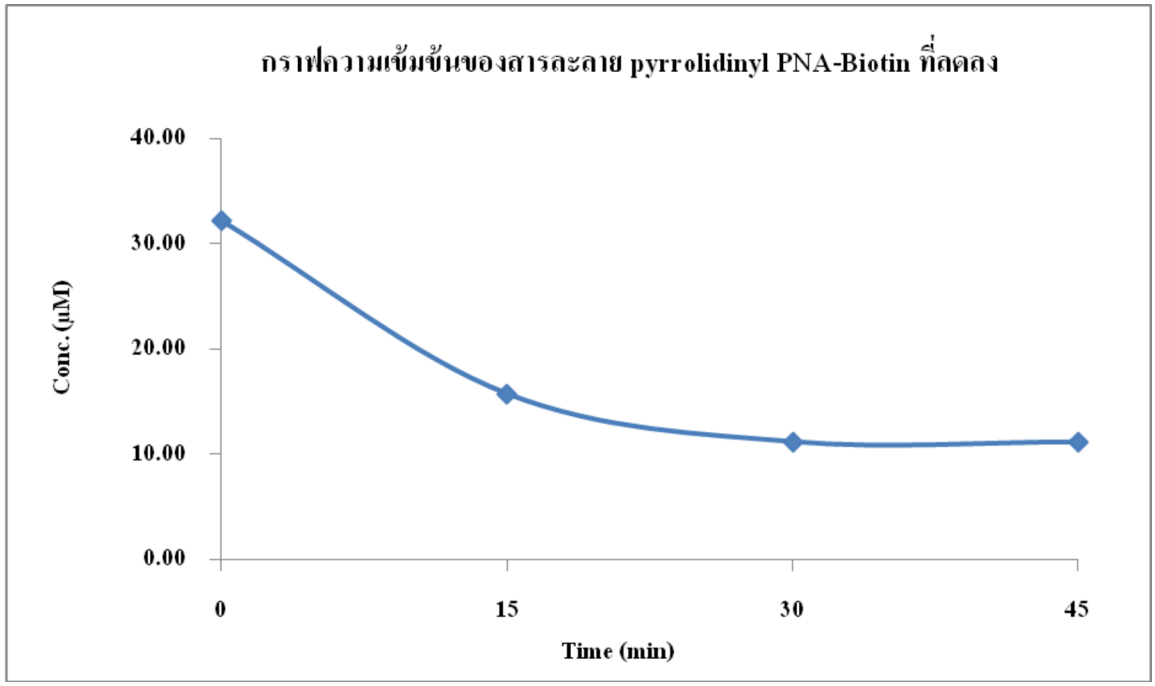
ภาพ 18 กราฟมาตรฐานของ acpcPNA-Biotin

จากกราฟมาตรฐาน acpcPNA-Biotin พบว่าได้กราฟเป็นเส้นตรง $R^2 = 0.9895$ ซึ่งถือเป็นค่าที่ยอมรับได้

2.2) การตรึง acpcPNA-Biotin ลงบนพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วยสเตรปตาวิดิน

โดยความเข้มข้นของ acpcPNA-Biotin เริ่มต้นเท่ากับ 32.15 µM หลังจากนั้นเติมอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ถูกตรึงด้วยสเตรปตาวิดินลงในสารละลาย acpcPNA-Biotin ทำการ sampling สารละลาย

acpcPNA-Biotin โดย sampling ทุก 15 นาที เป็นเวลา 45 นาที หลังจากนั้นนำสารละลาย acpcPNA-Biotin ที่ได้จากการ sampling ทุก 15 นาที มาทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค UV-Vis spectrophotometry ที่ความยาวคลื่น 260 nm นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ในแต่ล่ะช่วงเวลามาเทียบกับกราฟมาตรฐาน acpcPNA-Biotin ในรูปที่ 5 เพื่อคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลาย acpcPNA-Biotin ที่แต่ละช่วงเวลา จากนั้นนำมาสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้น (μM) กับ เวลา (นาที) ดังภาพ 19



ภาพ 19 กราฟความเข้มข้นของสารละลาย acpcPNA-Biotin ที่ลดลง หลังจากถูกตรึงลงบนพื้นผิวของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์

จากกราฟแสดงความเข้มข้นของสารละลาย acpcPNA-Biotin ที่ลดลง หลังจากการผสมกับอนุภาคนาโนแมกนีไทท์และทำการแยกอนุภาคออกแล้ว ซึ่งสอดคล้องกับความเข้มข้นของ acpcPNA-Biotin ที่ตรึงบนพื้นผิวอนุภาค จากผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของสารละลาย acpcPNA-Biotin เริ่มต้นเท่ากับ 32.15 μM และเริ่มลดลงที่เวลา 15 นาทีแรก (ลดลง 16.44 μM) หลังจากนั้นจะเริ่มลดลงและคงที่ในช่วงเวลา 30-45 นาที (ลดลง 21.01 μM) ซึ่งความเข้มข้นของ PNA ที่ลดลงสอดคล้องกับความเข้มข้นของ PNA ที่ถูกตรึงบนพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ จากกราฟแสดงความเข้มข้นของสารละลาย acpcPNA-Biotin ที่ลดลง สามารถใช้คำนวณหาปริมาณของ acpcPNA-Biotin ที่ถูกตรึงอยู่บนพื้นผิวของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ได้ดังตาราง 5 ซึ่งจากผลการทดลองพบว่ามีการตรึง acpcPNA-Biotin อยู่บนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์สูงสุด 126 pmol/mg ของ MNP

ตาราง 5 ความเข้มข้นของสารละลาย acpcPNA-Biotin ที่ถูกตรึงอยู่บนพื้นผิวของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ระยะเวลาการทำปฏิกิริยาต่างๆกัน

เวลา (นาที)	ความเข้มข้นของ PNA ในสารละลายที่ลดลง (μM)[a]	% yield[b]	ปริมาณ PNA บนอนุภาคแมกนีไทท์ (pmol/mg MNP)
0	0	0	0
15	16.44	51	99
30	20.99	65	126
45	21.01	65	126

[a] น้ำหนักของ streptavidin-grafted MNP ที่ใช้เป็น 5 mg และปริมาตรสารละลายเป็น 30 μL

[b] % yield เทียบกับความเข้มข้นของ acpcPNA-Biotin เริ่มต้นที่ใช้เป็น 32.15 μM

ขั้นตอนที่ 3. การประยุกต์ใช้อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง acpcPNA-Biotin แล้วมาใช้ในการทำให้ DNA บริสุทธิ์

1) ผลการทดลองการใช้ PNA1 เพื่อเป็น probe

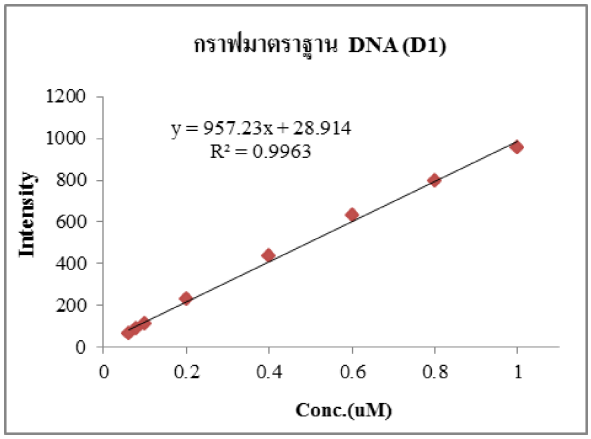
การศึกษาความจำเพาะเจาะจง (specificity) ของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึง PNA(P1) และอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ก่อนตรึง PNA(P1) (ตัวควบคุม) ในการยึดจับกับ DNA แต่ละลำดับเบส คือ DNA (D1), DNA (D2) หรือ DNA (D3) แบ่งออกเป็น 2 ส่วนย่อยดังนี้

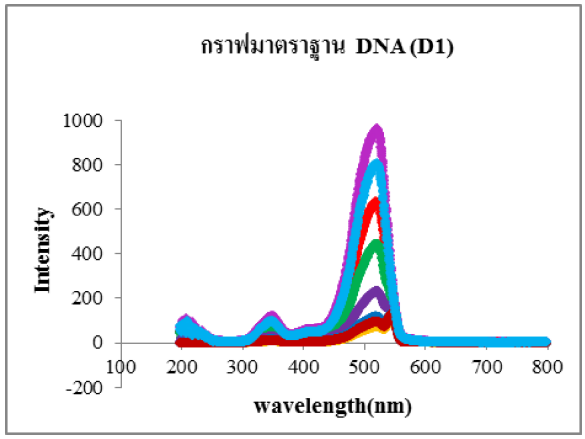
1.1 การสร้างกราฟมาตรฐานของ DNA แต่ละลำดับเบส ทั้ง 3 ลำดับเบส คือ DNA(D1), DNA(D2) หรือ DNA(D3) โดยทำที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.06, 0.08, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ1 μM แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Fluorescence spectroscopy ที่ความยาวคลื่นในการกระตุ้น(excitation wavelength) และความยาวคลื่นในการคายแสง (emission wavelength) ดัง**ตาราง** 6

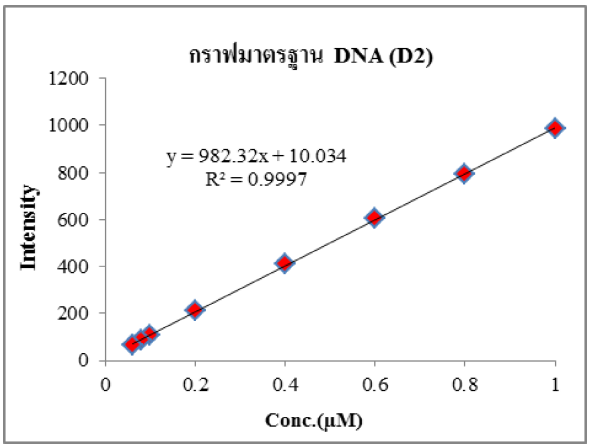
ตาราง 6 ความยาวคลื่นของ DNA ทั้ง 3 ลำดับเบส คือ D1, D2 และ D3

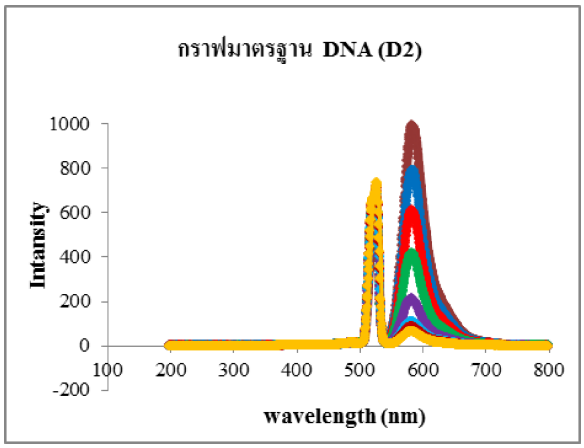
DNA	Excitation wavelength (nm)	Emission wavelength (nm)
D1 : 5'-ATATgCTTgTAg-FAM	494	521
D2 : 5'-CACgTTCCAggA-TAMRA	552	584
D3 : 5'-ATATgCATgTAg-TAMRA	552	584

กราฟมาตรฐานของ DNA แต่ละลำดับเบสมีลักษณะ ดังนี้ (ภาพ 20-22)



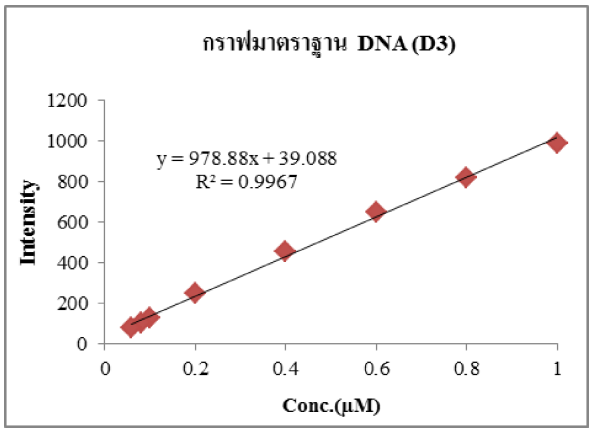


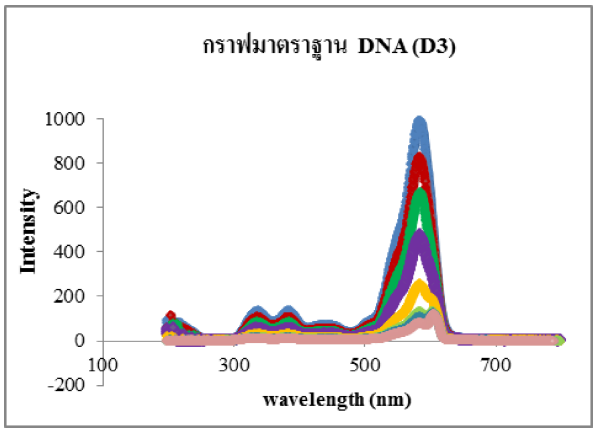




ภาพ 20 กราฟมาตรฐานของ DNA(D1, fully match)

ภาพ 21 กราฟมาตรฐานของ DNA(D2, fully mismatch)





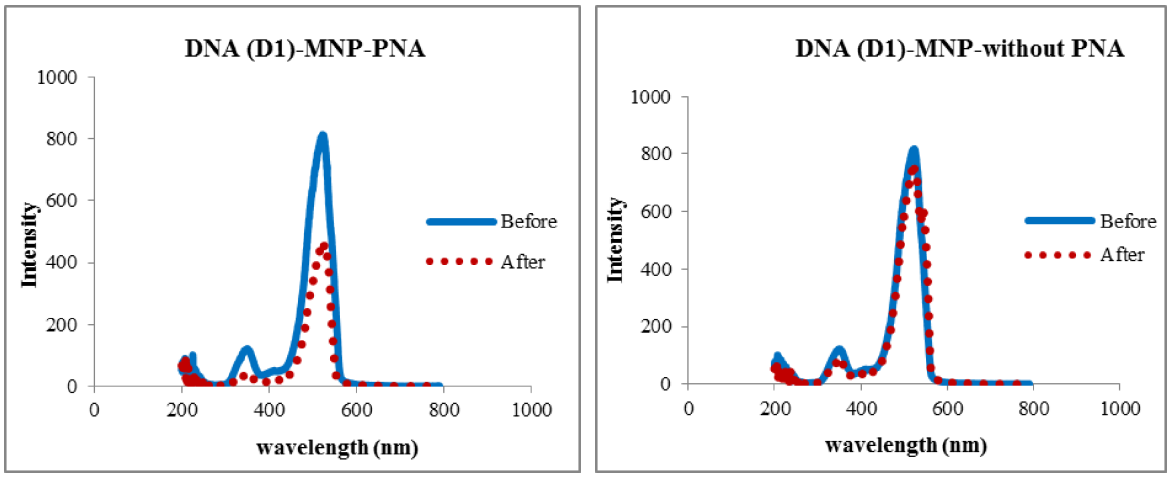
ภาพ 22 กราฟมาตรฐานของ DNA(D3, single based mismatch)

จากกราฟมาตรฐานของ DNA แต่ละลำดับเบส ทั้ง 3 ลำดับเบส คือ DNA (D1), DNA (D2) และ DNA (D3) พบว่าได้กราฟเป็นเส้นตรง R^2 = 0.9963, 0.9997 และ 0.9967 ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่า R^2 ที่ยอมรับได้ และเมื่อความเข้มข้นของ DNA เพิ่มขึ้น จะส่งผลให้ค่า Intensity สูงขึ้นด้วย

1.2 การศึกษาความจำเพาะเจาะจง (specificity) ของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึง PNA(P1) โดยการเติม DNA ทีละหนึ่ง sequence

การทดลองจะใช้อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึง PNA(P1) ยึดจับกับ DNA แต่ละลำดับเบส ทั้ง 3 ลำดับเบส คือ DNA(D1, full match), DNA(D2, full mismatch) หรือ DNA(D3, single based mismatch) โดยการเปรียบเทียบกับอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนการตรึง PNA(P1) (ตัวควบคุม) และทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Fluorescence spectroscopy และ Gel electrophoresis (agarose gel)

1.2.1 การใช้อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึง PNA(P1) และอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนการตรึง PNA(P1) (ตัวควบคุม) ยึดจับกับ DNA (D1, fully match) โดยความเข้มข้นของ DNA(D1, fully match) ที่ใช้เริ่มต้นเท่ากับ 0.8 µM ผลที่ได้แสดงดังภาพ 23

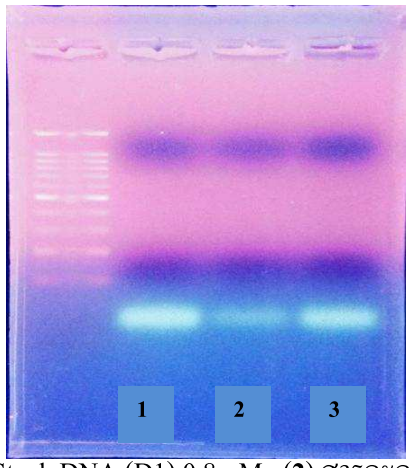


MNP-PNA = อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA (P1) และ MNP-without PNA = อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P1)(ตัวควบคุม))

ภาพ 23 สเปคตราของสารละลาย DNA(D1) เริ่มต้น และสารละลาย DNA(D1) ที่แยกออกมาจากหลังการเติมอนุภาคนาโนแมกนีไทท์แต่ละชนิด

จากภาพ 23 พบว่าสารละลาย DNA(D1, fully match) ที่แยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P1) (รูปซ้าย (เส้นประ)) มีค่าการคายแสงลดลงเมื่อเทียบกับสารละลายเริ่มต้น (รูปซ้าย (เส้นทึบ))

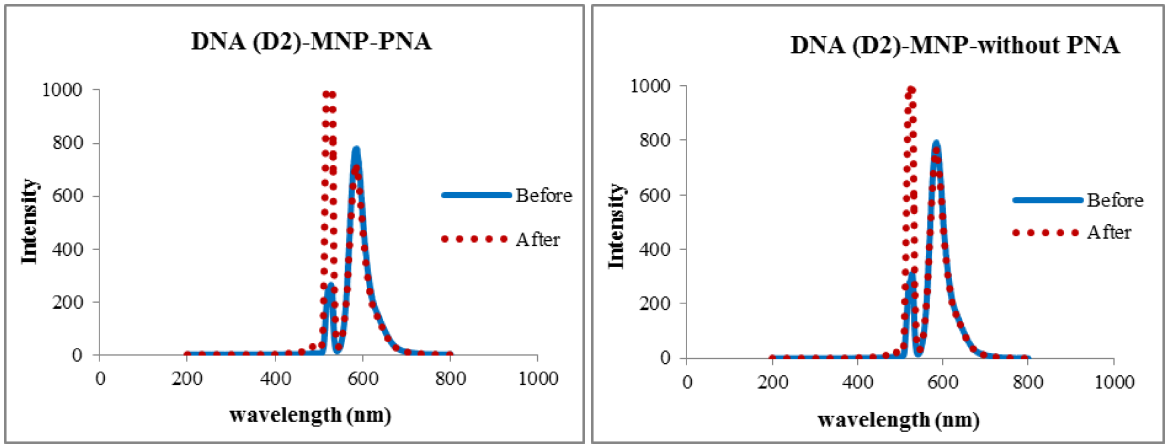
จากนั้นนำค่าการคายแสงมาคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานของ DNA(D1) พบว่ามีปริมาณของ DNA(D1) ลดลงคิดเป็น 45.73 % แสดงว่า DNA(D1) ถูกยึดจับลงบนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย PNA(P1) คิดเป็นปริมาณ 745.01 pmol ในกรณีของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P1) (ตัวควบคุม) พบว่าสารละลาย DNA(D1) ที่แยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P1) (ตัวควบคุม) มีค่าการคายแสงไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับสารละลายเริ่มต้น(รูปขวา) แสดงให้เห็นว่าไม่มี non specificity ระหว่างอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P1) กับ DNA(D1) นอกจากนี้เพื่อยืนยันการยึดจับของ DNA (D1) บนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย PNA(P1) จึงได้ทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Gel electrophoresis (agarose gel) โดยการเปรียบเทียบสารละลาย DNA (D1) เริ่มต้นกับสารละลายที่ถูกแยกออกจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์แต่ละชนิด ผลที่ได้แสดงดังภาพ 24



ภาพ 24 แถบของ DNA โดย (**1**) Stock DNA (D1) 0.8 μM, (**2**) สารละลาย DNA (D1) ที่ถูกแยกออกจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P1) และ (**3**) สารละลาย DNA(D1) ที่ถูกแยกออกจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P1)

จากภาพ 24 พบว่าแถบของสารละลาย DNA(D1) ที่ถูกแยกออกจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P1) (หมายเลข 2) มีลักษณะของแบนด์ที่เล็กและจางลง เมื่อเทียบกับแถบแบนด์หมายเลข 1 และ 3 แสดงให้เห็นว่า DNA(D1) มีปริมาณลดลงและถูกดูดจับบนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P1) ส่วนหมายเลข 3 คือ DNA(D1) ที่แยกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P1)(ตัวควบคุม) พบว่ามีขนาดแบนด์ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ Stock DNA(D1) เริ่มต้น (หมายเลข 1) แสดงให้เห็นว่า DNA(D1) ไม่ได้ถูกดูดจับบนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P1) รวมทั้งแสดงถึงความไม่มี non specificity ระหว่างอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P1) กับ DNA(D1) อีกด้วย

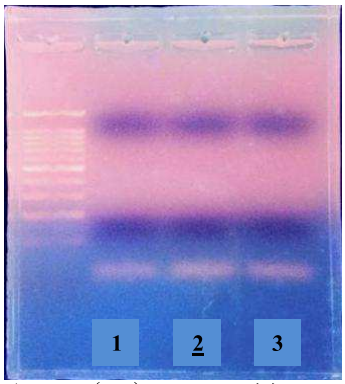
1.2.2 การใช้อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึง PNA(P1) แล้วยึดจับกับ DNA(D2, fully mismatch)โดยความเข้มข้นของ DNA(D2, fully mismatch) เริ่มต้นเท่ากับ 0.8 μM ผลที่ได้แสดงดังภาพ 25



MNP-PNA = อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P1) และ MNP-without PNA = อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P1)(ตัวควบคุม))

ภาพ 25 สเปคตราของสารละลาย DNA (D2) เริ่มต้น และสารละลาย DNA (D2) ที่แยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์แต่ละชนิด

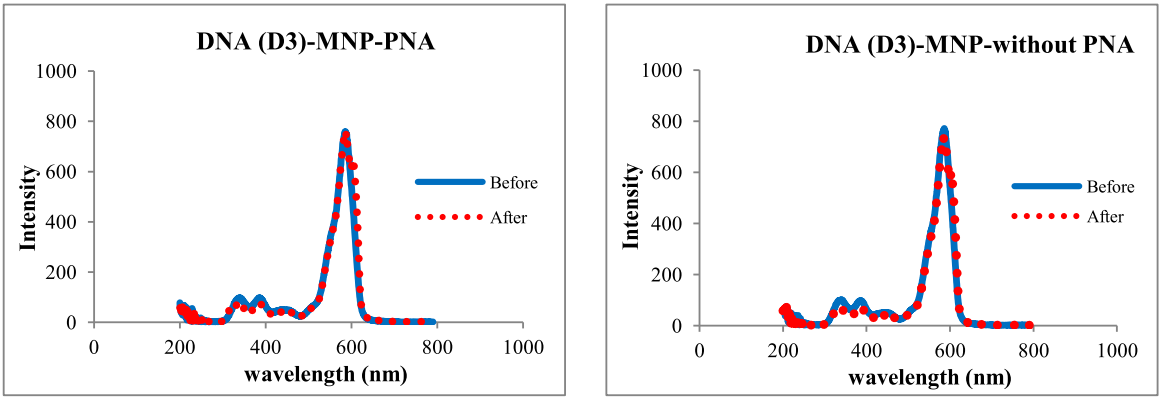
จากภาพ 25 พบว่าสารละลาย DNA (D2, fully mismatch) ที่แยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P1) มีค่าการคายแสงไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับสารละลายเริ่มต้น (รูปซ้าย) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า DNA(D2) ไม่ถูกยึดจับลงบนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย PNA (P1) และในกรณีของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P1)(ตัวควบคุม) พบว่าสารละลาย DNA (D2) ที่แยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P1)(ตัวควบคุม) มีค่าการคายแสงไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับสารละลายเริ่มต้น (รูปขวา) เช่นเดียวกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไม่มี non specificity ระหว่างอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P1) กับ DNA(D2) นอกจากนี้ เพื่อยืนยันการยึดจับของ DNA (D2) บนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย PNA(P1) จึงได้ทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Gel electrophoresis (agarose gel) โดยการเปรียบเทียบสารละลาย DNA(D2) เริ่มต้นกับสารละลาย DNA(D2) ที่ถูกแยกออกจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์แต่ละชนิด ผลที่ได้แสดงดังภาพ 26



ภาพ 26 แถบของ DNA โดย **(1)** Stock DNA(D2) 0.8 µM, **(2)** สารละลาย DNA(D2) ที่ถูกแยกออกจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P1) และ **(3)** สารละลาย DNA(D2) ที่ถูกแยกออกจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P1)

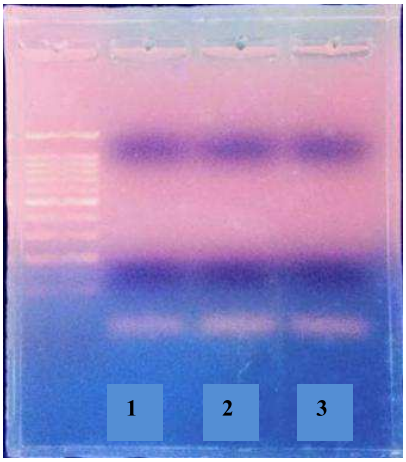
จากภาพ 26 พบว่าแถบของ DNA(D2) ทั้ง 3 แบนด์ มีขนาดของแบนด์ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่า DNA(D2, fully mismatch) ไม่ได้ถูกยึดจับลงบนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P1) (หมายเลข 2) และอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P1)(ตัวควบคุม) (หมายเลข 3) เมื่อเปรียบเทียบกับแถบของ DNA(D2) เริ่มต้น (หมายเลข 1)

1.2.3 การใช้อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึง PNA(P1) แล้วยึดจับกับ DNA (D3, single base mismatch)โดยความเข้มข้นของ DNA(D3, single based mismatch) เริ่มต้นเท่ากับ 0.8 µM ผลที่ได้แสดงดังภาพ 27



ภาพ 27 สเปคตราของสารละลาย DNA(D3) เริ่มต้น และสารละลาย DNA(D3) ที่แยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์แต่ละชนิด โดย MNP-PNA = อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P1) และ MNP-without PNA = อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P1)(ตัวควบคุม))

จากภาพ 27 พบว่าสารละลาย DNA(D3, single-based mismatch) ที่แยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P1) มีค่าการคายแสงไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับสารละลายเริ่มต้น (รูปซ้าย) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า DNA(D3) ไม่ถูกยึดจับลงบนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย PNA(P1) และในกรณีของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P1) (ตัวควบคุม) พบว่าสารละลาย DNA(D3) ที่แยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P1) (ตัวควบคุม) มีค่าการคายแสงไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับสารละลายเริ่มต้น (รูปขวา) เช่นเดียวกัน จากนั้นทำการยืนยันการยึดจับของ DNA (D3) บนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย PNA(P1) ด้วยเทคนิค Gel electrophoresis (agarose gel) โดยการเปรียบเทียบสารละลาย DNA (D3) เริ่มต้นกับสารละลายที่ถูกแยกออกจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์แต่ละชนิด ผลที่ได้แสดงดังภาพ 28

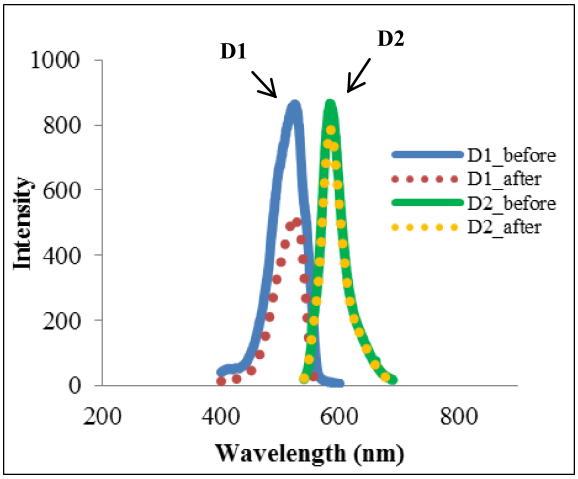


ภาพ 28 แถบของ DNA โดย **(1)** Stock DNA (D3) 0.8 μM, **(2)** สารละลาย DNA (D3) ที่ถูกแยกออกจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA (P1) และ **(3)** สารละลาย DNA (D3) ที่ถูกแยกออกจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P1)

จากภาพ 28 พบว่าแถบของ DNA(D3, single based mismatch) ทั้ง 3 แบนด์มีขนาดของแบนด์ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่า DNA(D3) ไม่ได้ถูกยึดจับลงบนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P1) (หมายเลข 2) และอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P1)(ตัวควบคุม) (หมายเลข 3)

1.3 การศึกษาความจำเพาะเจาะจง (specificity) ของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึง PNA(P1) โดยการเติม DNA ทีละสอง sequence (DNA mixture ของ D1+D2 และ D1+D3) แบ่งผลการทดลองออกเป็น 2 ส่วนดังนี้

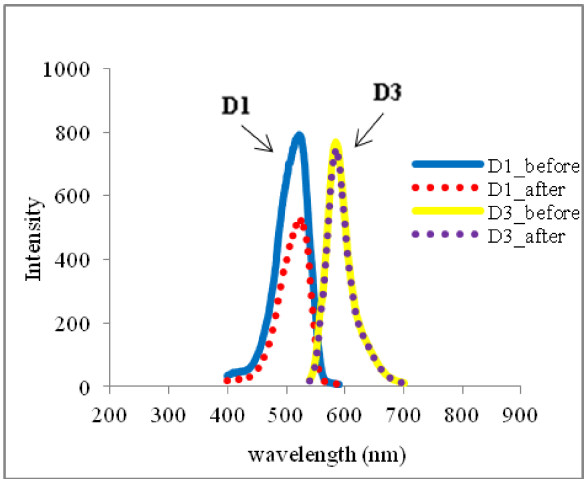
1.3.1 การศึกษาความจำเพาะเจาะจง (specificity) ของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึง PNA(P1) ในการยึดจับกับ DNA แบบผสม 2 ลำดับเบส ระหว่าง DNA(D1, fully match) + DNA(D2, fully mismatch) ผลที่ได้แสดงดังภาพ 29



ภาพ 29 สเปคตราของสารละลาย DNA(D1) + DNA(D2) เริ่มต้น และสารละลาย DNA(D1) + DNA(D2) ที่แยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์

จากภาพ 29 พบว่าสเปคตรัมของสารละลาย DNA ผสม DNA(D1)+ DNA(D2) ที่แยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P1) พบว่า ในส่วนที่เป็น DNA(D1) (เส้นประ) มีค่าการคายแสงลดลงเมื่อเทียบกับสารละลาย DNA(D1) เริ่มต้น (เส้นทึบ) จากนั้นนำค่าการคายแสงมาคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานของ DNA(D1) พบว่า DNA(D1) มีปริมาณลดลงคิดเป็น 42.42 % แสดงให้เห็นว่า DNA(D1) ถูกยึดจับลงบนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย PNA(P1) ส่วนปริมาณของ DNA(D2) ในสารละลายผสม DNA(D1) + DNA(D2) (เส้นประ) ที่แยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P1) พบว่า มีค่าการคายแสงไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับสารละลายเริ่มต้น (เส้นทึบ) ซึ่งแสดงว่า DNA(D2) ไม่ได้ถูกยึดจับลงบนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย PNA(P1)

1.3.2 การศึกษาความจำเพาะเจาะจง (specificity) ของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึง PNA(P1) ในการยึดจับกับ DNA แบบผสม 2 ลำดับเบส ระหว่าง DNA(D1, fully match) + DNA(D3, single based mismatch) ผลที่ได้แสดงดังภาพ 30



ภาพ 30 สเปคตราของสารละลายDNA(D1) + DNA(D3) เริ่มต้น และสารละลาย DNA(D1) + DNA(D3) ที่แยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์

จากภาพ 30 สเปคตราของสารละลาย DNA ผสม DNA(D1) + DNA(D3) ที่แยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P1) พบว่า DNA(D1) (เส้นประ) มีค่าการคายแสงลดลงเมื่อเทียบกับสารละลาย DNA(D1) เริ่มต้น(เส้นทึบ) จากนั้นนำค่าการคายแสงมาคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานของ DNA(D1) พบว่า DNA(D1) มีปริมาณลดลงคิดเป็น 40.66 % แสดงว่า DNA(D1) ในสารละลายผสม DNA(D1) + DNA(D3) ถูกยึดจับลงบนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย PNA(P1) ส่วนปริมาณของ DNA(D3) ในสารละลายผสม DNA(D1) + DNA(D3) (เส้นประ) พบว่า มีค่าการคายแสงไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับสารละลายเริ่มต้น(เส้นทึบ) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า DNA(D3) ไม่ได้ถูกยึดจับลงบนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย PNA(P1)

จากผลการทดลองข้างต้นสามารถกล่าวได้ว่าอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P1) มีความจำเพาะเจาะจงสูงซึ่งสามารถเลือกยึดจับกับ DNA ที่มีลำดับเบสที่เป็นคู่สมกันเท่านั้นโดยการยืนยันด้วยเทคนิค Fluorescence spectroscopy ดังนั้นในขั้นตอนต่อไปจึงนำเอาอนุภาคนาโนแมกนีไทท์มาใช้กับ DNA จริงเพื่อเป็นอนุภาคในการทำให้ DNA บริสุทธิ์

2) การใช้ PNA2 (มีลำดับเบสสอดคล้องกับลำดับเบสของ zein gene ของข้าวโพด) เพื่อเป็น probe

2.1 การศึกษาความจำเพาะเจาะจง (specificity) ของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึง PNA(P2) และอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ก่อนตรึง PNA(P2) (ตัวควบคุม) ในการยึดจับกับ DNA แต่ละลำดับเบส คือ DNA(D1), DNA(D2) หรือ DNA(D3) โดยแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน ดังนี้

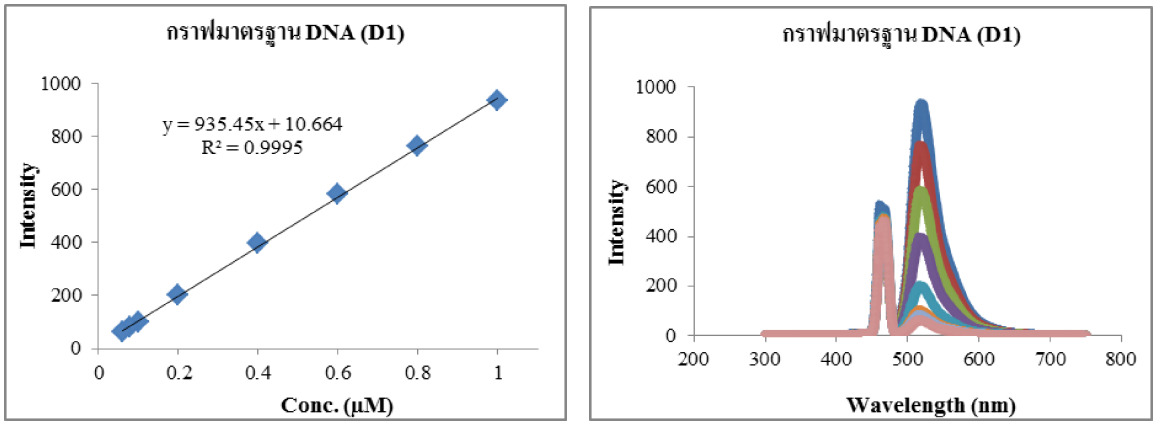
2.1.1 กราฟมาตรฐานของ DNA แต่ละลำดับเบส ทั้ง 3 ลำดับเบส คือ DNA(D1), DNA(D2) หรือ DNA(D3) โดยทำที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.06, 0.08, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 µM แล้วนำมาวิเคราะห์

ด้วยเทคนิค Fluorescence spectrophotometry ที่ความยาวคลื่นในการกระตุ้น(excitation wavelength) และความยาวคลื่นในการคายแสง (emission wavelength) ดังตาราง 7

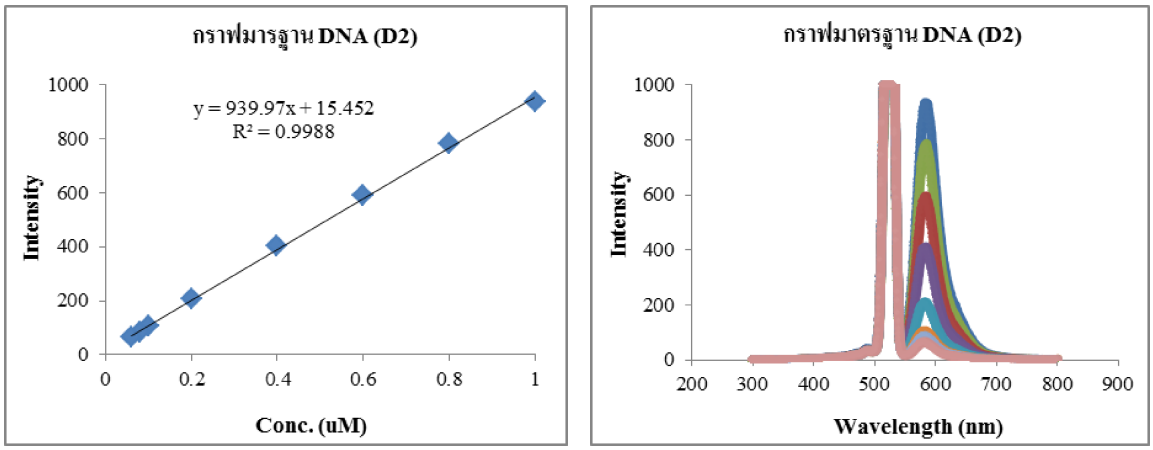
ตาราง 7 ความยาวคลื่นของ DNA ทั้ง 3 ลำดับเบส คือ D1, D2 และ D3

Sequence of DNAs	Excitation wavelength (nm)	Emission wavelength (nm)
D1 : 5'-ACATTGTGGCAT-FAM	494	521
D2 : 5'-TGCGATCCATGC-TAMRA	552	584
D3 : 5'- ACATTATGGCAT-Cy5	650	670

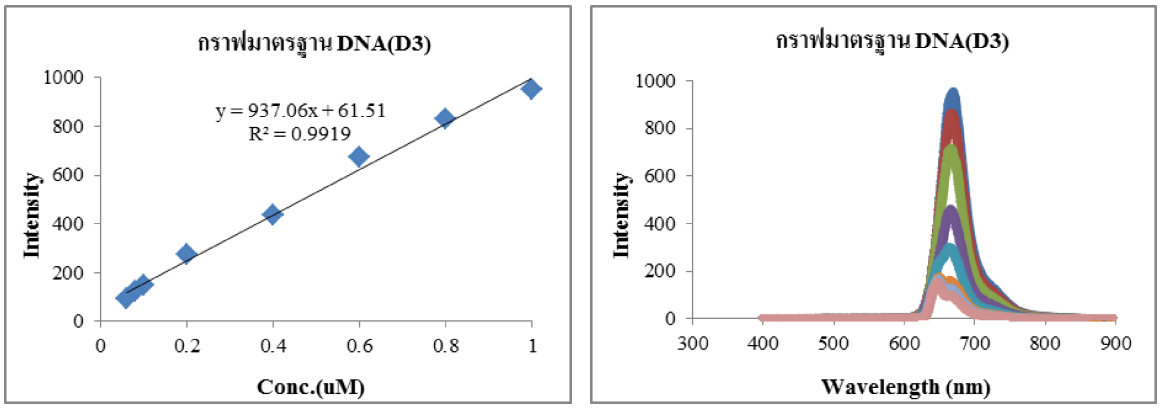
โดยกราฟมาตรฐานของ DNA แต่ละลำดับเบสมีลักษณะ ดังนี้



ภาพ 31 กราฟมาตรฐานของ DNA(D1)



ภาพ 32 กราฟมาตรฐานของ DNA(D2)

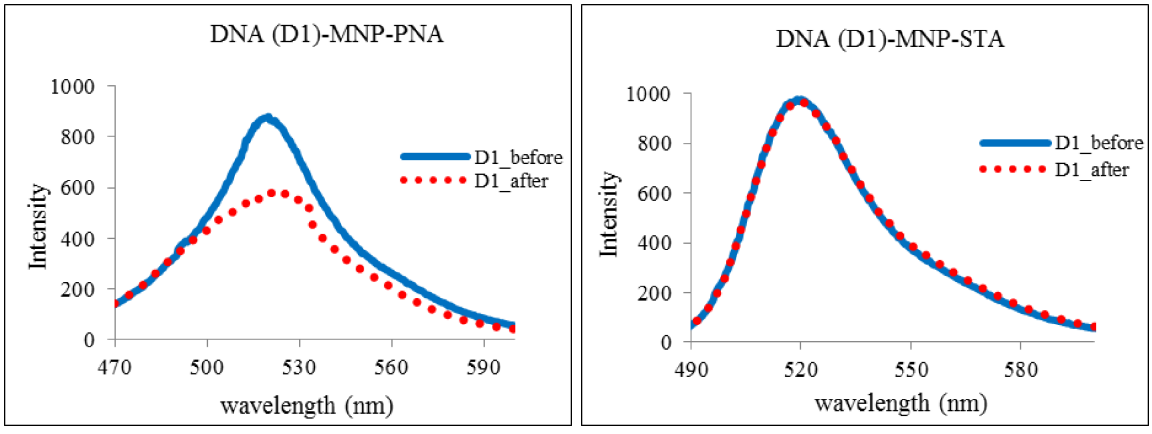


ภาพ 33 กราฟมาตรฐานของ DNA(D3)

จากกราฟมาตรฐานของ DNA แต่ละลำดับเบส ทั้ง 3 ลำดับเบส คือ DNA(D1), DNA(D2) และ DNA(D3) พบว่าได้กราฟเป็นเส้นตรงโดยค่า R^2 = 0.9995, 0.9988 และ 0.9919 ตามลำดับ ซึ่งถือเป็นค่าที่ยอมรับได้ และเมื่อความเข้มข้นของ DNA เพิ่มขึ้น จะส่งผลให้ค่า Intensity สูงขึ้นด้วย

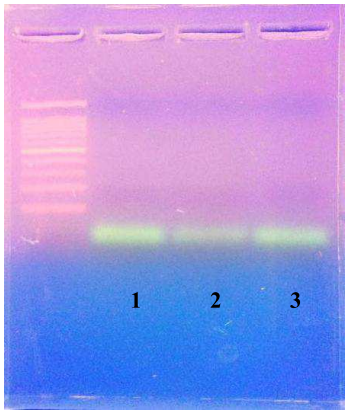
2.1.2 การศึกษาความจำเพาะเจาะจง (specificity) ของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึง PNA(P2) โดยใช้อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึง PNA(P2) ยึดจับกับ DNA แต่ละลำดับเบส ทั้ง 3 ลำดับเบส คือ DNA(D1), DNA(D2) หรือ DNA(D3) โดยการเปรียบเทียบกับอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนการตรึง PNA(P2) (ตัวควบคุม) และทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Fluorescence spectrophotometry และ Gel electrophoresis (agarose gel)

ก) การใช้อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึง PNA(P2) และอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนการตรึง PNA(P2)(ตัวควบคุม) ยึดจับกับ DNA(D1, fully match) โดยความเข้มข้นของ DNA(D1) ที่ใช้เริ่มต้นเท่ากับ 0.9 μM ผลที่ได้แสดงดังภาพ 34



ภาพ 34 สเปคตราของสารละลาย DNA(D1) เริ่มต้น และสารละลาย DNA(D1) ที่แยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์แต่ละชนิด โดย MNP-PNA = อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P2) และ MNP-STA = อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P2) (ตัวควบคุม))

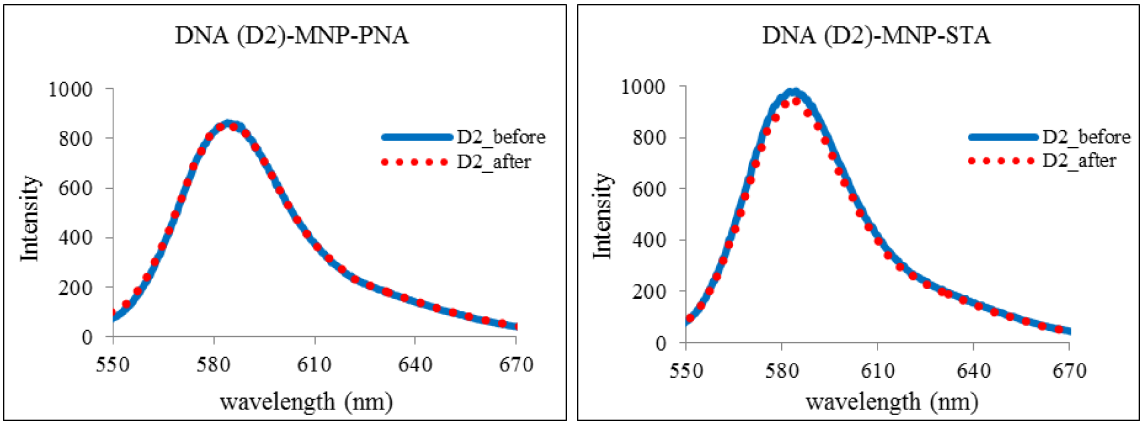
จากรูป 7 พบว่าสารละลาย DNA(D1) ที่แยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P2) (รูปซ้าย (เส้นประ)) มีค่าการคายแสงลดลงเมื่อเทียบกับสารละลายเริ่มต้น (รูปซ้าย (เส้นทึบ)) จากนั้นนำค่าการคายแสงมาคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานของ DNA(D1) พบว่ามีปริมาณของ DNA(D1) ลดลงคิดเป็น 32 % แสดงว่า DNA(D1) ถูกยึดจับลงบนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย PNA(P2) คิดเป็นปริมาณ 297 pmol DNA nucleotide/mg MNP ในกรณีของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P2)(ตัวควบคุม) พบว่าสารละลาย DNA(D1) ที่แยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P2)(ตัวควบคุม) มีค่าการคายแสงไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับสารละลายเริ่มต้น(รูปขวา) แสดงให้เห็นว่าไม่มี non specificity ระหว่างอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P2) กับ DNA(D1) นอกจากนี้ เพื่อยืนยันการยึดจับของ DNA(D1) บนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย PNA(P2) จึงได้ทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Gel electrophoresis (agarose gel) โดยการเปรียบเทียบสารละลาย DNA(D1) เริ่มต้นกับสารละลายที่ถูกแยกออกจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์แต่ละชนิด ผลที่ได้แสดงดังภาพ 35



ภาพ 35 แถบของ (1) DNA (1) Stock DNA(D1) 0.9 μM (2) สารละลาย DNA(D1) ที่ถูกแยกออกจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P2) (3) สารละลาย DNA(D1) ที่ถูกแยกออกจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P2)

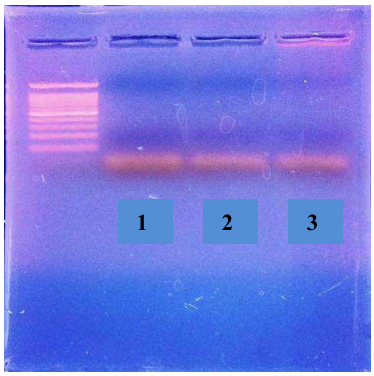
จากภาพ 35 พบว่าแถบของ สารละลาย DNA(D1) ที่ถูกแยกออกจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P2) (หมายเลข 2) มีลักษณะของแบนด์ที่เล็กและจางลง เมื่อเทียบกับแถบแบนด์หมายเลข 1 และ 3 แสดงให้เห็นว่า DNA(D1) มีปริมาณลดลงและถูกดูดจับบนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P2) ส่วนหมายเลข 3 คือ DNA(D1) ที่แยกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P2)(ตัวควบคุม) พบว่ามีขนาดแบนด์ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ Stock DNA(D1) เริ่มต้น (หมายเลข 1) แสดงให้เห็นว่า DNA(D1) ไม่ได้ถูกดูดจับบนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P2) รวมทั้งแสดงถึงความไม่มี non specificity ระหว่างอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P2) กับ DNA(D1) อีกด้วย

ข) การใช้อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึง PNA(P2) แล้วยึดจับกับ DNA(D2, full mismatch) โดยความเข้มข้นของ DNA(D2) เริ่มต้นเท่ากับ 0.9 µM ผลที่ได้แสดงดังภาพ 36



ภาพ 36 สเปคตราของสารละลาย DNA(D2) เริ่มต้น และสารละลาย DNA(D2) ที่แยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์แต่ละชนิด โดย MNP-PNA = อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P2) และ MNP-STA = อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P2)(ตัวควบคุม))

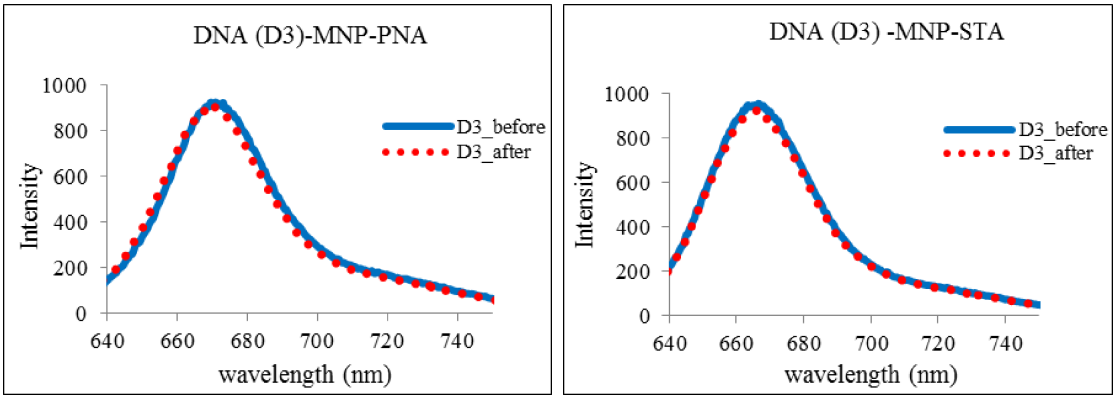
จากภาพ 36 พบว่าสารละลาย DNA(D2) ที่แยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P2) มีค่าการคายแสงไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับสารละลายเริ่มต้น (รูปซ้าย) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าDNA(D2) ไม่ถูกยึดจับลงบนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย PNA(P2) และในกรณีของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P2)(ตัวควบคุม) พบว่าสารละลาย DNA(D2) ที่แยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P2)(ตัวควบคุม) มีค่าการคายแสงไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับสารละลายเริ่มต้น (รูปขวา) เช่นเดียวกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไม่มี non specificity ระหว่างอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P2) กับ DNA(D2) นอกจากนี้ เพื่อยืนยันการยึดจับของ DNA(D2) บนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย PNA(P2) จึงได้ทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Gel electrophoresis (agarose gel) โดยการเปรียบเทียบสารละลาย DNA(D2) เริ่มต้นกับสารละลาย DNA(D2) ที่ถูกแยกออกจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์แต่ละชนิด ผลที่ได้แสดงดังภาพ 37



ภาพ 37 แถบของ (1) DNA (1) Stock DNA(D2) 0.9 µM (2) สารละลาย DNA(D2) ที่ถูกแยกออกจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P2) (3) สารละลาย DNA(D2) ที่ถูกแยกออกจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P2)

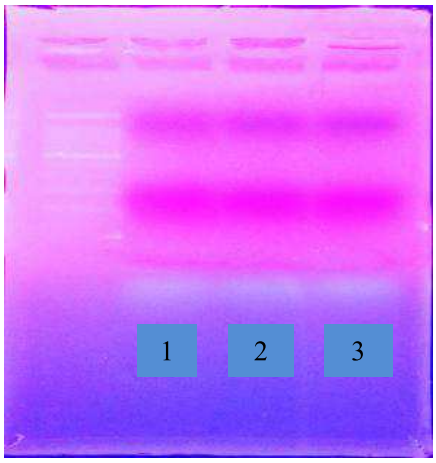
จากภาพ 37 พบว่าแถบของ DNA(D2) ทั้ง 3 แบนด์ มีขนาดของแบนด์ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่า DNA(D2) ไม่ได้ถูกยึดจับลงบนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P2) (หมายเลข 2) และอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P2)(ตัวควบคุม) (หมายเลข 3) เมื่อเปรียบเทียบกับแถบของ DNA(D2) เริ่มต้น (หมายเลข 1)

ค) การใช้อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึง PNA(P2) แล้วยึดจับกับ DNA(D3, single-base mismatch) โดยความเข้มข้นของ DNA(D3) เริ่มต้นเท่ากับ 0.9 µM ผลที่ได้แสดงดังภาพ 38



ภาพ 38 สเปคตราของสารละลาย DNA(D3) เริ่มต้น และสารละลาย DNA(D3) ที่แยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์แต่ละชนิด โดย MNP-PNA = อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P2) และ MNP-STA = อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P2)(ตัวควบคุม))

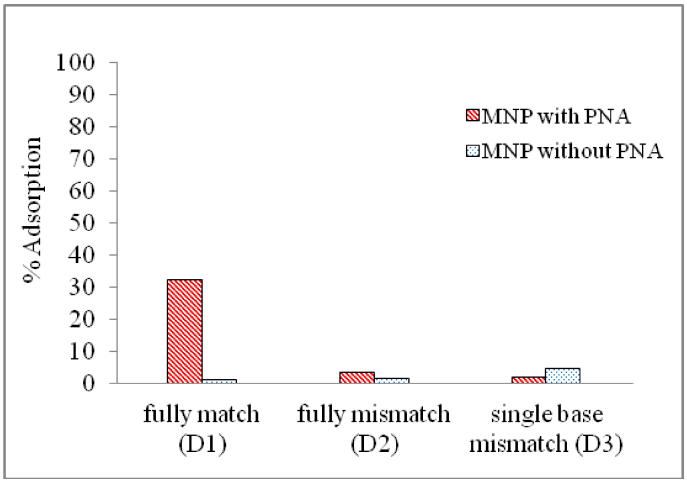
จากภาพ 38 พบว่าสารละลาย DNA(D3) ที่แยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P2) มีค่าการคายแสงไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับสารละลายเริ่มต้น (รูปซ้าย) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า DNA(D3) ไม่ถูกยึดจับลงบนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย PNA(P2) และในกรณีของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P2)(ตัวควบคุม) พบว่าสารละลาย DNA(D3) ที่แยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P2)(ตัวควบคุม) มีค่าการคายแสงไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับสารละลายเริ่มต้น (รูปขวา) เช่นเดียวกัน นอกจากนี้ เพื่อยืนยันการยึดจับของ DNA(D2) บนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย PNA(P2) จึงได้ทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Gel electrophoresis (agarose gel) โดยการเปรียบเทียบสารละลาย DNA(D2) เริ่มต้นกับสารละลาย DNA(D2) ที่ถูกแยกออกจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์แต่ละชนิด ผลที่ได้แสดงดังภาพ 39



ภาพ 39 แถบของ (1) DNA (1) Stock DNA(D3) 0.9 µM (2) สารละลาย DNA(D3) ที่ถูกแยกออกจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P2) (3) สารละลาย DNA(D3) ที่ถูกแยกออกจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P2)

จากภาพ 39 พบว่าแถบของ DNA(D3) ทั้ง 3 แบนด์ มีขนาดของแบนด์ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่า DNA(D3) ไม่ได้ถูกยึดจับลงบนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P2) (หมายเลข 2) และอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึง PNA(P2)(ตัวควบคุม) (หมายเลข 3) เมื่อเปรียบเทียบกับแถบของ DNA(D3) เริ่มต้น (หมายเลข 1)

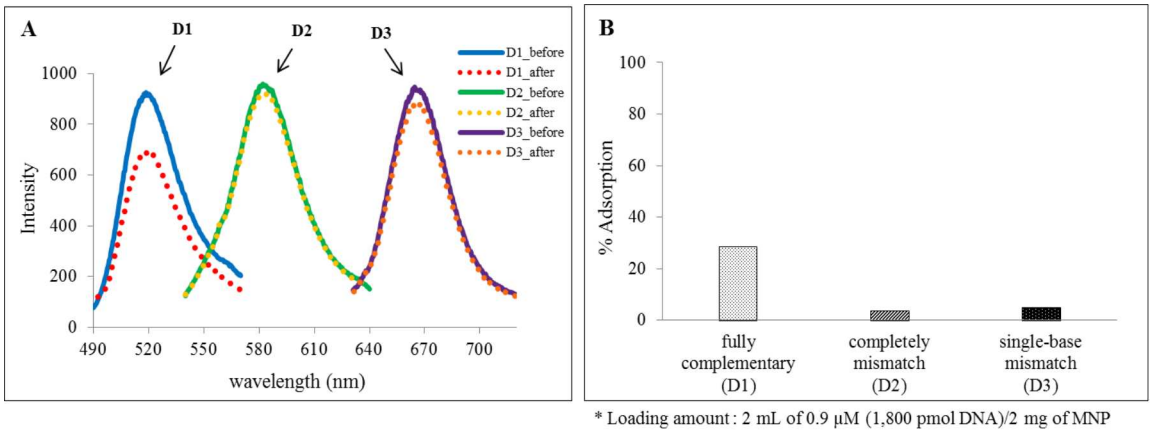
โดยรูปกราฟเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การดูดซับของ DNA (D1-D3) บนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่มีการตรึง PNA และอนุภาคที่ไม่มีการตรึง PNA แสดงดังภาพ 40



ภาพ 40 เปอร์เซ็นต์การดูดซับของ DNA (D1-D3) บนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์

2.2 การศึกษาการใช้อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึง PNA(P2) มายึดจับกับ DNA แบบผสม 3 ลำดับเบส ระหว่าง DNA(D1), DNA(D2) และ DNA(D3)

โดยความเข้มข้นเริ่มต้นของ DNA แต่ละลำดับเบสเท่ากับ 0.9 µM จากนั้นนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Fluorescence spectrophotometry ผลที่ได้แสดงดังภาพ 41



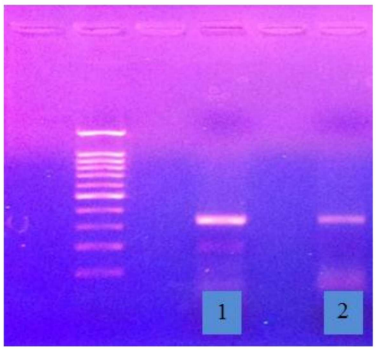
ภาพ 41 (A) สเปคตราของสารละลาย DNA แบบผสม 3 ลำดับเบสเริ่มต้น และสารละลาย DNA แบบผสม 3 ลำดับเบส ที่แยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ และ (B) เปอร์เซ็นต์การดูดซับของ DNA (D1-D3) แบบผสมบนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์

จากภาพ 41(A) พบว่าสเปคตรัมของสารละลาย DNA แบบผสม 3 ลำดับเบส ระหว่าง DNA(D1), DNA(D2) และ DNA(D3) ที่แยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P2) พบว่า ในส่วนที่เป็น DNA(D1) (เส้นประ) มีค่าการคายแสงลดลงเมื่อเทียบกับสารละลาย DNA(D1) เริ่มต้น (เส้นทึบ) จากนั้นนำ

ค่าการคายแสงมาคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานของ DNA(D1) พบว่ามีปริมาณลดลงคิดเป็น 29 % (ดังภาพ 41(B)) แสดงให้เห็นว่า DNA(D1) ถูกยึดจับลงบนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย PNA(P2) คิดเป็นปริมาณ 290 pmol DNA nucleotide/mg MNP ส่วนปริมาณของ DNA(D2) และ DNA(D3) ในสารละลายผสม (เส้นจุดประ) ที่แยกออกมาจากอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึง PNA(P2) พบว่า มีค่าการคายแสงไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับสารละลายเริ่มต้น(เส้นทึบ) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า DNA(D2) และ DNA(D3) ไม่ได้ถูกยึดจับลงบนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย PNA(P2)

2.3 การศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการยึดจับของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย PNA(P2) กับ DNA จริงที่สกัดจากข้าวโพด

การศึกษาเพื่อยืนยันว่าอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย PNA(P2) สามารถยึดจับกับ DNA ที่มีลำดับเบสที่เป็นคู่สมกันเท่านั้น จึงนำมาทดสอบกับ DNA ตัวอย่างจริงที่สกัดมาจากข้าวโพดดังขั้นตอนที่กล่าวมาข้างต้น เมื่อนำสารละลาย DNA ตัวอย่างที่ทำพีซีอาร์แล้วมาทดสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟริซิส (Electrophoresis) โดยใช้อะกาโรสเจล พบว่า DNA ตัวอย่างแสดงแถบขึ้นตรงตำแหน่งเดียวกับ DNA จริงของข้าวโพด (ภาพ 42) แสดงว่า DNA ตัวอย่างที่ถูกล้างออกมาจากอนุภาคมีลำดับเบสเช่นเดียวกับ DNA จริงของข้าวโพด นอกจากนี้ยังได้ทำการยืนยันผลการทดลองที่ได้ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิทรี (UV-Vis spectrophotometry) โดยเปรียบเทียบระหว่าง DNA ตัวอย่างที่ถูกล้างออกมาจากอนุภาคก่อนและหลังนำไปเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของ DNA ตัวอย่างหลังจากนำไปเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของ DNA ตัวอย่างก่อนทำ PCR แสดงว่า DNA ตัวอย่างที่ถูกล้างออกมาจากอนุภาค คือ DNA ตัวอย่างจริงที่สกัดมาจากข้าวโพด จากผลการทดลองสามารถกล่าวได้ว่าอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย PNA(P2) สามารถแยก DNA ที่มีลำดับเบสที่เป็นคู่สมกันได้จาก DNA จริงที่สกัดมาจากข้าวโพด (ภาพ 42)



(1) Initial real DNA of corn
(2) Real DNA of corn after desorption from MNPs and then PCR

ภาพ 42 แถบของ real DNA ที่สกัดจากข้าวโพด หลังจากล้างออกจากพื้นผิวของอนุภาคนาโนแมก นีไทท์และนำไปเพิ่มความเข้มข้นด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) โดยใช้เทคนิคอิเล็กโทรโฟริซิส(Electrophoresis) แบบอะกาโรสเจล

<u>สรุปผลการทดลองแนวทางที่ 1</u>

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่มีการดัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิเอ็นอะไคโลอิลไกลซีน ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่สามารถตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและพีเอชจากปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน ทำให้อนุภาคนาโนแมกนีไทท์มีพื้นผิวเป็นประจุลบที่ยังคงคุณสมบัติความเป็นแม่เหล็กสูง สามารถกระจายตัวได้ดีขึ้นเมื่อกระจายตัวในน้ำ และส่งผลให้อนุภาคมีขนาดเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน ซึ่งเมื่อพิจารณาขนาดไฮโดรไดนามิกของอนุภาคพบว่าอยู่ในช่วง 300-500 นาโนเมตร และมีค่าประจุลบเท่ากับ -45.4 มิลลิโวลต์ เมื่อกระจายตัวอยู่ในน้ำ โดยดีกรีของประจุลบบนพื้นผิวของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์จะมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อสารละลายมีค่าพีเอชเพิ่มขึ้น(ความเป็นเบสเพิ่มขึ้น) อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ถูกเคลือบด้วยพอลิเอ็นอะไคโลอิลไกลซีนถูกนำมาตรึงด้วยสเตรปตาวิดินผ่านปฏิกิริยาควบคู่ (amino acid coupling) พบว่ามีขนาดเพิ่มขึ้นเป็น 736.5 นาโนเมตร และจากการศึกษาการตรึง acpcPNA ที่มีหมู่ปลายเป็นไบโอตินโดยอาศัยความจำเพาะเจาะจงระหว่างสเตรปตาวิดินกับไบโอติน พบว่ามีปริมาณของ acpcPNA ที่ถูกตรึงลงบนพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทท์เท่ากับ 126 pmol/mg ของ MNP และจากการศึกษาการนำอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย acpcPNA เป็นโพรบเพื่อใช้ในการทดสอบการแยก DNA ทั้งใน DNA สังเคราะห์และ DNA จริงที่สกัดจากข้าวโพด โดยทำเปรียบเทียบกับตัวควบคุมกล่าวคือ อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึงด้วย acpcPNA พบว่า acpcPNA โพรบ มีความสามารถในการแยก DNA ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับลำดับเบสของ PNA ได้ ดังนั้นจากการศึกษางานวิจัยนี้พบว่า อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่มีการดัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิเอ็นอะไคโลอิลไกลซีน (PNAG) แล้วตรึงด้วย acpcPNA เพื่อเป็นโพรบสามารถประยุกต์ใช้เป็นวัสดุในการจำแนกและเพิ่มความเข้มของ DNA จากตัวอย่างจริงได้

แนวทางที่ 2 การดัดแปรพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ด้วย PAA เพื่อนำใช้มาตรึงกับ acpcPNA ด้วยแรงระหว่างประจุ (electrostatic interaction)

<u>วิธีการทดลอง</u>

วิธีดำเนินการทดลองในแนวทางที่ 2 แบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอนหลักดังนี้

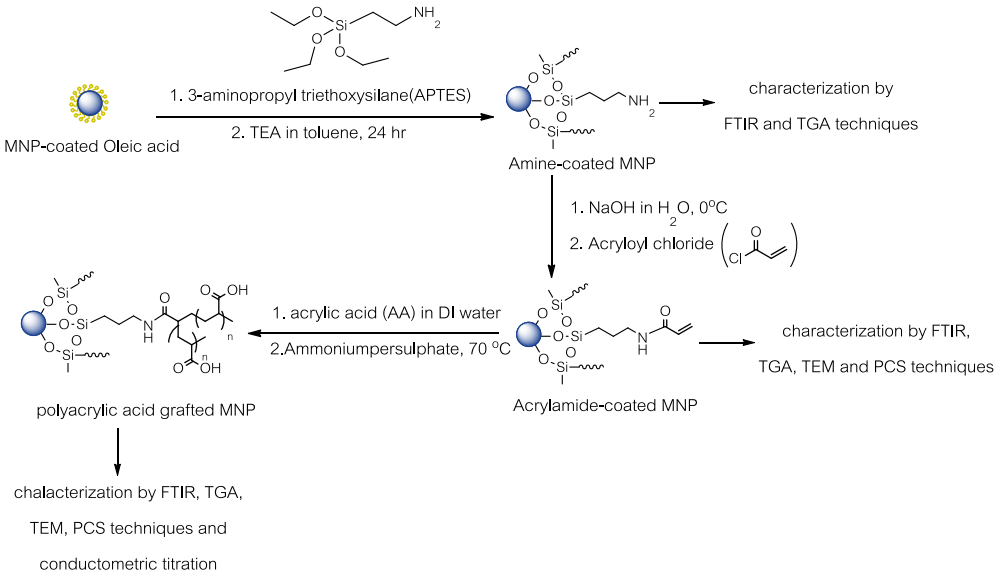
ขั้นตอนที่ 1 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ถูกเคลือบด้วยพอลิเมอร์ชนิดพอลิอะไครลิกแอซิด

ขั้นตอนที่ 2 การตรึง acpc-PNAลงบนพื้นผิวอนุภาคที่ถูกเคลือบด้วยพอลิเมอร์ชนิดพอลิอะไครลิกแอซิดด้วยแรงระหว่างประจุ

ขั้นตอนที่ 3 การนำอนุภาคที่มีการตรึง acpcPNA มาศึกษาการดูดจับดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์

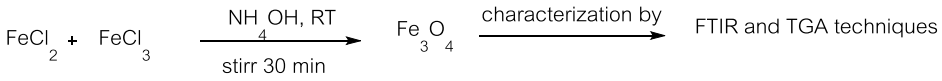
ขั้นตอนที่ 4 การนำอนุภาคที่มีการตรึง acpcPNA เพื่อมาประยุกต์ใช้ร่วมกับดีเอ็นเอจริง

1. การสังเคราะห์อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ถูกเคลือบด้วยพอลิเมอร์ ชนิดพอลิอะไครลิกแอซิดแสดงดังภาพ 43 โดยมีรายละเอียดดังนี้



ภาพ 43 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่เคลือบด้วยพอลิเมอร์ชนิดพอลิอะไครลิกแอซิด

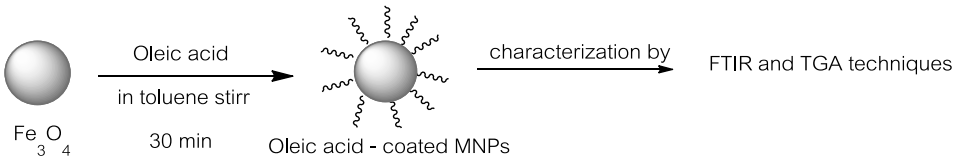
1.1 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ (MNP) ด้วยเทคนิคการตกตะกอนร่วม (Co-Precipitation) ดังภาพ 44



ภาพ 44 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ด้วยปฏิกิริยาการตกตะกอนร่วม

โดยการทำปฏิกิริยาระหว่างเฟอรัสคลอไรด์ ($FeCl_2$) และเฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3$) ทำการคนเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (NH_4OH) คนต่อไปที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ขณะที่ปฏิกิริยากำลังดำเนินไปจะสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงของสารจากสารละลายสีเขียวเหลืองเป็นสีดำ หลังสิ้นสุดปฏิกิริยาทำการแยกอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ออกด้วยแม่เหล็ก ทำการล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน 2-3 ครั้ง ทำให้แห้งและพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคด้วยเทคนิค ฟูเรียทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรสโคปี (Fourier Transform Infrared spectroscopy, FTIR) และ เทอร์โมกราวิเมตริกอนาไลซิส(Thermogravimetric analysis, TGA)

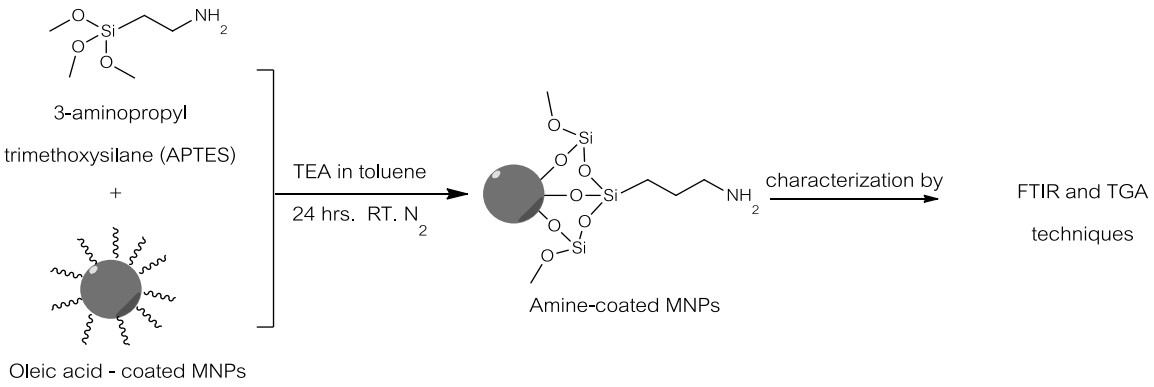
1.2 การเคลือบ Oleic acid บนพื้นผิวของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ (MNP-Oleic) เพื่อเสถียรอนุภาคไม่ให้เกิดเกาะกลุ่มเป็นตะกอนใหญ่ (aggregation) ดังภาพ 45



ภาพ 45 การเคลือบ Oleic acid บนพื้นผิวของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์

นำเอาอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่สังเคราะห์ได้มาทำปฏิกิริยากับ Oleic acid ใน Toluene คนเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการล้างด้วยอะซิโตน 2-3 ครั้ง แยกอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่เคลือบ Oleic acid ด้วยแม่เหล็กทำให้แห้งแล้วพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคที่ได้ด้วยเทคนิค ฟูเรียทรานส์ฟอร์ม อินฟราเรดสเปกโตรสโคปี (Fourier Transform Infrared spectroscopy, FTIR) และ เทอร์โมกราวิเมตริก อนาไลซิส (Thermogravimetric analysis, TGA)

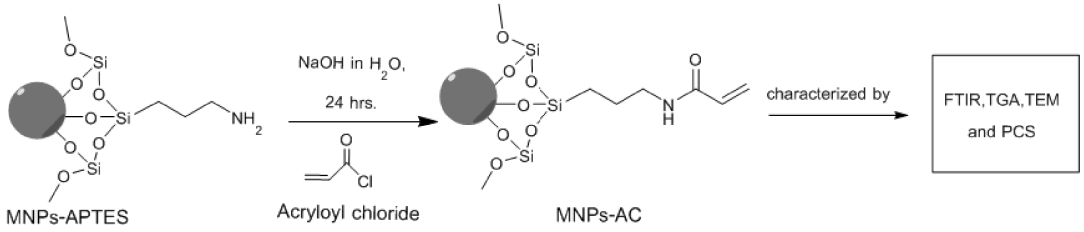
1.3 การตรึงอะมิโนโพรพิลไตรเอททอกซีไซเลน (3-aminopropyl triethoxysilane, APTES) บนพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ *ดังภาพ 46*



ภาพ 46 การตรึงอะมิโนโพรพิลไตรเอททอกซีไซเลน (3-aminopropyl triethoxysilane, APTES) บนพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทท์

โดยการนำอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่เสถียรด้วย oleic acid มากระจายตัวใน toluene จากนั้นค่อยๆ เติม triethoxylamine (TEA) ลงในสารละลายโทลูอีนที่มีอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ หลังจากนั้นค่อยๆเติม 3-Aminopropyl triethoxysilane (APTES) ภายใต้สภาวะความดันบรรยากาศของไนโตรเจน ที่อุณหภูมิห้อง หลังสิ้นสุดปฏิกิริยาทำการแยกอนุภาคแมกนีไทท์ออกโดยใช้แม่เหล็กทำการล้างด้วยเอทานอล 2-3 ครั้ง ทำให้แห้งและพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคด้วยเทคนิค FTIR และ TGA

1.4 การฟังก์ชันนอลไลซ์หมู่อะคริลาไมด์ (Acrylamide) บนพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ (MNP-Ac) ดังภาพ 47

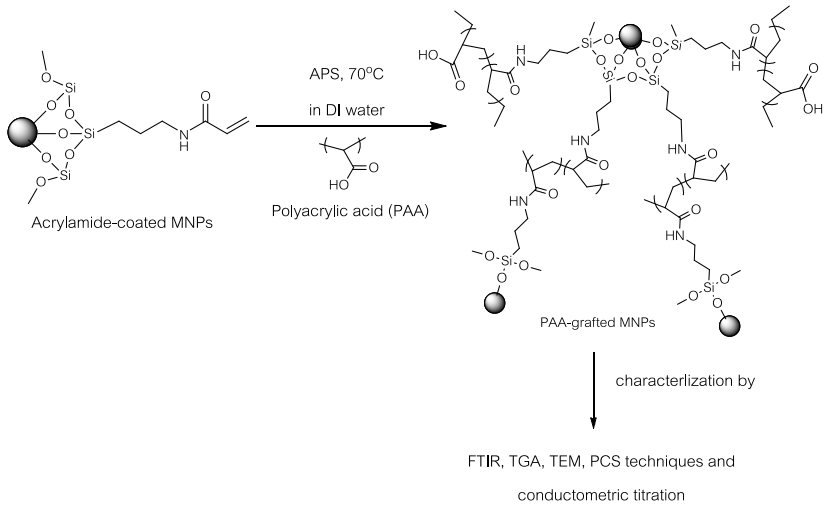


ภาพ 47 การฟังก์ชันนอลไลซ์หมู่อะคริลาไมด์ (acrylamide) บนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์

โดยการนำอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ถูกตรึงด้วย APTES มากระจายตัวอีกครั้งในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยากับ acryloyl chloride ภายใต้สภาวะความดันบรรยากาศของไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 0ºC เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำปฏิกิริยาต่อไปที่อุณหภูมิห้องจนครบ 24 ชั่วโมง

หลังสิ้นสุดปฏิกิริยาทำการแยกอนุภาคออกด้วยแม่เหล็ก ทำการล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน 2-3 ครั้ง ทำให้แห้งและพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคด้วยเทคนิค FTIR, TGA, TEM และ โฟโตคอรีเรชันสเปกโตรสโครปี (Photo correlation spectroscopy ,PCS)

1.5 การดัดแปรบนพื้นผิวของอนุภาคด้วยพอลิอะไครลิกแอซิด (MNP-PAA) ดังภาพ 48



ภาพ 48 การดัดแปรบนพื้นผิวของอนุภาคด้วยพอลิอะไครลิกแอซิด (MNP-PAA)

ละลายอะไครลิกแอซิดมอนอเมอร์ในน้ำ คนเป็นเวลา 15 นาทีที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการหยดแอมโมเนียม เปอร์ซัลเฟต (Ammonium Persulphate, APS) (ใช้อัตราส่วนโมลของ initiator : monomer เท่ากับ 1 : 100) ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงภายใต้สภาวะบรรยากาศของแก๊สไนโตรเจนเพื่อทำให้เกิดเป็นพอลิเมอร์ชนิด พอลิอะไครลิกแอซิดจากนั้นเติม อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่เคลือบด้วย Acrylamide เพื่อทำการพอลิเมอไรซ์ลงบนพื้นผิวของอนุภาคเป็นเวลา 30 นาทีหลังสิ้นสุดปฏิกิริยาทำการแยกอนุภาคออกด้วยแม่เหล็ก ทำการล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน 2-3 ครั้ง ทำให้แห้งและพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคด้วยเทคนิค FTIR, TGA, TEM, PCS และการไทเทรตโดยวัดค่าการนำไฟฟ้า (Conductometric Titration)

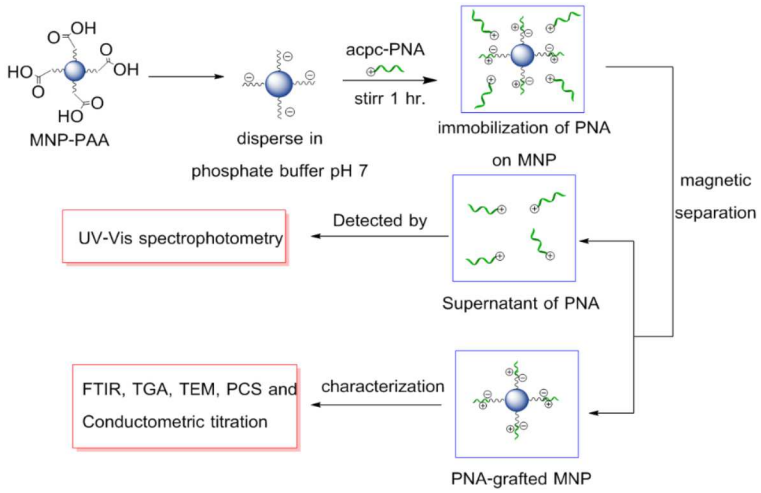
2 การตรึงพิร์โรลิดินิลพีเอ็นเอลงบนพื้นผิวอนุภาคที่ถูกเคลือบด้วยพอลิเมอร์ชนิดพอลิอะไครลิกแอซิดด้วยแรงระหว่างประจุโดยแบ่งเป็น 2 ขั้นตอนดังนี้

2.1 การสร้างกราฟมาตรฐานของ acpc-PNA

ในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้ acpcPNA ที่มีลำดับเบสคือ Ac-ATG-CCA-CAA-TGT-Lys-NH_2

นำสารละลาย acpcPNA ที่มีความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ มาทำการเจือจางด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 ให้มีความเข้มข้น 0,10,20,30,40 และ 50ไมโครโมลาร์ปริมาตรรวมเท่ากับ 5 ไมโครลิตร แล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเทคนิค UV-vis spectrophotometry ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรหลังจากนั้นทำการพลอตกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของ acpcPNA และค่าการดูดกลืนแสงของ acpcPNA ที่แต่ละความเข้มข้น

2.2 การตรึง acpcPNA ลงบนพื้นผิวอนุภาคที่ถูกเคลือบด้วยพอลิเมอร์ชนิดพอลิอะไครลิกแอซิด โดยใช้แรงระหว่างประจุดังภาพ 49



ภาพ 49 การตรึง acpcPNA ลงบนพื้นผิวอนุภาคที่ถูกเคลือบด้วยพอลิเมอร์ชนิดพอลิอะไครลิกแอซิดโดยใช้แรงระหว่างประจุ

นำอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ถูกเคลือบด้วยพอลิเมอร์ชนิดพอลิอะไครลิกแอซิด 10 มิลลิกรัม มาทำปฏิกิริยากับสารละลาย acpcPNA ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 ทำการคนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการแยกอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ออกจากสารละลาย acpcPNA ด้วยแม่เหล็ก นำสารสารละลาย acpcPNA เหลือหลังการทำปฏิกิริยามาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมตรี (UV-Vis spectrophotometry) หลักจากนั้นนำอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึงด้วย acpcPNA แล้วมาทำการล้างทำความสะอาดด้วยน้ำปราศจากไอออน 2-3 ครั้งแล้วทำให้แห้งและพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค FTIR, TGA, TEM, PCS และการไทเทรตโดยวัดค่าการนำไฟฟ้า (Conductometric Titration) จากนั้นทำการหาปริมาณ acpcPNA ทั้งสองชนิดที่ถูกตรึงลงบนอนุภาคด้วยเทคนิค ยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมตรี โดยการนำส่วนของละลาย acpcPNA ก่อนตรึงและหลังตรึงลงบนอนุภาคมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมตรี

เพื่อหาปริมาณ acpcPNA นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายacpcPNA และคำนวณหาปริมาณ acpc-PNAดังสมการ

ปริมาณ PNA ที่ตรึงบนอนุภาค = ปริมาณ PNA ก่อนตรึง – ปริมาณ PNA ที่เหลือในสารละลาย

3. การนำอนุภาคที่มีการตรึง acpcPNA มาใช้ร่วมกับดีเอ็นเอ

3.1 การนำอนุภาคที่มีการตรึง acpcPNA มาศึกษาการดูดจับดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ (synthetic DNA)

3.1.1 การสร้างกราฟมาตรฐานของดีเอ็นเอสังเคราะห์

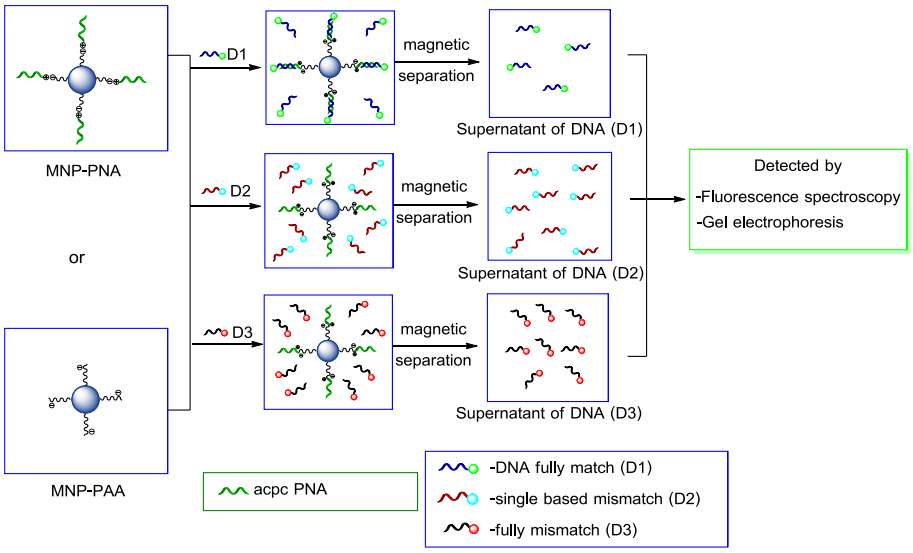
โดยลำดับเบสของ acpcPNA และ ดีเอ็นเอสังเคราะห์ที่มีลำดับเบสสอดคล้องกับดีเอ็นเอจริงที่ใช้แสดงดังตาราง 8

ตาราง 8 แสดงลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ใช้ทำปฏิกิริยากับอนุภาคที่ตรึงด้วยพีเอ็นเอ

ชนิดของพีเอ็นเอ (acpc-PNA)	ลำดับเบสของดีเอ็นเอ	excitation	emission
Ac-ATGCCACAATGT-LysNH$_2$	FAM-5'-ACATTGTGGCAT-3' Fully match (D1)	490	520
	Cy5-5'-ACATTATGGCAT-3' Single based mismatch (D2)	650	670
	TAMRA-5'-TGCGATCCATGC-3' Fully mismatch (D3)	552	584

นำสารละลายดีเอ็นเอแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น เข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 70 ไมโครลิตรมาทำการเจือจางด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 ให้มีความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 700 ไมโครลิตร หลังจากนั้นทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานดีเอ็นเอที่ความเข้มข้น 0.06, 0.08, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1ไมโครโมลาร์ จากสารละลาย stock ของดีเอ็นเอ 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตรรวมเท่ากับ 2 มิลลิลิตร แล้วทำการวัดค่าการคายแสงด้วยเทคนิค ฟลูออเรสเซนต์สเปกโตรโฟโตเมตรีทำการพลอตกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของดีเอ็นเอและค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของดีเอ็นเอเอ็นเอที่แต่ละความเข้มข้น

3.1.2 การทดสอบความสามารถในการดูดจับดีเอ็นเอแต่ละชนิด (D1, D2 และ D3) และศึกษาความจำเพาะเจาะจงของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ถูกตรึงด้วย acpcPNA (MNP-PNA) เทียบกับอนุภาคก่อนตรึงด้วย acpcPNA (MNP-PAA) ดังแสดงดังภาพ 50

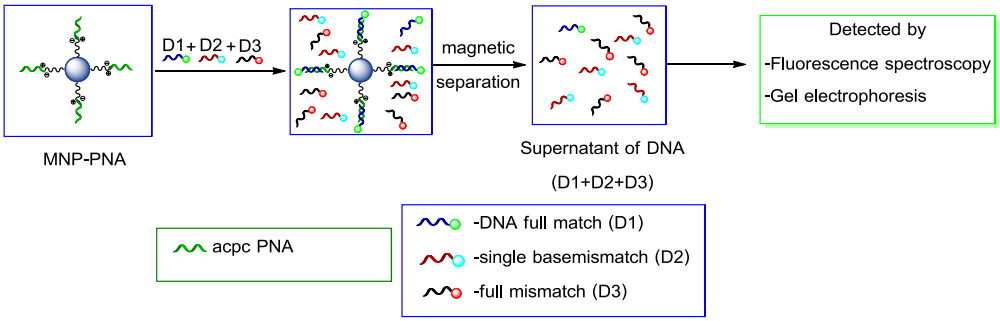


ภาพ 50 การทดสอบการดูดจับดีเอ็นเอ และศึกษาความจำเพาะเจาะจงของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ถูกตรึงด้วย acpcPNA (MNP-PNA) เทียบกับอนุภาคก่อนตรึงด้วย acpcPNA (MNP-PAA)

นำอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึงด้วย acpcPNA (MNP-PAA) หรืออนุภาคหลังตรึงด้วย acpcPNA (MNP-PNA) 2 มิลลิกรัม จากนั้นเติมสารละลายดีเอ็นเอแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 0.4 ไมโครโมลาร์ ทำการคนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมงจากนั้นทำการแยกอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ออกจากสารละลายดีเอ็นเอโดยใช้แม่เหล็กภายนอกทำการศึกษาผลการทดลองเชิงคุณภาพด้วยเทคนิคเจล-อิเล็กโตรโฟรีซิสและทำการศึกษาหาปริมาณดีเอ็นเอแต่ละชนิดที่ถูกดูดจับบนอนุภาค โดยนำสารละลายดีเอ็นเอที่แต่ละชนิดก่อนและหลังทำการดูดจับกับอนุภาคมาตรวจวัดค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโตรสโคปี และนำค่าการคายแสงที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายดีเอ็นเอแต่ละชนิด และทำการคำนวณหาปริมาณดีเอ็นเอที่ถูกดูดจับบนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึงด้วย acpcPNA (MNP-PAA) และอนุภาคหลังตรึงด้วย acpcPNA (MNP-PNA) โดยใช้สมการ

ปริมาณ DNA ที่ถูกดูดจับ = ปริมาณ DNA ก่อนเติมอนุภาค – ปริมาณ DNA ที่เหลือในสารละลาย

3.1.3 การนำอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ถูกตรึงด้วย acpcPNA มาศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการดูดจับดีเอ็นเอในสารละลายดีเอ็นเอผสม 3 ชนิด ดังแสดงในภาพ 51



ภาพ 51 การทดสอบการดูดจับดีเอ็นเอผสม 3 ชนิด ของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ถูกตรึงด้วย acpc-PNA

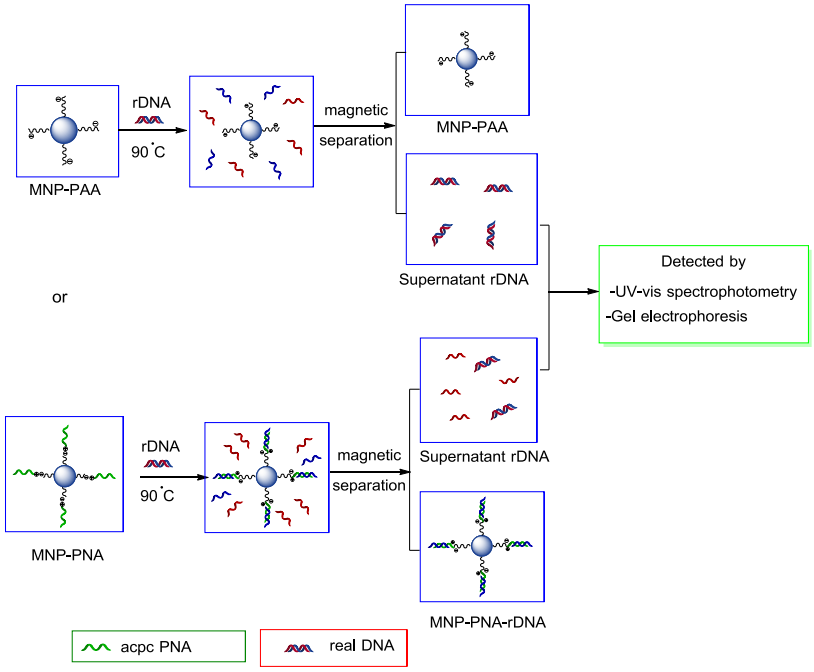
นำอนุภาคนาโนแมกนีไทท์หลังตรึงด้วย acpcPNA (MNP-PNA) ปริมาณ 2 มิลลิกรัม เติมลงในสารละลายดีเอ็นเอผสม D1+D2+D3 โดยดีเอ็นเอแต่ละชนิดมีความเข้มข้น 0.4 ไมโครโมลาร์ ทำการคนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากทำปฏิกิริยาแยกอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ออกจากสารละลายโดยใช้แม่เหล็กภายนอก และทำการศึกษาหาปริมาณดีเอ็นเอที่ถูกดูดจับบนอนุภาค โดยนำสารละลายดีเอ็นเอผสมก่อนและหลังทำการดูดจับกับอนุภาคที่ตรึงด้วย acpc-PNA (MNP-PNA)ทำการตรวจวัดด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโตรสโคปีแล้วนำค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายดีเอ็นเอแต่ละชนิดทำการคำนวณหาปริมาณดีเอ็นเอที่ถูกดูดจับบนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย acpc-PNA(MNP-PNA) โดยใช้สมการ

ปริมาณ DNA ที่ถูกดูดจับ = ปริมาณ DNA ก่อนเติมอนุภาค – ปริมาณ DNA ที่เหลือในสารละลาย

3.2 การนำอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย acpcPNA (MNP-PNA) มาทำการทดสอบเบื้องต้นในการดูดจับดีเอ็นเอจริง (rDNA) เทียบกับอนุภาคก่อนตรึง acpcPNA

นำอนุภาคที่ตรึงด้วย acpcPNA (MNP-PNA) หรือ อนุภาค MNP-PAA จำนวน 2 มิลลิกรัม มาเติมลงในสารละลายดีเอ็นเอจริงที่ทำการแยกเป็นสายเดี่ยวแล้วที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสในปริมาตร 40 ไมโครลิตร โดยดีเอ็นเอจริงที่ใช้ในการศึกษาประกอบไปด้วยดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้าวโพดและดีเอ็นเอจริงที่สกัดได้จากกล้วยไม้ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์มาจาก ผศ.ดร. มลิวรรณ นาคขุนทด ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ทำการคนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นแยกอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ออกจากสารละลายดีเอ็นเอโดยใช้แม่เหล็กภายนอก และทำการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับความสามารถในการดูดจับดีเอ็นเอจริงของอนุภาคที่ตรึงด้วย acpcPNA และอนุภาค MNP-PAA โดยนำ

สารละลายดีเอ็นเอจริงก่อนและหลังทำการดูดจับกับอนุภาคทั้ง 2 ชนิดทำการตรวจวัดด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมตรี (UV-Vis spectrophotometry) และเจล-อิเล็กโตรโฟรีซิส แสดงดังภาพที่ 52



ภาพ 52 การนำอนุภาค MNP-PNA มาทำการทดสอบเบื้องต้นในการดูดจับดีเอ็นเอจริงเทียบกับอนุภาค MNP-PAA

<u>ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง</u>

งานวิจัยนี้ได้ทำการดัดแปรพื้นผิวอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ให้มีประจุลบด้วยพอลิเมอร์ชนิดพอลิอะไครลิก แอซิด (Polyacrylic acid, PAA) เพื่อนำมาใช้ตรึงกับ acpcPNA ด้วยแรงระหว่างประจุ (electrostatic interaction) ในสภาวะที่เหมาะสม โดยอนุภาคที่สังเคราะห์ได้สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นอนุภาคในการตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอ และดูดจับดีเอ็นเอที่สนใจ ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้แบ่งผลการทดลองทั้งหมด 4 ส่วน โดยมีรายละเอียดดังนี้

1. การสังเคราะห์อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ดัดแปรพอลิเมอร์ชนิดพอลิอะไครลิกแอซิด (MNP-PAA)

2.การตรึง acpcPNA ลงบนอนุภาคนาโนแมกนไทท์ที่ดัดแปรพอลิเมอร์ชนิดพอลิอะไครลิกแอซิด (MNP-PAA)

3. การนำอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย acpcPNA มาทดสอบความสามารถในการดูดจับดีเอ็นเอและตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอตัวอย่างที่ได้จากการสังเคราะห์

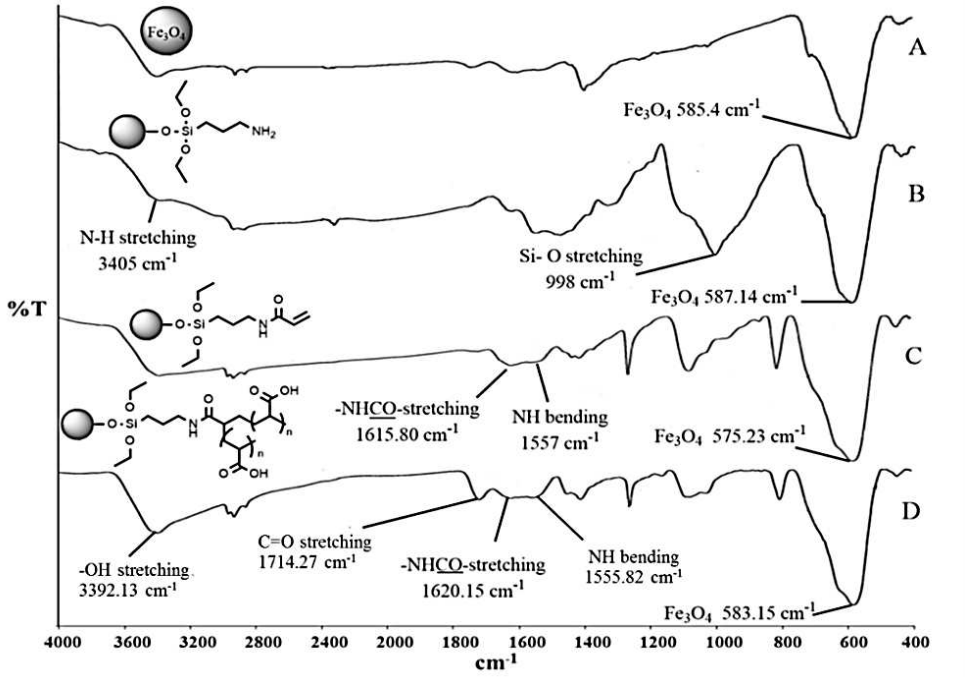
4.การนำอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย acpcPNA มาใช้ร่วมกับดีเอ็นเอตัวอย่างจริง

โดยแต่ละผลการทดลองมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1. การสังเคราะห์อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ดัดแปรพอลิเมอร์ชนิดพอลิอะไครลิกแอซิด (MNP-PAA)

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ดัดแปรพอลิเมอร์ชนิดพอลิอะไครลิกแอซิด จะใช้วิธีการนำอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่เคลือบด้วยหมู่อะคริละไมด์ (Acrylamide, Ac) มาทำปฏิกิริยากับมอนอเมอร์ ชนิดอะไครลิกแอซิด (Acrylic acid, AA) โดยผ่านอนุมูลอิสระ (free-radical polymerization) ดังภาพ 59 โดยอนุภาคที่สังเคราะห์ได้ในแต่ละขั้นตอนสามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค FTIR, TGA, TEM และ PCSโดยมีรายละเอียดดังนี้

1.1 การศึกษาเอกลักษณ์ของอนุภาคที่สังเคราะห์ได้ในแต่ละขั้นตอนด้วยเทคนิคฟูเรียทรานส์ฟอร์ม อินฟราเรดสเปกโตรสโคปี (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR) โดยผลการวิเคราะห์แสดงดังภาพ 53

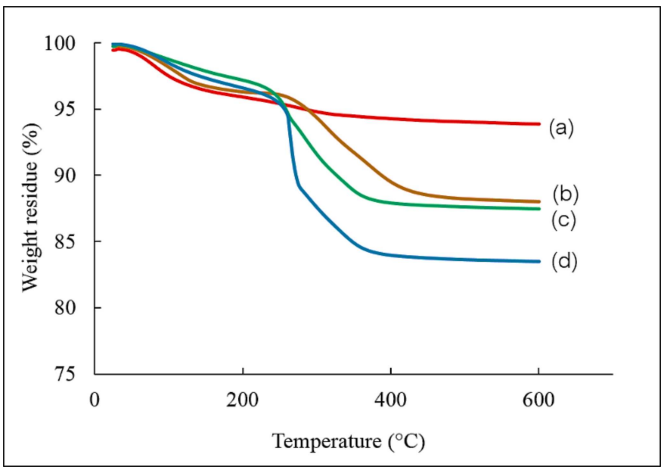


ภาพ 53 สเปคตรา FTIR ของ A) MNP, B) MNP-APTES, C) MNP-Ac และ D) MNP-PAA

จาก FT-IR สเปคตรัมของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่สังเคราะห์ได้ในแต่ละขั้นตอนพบว่าในสเปคตรัม A เป็นสเปคตรัมของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ (Fe_3O_4) จะพบ สัญญาณ Fe-O ของสารประกอบเหล็กออกไซด์ที่ 585.4 cm^{-1} ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ สเปคตรัม B เป็นสเปคตรัมของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่เคลือบด้วย 3-aminopropyl triethoxysilane (APTES) จะพบสัญญาณของหมู่ฟังก์ชันเอมีน NH stretching ที่ 3405 cm^{-1} และสัญญาณ Si-O stretching ที่ 998.16 cm^{-1} ซึ่ง

แสดงถึงการมี 3-aminopropyl triethoxysilane (APTES) เคลือบอยู่บนพื้นผิวอนุภาค สเปคตรัม C เป็นสเปคตรัมของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่เคลือบด้วยกลุ่มของ Acrylamide (Ac) จะพบสัญญาณของหมู่คาร์บอนิลของหมู่เอไมด์ -NH-C=O- stretching ที่ 1615.8 cm^{-1} และสัญญาณของ N-H bending ที่ 1557 cm^{-1} ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการมี หมู่ Acrylamide เคลือบอยู่บนพื้นผิวอนุภาค และสเปคตรัม D เป็นสเปคตรัมของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ ดัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิอะไครลิกแอซิด จะพบสัญญาณของหมู่คาร์บอนิล (C=O stretching) ของหมู่ คาร์บอกซิลิค แอซิด ของพอลิอะไครลิกที่ 1714 cm^{-1} และ พบสัญญาณของหมู่ไฮดรอกซีของหมู่คาร์บอก ซิลิค แอซิด ที่ 3392 cm^{-1} ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการมีพอลิอะไครลิก แอซิด เคลือบอยู่บนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ ซึ่งจากผลของเทคนิค FTIR ที่ได้สามารถกล่าวได้ว่าอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่สังเคราะห์มีพอลิเมอร์ ชนิดพอลิอะไครลิกแอซิดเคลือบอยู่ที่ผิวของอนุภาค

1.2 การศึกษาองค์ประกอบของสารอินทรีย์ที่เคลือบอยู่บนอนุภาคในแต่ละขั้นตอนด้วยเทคนิคเทอร์โมกราวิเมตริก อนาไลซิส (Thermo gravimetric analysis, TGA) ผลการวิเคราะห์แสดงดังภาพ 54

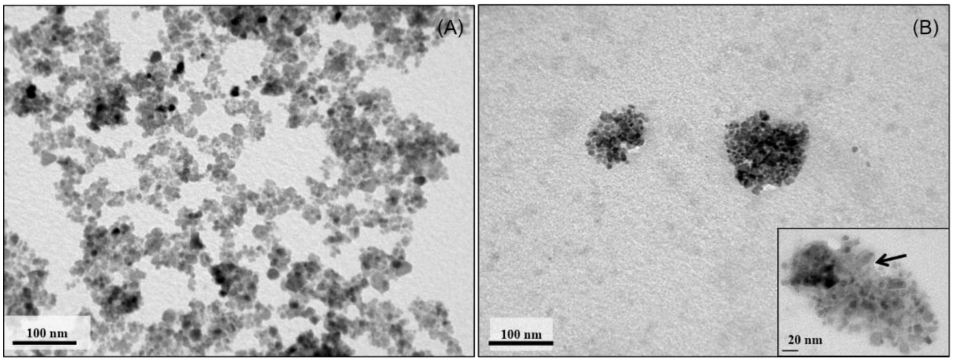


ภาพ 54 เทอร์โมแกรมTGA ของ a) MNP, b) MNP-APTES, c) MNP-Ac และ d) MNP-PAA ที่อุณหภูมิ 25-600 องศาเซลเซียสภายใต้ความดันบรรยากาศของออกซิเจน

จาก TGA เทอร์โมแกรมภาพ 54 พบว่าเมื่อทำการดัดแปรพื้นผิวของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ในแต่ละขั้นตอนมีผลทำให้เปอร์เซ็นการหายไปของสารอินทรีย์ที่เคลือบอยู่บนผิวของอนุภาคเพิ่มขึ้น โดยในขั้นตอนการดัดแปรพื้นผิวของอนุภาคด้วย APTES มีการหายไปของสารอินทรีย์โดยเทียบกับอนุภาคนาโนแมกนีไทท์เริ่มต้น (MNP) คิดเป็น 5.9% (b) อนุภาคที่ดัดแปรพื้นผิวด้วยหมู่อะคลิลาไมด์ (Ac) มีการหายไปของสารอินทรีย์โดยเทียบกับอนุภาคนาโนแมกนีไทท์เริ่มต้น (MNP) คิดเป็น 6.4% (c) และ อนุภาคที่ดัดแปรพื้นผิวด้วย PAA มีการหายไปของสารอินทรีย์โดยเทียบกับอนุภาคนาโนแมกนีไทท์เริ่มต้น (MNP) คิด

เป็น 10.4% (d) ตามลำดับ สามารถกล่าวได้ว่าบนพื้นผิวของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์มีพอลิเมอร์ชนิดพอลิอะไครลิกแอซิดซึ่งผลการวิเคราะได้นี้สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FTIR

1.3 การศึกษาขนาดและลักษณะของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนและหลังทำการดัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิอะไครลิกแอซิดด้วยเทคนิคกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope, TEM) ผลการวิเคราะห์แสดงดังภาพ 55

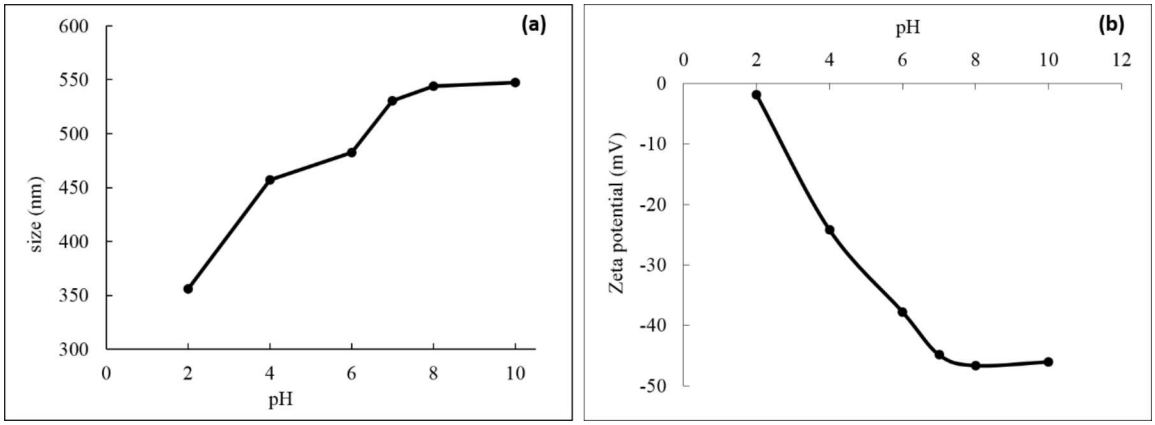


ภาพ 55 ภาพจากเทคนิค TEM ของอนุภาค (A) MNP-Ac และ (B) MNP-PAA

จากภาพ TEM พบว่าอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่มีการดัดแปรพื้นผิวด้วยหมู่อะคลิลาไมด์ (Ac) ซึ่งเป็นอนุภาคก่อนการดัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิอะไครลิกแอซิด (MNP-Ac) ภาพ 55(A) แสดงให้เห็นถึงการกระจายตัวของอนุภาคในน้ำปราศจากไอออนได้ดี ในขณะที่อนุภาคที่ดัดแปลงพื้นผิวด้วยพอลิอะไครลิกแอซิด(MNP-PAA) ภาพ 55(B) พบว่าเกิดการจับตัวกันเป็นกลุ่ม (clusters) โดยจะสังเกตเห็นมีเยื่อของพอลิเมอร์หุ้มอยู่โดยรอบ และแต่ละกลุ่มแยกกันอยู่อย่างชัดเจนซึ่งขนาดของ clusters อยู่ที่ประมาณ 100 นาโนเมตร ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากพอลิอะไครลิกแอซิดมีส่วนทำให้เกิดการเชื่อมโยงตาข่ายระหว่างอนุภาคด้วยกันเองซึ่งมีผลทำให้อนุภาคเกิดการเกาะกลุ่มกัน

1.4 การศึกษาความเป็นประจุและขนาดของอนุภาคที่เคลือบด้วยพอลิเมอร์ชนิดพอลิอะไครลิกแอซิดด้วยเทคนิค โฟโตคอรีเรชันสเปกโตรสโครปี (Photo correlation spectroscopy, PCS)

เนื่องจากพอลิอะไคลิคแอซิด (Polyacrylic acid) เป็นพอลิเมอร์ที่สามารถตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของประจุในสารละลายที่มีค่าพีเอชที่ต่างกัน เนื่องจากผลของการมีหมู่คาร์บอกซิลิค อยู่บนพื้นผิว ดังนั้นจึงได้ทำการวิเคราะห์หาขนาดและค่าความเป็นประจุของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ดัดแปลงพื้นผิวด้วยพอลิอะไคลิคแอซิดในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH ต่างกันเพื่อพิสูจน์คุณสมบัติของพอลิเมอร์ชนิดนี้ โดยใช้เทคนิค PCS ผลการทดลองแสดงดังภาพ 56



ภาพ 56 (a) ขนาดไฮโดรไดนามิกของอนุภาคที่ดัดแปลงพื้นผิวด้วยพอลิอะไครลิกแอซิดในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH ตั้งแต่ 2-10 และ (b) ค่าความเป็นประจุของอนุภาคที่ดัดแปลงพื้นผิวด้วยพอลิอะไครลิกแอซิดในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH ตั้งแต่ 2-10

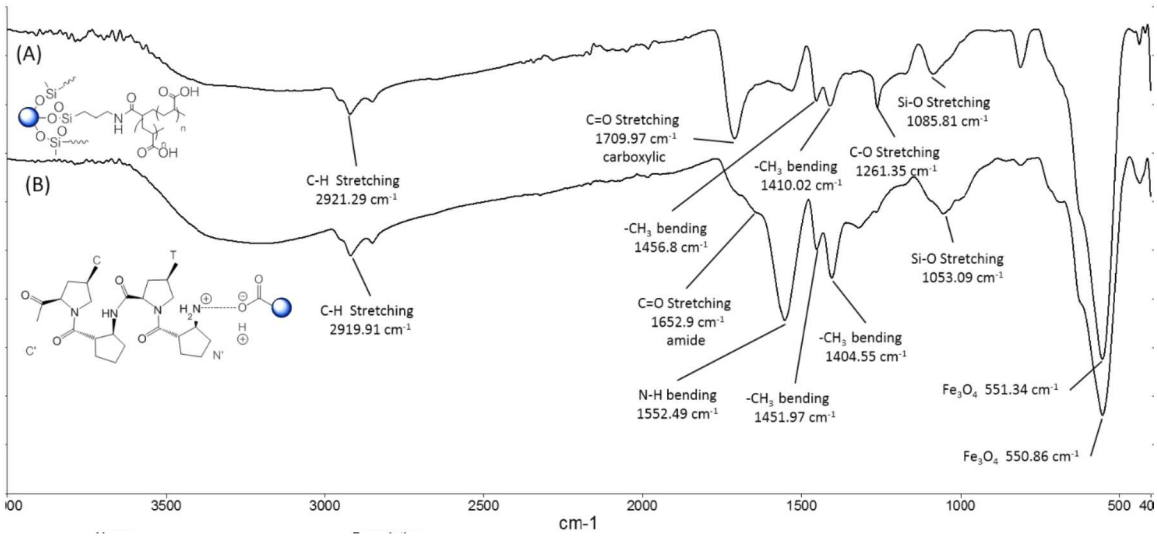
จากภาพ 56 พบว่าเมื่ออนุภาคอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH สูงขึ้นทำให้ประจุลบบนพื้นผิวของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์มากขึ้น และขนาดของอนุภาคมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH สูงมีผลทำให้การแตกตัวให้โปรตอนของหมู่คาร์บอกซิลิค แอซิด ของพอลิอะไครลิกแอซิดเพิ่มขึ้น จึงทำให้เกิดเป็นหมู่คาร์บอกซิเลตซึ่งเป็นประจุลบมากขึ้นและนอกจากนี้ยังเกิดการบวมตัวของพอลิเมอร์ได้มากขึ้น ซึ่งมีผลให้ขนาดของอนุภาคมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นด้วย จากผลการวิเคราะห์ที่ได้นี้สามารถกล่าวได้ว่าอนุภาคนาแมกนีไทท์ที่ถูกดัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิอะไครลิกแอซิดสามารถตอบสนองทางด้านความเป็นประจุ และขนาดของอนุภาคเมื่ออยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี pH ต่างกัน

จากผลการสังเคราะห์อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ดัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิอะไครลิกแอซิดแล้วทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคต่างๆที่กล่าวมาข้างต้นสามารถกล่าวได้ว่าอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่สังเคราะห์ได้มีพอลิอะไครลิกแอซิดเคลือบอยู่ที่ผิว

2. การตรึงพิร์โรลิดินิลพีเอ็นเอ (acpc-PNA) ลงบนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ดัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิอะไครลิกแอซิด

ในงานวิจัยนี้ได้เลือก acpcPNA เพื่อตรึงลงบนอนุภาคที่มีการดัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิอะไครลิกแอซิดโดยอาศัยแรงระหว่างประจุลบของพอลิอะไครลิกแอซิดบนพื้นผิวของอนุภาคและประจุบวกของ acpcPNA ในสภาวะที่เหมาะสมโดยลำดับเบสของ acpcPNA มีลำดับเบสดังนี้ Ac-ATG-CCA-CAA-TGT-Lys-NH_2 โดยทำการยืนยันการตรึง acpcPNA ลงบนพื้นผิวของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ดัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิอะไครลิกแอซิดด้วยเทคนิค FTIR, TGA, TEM และ PCS โดยมีรายละเอียดดังนี้

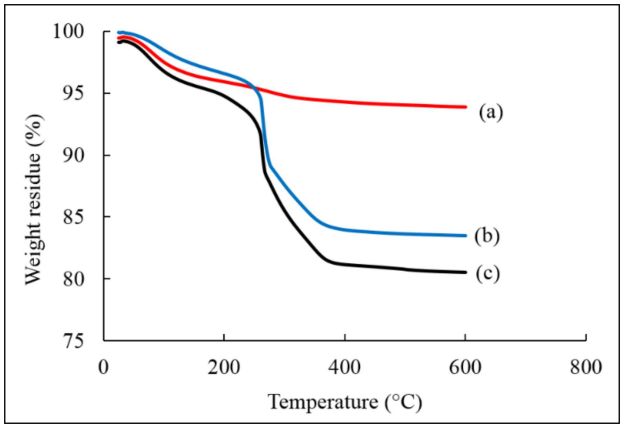
2.1 การยืนยันการตรึง acpcPNA ลงบนอนุภาคที่ดัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิอะไครลิกแอซิดด้วยเทคนิค ฟูเรียทรานส์ฟอร์ม อินฟราเรดสเปกโตรสโคปี(Fourier Transform Infrared spectroscopy, FTIR) ผลการวิเคราะห์แสดงภาพ 57



ภาพ 57 สเปคตรา FTIR ของ A) MNP-PAA และ B) MNP-PNA

จากสเปคตรัมของ FTIR เมื่อทำการนำอนุภาคที่ดัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิอะไครลิกแอซิดมาทำการตรึงด้วย acpcPNA พบว่าสัญญาณ C=O Stertching คาร์บอกซิลิกของพอลิอะไครลิกแอซิดที่ 1709.97 cm^{-1} ซึ่งมีความเข้มลดลง ซึ่งในขณะเดียวกันจะพบสัญญาณ C=O Stertching ของหมู่เอไมด์ของ acpc-PNA(P1) ที่ 1652.9 cm^{-1} และสัญญาณของหมู่เอมีน N-H bending ของ acpcPNA ที่ 1552.49 cm^{-1} ได้อย่างชัดเจน แสดงให้เห็นถึงการมีหมูฟังก์ชันของเอมีนบนพื้นผิวของอนุภาคเพิ่มมากขึ้น ซึ่งคาดว่าเป็นผลมาจาก acpcPNA ที่ถูกตรึงลงบนพื้นผิวของอนุภาคซึ่งในโครงสร้างของ acpcPNA มีหมู่ฟังก์ชันของเอไมด์เป็นจำนวนมาก

2.2 การยืนยันการตรึง acpcPNA ลงบนอนุภาคที่ดัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิอะไครลิกแอซิดด้วยเทคนิคเทอร์โมกราวิเมตริก อนาไลซิส (Thermogravimetric analysis, TGA) ผลการวิเคราะห์แสดงภาพ 58

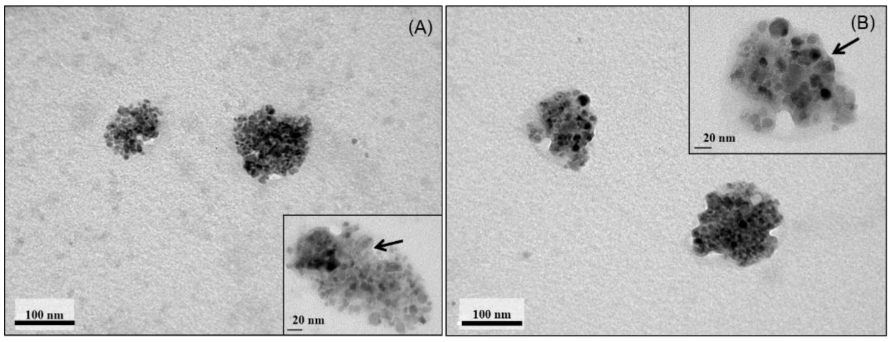


ภาพ 58 เทอร์โมแกรม TGA ของ a) MNP, b) MNP-PAA และ c) MNP-PNA ที่อุณหภูมิ 25-600 องศาเซลเซียสภายใต้ความดันบรรยากาศของออกซิเจน

จากผลการวิเคราะห์พบว่าเมื่อทำการดัดแปรงพื้นผิวของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ในแต่ละขั้นตอนมีเปอร์เซ็นการหายไปของน้ำหนักเพิ่มขึ้น ในขั้นตอนการดัดแปรพื้นผิวของอนุภาคด้วยพอลิเมอร์ชนิด polyacrylic acid มีการหายไปของสารอินทรีย์โดยเทียบกับอนุภาคนาโนแมกนีไทท์เริ่มต้น (MNP) คิดเป็น 10.4% และเมื่อทำการตรึง acpcPNA มีการหายไปของสารอินทรีย์โดยเทียบกับอนุภาคนาโนแมกนีไทท์เริ่มต้น (MNP) คิดเป็น 13.3% แสดงให้เห็นว่า acpcPNA ถูกตรึงลงบนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ถูกดัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิเมอร์ชนิดพอลิอะไครลิกแอซิด ซึ่งสอดคล้องกับการพิสูจน์หมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิค FTIR

2.3 การยืนยันการตรึง acpcPNA ลงบนอนุภาคที่ดัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิอะไครลิกแอซิดด้วยเทคนิคกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope, TEM)

เมื่อนำอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ดัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิอะไครลิกแอซิดที่ทำการตรึงด้วย acpcPNA มาทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope, TEM) ผลการทดลองที่ได้แสดงดังภาพ 59

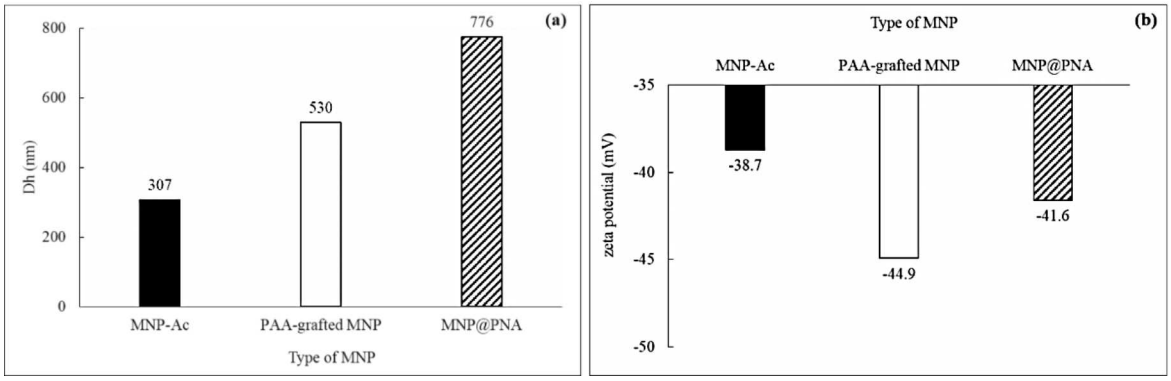


ภาพ 59 ภาพจากเทคนิค TEM ของอนุภาค (A) MNP-PAA และ (B) MNP-PNA

จากภาพ 59 พบว่าอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ดัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิอะไครลิกแอซิดมาทำการตรึงด้วย acpcPNA (ภาพ 59B) สามารถสังเกตเห็นเยื่อของพอลิเมอร์ที่เคลือบอยู่บนพื้นผิวของอนุภาคได้ชัดเจนและมากกว่าอนุภาคที่เคลือบด้วยพอลิอะไครลิกแอซิด (ภาพ 59A) ซึ่งสามารถกล่าวได้ว่าบนพื้นผิวของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์มี acpcPNA เคลือบอยู่ที่ผิว

2.4 การยืนยันการตรึง acpcPNA ลงบนอนุภาคที่ดัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิอะไครลิกแอซิดด้วยเทคนิคโฟโตคอรีเรชันสเปกโตรสโครปี (Photo correlation spectroscopy ,PCS)

การทดลองนี้ได้ทำการเปรียบเทียบขนาดและประจุของอนุภาคก่อนเคลือบด้วย PAA(MNP-AC), อนุภาคที่เคลือบด้วยพอลิเมอร์พอลิอะไครลิกแอซิด(MNP-PAA) และอนุภาคที่ตรึงด้วยพีเอ็นเอ (MNP-PNA, P1) ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 7 ผลการทดลองที่ได้แสดงดังภาพ 60

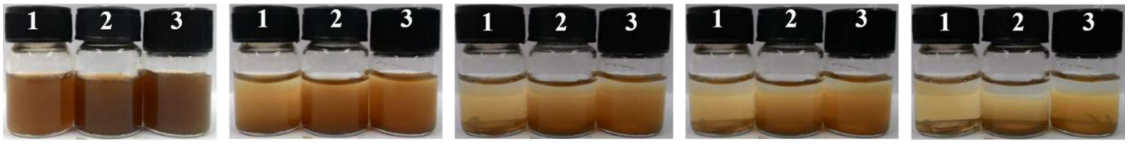


ภาพ 60 (a) ขนาดไฮโดรไดนามิก และ (b) ค่าความเป็นประจุของอนุภาคก่อนดัดแปลงพื้นผิวด้วยพอลิอะไครลิกแอซิด (MNP-Ac), อนุภาคที่ดัดแปลงพื้นผิวด้วยพอลิเมอร์พอลิอะไครลิกแอซิด(MNP-PAA) และอนุภาคที่ตรึงด้วยพีเอ็นเอ (MNP-PNA)

จากภาพ 60 พบว่าอนุภาคมีขนาดเพิ่มขึ้นเมื่อทำการดัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิอะไครลิก แอซิด และ acpc- PNA ลงทั้งนี้เนื่องจากพื้นผิวของอนุภาคดังกล่าวมีประจุลบมากกว่าอนุภาคก่อนดัดแปลงพื้นผิวด้วยพอลิอะไครลิกแอซิด (MNP-Ac) จึงทำให้มีการบวมตัวในสารละลายบัฟเฟอร์ได้ดีกว่า นอกจากนี้พบว่าอนุภาคที่ดัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิอะไครลิกแอซิดมีค่าประจุลบจะเพิ่มขึ้นเนื่องจากพอลิอะไครลิกแอซิดซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่ตอบสนองต่อค่า pH เมื่ออยู่ในสารละลายที่มีค่า pH สูงจะทำให้หมู่คาร์บอกซิลิกแตกตัวให้โปรตอนทำให้อยู่ในรูปของคาร์บอกซิเลตที่มีประจุลบมากขึ้น ในขณะที่อนุภาคที่ทำการตรึงด้วย acpcPNA พบว่าค่าความเป็นประจุลดลงอาจเนื่องมาจากการตรึง acpcPNA ด้วยแรงระหว่างประจุลบของพอลิอะไครลิกแอซิดและประจุบวกของ acpcPNA มีผลทำให้หมู่คาร์บอกซิเลตที่มีอยู่บนอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ลดลงซึ่งมีผลทำให้ค่าความเป็นประจุลดลง

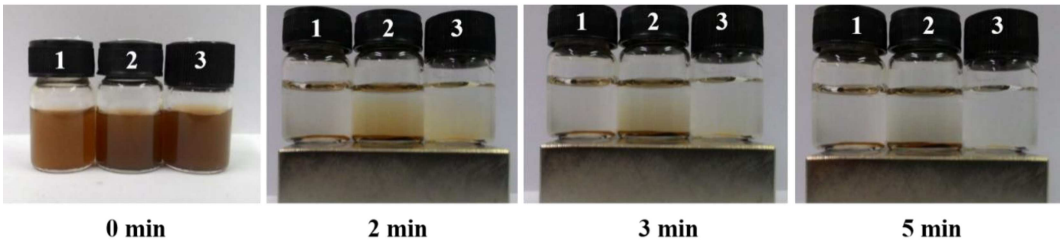
2.6 การศึกษาการกระจายตัวในน้ำปราศจากไอออนของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนดัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิอะไครลิกแอซิด อนุภาคที่ดัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิอะไครลิกแอซิด และอนุภาคที่ตรึงด้วย acpcPNA

นำอนุภาคก่อนเคลือบด้วยพอลิอะไครลิกแอซิด (MNP-Ac), อนุภาคที่เคลือบด้วยพอลิเมอร์พอลิอะไครลิกแอซิด(MNP-PAA) และอนุภาคที่ตรึงด้วยพีเอ็นเอ (MNP-PNA) แต่ละชนิดทำการกระจายตัวในน้ำ DI ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมงผลการทดลองแสดงดังภาพ 61



ภาพ 61 การทดสอบการกระจายตัวในน้ำของอนุภาคก่อนเคลือบด้วยพอลิอะไครลิกแอซิด (MNP-Ac), อนุภาคที่เคลือบด้วยพอลิเมอร์พอลิอะไครลิกแอซิด (MNP-PAA) และอนุภาคที่ตรึงด้วย acpcPNA (MNP-PNA)

จากภาพ 61 พบว่าอนุภาคทั้ง 3 ชนิดสามารถกระจายตัวได้ดีในน้ำในช่วงเวลาก่อน 24 ชั่วโมง และเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง พบว่าอนุภาคก่อนเคลือบด้วยพอลิอะไครลิกแอซิด (MNP-Ac) เกิดการตกตะกอนลงมาก่อนอนุภาคที่เคลือบด้วยพอลิเมอร์พอลิอะไครลิกแอซิด (MNP-PAA) และอนุภาคที่ตรึงด้วยพีเอ็นเอ (MNP-PNA) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากอนุภาคทั้ง 2 ชนิดนี้มีหมู่คาร์บอกซิลิกของพอลิอะไครลิกแอซิดที่อยู่บนอนุภาคซึ่งช่วยในการกระจายตัวในน้ำได้ดีนั่นเอง เมื่อทำการทดสอบการตอบสนองต่อแม่เหล็กของอนุภาคทั้ง 3 ชนิดผลการทดลองแสดงดังภาพ 62



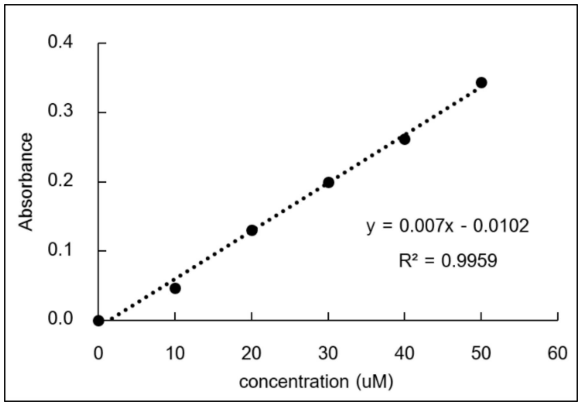
ภาพ 62 การทดสอบการตอบสนองต่อแม่เหล็กของอนุภาคก่อนเคลือบด้วยพอลิอะไครลิกแอซิด (MNP-Ac), อนุภาคที่เคลือบด้วยพอลิเมอร์พอลิอะไครลิกแอซิด (MNP-PAA) และอนุภาคที่ตรึงด้วยพีเอ็นเอ (MNP-PNA)

จากภาพ 62 เมื่อมีการใช้แม่เหล็กจากภายนอกมาทำการล่อให้อนุภาคตกตะกอนพบว่าอนุภาคก่อนเคลือบด้วยพอลิอะไครลิกแอซิด (MNP-AC) ตกตะกอนภายในเวลา 2 นาที จากนั้นเมื่อเวลาผ่านไป 3 นาที อนุภาคที่ตรึงด้วยพีเอ็นเอ (MNP-PNA) จึงเกิดการตกตะกอนในขณะที่อนุภาคที่เคลือบด้วยพอลิเมอร์พอลิอะไครลิกแอซิด (MNP-PAA) เกิดการตกตะกอนช้าสุดเมื่อเวลาผ่านไปเวลา 5 นาที จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นถึงอนุภาคที่ถูกดัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิอะไครลิกแอซิดมีความสามารถในการกระจายตัวในน้ำได้ดีที่สุด ในขณะที่อนุภาคที่ถูกตรึงด้วยพีเอ็นเอ (MNP-PNA) จะมีส่วนของหมู่คาร์บอกซิเลตน้อยลงและมี acpcPNA ซึ่งเป็นโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำจึงทำให้เกิดการตกตะกอนลงมาก่อนอนุภาคที่ดัดแปลงพื้นผิวด้วยพอลิอะไครลิกแอซิด

2.7 การหาปริมาณของ acpcPNA ที่ถูกตรึงลงบนพื้นผิวของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่มีการดัดแปลงพื้นผิวด้วยพอลิอะไครลิกแอซิด

2.7.1 การสร้างกราฟมาตรฐานของ acpc-PNA

การสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลาย acpcPNA ที่ความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 ไมโครโมลาร์ โดยนำสารละลาย acpcPNA แต่ละความเข้มข้นไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเทคนิค UV-Vis spectrophotometry ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร หลังจากนั้นทำการพลอตกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของพิโรล์ลิดินิลพีเอ็นเอและค่าการดูดกลืนแสงของ acpcPNA แต่ละความเข้มข้น ผลการทดลองแสดงดังภาพ 63

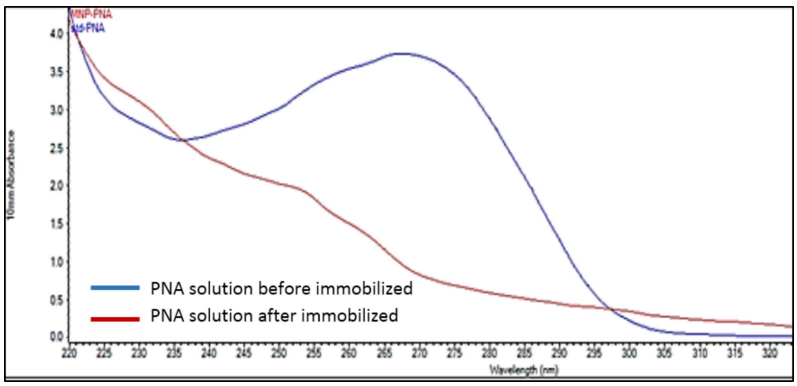


ภาพ 63 กราฟมาตรฐานของ acpcPNA ที่ความเข้มข้นต่างๆ

จากภาพ 63 พบว่ากราฟมาตรฐานของ acpcPNA มีความเป็นเส้นตรงและมีค่าสัมประสิทธิ์สห สัมพัทธ์อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้

2.7.2 การหาปริมาณของ acpcPNAถูกตรึงลงบนพื้นผิวอนุภาคที่ถูกเคลือบด้วยพอลิเมอร์ชนิดพอลิอะไครลิกแอซิดโดยใช้แรงระหว่างประจุ

การตรึง acpcPNAลงบนพื้นผิวอนุภาคที่ถูกเคลือบด้วยพอลิเมอร์ชนิดพอลิอะไครลิกแอซิดจะทำจะทำในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 7 เมื่อทำการแยกอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ออกจากสารละลาย acpcPNAด้วยแม่เหล็ก นำสารละลาย acpcPNAที่เหลือหลังการทำปฏิกิริยามาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมตรี (UV-Vis spectrophotometry) โดยเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของ acpcPNAก่อนการตรึงลงบนอนุภาค ผลการทดลองแสดงดังภาพ 64



ภาพ 64 ค่าการดูดกลืนแสงของ acpcPNAก่อนและหลังตรึงลงบนอนุภาค

จากภาพ 64 พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของ acpc-PNAหลังจากตรึงลงบนอนุภาคมีค่าลดลงเมื่อเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของ acpcPNA ก่อนตรึงลงบนอนุภาค และเมื่อทำการหาปริมาณของ acpcPNA ที่ถูกตรึงลงบนอนุภาค พบว่า acpcPNA ถูกตรึงลงบนอนุภาคคิดเป็น 0.18 นาโนโมลต่อมิลลิกรัมของอนุภาค

3. การนำอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วยพิร์โรลิดินิลพีเอ็นเอทั้งสองชนิดมาใช้ร่วมกับดีเอ็นเอ

3.1 การนำอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย acpcPNA มาทดสอบความสามารถในการดูดจับดีเอ็นเอและตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ที่สอดคล้องกับบางส่วนของดีเอ็นเอตัวอย่างจริง

ดีเอ็นเอที่ใช้ในการศึกษาได้มีการติดสารเรืองแสงที่ปลายสายเพื่อให้ง่ายต่อการตรวจวัดซึ่งประกอบไปด้วยดีเอ็นที่ได้จากการสังเคราะห์ที่มีลำดับเบสคู่สม (Fully match,D1), ดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสไม่เป็นคู่สมหนึ่งตำแหน่ง (Single based mismatch, D2) และ ดีเอ็นเอที่ไม่มีลำดับเบสที่เป็นคู่สม (Fully mismatch, D3) ซึ่งมีลำดับเบสแสดงดังตาราง 9

ตาราง 9 ลำดับเบสของดีเอนเอที่ใช้ร่วมกับอนุภาคที่ตรึงด้วยพีเอ็นเอ

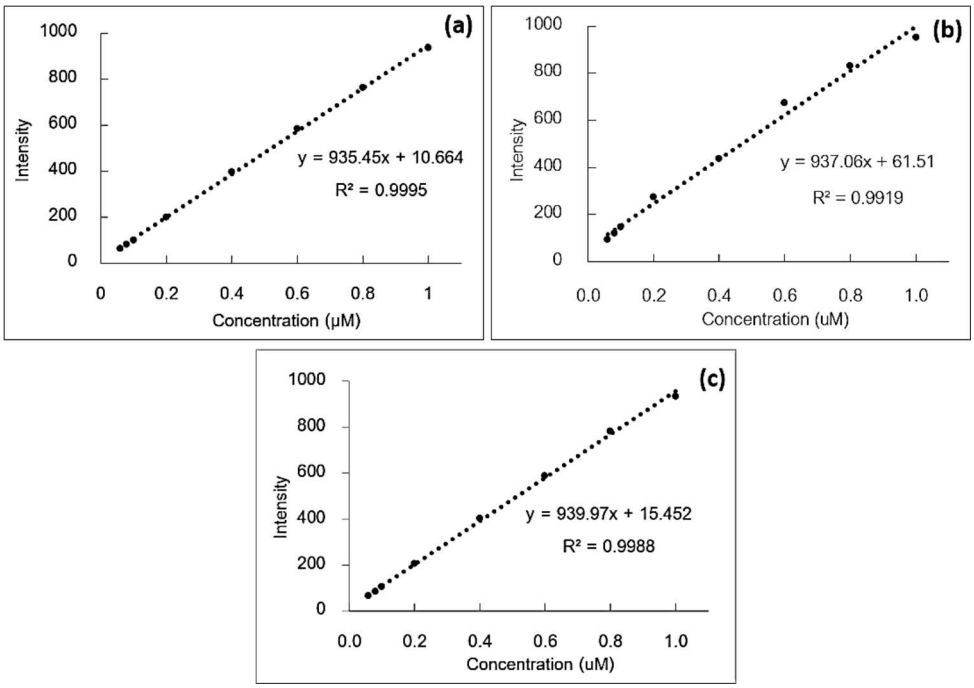
	ลำดับเบสของดีเอ็นเอ	**excitation**	**emission**
Ac-ATGCCACAATGT-LysNH_2	FAM-5’-ACATTGTGGCAT-3’	490	520
	Fully match (D1)		
	Cy5-5’-ACATTATGGCAT-3’	650	670
	Single based mismatch (D2)		
	TAMRA-5’-TGCGATCCATGC-3’	552	584
	Fully mismatch (D3)		

ในการศึกษาการนำอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย acpcPNA มาทดสอบความสามารถในการดูดจับดีเอ็นเอและตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นสังเคราะห์แบ่งเป็น 3 การทดลองดังนี้

3.1.1 การสร้างกราฟมาตรฐานของดีเอ็นเอ (D1, D2 และ D3)

นำสารละลายมาตรฐานดีเอ็นเอแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 0.06, 0.08, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 ไมโครโมลาร์ ทำการวัดค่าการคายแสงด้วยเทคนิค ฟลูออเรสเซนต์สเปกโตรสโคปีจากนั้น ทำการ

พลอต กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของดีเอ็นเอและค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของดีเอ็นเออีเอ็นเอที่แต่ละความเข้มข้น ผลการทดลองที่ได้แสดงดังภาพ 65



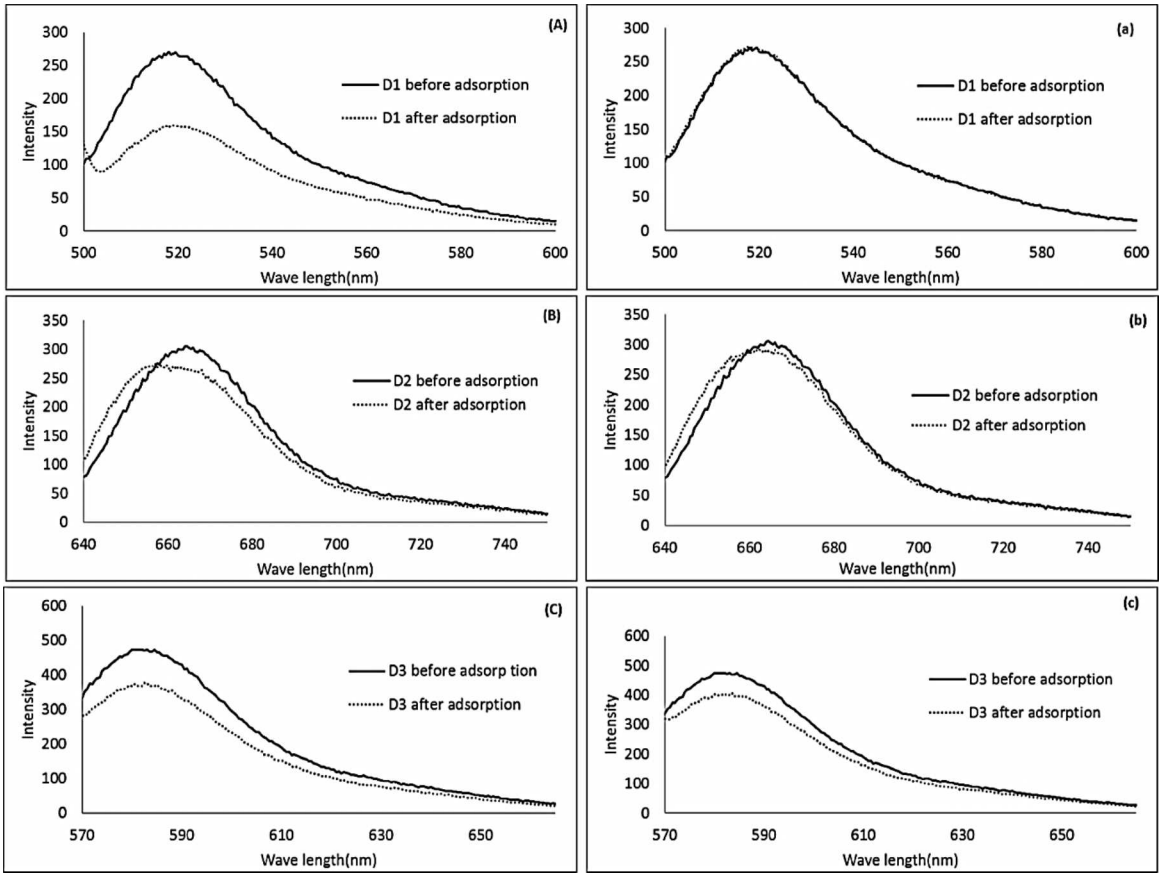
ภาพ 65 กราฟมาตรฐานของดีเอ็นเอ (a) Fully match (D1), (b) Single based mismatch (D2) และ (c) Fully mismatch (D3)

พบว่ากราฟมาตรฐานของดีเอ็นเอแต่ละชนิดอยู่ในช่วงความเป็นเส้นตรงและมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้

3.1.2 การศึกษาความสามารถและความจำเพาะเจาะจงของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ถูกตรึงด้วย acpcPNA (MNP-PNA) ในการดูดจับดีเอ็นเอเทียบกับอนุภาคก่อนตรึงด้วยพีเอ็นเอ (MNP-PAA)

โดยนำอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ก่อนตรึงด้วย acpcPNA (MNP-PAA) และอนุภาคหลังตรึงด้วย acpcPNA (MNP-PNA) ทดสอบการดูดจับดีเอ็นเอ 3 ชนิด ที่ประกอบด้วยดีเอ็นที่มีลำดับเบสคู่สม (Fully match,vD1), ดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสไม่เป็นคู่สมหนึ่งตำแหน่ง (Single based mismatch, D2) และ ดีเอ็นเอที่ไม่มีลำดับเบสที่เป็นคู่สม (Fully mismatch, D3) โดยการการเติมอนุภาคแต่ละชนิดลงในสารละลายของดีเอ็นเอ D1, D2 และ D3 ทำการศึกษาหาปริมาณดีเอ็นเอที่ถูกดูดจับบนอนุภาค โดยนำสารละลายดีเอ็นเอแต่ละชนิด ก่อนและหลังทำการดูดจับกับอนุภาคทำการตรวจวัดค่าการคายแสงด้วยเทคนิคฟลูออเรส

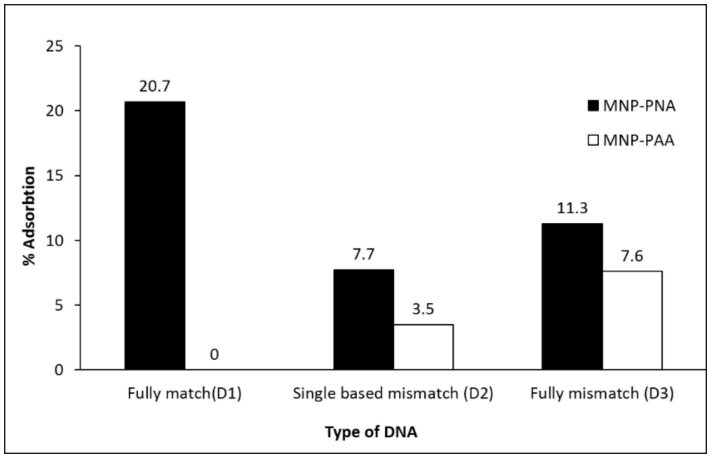
เซนต์สเปกโตรสโคปีแล้วนำค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานของดีเอ็นเอแต่ละชนิด ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 66



ภาพ 66 ฟลูออเรสเซนต์สเปกตรัมของสารละลายดีเอ็นเอแต่ละชนิดก่อน และหลังทำการดูดจับลงบนอนุภาค A-C : อนุภาคที่ตรึงด้วย acpcPNA (MNP-PNA) และ a-c : อนุภาคก่อนตรึงด้วย acpcPNA (MNP-PAA)

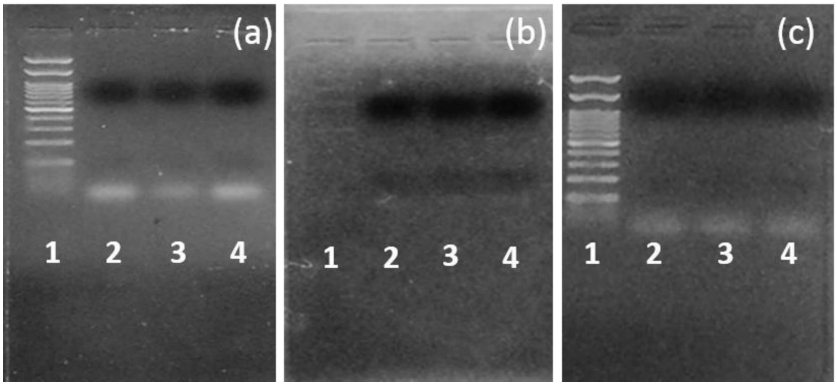
จากภาพพบว่าเมื่อใช้อนุภาคที่ตรึง acpcPNA (MNP-PNA) มาทำการดูดจับดีเอ็นแต่ละชนิด อนุภาคสามารถดูดจับได้เฉพาะดีเอ็นที่ที่มีลำดับเบสคู่สม (Full match, D1) เท่านั้น โดยจากค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายดีเอ็นเอ D1 หลังเติมอนุภาคมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพ 66A) ในขณะที่ค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายดีเอ็นเอ D2 และ D3 มีค่าค่อนข้างใกล้เคียงกับสารละลายดีเอ็นเอก่อนเติมอนุภาค (ภาพ 66 B และ C) แสดงให้เห็นว่าอนุภาคที่ถูกตรึงด้วย acpcPNA (MNP-PNA) นี้มีความจำเพาะเจาะจงในการดูดจับดีเอ็นเอเฉพาะดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมเท่านั้น ในทางกลับกันเมื่อทดสอบความสามารถของอนุภาคก่อนตรึงด้วย acpcPNA มาดูดจับกับดีเอ็นเอ D1, D2 และ D3 พบว่าอนุภาคดูดจับดีเอ็นเอทั้ง 3 ชนิดได้น้อยมาก โดยดูได้จากค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของดีเอ็นเอแต่ละ

ชนิดก่อน และหลังการเติมอนุภาคมีค่อนข้างค่าใกล้เคียงกันมาก (ภาพ 66 a-c) จากผลการทดลองสามารถกล่าวได้ว่าอนุภาคก่อนตรึง acpcPNA (MNP-PAA) ไม่เกิดแรงกระทำ หรือดูดจับแบบไม่จำเพาะเจาะจง (non-specific adsorption) กับดีเอ็นเอทั้ง 3 ชนิด เมื่อคำนวณหาปริมาณของดีเอ็นเอแต่ละชนิดที่ถูกดูดจับลงบนอนุภาค และนำค่าปริมาณของดีเอ็นเอที่ได้มาทำการหาค่าเปอร์เซ็นต์การดูดจับดีเอ็นเอลงบนอนุภาคแต่ละชนิดพบว่าได้ผลดังภาพ 67



ภาพ 67 ค่าเปอร์เซ็นต์การดูดจับดีเอ็นเอทัง 3 ชนิด D1, D2 และ D3 โดยใช้อนุภาค MNP-PNA เทียบกับอนุภาค MNP-PAA

จากภาพ 67 พบว่าอนุภาค MNP-PNA สามารถดูดจับดีเอ็นเอ D1 ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับ acpcPNA ได้ปริมาณมากที่สุดโดยมีค่าเปอร์เซ็นต์ของการดูดจับดีเอ็นเอคิดเป็น 20.7 ส่วนดีเอ็นเอ D2 และ D3 ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสไม่เป็นคู่สมเพียง 1 ตำแหน่ง และดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสไม่เป็นคู่สมตามลำดับ มีค่าเปอร์เซ็นต์ของการดูดจับค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับ D1 ซึ่งอาจเกิดจากการหายไปของดีเอ็นเอในขั้นตอนของการแยกดีเอ็นเอออกจากอนุภาค จึงทำให้เกิดการสูญหายไปของดีเอ็นเอในขณะที่การใช้อนุภาค MNP-PAA ในการดูดจับดีเอ็นเอแต่ละชนิดให้ผลที่ได้ไม่แตกต่างกัน จึงกล่าวได้ว่าอนุภาค MNP-PNA สามารถดูดจับดีเอ็นเอ D1 ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมเท่านั้น ส่วนอนุภาค MNP-PAA สามารถดูดจับดีเอ็นเอทั้ง 3 ชนิดได้น้อยมาก นอกจากนี้ยังได้ศึกษาความสามารถและความจำเพาะเจาะจงในการดูดจับดีเอ็นเอของอนุภาคแต่ละชนิดในเชิงคุณภาพโดยใช้เทคนิค เจล อิเล็กโตรโฟเรซิส ผลการทดลองที่ได้แสดงดังภาพ 68

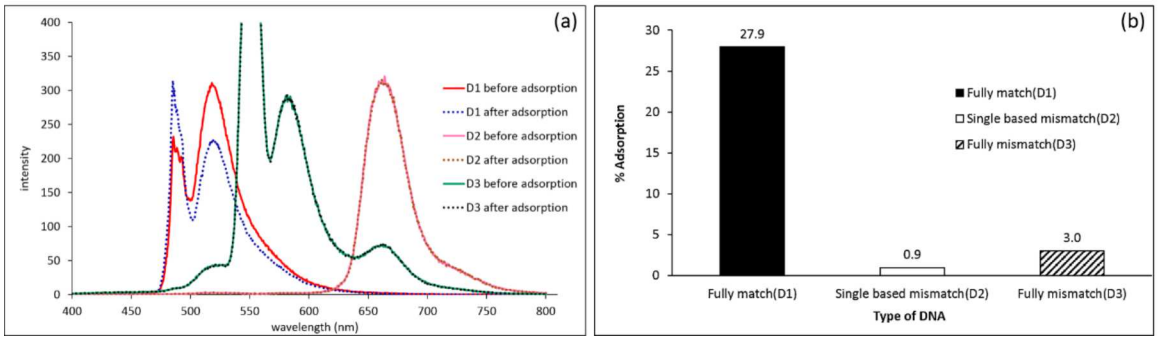


ภาพ 68 ภาพเจลอิเล็กโตรโฟเลซิส a. Fully match (D1), b. Single based mismatch (D2) และ c. Fully mismatch (D3) 1: มาร์คเกอร์ 100 เบส, 2: สารละลายดีเอ็นเอก่อนการเติมอนุภาค, 3: สารละลายดีเอ็นเอหลังเติมอนุภาค MNP-PNA และ 4: สารละลายดีเอ็นเอหลังเติมอนุภาค MNP-PAA

จากภาพพบว่าแบนด์ที่ 3 ซึ่งเป็นแบนด์ของสารละลายของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเป็นคู่สม (Fully match, D1) (ภาพ 68 a) หลังการเติมอนุภาค MNP-PNA มีสีจางลงเท่านั้นซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีดีเอ็นเอ (D1) บางส่วนถูกดูดจับลงบนอนุภาคจึงทำให้สารละลายดีเอ็นเอ (D1) มีปริมาณลดลงในขณะที่สารละลายดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสไม่เป็นคู่สมเพียง 1 ตำแหน่ง (Single based mismatch, D2) (ภาพ 68 b) และ สารละลายดีเอ็นเอที่ไม่มีลำดับเป็นคู่สม (Fully mismatch, D3) (ภาพ 68 c) มีขนาดของแบนด์เท่าเดิมเมื่อเทียบกับสารละลายดีเอ็นเอก่อนเติมอนุภาคซึ่งแสดงในแบนด์ที่ 2 (ภาพ 68 b และ c) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า D2 และ D3 ไม่ได้ถูกดูดจับบนอนุภาค ในทางกลับกันเมื่อทำการดูดจับดีเอ็นเอด้วยอนุภาค MNP-PAA พบว่าขนาดและสีของแบนด์ของสารละลายดีเอ็นเอทั้ง 3 ชนิดหลังการเติมอนุภาค ซึ่งแสดงในแบนด์ที่ 4 (ภาพ 68 a-c) ไม่มีการจางลง ซึ่งสามารถกล่าวได้ว่าดีเอ็นเอทั้ง 3 ชนิดไม่ถูกดูดจับลงบนอนุภาค MNP-PAA ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองของฟลูออเรสเซนต์สเปกโตรสโคปี

3.1.3 การทดสอบการดูดจับดีเอ็นเอผสม 3 ชนิด ของอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ถูกตรึงด้วย acpc-PNA

เพื่อยืนยันความสามารถและความจำเพาะเจาะจงของอนุภาคที่ถูกตรึงด้วย acpcPNA ในการดูดจับดีเอ็นเอจึงได้ทำการนำอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ตรึงด้วย acpcPNA (MNP-PNA) มาทดสอบการดูดจับดีเอ็นเอในสารละลายดีเอ็นเอผสม 3 ชนิด ระหว่างสารละลายดีเอ็นเอ D1+D2+D3 จากนั้นนำสารละลายดีเอ็นผสม 3 ชนิด ก่อนและหลังทำการดูดจับกับอนุภาค MNP-PNA ทำการตรวจวัดด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโตรสโคปี แล้วทำการหาค่าเปอร์เซ็นต์ของการดูดจับดีเอ็นเอ ผลการทดลองแสดงดังภาพ 69

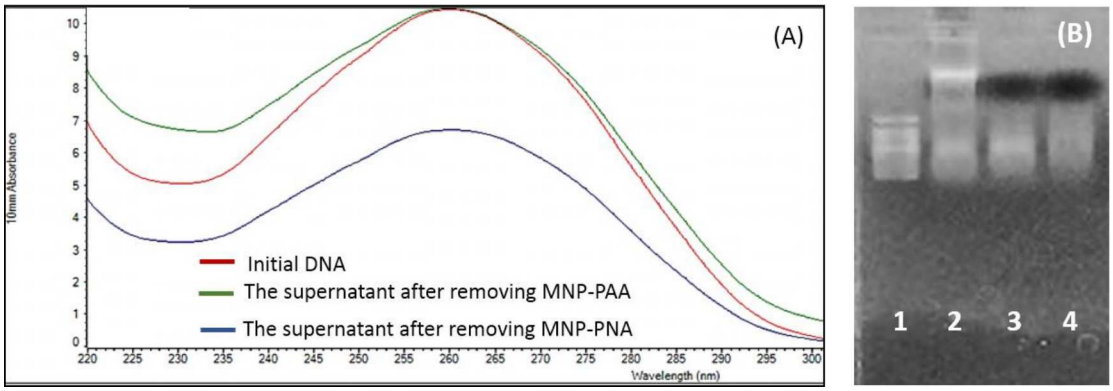


ภาพ 69 (a) ฟลูออเรสเซนต์สเปกตรัมของสารละลายดีเอ็นเอผสม D1+D2+D3 ก่อนและหลังการดูดจับด้วยอนุภาคที่ตรึง acpcPNA (MNP-PNA) และ (b) ค่าร้อยละของการดูดจับดีเอ็นเอแต่ละชนิด

จากภาพพบค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของดีเอ็นเอ D1 ในสารละลายดีเอ็นเอผสม (D1+D2+ D3) หลังการเติมอนุภาค MNP-PNA ลดลงอย่างชัดเจน ในขณะที่ค่าการคายแสงของ D2 และ D3 มีค่าลดลงอย่างไม่มีนัยสำคัญ เมื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของการดูดจับดีเอ็นเอแต่ละชนิดพบว่าอนุภาค MNP-PNA สามารถดูดจับดีเอ็นเอ D1 ในสารละลายดีเอ็นเอผสมระหว่าง D1+D2+D3 คิดเป็น 27.9 จากผลการทดลองที่ได้นั้นสามารถยืนยันได้ว่าอนุภาค MNP-PNA แสดงความสามารถในการดูดจับดีเอ็นเอที่ดีและมีความจำเพาะเจาะจงในการเลือกจับดีเอ็นเอที่สูงซึ่งสามารถแยกความแตกต่างของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสที่เป็นคู่สม และไม่เป็นคู่สมรวมถึงดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสที่ต่างกันเพียง 1 ลำดับเบสได้อย่างชัดเจน

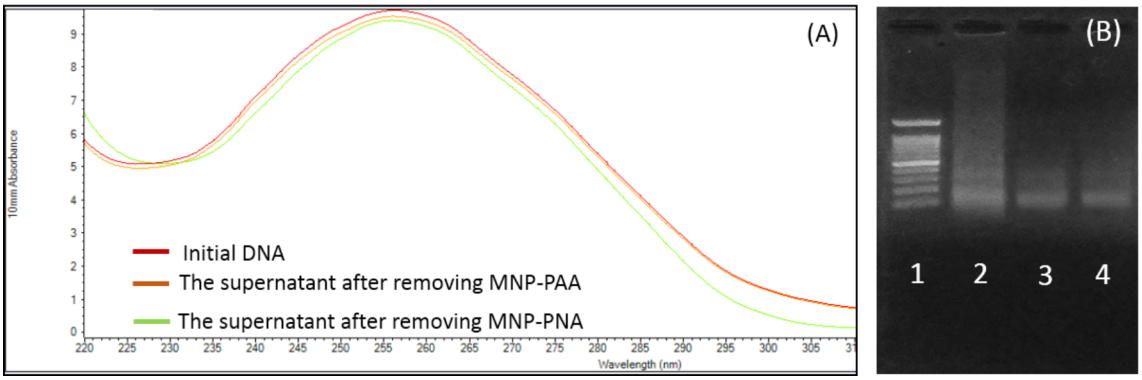
3.2. การศึกษาเบื้องต้นในการนำอนุภาคที่ตรึงด้วย acpc-PNA(P1)(MNP-PNA) มาทำการดูดจับดีเอ็นเอจริงเพื่อใช้เป็นอนุภาคในการดูดจับดีเอ็นเอที่สนใจ

ดีเอ็นเอจริงที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้รับความอนุเคราะห์มาจาก ผศ.ดร. มลิวรรณ นาคขุนทด ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ซึ่งการทดลองได้นำอนุภาคที่ตรึงด้วยพิร์โรลิดินิลพีเอ็นเอ (MNP-PNA) หรือ อนุภาค MNP-PAA มาทำการเติมลงในสารละลายดีเอ็นเอจริงที่เกี่ยวข้องกับโปรตีนซีนที่สกัดได้จากข้าวโพดที่ทำการแยกให้เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวแล้ว จากนั้นนำสารละลายดีเอ็นเอจริงก่อนและหลังทำการดูดจับกับอนุภาคที่ตรึงด้วยพิร์โรลิดินิลพีเอ็นเอ(MNP-PNA) หรือ อนุภาค MNP-PAA ทำการตรวจวัดเบื้องต้นด้วยเทคนิค ยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมตรี และเจล-อิเล็กโตรโฟรีซิส ผลการทดลองแสดงดังภาพ 70



ภาพ 70 (A) สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายดีเอ็นเอจริงที่ได้จากการสกัดจากข้าวโพด ก่อนและหลังทำการดูดจับด้วยอนุภาค MNP-PNA หรือ MNP-PAA
(B) เจล-อิเล็กโตรโฟรีซิส 1: มาร์คเกอร์ 100 เบส, 2: สารละลายดีเอ็นเอก่อนการเติมอนุภาค, 3: สารละลายดีเอ็นเอหลังการเติมอนุภาค MNP-PAA และ 4: สารละลายดีเอ็นเอหลังการเติมอนุภาค MNP-PNA

จากภาพ 70(A) พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอตัวอย่างจริงหลังจากการเติมอนุภาค MNP-PNA มีค่าลดลงอย่างชัดเจนซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองจากเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส ภาพ 70(B) ซึ่งพบว่าความเข้มของแบนด์ที่ 4 ซึ่งเป็นแบนด์ของสารละลายดีเอ็นเอตัวอย่างจริงหลังจากการเติมอนุภาค MNP-PNA จางลงเมื่อเทียบกับสารละลายดีเอ็นเอจริงก่อนทำการดูดจับด้วยอนุภาค MNP-PNA (ภาพ 70(B)หมายเลข 2) แสดงให้ว่าดีเอ็นเอจริงบางส่วนถูกดูดจับไปบนอนุภาคซึ่งเป็นผลมาจากส่วนของดีเอ็นเอจริงมีลำดับเบสบางส่วนเป็นคู่สมกับ acpcPNA ที่ถูกตรึงอยู่ที่ผิวของอนุภาค ในทางกลับกันเมื่อใช้อนุภาค MNP-PAA ในการจับดีเอ็นเอพบว่าค่าการดูดกลืนแสงไม่เปลี่ยนแปลงหลังจากทำการดูดจับดีเอ็นเอซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองจากเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสซึ่งพบว่าแบนด์ที่ 3 ซึ่งเป็นแบนด์ของสารละลายดีเอ็นเอตัวอย่างจริงหลังจากการเติมอนุภาค MNP-PAA มีความเข้มเท่าเดิมเมื่อเทียบกับสารละลายดีเอ็นเอจริงก่อนทำการดูดจับด้วยอนุภาค MNP-PAA ซึ่งสามารถกล่าวได้ว่าดีเอ็นเอไม่ถูกดูดจับลงบนอนุภาค MNP-PAA เพื่อทำการยืนยันประสิทธิภาพของอนุภาคที่ตรึงด้วยพิร์โรลิดินิลพีเอ็นเอ (MNP-PNA)ในการเลือกจับดีเอ็นเอที่สนใจอย่างจำเพาะเจาะจง ได้ทำการทดสอบกับดีเอ็นเอจริงที่สกัดได้จากกล้วยไม้ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่ไม่เกี่ยวข้องกับโปรตีนซีนและมีลำดับเบสที่ไม่เป็นคู่สมกับ PNA ซึ่งทำการตรวจวัดสารละลายดีเอ็นเอจริงก่อนและหลังทำการดูดจับกับอนุภาคที่ตรึงด้วยพิร์โรลิดินิลพีเอ็นเอ(MNP-PNA) หรือ อนุภาค MNP-PAA เบื้องต้นด้วยเทคนิค ยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมตรี และเจล-อิเล็กโตรโฟรีซิส ผลการทดลองแสดงดังภาพ 71



ภาพ 71 (A) สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายดีเอ็นเอจริงที่ได้จากการสกัดจากกล้วยไม้ ก่อนและหลังทำการดูดจับด้วยอนุภาค MNP-PNA หรือ MNP-PAA

(B) เจล-อิเล็กโตรโฟรีซิส 1: มาร์คเกอร์ 100 เบส, 2: สารละลายดีเอ็นเอก่อนการเติมอนุภาค, 3: สารละลายดีเอ็นเอหลังการเติมอนุภาค MNP-PAA และ 4: สารละลายดีเอ็นเอหลังการเติมอนุภาค MNP-PNA

จากภาพ 71(A) พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอตัวอย่างจริงหลังจากการเติมอนุภาค MNP-PAA และ MNP-PNA มีค่าใกล้เคียงกับค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายดีเอ็นเอก่อนเติมอนุภาค ซึ่งสอดคล้องกับเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส ภาพ 71(B) ซึ่งพบว่าความเข้มของแบนด์ที่ 3 และ 4 ซึ่งเป็นแบนด์ของสารละลายดีเอ็นเอตัวอย่างจริงหลังจากการเติมอนุภาค MNP-PNA และ MNP-PAA ไม่แตกต่างจากแบนด์ที่ 2 ซึ่งเป็นแบนด์ของสารละลายดีเอ็นเอจริงก่อนทำการดูดจับด้วยอนุภาค แสดงให้ว่าดีเอ็นเอจริงไม่ถูกดูดจับไปบนอนุภาคทั้งสองชนิดนี้ ซึ่งเนื่องมาจากดีเอ็นเอที่สกัดได้จากกล้วยไม้นี้ไม่มีลำดับเบสที่เป็นคู่สมกับ acpcPNA ที่ตรึงบนพื้นผิวของอนุภาค จากผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงความสามารถของอนุภาคที่ตรึงด้วยพิร์โรลิดินิลพีเอ็นเอ (MNP-PNA)ในการเลือกจับดีเอ็นเอเฉพาะที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมเท่านั้น

จากผลการทดลองเบื้องต้นสามารถกล่าวได้ว่าอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ถูกตรึงด้วย acpcPNA สามารถนำมาใช้ร่วมกับดีเอ็นเอตัวอย่างจริงได้ โดยสามารถนำมาใช้เป็นอนุภาคในการดูดจับเฉพาะดีเอ็นเอที่สนใจได้และยังมีความจำเพาะเจาะจงสูงอีกด้วย

<u>สรุปผลการทดลองแนวทางที่ 2</u>

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการสังเคราะห์อนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ดัดแปรพื้นผิวด้วยพอลิอะไครลิกแอซิด ซึ่งอนุภาคที่สังเคราะห์ได้แสดงคุณสมบัติมีประจุลบบนพื้นผิวสูง มีความเสถียร และการกระจายตัวในน้ำที่ดี นอกจากนี้ยังสามารถตอบสนองต่อค่า pH ของสารละลายที่เปลี่ยนแปลงไป หลังจากนั้นเมื่อทำการตรึง acpcPNA ลงบนพื้นผิวของอนุภาคด้วยแรงระหว่างประจุพบว่ามีปริมาณของ acpcPNA ที่ถูกตรึงลงบนอนุภาคคิดเป็น 0.18 นาโนโมลต่อมิลลิกรัมของอนุภาค

เมื่อนำอนุภาคที่ตรึงด้วย acpcPNA ทำการทดสอบความสามารถและความจำเพาะเจาะจงในการจับกับดีเอ็นเอแต่ละชนิด ซึ่งพบว่าอนุภาคที่ตรึงด้วย acpcPNA สามารถจับกับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกันเท่านั้นซึ่งแสดงให้เห็นถึงความจำเพาะเจาะจงในการเลือกจับดีเอ็นเอ และความสามารถในการแยกความแตกต่างของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสไม่เป็นคู่สมกันเพียงตำแหน่งเดียวได้ จากนั้นเมื่อนำอนุภาคที่ตรึงด้วย acpcPNA มาศึกษาเบื้องต้นร่วมกับดีเอ็นเอจริง โดยนำอนุภาคที่ตรึงด้วย acpcPNA มาทดสอบการจับกับดีเอ็นเอจริงที่สกัดได้จากข้าวโพด ซึ่งจากผลการทดลองเบื้องต้นพบว่าอนุภาคที่ตรึงด้วย acpcPNA สามารถดูดจับดีเอ็นเอตัวอย่างจริงได้

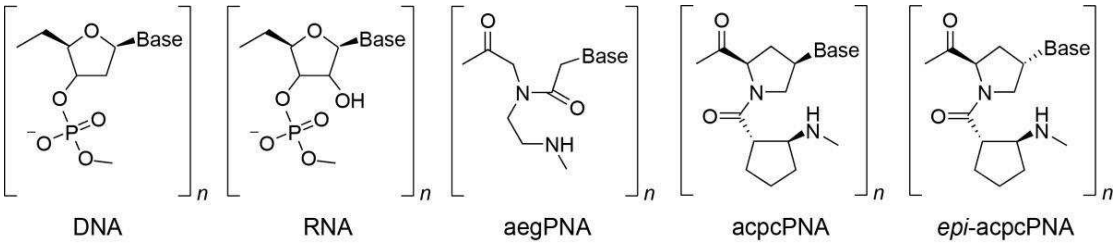
จากการทดลองที่ได้สามารถกล่าวได้ว่าอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ทำการตรึงด้วย acpcPNA มีความสามารถ และมีความจำเพาะเจาะจงในการเลือกจับดีเอ็นเอได้ ซึ่งคาดว่าอนุภาคนาโนแมกนีไทท์ที่ได้ดังกล่าวนี้สามารถนำมาประยุกต์เป็นอนุภาคในการตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอ และดูดจับดีเอ็นเอที่สนใจในอนาคตได้

ชื่อโครงการย่อย A theoretical study of structural and energetic properties of peptide nucleic acid
ระยะเวลาโครงการ 17 มีนาคม 2557 – 16 มีนาคม 2560 ได้รับอนุมัติให้ขยายเวลาถึง 16 กันยายน 2560
รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 17 มีนาคม 2557 **ถึงวันที่** 16 กันยายน 2560

หัวหน้าโครงการย่อย
ผศ.ดร.คัชรินทร์ ศิริวงศ์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

หลักการและเหตุผล

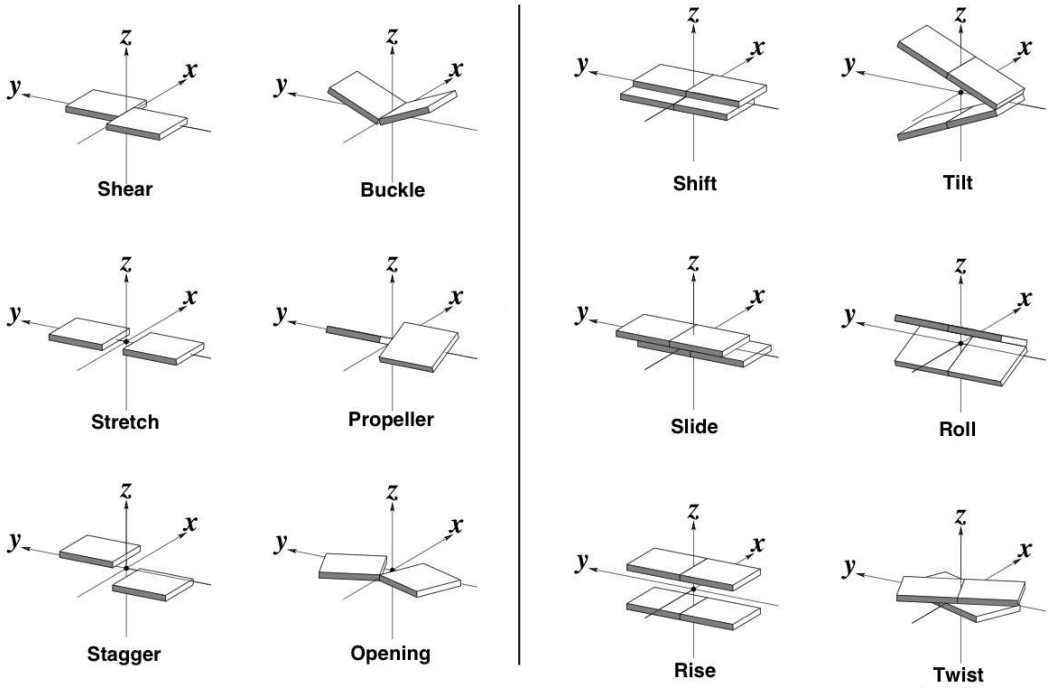
เนื่องจากผลการศึกษาในห้องปฏิบัติการพบว่า pyrrolidinyl PNA มีความสามารถในการเข้าคู่กับกรดนิวคลีอิกเกิดเป็นโมเลกุลสายคู่ PNA-DNA, PNA-RNA และ PNA-PNA ได้โครงสร้างที่มีความเสถียรเชิงความร้อนสูง อย่างไรก็ตาม เนื่องจากไม่มีโครงสร้าง 3 มิติของพีเอ็นเอชนิดดังกล่าว จึงไม่สามารถอธิบายสมบัติการเข้าคู่ที่แตกต่างกันของพีเอ็นเอทั้ง 2 ชนิดนี้ได้ จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องศึกษาสมบัติทางโครงสร้างด้วยวิธีทางทฤษฎี หรือ วิธีทางเคมีเชิงคอมพิวเตอร์ ดังนั้นโครงการย่อยนี้จึงมีวัตถุประสงค์คือเพื่อศึกษาสมบัติทางโครงสร้างและพลังงานการจับยึดของ pyrrolidinyl PNA ซึ่งในการศึกษานี้จะใช้วิธีการจำลองแบบทางพลวัตเชิงโมเลกุล (molecular dynamics simulation) โดยศึกษาทั้งหมด 2 ชนิด (รูปที่ 1) ซึ่งได้แก่ (2*R*,4*R*)-prolyl-(1*S*,2*S*)-2-aminocyclopentane carboxylic acid (acpcPNA) และ (2*R*,4*S*)-prolyl-(1*S*,2*S*)-2-aminocyclopentane carboxylic acid (*epi*-acpcPNA) เมื่อเข้าคู่กันกับ DNA, RNA และ PNA ด้วยกันเองเกิดเป็นโมเลกุลสายคู่ PNA-DNA, PNA-RNA และ PNA-PNA ตามลำดับ



รูปที่ 1 โครงสร้างเคมีของ DNA, RNA และ PNA ชนิด N-(2-amino-ethyl)-glycine หรือ aegPNA, (2*R*,4*R*)-prolyl-(1*S*,2*S*)-2-aminocyclopentane carboxylic acid (acpcPNA) และ (2*R*,4*S*)-prolyl-(1*S*,2*S*)-2-aminocyclopentane carboxylic acid (*epi*-acpcPNA)

การเข้าคู่กันของกรดนิวคลีอิกเกิดเป็นเกลียวคู่ (double helix) นั้นเป็นไปได้หลายรูปแบบ (form) เช่น ในโมเลกุลสายคู่ของ DNA ที่พบมากจะเป็นแบบ A-form และแบบ B-form (Saenger, 1988) ในขณะที่การเข้าคู่ของ PNA ชนิด aegPNA จะเป็นแบบ P-form (Sen & Nielsen, 2006) โดยพารามิเตอร์ที่บอกความแตกต่างกันของโมเลกุลสายคู่แต่ละแบบแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ การวางตัวของคู่เบส หรือ base-pair parameter (ประกอบด้วย 6 พารามิเตอร์ ได้แก่ shear, stretch stagger, buckle, propeller และ opening) และ การวางตัวของสองคู่เบสที่อยู่ติดกัน หรือ base-step parameter (ได้แก่ shift, slide, rise, tilt, roll และ twist) (ดูรูปที่ 2) สำหรับโมเลกุลสายคู่

แบบ A-form จะมีพารามิเตอร์ rise = 2.5 Å และ twist = 32.7° (ทำให้มีจำนวนคู่เบส 11 คู่ต่อการหมุนเกลียว 1 รอบ) โมเลกุลสายคู่แบบ B-form จะมีพารามิเตอร์ rise = 3.4 Å และ twist = 36.0° (ทำให้มีจำนวนคู่เบส 10 คู่ต่อการหมุนเกลียว 1 รอบ) และโมเลกุลสายคู่แบบ P-form จะมีพารามิเตอร์ rise = 3.3 Å และ twist = 20° (ทำให้มีจำนวนคู่เบส 18 คู่ต่อการหมุนเกลียว 1 รอบ) และค่าพารามิเตอร์ slide มีค่าประมาณ –2.5 Å (Rasmussen et al., 1997)



รูปที่ 2 แสดงการวางตัวของคู่เบสสำหรับบอกพารามิเตอร์ต่างๆ ได้แก่ base-pair (ซ้ายมือ) และ base-step parameter (ขวามือ)

ตามที่กล่าวมาแล้วข้างต้นว่าไม่มีโครงสร้าง 3 มิติของ pyrrolidinyl PNA ทั้ง 2 ชนิด ดังนั้นในการสร้างแบบจำลองเพื่อศึกษาสมบัติทางโครงสร้างของ PNA ดังกล่าวจึงต้องสร้างโครงสร้างเริ่มต้นทั้ง 3 รูปแบบ เพื่อศึกษาว่าโครงสร้างที่เป็นไปได้ของ PNA ว่ามีรูปแบบอย่างไร อย่างไรก็ตามเพื่อเป็นการพิสูจน์ว่าระเบียบวิธีวิจัยมีความถูกต้อง จึงต้องศึกษาโครงสร้างของ aegPNA ซึ่งเป็น PNA ที่มีโครงสร้าง 3 มิติ ด้วยทั้งนี้เพื่อพิสูจน์ว่าผลที่ได้จากการจำลองแบบทางพลวัตเชิงโมเลกุลให้โครงสร้างสอดคล้องกับโครงสร้าง 3 มิติ ที่ได้จากการศึกษาในห้องปฏิบัติการหรือไม่ จากนั้นนำโครงสร้างของโมเลกุลสายคู่ที่ได้จากการจำลองแบบทางพลวัตเชิงโมเลกุลนำมาคำนวณพลังงานยึดจับ (binding energy, $\Delta E_{binding}$) เพื่อเปรียบเทียบความเสถียรเชิงโครงสร้างของโมเลกุลกับความเสถียรเชิงความร้อน (T_m) ที่ได้จากการทดลองในห้องปฏิบัติการ

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาสมบัติทางโครงสร้างและพลังงานของโมเลกุลสายคู่ PNA-PNA, PNA-DNA และ PNA-RNA เมื่อ PNA เป็น acpcPNA และ *epi*-acpcPNA โดยใช้การจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุลร่วมกับการคำนวณทางเคมีควอนตัม

วิธีการคำนวณ

การศึกษาด้วยวิธีการจำลองแบบทางพลวัตเชิงโมเลกุลจำเป็นต้องสร้างพารามิเตอร์ที่แสดงถึงอันตรกิริยาระหว่างอะตอมของระบบที่ศึกษา เรียกพารามิเตอร์เหล่านี้ว่า สนามแรง (force field) โดยในงานวิจัยนี้ได้สร้าง force field สำหรับ PNA ทั้ง 3 ชนิด แต่ละชนิดประกอบด้วยเบส อะดีนีน (A), ไซโทซีน (C), กัวนีน (G) และ ไทมีน (T) โครงสร้างที่นำมาเป็นฐานข้อมูลสำหรับ force field ของ PNA ข้างต้นได้จากการคำนวณทางกลศาสตร์ควอนตัมด้วยระเบียบวิธี B3LYP/6-31G(d) และคำนวณประจุของแต่ละอะตอม (atomic point charge) ด้วยวิธี HF/6-31G(d) นำผลที่ได้ไปสร้างเป็น force field เพื่อใช้กับการจำลองแบบทางพลวัตเชิงโมเลกุลของโมเลกุลสายคู่ต่อไป

ในการจำลองแบบทางพลวัตเชิงโมเลกุลจะให้ระบบ (โมเลกุลสายคู่) อยู่ในสภาวะสารละลาย โดยอยู่ในกล่องสี่เหลี่ยมที่มีน้ำล้อมรอบห่างจากโมเลกุลสายคู่เป็นระยะประมาณ 10 Å ในทุกทิศทาง และทำการจำลองแบบเป็นเวลา 10 ns จากนั้นนำโครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบไปคำนวณพลังงาน

ผลการคำนวณ

1. โมเลกุลสายคู่ PNA-PNA

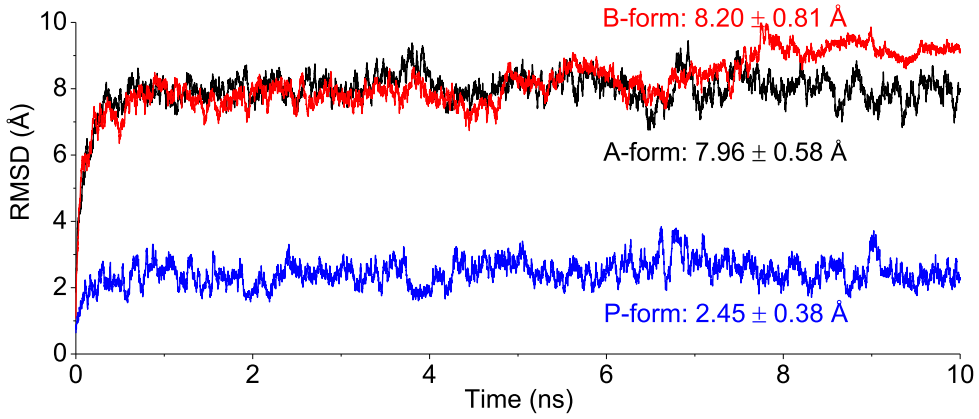
เนื่องจากการลักษณะของโมเลกุล PNA เมื่อมีการเข้าคู่เกิดเป็น PNA-PNA แล้ว สามารถจัดเรียงตัวในทิศทางที่แตกต่างกันได้ 2 แบบ คือ (1) แบบขนาน (parallel) โดยปลายด้าน *N*-terminus ของสายสายที่หนึ่งจับคู่กับด้าน *N*-terminus ของอีกสายหนึ่ง และ (2) แบบขนานสวน (antiparallel) โดยปลายด้าน *N*-terminus ของสายที่หนึ่งจับคู่กับปลายด้าน *C*-terminus ของสายที่สอง โดยลำดับเบสที่เลือกมาศึกษาคือ *N*–GCGAATTCGC–*C*: PNA1 และ *N*–CGCTTAAGCG–*C*: PNA2 ดังนั้น การศึกษาโมเลกุลสายคู่ PNA-PNA ของ acpcPNA และ *epi*-acpcPNA ที่สายของ PNA จับกันในทิศทาง antiparallel ระบบโมเลกุลสายคู่จะเป็น PNA1-PNA1 และ PNA2-PNA2 ในขณะที่การศึกษาโมเลกุลสายคู่ PNA-PNA ที่สาย PNA จับกันในทิศทาง parallel ระบบโมเลกุลสายคู่จะเป็น PNA1-PNA2

จากการทดลองในห้องปฏิบัติการพบว่า acpcPNA ไม่สามารถเข้าคู่กับ PNA อีกสายหนึ่งในทิศทาง antiparallel ได้ (หมายความว่าไม่สามารถเกิดโมเลกุลสายคู่ของ PNA1-PNA1 และ PNA2-PNA2) แต่สามารถเข้าคู่กับ PNA อีกสายหนึ่งในทิศทาง parallel ได้เป็นอย่างดี (สามารถเกิดโมเลกุลสายคู่ PNA1-PNA2 ได้) โดยมีค่า T_m ประมาณ 31 $^{\circ}$C สำหรับ *epi*-acpcPNA พบว่าสามารถเข้าคู่ PNA อีกสายหนึ่งในทิศทาง antiparallel ได้เป็นอย่างดี ทั้งโมเลกุลสายคู่ของ PNA1-PNA1 และ PNA2-PNA2 โดยมีค่า T_m ประมาณ 33 $^{\circ}$C และ 39 $^{\circ}$C ตามลำดับ (Mansawat et al., 2012) ส่วนการจับกันแบบ parallel ของ *epi*-acpcPNA ให้ค่า T_m ประมาณ 35 $^{\circ}$C

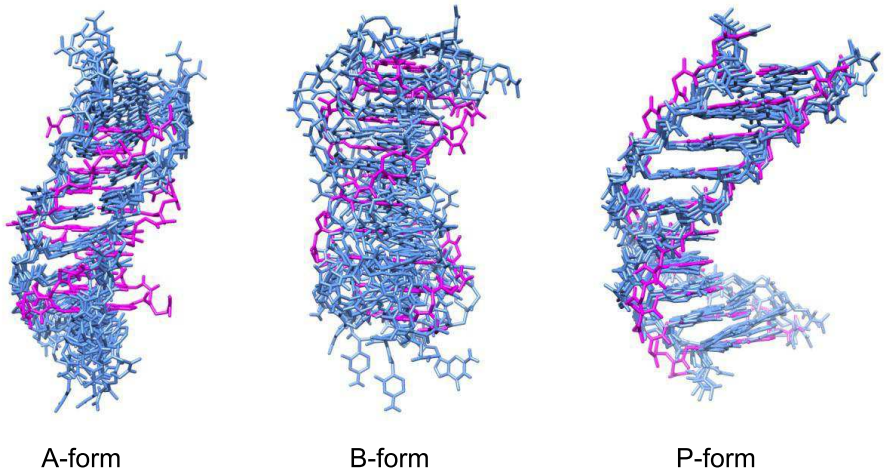
1.1 aegPNA

เมื่อจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุลของ aegPNA-aegPNA ที่เข้าคู่แบบ antiparallel โดยเริ่มต้นจาก A-, B- และ P-form เป็นเวลา 10 ns จากนั้นหาค่า root-mean-square deviation หรือ RMSD

เทียบกับโครงสร้างเริ่มต้น และเลือกบางโครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบมาซ้อนทับกับโครงสร้างเริ่มต้น ผลที่ได้แสดงในรูปที่ 3 และ 4 ซึ่งจะเห็นว่าเมื่อเริ่มต้นการจำลองแบบด้วยโครงสร้างแบบ A-form และ B-form พบว่าได้โครงสร้างที่ไม่เสถียรและเบี่ยงเบนจากโครงสร้างเริ่มต้น (มีค่า RMSD เฉลี่ยประมาณ 8 Å) และมีลักษณะของโมเลกุลสายคู่ที่ไม่ดี แสดงว่าโครงสร้างโมเลกุลสายคู่ของ aegPNA ไม่ใช่แบบ A- และ B-form ในขณะที่โครงสร้างเริ่มต้นแบบ P-form มีค่า RMSD เฉลี่ยประมาณ 2.5 Å และมีลักษณะเป็นสายคู่อย่างดีและคู่เบสสามารถเข้าคู่กันได้เป็นอย่างดีซึ่งสอดคล้องกับโครงสร้าง X-ray ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าระเบียบวิธีที่ใช้ในการศึกษานี้มีความน่าเชื่อถือ



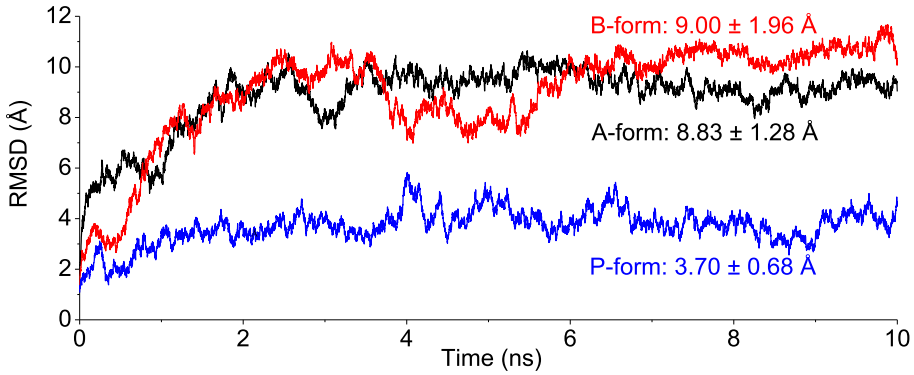
รูปที่ 3 แสดงค่า RMSD ของโมเลกุลสายคู่ PNA1-PNA1 ที่จับกันแบบ antiparallel เมื่อ PNA เป็น aegPNA ซึ่งมีรูปแบบเริ่มต้นเป็น A-, B- และ P-form



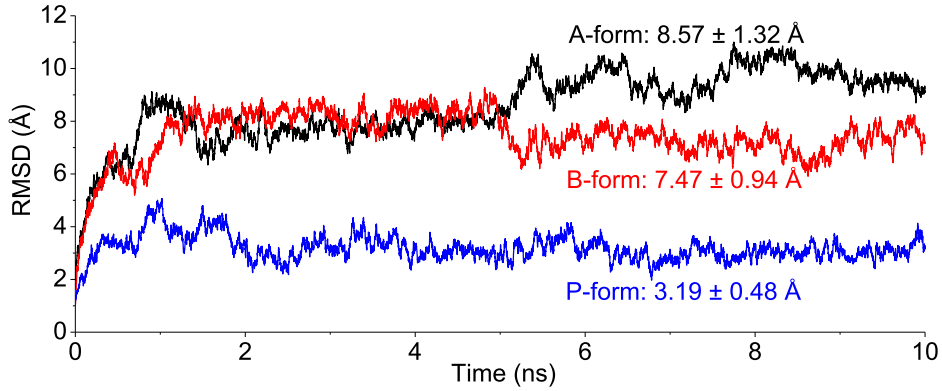
รูปที่ 4 แสดงการซ้อนทับกันของโครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบทุก 2 ns (น้ำเงิน) เทียบกับโครงสร้างเริ่มต้น (แดง) ของ PNA1-PNA2 ที่จับกันแบบ antiparallel เมื่อ PNA เป็น aegPNA

1.2 Antiparallel PNA-PNA: acpcPNA

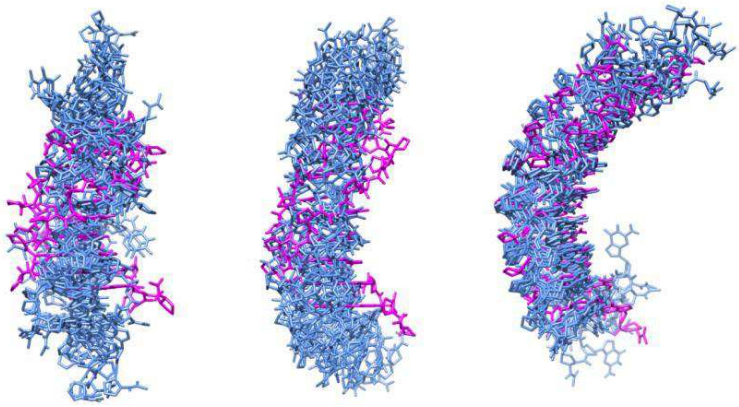
ผลการจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุลของ acpcPNA-acpcPNA แบบ antiparallel พบว่าโครงสร้างของ acpcPNA ที่มีลำดับเบสทั้ง PNA1-PNA1 และ PNA2-PNA2 มีความผันผวนและแตกต่างจากโครงสร้างเริ่มต้นค่อนข้างมากทั้งแบบ A-form และ B-form ในขณะที่โครงสร้างแบบ P-form มีการเปลี่ยนแปลงไปจากโครงสร้างเริ่มต้นน้อยกว่า (ดูรูปที่ 5 และ 6) แต่เมื่อพิจารณาโครงสร้าง (รูปที่ 7 และ 8) พบว่า โครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบของโมเลกุลสายคู่แบบ P-form มีความผันผวนของโครงสร้างในส่วนปลายของสายคู่และคู่เบสในส่วนนี้ยังเบี่ยงเบนออกนอกโมเลกุลอีกด้วย เมื่อวิเคราะห์การเกิดพันธะไฮโดรเจนตามการจับคู่เบสแบบ Watson-Crick ของโครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบจำนวน 10,000 โครงสร้าง พบว่าการเกิดพันธะไฮโดรเจนของบางคู่เบสมีค่าน้อยมากดังแสดงในตารางที่ 1 แสดงว่า acpcPNA ไม่สามารถเกิดเป็นโมเลกุลสายคู่แบบ antiparallel PNA-PNA ได้



รูปที่ 5 แสดงค่า RMSD ของโมเลกุลสายคู่ antiparallel acpcPNA ของระบบ PNA1-PNA1

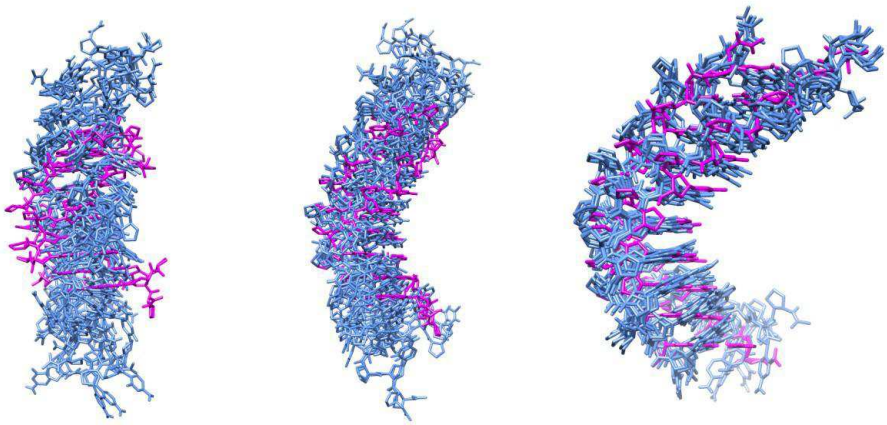


รูปที่ 6 แสดงค่า RMSD ของโมเลกุลสายคู่ antiparallel acpcPNA ของระบบ PNA2-PNA2



A-form B-form P-form

รูปที่ 7 แสดงการซ้อนทับกันของโครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบทุก 2 ns (น้ำเงิน) เทียบกับโครงสร้างเริ่มต้น (แดง) ของโมเลกุลสายคู่ antiparallel acpcPNA ของระบบ PNA1-PNA1

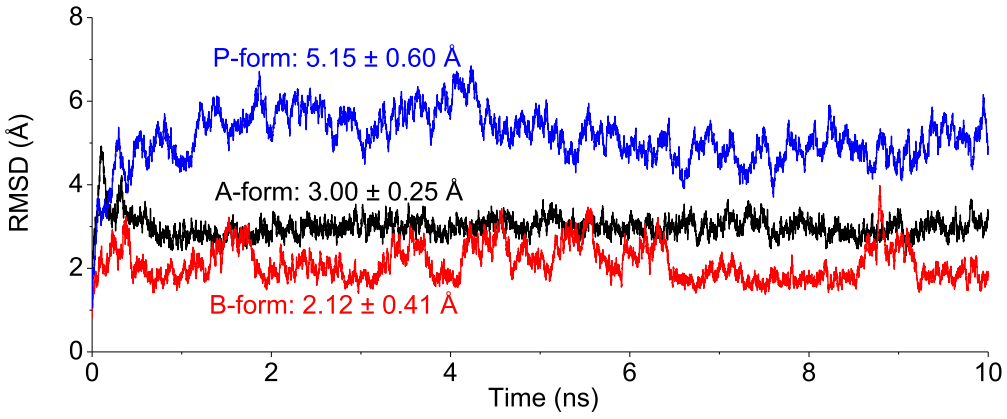


A-form B-form P-form

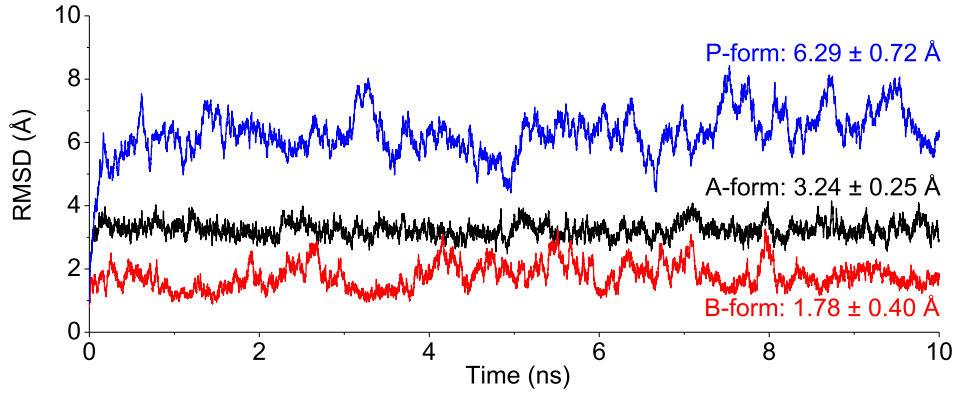
รูปที่ 8 แสดงการซ้อนทับกันของโครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบทุก 2 ns (น้ำเงิน) เทียบกับโครงสร้างเริ่มต้น (แดง) ของโมเลกุลสายคู่ antiparallel acpcPNA ของระบบ PNA2-PNA2

1.3 Antiparallel PNA-PNA: *epi*-acpcPNA

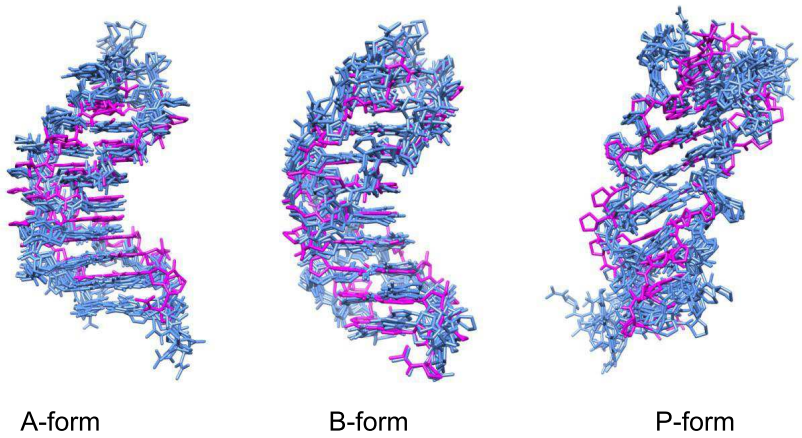
สำหรับการจำลองแบบทางพลวัตเชิงโมเลกุลของ antiparallel PNA-PNA ที่ชนิดของ PNA เป็น *epi*-acpcPNA ค่า RMSD ของ PNA1-PNA1 และ PNA2-PNA2 แสดงดังรูปที่ 9 และ 10 ตามลำดับ และโครงสร้างแสดงดังรูปที่ 11 และ 12 ตามลำดับ โมเลกุลสายคู่ที่โครงสร้างเริ่มต้นเป็นแบบ A-form และ B-form เปลี่ยนแปลงไปจากโครงสร้างเริ่มต้นน้อยที่สุด (มีค่า RMSD ต่ำ) เมื่อนำโมเลกุลสายคู่ทั้งสองมาหาค่าเฉลี่ยของ base-pair parameter และ base-step parameter (ตารางที่ 2) พบว่าการเข้าคู่ของ PNA ชนิดนี้มีลักษณะการวางตัวของคู่เบสคล้ายแบบ B-form มากที่สุด ดังนั้นโครงสร้างจากการจำลองแบบที่เริ่มต้นจาก B-form จึงถูกนำมาศึกษาการเกิดพันธะไฮโดรเจนที่จำเพาะระหว่างคู่เบส Watson-Crick ซึ่งพบการเกิดพันธะไฮโดรเจนมากกว่า 90%



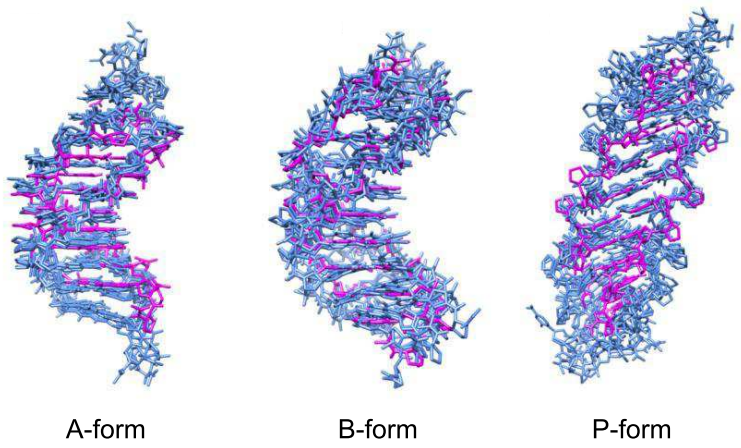
รูปที่ 9 แสดงค่า RMSD ของโมเลกุลสายคู่ antiparallel *epi*-acpcPNA ของระบบ PNA1-PNA1



รูปที่ 10 แสดงค่า RMSD ของโมเลกุลสายคู่ antiparallel *epi*-acpcPNA ของระบบ PNA2-PNA2



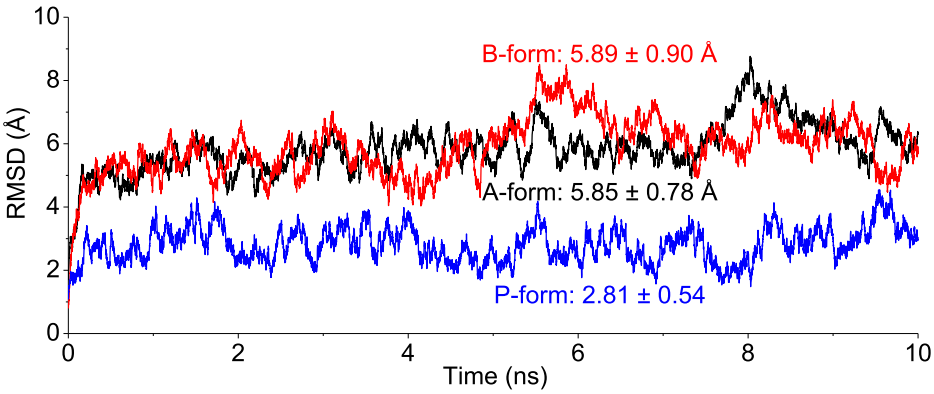
รูปที่ 11 แสดงการซ้อนทับกันของโครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบทุก 2 ns (น้ำเงิน) เทียบกับโครงสร้างเริ่มต้น (แดง) ของ antiparallel *epi*-acpcPNA ของระบบ PNA1-PNA1



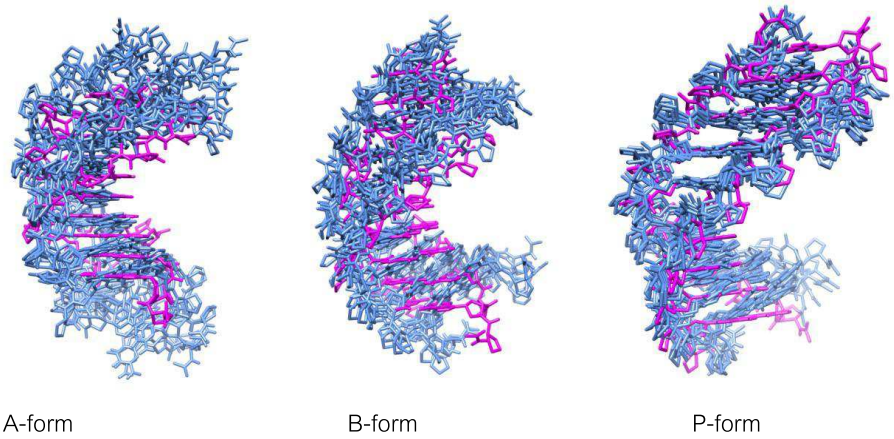
รูปที่ 12 แสดงการซ้อนทับกันของโครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบทุก 2 ns (น้ำเงิน) เทียบกับโครงสร้างเริ่มต้น (แดง) ของ antiparallel *epi*-acpcPNA ของระบบ PNA2-PNA2

1.4 Parallel PNA-PNA: acpcPNA

จากผลการจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุลของ PNA1-PNA2 ซึ่งเป็นการจับกันของ PNA ในทิศทาง parallel เมื่อ PNA คือ acpcPNA พบว่าระบบที่ค่า RMSD ต่ำที่สุดคือ P-form (รูปที่ 13) ค่า RMSD ประมาณ 2.8 Å จากการพิจารณาโครงสร้าง (รูปที่ 14) และจากการศึกษาค่าเฉลี่ยของ base-pair parameter และ base-step parameter (ตารางที่ 2) พบว่ามีค่าใกล้เคียงกับ P-form ดังนั้นโครงสร้างที่เป็นไปได้ของโมเลกุลสายคู่ของ PNA ชนิดนี้น่าจะเป็นแบบ P-form นอกจากนั้นยังพบการเกิดพันธะไฮโดรเจนตามการจับคู่เบสแบบ Watson-Crick มากกว่า 95% ของทั้ง 10,000 โครงสร้าง (ตารางที่ 1)



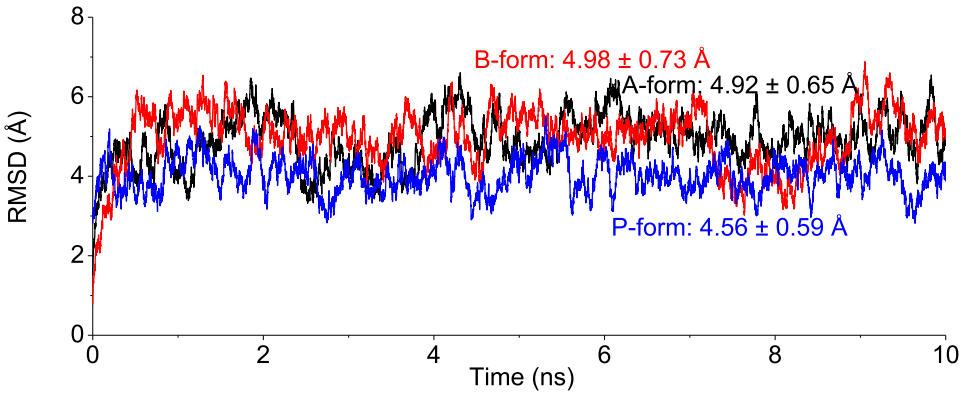
รูปที่ 13 แสดงค่า RMSD ของโมเลกุลสายคู่ parallel acpcPNA ของระบบ PNA1-PNA2



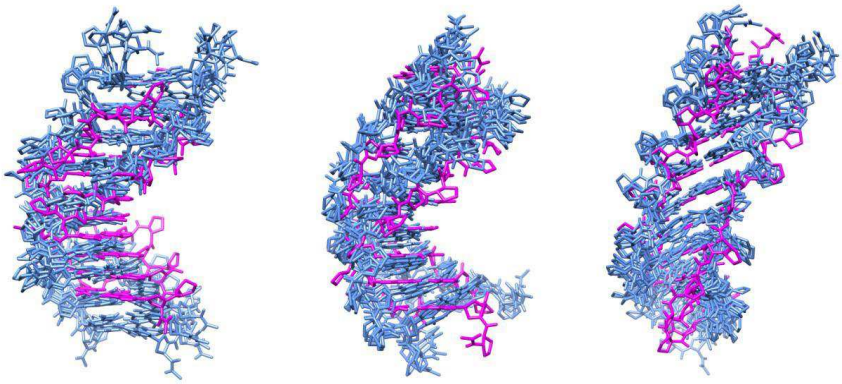
รูปที่ 14 แสดงการซ้อนทับกันของโครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบทุก 2 ns (น้ำเงิน) เทียบกับโครงสร้างเริ่มต้น (แดง) ของโมเลกุลสายคู่ parallel acpcPNA ของระบบ PNA1-PNA2

1.4 Parallel PNA-PNA: *epi*-acpcPNA

ในกรณีของ parallel PNA-PNA ของ *epi*-acpcPNA จากผลของ RMSD พบว่า โครงสร้างที่ได้จากการจำลองทั้ง 3 รูปแบบ มีความแตกต่างจากโครงสร้างเริ่มต้นใกล้เคียงกัน (รูปที่ 15) จากการพิจารณาโครงสร้างที่ได้จากการจำลองทั้ง 3 รูปแบบ พบว่าคู่เบสสามารถเข้าคู่กันได้อย่างดี (รูปที่ 16) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ของโครงสร้างพีเอ็นเอทั้ง 3 รูปแบบ แต่เมื่อวิเคราะห์ base-pair parameter และ base-step parameter (ตารางที่ 2) พบว่า โครงสร้างเริ่มต้นแบบ A-form และ B-form ให้ลักษณะการวางตัวของคู่เบสที่ใกล้เคียงกันคือคล้าย B-form แต่มีค่า twist ค่อนข้างต่ำ ขณะที่การจำลองแบบด้วยโครงสร้างเริ่มต้นแบบ P-form ให้ผลต่างออกไป ไม่แสดงลักษณะของการเกิดเป็นเกลียวคู่ สังเกตได้จาก twist มีค่าเป็นบวก-ลบสลับกันไป (ตารางที่ 3) ดังนั้นสรุปได้ว่า *epi*-acpcPNA สามารถเกิดเป็นโมเลกุลที่มีการจัดเรียงตัวแบบ parallel ได้ แต่โครงสร้างที่ได้มีความเสถียรเชิงโครงสร้างค่อนข้างต่ำ



รูปที่ 15 แสดงค่า RMSD ของโมเลกุลสายคู่ parallel *epi*-acpcPNA ของระบบ PNA1-PNA2



A-form B-form P-form

รูปที่ 16 แสดงการซ้อนทับกันของโครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบทุก 2 ns (น้ำเงิน) เทียบกับโครงสร้างเริ่มต้น (แดง) ของ parallel *epi*-acpcPNA ของระบบ PNA1-PNA2

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยของการเกิดพันธะไฮโดรเจนตามการจับคู่เบสแบบ Watson-Crick ของระบบต่างๆ ที่ได้จากการจำลองแบบทางพลวัตเชิงโมเลกุลจำนวน 10,000 โครงสร้าง

Base-pair	Concerned atoms	% Occupied					
		Antiparallel				Parallel	
		acpcPNA		*epi*-acpcPNA		acpcPNA	*epi*-acpcPNA
		P-form (PNA1-PNA1)	P-form (PNA2-PNA2)	B-form (PNA1-PNA1)	B-form (PNA2-PNA2)	P-form (PNA1-PNA2)	B-form (PNA1-PNA2)
1	O(G)···H-N(C)	97.1	99.4	97.2	98.7	99.2	99.0
	N-H(G)···N(C)	99.7	100	99.9	100.0	99.9	100.0
	N-H(G)···O(C)	99.6	-	99.9	100.0	99.6	99.9
2	N-H(C)···O(G)	89.8	99.5	99.7	99.7	99.9	99.7
	N(C)···H-N(G)	93.5	100	100.0	100.0	100.0	100.0
	O(C)···H-N(G)	98.5	100	99.5	100.0	100.0	100.0
3	O(G)···H-N(C)	46.4	99.9	99.1	96.9	99.6	99.6
	N-H(G)···N(C)	54.3	100	100.0	99.9	99.8	100.0
	N-H(G)···O(C)	95.4	100	100.0	100.0	99.9	100.0
4	N-H(A)···O(T)	97.2	96.7	97.7	99.2	99.0	99.4
	N(A)···H-N(T)	99.3	100	93.8	99.7	100.0	99.9
5	N-H(A)···O(T)	98.8	99.4	99.9	98.2	99.2	98.4
	N(A)···H-N(T)	99.9	99.5	100.0	100.0	100.0	100.0
6	O(T)···H-N(A)	99.5	97.8	100.0	96.5	99.7	97.4
	N-H(T)···N(A)	100.0	99.9	99.8	99.9	99.7	100.0
7	O(T)···H-N(A)	99.9	97.6	99.3	96.4	99.8	97.5
	N-H(T)···N(A)	98.3	100	99.1	100.0	99.9	99.9
8	N-H(C)···O(G)	99.7	99.9	99.0	99.8	99.9	99.1
	N(C)···H-N(G)	100.0	100	100.0	100.0	100.0	100.0
	O(C)···H-N(G)	100.0	100	100.0	100.0	100.0	100.0
9	O(G)···H-N(C)	12.2	99.9	99.7	99.7	99.9	99.9
	N-H(G)···N(C)	28.0	100	100.0	100.0	100.0	100.0
	N-H(G)···O(C)	19.4	99.9	99.8	100.0	100.0	99.9
10	N-H(C)···O(G)	8.5	1.9	98.7	99.6	99.8	95.3
	N(C)···H-N(G)	8.0	2.5	99.7	100.0	100.0	97.9
	O(C)···H-N(G)	8.0	-	99.8	99.9	99.9	98.8

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยของ base-pair parameter และ base-step parameter ของระบบต่างๆ ที่ได้จากการจำลองแบบทางพลวัตเชิงโมเลกุลจำนวน 10,000 โครงสร้าง (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานแสดงในวงเล็บ)

Parameters	Antiparallel *epi*-acpcPNA				Parallel acpcPNA P-form	Parallel *epi*-acpcPNA			aegPNA	aegPNA (X-ray)
	PNA1-PNA1		PNA2-PNA2			PNA1-PNA2				
	A-form	B-form	A-form	B-form		A-form	B-form	P-form		
Shear (Å)	0(0.3)	0.0(0.3)	0.0(0.3)	0.0(0.3)	0.0(0.3)	0.0(0.4)	0.1(0.3)	0.0(0.3)	0.0(0.3)	0.0
Stretch (Å)	-0.1(0.1)	0.0(0.1)	0.0(0.1)	0.0(0.1)	-0.1(0.1)	0.0(0.1)	0.0(0.1)	0.0(0.1)	-0.1(0.1)	-0.1
Stagger (Å)	0.1(0.4)	-0.2(0.4)	0.2(0.4)	-0.1(0.4)	-0.1(0.4)	-0.1(0.4)	0.0(0.4)	-0.1(0.4)	-0.1(0.4)	0.1
Buckle (°)	-1.4(9.1)	-7.1(9.2)	0.0(9.0)	-0.3(9.6)	3.4(9.5)	8.0(10.6)	1.3(9.4)	5.6(11.1)	-0.3(9.4)	0.0
Prop-Tw (°)	-2.6(8.5)	-10.8(7.1)	-0.9(8.0)	-10.5(7.4)	-5.7(8.0)	-2.6(10.6)	-9.3(7.6)	-4.8(9.9)	-10.4(7.6)	-7.2
Opening (°)	-1.3(3.6)	1.9(4.6)	-2.3(3.7)	-0.7(4.4)	-0.2(3.8)	-0.4(4.1)	0.8(4.2)	1.3(5.0)	0.2(4.1)	-1.8
Shift (Å)	0(0.4)	0.1(0.4)	0.0(0.4)	0.0(0.5)	0.2(0.5)	-0.4(0.5)	-0.5(0.4)	0.3(0.7)	0.0(0.4)	0.0
Slide (Å)	0.3(0.5)	-0.1(0.6)	0.3(0.5)	0.0(0.9)	-2.2(0.5)	-1.1(0.7)	-1.7(0.5)	-3.4(0.6)	-2.2(0.4)	-2.5
Rise (Å)	3.4(0.3)	3.3(0.3)	3.4(0.3)	3.2(0.3)	3.4(0.4)	3.5(0.4)	3.4(0.3)	3.4(0.4)	3.4(0.4)	3.3
Tilt (°)	-0.4(4.3)	0.6(4.4)	0.0(4.1)	0.3(4.5)	-2.3(5.2)	-3.1(5.4)	-2.4(4.9)	-2.9(5.8)	0.2(4.6)	-0.3
Roll (°)	0.7(5.7)	5.2(5.0)	-1.1(5.2)	2.9(5.3)	7.3(5.5)	0.9(6.5)	8.0(5.3)	9.3(6.7)	6.1(5.0)	3.0
Twist (°)	33.8(3.3)	33.3(3.8)	33.9(3.3)	34.7(4.1)	21.4(4.1)	25.9(5.8)	25.6(4.6)	7.2(6.7)	21.4(4.1)	19.7

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยของ base-pair parameter และ step parameter ของ P2 ที่มีการเรียงตัวแบบ parallel (PNA1-PNA2) ของโมเลกุลสายคู่แบบ P-form ที่ได้จากการจำลองแบบทางพลวัตเชิงโมเลกุลจำนวน 10,000 โครงสร้าง

Base-pair	Shear(Å)	Stretch(Å)	Stagger(Å)	Buckle(°)	Prop-Tw(°)	Opening(°)	Shift Å)	Slide Å)	Rise Å)	Tilt(°)	Roll(°)	Twist(°)
2	0.41	-0.11	-0.12	-5.07	-7.56	1.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	-0.40	-0.14	0.09	8.65	-8.06	-1.41	0.75	-4.15	3.24	-2.47	12.53	-14.55
4	0.20	0.05	-0.04	-7.60	-3.34	4.70	-0.50	-2.54	3.54	-2.90	9.42	36.49
5	0.08	0.01	-0.02	9.16	-8.03	-0.50	0.80	-4.20	3.25	-0.97	10.39	-12.56
6	-0.09	0.01	-0.64	5.77	-12.30	7.87	-0.49	-2.51	3.50	2.40	4.89	29.19
7	-0.08	0.01	-0.29	9.77	-8.19	-0.43	1.24	-3.84	3.67	-0.93	10.65	-4.28
8	0.41	-0.11	-0.16	-2.78	-5.47	0.70	-0.74	-2.11	3.60	-2.96	14.19	34.71
9	-0.49	-0.06	0.19	27.13	14.32	-1.56	1.07	-4.26	2.85	-12.24	2.72	-18.94

จากผลการศึกษาคุณสมบัติทางโครงสร้างโดยวิธีการจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุล ทำให้ทราบลักษณะโครงสร้างที่เป็นไปได้ในการเกิดเป็นโมเลกุลสายคู่ PNA-PNA ของ PNA แต่ละชนิด โดย acpcPNA สามารถเกิดเป็นโมเลกุลสายคู่ PNA-PNA ในทิศทางแบบ parallel ในขณะที่ *epi*-acpcPNA เกิดเป็นโมเลกุลสายคู่ PNA-PNA ได้ในทิศทางทั้งแบบ antiparallel และแบบ parallel โดยที่แบบ parallel ให้โครงสร้างที่ไม่ค่อยเสถียรมากนัก ผลการศึกษาสรุปได้ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 สรุปโครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบของ PNA ชนิดต่างๆ
เมื่อ ✓ หมายถึง สามารถเกิดเป็นโมเลกุลสายคู่ได้
✘ หมายถึง ไม่สามารถเกิดเป็นโมเลกุลสายคู่ได้

PNA	Strand 1	Strand 2	Direction	Duplex	Form
acpcPNA	PNA1	PNA1	antiparallel	✘	-
	PNA2	PNA2	antiparallel	✘	-
	PNA1	PNA2	parallel	✓	P-form
epi-acpcPNA	PNA1	PNA1	antiparallel	✓	B-form
	PNA2	PNA2	antiparallel	✓	B-form
	PNA1	PNA2	parallel	✓ (ความเสถียรต่ำ)	P-form

ตารางที่ 5 พลังงานการยึดจับ ($\Delta E_{binding}$) ของโครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุล จากการคำนวณด้วยวิธี B3LYP/6-31G** เปรียบเทียบกับค่า T_m (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานแสดงในวงเล็บ)

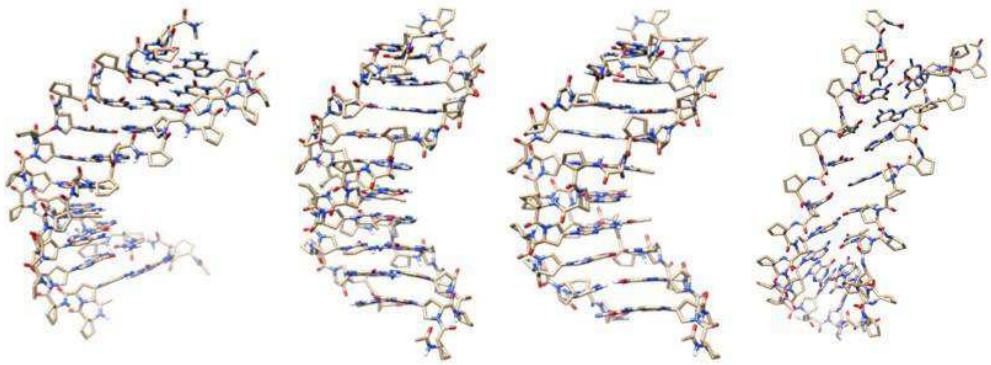
PNA	Strand 1	Strand 2	Direction	$\Delta E_{binding}$ (kcal/mol)	T_m (°C)
acpcPNA	PNA1	PNA1	antiparallel	-173.2(12.2)	<20[a]
	PNA2	PNA2	antiparallel	-173.7(9.4)	<20[a]
	PNA1	PNA2	parallel	-199.4(8.5)	30.8
epi-acpcPNA	PNA1	PNA1	antiparallel	-194.4(8.4)	31.9[a]
	PNA2	PNA2	antiparallel	-191.4(7.9)	38.7[a]
	PNA1	PNA2	parallel	-180.4(8.5)	35.4

[a] Mansawat et al, 2012.

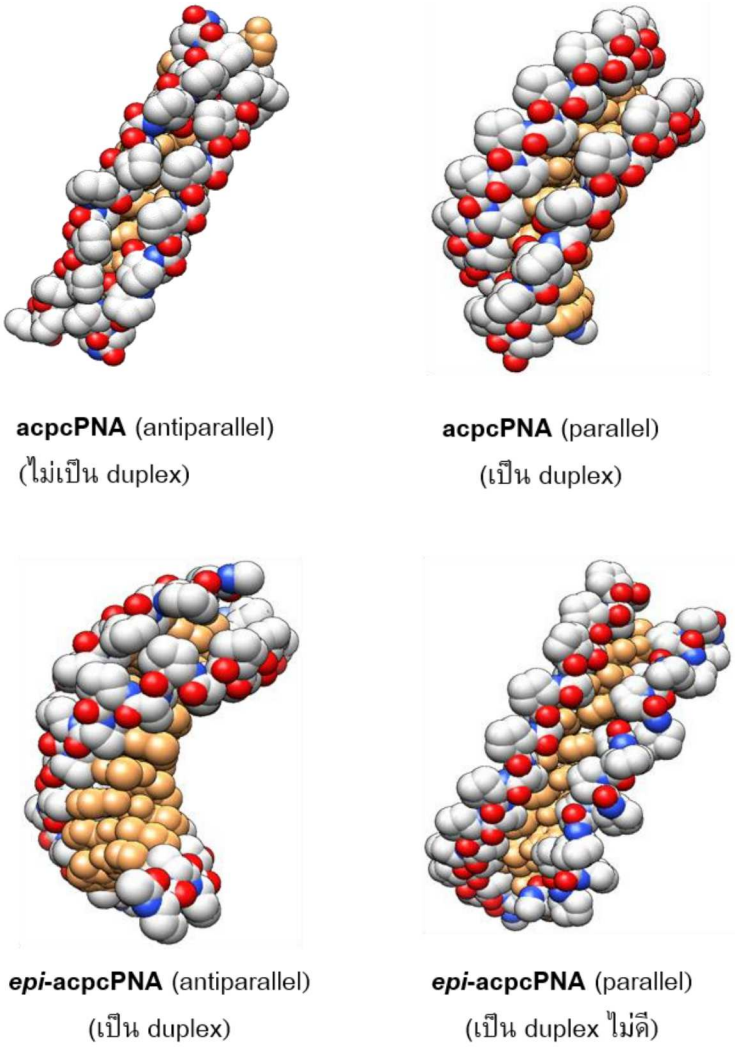
เมื่อนำโครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุล โดยเลือกระบบที่สามารถเกิดเป็นโมเลกุลสายคู่ได้มาคำนวณพลังงานการยึดจับ ($\Delta E_{binding}$) ด้วยวิธีกลศาสตร์ควอนตัมด้วยระเบียบวิธี B3LYP/6-31G** โดยใช้โปรแกรม GAUSSIAN09 โดย $\Delta E_{binding} = E_{duplex} - (E_{strand1} + E_{strand2})$ ทั้งนี้ระบบที่ศึกษาอยู่ในวัฏภาคแก๊ส เมื่อ E_{duplex} คือพลังงานของโมเลกุลสายคู่ $E_{strand1}$ และ $E_{strand2}$ คือพลังงานของสายเดี่ยวที่ 1 และ 2 ตามลำดับ ผลการคำนวณแสดงดังตารางที่ 5

จากผลการคำนวณจะเห็นว่า สำหรับโมเลกุลสายคู่ PNA-PNA ที่มีแกนหลักเป็นชนิด acpcPNA ที่มีลำดับเบสทั้งแบบ PNA1-PNA1 และ PNA2-PNA2 และเข้าคู่แบบ antiparallel ให้ค่าพลังงานที่มีความเป็นลบน้อยกว่าระบบอื่นๆ แสดงว่าโมเลกุลสายคู่ของ antiparallel acpcPNA มีความเสถียรต่ำ และเมื่อพิจารณาโครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบจะเห็นว่าไม่สามารถเกิดเป็นโมเลกุลสายคู่ได้ ซึ่งสอดคล้องกับค่า T_m (< 20°C) ที่ได้จากการทดลองในห้องปฏิบัติการ ในขณะที่การเข้าคู่แบบ parallel จะให้ค่าพลังงานการยึดจับประมาณ –199 kcal/mol ซึ่งค่อนข้างสูงและโครงสร้างโมเลกุลสายคู่มีความเสถียรเมื่อเทียบกับแบบ antiparallel ส่วนการเกิดโมเลกุลสายคู่ของ *epi*-acpcPNA นั้นพบว่าสามารถเกิดได้ทั้งในทิศทางแบบ parallel และ antiparallel อย่างไรก็ตามค่าพลังงานยึดจับที่คำนวณได้แสดงให้เห็นว่าทิศทางแบบ parallel มีความเสถียรน้อยกว่าทิศทางแบบ antiparallel อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังพบว่าการเข้าคู่กันของ parallel *epi*-acpcPNA ให้โครงสร้างโมเลกุลที่ไม่ค่อยดีนักซึ่งสอดคล้องกับค่าพลังงานยึดจับที่ไม่สูงมากนัก โดยโครงสร้างเฉลี่ยของโมเลกุลสายคู่ที่ได้จากการจำลองแบบแสดงในรูปที่ 17 ซึ่งเห็นได้อย่างชัดเจนว่าสมบัติทางสเตอริโอเคมีและทิศทางการเกิดโมเลกุลสายคู่ส่งผลต่อลักษณะโครงสร้างของโมเลกุลสายคู่ PNA-PNA โดยพบว่าทิศทางการเกิดโมเลกุลสายคู่แบบ antiparallel ให้ลักษณะร่องของแกนหลักที่ลึกและแกนหลักทั้งสองสายหันเข้าด้านในโมเลกุลสายคู่ ในขณะที่ทิศทางการเกิดโมเลกุลสายคู่แบบ parallel ให้ลักษณะร่องของแกนหลักที่แบนออกนอกโมเลกุลสายคู่ ดังแสดงในรูปที่ 18 อย่างไรก็ตามผู้วิจัยเชื่อว่าในระบบที่ประกอบไปด้วยสายของ *epi*-acpcPNA1 และ *epi*-acpcPNA2 นั้นน่าจะเกิดเป็น PNA1-PNA1 และ PNA2-PNA2 ในทิศทางแบบ antiparallel มากกว่าที่จะเกิดเป็น PNA1-PNA2 (parallel) ซึ่งถ้าเป็นเช่นนี้ค่า T_m ที่วัดได้ในตารางที่ 5 (35.4°C) จะเป็นค่าเฉลี่ยของ PNA1-PNA1 และ PNA2-PNA2

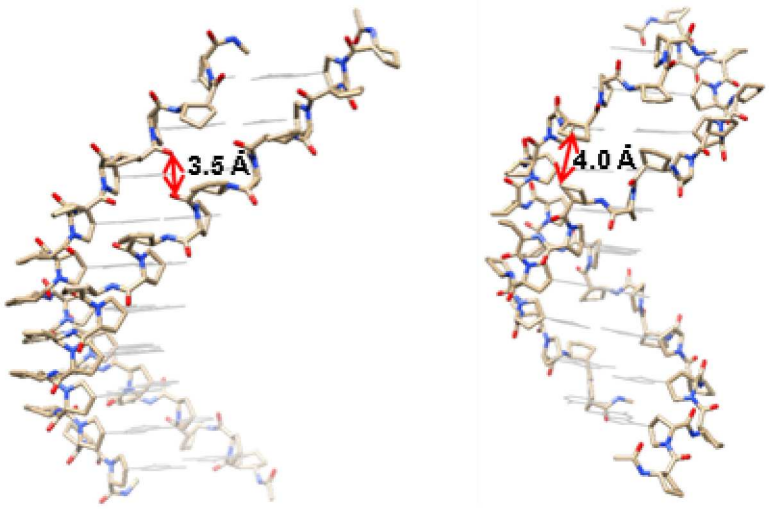
สาเหตุที่ acpcPNA ไม่สามารถเข้าคู่กันเกิดเป็น PNA-PNA ในทิศทาง antiparallel ได้ ในขณะที่ *epi*-acpcPNA เกิดได้อาจเนื่องมาจากหากพิจารณาโครงสร้างเริ่มต้น (รูปที่ 19) โดยให้เบสเข้าคู่กันได้ดีที่สุดจะทำให้แกนหลักลู่เข้าหากันและอยู่ใกล้กันมาก (ห่างกันประมาณ 3.5 Å) ทั้งนี้เป็นผลมาจากลักษณะทางสเตอริโอเคมีของเบสที่ต่อกับแกนหลัก ดังนั้นเมื่อทำการจำลองแบบจึงทำให้แกนหลักผลักกันมากส่งผลให้เบสเข้าคู่กันได้ไม่ดีและการวางตัวของแกนหลักไม่เหมาะสม จึงไม่มีความเป็นโมเลกุลสายคู่ทำให้ได้พลังงานยึดจับที่เป็นลบน้อย แต่ลักษณะดังกล่าวนี้ไม่เกิดกับ PNA ชนิด *epi*-acpcPNA ซึ่งมีสเตอริโอเคมีที่ต่างกันทำให้ *epi*-acpcPNA เกิดเป็นโมเลกุลสายคู่ในทิศทางแบบ antiparallel ได้



รูปที่ 17 โครงสร้างเฉลี่ยที่ได้จากการจำลองแบบของ PNA ที่สามารถเกิดเป็นโมเลกุลสายคู่ได้



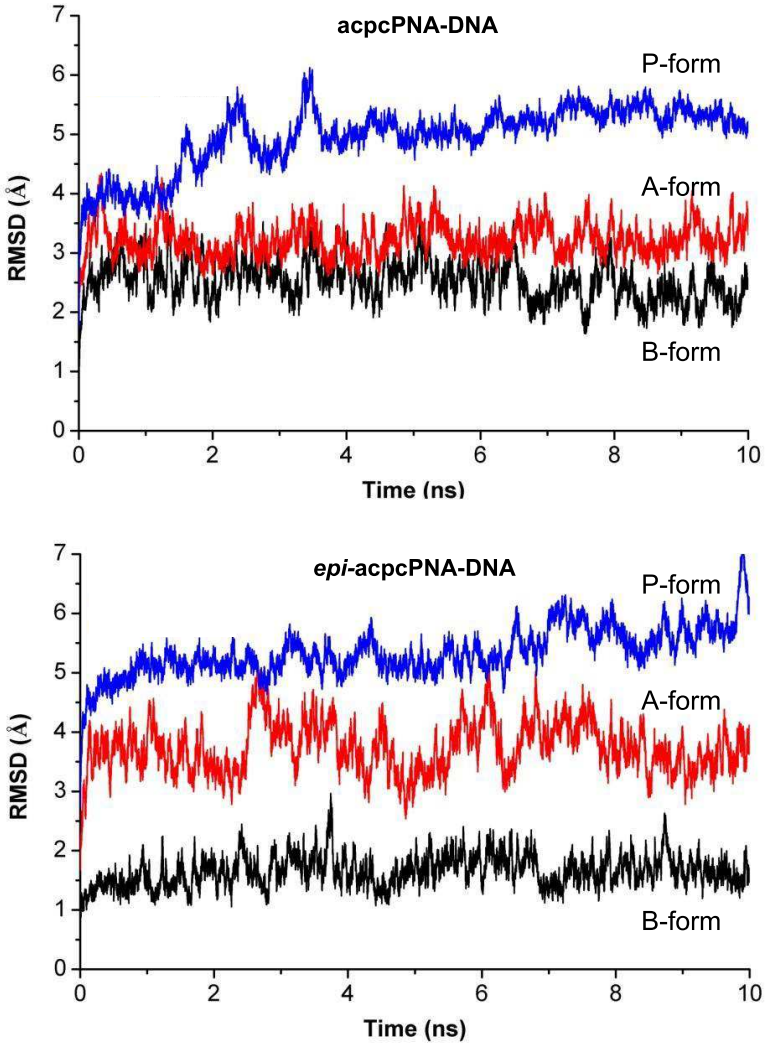
รูปที่ 18 ลักษณะร่องของแกนหลักของโครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุล



รูปที่ 19 ลักษณะร่องของแกนหลักของโครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุล

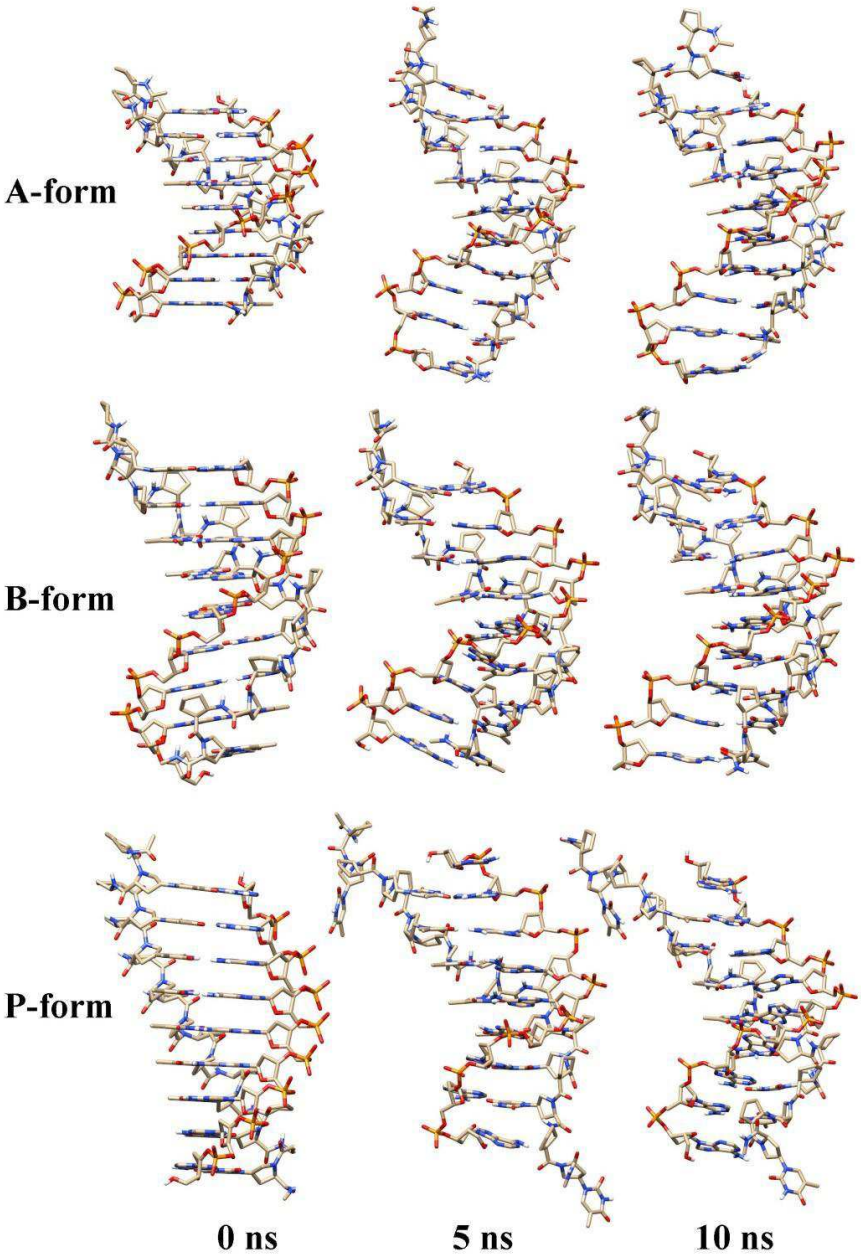
2. โมเลกุลสายคู่ PNA-DNA และ PNA-RNA

เพื่อศึกษาโครงสร้างที่เป็นไปได้ของโมเลกุลสายคู่ PNA-DNA ได้ทำการจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุลของ PNA-DNA เมื่อ PNA เป็น acpcPNA และ *epi*-acpcPNA โดยระบบเบสที่ทำการศึกษาเป็น *N*-TTTTTTTTT-*C* สำหรับ PNA จับกับ DNA ที่เป็นเบสคู่สม เป็นเวลา 10 ns โครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบทั้งหมดเทียบกับโครงสร้างเริ่มต้นโดยพิจารณาจากค่า RMSD ซึ่งเป็นค่าที่บอกความแตกต่างของโครงสร้างใดๆ กับโครงสร้างอ้างอิง จากรูปที่ 20 จะพบว่าโครงสร้างเริ่มต้นแบบ P-form ของทั้ง acpcPNA-DNA และ *epi*-acpcPNA -DNA ให้โครงสร้างจากการจำลองแบบแตกต่างจากโครงสร้างเริ่มต้นค่อนข้างมาก (มีค่า RMSD ประมาณ 5 Å) แสดงให้เห็นว่าโมเลกุลสายคู่ทั้งสองไม่ใช่แบบ P-form ในทำนองเดียวกันการใช้โครงสร้างเริ่มต้นแบบ A-form ให้โครงสร้างจากการจำลองแบบเบี่ยงเบนจากเดิมไปพอสมควรโดยมีค่า RMSD ประมาณ 3 – 4 Å ในขณะที่โครงสร้างเริ่มต้นแบบ B-form ให้โครงสร้างที่ไม่ต่างจากเดิมมากนัก (ค่า RMSD ประมาณ 2.5 Å และ 1.5 Å สำหรับ acpcPNA-DNA และ *epi*-acpcPNA-DNA ตามลำดับ) จึงสามารถกล่าวได้ว่า acpcPNA และ *epi*-acpcPNA สามารถเข้าคู่กับ DNA จะทำให้เกิดโมเลกุลสายคู่ PNA-DNA ที่มีโครงสร้างเป็นแบบ B-form

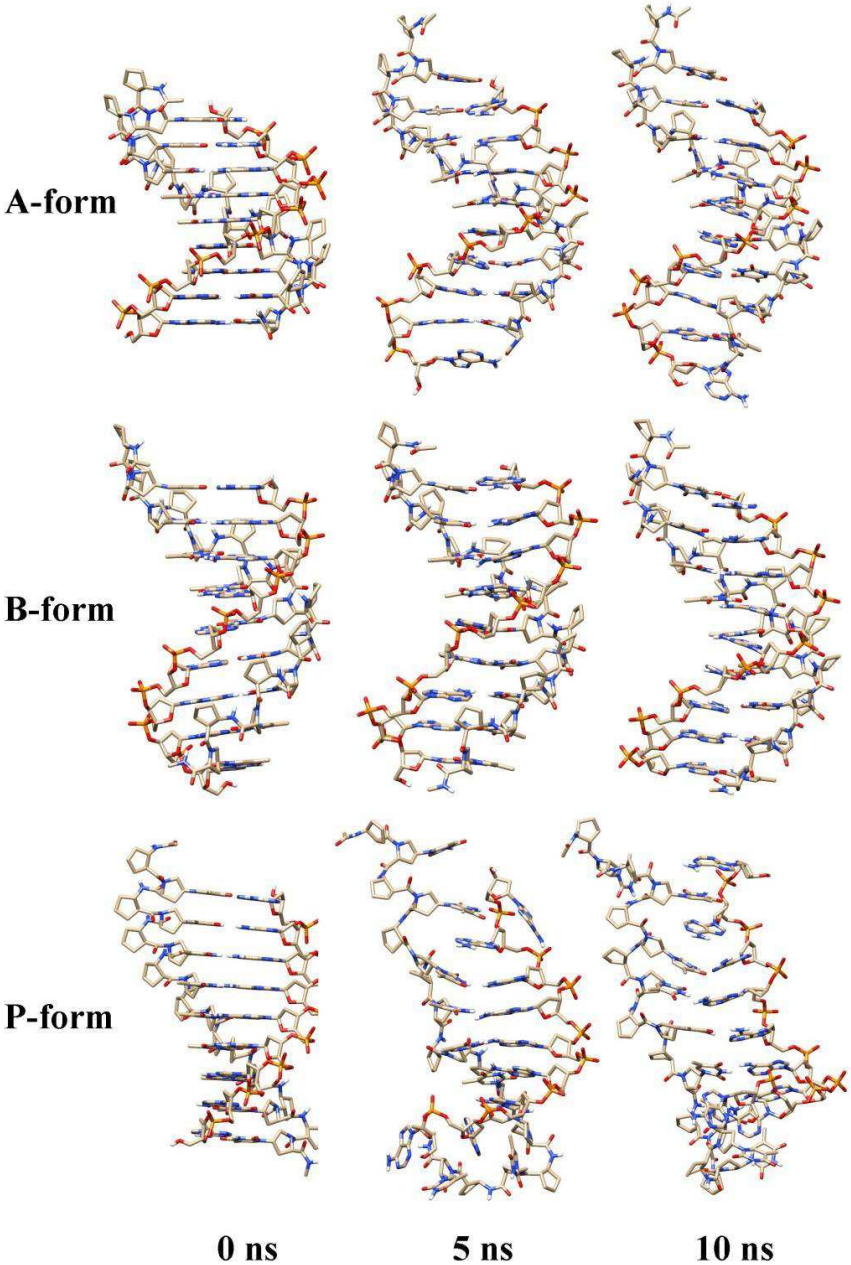


รูปที่ 20 แสดงค่า RMSD ของโครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบทางพลวัตเชิงโมเลกุลตลอดช่วง 10 ns ของ acpcPNA-DNA และ *epi*-acpcPNA -DNA ที่ใช้โครงสร้างเริ่มต้นแบบต่างๆ

เมื่อพิจารณาโครงสร้างของโมเลกุลสายคู่ที่เปลี่ยนตามเวลาของการจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุล พบว่าทั้ง acpcPNA-DNA (รูปที่ 21) และ *epi*-acpcPNA-DNA (รูปที่ 22) เมื่อเวลาผ่านไปโครงสร้างแบบ A-form และแบบ P-form จะเบี่ยงเบนไปจากเดิม โดยแบบ A-form จะให้โครงสร้างที่เบี่ยงเบนเข้าหาโครงสร้างแบบ B-form ในขณะที่แบบ P-form จะพบว่าการเข้าคู่ของเบสคู่สมไม่ดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระบบ *epi*-acpcPNA-DNA ซึ่งสอดคล้องกับค่า RMSD ที่เพิ่มสูงขึ้น



รูปที่ 21 แสดงโครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบทางพลวัตเชิงโมเลกุลในช่วงเวลา 0, 5 และ 10 ns ของ acpcPNA-DNA ที่ใช้โครงสร้างเริ่มต้นแบบต่างๆ



รูปที่ 22 แสดงโครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบทางพลวัตเชิงโมเลกุลในช่วงเวลา 0, 5 และ 10 ns ของ *epi*-acpcPNA-DNA ที่ใช้โครงสร้างเริ่มต้นแบบต่างๆ

เมื่อนำโครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบมาวิเคราะห์ base-step parameter (rise และ twist) ทุกๆ 2ns จะเห็นว่าโครงสร้างแบบ B-form จะมีความเสถียรตลอดช่วงเวลาของการจำลองแบบโดยมีค่า rise ประมาณ 3.3 Å และค่า twist ประมาณ 34° ในขณะที่แบบ A-form และ P-form จะให้ค่า parameter ทั้งสองแตกต่างจากโครงสร้างเริ่มต้น (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7. ค่า base-step parameter (rise และ twist) ของโครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบทุกๆ 2 ns

System		Rise (Å)/Twist (º)					
		0 ns	**2 ns**	**4 ns**	**6 ns**	**8 ns**	**10 ns**
acpcPNA-DNA	A-form	2.5/32.7	3.4/35.9	3.5/35.0	3.3/36.3	3.5/35.5	3.3/34.7
	B-form	3.4/35.8	3.4/34.0	3.3/33.2	3.2/31.4	3.2/33.7	3.2/33.5
	P-form	3.2/20.0	3.2/28.6	3.3/32.6	3.4/31.2	3.3/33.6	3.3/32.8
epi-acpcPNA-DNA	A-form	2.5/32.7	3.2/36.4	3.3/37.3	3.3/39.2	3.2/37.2	3.4/38.5
	B-form	3.4/35.8	3.3/34.6	3.2/36.8	3.2/36.6	3.2/38.9	3.3/35.3
	P-form	3.2/20.0	3.3/24.9	3.2/21.3	3.0/27.6	3.2/24.8	3.5/16.7

นำโครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบทั้ง 10,000 โครงสร้าง (โครงสร้างแบบ B-form) มาคำนวณพลังงานอิสระการยึดจับ ($\Delta G_{binding}$) พบว่าโมเลกุลสายคู่ acpcPNA-DNA มีพลังงานอิสระการยึดจับเป็นลบมากกว่า *epi*-acpcPNA-DNA แสดงให้เห็นว่า acpcPNA-DNA มีความเสถียรทางเทอร์โมไดนามิกส์มากกว่า ซึ่งสอดคล้องกับค่า T_m ที่ได้จากการทดลอง (Suparpprom et al., 2005) (ดูตารางที่ 8)

ตารางที่ 8. ค่า $\Delta G_{binding}$ (ในหน่วย kcal/mol) ของโมเลกุลสายคู่

System	$\Delta G_{binding}$	T_m(°C)
acpcPNA-DNA	–49.9	72.9
epi-acpcPNA-DNA	–28.0	67.8

นอกจากนี้ จากการคำนวณพลังงานยึดจับ ($\Delta E_{binding}$) ของคู่เบสเดี่ยว T-A ที่มีแกนหลักแบบต่างๆ โดยวิธีทางเคมีควอนตัม (คำนวณหาโครงสร้างเสถียรโดยวิธี B3LYP/6-31G** และคำนวณพลังงานโดยวิธี BP86/6-31+G**) พบว่าวิธีการคำนวณดังกล่าวให้ผลสอดคล้องกับผลที่ได้จากการทดลองโดยเปรียบเทียบจากกรณีของคู่เบสเดี่ยว T-A ที่ไม่มีแกนหลักที่ได้ค่าการคำนวณและการทดลองประมาณ –13 kcal/mol (ตารางที่ 9) ในส่วนของโครงสร้างของ 1 คู่เบสที่มีแกนหลักชนิดต่างๆ จากการคำนวณพบว่า แกนหลักไม่ว่าจะเป็นหมู่น้ำตาล-ฟอสเฟต (ของ DNA), aegPNA และ acpcPNA ไม่มีผลต่อระยะห่างและมุมของการเกิดพันธะไฮโดรเจนของคู่เบส T-A เลย แต่แกนหลักแบบต่างๆ มีผลต่อความแข็งแรงของพันธะไฮโดรเจน โดย acpcPNA-DNA ให้ความแข็งแรงของพันธะไฮโดรเจนมากกว่า *epi*-acpcPNA-DNA ซึ่งสอดคล้องกับความเสถียรของโมเลกุลสายคู่ทั้งสองแบบที่ได้จากการจำลองแบบ ($\Delta G_{binding}$) และจากการทดลอง (T_m) ในขณะที่แกนหลักที่เป็น DNA และ aegPNA ให้พลังงานพันธะไฮโดรเจนค่อนข้างต่ำ

ตารางที่ 9. พลังงานพลังงานยึดจับ ($\Delta E_{binding}$ ในหน่วย kcal/mol) คู่เบสเดี่ยว T-A ที่มีแกนหลักแบบต่างๆ

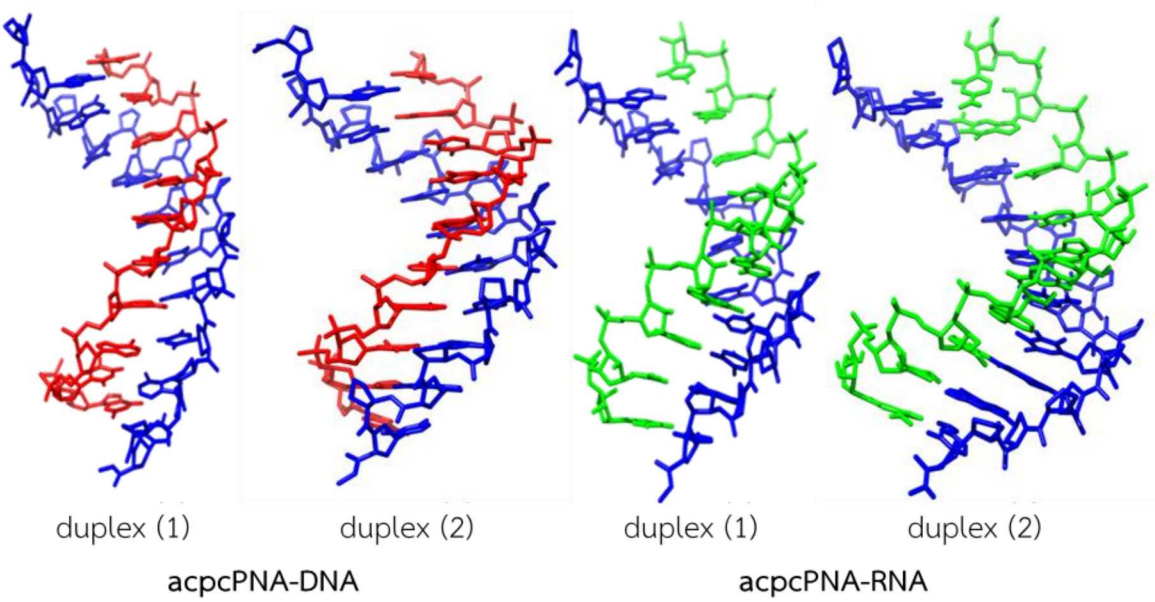
	$\Delta E_{binding}$	Expt.[a]
isolated T-A base pair	–13.2	–13.0
DNA-DNA	–9.7	
aegPNA-DNA	–9.1	
acpcPNA-DNA	–13.9	
epi-acpcPNA-DNA	–13.6	

[a] Saenger, 1988

เนื่องจากการทดสอบในห้องปฏิบัติการพบว่า acpcPNA สามารถเข้าคู่ได้ทั้งกับ DNA และ RNA แต่อย่างไรก็ตาม พบว่าความเสถียรเชิงความร้อนของโมเลกุลสายคู่ PNA-DNA สูงกว่า PNA-RNA ดังนั้น เพื่อความเข้าใจในโครงสร้างและคุณสมบัติการเข้าคู่ของ acpcPNA-DNA และ acpcPNA-RNA ในระดับโมเลกุล จึงได้ทำการศึกษาสมบัติเชิงทฤษฎีโดยการสร้างแบบจำลองเชิงโมเลกุล ในที่นี้ ได้ติดตามการเปลี่ยนแปลงเชิงโครงสร้าง และพิจารณาปัจจัยที่ส่งผลต่อความเสถียรของโมเลกุลสายคู่ทั้งสองในระดับโมเลกุล โดยได้จำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุลของ acpcPNA-RNA และ acpcPNA-DNA ที่ประกอบด้วยจำนวนคู่เบส G-C ที่แตกต่างกันทั้งหมด 4 ระบบ ดังตารางที่ 10 ในน้ำเป็นเวลา 60 ns โดยโครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุลแสดงดังรูปที่ 23

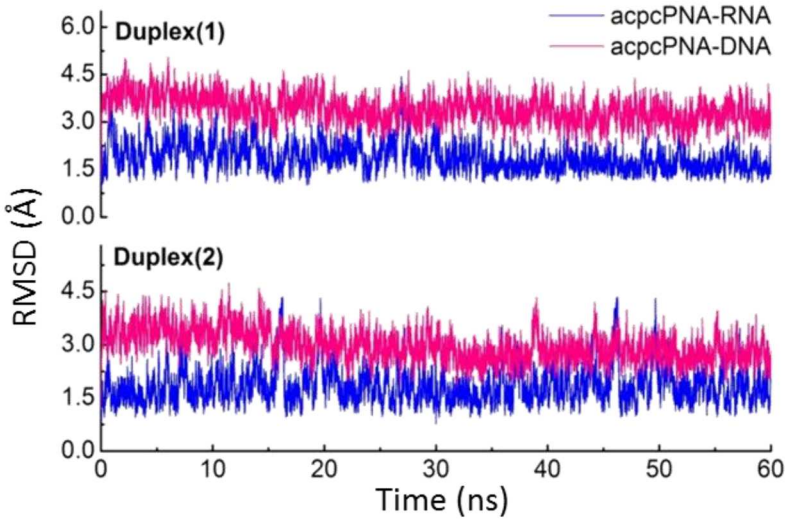
ตารางที่ 10 แสดงระบบของการจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุลของ acpcPNA-RNA และ acpcPNA-DNA

ระบบ		PNA sequence	DNA/RNA sequence	%(G+C) content	โครงสร้างเริ่มต้น
acpcPNA-RNA	duplex (1)	*N*-AGTGATCTAC-*C*	3'-UCACUAGAUG-5'	40	A-form
	duplex (2)	*N*-GCGACGTAGC-*C*	3'-CGCUGCAUCG-5'	70	
acpcPNA-DNA	duplex (1)	*N*-AGTGATCTAC-*C*	3'-TCACTAGATG-5'	40	B-form
	duplex (2)	*N*-GCGACGTAGC-*C*	3'-CGCTGCATCG-5'	70	



รูปที่ 23 โครงสร้างของโมเลกุลสายคู่ที่ได้จากการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล

นำโครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุลมาคำนวณค่า RMSD (รูปที่ 24) เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลของการจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุล พบว่าโครงสร้างที่ได้มีความเสถียรตลอดการจำลองแบบ เมื่อคำนวณค่า base-pair parameter และ base-step parameter พบว่า ทั้งระบบ acpcPNA-DNA และ acpcPNA-RNA มีค่า rise ประมาณ 3.3 Å (คล้ายกับ B-form) และค่า slide มีค่าเป็นลบ (คล้ายกับ P-form) นอกจากนี้ค่า twist ซึ่งบ่งบอกความเป็นเกลียวของโมเลกุลมีค่าลดลงจากโครงสร้างเริ่มต้น โดย twist ของ acpcPNA-DNA มีค่ามากกว่า acpcPNA-RNA ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าโครงสร้างโมเลกุลสายคู่ของทั้ง acpcPNA-DNA และ acpcPNA-RNA มีลักษณะโครงสร้างอยู่ระหว่าง B-form และ P-form



รูปที่ 24 ค่า RMSD ของโมเลกุลสายคู่ที่ได้จากการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลเทียบกับโครงสร้างเริ่มต้น

จากการศึกษาความสามารถในการเข้าคู่ของ acpcPNA กับ DNA และ RNA พบว่า acpcPNA สามารถเข้าคู่กับ DNA เกิดเป็นโมเลกุลสายคู่ acpcPNA-DNA ได้ดีกว่า RNA ยืนยันได้จากค่า $\Delta G_{binding}$ ซึ่งค่า $\Delta G_{binding}$ ของ acpcPNA-DNA มีค่าเป็นลบมากกว่า acpcPNA-RNA (ตารางที่ 11) และผลการคำนวณสอดคล้องกับความเสถียรเชิงความร้อน (T_m) ที่ได้จากการทดลองในห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้เมื่อพิจารณาพลังงานย่อยของแต่ละระบบ พบว่า ΔH_{gas} ของระบบ acpcPNA-DNA และ acpcPNA-RNA แตกต่างกันเล็กน้อย โดยค่า ΔH_{gas} จะขึ้นอยู่กับจำนวนคู่เบส G-C เป็นหลัก ซึ่งถ้าจำนวนคู่เบส G-C มาก ΔH_{gas} ก็จะมีค่ามากด้วยเช่นกัน ในขณะที่ ΔG_{solv} ซึ่งบ่งบอกความสามารถในการละลายน้ำของโมเลกุล พบว่า ระบบที่ประกอบด้วย DNA และ RNA มีความสามารถในการละลายน้ำต่างกัน จากการคำนวณพบว่าโมเลกุลสายคู่ acpcPNA-RNA ละลายน้ำได้มากกว่า acpcPNA-DNA พิจารณาจากค่า ΔG_{solv} ของ acpcPNA-RNA มีค่ามากกกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ acpcPNA-DNA ที่มีลำดับเบสเดียวกัน

ตารางที่ 11 แสดงค่า $\Delta G_{binding}$ และพลังงานย่อยของโครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบจำนวน 5000 โครงสร้าง

ระบบ		พลังงาน (kcal/mol)				T_m (°C)
		ΔH_{gas}	ΔG_{solv}	$T\Delta S$	$\Delta G_{binding}$	
acpcPNA-RNA	duplex (1)	-298.81	202.37	-43.17	-53.27	40.8
	duplex (2)	-348.06	236.55	-40.50	-71.01	49.3
acpcPNA-DNA	duplex (1)	-303.56	184.11	-45.15	-74.30	52.8
	duplex (2)	-347.75	215.25	-46.84	-85.65	60.8

ได้คำนวณอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างสาย PNA กับ DNA หรือกับ RNA ของโครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุลโดยใช้วิธี density functional theory (DFT) ภายใต้ระเบียบวิธี B3LYP/6-31G** อันตรกิริยาที่คำนวณได้อยู่ในเทอมของพลังงานยึดจับ ผลการคำนวณแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 อันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างสองสายของโมเลกุลสายคู่ ($\Delta E_{binding}$) ที่ได้จากการคำนวณด้วยวิธี DFT

ระบบ		$\Delta E_{binding}$ (kcal/mol)
acpcPNA-RNA	duplex (1)	–185.12
	duplex (2)	–222.48
acpcPNA-DNA	duplex (1)	–186.46
	duplex (2)	–229.47

จากตารางที่ 12 จะพบว่าระบบที่มี %(G+C) มากกว่าจะมีความเสถียรมากกว่า (ค่าพลังงานยึดจับเป็นลบมากกว่า) อย่างไรก็ตาม สำหรับโมเลกุลสายคู่ที่มีลำดับเบสเหมือนกัน จะเห็นว่า acpcPNA-DNA และ acpcPNA-RNA มีความเสถียรไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญโดยที่ acpcPNA-DNA มีความเสถียรมากกว่า เล็กน้อย ($\Delta E_{binding}$ มีค่าเป็นลบมากกว่าเล็กน้อย) แต่จากค่า $\Delta G_{binding}$ และ T_m ในตารางที่ 11 จะเห็นว่า acpcPNA-DNA มีความเสถียรมากกว่า acpcPNA-RNA อย่างชัดเจน แสดงว่าความเสถียรของโมเลกุลสายคู่ acpcPNA-DNA และ acpcPNA-RNA ไม่ได้ขึ้นกับอันตรกิริยาระหว่างสาย PNA กับ DNA หรือ PNA กับ RNA เป็นหลัก แต่น่าจะขึ้นกับปัจจัยอื่น เมื่อศึกษาอันตรกิริยากับโมเลกุลของน้ำของ acpcPNA-DNA เปรียบเทียบกับ acpcPNA-RNA โดยเปรียบเทียบจำนวนโมเลกุลของน้ำที่ล้อมรอบโมเลกุลสายคู่ที่ระยะห่าง 2.0, 2.5, 3.0 และ 3.5 Å (ตารางที่ 13) และพิจารณาโอกาสที่จะพบโมเลกุลของน้ำแทรกอยู่ในบริเวณ minor groove (ช่องว่างระหว่างแกนหลัก) ของโมเลกุลสายคู่ที่ได้จากการจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุล

ตารางที่ 13 เปรียบเทียบจำนวนโมเลกุลน้ำที่ล้อมรอบโมเลกุลสายคู่ของ acpcPNA-DNA และ acpcPNA-RNA ที่ระยะห่างต่างๆ (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานแสดงในวงเล็บ)

ระบบ		จำนวนโมเลกุลของน้ำเฉลี่ยที่ระยะห่างต่าง ๆ			
		2.0 Å	**2.5 Å**	**3.0 Å**	**3.5 Å**
acpcPNA-RNA	duplex (1)	100.2 (5.7)	194.6 (7.3)	292.4 (8.9)	367.6 (9.2)
	duplex (2)	101.9 (5.8)	197.8 (7.5)	296.0 (8.3)	371.9 (9.7)
acpcPNA-DNA	duplex (1)	93.1 (5.2)	175.2 (7.0)	263.1 (8.9)	332.5 (9.2)
	duplex (2)	93.5 (5.4)	175.8 (7.0)	262.3 (8.3)	325.8 (9.6)

จากการพิจารณาจำนวนของน้ำที่เข้าล้อมรอบโครงสร้างโมเลกุลสายคู่พบว่าที่ระยะ first solvation shell (ประมาณ 3.5 Å) จะพบจำนวนโมเลกุลน้ำล้อมรอบ acpcPNA-RNA มากกว่า acpcPNA-DNA อย่างชัดเจน ทำให้เมื่ออยู่ในรูปของสารละลาย acpcPNA-RNA จะมีความเสถียรน้อยกว่า acpcPNA-DNA เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างของ acpcPNA-DNA และ acpcPNA-RNA พบว่า ขนาด minor groove ของ acpcPNA-RNA (9.06±0.51 Å) กว้างกว่า acpcPNA-DNA (5.25±1.03 Å) (ความกว้างของ minor groove ที่แตกต่างกันนี้เป็นผลจากลักษณะของ sugar pucker ที่แตกต่างกันของ DNA (C2’ endo) และ RNA (C3’ endo) ความแตกต่างกันของ sugar pucker ส่งผลให้โครงสร้างของ DNA และ RNA เมื่อเข้าคู่กับ acpcPNA แตกต่างกันไปด้วย) ความกว้างของ minor groove ของ acpcPNA-RNA ที่กว้างกว่าทำให้น้ำมีโอกาสเข้าไปอยู่ใน minor groove ได้มากกว่า จากโครงสร้างที่ได้จากการจำลองแบบพบว่า acpcPNA-RNA จะมีน้ำจะเข้าไปอยู่ใน minor groove ได้มากกว่า acpcPNA-DNA ประมาณ 10% ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า ปัจจัยที่ส่งผลต่อความเสถียรของ acpcPNA-RNA คือความสามารถในการละลายน้ำของ acpcPNA-RNA ที่มีโครงสร้างที่เอื้อต่อการให้น้ำเข้าล้อมรอบได้มากกว่า acpcPNA-DNA กล่าวคือการที่มีโมเลกุลน้ำ

มาล้อมรอบโมเลกุลสายคู่ได้มากกว่าจะทำให้แต่ละสายเกิดอันตรกิริยากับน้ำได้ดี ซึ่งส่งผลให้อันตรกิริยาระหว่างสายทั้งสองลดลงทำให้ความเสถียรลดลง

จากการศึกษาโครงสร้างและพลังงานของโมเลกุล acpcPNA-DNA และ acpcPNA-RNA ที่ประกอบด้วยหนึ่งคู่เบส (single base pair) โดยการคำนวณด้วยกลศาสตร์ควอนตัมในบรรยากาศที่มีน้ำ (solvated phase) และไม่มีน้ำ (gas phase) ซึ่งโครงสร้างเสถียร (optimized structure) ที่เหมาะสมของ 1 คู่เบส ที่มีแกนหลักแตกต่างกันหาได้จากการคำนวณด้วยวิธี DFT ภายใต้ระเบียบวิธี B3LYP/6-31G* และคำนวณพลังงานด้วยระเบียบวิธี B3LYP/6-31+G** ผลการคำนวณแสดงดังตารางที่ 14 พบว่าคู่เบส G-C ให้ค่าพลังงานเป็นลบมากกว่า แสดงว่าโครงสร้างสามารถยึดจับกันได้ดีสอดคล้องกับจำนวนพันธะไฮโดรเจนของ G-C ที่มีมากกว่า A-T โครงสร้างของโมเลกุลเมื่อคำนวณในสภาวะของ solvated phase จะมีพลังงานสูงกว่า หมายความว่า น้ำมีส่วนในการทำให้โครงสร้างมีความเสถียรลดลง อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาความแตกต่างของแกนหลักพบว่า ไม่ว่าแกนหลักจะเป็น DNA หรือ RNA พลังงานที่ได้จากการคำนวณ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 14 อันตรกิริยาระหว่าง 1 คู่เบสที่ได้จากการคำนวณด้วยวิธีกลศาสตร์ควอนตัม

ระบบ	อันตรกิริยาระหว่าง 1 คู่เบส (kcal/mol)			
	XNA = DNA		XNA = RNA	
	Gas phase	Solvated phase	Gas phase	Solvated phase
acpcPNA(A)-XNA(T/U)	-13.93	-8.25	-14.26	-8.48
acpcPNA(T)-XNA(A)	-14.46	-8.40	-14.11	-8.48
acpcPNA(C)-XNA(G)	-27.48	-14.25	-26.90	-14.24
acpcPNA(G)-XNA(C)	-30.96	-14.82	-31.30	-14.44

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า จากการจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุลของโมเลกุลสายคู่ acpcPNA-DNA และ acpcPNA-RNA ที่มี %(G+C) แตกต่างกันพบว่าโครงสร้างของโมเลกุลมี form ผสมระหว่าง B-form และ P-form และ acpcPNA สามารถเข้าคู่กับ DNA เกิดเป็นโมเลกุลสายคู่ acpcPNA-DNA ได้ดีกว่า RNA ซึ่งความเสถียรทางเทอร์มอไดนามิกส์ที่คำนวณได้ ($\Delta G_{binding}$) สอดคล้องกับความเสถียรเชิงความร้อน (T_m) ที่ได้จากการทดลองในห้องปฏิบัติการ โดยปัจจัยหลักที่มีผลให้ความเสถียร acpcPNA-RNA น้อยกว่า acpcPNA-DNA คือความสามารถในการเกิดอันตรกิริยากับโมเลกุลของน้ำ เมื่อพิจารณาจำนวนโมเลกุลของน้ำที่ล้อมรอบโมเลกุลสายคู่ที่ระยะ first solvation shell พบว่า จำนวนของน้ำที่ล้อมรอบ acpcPNA-RNA มีมากกว่า acpcPNA-DNA เนื่องจากโครงสร้างของ acpcPNA-RNA มีขนาดของ minor groove กว้างกว่า acpcPNA-DNA ส่งผลให้โอกาสที่น้ำจะเข้าไปอยู่ในบริเวณของ minor groove ของโมเลกุลมีมากกว่า acpcPNA-DNA นอกจากนี้ยังพบว่าอันตรกิริยาระหว่าง acpcPNA กับ DNA หรือ acpcPNA กับ RNA ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

สรุปผลการดำเนินงาน

จากการจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุลของโมเลกุลสายคู่ PNA-PNA พบว่า acpcPNA สามารถเกิดเป็นโมเลกุลสายคู่ PNA-PNA ในทิศทางแบบ parallel ในขณะที่ *epi*-acpcPNA เกิดเป็นโมเลกุลสายคู่ PNA-PNA ได้ในทิศทางแบบ antiparallel และแบบ parallel โดยที่แบบ parallel ให้โครงสร้างที่ไม่ค่อยเสถียรมากนัก

สำหรับการศึกษาความสามารถในการเข้าคู่ของ PNA-DNA และ PNA-RNA พบว่าทั้ง acpcPNA และ *epi*-acpcPNA สามารถเข้าคู่กับ DNA เกิดเป็นโมเลกุลสายคู่ PNA-DNA ในทิศทาง antiparallel ได้ดีกว่าเข้าคู่กับตัวมันเองและได้ดีกว่า RNA ซึ่งความเสถียรทางเทอร์มอไดนามิกส์ที่คำนวณได้ ($\Delta G_{binding}$) สอดคล้องกับความเสถียรเชิงความร้อน (T_m) ที่ได้จากการทดลองในห้องปฏิบัติการ โดยปัจจัยหลักที่มีผลให้ความเสถียร PNA-RNA น้อยกว่า PNA-DNA คืออันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลของน้ำกับโมเลกุลสายคู่

References

Mansawat, W.; Vilaivan, C.; Balázs, A.; Aitken, A. J.; Vilaivan, T. *Organic Letters* **2012**, *14*, 1440–1443.

Rasmussen, H.; Kastrup, J. S.; Nielsen, J. N.; Nielsen, J. M.; Nielsen, P. E. *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4*, 98–101.

Suparpprom, C.; Srisuwannaket, C.; Sangvanich, P.; Vilaivan, T. *Tetrahedron Letters* **2005**, 46, 2833–2837.

Saenger, W. Principles of Nucleic acid Structure. New York: Springer; 1988.

Sen, A.; Nielsen, P. E. *Biophys. J.* **2006**, *90*, 1329–1337.

ภาคผนวก 2

Reprint ของบทความที่ได้รับการตีพิมพ์

Organic & Biomolecular Chemistry

COMMUNICATION

View Article Online
View Journal | View Issue

The base discriminating potential of pyrrolidinyl PNA demonstrated by magnetic Fe_xO_y particles†

Cite this: *Org. Biomol. Chem.*, 2014, **12**, 3586

Received 4th March 2014,
Accepted 8th April 2014

DOI: 10.1039/c4ob00487f

www.rsc.org/obc

Claudia Stubinitzky,[a] Tirayut Vilaivan*[b] and Hans-Achim Wagenknecht*[a]

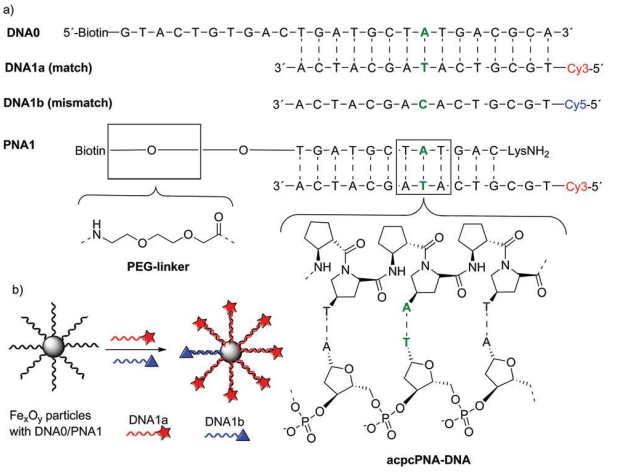
Published on 08 April 2014. Downloaded by KIT on 22/05/2014 09:08:46.

Pyrrolidinyl PNA was immobilized on Fe_xO_y magnetic particles and was able to capture and thereby discriminate single base alterations in DNA counterstrands better than DNA. The selectivities of matched *vs.* mismatched oligonucleotides measured by the absorption differences were up to 10–12 which are remarkable values for linear probes.

Among several peptide nucleic acids (PNA)[1,2] described as DNA analogues to date, the acpcPNA system consisting of 4′-substituted proline units with (2′*R*,4′*R*) configuration in combination with (2*S*)-amino-cyclopentane-(1*S*)-carboxylic acids plays a unique role for the following reasons:[3–5] (i) acpcPNA oligos form stable hybrids with complementary DNA but much less stable hybrids with RNA. (ii) acpcPNA recognition of DNA occurs highly sequence selectively. (iii) No self-pairing hybrids can be obtained. Fluorescence dyes such as 5-(1-pyrenyl)uracil and thiazole orange have recently been synthetically incorporated into acpcPNA to visualize the sequence selectivity with DNA by means of fluorescence.[6] Only the fully complementary acpcPNA–DNA hybrid showed a significant fluorescence intensity increase.

Chip-based arrays as well as soluble assays with PNA allow the single nucleotide discrimination in the target DNA.[7–9] Furthermore, the applications of DNA and PNA on inorganic particles have emerging significance as carrier systems for therapeutic purposes.[9–15] Herein we demonstrate the potential of pyrrolidinyl PNA immobilized on inorganic magnetic particles (Fe_xO_y) for single base discrimination in capturing oligonucleotides.

The investigations started with a random acpcPNA sequence (PNA1) that carries a biotin anchor tethered *via* a short PEG linker to the N-terminus. The corresponding conventional DNA sequence (DNA0) contains a biotin group at the 5′-end. PNA1 is shorter than DNA0 to avoid solubility issues and to obtain melting temperatures (T_m) in a comparable range. Successful immobilization of the biotinylated oligonucleotides on streptavidin-coated Fe_xO_y magnetic particles was confirmed by the loss of absorption at 260 nm (see ESI†). In order to test and compare the base discriminating potential of PNA1 with DNA0, two DNA counterstrands were mixed in an equimolar ratio: DNA1a is fully complementary and was labeled with Cy3, whereas DNA1b contains a single mismatch and was labeled with Cy5 (Scheme 1a). Both dyes exhibit extremely high extinction coefficients that allow following the capture of oligonucleotides simply by absorption measurements. The Cy3 (550 nm) and Cy5 (645 nm) absorptions were each normalized at the beginning to obtain a comparable



Scheme 1 (a) Sequences of biotinylated DNA0 and PNA1, modified DNA counterstrands DNA1a, DNA1b and the structure of acpcPNA hybrids in detail; (b) description for single base mismatch discrimination using DNA- or PNA-immobilized Fe_xO_y-particles.

[a]*Institute of Organic Chemistry, Karlsruhe Institute of Technology (KIT), Fritz-Haber-Weg 6, 76131 Karlsruhe, Germany. E-mail: Wagenknecht@kit.edu; Fax: +49-721-608-44825; Tel: +49-721-608-47486*

[b]*Organic Synthesis Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand. E-mail: vtirayut@chula.ac.th; Fax: +66-2-2187598; Tel: +66-2-2187627*

†Electronic supplementary information (ESI) available: Details of synthesis of PNA1–PNA5, all DNA and PNA sequences, melting temperatures and spectroscopic analysis of the capture experiments. See DOI: 10.1039/c4ob00487f

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2014

Published on 08 April 2014. Downloaded by KIT on 22/05/2014 09:08:46.

readout. The absorbance loss at 550 nm (Cy3) and at 645 nm (Cy5) was monitored until 60 min after the addition of the magnetic particles that were previously immobilized with PNA1 (or DNA0). In both cases it was impossible to capture the corresponding oligonucleotides quantitatively, which may reflect limited accessibility of the immobilized PNA/DNA probes. A control experiment showed that the amount of the finally captured acpcPNA–DNA hybrid is comparable (i) if the acpcPNA is immobilized on the particle and subsequently annealed with the complementary DNA strand (68%) or (ii) if the acpcPNA–DNA hybrid is first annealed in solution and then immobilized on the particle (73%) (see Fig. S8 in the ESI†). As expected, immobilized DNA0 does not allow discriminating between DNA1a and DNA1b at ambient temperature (50 mM Na-P_i buffer, pH 7, with 250 mM NaCl). In fact, the selectivity of approximately 0.6 shows that the mismatched DNA1b was captured slightly more efficiently (Fig. 1). Employing a slight excess of DNA1a/DNA1b (1.2 equiv.) did not change the capture selectivity. Control capture experiments with arbitrarily chosen Cy3 and Cy5 labeled DNA using streptavidin-coated magnetic beads in the absence and presence of immobilized DNA exclude non-specific binding (see Fig. S9 in the ESI†).

In contrast, immobilized PNA1 yields a selectivity of 5–6 and thereby illustrates the base discriminating potential of acpcPNA compared to normal DNA as a linear probe. Although the lengths of the PNA and DNA used are different, this comparison is still valid as the discrimination experiments were carried out under the situation that the relevant PNA and DNA hybrids were of comparable thermal stabilities. This experiment is complemented by considering the melting temperatures of the PNA–DNA1a/b hybrids which show remarkable differences compared to the DNA0–DNA1a/b duplexes (Table 1): (i) the T_m of the fully matched hybrid PNA1–DNA1a is significantly higher (77.5 °C) compared to the duplex DNA0–DNA1a (63.5 °C), although the sequence of PNA1 is much shorter than that of DNA0. This result shows the extraordinary stabilizing effect of acpcPNA for hybridization with DNA. The cyclic, five-membered ring spacer locks the conformation of the acpcPNA that is optimal for DNA binding.[5] The principle of incorporating conformational rigidity into the PNA backbone to improve the binding affinity especially to DNA is the result of decreased entropy loss upon hybridization.[9,16,17] (ii) The T_m difference of the PNA1–DNA1a (match) and PNA1–DNA1b (mismatch) hybrids is 41.0 °C. This is an astonishingly high value given the fact that the two hybrids are only differing by a single base in the DNA part, but this is fully consistent with previous studies on acpcPNA.[4]

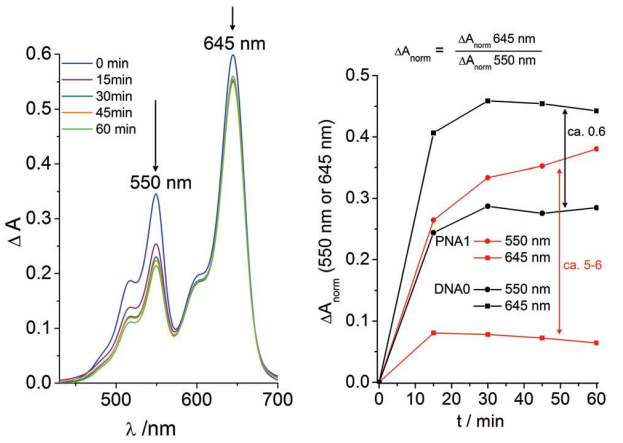


Fig. 1 (Left) UV/Vis absorption of DNA1a and DNA1b hybridized with PNA1 bearing Fe_xO_y particles, 50 mM Na-P_i buffer, pH 7, 250 mM NaCl; (right) selectivity ΔA_{norm} of DNA0 and PNA1 towards DNA1a (complementary) and DNA1b (mismatch).

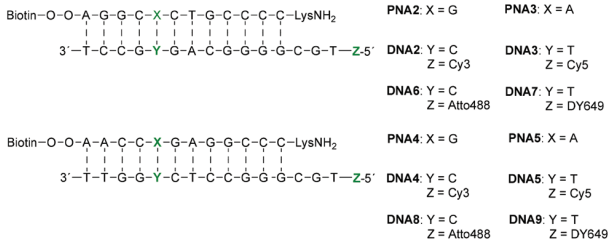
In order to give the investigations a background that is biologically more relevant, we synthesized two pairs of acpcPNA sequences that bear the R175H mutation (CGC in PNA2 *vs.* CAC in PNA3)[18] and the R248Q mutation (CGG in PNA4 *vs.* CAG in PNA5)[18] within the p53 gene (Scheme 2).[19] DNA2 to DNA5 were used as counterstrands that either match completely (*e.g.* PNA2–DNA2) or form a single mismatch in the PNA–DNA hybrid (*e.g.* PNA2–DNA3). In all four cases, the T_m values (Table 1) of the matched PNA–DNA hybrids are significantly higher than that of the corresponding mismatched ones. However one can notice significantly less discrimination in the case of mismatches with X = G and Y = T (PNA2–DNA3, PNA2–DNA7, PNA4–DNA5, PNA4–DNA9) (ΔT_m in the range of 11.4–15.5 °C) when compared to other mismatches (ΔT_m in the range of 23.1–38.0 °C). The unusually high stability of GT mismatch is well known in the DNA field but was unexpected with respect to acpcPNA–DNA hybrids.[20]

The capture experiments have been performed with PNA2–5 as described above. PNA3 and PNA5 discriminate the single base mismatches successfully and showed selectivities of 4–5/

Table 1 Melting temperatures (T_m) of PNA–DNA hybrids and DNA–DNA duplexes

Strand	Codon	Match	Codon	T_m (°C)	Mismatch	Codon	T_m (°C)	ΔT_m (°C)
DNA0	—	DNA1a	—	63.5	DNA1b	—	52.5	11.0
PNA1	—	DNA1a	—	77.5	DNA1b	—	36.5	41.0
PNA2	CGC	DNA2	GCG	65.1	DNA3	GTG	49.6	15.5
PNA3	CAC	DNA3	GTG	64.1	DNA2	GCG	29.3	34.8
PNA4	CGG	DNA4	GCC	70.7	DNA5	GTC	55.6	15.1
PNA5	CAG	DNA5	GTC	68.8	DNA4	GCC	43.3	25.5
PNA2	CGC	DNA6	GCG	67.4	DNA7	GTG	56.0	11.4
PNA3	CAC	DNA7	GTG	73.9	DNA6	GCG	35.9	38.0
PNA4	CGG	DNA8	GCC	70.5	DNA9	GTC	57.1	13.4
PNA5	CAG	DNA9	GTC	69.4	DNA8	GCC	46.3	23.1

Published on 08 April 2014. Downloaded by KIT on 22/05/2014 09:08:46.



Scheme 2 Sequences of PNA2–PNA4 and DNA2–DNA9.

5–6 for the matched PNA–DNA hybrids. In contrast, the capture experiments with immobilized PNA2 and PNA4 failed as the selectivities were approximately 1 or even lower (Fig. 2).

In principle, there are three differences between the capture experiments that showed selectivity and the unselective ones: (i) the sequence mainly differs by the match/mismatch A–T/A–C pairs in the hybrids of PNA3 and PNA5 compared to the G–C/G–T pairs in the hybrids of PNA2 and PNA4. (ii) ΔT_m of PNA3 and PNA5 are >20 °C as described for PNA1, whereas the corresponding T_m differences of the hybrids with PNA2 and PNA4 are lower. Nevertheless in all cases ΔT_m is higher than that of DNA–DNA hybrids containing the same sequence (ESI†). (iii) The modification of complementary counterstrands is different (Cy5 *vs.* Cy3). The question is whether the observed differences in selectivities have to be mainly attributed to the sequence issues followed by differences in ΔT_m or to undesired dye interactions.

In order to follow this question, the capture experiments of PNA2–PNA5 were repeated with oligonucleotides DNA6/7 and DNA8/9 bearing a different dye combination. The Cy3 dye of DNA2 and DNA4 was replaced by the Atto488 dye in DNA6 and DNA8, and the Cy5 dye of DNA3 and DNA5 was replaced by the DY649 dye in DNA7 and DNA9. Although the optical properties are similar to Cy3 and Cy5, Atto488 and DY649 exhibit negative charges in contrast to the cationic Cy3/Cy5 dyes. The T_m values of this additional set of PNA–DNA hybrids showed similarities to the previously described set (Table 1). The T_m were also compared with those of the corresponding duplexes without dyes, which gave similar values (ESI†). This result rules out possible dye interaction that influences the stability of the PNA–DNA duplexes.

Interestingly, the selectivities in the capture experiments that were obtained were improved with PNA3 and PNA5 from values of 4–5/5–6 to 9–10/11–12 (15 min after the addition of the magnetic particles to the oligonucleotide mixture) (Fig. 3). This result seems to be surprising since the T_m values were quite similar and not affected by the dyes. We attribute the selectivity improvement to the charge of the dyes: between the positively charged Cy3 and Cy5 dyes, heterodimeric and homodimeric interactions occur that let the oligonucleotides bind to each other and interfere with binding to the immobilized PNA strand on the particle. Typically, such excitonic interactions are indicated by the ratios of the absorption maxima as given by the (0 → 0/0 → 1 vibronic) fine structure of the dyes. This was successfully demonstrated *e.g.* for the perylene bisimide[21,22] and the thiazole orange dye.[23,24] The absorption ratio between ΔA at 602 nm and ΔA at 645 nm for the Cy5 decreases during the capture experiments of PNA3 and PNA5 with DNA3/DNA2 and DNA5/DNA4, respectively (see Fig. S10 in the ESI†). This indicates that the Cy5 dyes as terminal labels of the corresponding oligonucleotides are aggregated and get isolated during the capturing process onto the immobilized PNA. In the case of the negatively charged Atto488 and DY649 dyes, these dye–dye interactions were not observed as the corresponding absorption ratio at 610 nm and 652 nm for the Dy649 dye remains unchanged. Nevertheless, a selective capture of the completely matched oligonucleotide is still not possible for PNA2 and PNA4. This clearly shows that the differences between PNA2/PNA4 and PNA3/PNA5 have to be attributed to their sequential context, most likely to the high stability of the GT mismatch.[20]

Furthermore the negatively charged dyes Atto488 and DY649 enable a fully reversible annealing and dehybridisation of DNA strands to PNA4 and PNA5 that has not been possible with the corresponding Cy3- and Cy5-labeled oligonucleotides DNA2 and DNA3. By heating up the particles to 80 °C for

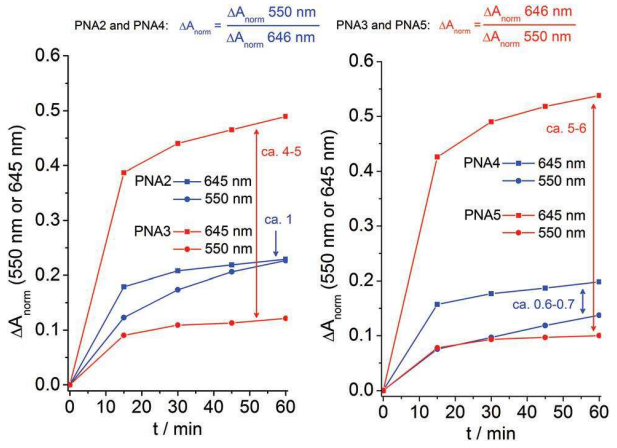


Fig. 2 Selectivity ΔA_{norm} of PNA2/PNA3 (left) and selectivity ΔA_{norm} of PNA4/PNA5 (right) towards matched and mismatched counterstrands.

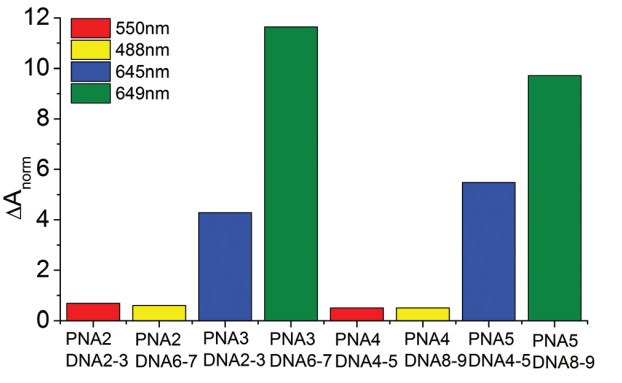


Fig. 3 Selectivity ΔA_{norm} of PNA2–5 towards complementary DNA labeled counterstrands 15 min after the addition of the magnetic particles to the oligonucleotide mixture.

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2014

Published on 08 April 2014. Downloaded by KIT on 22/05/2014 09:08:46.

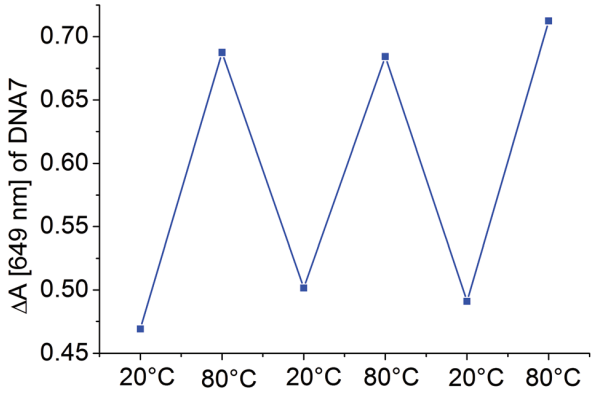


Fig. 4 Absorption differences by release and capture of DNA7 using particles bearing immobilized PNA3.

10 min the Atto488- or DY649-labeled DNA counterstrands can be fully released and subsequently recaptured (Fig. 4). This again supports the interpretation mentioned above that the negative charge of the dyes inhibits dye–dye interactions that interfere with selective capturing.

In conclusion we showed that acpcPNA can be immobilized on Fe_xO_y magnetic particles and is potentially able to reversibly discriminate single base alterations in DNA counterstrands better than DNA itself. This can be followed by absorption and potentially also by fluorescence. The selectivities of matched *vs.* mismatched oligonucleotides measured by the absorption differences were up to 10–12. These values are remarkable for linear probes. The rates of hybridization of a matched *vs.* a mismatched DNA target were nearly the same in our experiments. Hence, the selectivity of the oligonucleotide capturing seems to primarily be driven by thermodynamics and the relative stability of the acpcPNA–DNA hybrid. A ΔT_m of at least 20 °C is required to obtain selectivity. Such ΔT_m differences can be easily obtained in acpcPNA–DNA hybrids (except the GT mismatch) and clearly show the base discriminating potential of this pyrrolidinyl PNA.

Acknowledgements

Financial support by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), KIT and the Thailand Research Fund (DPG5780002) is gratefully acknowledged. Claudia Stubinitzky thanks the Karlsruhe House of Young Scientists (KHYS) for a short-term doctoral fellowship. Tirayut Vilaivan received a research fellowship under the support of the Alexander von Humboldt Foundation.

Notes and references

1 P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg and O. Buchardt, *Science*, 1991, **254**, 1497–1500; M. Egholm, O. Buchardt, L. Christensen, C. Behrens, S. M. Freier, D. A. Driver, R. H. Berg, S. K. Kim, B. Norden and P. E. Nielsen, *Nature*, 1993, **365**, 566–568.
2 B. Hyrup and P. E. Nielsen, *Bioorg. Med. Chem.*, 1996, **4**, 5–23.
3 T. Vilaivan and G. Lowe, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 9326–9327.
4 T. Vilaivan and C. Srisuwannaket, *Org. Lett.*, 2006, **8**, 1879–1900; C. Vilaivan, C. Srisuwannaket, C. Ananthanawat, C. Suparpprom, J. Kawakami, Y. Yamaguchi, Y. Tanaka and T. Vilaivan, *Artif. DNA PNA XNA*, 2011, **2**, 50–59.
5 W. Mansawat, C. Vilaivan, Á. Balázs, D. J. Aitken and T. Vilaivan, *Org. Lett.*, 2012, **14**, 1440–1443.
6 C. Boonlua, C. Vilaivan, H.-A. Wagenknecht and T. Vilaivan, *Chem. – Asian J.*, 2011, **12**, 3251–3259; B. Ditmangklo, C. Boonlua, C. Suparpprom and T. Vilaivan, *Bioconjugate Chem.*, 2013, **24**, 614–625.
7 K. Matsumoto, E. Nakata, T. Tamura, I. Saito, Y. Aizawa and T. Morii, *Chem. – Eur. J.*, 2013, **19**, 5034–5504.
8 M. F. Ali, R. Kirby, A. P. Goodey, M. D. Rodriguez, A. D. Ellington, D. P. Neikirk and J. T. McDevitt, *Anal. Chem.*, 2013, **75**, 4732–4739.
9 J. K. Pokorski, M. A. Witschi, B. L. Purnell and D. H. Appella, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 15067–15073; C. M. Micklitsch, B. Y. Oquare, C. Zhao and D. H. Appella, *Anal. Chem.*, 2013, **85**, 251–257.
10 A. Rolland, *Advanced Gene Delivery: From Concepts to Pharmaceutical Products*, Harwood, Amsterdam, 1999.
11 G. P. H. Dietz and M. Bahr, *Mol. Cell. Neurosci.*, 2004, **27**, 85–131.
12 R. Langer and N. A. Peppas, *AIChE J.*, 2003, **49**, 2990–3006.
13 W. C. Heiser, *Gene Delivery to Mammalian Cells*, Humana Press, Totowa, New Jersey, 2004.
14 V. Sokolova and M. Epple, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2008, **47**, 1382–1395.
15 Y. Chen, H. Chen and J. Shi, *Mol. Pharmaceutics*, 2014, DOI: 10.1021/mp400596v.
16 V. A. Kumar and K. N. Ganesh, *Acc. Chem. Res.*, 2005, **38**, 404–412.
17 R. J. Worthington, A. P. O'Rourke, J. Morral, T. H. S. Tan and J. Micklefield, *Org. Biomol. Chem.*, 2007, **5**, 249–259.
18 A. N. Bullock and A. R. Fersht, *Nat. Rev. Cancer*, 2001, **1**, 68–76.
19 P. Lamb and L. Crawford, *Mol. Cell Biol.*, 1986, **6**, 1379–1385.
20 S. Pan, X. Sun and J. K. Lee, *Int. J. Mass Spectrom.*, 2006, **253**, 238–248; P. S. Ho, C. A. Frederick, G. J. Quigley, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, A. H. Wang and A. Rich, *EMBO J.*, 1985, **4**, 3617–3623.
21 P. P. Neelakandan, Z. Pan, M. Hariharan, Y. Zheng, H. Weissman, B. Rybtchinski and F. D. Lewis, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 15808–15813.
22 D. Baumstark and H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2008, **47**, 2612–2614.
23 A. Okamoto, *Chem. Soc. Rev.*, 2011, **40**, 5815–5828.
24 S. Berndl and H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2009, **48**, 2418–2421.

BEILSTEIN JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY

Synthesis and optical properties of pyrrolidinyl peptide nucleic acid carrying a clicked Nile red label

Nattawut Yotapan[1], Chayan Charoenpakdee[1], Pawinee Wathanathavorn[1], Boonsong Ditmangklo[1], Hans-Achim Wagenknecht[*2] and Tirayut Vilaivan[*1]

Full Research Paper

Open Access

Address:
[1]Organic Synthesis Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand and [2]Institute of Organic Chemistry, Karlsruhe Institute of Technology (KIT), Fritz-Haber-Weg 6, 76131 Karlsruhe, Germany

Email:
Hans-Achim Wagenknecht[*] - wagenknecht@kit.edu;
Tirayut Vilaivan[*] - vtirayut@chula.ac.th

* Corresponding author

Keywords:
click chemistry; deoxyribonucleic acid; DNA bulge; fluorescence; nucleic acids; solvatochromism

Beilstein J. Org. Chem. **2014,** *10,* 2166–2174.
doi:10.3762/bjoc.10.224

Received: 08 May 2014
Accepted: 19 August 2014
Published: 11 September 2014

This article is part of the Thematic Series "Nucleic acid chemistry".

Associate Editor: S. Flitsch

© 2014 Yotapan et al; licensee Beilstein-Institut.
License and terms: see end of document.

Abstract

DNA or its analogues with an environment-sensitive fluorescent label are potentially useful as a probe for studying the structure and dynamics of nucleic acids. In this work, pyrrolidinyl peptide nucleic acid (acpcPNA) was labeled at its backbone with Nile red, a solvatochromic benzophenoxazine dye, by means of click chemistry. The optical properties of the Nile red-labeled acpcPNA were investigated by UV–vis and fluorescence spectroscopy in the absence and in the presence of DNA. In contrast to the usual quenching observed in Nile red-labeled DNA, the hybridization with DNA resulted in blue shifting and an enhanced fluorescence regardless of the neighboring bases. More pronounced blue shifts and fluorescence enhancements were observed when the DNA target carried a base insertion in close proximity to the Nile red label. The results indicate that the Nile red label is located in a more hydrophobic environment in acpcPNA–DNA duplexes than in the single-stranded acpcPNA. The different fluorescence properties of the acpcPNA hybrids of complementary DNA and DNA carrying a base insertion are suggestive of different interactions between the Nile red label and the duplexes.

Introduction

Fluorescent labels are important tools for investigating the structure and dynamics of biomolecular interactions [1-3]. Traditionally, the biological macromolecules are labeled with two or more dyes which can interact in a conformation/distant-dependent manner via Förster resonance energy transfer (FRET) [4-6]. Alternatively, the FRET pairs can be replaced by an environmentally sensitive label that can change its fluorescence in response to its altered micro-environment [7-9]. Nile

red is a member of the benzophenoxazine dye family which exhibits several interesting features including a high photostability, high fluorescence quantum yield, broad working pH range, long excitation and emission wavelengths, and solvatochromic properties [10]. Applications of Nile red as a staining dye in histology [11,12] and as a probe for the sensing of polarity and hydrophobicity [13] are well-known. Nile red has been used as a DNA label, either as a base modifier [14-16], a base replacement [17] or a backbone-tethered label [18,19]. However, in most cases the formation of DNA duplexes does not yield significant fluorescence changes in the Nile red, unless it is used in combination with another dye such as pyrene to form an energy transfer pair [20,21]. A related phenoxazine dye – Nile blue – has also been incorporated into DNA as a base replacement, again without showing significant structure-induced fluorescence change [22].

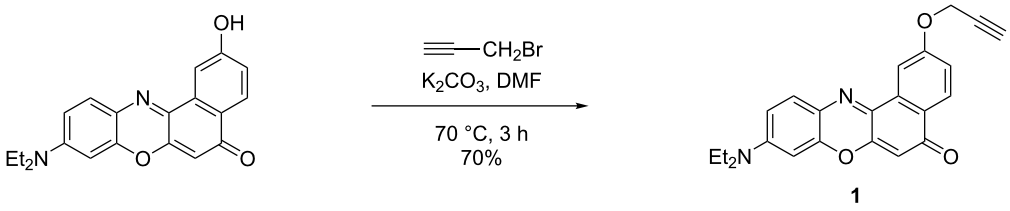
Peptide nucleic acid or PNA is an electrostatically neutral analogue of DNA which can form very stable duplexes with DNA and RNA in a highly sequence specific fashion. PNA–DNA duplexes have different structural morphology and electrostatic potential surfaces from DNA–DNA duplexes and therefore they are interacting differently with DNA-binding dyes [23-25]. We had recently introduced a new conformationally constrained pyrrolidinyl PNA known as acpcPNA that shows several unique properties [26-28]. Its potential applications as a probe for DNA sensing are well-established. For example, we have developed singly labeled acpcPNA probes that can give a fluorescence change in response to hybridization to DNA [29-31]. Due to its solvatochromic properties, Nile red is a potential candidate to be used in combination with PNA to develop a hybridization probe which not only differentiates between complementary and non-complementary DNA, but can also report on local structural variations. Except for an example from our group on the conformation control of Nile red-labeled DNA by acpcPNA [32], no combination of the Nile red label and PNA has yet been reported in the literature. It is therefore our purpose to develop a facile method for synthesizing Nile red-labeled acpcPNA based on the click strategy [33-36] and to investigate its optical properties.

Results and Discussion

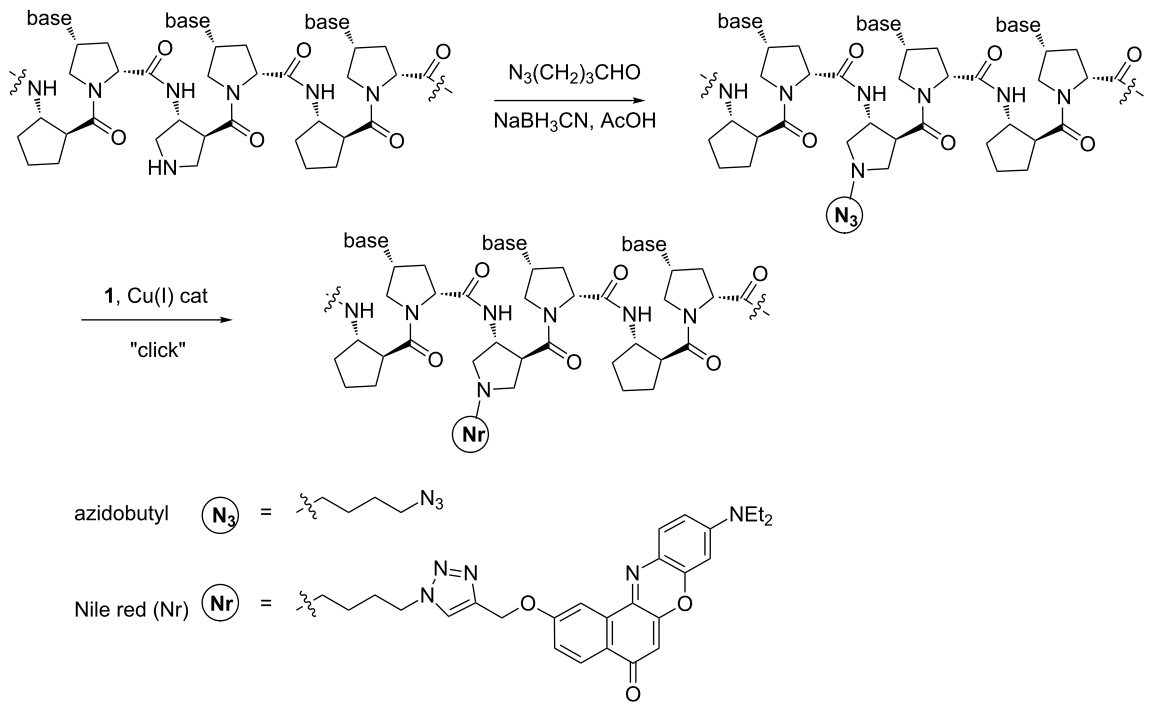
At least two different means to introduce the Nile red label onto DNA by using click chemistry have been reported in the literature. One involves the clicking of in situ generated 5-azidodeoxyuridine-containing DNA with propargyl Nile red [16], the other employs DNA bearing 2'-propargylated nucleotides and azide-modified Nile red [19]. An approach related to the latter was used in this work, although the azide function was placed on the PNA instead of the Nile red, and the clicking was carried out on the solid support rather than in solution phase. The propargylated Nile red label **1** was synthesized in 70% yield by alkylation of the known 2-hydroxy Nile red [37,38] with propargyl bromide in the presence of K_2CO_3 in DMF (Scheme 1).

The alkyne-containing compound **1** was clicked onto the backbone of acpcPNA that had been pre-functionalized with an azidobutyl group by a reductive alkylation strategy previously reported by our group (Scheme 2) [31]. Two lysine residues were incorporated at the N- and C-termini of the acpcPNA to ensure a sufficient solubility in aqueous solution. Five acpcPNA sequences, each of which singly labeled at the backbone with Nile red under different sequence context, were successfully synthesized and characterized by MALDI–TOF MS (Figure 1 and Table 1). Isolated yields in the range of 6–18% were obtained (0.5 μmol scale), which are typical for solid phase synthesis, whereby the majority of material loss occurred during HPLC purification. All Nile red-labeled acpcPNAs are freely soluble in water (>1 mM), providing a bright blue solution.

The UV–vis spectrum of the free propargyl Nile red label **1** in acetonitrile (Figure 2a) showed absorption and fluorescence emission maxima at 538 nm and 620 nm, with a fluorescence quantum yield (Φ_F) of 0.65, which is quite comparable to other Nile red derivatives reported in the literature [10]. As the polarity of the solvent increases with the addition of aqueous phosphate buffer, both the absorption and the fluorescence maxima shifted to longer wavelengths with a concomitant decrease in the fluorescence quantum yields (50% MeCN: λ_{abs} 564 nm, λ_{em} 641 nm, Φ_F 0.29; 20% MeCN: λ_{abs} 587 nm, λ_{em}



Scheme 1: Synthesis of propargylated Nile red **1**.



Scheme 2: Synthesis of azidobutyl- and Nile red-modified acpcPNA.

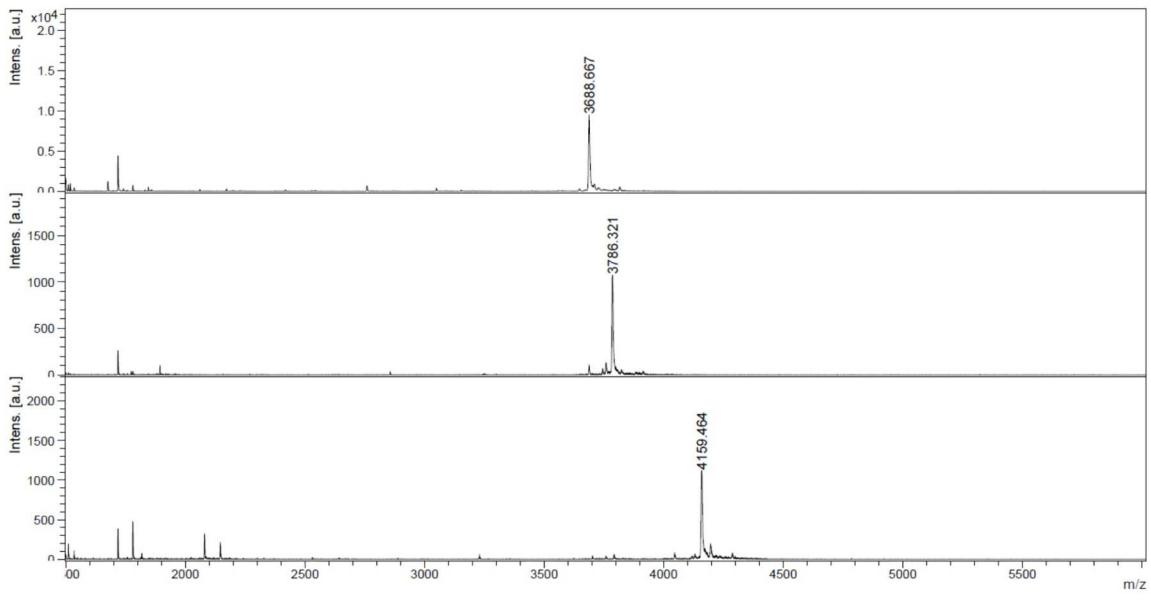


Figure 1: MALDI–TOF mass spectra of the crude 10mer acpcPNA before (top) (calcd *m*/*z* 3688.0), and after functionalizing with the azidobutyl group (middle) (calcd *m*/*z* 3785.1), and followed by clicking with Nile red (bottom) (calcd *m*/*z* 4157.5).

651 nm; Φ_F 0.14). In aqueous phosphate buffer (10 mM, pH 7.0), the Nile red-labeled acpcPNA **10mer-Nr** exhibited a broad absorption peak centered at 575 nm and a fluorescence emission at 656 nm, respectively (Figure 2b). The solvatochromic property of the Nile red-labeled acpcPNA is demonstrated as shown by the progressively blue-shifted absorption

Table 1: Sequence, isolated yield and characterization data of Nile red-labeled acpcPNA.

PNA	sequence (N to C)[a]	t_R (min)[b]	% yield[c]	*m/z*[d] (calcd)	*m/z*[e] (found)
10mer-Nr	GTAGA(Nr)TCACT	33.6	6.3	4157.5	4155.1
11merAA-Nr	CATAA(Nr)AATACG	34.2	18.5	4491.9	4491.1
11merCC-Nr	CATAC(Nr)CATACG	34.6	11.4	4443.9	4441.8
11merGG-Nr	CATAG(Nr)GATACG	32.8	15.2	4523.9	4523.2
11merTT-Nr	CATAT(Nr)TATACG	34.3	8.4	4473.9	4473.0

[a]All sequences were end-capped at N- and C-termini with *N*-acetyl-L-lysine and L-lysinamide, respectively. [b]HPLC conditions: C18 column 4.6 × 50 mm, 3 µ, gradient 0.1% TFA in H_2O:MeOH 90:10 for 5 min then linear gradient to 10:90 over 30 min, flow rate 0.5 mL/min, 260 nm. [c]Isolated yield (determined spectrophotometrically) after HPLC purification. [d]Average mass of $[M + H]^+$. [e]MALDI–TOF.

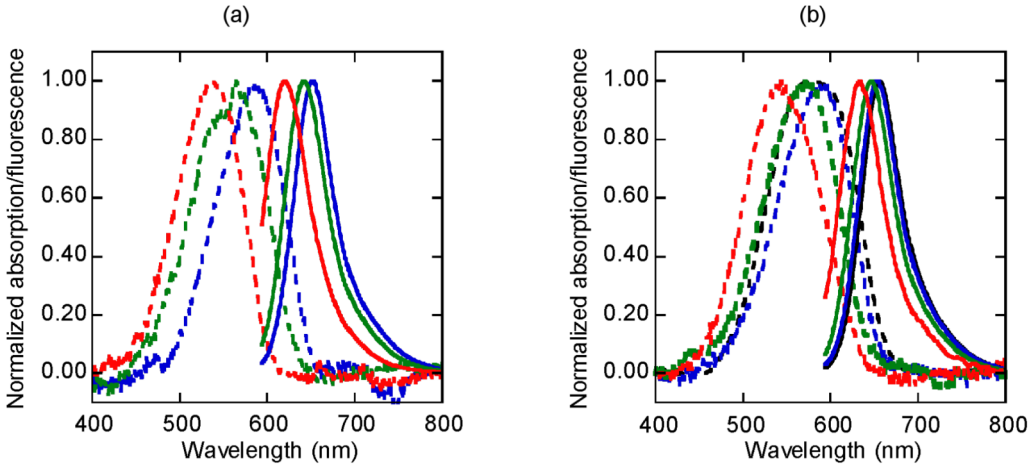


Figure 2: Normalized absorption (---) and fluorescence (—) spectra of (a) propargyl Nile red **1** and (b) Nile red-labeled acpcPNA **10mer-Nr** in 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0):acetonitrile: black = 100:0; blue = 80:20; green = 50:50; red = 0:100. All measurements were carried out in 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), [PNA] and [**1**] = 1.0 µM at 20 °C with λ_{ex} = 580 nm.

and fluorescence emission maxima in the presence of acetonitrile (100% MeCN: λ_{abs} 544 nm, λ_{em} 634 nm; 50% MeCN: λ_{abs} 569 nm, λ_{em} 647 nm; 20% MeCN: λ_{abs} 592 nm, λ_{em} 654 nm). The fluorescence spectrum of the Nile red-labeled acpcPNA is notably red-shifted compared to the fluorescence spectrum of the free Nile red label in the same solvent. This suggests possible interactions between the Nile red label and the PNA base or backbone. Nevertheless, the Nile red in the acpcPNA **10mer-Nr** was not quenched as indicated by the quantum yield value being similar to that of the free label (**10mer-Nr**: Φ_F = 0.16; **1**: Φ_F = 0.14 in 20% MeCN). Unfortunately, the value can only be compared in an acetonitrile:water mixture as compound **1** is essentially insoluble in water.

Melting temperature data and optical properties of the Nile red-labeled acpcPNAs and their hybrids with various DNA are summarized in Table 2. Thermal denaturation experiments suggest that the Nile red-labeled acpcPNA **10mer-Nr** can form a stable hybrid with complementary DNA. In contrast to some other labels such as pyrene which usually destabilize acpcPNA–DNA duplexes [30,31], the T_m of the complementary DNA hybrid of Nile red-labeled PNA (58.8 °C by UV or 56.9 °C by fluorescence) was comparable to the T_m of unlabeled acpcPNA with an identical sequence (57.6 °C) [26]. Absorption spectra of **10mer-Nr** and its complementary DNA duplex show differences in the Nile red region as shown by the sharpening and red shift of the absorption maxima (λ_{max} = 575 and 598 nm in single stranded and duplex, respectively). Importantly, fluorescence spectra of the duplex showed a pronounced blue shift of the emission maxima (647 nm) compared to the single-stranded PNA (656 nm) as well as a small fluorescence increase (1.36 fold at 643 nm) (Figure 3a,b). The blue-shifted fluorescence maxima and increased quantum yields of Nile red suggest that the Nile red chromophore in complementary PNA–DNA duplexes was placed in a less polar environment compared to its placement in single-stranded PNA. Although

Table 2: T_m and optical properties of Nile red-labeled acpcPNA[a].

PNA	DNA (5′ to 3′)[b]	T_m (°C)[c]	λ_{abs}	λ_{em}[d]	Φ_F[e]	F/F_0[f]
10mer-Nr	none	–	575	656	0.11	–
	AGTGATCTAC	58.8 (56.9)	598	647	0.15	1.36
	AGTGCTCTAC	37.5 (36.7)	585	648	0.17	1.72
	AGTCATCTAC	37.7 (37.5)	589	649	0.14	1.43
	AGTGACCTAC	40.8 (41.3)	592	652	0.15	1.70
	AGTGA**C**TCTAC	46.9 (52.0)	589	643	0.29	2.91
	AGTGA**A**TCTAC	40.1 (46.7)	588	648	0.20	2.60
	AGTGA**T**TCTAC	54.7 (52.7)	591	649	0.22	2.65
	AGTGA**G**TCTAC	42.2 (46.0)	593	645	0.20	3.31
	AGT**C**GATCTAC	N.D.[g]	591	648	0.14	1.16
	AGTGATC**C**TAC	N.D.[g]	597	653	0.10	0.87
	AGTGC**C**TCTAC	N.D.[g]	585	648	0.17	1.45
	AGTGA**C**CCTAC	N.D.[g]	593	652	0.13	1.23
	AGTGA**C**TCCAC	N.D.[g]	585	647	0.13	1.24
11merAA-Nr	none	–	598	657	0.15	–
	CGTATTTTATG	76.0	600	651	0.23	1.55
	CGTATT**C**TTATG	74.7	593	645	0.33	2.34
11merCC-Nr	none	–	594	656	0.08	–
	CGTATGGTATG	67.4	594	646	0.19	2.49
	CGTATG**C**GTATG	71.2	598	644	0.13	1.79
11merGG-Nr	none	–	599	660	0.04	–
	CGTATCCTATG	(62.3)	599	655	0.15	3.27
	CGTATC**C**CTATG	(62.3)	599	652	0.10	2.46
11merTT-Nr	none	–	588	655	0.09	–
	CGTATAATATG	76.6	602	654	0.19	2.05
	CGTATA**C**ATATG	76.0	590	646	0.29	3.44

[a]All measurements were carried out in 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), [PNA] = 1.0 μM; [DNA] = 1.2 μM at 20 °C. [b]Underlined and boldface letters in DNA sequences indicate the position of mismatch and base insertion, respectively. [c]Determined by UV–vis (260 nm) and/or fluorescence spectrophotometry (643 nm, shown in parentheses). [d]λ_{ex} = 580 nm. [e]Cresyl violet was used as a standard (Φ = 0.54 in MeOH) [41]. [f]F/F_0 was calculated from the ratio of fluorescence of duplex divided by the single-stranded PNA at 643 nm. [g]Not determined.

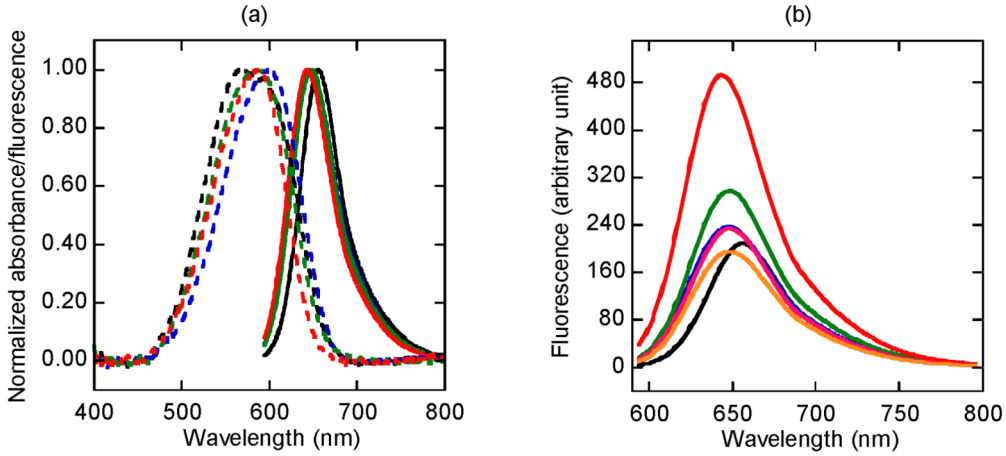


Figure 3: (a) Normalized absorption (---) and fluorescence (—) spectra and (b) fluorescence spectra of Nile red-labeled acpcPNA **10mer-Nr** in the absence (black) and presence of various DNA sequences (5'→3'): blue = AGTGATCTAC (complementary); green = AGTGCTCTAC (mismatched); red = AGTGA**C**TCTAC (bulged); pink = AGTGC**C**TCTAC (bulged with mismatch); orange = AGT**C**GATCTAC (misplaced bulge). All measurements were carried out in 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), [PNA] = 1.0 μM; [DNA] = 1.2 μM at 20 °C with λ_{ex} = 580 nm.

the related benzophenoxazine dye Nile blue binds to DNA by intercalation, the binding results in a bathochromic shifting and a quenched fluorescence [39,40]. Based on this, together with the fact that PNA–DNA duplexes are not good substrates for intercalative binding [23], we propose that the Nile red is more likely to bind to the groove of the PNA–DNA duplex rather than intercalate into the base stacks.

In the presence of a mismatched base in the DNA strand, the T_m of the duplex was decreased as expected. For example, the mismatched hybrid of **10mer-Nr** with the DNA carrying a mismatched base in close proximity to the position of the Nile red label showed T_m values in the range of 37–41 °C. Fluorescence spectra of these mismatched DNA duplexes showed blue-shifted and enhanced fluorescence emissions similar to the complementary duplex, which ranged from 1.4 to 1.7 fold compared to the one of single-stranded Nile red-labeled acpcPNA. This suggests that the Nile red label can still noticeably interact with the mismatched duplexes.

The most remarkable feature of the Nile red-labeled acpcPNA **10mer-Nr** is the relatively large fluorescence increase after the hybridization with DNA targets which carry a base insertion in close proximity to the Nile red label. As shown in Table 2, these duplexes showed more pronounced fluorescence increases (2.6–3.3 fold) than the complementary or mismatched duplexes (1.4–1.7 fold relative to the single-stranded **10mer-Nr**). The fluorescence maxima were also further blue-shifted relative to the single-stranded and complementary duplexes of Nile red-labeled acpcPNA (Figure 3a,b). These results suggest that the Nile red label in these duplexes adopts a different configuration to the complementary and the single-mismatched duplexes. When the DNA strand carries an extra inserted base, the only way it can form a stable hybrid is to form a bulge on the DNA strand at the insertion site. This is supported by the unusually high T_m values (46–53 °C) for these duplexes. In addition, consistent fluorescence increases were observed regardless of the nature of the inserted base. Based on these findings we propose that the extra DNA base is looped out to form a bulge which can accommodate the Nile red label. A similar binding mode has been proposed earlier for pyrene-labeled DNA [42]. When the inserted base was misplaced, i.e., away from the Nile red label, or when a mismatch base was introduced elsewhere in the DNA strand, the fluorescence change was small (Figure 3b, Figure S11 and Figure S12, Supporting Information File 1), suggesting that the fluorescence increase was due to a specific interaction between the Nile red label and the bulge site. The addition of β-cyclodextrin to the bulged duplexes caused no change in the fluorescence of the Nile red label, whereas a marked blue shift was observed with single-stranded PNA (8 nm) (Figure S17, Supporting Information File 1). This experiment confirmed that the Nile red label is buried well within the hydrophobic pocket of the bulged duplexes and therefore not available to form an inclusion complex with the cyclodextrins [17]. Less pronounced shifts were observed with complementary and mismatched duplexes (2 and 4 nm, respectively) upon the addition of cyclodextrin, which indicates possible interactions between the groove-bound Nile red and cyclodextrin.

To better understand the effect of neighboring bases on the optical properties of the Nile red-labeled acpcPNA and its duplexes with DNA, four Nile red-labeled acpcPNA sequences (**11merAA-Nr**, **11merCC-Nr**, **11merGG-Nr**, **11merTT-Nr**) were synthesized. These four Nile red-labeled acpcPNA sequence exhibited differences only at the bases flanking the Nile red label, For single-stranded PNA, the order of fluorescence quantum yields was AA > TT ~ CC > GG. This suggests a more efficient quenching of the Nile red label by neighboring G than by other nucleobases. A is almost non-quenching as shown by the high quantum yield of **11merAA-Nr** (Φ_F = 0.15), which is comparable to the high quantum yield of the free Nile red label (Φ_F = 0.14). On the other hand, the presence of two flanking G in **11merGG-Nr** resulted in a decrease of the quantum yield of more than 70% (Φ_F = 0.04). Upon hybridization with complementary DNA targets, the fluorescence quantum yields of all four hybrids were increased to a similar range (Φ_F = 0.15–0.23). However, since the initial fluorescence of **11merGG-Nr** was low, the fluorescence change was more pronounced (3.27 fold) than other sequences (1.55–2.49 fold). When a bulge was introduced, a larger fluorescence increase was observed in duplexes with neighboring A-T than G-C pairs. Accordingly, the bulged duplexes of **11merAA-Nr** and **11merTT-Nr** became more fluorescent than the corresponding complementary duplexes. Opposite results were observed with **11merCC-Nr** and **11merGG-Nr**, that is, the complementary duplexes exhibited higher fluorescence than the bulged duplexes. In all cases the fluorescence emission maxima of the bulged duplex were at shorter wavelengths than fluorescence emission maxima of the complementary duplexes and single-stranded PNA. These results clearly support our hypothesis of the different placement of the Nile red label in the complementary and bulged duplexes.

Although Nile red has been previously incorporated in DNA either through a base substitution or modification, these Nile red-labeled DNAs do not show appreciable fluorescence changes in response to the hybridization with DNA regardless of the mode of Nile red attachment [14,17,18]. In most cases, the pairing of Nile red-labeled DNA with another DNA strand resulted in unchanged or decreased fluorescence quantum yields. This, together with the red-shifted absorption and fluo-

rescence spectra in comparison to single-stranded DNA, suggests that Nile red may intercalate into the base stack of DNA–DNA duplexes. The behavior of the Nile red label in acpcPNA is completely different, as shown by the consistent increase in the fluorescence quantum yield upon hybridization with complementary DNA irrespective of the nature of the flanking bases. In such duplexes, the Nile red is expected to interact with the PNA–DNA duplexes by means of groove binding, which results in a lower localized polarity around the Nile red chromophore and gives rise to the observed blue shifts and the fluorescence increase. In addition, a larger increase in fluorescence was also observed with DNA targets that can form a bulge in the vicinity of the Nile red label. We propose that the Nile red label is buried within the looped out structure of the bulged duplex, which gives rise to an even more pronounced blue shift and fluorescence increase, except when there are nearby G-C base pairs which may quench the fluorescence.

Conclusion

We successfully synthesized the propargylated Nile red **1** and clicked it onto acpcPNA with an azide-modified backbone. The solvatochromic properties of the Nile red label is retained in the labeled acpcPNA. Quenching of the Nile red label by neighboring bases in acpcPNA increases in the order of A > T ~ C > G. The hybridization with fully complementary DNA and DNA with an inserted base consistently resulted in blue-shifted and enhanced fluorescence. This indicates that the Nile red label in acpcPNA–DNA duplexes is in a more hydrophobic environment compared to when the Nile red label is in single-stranded acpcPNA. Based on spectroscopic evidence, we propose that either the Nile red label resides within the groove (complementary duplexes) or the hydrophobic pocket formed by the looped-out base (bulged duplexes) rather than intercalating into the base stacks.

Experimental

General remarks

All chemicals were obtained from standard suppliers and used as received. Anhydrous DMF for peptide synthesis was purchased from RCI Labscan (Thailand). All other solvents were AR or HPLC grade and were used without further purification. Oligonucleotides were obtained from Pacific Science (Thailand) or BioDesign (Thailand). The water used in all experiments was obtained from an ultrapure water system fitted with a Millipak® 40 filter unit.

Synthesis of propargyl Nile red **1**

2-Hydroxy Nile red [37] (140.1 mg, 0.41 mmol) was dissolved in anhydrous DMF (5 mL). The solution was cooled in an ice bath followed by the addition of potassium carbonate (210.7 mg, 1.5 mmol) and propargyl bromide (100 µL, 1.5 mmol). The mixture was heated at 70 °C and stirred for 3 h. After the removal of the solvent, the residue was purified by column chromatography (EtOAc/hexanes 1:4) to obtain **1** (108.1 mg, 70% yield) as a dark purple solid. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 1.17 (t, J = 6.9 Hz, 6H, CH_3CH$_2$), 3.51 (q, J = 6.9 Hz, 4H, CH$_3$CH_2), 3.67 (t, J = 2.2 Hz, 1H, ≡CH), 5.03 (d, J = 2.2 Hz, 2H, OCH$_2$), 6.20 (s, 1H, ArH), 6.65 (d, J = 2.6 Hz, 1H, ArH), 6.83 (dd, J = 9.1 and 2.6 Hz, 1H, ArH), 7.32 (dd, J = 8.7 and 2.5 Hz, 1H, ArH), 7.64 (d, J = 9.1 Hz, 1H, ArH), 8.04 (d, J = 2.5 Hz, 1H, ArH), 8.08 (d, J = 8.7 Hz, 2H, ArH); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ 181.3, 159.8, 151.8, 150.9, 146.5, 138.1, 133.5, 131.0, 127.2, 125.5, 124.0, 118.2, 110.1, 107.0, 104.1, 96.0, 78.8, 78.7, 55.9, 44.4, 12.4; IR (ATR) ν_{max}: 3281.7, 3190.3, 2968.3, 2920.4, 2846.4, 1675.4, 1584.0, 1405.6 cm^{-1}; HRMS (ESI–TOF): [M + H]$^+$ calcd for $C_{23}H_{21}N_2O_3$, 373.1552; found, 373.1581; UV (MeOH) λ_{max} (ε): 553 (3.2×10^4).

Synthesis of Nile red-modified acpcPNA

The 3-aminopyrrolidine-4-carboxylic acid (apc) modified acpcPNA was manually synthesized at a 1.5 µmol scale on Tentagel S-RAM resin (Fluka, 0.24 mmol/g) from the four Fmoc-protected pyrrolidinyl PNA monomers (A^{Bz}, T, C^{Bz}, G^{Ibu}) and spacers [Fmoc-(1*S*,2*S*)-2-aminocycolpentanecarboxylic acid or (3*R*,4*S*)-3-(Fmoc-amino)-1-trifluoroacetylpyrrolidine-4-carboxylic acid] [43] according to the previously published protocol [26,27,31]. Lysine was included at both C- and N-termini to improve the water solubility. After the completion of the synthesis, the N-terminal Fmoc group was removed and the free amino group was capped by acetylation. The acpcPNA on the solid support was spilt to 0.5 µmol portions for a further labeling experiment and treated with 1:1 dioxane/aqueous NH_3 at 60 °C overnight to remove the nucleobase- and apc-protecting groups. Fully deprotected acpcPNA (0.5 µmol) was treated with 4-azidobutanal (15 µmol, 30 equiv) in the presence of $NaBH_3CN$ (30 µmol, 60 equiv) and HOAc (30 µmol, 60 equiv) in MeOH (200 µL) at room temperature overnight. After an exhaustive washing with MeOH, the azide-modified acpcPNA was reacted with **1** (7.5 µmol, 15 equiv) in the presence of tris[(benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amine [44] (TBTA, 30 µmol, 60 equiv), tetrakis(acetonitrile) copper(I) hexafluorophosphate (15 µmol, 30 equiv) and (+)-sodium-L-ascorbate (60 µmol, 120 equiv) in 3:1 (v/v) DMSO/*t*-BuOH at room temperature overnight. After the reaction was completed, the labeled acpcPNA was cleaved from the solid support with trifluoroacetic acid (500 µL × 30 min × 3). After drying and washing with diethyl ether, the residue was purified by reversed-phase HPLC and characterized by MALDI–TOF mass spectrometry (Microflex, Bruker Daltonics; α-cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix, positive linear ion mode).

Spectroscopic studies

Samples for melting temperature, UV–vis, and fluorescence studies were prepared in 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) at concentrations of PNA = 1.0 μM and DNA = 1.2 μM. UV–vis and thermal denaturation experiments were performed on a CARY 100 UV–vis spectrophotometer (Varian, Australia) equipped with a thermal melting system. Fluorescence spectra were measured on a Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (Varian, Australia) at an excitation wavelength of 580 nm with 5 nm excitation and emission slits. Fluorescence melting experiments were performed under the same conditions by measuring the sample that was pre-heated to the specified temperature at 5 °C intervals and left for equilibration at that temperature for at least 5 min. The emission at 643 nm was divided by the emission at 643 nm of the single-stranded acpcPNA at the same temperature and plotted against the temperature to obtain the fluorescence melting curves. Melting temperatures were obtained from the UV or fluorescence melting curves by first derivative plots.

Supporting Information

Supporting Information File 1

NMR spectra, HPLC chromatogram, mass spectra and additional spectroscopic data.
[http://www.beilstein-journals.org/bjoc/content/supplementary/1860-5397-10-224-S1.pdf]

Acknowledgements

Financial support of this work from the Thailand Research Fund (DPG5780002), the Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund of the Chulalongkorn University (RES560530126-AM), and the Thai government stimulus package 2 (TKK2555, SP2) under the Project for the Establishment of Comprehensive Center for Innovative Food, Health Products and Agriculture and the Royal Golden Jubilee Ph.D. Program (Grant No. PHD/0316/2550, to NY and TV) is gratefully acknowledged.

References

1. Murphy, M. C.; Rasnik, I.; Cheng, W.; Lohman, T. M.; Ha, T. *Biophys. J.* **2004,** *86,* 2530–2537. doi:10.1016/S0006-3495(04)74308-8
2. Sindbert, S.; Kalinin, S.; Nguyen, H.; Kienzler, A.; Clima, L.; Bannwarth, W.; Appel, B.; Müller, S.; Seidel, C. A. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2011,** *133,* 2463–2480. doi:10.1021/ja105725e
3. Börjesson, K.; Preus, S.; El-Sagheer, A.-H.; Brown, T.; Albinsson, B.; Wilhelmsson, L. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2009,** *131,* 4288–4293. doi:10.1021/ja806944w
4. Marras, S. A. E. *Mol. Biotechnol.* **2008,** *38,* 247–255. doi:10.1007/s12033-007-9012-9
5. Sapsford, K. E.; Berti, L.; Medintz, I. L. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006,** *45,* 4562–4588. doi:10.1002/anie.200503873
6. Sahoo, H. *J. Photochem. Photobiol., C* **2011,** *12,* 20–30. doi:10.1016/j.jphotochemrev.2011.05.001
7. Lavis, L. D.; Raines, R. T. *ACS Chem. Biol.* **2008,** *3,* 142–155. doi:10.1021/cb700248m
8. Waegele, M. M.; Culik, R. M.; Gai, F. *J. Phys. Chem. Lett.* **2011,** *2,* 2598–2609. doi:10.1021/jz201161b
9. Dziuba, D.; Postupalenko, V. Y.; Spadafora, M.; Klymchenko, A. S.; Guérineau, V.; Mély, Y.; Benhida, R.; Burger, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2012,** *134,* 10209–10213. doi:10.1021/ja3030388
10. Jose, J.; Burgess, K. *Tetrahedron* **2006,** *62,* 11021–11037. doi:10.1016/j.tet.2006.08.056
11. Fowler, S. D.; Greenspan, P. *J. Histochem. Cytochem.* **1985,** *33,* 833–836. doi:10.1177/33.8.4020099
12. Greenspan, P.; Mayer, E. P.; Fowler, S. D. *J. Cell Biol.* **1985,** *100,* 965–973. doi:10.1083/jcb.100.3.965
13. Sackett, D. L.; Wolff, J. *Anal. Biochem.* **1987,** *167,* 228–234. doi:10.1016/0003-2697(87)90157-6
14. Varghese, R.; Gajula, P. K.; Chakraborty, T. K.; Wagenknecht, H.-A. *Synlett* **2009,** 3252–3257. doi:10.1055/s-0029-1218384
15. Varghese, R.; Wagenknecht, H.-A. *Chem. – Eur. J.* **2010,** *16,* 9040–9046. doi:10.1002/chem.201001136
16. Beyer, C.; Wagenknecht, H.-A. *Chem. Commun.* **2010,** *46,* 2230–2231. doi:10.1039/b924471a
17. Okamoto, A.; Tainaka, K.; Fujiwara, Y. *J. Org. Chem.* **2006,** *71,* 3592–3598. doi:10.1021/jo060168o
18. Prokhorenko, I. A.; Dioubankova, N. N.; Korshun, V. A. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* **2004,** *23,* 509–520. doi:10.1081/NCN-120028344
19. Wenge, U.; Ehrenschwender, T.; Wagenknecht, H.-A. *Bioconjugate Chem.* **2013,** *24,* 301–304. doi:10.1021/bc300624m
20. Varghese, R.; Wagenknecht, H.-A. *Org. Biomol. Chem.* **2010,** *8,* 526–528. doi:10.1039/b918381g
21. Varghese, R.; Wagenknecht, H.-A. *Chem. – Eur. J.* **2009,** *15,* 9307–9310. doi:10.1002/chem.200901147
22. Lachmann, D.; Berndl, S.; Wolfbeis, O. S.; Wagenknecht, H.-A. *Beilstein J. Org. Chem.* **2010,** *6,* No. 13. doi:10.3762/bjoc.6.13
23. Wittung, P.; Kim, S. K.; Buchardt, O.; Nielsen, P.; Nordén, B. *Nucleic Acids Res.* **1994,** *22,* 5371–5377. doi:10.1093/nar/22.24.5371
24. Dilek, I.; Madrid, M.; Singh, R.; Urrea, C. P.; Armitage, B. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2005,** *127,* 3339–3345. doi:10.1021/ja045145a
25. Armitage, B. A. *Top. Curr. Chem.* **2005,** *253,* 55–76. doi:10.1007/b100442
26. Vilaivan, T.; Srisuwannaket, C. *Org. Lett.* **2006,** *8,* 1897–1900. doi:10.1021/ol060448q
27. Vilaivan, C.; Srisuwannaket, C.; Ananthanawat, C.; Suparpprom, C.; Kawakami, J.; Yamaguchi, Y.; Tanaka, Y.; Vilaivan, T. *Artificial DNA: PNA XNA* **2011,** *2,* 50–59. doi:10.4161/adna.2.2.16340
28. Mansawat, W.; Vilaivan, C.; Balázs, Á.; Aitken, D. J.; Vilaivan, T. *Org. Lett.* **2012,** *14,* 1440–1443. doi:10.1021/ol300190u
29. Boonlua, C.; Vilaivan, C.; Wagenknecht, H.-A.; Vilaivan, T. *Chem. – Asian J.* **2011,** *6,* 3251–3259. doi:10.1002/asia.201100490
30. Boonlua, C.; Ditmangklo, B.; Reenabthue, N.; Suparpprom, C.; Poomsuk, N.; Siriwong, K.; Vilaivan, T. *RSC Adv.* **2014,** *4,* 8817–8827. doi:10.1039/c3ra47997h
31. Ditmangklo, B.; Boonlua, C.; Suparpprom, C.; Vilaivan, T. *Bioconjugate Chem.* **2013,** *24,* 614–625. doi:10.1021/bc3005914
32. Sezi, S.; Varghese, R.; Vilaivan, T.; Wagenknecht, H.-A. *ChemistryOpen* **2012,** *1,* 173–176. doi:10.1002/open.201200016
33. Meldal, M.; Tornøe, C. W. *Chem. Rev.* **2008,** *108,* 2952–3015. doi:10.1021/cr0783479

34. Gramlich, P. M. E.; Wirges, C. T.; Manetto, A.; Carell, T. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008,** *47,* 8350–8358. doi:10.1002/anie.200802077
35. Amblard, F.; Cho, J. H.; Schinazi, R. F. *Chem. Rev.* **2009,** *109,* 4207–4220. doi:10.1021/cr9001462
36. El-Sagheer, A. H.; Brown, T. *Chem. Soc. Rev.* **2010,** *39,* 1388–1405. doi:10.1039/b901971p
37. Briggs, M. S. J.; Bruce, I.; Miller, J. N.; Moody, C. J.; Simmonds, A. C.; Swann, E. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1997,** 1051–1058. doi:10.1039/a605012c
38. Jose, J.; Burgess, K. *J. Org. Chem.* **2006,** *71,* 7835–7839. doi:10.1021/jo061369v
39. Chen, Q.-y.; Li, D.-h.; Yang, H.-h.; Zhu, Q.-z.; Xu, J.-g.; Zhao, Y. *Analyst* **1999,** *124,* 901–906. doi:10.1039/a901174i
40. Zhao, G.-C.; Zhu, J.-J.; Chen, H.-Y.; Wang, X.-M.; Lu, Z.-H. *Chin. J. Chem.* **2002,** *20,* 57–62. doi:10.1002/cjoc.20020200112
41. Magde, D.; Brannon, J. H.; Cremers, T. L.; Olmsted, J., III. *J. Phys. Chem.* **1979,** *83,* 696–699. doi:10.1021/j100469a012
42. Okamoto, A.; Ichiba, T.; Saito, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2004,** *126,* 8364–8365. doi:10.1021/ja049061d
43. Reenabthue, N.; Boonlua, C.; Vilaivan, C.; Vilaivan, T.; Suparpprom, C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011,** *21,* 6465–6469. doi:10.1016/j.bmcl.2011.08.079
44. Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. *Org. Lett.* **2004,** *6,* 2853–2855. doi:10.1021/ol0493094

License and Terms

This is an Open Access article under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/2.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The license is subject to the *Beilstein Journal of Organic Chemistry* terms and conditions: (http://www.beilstein-journals.org/bjoc)

The definitive version of this article is the electronic one which can be found at: doi:10.3762/bjoc.10.224

RSC Advances

COMMUNICATION

Pyrrolidinyl peptide nucleic acids immobilised on cellulose paper as a DNA sensor†

Nuttapon Jirakittiwut, Nattawadee Panyain, Thanesuan Nuanyai,‡ Tirayut Vilaivan and Thanit Praneenararat*

Cite this: *RSC Adv.*, 2015, **5**, 24110

Received 26th November 2014
Accepted 26th February 2015

DOI: 10.1039/c4ra15287e

www.rsc.org/advances

A new label-free DNA sensor based on pyrrolidinyl peptide nucleic acid on cellulose paper was fabricated. Coupled with straightforward signal detection by cationic dye staining, this sensor has promise as a robust tool for point-of-care DNA detection.

The development of field diagnostics for developing countries remains a challenge that has gained much interest from researchers around the world. In this regard, paper-based analytical devices are of much interest due to several superior properties of cellulose paper such as low cost and biocompatibility.[1] Pioneered by the Whitesides group in the form of paper-based microfluidic devices,[2–4] several types of paper-based sensors have since fabricated, leading to various applications such as whole cell biosensors,[5] or the sensor capable of multiple determinations of metals.[6,7] Notably, most of these devices used cellulose merely as a platform for physical adsorption of chemical species, whereas covalent immobilisation could allow detection of species that would otherwise be impossible due to the poor retention of the involving counterparts in cellulose material. A notable example includes a study by Yu *et al.* who demonstrated that divinyl sulfone (DVS) could be used to attach various biomolecules having varying retention on cellulose and utilise them as probes.[8] This paved the way for more economical sensors that can detect various biomolecules including DNA, whose detection can lead to diverse applications such as clinical diagnosis or the detection of pathogens.[9] Note, however, that DNA as a probe for another DNA strand is subject to enzymatic degradation. Therefore, means to improve the stability, as well as specificity and selectivity, of DNA probes are still desired.

Peptide nucleic acid (PNA),[10] a synthetic DNA mimic, has been extensively studied as a probe for DNA detection due to several advantages including higher binding affinity of PNA–DNA over DNA–DNA, and much greater resistance to enzymatic degradation. This has sparked interest from researchers to utilise PNAs, mostly in the original scaffold called aminoethylglycyl PNA (aegPNA), as probes in a number of sensors with great performance in many aspects such as sensitivity, specificity and robustness.[11–14]

During the past few years, our group has developed a new class of pyrrolidinyl PNAs, a conformationally rigid PNA. Our pyrrolidinyl PNA consists of a D-prolyl-2-aminocyclopentanecarboxylic acid (acpc) backbone (Fig. 1).[15,16] This relatively more rigid structure was shown to exhibit certain desirable properties over aegPNA, while maintaining comparable overall binding affinity and sequence specificity. These advantages include the stronger directional preference for antiparallel binding and the higher affinity towards DNA over RNA. Encouraged by the aforementioned features, we have showcased the utility of this PNA as DNA probes in a number of applications.[17–21]

In the current study, we aimed to immobilise acpcPNA by covalently attaching the PNA onto cellulose paper, and utilising it as a probe for DNA detection. After DNA incubation by capillary method[22] and washing, we demonstrated that cationic organic dyes could be used to visualise the binding between

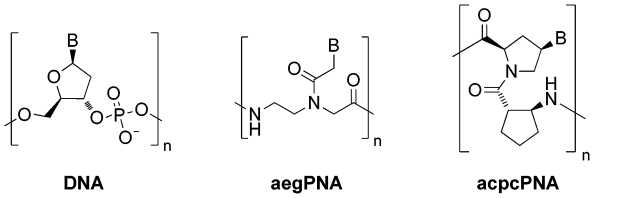


Fig. 1 Chemical structures of DNA, aegPNA, and acpcPNA. B stands for nucleobases (A, T, C, and G).

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Rd., Pathumwan, Bangkok, 10330, Thailand. E-mail: Thanit.P@chula.ac.th

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c4ra15287e

‡ Present address: Faculty of Liberal Arts, Rajamangala University of Technology Rattanakosin, Wang Klai Kangwon Campus, Huanhin, Prachuap Khiri Khan, Thailand, 77110.

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2015

PNA and DNA by electrostatic interaction between the dye and the bound negatively charged DNA (Fig. 2). By combining the relatively low cost of cellulose paper, and the performance of acpcPNA as a DNA probe, we envisioned that this new DNA sensor could have promise as an economical point-of-care DNA testing device.

The fabrication of the sensor commenced with selecting an appropriate chemistry for covalent immobilisation of acpcPNA *via* an appended lysine residue at the N- or C-termini. The hydroxyl group at C-6 position of the glucose monomer in cellulose is the most common site for functional group interconversion,[23] as it has been used as a "gateway" to attach various chemical scaffolds[8,18,22,24–26] leading to diverse applications ranging from combinatorial synthesis (SPOT and macroarray synthesis)[27] to the immobilisation of biomolecules for sensor construction purposes.[8,22,26] For the ultimate goal of naked-eye detection, we found that not all commonly used chemical reactions are equally suitable, as some attachment methods produced false-positive signal from PNA alone (without the presence of DNA – data not shown). Hence, we conducted a preliminary screening and found that divinyl sulfone (DVS) is a suitable attachment method and thus we decided to immobilise acpcPNA by this chemistry (Scheme 1).[8]

Thereafter, some experiments to prove that the PNA was really covalently attached on the cellulose support were needed. We confirmed the success of attachment by immobilising a fluorescein-labelled PNA onto cellulose (Fig. S1 – see ESI†). After thorough washing, it was found that the PNA with prior incubation of cellulose with DVS showed significantly higher fluorescence intensity than that without DVS incubation. This indirectly confirmed that the covalent attachment has occurred and is required for PNA retention on the paper. Also, we conducted another preliminary test by immobilising unlabelled PNA onto support, followed by incubation with fluorescently labelled DNA. We found that only the complementary DNA could be retained on support after extensive washing, confirming that the immobilised PNA is still capable of exerting Watson–Crick base pairing with the DNA (Fig. S2†). An

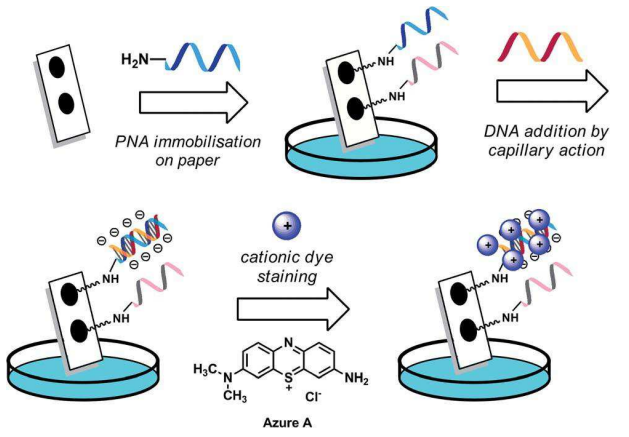
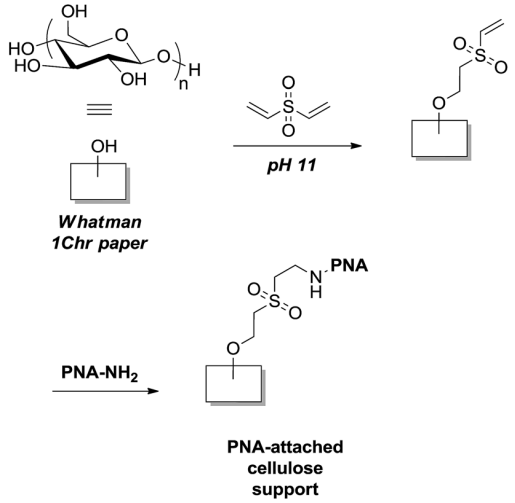


Fig. 2 The fabrication of the new DNA sensor by covalently attaching acpcPNA onto cellulose paper, followed by cationic dye staining.



Scheme 1 The immobilisation of acpcPNA by DVS-mediated conjugate addition of acpcPNA onto support.

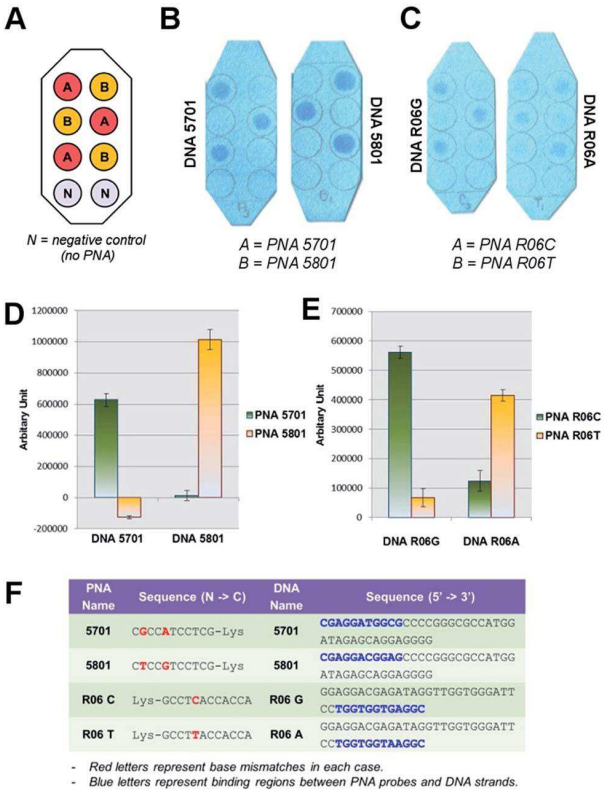
additional experiment where we varied the concentration (amount) of incubated DNA showed that the fluorescence signals, as quantified by the software ImageJ, had a logarithm relationship with the amount of bound DNA, roughly following the Langmuir isotherm (Fig. S3†).

Aiming to avoid labelling of the DNA samples,[22] a third component that enables visualisation of the PNA–DNA binding event in a label-free and preferably instrument-free fashion is desired.[12,26] Encouraged by the preliminary results, we screened for methods that allow detection of binding between unlabelled PNA and DNA. We envisaged that the difference of charges between PNA (no charge) and DNA (negatively charged at physiological pH) could provide a unique opportunity for detection – a method that would not be plausible with DNA or other DNA analogues as a probe. Indeed, this feature has been utilised before by Kim *et al.* where they used positively-charged gold nanoparticle with signal enhancement to allow naked-eye detection of aegPNA–DNA binding.[12] Unfortunately, this method did not work well in our condition, likely because of the drastic difference between the surfaces used in each study. We then focused on known, positively-charged, fluorescent dyes for DNA detection including ethidium bromide and SYBR gold, and found that none of them could give appreciable signal. Subtle molecular effects may influence this outcome and we are actively investigating this phenomenon with other cationic fluorescent dyes. Consequently, we turned our attention to optical cationic dyes that can be directly visualised by naked eyes. After some screening, thiazine dyes – a class of molecular biology staining agents including the commonly known methylene blue – was shown to be an appropriate visualising agent. Preliminary tests revealed that Azure A (structure shown in Fig. 2) showed the best staining profile among dyes tested (see details in ESI†). Hence, we selected this dye for the subsequent studies.

As a preliminary study of the new experimental setup, we studied the effect of the length of incubated DNAs and the

orientation of the binding region to better understand the nature of this detection method. Fig. S4† showed the effect of the total length of DNA on signal intensity. It should be noted that longer DNA strands are expected to provide stronger signal since they gave more accessible sites for dye binding. In our case, the shortest DNA among the three in this study did give the lowest signal intensity. On the contrary, the longest DNA strand gave approximately the same signal intensity as the one with the second longest length, likely due to the saturation of signal. We decided to choose the DNA with the second longest length (41 nucleotides) for our subsequent experiments. Furthermore, we studied the effect of the expected binding orientation on the signal intensity, with the hypothesis that the "wrong" orientation where extra bases are forced to clash with the surface should lead to unfavourable interactions with both the probe and the dye, leading to reduced signal intensity. As shown in Fig. S5,† the wrong orientation (DNA "C") gave lowest signal intensity as anticipated.

After gaining some basic understanding of the system, we proceeded to showcase the utility of this sensor by applying it to detect DNA sequences that were derived from real biological settings. Extra hanging sequences were appended to either the 3′ or 5′ end of the synthetic DNA targets to mimic the detection of real DNA samples. It should be noted that phenothiazine dyes bind electrostatically to both duplex and single-stranded DNAs,[28] therefore the extra hanging bases should contribute to the dye adsorption.[12] First, we attempted to detect the binding of DNA sequences in human leukocyte antigen (HLA) alleles. HLA alleles such as HLA-B*5701 and HLA-B*5801 used in this study were found to have strong correlation with various forms of cutaneous adverse drug reactions.[29,30] Therefore, the ability to screen patients for such genes would greatly reduce the risk associated with the prescription of relevant drugs. Another case was about the detection of a single-gene disorder thalassaemia. Codon 26 mutation (R06 G → A) is a cause of β-thalassaemia and the ability to detect this single-base mutation could be very useful for prenatal diagnosis and treatment.[31] As shown in Fig. 3B, our detection system could unambiguously distinguish sequences with double mismatches (HLA-B*5701 *vs.* 5801). Notably, since sheets of paper can be scanned by a commercial scanner, images obtained could be used for further processing by imaging software (ImageJ) to produce some quantitative data. Fig. 3D showed a representative graph illustrating that our DNA sensing device could clearly differentiate related DNA sequences, as objectively confirmed by the Student's *t*-test of the obtained numerical data. In the case of single mismatched DNAs (R06C and T), the Student's *t*-test still suggested that values from the two DNA sequences differ with statistical significance. Nevertheless, it was more obvious by naked eyes that the mismatch DNA also gave significant false-positive signal. In order to solve this issue, we found that a more stringent washing (20% acetonitrile in PBS buffer) after the DNA incubation could efficiently remove this non-specific binding, albeit with a slight compromise of signal intensity (Fig. 3C and E). In addition, we also tested the performance of the sensing system in the presence of various interferences. First, the 5701/5801 DNA sensor was tested again with the



F

PNA Name	Sequence (N -> C)	DNA Name	Sequence (5' -> 3')
5701	CGCCATCCTCG-Lys	5701	CGAGGATGGCGCCCCGGGCGCCATGG ATAGAGCAGGAGGGG
5801	CTCCGTCCTCG-Lys	5801	CGAGGACGGAGCCCCGGGCGCCATGG ATAGAGCAGGAGGGG
R06 C	Lys-GCCTCACCACCA	R06 G	GGAGGACGAGATAGGTTGGTGGGATT CCTGGTGGTGAGGC
R06 T	Lys-GCCTTACCACCA	R06 A	GGAGGACGAGATAGGTTGGTGGGATT CCTGGTGGTAAGGC

- *Red letters represent base mismatches in each case.*
- *Blue letters represent binding regions between PNA probes and DNA strands.*

Fig. 3 (A) Layout of the paper-based DNA sensor; (B) and (C) the scanned images of DNA sensors for HLA-B*5701/5801, and R06 C/T, respectively. Each sheet was subject to DNA incubation of one sequence while each spot contained one PNA sequence as outlined in the figure; (D) and (E) signal intensities (HLA-B*5701/5801 and R06 C/T, respectively) derived from scanned images *via* the ImageJ image processing software. (F) The table showing all PNA and DNA sequences used in this study. All experiments were performed in triplicates of triplicates at the DNA concentration of 6 μM (100 pmol per spot).

presence of two non-relevant DNA sequences (R06G and A9). As shown in Fig. S6,† nearly the same results as in Fig 3B were obtained, confirming that the sensor is highly specific. Furthermore, we tested the performance of the 5801 system with the presence of nine other DNAs having varying lengths and sequences. The sensor again exhibited extremely good discrimination power by providing positive results only when the complementary sequence was present (Fig. S7†). Overall, the system could be applied with closely related DNA sequences with clear differentiation power, even with the presence of multiple DNA interferences. The ability to distinguish between complementary and single mismatch targets at ambient temperature highlights the benefits of the high specificity offered by pyrrolidinyl PNA probes.

Importantly, we also proved that an amino-linked DNA (aminohexyl group attached to 3′ end) with the same sequence as the HLA-B*5801 PNA probe used in this work did not provide significantly discernible signal. This is most likely due to the much lower binding affinity of the DNA probe (Fig. S8†). In fact,

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2015

it is common practice to use at least 20-nucleotide DNA as probes. Therefore, the cost of PNA (at the required length and amount) is not considered a significant addition to the overall cost of the sensor although the cost of PNA is about 20–25 times higher than that of DNA oligonucleotides. This further underscores the power of acpcPNA as a DNA probe. For the detection limit, we found the lowest detectable concentration of DNA to be about 200 nM or 3.3 pmol per spot (Fig. S9†). This value is comparable to the expected sensitivity of the DNA binding dye (~40 ng based on calculation *vs.* ~40–100 ng for Azure A and related dyes for gel-based detection of DNA)[32] with the advantages of high specificity and being a simple disposable system that requires no complicated instruments for performing the hybridization, detection, and signal analysis. As a comparison to our previous work,[18] the current sensor was found to exhibit greater resistance to signal interference when the sensor was incubated with a mixture of several DNA sequences (see above) with only one limitation of having lower sensitivity. This difference is attributed to the nature of the sensor chemical assembly, which aimed to provide a specific Watson–Crick interaction between PNA and DNA in the very first step, whereas the previous work[18] relied on non-specific electrostatic interaction as the binding site. In addition, an enzymatically generated colorimetric reaction was used as a means for signal amplification,[18] which should naturally lead to a lower detection limit. The results herein should therefore be considered as a promising system that can be further developed into a simple yet highly powerful DNA sensor.

Conclusions

We report herein the fabrication of a new DNA sensing device. This cellulose-based DNA sensor offers an economical way to detect DNA with great specificity. With low-cost fabrication and straightforward visual detection without requiring labelled samples nor strict temperature control, we envision that this new DNA sensor could become a robust tool for DNA detection in point-of-care testing. Further optimisation is being investigated in our laboratory to improve the sensitivity and allow label-free detection of double-stranded long DNA targets – this will be reported in due course.

Acknowledgements

This work is fully supported by the Thailand Research Fund (TRF – DBG5580007 and partially from DPG5780002) and the Ratchadapiseksompot Fund (Chulalongkorn University). The authors also acknowledge the Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University for instruments funding.

Notes and references

1 R. Pelton, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2009, **28**, 925–942.
2 A. W. Martinez, S. T. Phillips, M. J. Butte and G. M. Whitesides, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2007, **46**, 1318–1320.
3 A. W. Martinez, S. T. Phillips, G. M. Whitesides and E. Carrilho, *Anal. Chem.*, 2010, **82**, 3–10.
4 A. K. Yetisen, M. S. Akram and C. R. Lowe, *Lab Chip*, 2013, **13**, 2210–2251.
5 A. Struss, P. Pasini, C. M. Ensor, N. Raut and S. Daunert, *Anal. Chem.*, 2010, **82**, 4457–4463.
6 P. Rattanarat, W. Dungchai, D. M. Cate, W. Siangproh, J. Volckens, O. Chailapakul and C. S. Henry, *Anal. Chim. Acta*, 2013, **800**, 50–55.
7 P. Rattanarat, W. Dungchai, D. Cate, J. Volckens, O. Chailapakul and C. S. Henry, *Anal. Chem.*, 2014, **86**, 3555–3562.
8 A. Yu, J. Shang, F. Cheng, B. A. Paik, J. M. Kaplan, R. B. Andrade and D. M. Ratner, *Langmuir*, 2012, **28**, 11265–11273.
9 A. Sassolas, B. D. Leca-Bouvier and L. J. Blum, *Chem. Rev.*, 2008, **108**, 109–139.
10 P. Wittung, P. E. Nielsen, O. Buchardt, M. Egholm and B. Norden, *Nature*, 1994, **368**, 561–563.
11 O. Brandt, J. Feldner, A. Stephan, M. Schröder, M. Schnölzer, H. F. Arlinghaus, J. D. Hoheisel and A. Jacob, *Nucleic Acids Res.*, 2003, **31**, e119.
12 S. K. Kim, H. Cho, J. Jeong, J. N. Kwon, Y. Jung and B. H. Chung, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 3315–3317.
13 O. Brandt and J. D. Hoheisel, *Trends Biotechnol.*, 2004, **22**, 617–622.
14 N. Zhang and D. H. Appella, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 8424–8425.
15 C. Suparpprom, C. Srisuwannaket, P. Sangvanich and T. Vilaivan, *Tetrahedron Lett.*, 2005, **46**, 2833–2837.
16 T. Vilaivan and C. Srisuwannaket, *Org. Lett.*, 2006, **8**, 1897–1900.
17 B. Boontha, J. Nakkuntod, N. Hirankarn, P. Chaumpluk and T. Vilaivan, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 8178–8186.
18 P. S. Laopa, T. Vilaivan and V. P. Hoven, *Analyst*, 2013, **138**, 269–277.
19 S. Sankoh, S. Samanman, O. Thipmanee, A. Numnuam, W. Limbut, P. Kanatharana, T. Vilaivan and P. Thavarungkul, *Sens. Actuators, B*, 2013, **177**, 543–554.
20 T. Theppaleak, M. Rutnakornpituk, U. Wichai, T. Vilaivan and B. Rutnakornpituk, *J. Nanopart. Res.*, 2013, **15**, 2106.
21 S. Jampasa, W. Wonsawat, N. Rodthongkum, W. Siangproh, P. Yanatatsaneejit, T. Vilaivan and O. Chailapakul, *Biosens. Bioelectron.*, 2014, **54**, 428–434.
22 A. C. Araujo, Y. J. Song, J. Lundeberg, P. L. Stahl and H. Brumer, *Anal. Chem.*, 2012, **84**, 3311–3317.
23 S. C. Fox, B. Li, D. Q. Xu and K. J. Edgar, *Biomacromolecules*, 2011, **12**, 1956–1972.
24 D. Stollner, F. W. Scheller and A. Warsinke, *Anal. Biochem.*, 2002, **304**, 157–165.
25 M. Y. He and Z. H. Liu, *Anal. Chem.*, 2013, **85**, 11691–11694.
26 Y. J. Song, P. Gyarmati, A. C. Araujo, J. Lundeberg, H. Brumer and P. L. Stahl, *Anal. Chem.*, 2014, **86**, 1575–1582.
27 H. E. Blackwell, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2006, **10**, 203–212.
28 M. Ortiz, A. Fragoso, P. J. Ortiz and C. K. O'Sullivan, *J. Photochem. Photobiol., A*, 2011, **218**, 26–32.

29 S. Mallal, D. Nolan, C. Witt, G. Masel, A. M. Martin, C. Moore, D. Sayer, A. Castley, C. Mamotte, D. Maxwell, I. James and F. T. Christiansen, *The Lancet*, 2002, **359**, 727–732.

30 S. I. Hung, W. H. Chung, L. B. Liou, C. C. Chu, M. Lin, H. P. Huang, Y. L. Lin, J. L. Lan, L. C. Yang, H. S. Hong, M. J. Chen, P. C. Lai, M. S. Wu, C. Y. Chu, K. H. Wang, C. H. Chen, C. S. J. Fann, J. Y. Wu and Y. T. Chen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2005, **102**, 4134–4139.

31 P. Winichagoon, V. Saechan, R. Sripanich, C. Nopparatana, S. Kanokpongsakdi, A. Maggio and S. Fucharoen, *Prenatal Diagn.*, 1999, **19**, 428–435.

32 M. R. Green and J. Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4th edn., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2015

NANO LETTERS

Letter

pubs.acs.org/NanoLett

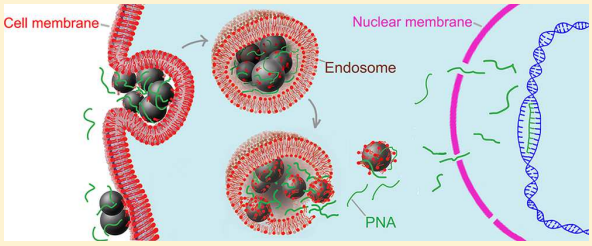
Bringing Macromolecules into Cells and Evading Endosomes by Oxidized Carbon Nanoparticles

Sunatda Arayachukiat,[†,○] Jiraporn Seemork,[‡,○] Porntip Pan-In,[§] Kittima Amornwachirabodee,[§] Naunpun Sangphech,[∥] Titiporn Sansureerungsikul,[§] Kamonluck Sathornsantikun,[§] Chotima Vilaivan,[§] Kazuki Shigyou,[⊥] Prompong Pienpinijtham,[§] Tirayut Vilaivan,[§] Tanapat Palaga,[∥] Wijit Banlunara,[¶] Tsutomu Hamada,[⊥] and Supason Wanichwecharungruang*[,§,▽]

[†]Macromolecular Science Program, Faculty of Science, Chulalongkorn University (CU), [‡]Program in Petrochemistry, Faculty of Science, CU, [§]Department of Chemistry, Faculty of Science, CU, [∥]Department of Microbiology, Faculty of Science, and Interdisciplinary Program in Medical Microbiology, CU, [⊥]School of Materials Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology (JAIST), [¶]Department of Pathology, Faculty of Veterinary Science, CU, [▽]Nanotec−CU Center of Excellence on Food and Agriculture, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

S *Supporting Information*

ABSTRACT: A great challenge exists in finding safe, simple, and effective delivery strategies to bring matters across cell membrane. Popular methods such as viral vectors, positively charged particles and cell penetrating peptides possess some of the following drawbacks: safety issues, lysosome trapping, limited loading capacity, and toxicity, whereas electroporation produces severe damages on both cargoes and cells. Here, we show that a serendipitously discovered, relatively nontoxic, water dispersible, stable, negatively charged, oxidized carbon nanoparticle, prepared from graphite, could deliver macromolecules into cells, without getting trapped in a lysosome. The ability of the particles to induce transient pores on lipid bilayer membranes of cell-sized liposomes was demonstrated. Delivering 12-base-long pyrrolidinyl peptide nucleic acids with D-prolyl-(1*S*,2*S*)-2-aminocyclopentanecarboxylic acid backbone (acpcPNA) complementary to the antisense strand of the NF-κB binding site in the promoter region of the *Il6* gene into the macrophage cell line, RAW 264.7, by our particles resulted in an obvious accumulation of the acpcPNAs in the nucleus and decreased *Il6* mRNA and IL-6 protein levels upon stimulation. We anticipate this work to be a starting point in a new drug delivery strategy, which involves the nanoparticle that can induce a transient pore on the lipid bilayer membrane.



KEYWORDS: *cellular penetration, lipid bilayer membrane, transient pore, nanoparticle, antigene, PNA, oxidized carbon particle*

Cell plasma membrane is the structure that not only separates the cell from its environment but also controls transports of all matters into and out of the cell. Various scientific investigations and therapeutic works require the transport of macromolecules such as antisense oligonucleotide, aptamer, siRNA, and peptides across the cell membrane.[1,2] Current popular approaches include the use of positively charged particles (lipid vesicles[3,4] and polymer particles[5,6]) and cell penetrating peptides.[7,8] Nevertheless, lysosome trapping, low transfection efficiency, toxicity, limited loading, and complicated preparation steps are drawbacks of these approaches.[9,10] Transporting gene by viral vectors, although is highly effective, faces a limited size of DNA fragment to be delivered and safety issues,[11] whereas physical stimuli such as electroporation produce damages on the cargoes and cells.[12] Therefore, a great challenge still exists in finding inexpensive, easy to use and effective delivery strategies to bring molecules across a cell membrane without being trapped in a lysosome.

Here, we propose the use of the negatively charged, oxidized carbon nanoparticles, serendipitously isolated and discovered during our preparation of graphene oxide sheets to bring biologically active substances across cell membrane. Using graphite as a starting material, we could reproducibly prepare negatively charged oxidized carbon particles with outstanding ability to penetrate lipid bilayer membrane and have named the obtained particles "membrane penetrating oxidized carbon nanoparticles" (MPOCs). This paper reports the preparation and characterization of the MPOCs and shows that MPOCs can facilitate the penetration of peptide nucleic acids across a cell membrane without being trapped in a lysosome. The membrane penetration mechanism of MPOCs is proposed. To clearly show that the MPOCs can be used as a simple and effective delivery vehicle to bring macromolecules into cells for

Received: February 19, 2015
Revised: April 1, 2015
Published: April 7, 2015

ACS Publications © 2015 American Chemical Society

DOI: 10.1021/acs.nanolett.5b00696
Nano Lett. 2015, 15, 3370−3376

biological applications, the paper demonstrates antigene function of peptide nucleic acid (PNA) delivered into cells by MPOCs.

Among several PNAs, pyrrolidinyl PNA with D-prolyl-(1*S*,2*S*)-2-aminocyclopentanecarboxylic acid backbone (acpcPNA, called PNA in this paper) demonstrates greater binding affinity and specificity to complementary DNAs than to complementary RNAs[13] and therefore is potentially useful in antigene application. Nevertheless, successful cellular delivery of acpcPNAs has never been reported. Here, using MPOCs, we show successful cellular delivery of the challenging acpcPNA into RAW 264.7 macrophage cell line and 293T human embryonic kidney cell line. We evaluated, using RAW 264.7 cells, the antigene property of acpcPNAs delivered into cells by MPOCs, focusing on the *Il6* gene expression. IL-6 is a multifaceted cytokine involved in both innate and adaptive immune responses. Dysregulation of IL-6 expression is linked to chronic inflammation and autoimmune diseases. Reports have shown that the promoter region of the *Il6* gene possesses a conserved binding site for the NF-κB transcription factor[14] and inhibition of NF-κB binding can suppress transcription of *Il6*.[15,16] Here, we selected the 12-bp DNA sequence, at the binding site of NF-κB in the *Il6* promoter (between −74 and −63),[17] as the target and synthesized the acpcPNAs complementary to this antisense sequence (here denoted as $PNA_{NF\kappa B}$). We then investigated the anti-*Il6* action of $PNA_{NF\kappa B}$ through the monitoring of both *Il6*-mRNA and IL-6 protein levels.

Preparation and Characterization of MPOCs. When graphite powder (99.9999% purity from Alfa Aesar, Johnson Matthey Company, Lancashire, U.K., or 98.5% purity from Thai Carbon and Graphite Co., Ltd., Bangkok, Thailand) were vigorously oxidized under sonication, carbon materials of different sizes and shapes, for example, tubes, sheets, spheres, and irregular-shaped particulates, could be observed by scanning electron microscope (SEM). Multistep-centrifugation could successively pellet down other carbon allotropes and resulted in an aqueous suspension of mostly MPOCs. The MPOCs dispersed well in water and possessed an average hydrodynamic size around 37.7 ± 4.6 nm when freshly sonicated. The particle size then quickly increased to an average size of 225 ± 57 nm (Figure 1). The water dispersible aggregated particles could be easily redispersed back into smaller particles upon sonication. SEM and transmission electron microscopic (TEM) images of the freshly sonicated suspensions also showed semispherical morphology of ∼40 nm particles, whereas analysis of the three-month-old-suspensions showed significant amounts of ∼100−300 nm particles and the observed large particles were aggregates of smaller ones (Figure 1). Sonicating these three-month-old suspensions resulted in smaller numbers of large particles (Supporting Information, Figure S1). The aqueous suspension of MPOCs showed no precipitation after being kept still for more than 3 years at 23−35 °C (room temperature). Zeta potentials of MPOCs in water and phosphate buffer saline of pH 7.4 were −40.96 ± 5.25 and −30.97 ± 2.06 mV, respectively. The particles could also be dispersed well in methanol, ethanol, *N*,*N*-dimethylformamide, dimethyl sulfoxide, ethyl acetate, and Dulbecco's modified Eagle medium (Supporting Information, Figure S2).

Elemental analysis of different batches of MPOCs gave similar C:O:H mass ratio at (mean ± SD) 47.35 ± 5.41:42.56 ± 2.52:2.62 ± 0.26, which corresponded to the C:O:H molar ratio around 1.0:0.68:0.66. SEM-energy dispersive X-ray

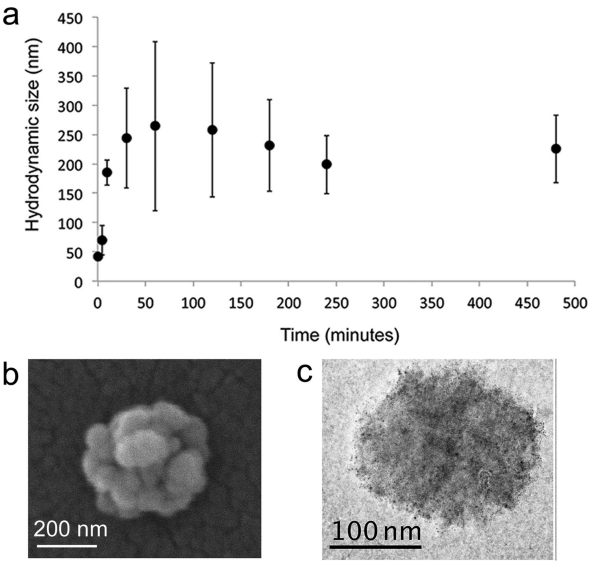


Figure 1. Size and morphology of MPOC. Hydrodynamic size distributions (shown as mean ± SD) of MPOCs at various postsonication times (a). SEM (b) and high resolution TEM (c) images of MPOCs.

spectroscopic analysis could also detect C and O throughout the particles. ATR-FTIR and X-ray photoelectronic spectroscopic (XPS) analyses (Supporting Information, Figure S3) indicated a presence of C—O—C, C═C, C—C, C—OH and COOH functionalities in MPOCs. Raman spectrum of the particles revealed two strong broad absorption bands at 1360 cm^{-1} (D band, in-plane vibration of disordered planar (sp^2) bonded carbons, finite shape planar (sp^2) bonded carbons, tetrahedral (sp^3) carbons) and 1590 cm^{-1} (G band, vibration of in-plane planar (sp^2) bonded carbons), and weak broad absorption bands at 2500−3400 cm^{-1} with three maxima at 2720, 2920, and 3200 cm^{-1} (2D or G′ band of disordered planar (sp^2) planes). The D band was always bigger than the G band. The broad D-band and G-band implied that the carbon networks in the MPOCs were in various orientations and possessed various bond strengths. The three broad 2D bands were likely a result of different interlayer interactions that occurred at different depths within the MPOCs. It should be noted here that the multiple 2D bands and the high intensity D band make the Raman spectrum of MPOCs different from those of graphene, graphite, nanocrystalline diamond, single-walled carbon nanotube, double-walled carbon nanotube and multiple-walled carbon nanotube, but quite similar to that of graphene oxide.[18−20] The lack of 1462 cm^{-1} absorption indicated the absence of C60 (buckyball) in the MPOCs.[21]

Thermo-gravitational analysis of the MPOCs showed fast weight losses at 80−120 and 180−240 °C, corresponded to the loss of water followed with particle degradation. Although light scattering of the MPOCs suspension could not be subtracted out, UV−visible absorption spectrum of the suspension showed broad absorption with a maximum at 227 nm. X-ray diffraction pattern of MPOCs showed no sharp peak, indicating that the crystallinity of the graphite was not preserved in MPOCs (Supporting Information, Figure S3). We conclude that MPOCs are 40 nm oxidized carbon nanoparticles containing planar carbon planes, disordered planar carbon planes and tetrahedral carbons with C═C, C═O, COOH and OH

DOI: 10.1021/acs.nanolett.5b00696
Nano Lett. 2015, 15, 3370−3376

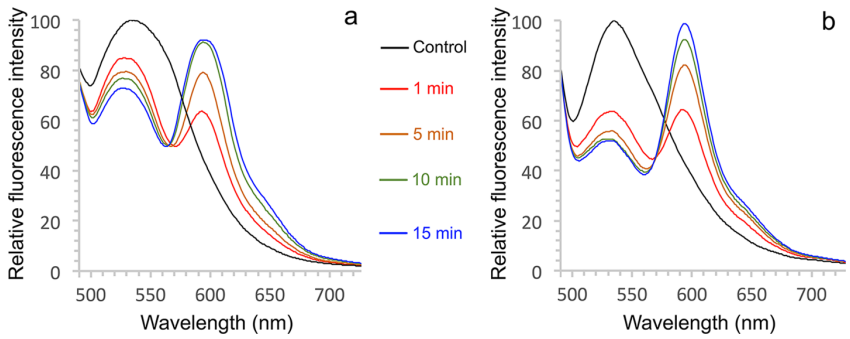


Figure 2. Monitoring the interaction between MPOCs and lipid bilayer membrane of the cell-sized liposome using FRET technique. Fluorescence emission of the aqueous suspensions of donor-containing liposomes after being incubated with free acceptor lipids (a) and acceptor lipid-loaded MPOCs (b) for 1, 5, 10, and 15 min. Aqueous suspensions of donor liposomes alone or that mixed with MPOCs were used as control in graphs a and b, respectively.

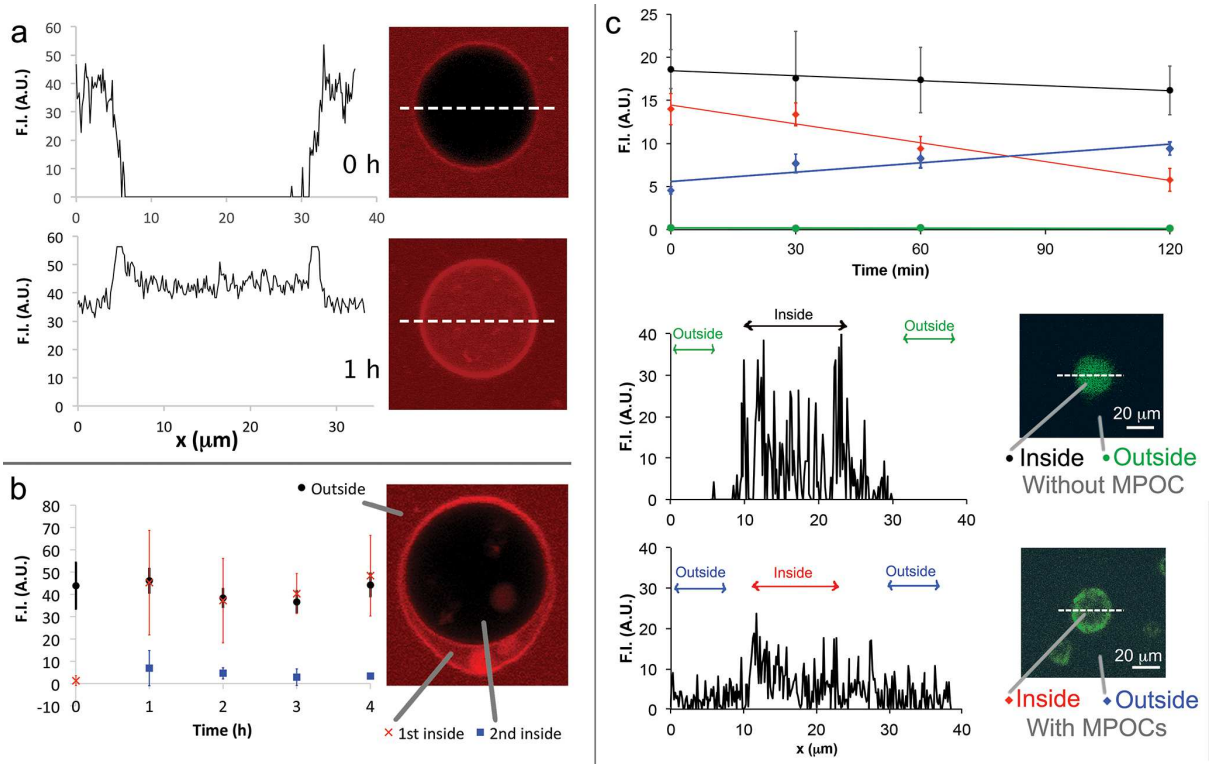


Figure 3. Liposome penetration. (A) Plots of fluorescence intensity (F.I.) of $MPOC_{RhB}$ along the white dashed line of the corresponding liposome (on the right), at 0 and 1 h incubation of the liposome suspension with $MPOC_{RhB}$. (B) A plot of F.I. of $MPOC_{RhB}$ at the outside, inside the first and the second layers, of the double layer liposomes (representative picture on the right) as a function of incubation time of liposomes and $MPOC_{RhB}$ (shown as mean ± SD, obtained from more than 20 liposomes). (C) A plot of anthocyanin F.I. at the inside and outside of the anthocyanin filled liposomes after water addition (without MPOC) or MPOC addition (with MPOCs), as a function of time (shown as mean ± SD, obtained from more than 10 liposomes from independent experiments; representative intensities at 60 min time point of both conditions are shown at the bottom together with representative pictures of liposomes on the right).

functionalities. The particles can undergo reversible aggregation to give a broad size distribution of around 200−300 nm in water.

Cellular Uptake of MPOC. Incubation the $MPOC_{TAMRA}$, the MPOCs covalently linked with 5(6)-carboxytetramethylrhodamine ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ of 561/595 nm), with human epidermoid cervical carcinoma cell line (CaSki), mouse macrophage cell line (RAW 264.7) and A549 human lung adenocarcinoma cells (A549) resulted in obvious cellular uptake of the $MPOC_{TAMRA}$ (Supporting Information, Figure S4). In addition, the three cell lines showed complete survival when treated with 10 ppm $MPOC_{TAMRA}$ (highest concentration tested). We conclude that $MPOC_{TAMRA}$ can get into those cells and the particles are not toxic to the cells under the condition used.

Monitoring the Interaction between MPOCs and Lipid Bilayer Membrane by Förster Resonance Energy Trans-

DOI: 10.1021/acs.nanolett.5b00696
Nano Lett. 2015, 15, 3370−3376

fer (FRET) Using Cell-Sized Liposomes. We first prepared liposomes in which their lipid bilayer membranes contained a fluorescent donor (*N*-[6-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)-amino]hexanoyl]-phytosphingosine or C6NBD, $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 470/530 nm). We next loaded a fluorescent acceptor (1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-(lissamine rhodamine B sulfonyl), $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 550/600 nm) onto the MPOCs (weight ratio of MPOC: fluorescent acceptor of $1.0{:}3.84 \times 10^{-4}$). Complete adsorption of the acceptor on MPOCs was achieved. An ability of the acceptors on the MPOCs and that of the free acceptors to quench the emission of the donors in the liposomes was monitored through the decrease in donor emission accompanied by the increase in acceptor emission. It was clearly observed that the quenching was more quickly and more pronounced when the acceptors were loaded on MPOCs (Figure 2). Because the efficiency of this long-range dipole−dipole quenching is inversely proportional to the sixth power of the distance between donor and acceptor and usually can be detected when the distance does not exceed 10 nm, we conclude that MPOCs can facilitate a close association between the loaded acceptors and the donors in the liposome membrane.

Penetration of MPOCs into Cell-Sized Liposome. Next, we investigated the penetration of MPOCs across lipid bilayer membrane by incubating $MPOC_{RhB}$, the MPOCs covalently linked with Rhodamine B (RhB, $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ of 470−495/510−550 nm), with cell-sized liposomes. Through the fluorescence of RhB, we observed that $MPOC_{RhB}$ moved toward the surface of the liposomes instantly after mixing (Figure 3a, 0 h). At the beginning the $MPOC_{RhB}$ emission intensity at the inside of the liposome was undetectable. However, after 30 min incubation, $MPOC_{RhB}$ emission intensity at the inside of the liposome was comparable to that at the outside (Figure 3a, 1 h). The result implied that $MPOC_{RhB}$ interacted with the lipid bilayer membrane and penetrated into the interior of the liposomes. The fluorescence signals in the liposomes mostly appeared noncompartmentalized, indicating that the main penetration mechanism was not through an endocytic deformation of the membrane. We did observe some endocytic deformation of the liposomes and some compartmentalized fluorescence signals inside the liposomes, but very minor comparing to the diffusion of the noncompartmentalized fluorescence signals into the interior of the liposomes. In the case of double layer liposomes, signals of the $MPOC_{RhB}$ was observed at the surface of the outer lipid bilayer membrane quickly after incubation, and later at first layer interior of the liposomes (Figure 3b). This indicated the penetration of $MPOC_{RhB}$ across the first membrane layer. During the 4 h experiment, the second layer interior of the liposomes was never fully filled with $MPOC_{RhB}$ emission. This indicated that after penetrating the first membrane layer, the $MPOC_{RhB}$ could not effectively penetrate the second membrane layer.

We speculated that the penetration of MPOCs might occur through a transient pore formation at the lipid bilayer membrane. To prove this, we investigated an ability of MPOCs to leak anthocyanin (a water-soluble fluorescent dye) out of the liposomes. We first prepared liposomes filled with anthocyanin then monitored the fluorescence of the anthocyanin at the interior and exterior of the liposomes upon an addition of MPOCs into the liposome suspension. Anthocyanin signals at the exterior of the liposome could be detected only when MPOCs were added to the liposome suspension. More specifically, when MPOCs were added, the signal of anthocyanin inside the liposomes decreased with incubation time while the signal of anthocyanin outside the liposomes increased with incubation time (Figure 3c). Adding water to the anthocyanin-filled liposome could not induce such leak. This indicated a continuous leakage of anthocyanin from the liposomes when MPOCs were added to the outside of the liposomes. The result agrees with our speculation that MPOCs can generate pores on lipid bilayer membrane of the liposomes. It is, therefore, concluded that anthocyanin molecules move out of the liposome through the transient pores generated on the lipid bilayer membrane by the MPOCs.

Lipid Adsorption on MPOCs. We speculated that the migration of phospholipid molecules from the bilayer membrane to the MPOC surface, was responsible for the pore formation on the membrane. Therefore, we evaluated an ability of MPOCs to adsorb phospholipids at pH 7.4 and 5.5. The result indicated that MPOCs could adsorb lipids at both pH conditions but adsorption at pH 5.5 was greater than at pH 7.4 (Supporting Information, Figure S5). It should be noted here that the zeta potential values of the MPOCs are -30.97 ± 2.06 mV and -33.31 ± 1.80 mV in pH 7.4 and 5.5 buffers, respectively. To further investigate the involvement of lipid adsorption on the pore generation, we tested an ability of phospholipid-loaded MPOCs to penetrate lipid bilayer membrane of the cell-sized liposomes. When the 2 to 1 (by weight) phospholipid/$MPOC_{RhB}$ mixture was incubated with cell-sized liposomes, rhodamine fluorescence signals could be observed inside the liposomes. However, when the 10 to 1 (by weight) phospholipid/$MPOC_{RhB}$ mixture was incubated with cell-sized liposomes, rhodamine fluorescence signals could not at all be observed inside the liposomes. The results imply that a high amount of phospholipid on the MPOC surface can suppress the lipid bilayer membrane penetration ability of the particles. This excellent ability of MPOCs to adsorb phospholipids also agreed well with the above FRET result and our observation that the MPOCs always instantly moved to the surface of the liposomes. All these results suggest that MPOC possesses high phospholipid affinity, and the particle's ability to induce leakage on lipid bilayer membrane may involves its phospholipid adsorption. It should be noted here that this is not the first report on the interaction between carbon-based materials and lipid bilayer membrane. An ability to situate themselves at the lipid bilayer membrane of carbon nanotubes (CNT) and oxidized CNT has been demonstrated earlier.[22−24] Pore formation on lipid bilayer membrane by carbon based material, however, has been demonstrated only with carbon black particles in which the femto-second laser pause was needed to assist their pore formation.[25]

Using the obtained results, we explain the ability of MPOCs to penetrate only the first membrane layer, not the second membrane layer, of the double layer liposomes (Figure 3b) as follows: pore formation at the first membrane layer by MPOCs resulted in lipid-adsorbed MPOCs inside the first layer of the liposomes, and lipids on the MPOCs surface prevented the particles to significantly adsorb more lipids from the second membrane layer, thus inhibiting further pore induction.

Cellular Delivery of PNA by MPOC. Next, we used MPOCs to leak PNAs into cells to perform antigene function. The binding site of NF-κB transcription factor is between −75 and −63 in the promoter of *Il6* gene[17] and the sequence between −74 to −63 (GGGATTTTCCCA) was selected as the antigene target site. We synthesized two 12mer PNAs, one with the sequence specific to the antisense strand of the binding site

DOI: 10.1021/acs.nanolett.5b00696
Nano Lett. 2015, 15, 3370−3376

of NF-κB transcription factor ($PNA_{NFκB}$) and the other with a random sequence (PNA_{random}). Also we fluorescently labeled the two PNAs with fluorescein (Flu): $PNA_{NFκB\text{-}flu}$, and $PNA_{random\text{-}flu}$.

Cytotoxicity of $PNA_{NFκB}$, MPOCs and the mixture of $PNA_{NFκB}$ and MPOCs, was investigated quantitatively by MTT assay in RAW 264.7 cells at up to 10.0 μg/mL MPOCs and 100 nM $PNA_{NFκB}$, and the result indicated no toxicity under our experimental conditions (Supporting Information, Figure S6).

Next we investigated the cellular uptake and localization of the $PNA_{NFκB\text{-}flu}$, in the presence and absence of $MPOC_{TAMRA}$, by RAW 264.7 cells. CLFM images of the cells incubated with $PNA_{NFκb\text{-}flu}$ for 4 h (Figure 4 row 2) showed no signals of

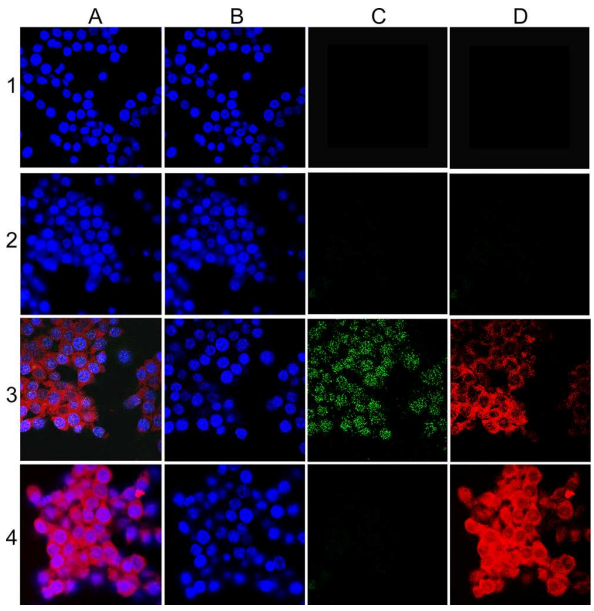


Figure 4. Cellular delivery of PNAs by MPOCs. Confocal fluorescence images of RAW 264.7 cells after being incubated with water (row 1), $PNA_{NFκb\text{-}flu}$ (row 2), $PNA_{NFκb\text{-}flu}$ plus $MPOC_{TAMRA}$ (row 3), and $MPOC_{TAMRA}$ (row 4). Images, as the original (column A) or separated (columns B–D), show the fluorescence signals indicating nucleus in blue (column B), PNAs in green (column C), and MPOCs in red (column D).

$PNA_{NFκb\text{-}flu}$ in the cells, indicating that without $MPOC_{TAMRA}$, $PNA_{NFκb\text{-}flu}$ could not significantly penetrate into cells. Intense signals from $PNA_{NFκB\text{-}flu}$ inside the nuclei, intense signals from $MPOC_{TAMRA}$ in the cytoplasm of the cells incubated with $PNA_{NFκb\text{-}flu}$ plus $MPOC_{TAMRA}$ (Figure 4 row 3), implied effective delivery of $PNA_{NFκb\text{-}flu}$ into the cells by $MPOC_{TAMRA}$, and accumulation of the $PNA_{NFκb\text{-}flu}$ and $MPOC_{TAMRA}$ in the nuclei and cytoplasm, respectively. Noted that cells incubated with only $MPOC_{TAMRA}$ (without PNAs) also showed the uptake of the particles (Figure 4 row 4). Similar results were observed for $PNA_{random\text{-}flu}$ (Supporting Information, Figure S7). We further confirmed the ability of MPOCs to deliver the PNAs in another cell line. Comparing to the commercially available reagent, FuGENE-HD (positively charged liposome), using flow cytometry, MPOCs showed significantly higher efficiency in delivering PNAs into the 293T human embryonic kidney (HEK293T) cells (Supporting Information, Figure S8). It should be noted that using MPOCs as carriers is simple and requires no organic solvent since MPOC is water dispersible (ethanol is needed for the lipid-based FuGENE-HD).

Endosome Evasion and Lysosome Avoidance. Next, we investigated the cellular trafficking by incubating the RAW 264.7 cells with $PNA_{NFκb\text{-}flu}$ mixed with coumarin-labeled MPOCs ($MPOC_{Cou}$) and monitoring the living cells under confocal laser fluorescence microscope (CLFM). Endosomes and lysosomes were tracked with early endosome and lysosome specific dyes. The same location of fluorescence signals from $PNA_{NFκb\text{-}flu}$, $MPOC_{Cou}$, and endosome specific dye, was observed after 30 min postincubation, implying that the $PNA_{NFκb\text{-}flu}$ and $MPOC_{Cou}$ were in the endosomes (Figure 5

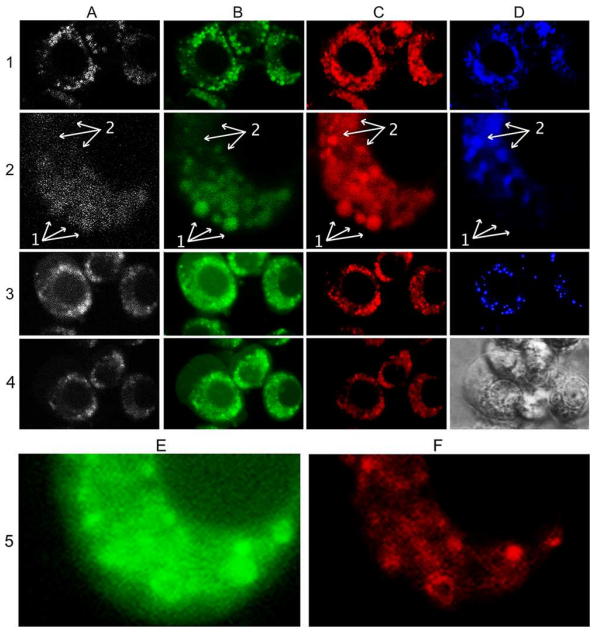


Figure 5. Endosome evasion of MPOCs. CLFM images of RAW 264.7 cells after being incubated with $PNA_{NFκb\text{-}flu}$ plus $MPOC_{Cou}$ for 40 (row 1 and 2), 105 (row 3), and 210 (row 4 and 5) min. Signals from $MPOC_{Cou}$ (column A), $PNA_{NFκb\text{-}flu}$ (column B), early endosome (column C) and lysosome (column D row 1, 2, and 3), are shown in white, green, red, and blue, respectively. Cell morphology at 210 min is shown in column D of row 4. Row 2 is an expansion of row 1: arrow 1 indicates colocalization of MPOC/PNA/endosome; arrow 2 indicates colocalization of endosomes/lysosomes. 5E and 5F are expansions of 4B and 4C, respectively.

and Supporting Information Video). Interestingly, signals from lysosomes did not colocalize with signals from the endosomes that contained $PNA_{NFκb\text{-}flu}/MPOC_{Cou}$ (arrow 1, Figure 5 row 2), indicating that the endosomes filled with $PNA_{NFκb\text{-}flu}$ and $MPOC_{Cou}$ were not merging with lysosomes. Noted that a normal merging of lysosomes with the endosomes that contained no $PNA_{NFκb\text{-}flu}/MPOC_{Cou}$ could still be observed (arrow 2, Figure 5 row 2). Here the emission from the lysosome specific dye started to fade at ≈150 min, and throughout the 150 min observation, no merging of lysosome and $PNA_{NFκb\text{-}flu}/MPOC_{Cou}$-containing endosome was observed. After 90 min incubation, obvious fluorescence signals from $PNA_{NFκb\text{-}flu}$ and $MPOC_{Cou}$ could be observed throughout the cytoplasm and nucleus. These late observed signals appeared noncompartmentalized and did not colocalize with the signals

DOI: 10.1021/acs.nanolett.5b00696
Nano Lett. 2015, 15, 3370–3376

from endosome/lysosome specific dyes, thus implying the leak of $PNA_{NFκb\text{-}flu}$ and $MPOC_{Cou}$ from some of the endosomes or the degradation of some of the endosomes. The leakage of the endosomes and the disruption of the endosomes together with the diffusion of $PNA_{NFκb\text{-}flu}$ all over the cells were very obvious at 210 min postincubation (Figure 5 row 4). The result implies that a presence of MPOCs in the endosome not only can induce endosome leakage, but can also prevent the fusion between such endosome and a lysosome.

Although in the liposome experiments above, penetration of MPOCs via endocytic deformation of the membrane was quite minor comparing to the penetration via transient pores, the result in the cell culture clearly indicated that the majority of the $PNA_{NFκb\text{-}flu}$ and $MPOC_{Cou}$ were taken up into the cells via endocytosis. In the liposome experiment, we observed the instant binding of the MPOCs to the lipid bilayer membrane, whereas the penetration usually took at least 15−30 min longer. Therefore, it was likely that in the cell culture, MPOCs also quickly bound to the cell membrane, and the binding induced endocytic uptakes of the $PNA_{NFκb\text{-}flu}/MPOC_{Cou}$ into the cells before the pores were formed. Therefore, we explain the results as follows: $PNA_{NFκb\text{-}flu}$-loaded $MPOC_{Cou}$ bound the cell membrane and a majority of $PNA_{NFκb\text{-}flu}$-loaded $MPOC_{Cou}$ entered the cells by endocytosis. The $MPOC_{cou}$ inside the endosomes continued the pore generation process and finally could successfully induce pores on the compartments, resulting the leakage of $PNA_{NFκb\text{-}flu}$ and $MPOC_{Cou}$ from the endosomes into the cytoplasm observable at approximately 90 min postincubation (Figure 5 rows 4 and 5, Supporting Information Video). Some $PNA_{NFκb\text{-}flu}$ and $MPOC_{Cou}$ might leak into the cells via transient pores on the cell membrane, but it is very minor compared to those that entered via the endosomes. The increase in acidity of the endosomes during their maturation should also increase the phospholipid adsorption capacity of MPOCs and might contribute to a more efficient induction of endosome leakage. It should be noted here that the time required for MPOCs to generate pores in the real cells was significantly longer than in the liposomes (endosome leakage was observed at approximately 90 min postincubation, whereas liposome penetration was observed at 15−30 min post-incubation). The different lipid bilayer membrane composition between liposomes and cells is likely one of many factors contribute to this discrepancy.

Antigene Action. Next we investigated the gene silencing function of the $PNA_{NFκB}$ delivered into the cells by MPOCs. We incubated RAW 264.7 cells with each tested sample (PNA_{random} and $PNA_{NFκB}$ either alone or with MPOCs), stimulated the cells with lipopolysaccharide (LPS) plus murine recombinant interferon gamma (rmIFN-γ), then monitored the amount of *Il6* mRNA by the quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) (Figure 6a) and amount of IL-6 protein by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Figure 6b). The result showed that without MPOC, the presence of the two PNAs did not affect *Il6* mRNA level. Under the unstimulated condition, MPOCs (5.0 mg/L) caused a small increase in the level of *Il6* mRNA. It was possible that at the concentration used, MPOCs could mildly stimulate *Il6* mRNA expression. Elucidation on this point is, however, beyond the scope of this report. Comparing between the cells treated with $PNA_{random}/MPOCs$ and those treated with $PNA_{NFκB}/MPOCs$, the latter showed 70% less increase of *Il6* mRNA level upon LPS/rmIFN-γ stimulation (Figure 6a). Thus, when delivered into cells by MPOCs, only the $PNA_{NFκB}$,

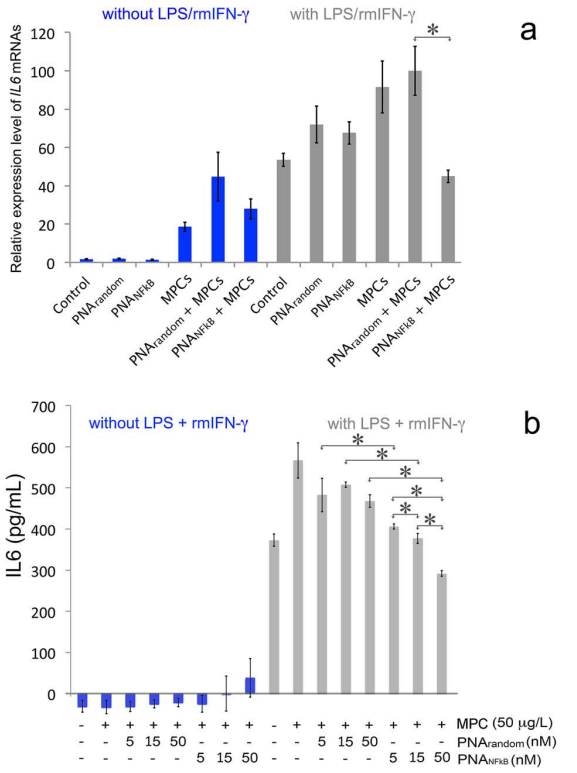


Figure 6. Interfering with *Il6* expression in vitro. A) Relative expression levels of *Il6* mRNA obtained when incubated RAW 264.7 cells (4×10^5 cells/mL) with various samples (control = water), under unstimulated (without LPS and rmIFN-γ) and stimulated (with LPS and rmIFN-γ) conditions, determined at the MPOC and PNA concentrations of 5 mg/L and 500 nM (2.1 μg/mL), respectively. B) Amounts of IL-6 proteins obtained when incubated RAW 264.7 cells with various samples under unstimulated (without LPS and rmIFN-γ) and stimulated (with LPS and rmIFN-γ) conditions. Data are shown as the mean ±1 standard deviation and a star indicates the statistical significant difference between the two samples, as determined by one way ANOVA Duncan at $P < 0.05$.

and not the PNA_{random}, could suppress the transcription of *Il6* gene. This antigene action of $PNA_{NFκB}$ was further confirmed at the translation level.

As shown in Figure 6b, a presence of 50 μg/L of MPOCs did not significantly affect the IL-6 protein level. It should be noted that the optimized MPOC concentration used here (50 μg/L) was lower than that used in the above transcription experiment. In the presence of MPOCs, only the PNA_{NFkB}, not the PNA_{random}, could suppress IL-6 production upon LPS/rmIFN-γ stimulation in a dose dependent manner. The result agreed well with the decreased *Il6* mRNA level in the above experiment. We conclude that the $PNA_{NFκB}$ delivered into cells by MPOCs can suppress the *Il6* gene transcription, resulting in the decreases in *Il6* mRNA and IL-6 protein levels. It is likely that the open-up of the actively transcribed *Il6* gene under LPS/rmIFN-γ stimulation should theoretically allow the access and binding of the PNA_{NFkB} to this targeted gene. In addition, the possibility of the 12 base long PNA_{NFkB} to bind to the open-up *Il6* gene, not to other genes in the chromatin, should also be increased under the stimulated condition.[26]

In conclusion (Supporting Information, Figure S9), here we introduce the "particle-induced transient pore on lipid bilayer

DOI: 10.1021/acs.nanolett.5b00696
Nano Lett. 2015, 15, 3370−3376

membrane" strategy to deliver bioactive molecules into cells without getting trapped in a lysosome. Synthesis and characterization of oxidized carbon particles with membrane penetrating property (called membrane penetrating carbon oxide nanoparticles or MPOCs) are shown. The mechanism of pore formation and how the MPOCs evade endosome are included. Using this delivery strategy, we show an ability of the acpcPNA to block gene transcription under a stimulated condition. This work, thus, kindles the particle-induced transient pore strategy to deliver matters across lipid bilayer membranes. We also anticipate applications of (i) MPOC as a delivery vector with endosome evasion property and (ii) acpcPNA as a potential antigene agent.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Figures S1−S9, Materials and methods, Cellular trafficking video. This material is available free of charge via the Internet at http://pubs.acs.org.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: psupason@chula.ac.th.

Author Contributions

○These authors contributed equally.

The manuscript was written through contributions of all authors.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Tatsuya Murakami at Japan Advanced Institute of Science and Technology for XPS analysis, and the Olympus Bioimaging Center at Mahidol University for fluorescence recording of live-cells. This work was financially supported by the Grant for Chula Research Scholar from the Ratchadapiseksompot Fund from Chulalongkorn University (CU), the CU 90th anniversary fund, Advance material cluster (RES 560530097), Nanotec-CU Center of Excellence on Food and Agriculture, and the Thailand Research Fund (DPG5780002), Thailand; MEXT KAKENHI (Nos. 25104510 and 26103516) and the Kao Foundation for Arts and Sciences, Japan. J.S. is funded by CU Dutsadiphiphat Scholarship, and P.P.-I. is funded by postdoctoral fellowship from CU.

■ REFERENCES

(1) De Rosa, G.; La Rotonda, M. I. *Molecules* **2009**, *14*, 2801−2823.

(2) Devi, G. R. *Cancer Gene Ther.* **2006**, *13*, 819−829.

(3) Akinc, A.; Zumbuehl, A.; Goldberg, M.; Leshchiner, E. S.; Busini, V.; Hossain, N.; Bacallado, S. A.; Nguyen, D. N.; Fuller, J.; Alvarez, R.; Borodovsky, A.; Borland, T.; Constien, R.; de Fougerolles, A.; Dorkin, J. R.; Narayanannair Jayaprakash, K.; Jayaraman, M.; John, M.; Koteliansky, V.; Manoharan, M.; Nechev, L.; Qin, J.; Racie, T.; Raitcheva, D.; Rajeev, K. G.; Sah, D. W. Y.; Soutschek, J.; Toudjarska, I.; Vornlocher, H.-P.; Zimmermann, T. S.; Langer, R.; Anderson, D. G. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 561−569.

(4) Falsini, S.; Ciani, L.; Ristori, S.; Fortunato, A.; Arcangeli, A. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 1138−1146.

(5) Boussif, O.; Lezoualc'h, F.; Zanta, M. A.; Mergny, M. D.; Scherman, D.; Demeneix, B.; Behr, J. P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1995**, *92*, 7297−7301.

(6) Islam, M. A.; Park, T. E.; Singh, B.; Maharjan, S.; Firdous, J.; Cho, M. H.; Kang, S. K.; Yun, C. H.; Choi, Y. J.; Cho, C. S. *J. Controlled Release* **2014**, *193*, 74−89.

(7) Copolovici, D. M.; Langel, K.; Eriste, E.; Langel, U. *ACS Nano* **2014**, *8*, 1972−1994.

(8) Jones, A. T.; Sayers, E. J. *J. Controlled Release* **2012**, *161*, 582−591.

(9) Merkel, O. M.; Beyerle, A.; Beckmann, B. M.; Zheng, M.; Hartmann, R. K.; Stöger, T.; Kissel, T. H. *Biomaterials* **2011**, *32*, 2388−2398.

(10) Shiraishi, T.; Nielsen, P. E. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 633−636.

(11) Somia, N.; Verma, I. M. *Nat. Rev. Genet.* **2000**, *1*, 91−99.

(12) Lakshmanan, S.; Gupta, G. K.; Avci, P.; Chandran, R.; Sadasivam, M.; Jorge, A. E. S.; Hamblin, M. R. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2014**, *71*, 98−114.

(13) Vilaivan, T.; Srisuwannaket, C. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1897−1900.

(14) Libermann, T. A.; Baltimore, D. *Mol. Cell. Biol.* **1990**, *10*, 2327−2334.

(15) Grigoriev, M.; Praseuth, D.; Robin, P.; Hemar, A.; Saison-Behmoaras, T.; Dautry-Varsat, A.; Thuong, N. T.; Hélène, C.; Harel-Bellan, A. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 3389−3395.

(16) Vickers, T. A.; Griffith, M. C.; Ramasamy, K.; Risen, L. M.; Freier, S. M. *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 3003−3008.

(17) Ray, A.; Tatter, S. B.; May, L. T.; Sehgal, P. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1988**, *85*, 6701−6705.

(18) Kim, H. J.; Lee, S. M.; Oh, Y. S.; Yang, Y. H.; Lim, Y. S.; Yoon, D. H.; Lee, C.; Kim, J. Y.; Ruoff, R. S. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 5176.

(19) Dresselhaus, M. S.; Dresselhaus, G.; Saito, R.; Jorio, A. *Phys. Rep.* **2005**, *409*, 47−99.

(20) Bandow, S.; Takizawa, M.; Hirahara, K.; Yudasaka, M.; Iijima, S. *Chem. Phys. Lett.* **2001**, *337*, 48−54.

(21) Bethune, D. S.; Meijer, G.; Tang, W. C.; Rosen, H. J.; Golden, W. G.; Seki, H.; Brown, C. A.; de Vries, M. S. *Chem. Phys. Lett.* **1991**, *179*, 181−186.

(22) Corredor, C.; Hou, W. C.; Klein, S. A.; Moghadam, B. Y.; Goryll, M.; Doudrick, K.; Westerhoff, P.; Posner, J. D. *Carbon* **2013**, *60*, 67−75.

(23) Geng, J.; Kim, K.; Zhang, J.; Escalada, A.; Tunuguntla, R.; Comolli, L. R.; Allen, F. I.; Shnyrova, A. V.; Cho, K. R.; Munoz, D.; Wang, Y. M.; Grigoropoulos, C. P.; Ajo-Franklin, C. M.; Frolov, V. A.; Noy, A. *Nature* **2014**, *514*, 612−615.

(24) Liu, L.; Yang, C.; Zhao, K.; Li, J.; Wu, H. C. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2989.

(25) Chakravarty, P.; Qian, W.; El-Sayed, M. A.; Prausnitz, M. R. *Nat. Nanotechnol.* **2010**, *5*, 607−611.

(26) Janowski, B. A.; Kaihatsu, K.; Huffman, K. E.; Schwartz, J. C.; Ram, R.; Hardy, D.; Mendelson, C. R.; Corey, D. R. *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 210−215.

DOI: 10.1021/acs.nanolett.5b00696
Nano Lett. 2015, 15, 3370−3376

Carbohydrate Polymers 131 (2015) 80–89

Contents lists available at ScienceDirect

Carbohydrate Polymers

journal homepage: www.elsevier.com/locate/carbpol

Quaternized chitosan particles as ion exchange supports for label-free DNA detection using PNA probe and MALDI-TOF mass spectrometry

Jittima Meebungpraw[a,b], Oraphan Wiarachai[c], Tirayut Vilaivan[d], Suda Kiatkamjornwong[e], Voravee P. Hoven[d,*]

[a] Program in Petrochemistry and Polymer Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Pathumwan, Bangkok 10330, Thailand
[b] Center of Excellence on Petrochemical and Materials Technology, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Pathumwan, Bangkok 10330, Thailand
[c] Program in Petrochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Pathumwan, Bangkok 10330, Thailand
[d] Organic Synthesis Research Unit, Department of Chemistry, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Pathumwan, Bangkok 10330, Thailand
[e] Department of Imaging and Printing Technology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Pathumwan, Bangkok 10330, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:
Received 9 January 2015
Received in revised form 20 May 2015
Accepted 20 May 2015
Available online 29 May 2015

Keywords:
Chitosan
Pyrrolidinyl peptide nucleic acid
Quaternary ammonium group
MALDI-TOF mass spectrometry
DNA sequence analysis

ABSTRACT

Quaternized chitosan particles are introduced as anion-exchanged captures to be used with a conformationally constrained pyrrolidinyl peptide nucleic acid (*acpc*PNA) and MALDI-TOF mass spectrometry for DNA sequence analysis. Methylated chitosan (MC) and methylated *N*-benzyl chitosan (MBzC) particles were obtained by heterogeneous chemical modification of ionically cross-linked chitosan particles via direct methylation and reductive benzylation/methylation, respectively. *N,N,N*-trimethylchitosan (TMC) and *N*-[(2-hydroxyl-3-trimethylammonium)propyl]chitosan chloride (HTACC) particles were prepared by ionic cross-linking of quaternized chitosan derivatives, homogeneously modified from chitosan, namely TMC and HTACC, respectively. The particles formed had a size in a sub-micrometer range and possessed positive charge. Investigation by MALDI-TOF mass spectrometry suggested that some quaternized particles in combination with *acpc*PNA were capable of detecting a single mismatched base out of 9–14 base DNA sequences. Potential application of this technique for the detection of wild-type and mutant K-*ras* DNA, a gene that mutation is associated with certain cancers, has also been demonstrated.
© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Chitosan is a natural polymer derived by partial deacetylation of chitin – a substance abundantly found in the exoskeletons of insects, the shells of crustaceans, and fungal cell walls. Due to the presence of ammonium groups in the structure, chitosan can form a stable complex with DNA in the solution having a pH range of 2–7 (Hayatsu, Kubo, Tanaka, & Negishi, 1997) and extract DNA with very high extraction efficiency (63–92%) even in complex DNA samples such as human genomic DNA from whole blood samples (Cao, Easley, Ferrance, & Landers, 2006). The hydrophilic sugar-based structure of chitosan ensures low non-specific binding–mainly through hydrophobic interactions – with other non-DNA components such as proteins and other interfering samples. These, together with the fact that the ammonium groups of chitosan can be converted into various quaternary ammonium entities prompts us to develop into an effective capture for negatively charged DNA that may be applicable for DNA sequence analysis.

Peptide nucleic acid (PNA), a neutral-peptide backbone DNA mimic firstly developed by Nielsen and co-workers (Egholm, Buchardt, Nielsen, & Berg, 1992; Nielsen, Egholm, Berg, & Buchardt, 1991), has a great potential to be used as a probe for DNA biosensor. The hybrid formed between PNA and its complementary DNA is more stable than the corresponding DNA·DNA hybrid due to the absence of electrostatic repulsion between negative charges along the phosphate backbone existing in the DNA structure (Sassolas, Leca-Bouvier, & Blum, 2007). Recently, a conformationally restricted pyrrolidinyl PNA based on D-prolyl-2-aminocyclopentane-carboxylic acid backbones (*acpc*PNA) was introduced by Vilaivan and co-workers. This PNA system possessed higher binding affinity and sequence specificity toward DNA than that of Nielsen's PNA, and with a much stronger preference for the antiparallel binding mode (Ananthanawat, Vilaivan, Hoven, & Su, 2010; Suparpprom, Srisuwannaket, Sangvanich, & Vilaivan, 2005; Vilaivan & Srisuwannaket, 2006). The powerful discrimination for single mismatched DNA makes *acpc*PNA a potential candidate for the development of highly effective DNA biosensors, which has

* Corresponding author. Tel.: +66 2218 7627; fax: +66 2218 7598.
E-mail address: vipavee.p@chula.ac.th (V.P. Hoven).

http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.05.043
0144-8617/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

been continuously proven for both labeling (Boonlua, Vilaivan, Wagenknecht, & Vilaivan, 2011; Maneelun & Vilaivan, 2013; Mansawat, Boonlua, Siriwong, & Vilaivan, 2012; Rashatasakhon, Vongnam, Siripornnoppakhun, Vilaivan, & Sukwattanasinitt, 2012; Reenabthue, Boonlua, Vilaivan, Vilaivan, & Suparpprom, 2011) and non-labeling techniques (Ananthanawat, Hoven, Vilaivan, & Su, 2011; Ananthanawat, Vilaivan, & Hoven, 2009; Ananthanawat, Vilaivan, Mekboonsonglarp, & Hoven, 2009; Jampasa et al., 2014; Sankoh et al., 2013; Theppaleak, Rutnakornpituk, Wichai, Vilaivan, & Rutnakornpituk, 2013a, 2013b; Thipmanee et al., 2012).

Recently, a simple label-free DNA sensing platform which relied on distinct electrostatic properties of *acpc*PNA and DNA was developed for analysis of single nucleotide polymorphism and food adultery detection (Boontha, Nakkuntod, Hirankarn, Chaumpluk, & Vilaivan, 2008). Because PNA is an electrostatically neutral molecule, it cannot be captured by a positively charged anion-exchanger unless hybridized with its complementary DNA target. The captured PNA can then be detected by MALDI-TOF MS (Boontha et al., 2008; Theppaleak et al., 2013a, 2013b) or alternatively by enzyme-mediated colorimetric detection (Laopa, Vilaivan, & Hoven, 2013). In this assay, the crude DNA products obtained after PCR can be used directly without prior purification and the analysis can be performed at room temperature under non-stringent conditions. Besides the satisfactory binding properties and specificity of the PNA probe, the success of this approach should also depend upon the physical properties of the anion exchanger, especially the ability to prevent non-specific adsorption of the unhybridized PNA. Q-sepharose, a commercially crosslinked agarose particles bearing quaternary ammonium groups (Boontha et al., 2008), and quaternized poly(dimethylamino)ethyl methacrylate -grafted cellulose paper (Laopa et al., 2013) or magnetic nanoparticles (Theppaleak et al., 2013a, 2013b) were previously used as solid support for the DNA capture. From material science perspective, the issue related to chemical functionality and hydrophobicity/hydrophilicity of the anion exchanger on the DNA capturing is also worth to be explored and has not yet been addressed in previous investigations.

Here in this research, we synthesized and compared the efficiency of modified-chitosan particles as anion exchangers for PNA-based detection of DNA by MALDI-TOF mass spectrometry. Two routes for the preparation of quaternized chitosan particles were performed. The first route is based on heterogeneous chemical modification of ionically cross-linked chitosan particles via direct methylation and reductive benzylation/methylation that yielded methylated chitosan (MC), methylated *N*-benzyl chitosan (MBzC) particles, respectively. The second route is based on ionic cross-linking of quaternized chitosan derivatives, homogeneously modified from chitosan, namely *N,N,N*-trimethylchitosan (TMC) and *N*-[(2-hydroxyl-3-trimethylammonium)propyl]chitosan chloride (HTACC) that gave TMC and HTACC particles, respectively. Synthetic methodology of both routes is outlined in Scheme 1. It is anticipated that this research should open up a new direction for chitosan applications in the area of biosensors in the format, to the best of our knowledge, that has never been reported.

2. Materials and methods

2.1. Materials

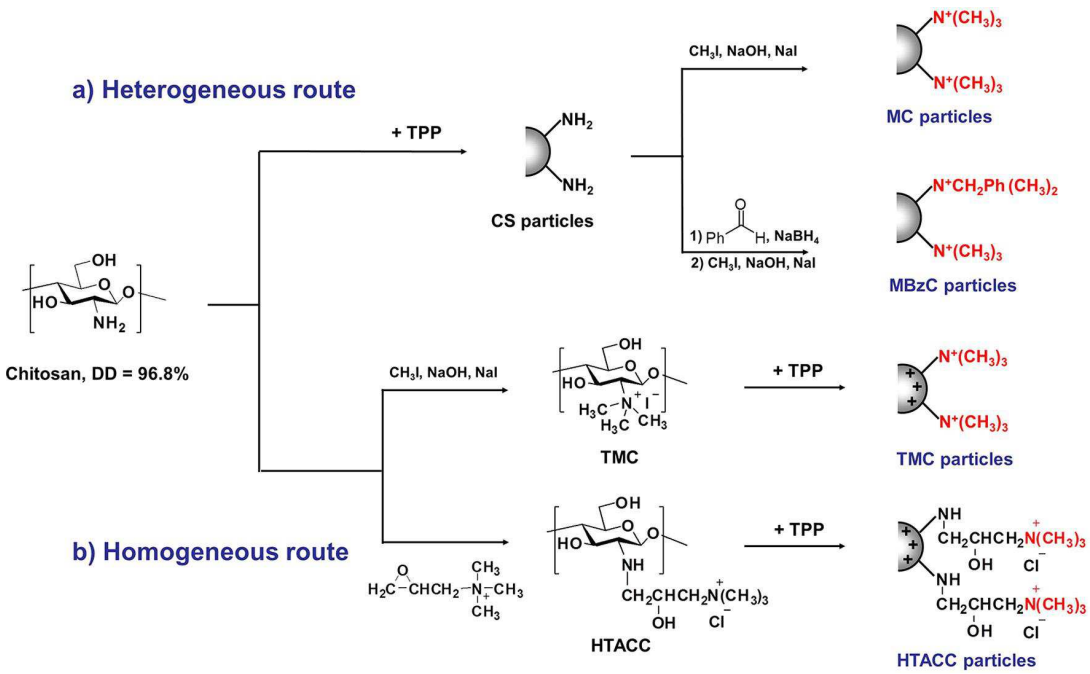
Chitosan flake (M_V = 45,000 Da) was purchased from Seafresh Chitosan (Lab) Co., Ltd (Thailand). Degree of deacetylation (%DD) of chitosan calculated based on ^{1}H NMR data (shown in Fig. S1 and Table S1 in Supplementary Data) was 96.8%. Acetaldehyde, methyl iodide (CH_3I), sodium borohydride ($NaBH_4$), sodium hydroxide (NaOH), sodium iodide (NaI), and sodium tripolyphosphate (TPP) were obtained from Fluka (Switzerland). Acetic acid, benzaldehyde, *N*-methylpyrrolidone (NMP), and methanol (MeOH) were purchased from Merck (Germany). Glycidyltrimethylammonium chloride (GTMAC) was obtained from Fluka (Switzerland). Genomic DNA from *Escherichia coli* strain B type VIII was obtained from Sigma (USA). PNAs were synthesized manually by solid phase peptide synthesis on TentaGel S RAM resin (Fluka) preloaded with Fmoc-L-Lys(Boc)-OPfp (Calbiochem Novabiochem Co., Ltd., USA) following the procedure described earlier (Vilaivan & Srisuwannaket, 2006). The identity of the PNAs was verified by MALDI-TOF mass spectrometry (Bruker Daltonik GmbH, Germany). Oligonucleotides were purchased from Bioservice Unit, National Science and Technology Development Agency (Thailand). All reagents and materials are analytical grade and used without further purification. Ultrapure distilled water was obtained after purification using a Millipore Milli-Q system (USA) that involves reverse osmosis, ion exchange, and a filtration step.

2.2. Preparation of quaternized chitosan particles by heterogeneous route

Chitosan (CS) particles were fabricated using TPP as a cross-linking agent according to the method reported by Qi, Xu, Jiang, Hu, and Zou (2004). Two types of quaternized chitosan particles, namely methylated *N*-benzyl chitosan (MBzC) and methylated chitosan (MC) particles were prepared following the method reported by Wiarachai, Thongchul, Kiatkamjornwong, and Hoven (2012). An anhydrous methanol solution of 1.0 M benzaldehyde (10 mL) was added into a flask containing the chitosan particles (0.03 g). After stirring for 4 h at room temperature, $NaBH_4$ (0.3 g, 8.0 mmol) was added into the reaction mixture and the solution was stirred for 24 h. The resulting *N*-benzyl chitosan particles were then isolated by centrifugation at 12,000 rpm for 30 min. The supernatant was discarded and the particles were centrifugally washed three times as above with methanol and then dried in vacuo. Methylation was then performed by an addition of anhydrous methanol solution (10 mL) of NaI (0.30 g, 2 mmol) and NaOH (0.13 g, 3.3 mmol) into the flask containing the *N*-benzyl chitosan particles (0.03 g) followed by CH_3I (2.0 M, 3.1 mL) via a syringe. The reaction mixture was stirred at 50 °C for 12 h and then the MBzC particles obtained were isolated and purified as above. MC particles, on the other hand, were prepared by direct methylation of the CS particles as follows. Anhydrous methanolic solution (10 mL) of NaOH (0.13 g, 3.3 mmol) and NaI (0.30 g, 2.0 mmol) was added into a flask containing chitosan particles (0.05 g), followed by an addition of CH_3I (0.4 mL, 6.4 mmol). The same portion of CH_3I was added after the mixture was stirred for 4 h at 50 °C. The reaction was allowed to proceed for another 4 h under the same condition. The synthesized MC particles were then isolated by the same procedure as described above.

2.3. Preparation of quaternized chitosan particles by homogeneous route

TMC was synthesized according to a modified method of Domard, Rinaudo, and Terrassin (1986). Chitosan (2.0 g) was dispersed in 80 mL of NMP followed by adding NaOH (0.81 g, 0.02 mol) and NaI (1.51 g, 0.01 mol). CH_3I (4.32 g, 0.03 mol) was added to the reaction mixture which was then stirred magnetically at 40 °C for 4 h. An additional portion of CH_3I was then added to the mixture and the reaction was allowed to proceed for another 4 h under the same condition. The final product was precipitated using acetone and isolated by centrifugation at 12,000 rpm for 30 min. The precipitate was dissolved in 15.0% (w/v) NaCl solution for 4 h in order to replace the iodide counterion with chloride. The suspension was dialyzed against deionized water in a dialysis bag (cut-off molecular weight of 14,000 g/mol) at ambient temperature for 5 days to



Scheme 1. Preparation of quaternized chitosan particles by (a) heterogeneous and (b) homogeneous routes.

remove residual small molecules. The final product was obtained after lyophilization.

To prepare TMC particles, TMC (0.2 g) was dissolved in deionized water (100 mL) to give a 0.2% (w/v) TMC solution. The particles were formed spontaneously upon an addition of an aqueous TPP solution (1.01 mM, 3 mL) to the TMC solution (3 mL) under magnetic stirring. The particles were isolated by centrifugation at 12,000 rpm for 30 min, centrifugally washed with deionized water three times and then dried by lyophilization before further use.

HTACC was synthesized according to a modified method of Seong, Whang, and Ko (2000). Chitosan (~5 g) was dissolved in 1%v/v acetic acid at ambient temperature. GTMAC (15.3 g, 4 equiv) was then added into the chitosan solution. The reaction was performed at 70 °C for 24 h. The product was dialyzed with deionized water for 3 days, followed by lyophilization to obtain a cotton-like material that was dissolved in deionized water overnight to obtain a stock solution with a concentration of 0.2% (w/v). HTACC particles were formed spontaneously upon an addition of an aqueous TPP solution (6.06 mM, 3 mL) to this HTACC aqueous solution (3 mL) under magnetic stirring. The obtained HTACC particles were isolated by centrifugation, washed and lyophilized as described above.

2.4. Characterization of quaternized chitosan particles

Chemical identity of the particles was confirmed by Fourier transform-infrared (FT-IR) spectroscopy (Nicolet Impact 410) and nuclear magnetic resonance spectroscopy (Varian Mercury 400, operating at 400 MHz). All samples for FT-IR analysis were prepared as KBr pellets. All ^{1}H NMR spectra were recorded in a 1% (v/v) solution of CF_3COOH/D_2O. Chemical shifts (δ) are reported in parts per million (ppm) relative to sodium 3-(trimethylsilyl)-1-propanesulfonate as internal standard using the residual protonated solvent signal as a reference. The size and the morphology of all particles were determined by transmission electron microscopy (TEM) on a JEOL Model JEM-2100 electron microscope. The average diameter calculated using Semafore software and reported from the measurement of 100 randomly selected particles. The particle sizes as well as ζ-potential values of the particles were determined using a Nanosizer Nano-ZS (Malvern Instruments) at 25 °C with a scattering angle of 173°. All data are displayed as the mean ± one standard deviation (SD) and are derived from at least three independent experiments.

2.5. Determination of adsorption efficiency of E. coli DNA on chitosan particles by UV–Vis spectroscopy

The genomic DNA from *E. coli* was dissolved in 10 mM sodium phosphate buffer solution (pH 7.4) to give a final DNA concentration of 0.07 mg/mL in a total volume of 800 μL. The absorbance of the mixture was measured by UV-Vis spectroscopy at 260 nm. Thereafter, the dried particles (1 mg) were added to this DNA solution. After the mixture was incubated at ambient temperature for 20 min, it was centrifuged in order to separate the particles from the solution. The absorbance of the DNA solution was measured again. The remaining DNA concentration as well as the absorption efficiency was calculated as shown in the Supplementary Data.

2.6. PNA·DNA hybridization and capture experiments

PNA·DNA hybridization and capture experiments were performed according to a previously reported procedure (Boontha et al., 2008). Sequences of PNA and DNA used are shown in Table 1. The PNA probe (10 pmol) and DNA sample (10 pmol) were mixed in 30 μL of binding buffer (10 mM sodium phosphate, pH 7.4) and incubated at 25 °C for 20 min. The designated chitosan particles (1 mg) were then added to the solution of PNA·DNA hybrid, incubated for 20 min at ambient temperature, and then centrifugally washed with 3 × 200 μL of Milli-Q water. Finally, the washed particles were analyzed for the adsorbed PNA by MALDI-TOF mass spectrometry. MALDI-TOF mass spectra were collected on Microflex MALDI-TOF mass spectrometry (Bruker Daltonics, Germany). The washed particles (1 μL) were mixed with 10 μL of saturated solution of α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CCA) in

Table 1
PNA and DNA sequences used in this study.

PNA probe			DNA sample		
Code	Sequence (N → C)	*m/z*	Code	Sequence (5′ → 3′)	Correlation with PNA
PNA_1	Ac-TTTTTTTTT-$LysNH_2$	3176.9	DNA_{1c}	d(AAAAAAAAA)	Complementary to PNA_1
PNA_2	Ac-AAAAAAAAA-$LysNH_2$	3260.2	DNA_{1s}	d(AAAACAAAA)	Single mismatch to PNA_1
			DNA_{1n}	d(AGTGATCTAC)	Non-complementary to PNA_1
PNA_{mut}	Ac-Lys-O-CTACGCCAACAGCT-$SerNH_2$	5071.9	DNA_{mut}	d(AGCTGTTGGCGTAG)	Complementary to PNA_{mut}, Single mismatch to PNA_{wt}
PNA_{wt}	Ac-Lys-CTACGCCACCAGCT-$SerNH_2$	4902.8	DNA_{wt}	d(AGCTGGTGGCGTAG)	Complementary to PNA_{wt}, Single mismatch to PNA_{mut}
			DNA_{nc}	d(TAGTTGTACGTACA)	Non-complementary to both PNA_{mut} and PNA_{wt}

0.1% CF_3COOH in acetonitrile/water (1:1). This mixture (1 μL) was spotted onto the MALDI-TOF target, allowed to dry, and analyzed in positive ion linear time-of-fight mode with an accelerating voltage +20 kV. All spectra were processed by averaging between 20 and 30 individual laser shots.

3. Results and discussion

3.1. Chemical and physical characteristics of quaternized chitosan particles

Ionic cross-linking of chitosan solution with TPP was first performed to prepare chitosan (CS) particles. Heterogeneous quaternization was followed thereafter to generate methylated chitosan (MC) and methylated *N*-benzyl chitosan (MBzC) particles by the reactions schematically outlined in Scheme 1(a). MC particles were obtained by direct methylation of the CS particles with CH_3I whereas MBzC particles were prepared via reductive *N*-alkylation with benzaldehyde followed by methylation with CH_3I. The other two particles, namely TMC and HTACC, were prepared by ionic cross-linking of *N,N,N*-trimethylchitosan (TMC) and *N*-[(2-hydroxyl-3-trimethylammonium)propyl]chitosan chloride (HTACC) that were prepared from chitosan under homogeneous conditions as illustrated in Scheme 1(b).

It was found that all ionically crosslinked particles can partially dissolve in CF_3COOH/D_2O, the solvent used for NMR analysis as can be visually observed by the solution turning clearer from opaque upon dissolving in CF_3COOH/D_2O. Given that pK_a of CF_3COOH of 0.23 (Milne & Parker, 1981) is lower than pK_a of all acidic protons (pK_a = 1.0, 2.2, 2.3, 3.7, 8.5) (Wiberg, Holleman, & Wiberg, 2001) of tripolyphosphoric acid, the ionic crosslinking should be partially destroyed by protonation of the tripolyphosphate. Taking the benefit of partial solubility of the particles under acidic condition, we can semi-quantitatively determine the success of quaternization and to ensure that there are quaternary ammonium groups available for binding with DNA. This is very important, especially in the case of MC and MBzC particles of which quaternization was performed heterogeneously after particle formation by crosslinking. As presented in Fig. 1, ^1H NMR spectra of all quaternized chitosan particles show signals at 3.1–3.3 ppm (peak B for MC, MBzC, and TMC particles and peak E for HTACC particles), which belong to the methyl protons of the quaternary ammonium group. The signals at 3.0 (peak C) and 2.8 (peak D) ppm can be designated to the methyl protons of the disubstituted and monosubstituted amino groups, respectively for MC, MBzC, and TMC particles. The signal attributed to the acetyl group (peak A) of N-acetylglucosamine unit of chitosan appears at the chemical shift approximately 1.9–2.0 ppm for all particles. In the case of MBzC particles, a weak signal of aromatic protons at 7.5 ppm confirmed the presence of the benzyl group. Peak assignments of all quaternized chitosan derivatives agree very well with published data previously reported (Sajomsang, Tantayanon, Tangpasuthadol, & Daly, 2009; Seong et al., 2000; Sieval et al., 1998).

Degree of substitution of the quaternized chitosan particles can be deduced from ^1H NMR data. For the MC, TMC and HTACC particles, the degree of quaternization (%DQ) or degree of tri-substitution of methyl groups ($—N^+(CH_3)_3$) can be determined from the relative ratio between the integration of 9 protons from 3 methyl groups ($—N^+(CH_3)_3$) having signal at δ ~3.1–3.3 ppm and the peak integration of 6 protons of chitosan signal at δ ~3.5–4.4 ppm, assigned to $H_{2',3,4,5,6,6'}$ by using equation S1 (Supplementary Data). In the case of MBzC particles, the degree of substitution was estimated by assuming that the majority of quaternary ammonium groups existed in the form of $N^+(CH_3)_3$ or presented in the form of $—NR^+(CH_3)_2$, when substituted groups (R) were benzyl groups. This assumption is based on the fact that the remaining non-benzylated amino groups after the reductive alkylation step are less bulky, and should be more reactive than the benzylated amino group (—NHR) toward methylation by CH_3I. Such characteristic should favor the formation of $—N^+(CH_3)_3$ as opposed to that of the $—NR^+(CH_3)_2$. By using equation S1 for calculation, the degree of tri-substitution or quaternization (%DQ) of MC, MBzC, TMC, and HTACC were 6.3, 5.1, 1.9, and 60.8, respectively. For MC, MBzC, TMC particles, the degree of di-substitution and mono-substitution can also be estimated using equations S2 and S3, respectively (displayed in Supplementary Data). The data shown in Table S2 in Supplementary Data suggested that total degree of substitution ($\%DS_{total}$) was in a range of ~36–73%. The degree of di-substitution possessed higher values than those of mono- and tri-substitution in the case of MC and MBzC particles. Among all particles, HTACC particles exhibited the highest degree of tri-substitution (quaternization). It should be emphasized, at this point, that the quaternized particles were not completely dissolved in the solvent used for ^1H NMR analysis (CF_3COOH/D_2O). Accordingly, the data obtained from ^1H NMR analysis may not reflect the actual degree of substitution, and should only be used as a semi-quantitative estimation of the extent of substitution.

The %DQ values of HTACC (60.8%) and TMC (1.9%) particles were lower than those of HTACC (84.9%) and TMC (11.8%), soluble precursors obtained from homogeneously modified chitosan. This can be explained by the fact that some positive charges of HTACC and TMC were ionically crosslinked with negatively charged TPP upon the particle formation. It is also interesting to note that TMC particles prepared by the homogeneous route possessed less %DQ (~1.9%) in comparison with the MC particles (%DQ ~6.3%) despite their similar functionalities. This may be described as a result of only a portion of the TMC perhaps at the surface TMC particles can dissolve in CF_3COOH/D_2O, the solvent used for ^1H NMR analysis because most of TMC ionically interacted with TPP. The TMC entangled and trapped inside the particles by crosslinking should not be able to dissolve out. The resulting TMC particles therefore possessed much less %DQ (1.9%). This value should be taken as a lower limit and does not necessarily mean that there are not quaternary ammonium groups available inside the particles. In the case of MC particles, on the other hand, the quaternization was performed after the particle formation. The quaternary ammonium entities formed from the uncrosslinked amino groups at the particle surface may be more freely dissolved in CF_3COOH/D_2O and can be more readily detected by ^1H NMR. This strongly suggested that the heterogeneous approach

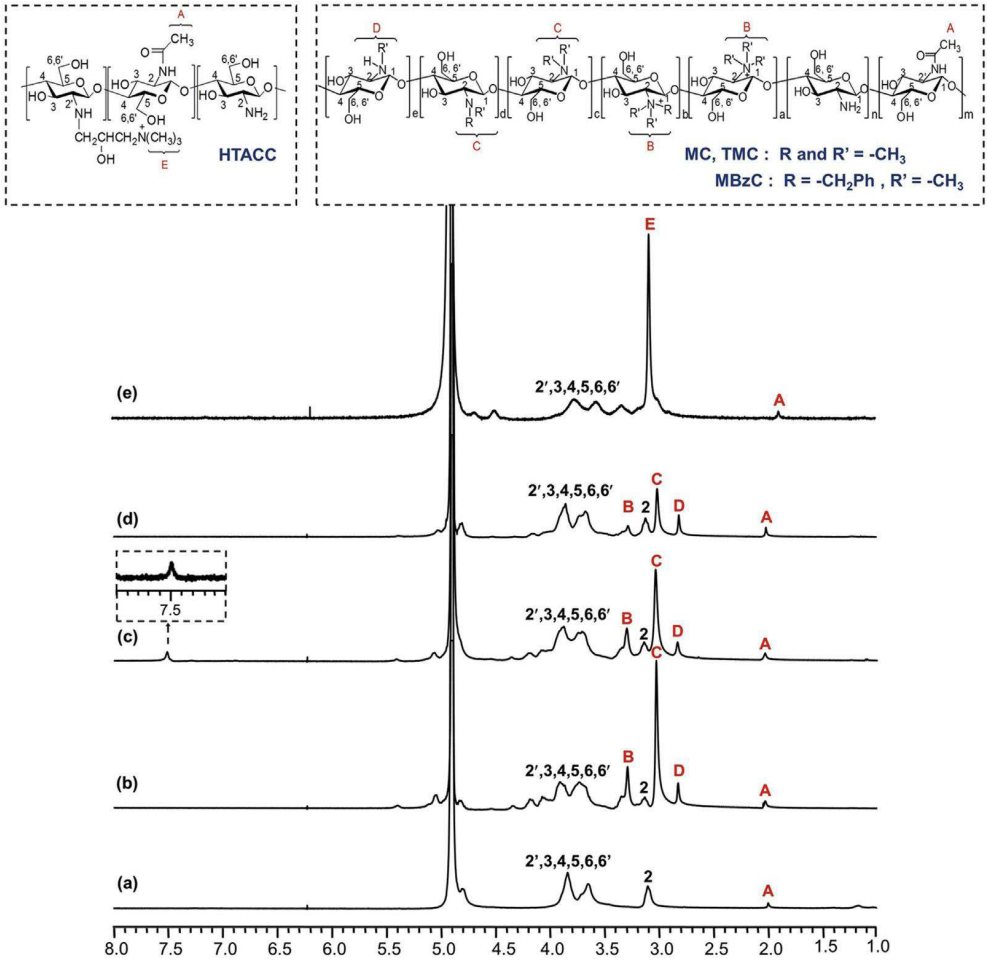


Fig. 1. ^{1}H NMR spectra of (a) CS, (b) MC, (c) MBzC, (d) TMC, and (e) HTACC particles.

is the more effective way to introduce the trimethylammonium groups to chitosan particles. This is highly advantageous considering that heterogeneous methylation is much more convenient to perform in comparison with the homogeneous methylation.

FT-IR analyses of all particles (Fig. S2, Supplementary Data) revealed two characteristic peaks at 1650 and 1543 cm^{-1} that can be assigned to C=O stretching (Amide I) and N—H bending (Amide II, Amine) of *N*-acetylglucosamine units. The decrement of the N—H bending signal at 1543 cm^{-1} and the appearance of C-H deformation signal in a range of 1460–1470 cm^{-1} demonstrated the successful quaternization by both homogeneous and heterogeneous routes. Peak characteristics are in good agreement with previously reported information (Jia, Shen, & Xu, 2001; Sajomsang et al., 2009; Seong et al., 2000).

As shown in Table S3, Supplementary Data, all particles were relatively spherical in shape, having diameters in a sub-micron range (~0.13–0.40 μm) as determined by TEM. We have also measured the particle sizes by DLS technique (Table S4, Supplementary Data). Apparently, the sizes obtained from DLS analysis were much larger than those obtained from TEM analysis. This is mainly due to the fact that the sizes measured by DLS are hydrodynamic sizes at which the particles swell in the solution during the measurements. Whereas TEM analysis was done under reduced pressure atmosphere so the particles were in the dehydrated form. It is also worth noting that the size variations are most significant in the case of MC and TMC particles (0.20 ± 0.05 μm and 0.13 ± 0.09 μm vs. 1.55 ± 0.23 μm and 1.79 ± 0.31 μm as determined by TEM and DLS, respectively), implying their higher degree of swelling than other particles. As anticipated, the size variation (0.16 ± 0.05 μm vs. 0.26 ± 0.01 μm, as determined by TEM and DLS, respectively) is quite insignificant in the case of MBzC bearing relative hydrophobic benzyl groups indicating its lowest swellability.

As evaluated by DLS, all particles exhibited positive ζ-potential values confirming their positively charged characteristics. The magnitude of ζ-potential values beyond a range of ±20 mV suggested that all particles were quite stable. It should be emphasized that the size and ζ-potential data were averaged values from three independent samples. Relatively small standard deviation of the size analyzed by TEM (Table S3, Supplementary Data) and those of both size and ζ-potential values evaluated by DLS (Table S4, Supplementary Data) implied the reproducibility of the synthetic procedures. Due to the limited solubility of quaternized chitosan particles in the solvent used for NMR analysis, %DQ cannot be accurately determined by ^{1}H NMR analysis. For this reason, we feel that it would be intuitively incorrect to make a direct correlation between %DQ and ζ-potential of the particles.

3.2. DNA adsorption efficiency of quaternized chitosan particles

In this experiment, a commercially available *E. coli* genomic DNA was used as a DNA model to determine the adsorption of the negatively charged DNA on the positively charged quaternized chitosan particles by electrostatic interactions, the main attractive force that is believed to drive the adsorption. A calibration curve showing

a linear relationship between DNA concentration and absorbance was established as shown in Fig.S3, Supplementary Data. This was used as a basis for calculation of the DNA adsorption efficiency as demonstrated in Supplementary Data.

As illustrated in Fig. S4 (Supplementary Data), HTACC and TMC particles, prepared by the homogeneous quaternization can adsorb DNA of ~2.6% (wt/wt) whereas MBzC and MC particles, prepared by heterogeneous quaternization, can only adsorb DNA of~0.4% and 1.5% (wt/wt). We explained the lowest DNA adsorptivity of the MBzC particles as a consequence of their inherent hydrophobicity preventing adsorption of negatively charged and hydrophilic DNA molecules despite their highest ζ-potential. Apparently, the quantity of adsorbed DNA does not correlate at all with %DQ previously estimated by ^{1}H NMR, especially in the case of TMC particles of which %DQ was as low as 1.9%. This warrants our previous assumption that such values may be under-estimated. And the particles synthesized by the homogeneous reaction should possess positive charges not only at the surface of but also inside the particles so that they can interact more effectively with the negatively charged *E. coli* DNA. On the other hand, the particles synthesized by the heterogeneous reaction may have positive charges only on their surface. Nevertheless, all quaternized chitosan particles can interact electrostatically with DNA molecules, suggesting their ability to be used for DNA sequence analysis in subsequent studies. We have found no specific correlation between the amount of adsorbed DNA and the size as well as ζ-potential of the particles from the data available.

Upon DNA adsorption experiments, ζ-potential values of all particles became less positive implying that the particles were covered with negatively charged DNA (Table S4, Supplementary Data). Two trends of the change in particle size were observed. The size became smaller in the case of CS, MC and TMC particles suggesting that the particles were less swollen upon electrostatically interacting with DNA. In the case of MBzC particles, the particles became more swollen once they were covered with the more hydrophilic DNA molecules as opposed to their inherently hydrophobic character prior to DNA adsorption.

3.3. Applications of quaternized chitosan particles as ion exchange supports for determination of PNA·DNA hybridization

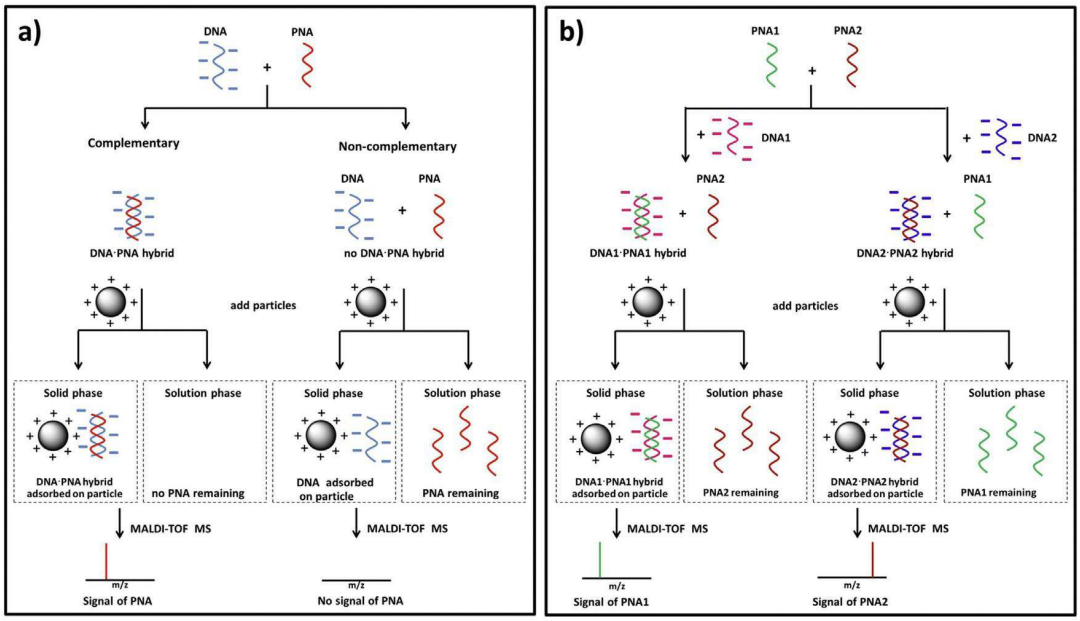
The concept of using quaternized chitosan particles as anion exchange supports for capturing PNA·DNA hybrids is displayed in Scheme 2. The minimum quantity of PNA probe and DNA target that can be analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry was first determined. PNA_1 having a T9 sequence and its complementary DNA, DNA_1 having an A9 sequence, were used for this investigation. As demonstrated in Fig. S5 (Supplementary Data), the minimum amount of PNA probe and DNA target that can be employed for detection of DNA sequence is 10 pmol. This finding is similar to the result previously reported by Boontha et al. (2008) in which Q-sepharose was used as the anion exchange support.

To test the ability of the particles for discrimination between complementary and mismatched DNA by the present anion-exchange capture technique, the PNA_1 was again chosen as the model. MALDI-TOF spectra of all particles after being washed by deionized water shown in Fig. 2 revealed the signal of PNA_1 probe only when the complementary DNA_1 (A9) was added. No signals were detected in the cases of both single-mismatched (DNA_{1s}) and non-complementary (DNA_{1n}) DNA, indicating the specificity of the detection. In the absence of the hybridized DNA, there was no appearance of PNA_1 signal, implying that there were no non-specific interactions between the particles and the PNA (with the exception of MBzC, vide infra). The mismatch discrimination cannot be realized in the case of the MBzC particles despite its high positive charge density (ζ-potential = 54.9 ± 1.0 eV). The PNA probe signals were detected on the particles in the absence and presence of all DNA targets. This non-specific interaction is believed to stem from the presence of hydrophobic benzyl moieties introduced to the MBzC particles. The hydrophobic character of the quaternized particles may be indirectly expressed in term of water contact angle of the chitosan film being modified by the same chemistry. MBzC film possessed a water contact angle of 93.0 ± 2.3° (Vallapa et al., 2011) which was apparently greater than that of the MC film (60.4 ± 1.7°) (Hoven, Tangpasuthadol, Angkitpaiboon, Vallapa, & Kiatkamjornwong, 2007). It should also be noted that in MALDI-TOF MS detection, no DNA signal could be observed due to the much less effective ionization of DNA than PNA in the positive ion mode.

In order to investigate the applicability of the quaternized chitosan particles for the analysis of more complex DNA sequences, two mixed base 14mer PNA probes complementary to DNA sequences that mimic the wild-type K-*ras* DNA (DNA_{wt}) and mutant K-*ras* DNA (DNA_{mut}) (Table 1) were used. Human K-*ras* gene, a member of the Ras family GTPases, is one of the most useful genetic markers that can be used for cancer screening from body fluids and plasma DNA. (Bos, 1989). The data shown in Fig. 3, which were obtained from the particles that were washed with Milli-Q water alone, revealed that only HTACC particles exhibited satisfactory behavior by showing the signal of the PNA probe only when the complementary DNA (DNA_{mut}) was present. No signals were detected in the cases of single-mismatched (DNA_{wt}) and fully non-complementary (DNA_{nc}) DNA targets, suggesting the specificity of the detection. However, the detected signal was relatively low in the complementary case in comparison with other particles. The other three particles, TMC, MC, and MBzC, could discriminate the complementary DNA target (DNA_{mut}) from the unrelated DNA (DNA_{nc}) after washing with Mill-Q water, but not from the single-mismatched DNA (DNA_{wt}). Interestingly, the CS particles cannot at all distinguish the complementary DNA from the non-complementary targets, suggesting that a high degree of non-specific interactions between PNA and the particles. Having a pK_a of approximately 6.0 (Badawy, 2010), CS particles may not be effectively protonated and less likely to be fully charged at pH 7 where the analysis was done. This can explain the observed extensive non-specific adsorption and emphasizes the necessity of introducing the quaternary ammonium groups to provide pH-independent permanent positive charges that are essential to suppress the unwanted non-specific adsorption. Similar results were also observed when PNA_{wt} was used as a probe (Fig. S6, Supplementary Data).

To get rid of the non-specific interactions, formamide was added to the buffer that was used for rinsing the particles after capturing the DNA·PNA hybrid and washing with Milli-Q water. Formamide was previously reported to successfully reduce the hydrophobic interactions between PNA and solid support (streptavidin magnetic bead in that case) and destabilize the mismatched DNA·PNA hybrids (Ross, Lee, & Belgrader, 1997). MALDI-TOF mass spectra obtained from the particles after rinsing with 20%formamide in phosphate buffer are shown in Fig. 4. Gratifyingly, the non-specific absorption of PNA·single-mismatched DNA hybrid on all but the CS particles could be completely eliminated both when PNA_{mut} and PNA_{wt} were used as probes. Apparently, the complementary, but not the mismatched, PNA·DNA hybrids can survive the 20% formamide washing, allowing effective discrimination.

To allow simultaneous detection of both wild-type and mutant K_{ras} DNA, two different PNA probes (PNA_{mut} and PNA_{wt}) were combined in the same reaction and hybridized with the DNA target followed by an addition of designated particles. The concept of the selectivity test using dual PNA probes is outlined in Scheme 2(b). The *m/z* signals of PNA_{mut} and PNA_{wt} would appear at *m/z* 5070 and 4900, respectively. Only one signal should be observed for the specific binding to the DNA target. If both signals are observed on the solid support, they are likely to be due to non-specifically adsorbed



Scheme 2. A schematic diagram showing the concept of using quaternized chitosan particles as anion-exchange captures of PNA-DNA hybrid in combination with MALDI-TOF mass spectrometry for DNA sequence analysis: (a) single probe, (b) dual probes.

PNA. This provides an extra mechanism for validating the detection experiment. According to Fig. 5, only the CS particles showed significant non-specific adsorption of the PNA_{mut} or PNA_{wt}. Upon using 20% formamide as the rinsing reagent after hybridization, MC, TMC, and HTACC particles exhibited good selectivity by showing only the signal of PNA that was hybridized to the correct DNA target suggesting their equivalent ability to suppress non-specific adsorption. However, in term of sensitivity, the TMC particles seem to be better choices than the other two particles in that they gave the strongest PNA signals. This may be described as a result of adsorbed DNA and complementary PNA hybrid being at the surface of the MC particles where most of the quaternary ammonium groups are located because quaternization was done heterogeneously so that the PNA ionization was most efficient and thus gave the highest signal. Although TMC and HTACC particles having quaternary ammonium entities both inside and outside so they exhibited higher DNA adsorption efficiency than the MC particles (see Fig.S4, Supplementary Data), PNA hybridized with complementary DNA absorbed inside the particles may not be effectively ionized therefore yielding lower signals. Overall, MC particles gave the best performance because it showed the strongest complementary PNA signal, and very low non-specific adsorption of the non-complementary probe. In addition, the heterogeneous method used to prepare the MC particles is less time-consuming and less complicated than that was used for the preparation of the TMC particles, which is based on the homogeneous method.

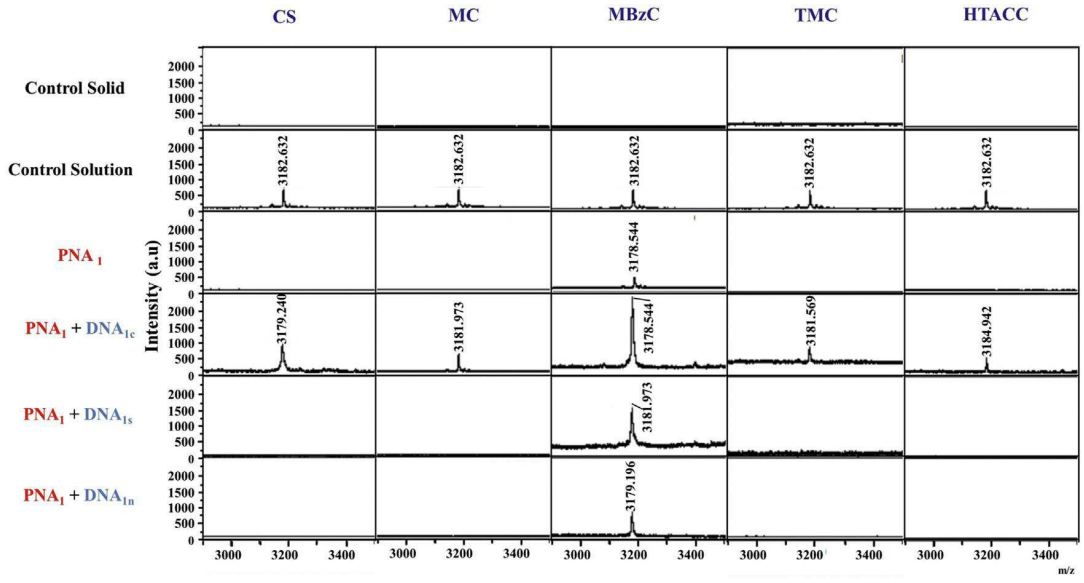


Fig. 2. MALDI-TOF mass spectra of control solid/solution and washed particles after capturing experiments with PNA_1 alone or in the presence of various DNA targets.

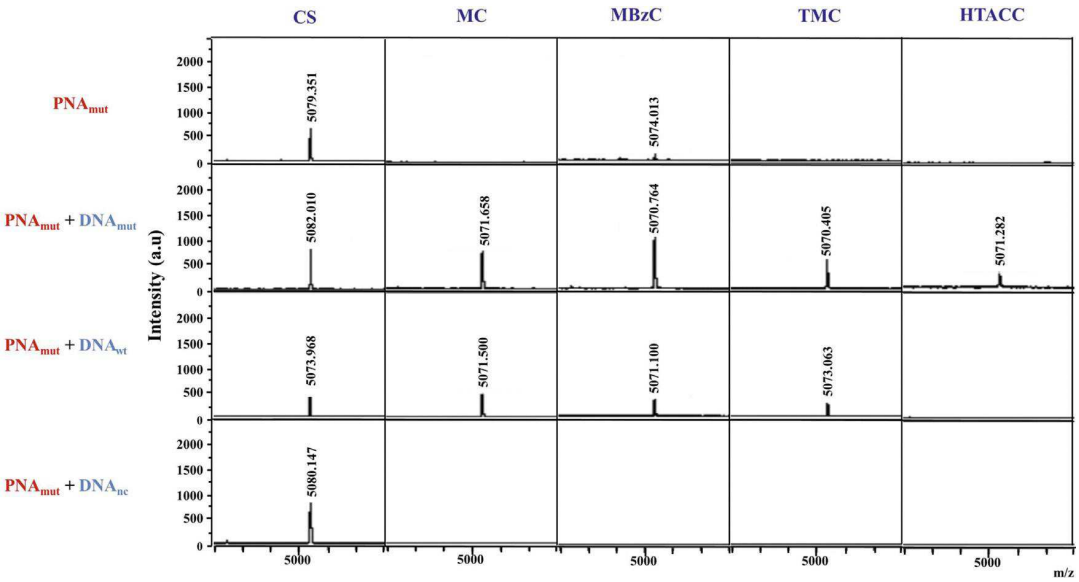


Fig. 3. MALDI-TOF mass spectra of particles after capturing experiments with PNA_{mut} alone or in the presence of various DNA targets.

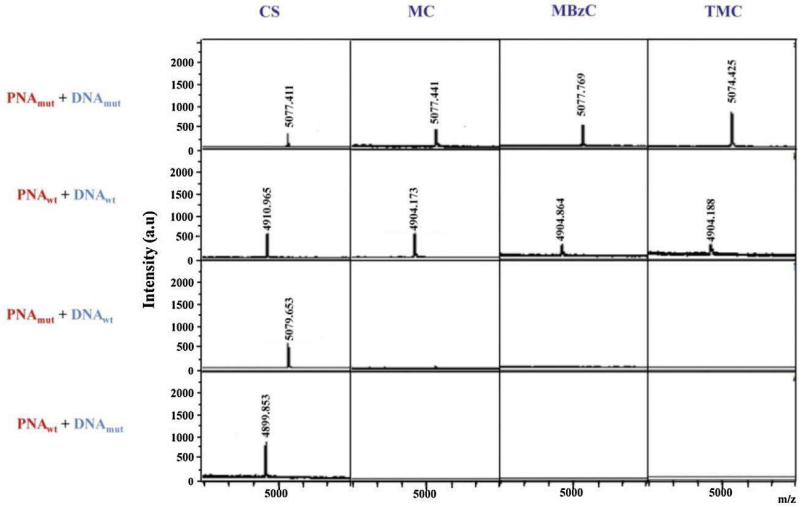


Fig. 4. MALDI-TOF mass spectra of particles after capturing the PNA·single-mismatched DNA hybrid and PNA·complementary DNA hybrid after washing with MilliQ water and 20% formamide in binding buffer using PNA_{mut} or PNA_{wt} as probes.

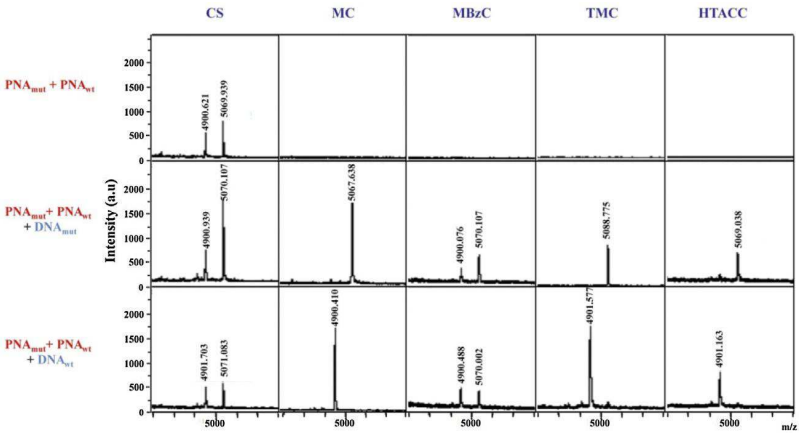


Fig. 5. MALDI-TOF mass spectra of particles after exposure to the mixture of PNA_{mut} and PNA_{wt} alone or the mixture of PNA_{mut} and PNA_{wt} that was previously hybridized with selected DNA target (DNA_{mut} or DNA_{wt}) after rinsing with 20% formamide.

4. Conclusions

Four quaternized chitosan particles having different alkyl substituents namely MC, MBzC, TMC, and HTACC particles were obtained by either heterogeneous or homogeneous quaternization. The success of particle formation was verified by ^{1}H NMR and FT-IR analyses. As determined by DLS, all particles carried positive charges with ζ-potential ranging from +30.2 to +49.4 mV. The results from TEM analysis indicated that all particles were relatively spherical and had diameters in a range of 0.16–0.40 μm. The concept of using quaternized chitosan particles as anion exchange captures in combination with *acpc*PNA and MALDI-TOF mass spectrometry for determination of DNA sequence has been proven practical for detection of synthetic 14-mer, mixed base DNAs of which sequence mimics mutant K-*ras* DNA. The specific detection of hybridization event can also be realized and is strongly affected by the variation of functionality introduced to the chitosan particles in the step of quaternization. Among all particles, MC particles gave the best performance with very low non-specific adsorption of PNA and a minimal detectable amount of DNA target of 10 pmol, which is comparable to that of the commercial anion exchanger Q-sepharose. Discrimination between complementary and single base mismatched DNA targets are readily achieved by rinsing with 20% formamide solution in PBS buffer. The fact that chitosan, especially in the form of quaternary-ammonium derivatives can effectively adsorb DNA strongly suggests their great potential in many advanced bio-related applications that relies on DNA capturing.

Acknowledgements

This research gratefully acknowledges the financial support provided by a Research Team Consolidation Grant from The Thailand Research Fund and the Office of Higher Education Commission (RTA5080004, RTA5280002), a Distinguished Research Professor Grant from the Thailand Research Fund and Chulalongkorn University (DPG5780002), the Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund of Chulalongkorn University (RES560530126-AM), and the Thai Government Stimulus Package 2 (TKK2555), under the Project for Establishment of Comprehensive Center for Innovative Food, Health Products and Agriculture.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.05.043

References

Ananthanawat, C., Hoven, V. P., Vilaivan, T., & Su, X. (2011). Surface plasmon resonance study of PNA interactions with double-stranded DNA. *Biosensors and Bioelectronics*, *26*(5), 1918–1923.

Ananthanawat, C., Vilaivan, T., & Hoven, V. P. (2009). Synthesis and immobilization of thiolated pyrrolidinyl peptide nucleic acids on gold-coated piezoelectric quartz crystals for the detection of DNA hybridization. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *137*(1), 215–221.

Ananthanawat, C., Vilaivan, T., Hoven, V. P., & Su, X. (2010). Comparison of DNA, aminoethylglycyl PNA and pyrrolidinyl PNA as probes for detection of DNA hybridization using surface plasmon resonance technique. *Biosensors and Bioelectronics*, *25*(5), 1064–1069.

Ananthanawat, C., Vilaivan, T., Mekboonsonglarp, W., & Hoven, V. P. (2009). Thiolated pyrrolidinyl peptide nucleic acids for the detection of DNA hybridization using surface plasmon resonance. *Biosensors and Bioelectronics*, *24*(12), 3544–3549.

Badawy, M. E. I. (2010). Structure and antimicrobial activity relationship of quaternary N-alkyl chitosan derivatives against some plant pathogens. *Journal of Applied Polymer Science*, *117*(2), 960–969.

Boonlua, C., Vilaivan, C., Wagenknecht, H. A., & Vilaivan, T. (2011). 5-(pyren-1-yl)uracil as a base-discriminating fluorescent nucleobase in pyrrolidinyl peptide nucleic acids. *Chemistry – An Asian Journal*, *6*(12), 3251–3259.

Boontha, B., Nakkuntod, J., Hirankarn, N., Chaumpluk, P., & Vilaivan, T. (2008). Multiplex mass spectrometric genotyping of single nucleotide polymorphisms employing pyrrolidinyl peptide nucleic acid in combination with ion-exchange capture. *Analytical Chemistry*, *80*(21), 8178–8186.

Bos, J. L. (1989). Ras oncogenes in human cancer: A review. *Cancer Research*, *49*(17), 4682–4689.

Cao, W., Easley, C. J., Ferrance, J. P., & Landers, J. P. (2006). Chitosan as a polymer for pH-induced DNA capture in a totally aqueous system. *Analytical Chemistry*, *78*(20), 7222–7228.

Domard, A., Rinaudo, M., & Terrassin, C. (1986). New method for the quaternization of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, *8*(2), 105–107.

Egholm, M., Buchardt, O., Nielsen, P. E., & Berg, R. H. (1992). Peptide nucleic acids (PNA). Oligonucleotide analogs with an achiral peptide backbone. *Journal of the American Chemical Society*, *114*(5), 1895–1897.

Hayatsu, H., Kubo, T., Tanaka, Y., & Negishi, K. (1997). Polynucleotide-chitosan complex, an insoluble but reactive form of polynucleotide. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, *45*(8), 1363–1368.

Hoven, V. P., Tangpasuthadol, V., Angkitpaiboon, Y., Vallapa, N., & Kiatkamjornwong, S. (2007). Surface-charged chitosan: Preparation and protein adsorption. *Carbohydrate Polymers*, *68*(1), 44–53.

Jampasa, S., Wonsawat, W., Rodthongkum, N., Siangproh, W., Yanatatsaneejit, P., Vilaivan, T., et al. (2014). Electrochemical detection of human papillomavirus DNA type 16 using a pyrrolidinyl peptide nucleic acid probe immobilized on screen-printed carbon electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*, *54*, 428–434.

Jia, Z., Shen, D., & Xu, W. (2001). Synthesis and antibacterial activities of quaternary ammonium salt of chitosan. *Carbohydrate Research*, *333*(1), 1–6.

Laopa, P. S., Vilaivan, T., & Hoven, V. P. (2013). Positively charged polymer brush-functionalized filter paper for DNA sequence determination following Dot blot hybridization employing a pyrrolidinyl peptide nucleic acid probe. *Analyst*, *138*(1), 269–277.

Maneelun, N., & Vilaivan, T. (2013). Dual pyrene-labeled pyrrolidinyl peptide nucleic acid as an excimer-to-monomer switching probe for DNA sequence detection. *Tetrahedron*, *69*, 10805–10810.

Mansawat, W., Boonlua, C., Siriwong, K., & Vilaivan, T. (2012). Clicked polycyclic aromatic hydrocarbon as a hybridization-responsive fluorescent artificial nucleobase in pyrrolidinyl peptide nucleic acids. *Tetrahedron*, *68*(21), 3988–3995.

Milne, J., & Parker, T. (1981). Dissociation constant of aqueous trifluoroacetic acid by cryoscopy and conductivity. *Journal of Solution Chemistry*, *10*(7), 479–487.

Nielsen, P., Egholm, M., Berg, R., & Buchardt, O. (1991). Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science*, *254*(5037), 1497–1500.

Qi, L., Xu, Z., Jiang, X., Hu, C., & Zou, X. (2004). Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Research*, *339*(16), 2693–2700.

Rashatasakhon, P., Vongnam, K., Siripornnoppakhun, W., Vilaivan, T., & Sukwattanasinitt, M. (2012). FRET detection of DNA sequence via electrostatic interaction of polycationic phenyleneethynylene dendrimer with DNA/PNA hybrid. *Talanta*, *88*, 593–598.

Reenabthue, N., Boonlua, C., Vilaivan, C., Vilaivan, T., & Suparpprom, C. (2011). 3-Aminopyrrolidine-4-carboxylic acid as versatile handle for internal labeling of pyrrolidinyl PNA. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, *21*(21), 6465–6469.

Ross, P. L., Lee, K., & Belgrader, P. (1997). Discrimination of single-nucleotide polymorphisms in human DNA using peptide nucleic acid probes detected by MALDI-TOF mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, *69*(20), 4197–4202.

Sajomsang, W., Tantayanon, S., Tangpasuthadol, V., & Daly, W. H. (2009). Quaternization of N-aryl chitosan derivatives: synthesis, characterization, and antibacterial activity. *Carbohydrate Research*, *344*(18), 2502–2511.

Sankoh, S., Samanman, S., Thipmanee, O., Numnuam, A., Limbut, W., Kanatharana, P., et al. (2013). A comparative study of a label-free DNA capacitive sensor using a pyrrolidinyl peptide nucleic acid probe immobilized through polyphenylenediamine and polytyramine non-conducting polymers. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *177*(0), 543–554.

Sassolas, A., Leca-Bouvier, B. D., & Blum, L. J. (2007). DNA biosensors and microarrays. *Chemical Reviews*, *108*(1), 109–139.

Seong, H. S., Whang, H. S., & Ko, S. W. (2000). Synthesis of a quaternary ammonium derivative of chito-oligosaccharide as antimicrobial agent for cellulosic fibers. *Journal of Applied Polymer Science*, *76*(14), 2009–2015.

Sieval, A. B., Thanou, M., Kotze, A. F., Verhoef, J. C., Brussee, J., & Junginger, H. E. (1998). Preparation and NMR characterization of highly substituted N-trimethyl chitosan chloride. *Carbohydrate Polymers*, *36*(2-3), 157–165.

Suparpprom, C., Srisuwannaket, C., Sangvanich, P., & Vilaivan, T. (2005). Synthesis and oligodeoxynucleotide binding properties of pyrrolidinyl peptide nucleic acids bearing prolyl-2-aminocyclopentanecarboxylic acid (ACPC) backbones. *Tetrahedron Letters*, *46*(16), 2833–2837.

Theppaleak, T., Rutnakornpituk, B., Wichai, U., Vilaivan, T., & Rutnakornpituk, M. (2013). Magnetite nanoparticle with positively charged surface for immobilization of peptide nucleic acid and deoxyribonucleic acid. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, *9*(9), 1509–1520.

Theppaleak, T., Rutnakornpituk, M., Wichai, U., Vilaivan, T., & Rutnakornpituk, B. (2013). Anion-exchanged nanosolid support of magnetic nanoparticle in combination with PNA probes for DNA sequence analysis. *Journal of Nanoparticle Research*, *15*(12), 1–12.

Thipmanee, O., Samanman, S., Sankoh, S., Numnuam, A., Limbut, W., Kanatharana, P., et al. (2012). Label-free capacitive DNA sensor using immobilized pyrrolidinyl PNA probe: Effect of the length and terminating head group of the blocking thiols. *Biosensors and Bioelectronics*, *38*(1), 430–435.

Vallapa, N., Wiarachai, O., Thongchul, N., Pan, J., Tangpasuthadol, V., Kiatkamjornwong, S., et al. (2011). Enhancing antibacterial activity of chitosan surface by heterogeneous quaternization. *Carbohydrate Polymers*, *83*(2), 868–875.

Vilaivan, T., & Srisuwannaket, C. (2006). Hybridization of pyrrolidinyl peptide nucleic acids and DNA: Selectivity, base-pairing specificity, and direction of binding. *Organic Letters*, *8*(9), 1897–1900.

Wiarachai, O., Thongchul, N., Kiatkamjornwong, S., & Hoven, V. P. (2012). Surface-quaternized chitosan particles as an alternative and effective organic antibacterial material. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *92*, 121–129.

Wiberg, N., Holleman, A. F., & Wiberg, E. (2001). *Inorganic chemistry*. San Diego: Academic Press.

ACCOUNTS of chemical research

Article

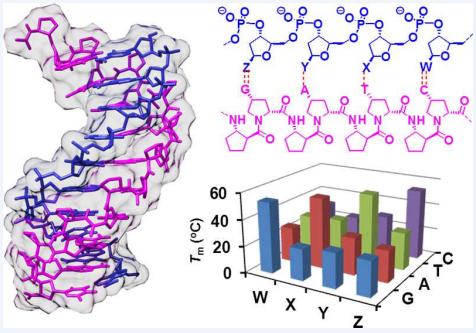
pubs.acs.org/accounts

Pyrrolidinyl PNA with α/β-Dipeptide Backbone: From Development to Applications

Tirayut Vilaivan*

Organic Synthesis Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand

CONSPECTUS: The specific pairing between two complementary nucleobases (A·T, C·G) according to the Watson–Crick rules is by no means unique to natural nucleic acids. During the past few decades a number of nucleic acid analogues or mimics have been developed, and peptide nucleic acid (PNA) is one of the most intriguing examples. In addition to forming hybrids with natural DNA/RNA as well as itself with high affinity and specificity, the uncharged peptide-like backbone of PNA confers several unique properties not observed in other classes of nucleic acid analogues. PNA is therefore suited to applications currently performed by conventional oligonucleotides/analogues and others potentially beyond this. In addition, PNA is also interesting in its own right as a new class of oligonucleotide mimics. Unlimited opportunities exist to modify the PNA structure, stimulating the search for new systems with improved properties or additional functionality not present in the original PNA, driving future research and applications of these in nanotechnology and beyond. Although many structural variations of PNA exist, significant improvements to date have been limited to a few constrained derivatives of the privileged *N*-2-aminoethylglycine PNA scaffold. In this Account, we summarize our contributions in this field: the development of a new family of conformationally constrained pyrrolidinyl PNA having a nonchimeric α/β-dipeptide backbone derived from nucleobase-modified proline and cyclic β-amino acids. The conformational constraints dictated by the pyrrolidine ring and the β-amino acid are essential requirements determining the binding efficiency, as the structure and stereochemistry of the PNA backbone significantly affect its ability to interact with DNA, RNA, and in self-pairing. The modular nature of the dipeptide backbone simplifies the synthesis and allows for rapid structural optimization. Pyrrolidinyl PNA having a (2′*R*,4′*R*)-proline/(1*S*,2*S*)-2-aminocyclopentanecarboxylic backbone (acpcPNA) binds to DNA with outstanding affinity and sequence specificity. It also binds to RNA in a highly sequence-specific fashion, albeit with lower affinity than to DNA. Additional characteristics include exclusive antiparallel/parallel selectivity and a low tendency for self-hybridization. Modification of the nucleobase or backbone allowing site-specific incorporation of labels and other functions to acpcPNA via click and other conjugation chemistries is possible, generating functional PNAs that are suitable for various applications. DNA sensing and biological applications of acpcPNA have been demonstrated, but these are still in their infancy and the full potential of pyrrolidinyl PNA is yet to be realized. With properties competitive with, and in some aspects superior to, the best PNA technology available to date, pyrrolidinyl PNA offers great promise as a platform system for future elaboration for the fabrication of new functional materials, nanodevices, and next-generation analytical tools.



1. INTRODUCTION

Recognition between two complementary nucleic acids via highly specific Watson–Crick base pairing is the basis for the storage and transfer of genetic information. The high fidelity of the recognition event suggests potential uses of nucleic acids for regulation of genetic expression, as a probe for nucleic acid sequence detection, and many other purposes.[1] In addition, the Watson–Crick base pairing allows one to program nucleic acids to fold into complex architectures in a controllable fashion, making them particularly attractive as building blocks or scaffolds for the creation of novel structures or materials exhibiting unique functions.[2−4] However, natural nucleic acids are not always ideal candidates for these "unnatural" purposes because of their limited stabilities and only modest binding affinities. Fortunately, the backbone of nucleic acids can tolerate structural modification to some extent without sacrificing the ability to form Watson–Crick base pairs. Such modified nucleic acids are collectively known as "xeno-nucleic acids" or XNA, examples of which are shown in Figure 1.[5] Some of these XNA can even be replicated, reversed-transcribed, and evolved with engineered polymerases.[6]

While the concept of redesigning nucleic acids by completely replacing the sugar–phosphate backbone with other polymeric backbones is not entirely new (see Figure 2 for examples), decent Watson–Crick base pairing in these synthetic systems has been demonstrated only relatively recently. In 1991, Nielsen et al.[7] reported the first peptide nucleic acid (PNA) that could recognize double-stranded (ds) DNA through a novel triplex invasion mechanism. PNA also binds to single-stranded DNA/RNA with high affinity and specificity according to the Watson–

Received: February 16, 2015
Published: May 29, 2015

ACS Publications © 2015 American Chemical Society

DOI: 10.1021/acs.accounts.5b00080
Acc. Chem. Res. 2015, 48, 1645−1656

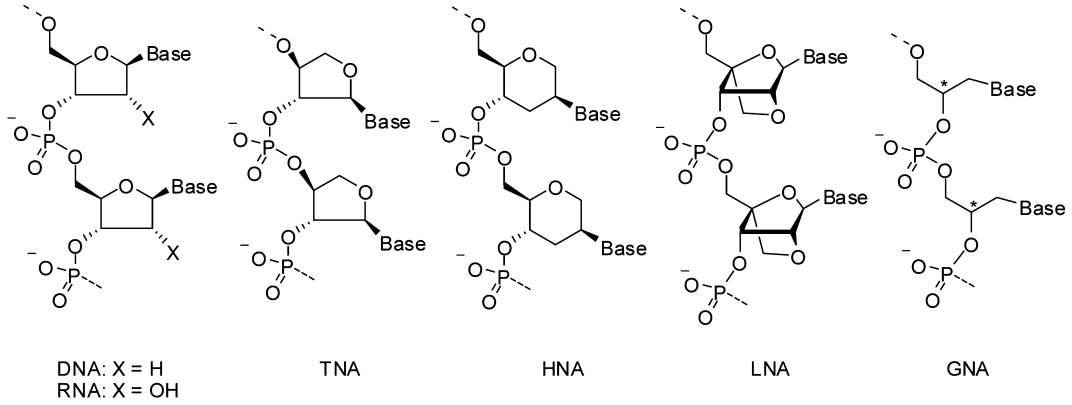


Figure 1. DNA/RNA and selected examples of xeno-nucleic acids.

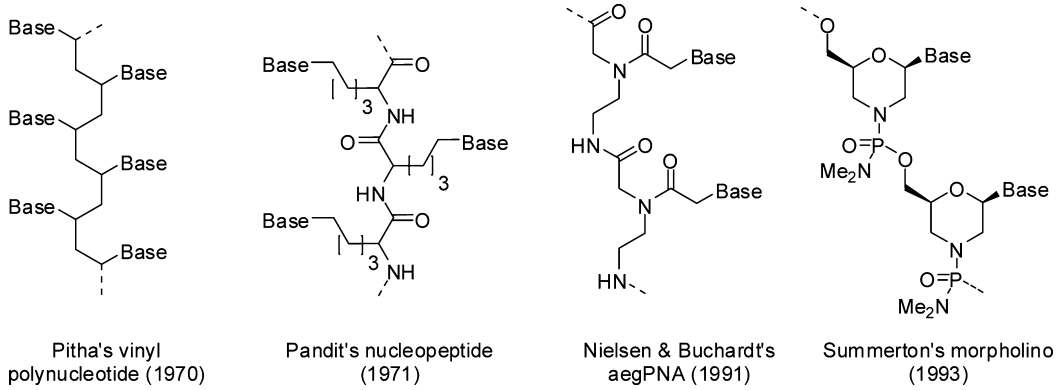


Figure 2. Examples of completely redesigned nucleic acid mimics.

Crick base-pairing rules. The electrostatically neutral backbone of PNA accounts for the unusually high stability as well as the relative insensitivity to ionic strength variations of PNA-containing duplexes.[8] These properties, together with the excellent stability of PNA toward nucleases and proteases, open the door to its use in nucleic-acid-related applications and considerably broaden the potential scope of this field.[9] In particular, the strong affinity of PNA is highly desirable for targeting of nucleic acids with secondary structures.[10] In addition, PNA is also interesting as a model for studying molecular recognition events, in prebiotic chemistry, and in designing self-replicating systems.[11,12] The virtually unlimited opportunities for structural modification should inspire the development of new PNAs having improved properties and functions.[13] In this Account, we summarize our contribution to the PNA research landscape, which focuses on the development and utility of a series of conformationally constrained pyrrolidinyl PNAs consisting of a proline-derived dipeptide backbone.

2. CONFORMATIONALLY CONSTRAINED PNA

The X-ray and NMR structures of PNA·PNA, PNA·RNA, and PNA·DNA duplexes suggest that the *N*-2-aminoethylglycine backbone of the original PNA (now known as aegPNA) is flexible enough to adopt a range of conformations, including the A-, B-, and novel P-type helices.[8] The concept of preorganizing the PNA structure to reduce the entropic penalty associated with the conformational change has been proposed to further enhance the binding properties (Figure 3).[14] Partial incorporation of the (*S*,*S*)-*trans*-cyclopentane ring into the aegPNA backbone improves its thermal stability and sequence specificity for DNA recognition.[15] On the other hand, incorporation of the *cis*-cyclohexane ring results in an increase in RNA binding affinity,

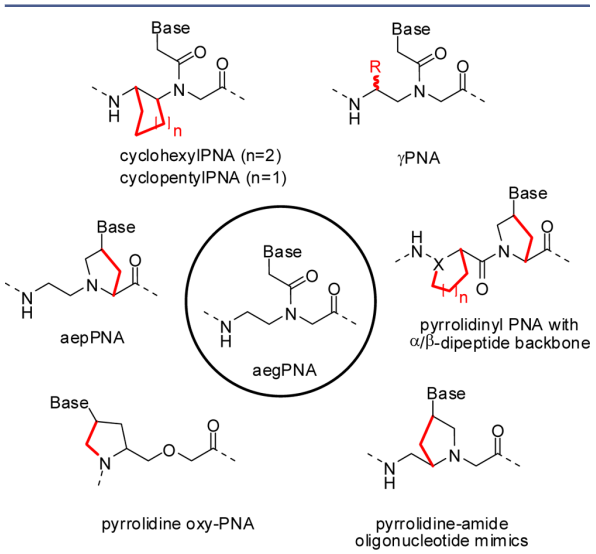


Figure 3. Examples of conformationally constrained PNA analogues.

DOI: 10.1021/acs.accounts.5b00080
Acc. Chem. Res. 2015, 48, 1645−1656

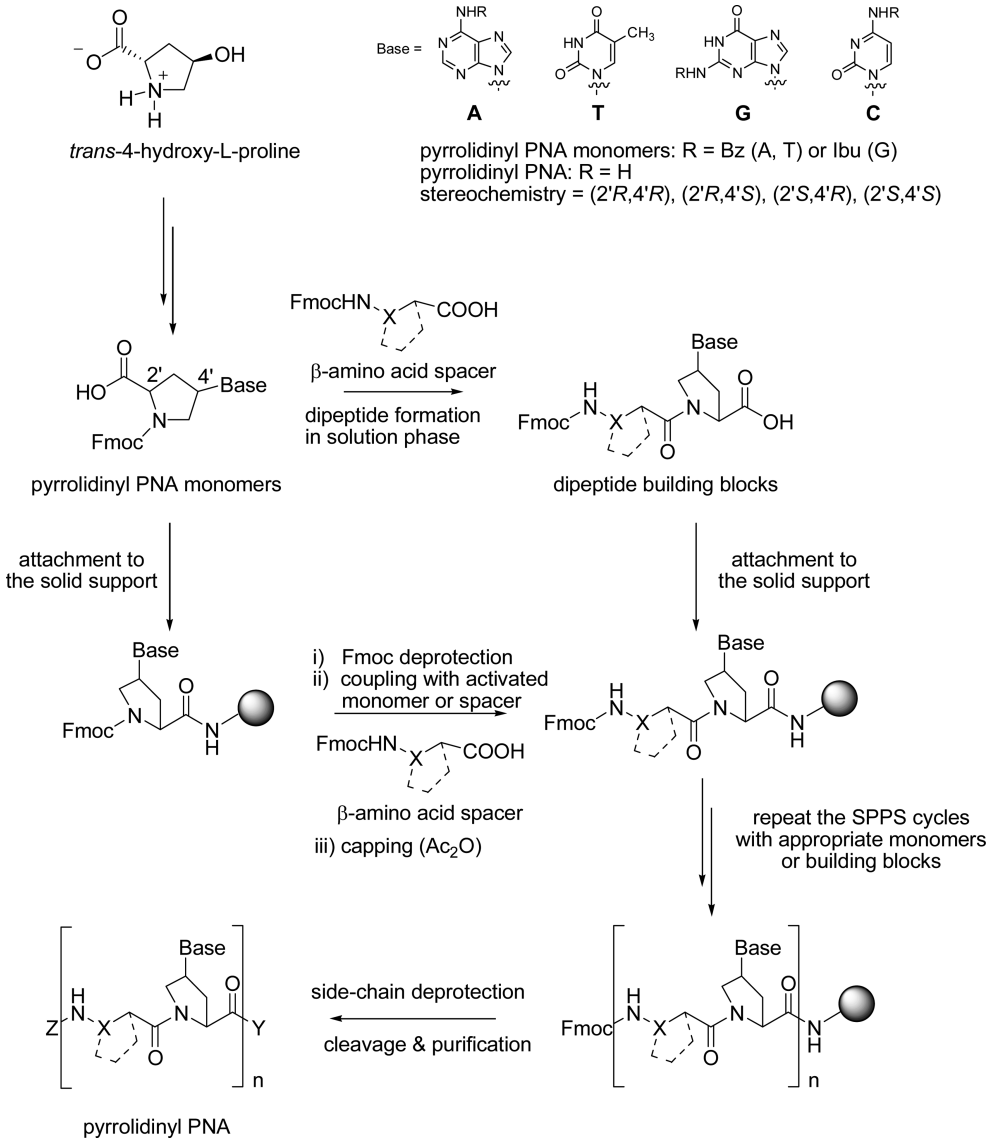


Figure 4. Synthesis of pyrrolidinyl PNA.

significantly more than for DNA.[16] Also, preorganization resulting from a simple substitution at the γ-position in aegPNA significantly improves its binding properties.[17] Various substituents can be placed at this position to improve water solubility[18] or cell penetration[19,20] or to incorporate other functions.[21,22]

Because of its straightforward access via proline derivatives having well-defined stereochemistries, the pyrrolidine ring has been extensively used as a constraint element in the design of new PNA structures (Figure 3). However, few studies have fully evaluated the general base-pairing behaviors of nonchimeric mixed-sequence pyrrolidine-containing PNA,[23,24] and none of these offer significant advantages over the well-established aegPNA. In 1996 we introduced a new pyrrolidinyl PNA having a modular dipeptide backbone consisting of nucleobase-modified prolines alternating with other amino acid "spacer" units.[25] However, it was not until 2001 that the active role of the cyclic β-amino acid spacer toward DNA binding was realized.[26] These findings were coincident with the discovery that short β-peptides can fold into well-defined helices as a result of intramolecular hydrogen bonding and conformation constraints.[27]

3. SYNTHESIS OF PYRROLIDINYL PNA

The structure of pyrrolidinyl PNA is divided into two parts: the pyrrolidine monomer and the β-amino acid spacer, which are equivalent to the nucleoside and phosphate groups in DNA, respectively. The four Fmoc-protected pyrrolidine monomers (A, T, C, G) were synthesized with full stereochemical control starting from *trans*-4-hydroxy-L-proline (Figure 4).[28−30] The nucleobase protecting groups Bz (A, C) and Ibu (G) chosen here are compatible with the Fmoc solid-phase peptide synthesis (SPPS) strategy and can be removed by aqueous ammonia treatment as in standard DNA synthesis. In early studies, the pyrrolidine monomer and the spacer were first joined to form a "nucleotide" building block before being assembled into PNA oligomers using SPPS.[31] The attractive feature of this approach is

DOI: 10.1021/acs.accounts.5b00080
Acc. Chem. Res. 2015, 48, 1645−1656

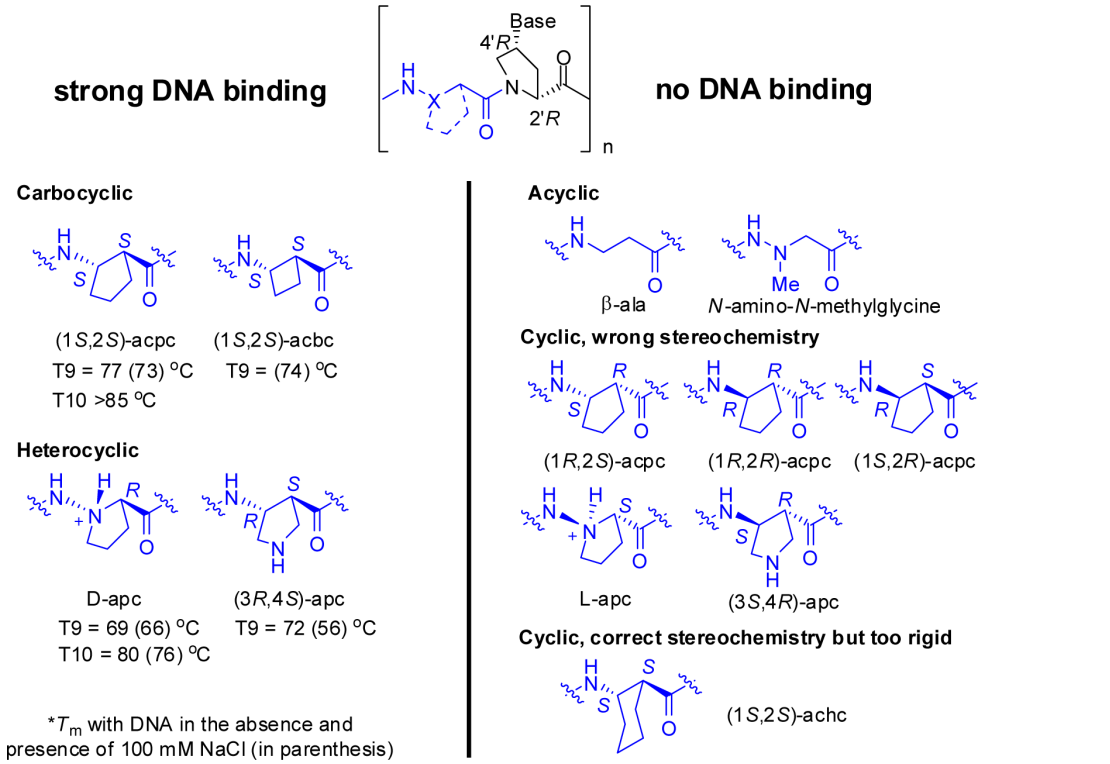


Figure 5. DNA binding properties of homothymine pyrrolidinyl PNAs having β-amino acid spacers.

that the number of solid-phase coupling steps is reduced by half. However, stepwise assembly of the monomer and spacer directly onto the solid phase is more convenient for building in structural variations, and this became the preferred method in later studies.[26,29] L-Lysinamide is usually included at either the C- or N-terminus to impart aqueous solubility (to the mM range). Other labels such as fluorescent dyes, thiols, and biotin may also be incorporated at either the N- or C-terminus (via an orthogonally protected lysine side chain). After the desired sequence is obtained, the nucleobase protecting groups are removed prior to cleavage from the solid support. While aegPNA and pyrrolidinyl PNA consisting of α-amino acids in the backbone are readily degraded by intramolecular cyclization under basic conditions,[25] pyrrolidinyl PNA having an α/β-dipeptide backbone is completely stable. The crude PNA is purified by reversed-phase HPLC and characterized by MALDI-TOF mass spectrometry. Typical coupling yields are >95% per step, and the recovery of PNA with >90% purity is between 10–40%, depending on the sequence.

4. BASE-PAIRING PROPERTIES OF PYRROLIDINYL PNA

4.1. DNA Binding Properties

During the discovery phase, the most easily prepared oligothymine sequences (5–10 bases in length) were used as a model to preliminarily determine the DNA binding properties of pyrrolidinyl PNA. The configuration of the pyrrolidine monomer was initially fixed as (2′*R*,4′*R*) to mimic that of natural nucleosides, and a limited set of β-amino acids were employed as spacers (Figure 5). A stable PNA·DNA hybrid (T_m = 80 °C for the T_{10} sequence) was first observed in dapcPNA having the (2*R*)-1-aminopyrrolidine-2-carboxylic acid (D-apc) spacer.[26,32] UV and circular dichroism (CD) titrations clearly revealed a 1:1 stoichiometry, which is in sharp contrast to other PNA systems, wherein triplex formation was preferred for homopyrimidine sequences.[8] The CD spectra of the PNA·DNA duplexes exhibit features that are compatible with right-handed helices.[32] As a hydrazino peptide, dapcPNA could potentially exist in its protonated form at physiological pH, which might provide additional attractive interactions with the negatively charged DNA backbone. The absence of DNA binding for pyrrolidinyl PNAs carrying either charged or uncharged open-chain spacers (β-alanine and *N*-amino-*N*-methylglycine) suggests the importance of structural constraints over electrostatic interactions to the DNA binding.[33] This hypothesis was further confirmed in subsequent studies of PNA with carbocyclic 2-aminocyclopentanecarboxylic acid (acpc) spacers. Out of the four possible diastereomers of acpc, only the pyrrolidinyl PNA having a (2′*R*,4′*R*)-pyrrolidine/(1*S*,2*S*)-acpc backbone (henceforth denoted as acpcPNA) formed a very stable hybrid with DNA (T_m > 85 °C for the T_{10} sequence).[30,34] The other two cyclic β-amino acids that promote DNA binding are (1*S*,2*S*)-2-aminocyclobutanecarboxylic acid [(1*S*,2*S*)-acbc][35] and (3*R*)-aminopyrrolidine-(4*S*)-carboxylic acid [(3*R*,4*S*)-apc)].[36] All of these have the same absolute stereochemistry as (1*S*,2*S*)-acpc and the protonated form of D-apc. Interestingly, although (1*S*,2*S*)-2-aminocyclohexanecarboxylic acid [(1*S*,2*S*)-achc] possesses the same configuration, achcPNA derived from this spacer cannot bind to DNA (vide infra). This underscores the importance of careful design and correct placements of conformational constraints in PNA systems.

After the key structural elements that are important for DNA binding had been established, more detailed studies directed to determining the DNA/RNA binding specificity and self-pairing

DOI: 10.1021/acs.accounts.5b00080
Acc. Chem. Res. 2015, 48, 1645–1656

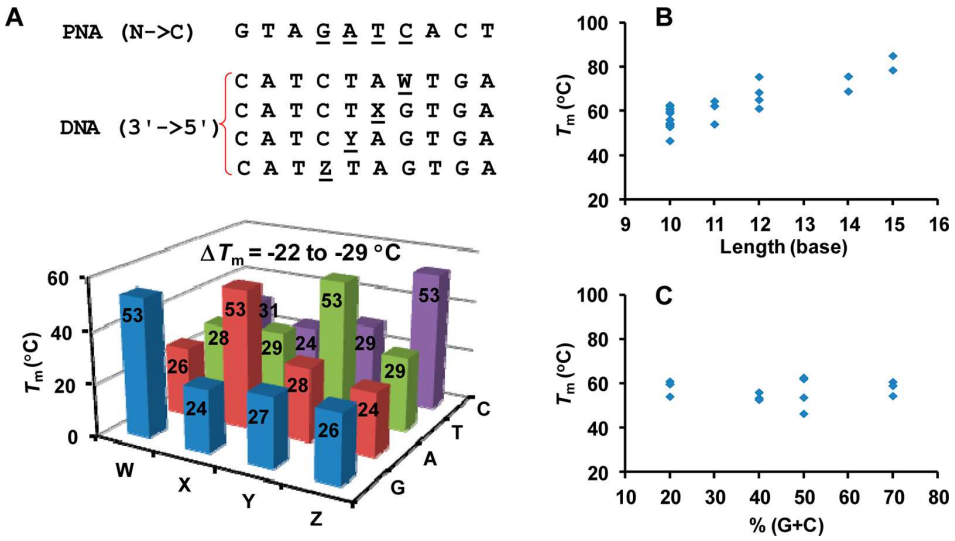


Figure 6. T_m of antiparallel acpcPNA·DNA duplexes. (A) Watson−Crick base-pairing specificity, (B) Relationships with number of base pairs (n = 24). (C) Relationships with base composition (10-mer, n = 13).

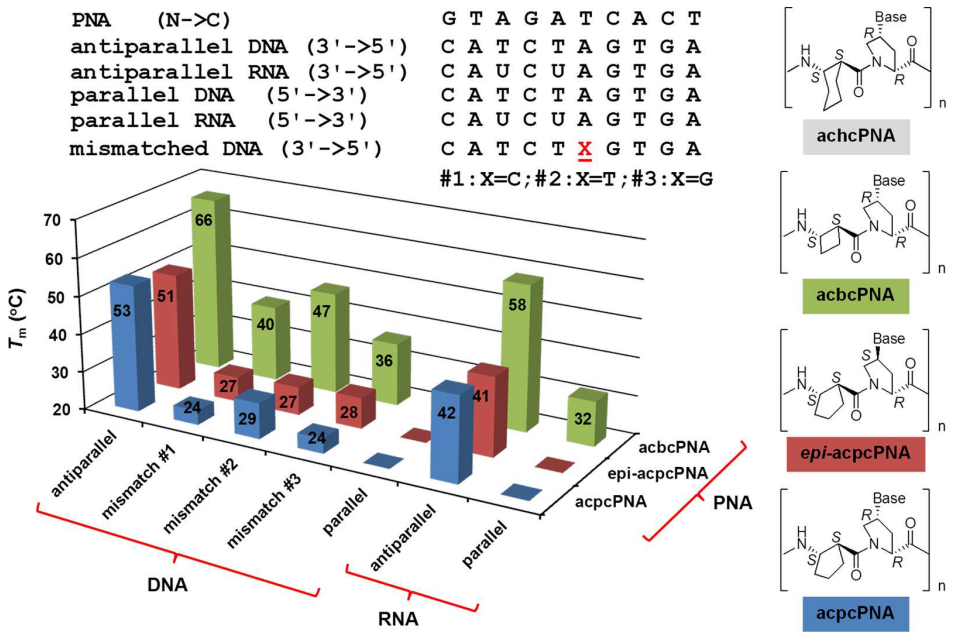


Figure 7. Comparison of T_m data of DNA and RNA hybrids of acpcPNA,[30] *epi*-acpcPNA,[38] and acbcPNA.[35] Values less than 20 °C are presented as 20 °C. achcPNA showed no detectable binding to either DNA and RNA (T_m < 20 °C in all cases).

ability were performed with selected PNA systems having mixed-base nonchimeric sequences. While aegPNA is known to form stable hybrids in both the antiparallel and parallel directions, acpcPNA exclusively forms antiparallel hybrids with DNA.[29] The pairing between acpcPNA and DNA exhibits excellent Watson−Crick specificity, as shown by an extremely large T_m decrease (22−29 °C) in the mismatched hybrids compared with the complementary hybrids (Figure 6A).[30] The T_m of acpcPNA·DNA hybrids increases with the number of base pairs (Figure 6B) but does not show obvious correlations with the base composition (G + C and purine/pyrimidine content) (Figure 6C). Whether this is a general phenomenon for the pyrrolidinyl PNA family remains to be confirmed, but preliminary studies with *epi*-acpcPNA and acbcPNA appear to suggest otherwise. An analysis of thermodynamic parameters suggests that the larger enthalpy gain due to G·C pairing relative to A·T pairing is counterbalanced by the more negative entropy term in the former case.[30] The different extents of puckering of the proline ring due to differences in electronegativity and steric bulkiness of the nucleobase substituents may partly explain such unusual sequence-dependent effects.[37]

The effect of the pyrrolidine stereochemistry was next explored by employing (1*S*,2*S*)-acpc as the spacer.[30] Out of three remaining diastereomeric acpcPNAs, only the diaster-

DOI: 10.1021/acs.accounts.5b00080
Acc. Chem. Res. 2015, 48, 1645−1656

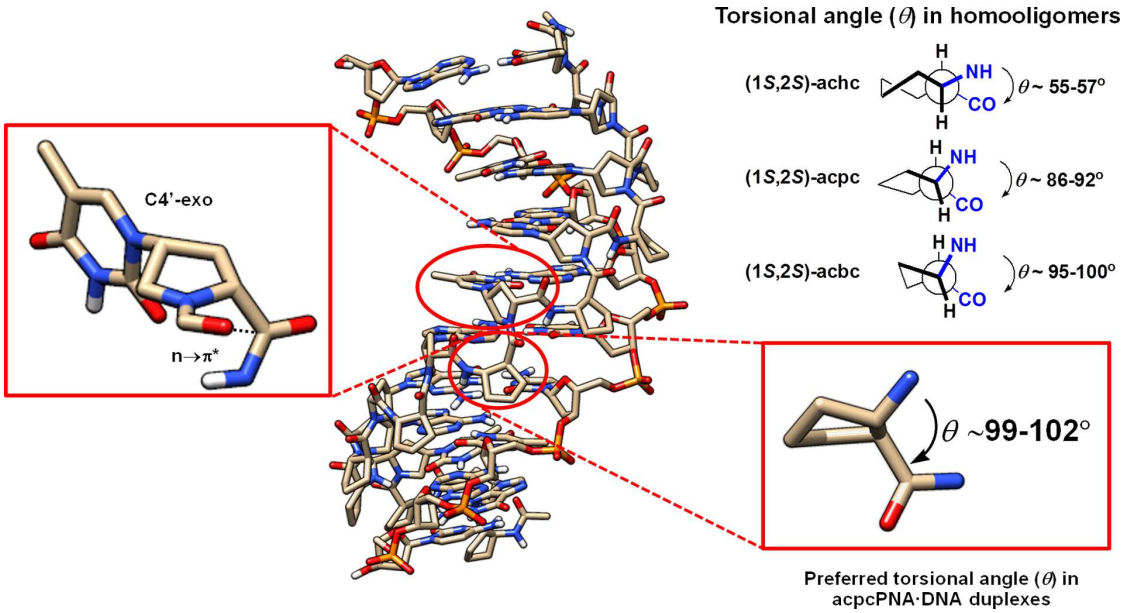


Figure 8. Model of the acpcPNA·DNA duplex showing the conformation of the pyrrolidine ring and torsional angles of the cyclic β-amino acids. Adapted from ref 35. Copyright 2012 American Chemical Society.

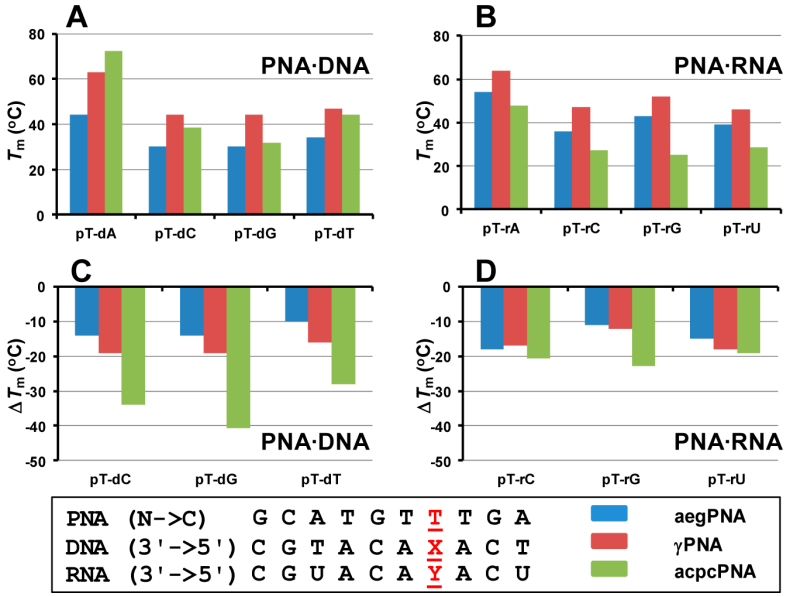


Figure 9. T_m and ΔT_m ($=T_m^{\text{mismatched}} - T_m^{\text{complementary}}$) data for (A, C) DNA hybrids and (B, D) RNA hybrids of aegPNA, γPNA, and acpcPNA under comparable conditions. The L-serine-derived γPNA was fully modified with hydroxymethyl side chains.[17]

eomer with the (2′*R*,4′*S*)-pyrrolidine/(1*S*,2*S*)-acpc backbone (henceforth denoted as *epi*-acpcPNA) shows appreciable DNA binding affinity, which is only slightly lower than that of the acpcPNA having the (2′*R*,4′*R*)-pyrrolidine/(1*S*,2*S*)-acpc backbone (Figure 7).[30,38] This behavior is analogous to that of α-anomeric DNA, which can form Watson−Crick pairs with normal (β) DNA.[39]

Importantly, decreasing the ring size of the cyclic β-amino acid spacer from five carbons in acpcPNA to four carbons in acbcPNA resulted in more stable PNA·DNA duplexes without compromising the base-pairing specificity, while achcPNA having a six-membered-ring spacer showed no ability to bind DNA. This can be rationalized by considering the NH−C2−C1−CO torsional angle (θ) in the cyclic β-amino acid (Figure 8).[35] The native θ value of 95−100°, obtained from an X-ray structure of oligo(*trans*-acbc),[40] is closer to the values of 99−102° obtained from molecular dynamics (MD) simulations of dapcPNA·DNA[41] and acpcPNA·DNA[42] duplexes than those of *trans*-acpc (86−92°), and *trans*-achc (55−57°).[43] The rigid six-membered ring in *trans*-achc is likely to be far less flexible to adopt the desired optimal torsional angle for the DNA binding conformation compared with the five-membered ring in *trans*-

DOI: 10.1021/acs.accounts.5b00080
Acc. Chem. Res. 2015, 48, 1645−1656

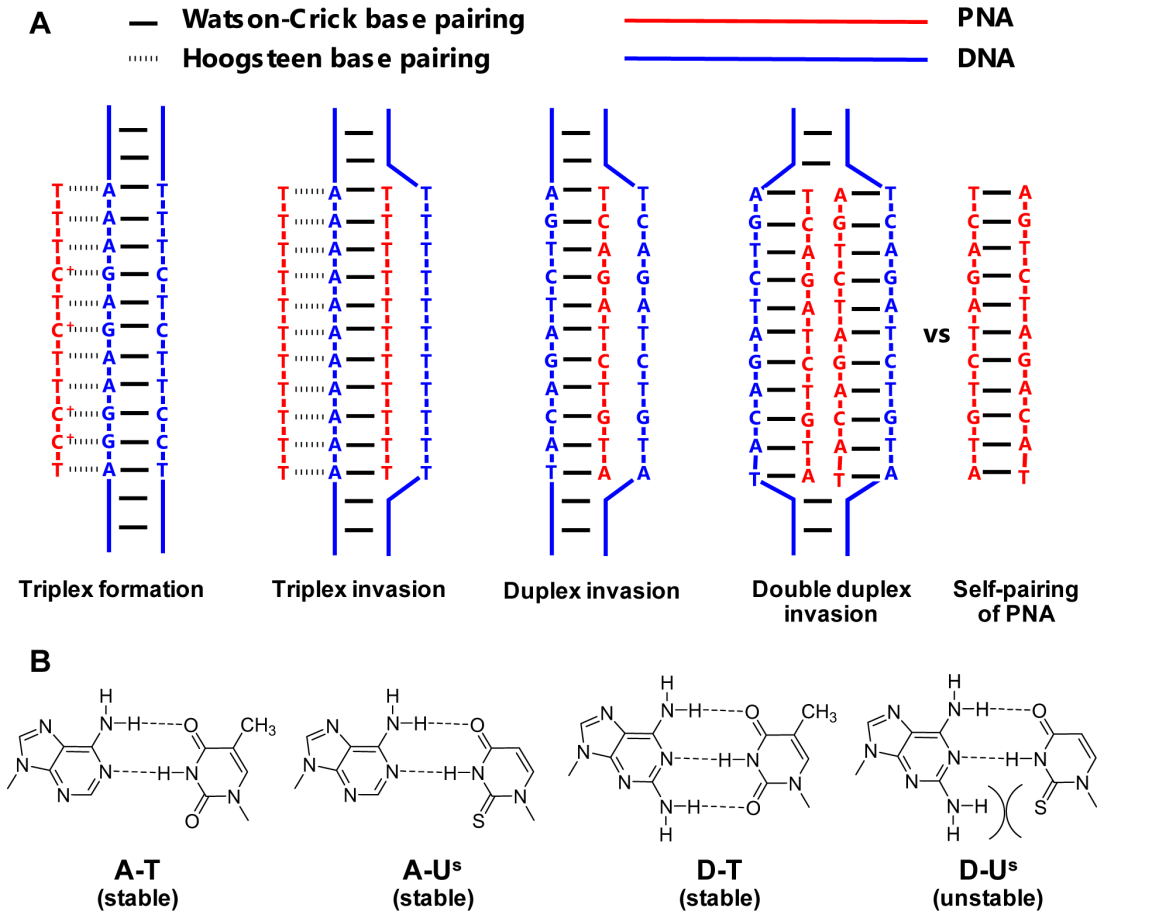


Figure 10. (A) Various modes of dsDNA recognition by PNA and (B) the concept of "pseudocomplementary" bases. Adapted with permission from ref 46. Copyright 1999 The National Academy of Sciences.

acpc. The MD simulations suggest that all of the amide bonds adopt a trans geometry, allowing n → π^* interactions between adjacent amide bonds in the N → C direction. In addition, they also suggest that the gas-phase enthalpy, calculated from a summation of bonded and nonbonded terms, is the major contributor to the high stability of pyrrolidinyl PNA·DNA duplexes, which is consistent with the uncharged nature of the PNA backbone. This is in contrast to DNA·DNA duplexes, in which the gas-phase energy is high because of electrostatic repulsion, and thus solvation becomes the predominant stabilizing factor. A comparative simulation study of acpcPNA·DNA and *epi*-acpcPNA·DNA duplexes suggests that both the (2′*R*,4′*R*) and (2′*R*,4′*S*) pyrrolidine moieties can be well-accommodated in antiparallel B-DNA-like duplexes by adopting different ring-puckering modes.[42] The (2′*R*,4′*R*) acpcPNA showed C4′-exo puckering of the pyrrolidine ring while the (2′*R*,4′*S*) *epi*-acpcPNA showed C4′-endo puckering, placing the nucleobases in pseudoequatorial positions in both cases.

The availability of literature data for aegPNA and γPNA[17−19] allows a direct comparison of their DNA and RNA binding properties with those of acpcPNA (Figure 9). The T_m of the complementary acpcPNA·DNA hybrid (72 °C) was higher than those of aegPNA and γPNA (44 and 63 °C, respectively). Moreover, mismatched DNA hybrids of acpcPNA showed larger T_m decreases (28−41 °C) than in aegPNA (10−14 °C), and γPNA (16−19 °C). The superior mismatch discrimination abilities of acpcPNA over aegPNA and DNA probes has also been clearly demonstrated by surface plasmon resonance (SPR)[44] and magnetic bead DNA capture experiments.[45]

4.2. RNA Binding and Self-Pairing Properties

While most other PNAs bind more strongly to RNA over DNA, pyrrolidinyl PNAs consistently show preferential DNA binding. The antiparallel binding mode is clearly preferred in pyrrolidinyl PNA·RNA hybrids, although weak parallel hybrids are also occasionally observed.[30] The data in Figures 7 and 9 indicate that acpcPNA forms less stable RNA hybrids than aegPNA or γPNA. Nevertheless, the T_m of 48 °C at 10 base pairs is still much higher than that of natural DNA/RNA pairs. Moreover, the larger T_m decrement for mismatched acpcPNA·RNA hybrids (19−23 °C) suggests a greater specificity compared with aegPNA (11−15 °C) and γPNA (12−18 °C). Although the structural basis of the much higher thermal stability of acbcPNA·RNA hybrids relative to acpcPNA·RNA hybrids is not yet understood,[35] acbcPNA is clearly more useful for RNA-related applications.

Perhaps the most striking feature of pyrrolidinyl PNA is the low propensity for self-pairing. While *epi*-acpcPNA forms only weakly stable self-hybrids,[38] no self-pairing has been observed in acpcPNA.[30] The order of pyrrolidinyl PNA duplex stabilities (PNA·DNA > PNA·RNA > PNA·PNA) is therefore completely opposite to that of aegPNA (PNA·PNA > PNA·RNA > PNA·

DOI: 10.1021/acs.accounts.5b00080
Acc. Chem. Res. 2015, 48, 1645−1656

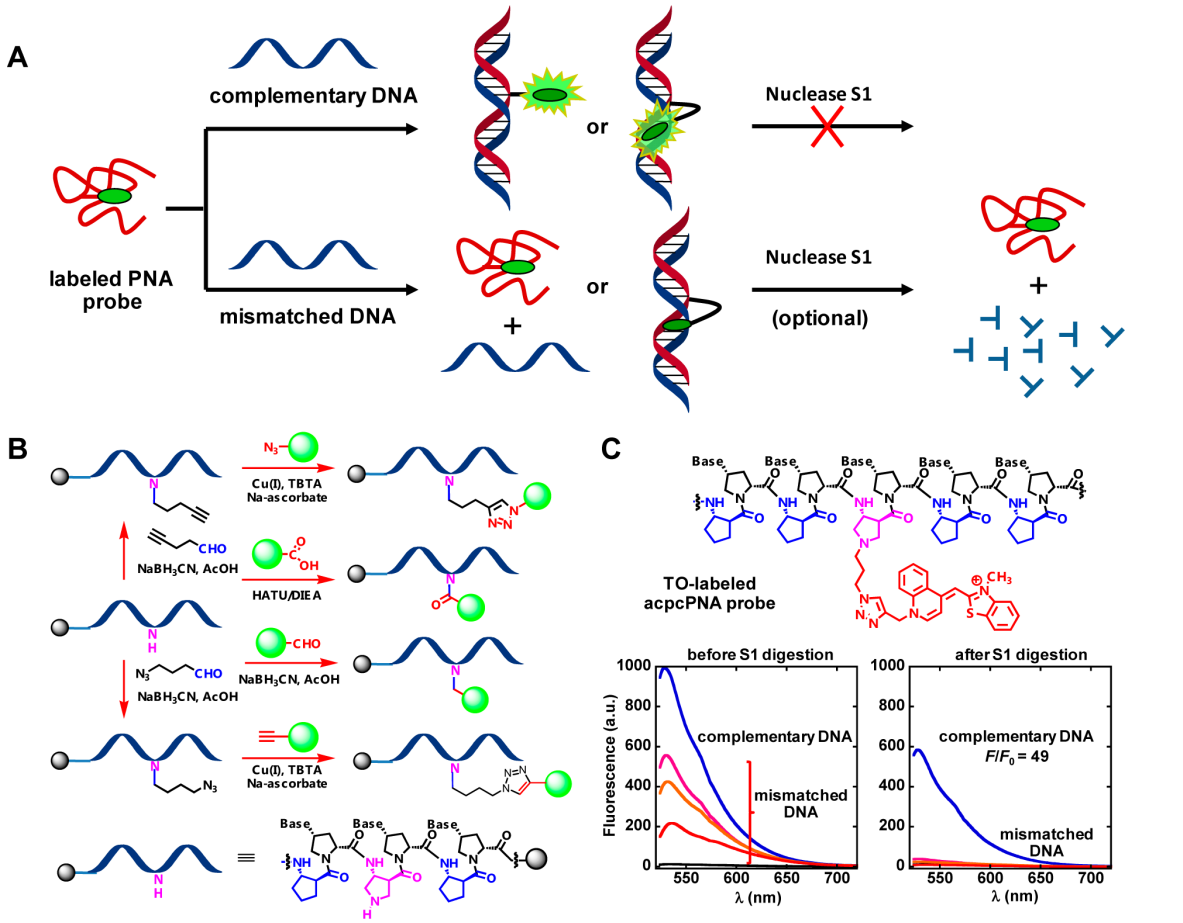


Figure 11. (A) Working principle of self-reporting PNA probes. (B) Strategies for backbone labeling of acpcPNA. Adapted from ref 58. Copyright 2013 American Chemical Society. (C) DNA-hybridization-responsive acpcPNA probes.

DNA). Destabilization of the acpcPNA self-hybrids was believed to be a consequence of the steric bulk of the acpcPNA strands. This hypothesis was experimentally supported by the observation that the less bulky acbcPNA formed considerably more stable self-hybrids than acpcPNA.[35] However, the greater stability of self-hybrids of *epi*-acpcPNA over acpcPNA also suggests the importance of stereochemistry to the self-pairing ability. NMR studies of three-dimensional structures as well as theoretical calculations are currently underway with the aim of further clarifying this issue. The obvious consequence of non-self-pairing PNA is that there is more flexibility in terms of sequence design without the concern of self-complementarity. On the other hand, such PNAs may not be suitable for applications that require self-pairing, such as in the construction of purely PNA-based nanomaterials, but they should still be useful when being used in combination with DNA such as in the development of DNA origami.[3,4]

PNA is among the few synthetic molecules that can recognize structured nucleic acid targets, including dsDNA, in a sequence-specific fashion.[10] In principle, double duplex invasion by PNA allows targeting of dsDNA without being limited to only purine rich regions as in triplex formation or triplex invasion (Figure 10A). However, the extremely high stability of aegPNA·aegPNA duplexes disfavors the double duplex invasion by two complementary strands of aegPNA designed to target the same region of dsDNA. Replacement of the base A with diaminopurine (D) and the base T with 2-thiouracil (U^s) gave "pseudocomplementary" aegPNA having improved DNA invasion ability through destabilization of aegPNA·aegPNA duplexes and stabilization of aegPNA·DNA duplexes (Figure 10B).[46] Nevertheless, such pseudocomplementary base modification exists only for A·T pairs, and therefore, this may not completely suppress self-pairing in G·C-rich aegPNA sequences. In such cases, a combination of base modification and other strategies such as incorporation of positive charges into the aegPNA backbone is necessary.[47] Since acpcPNA is inherently pseudocomplementary, it should be a potential candidate for double duplex invasion of dsDNA without concerns over sequence-related limitations. Although a recent finding showed that unmodified γPNA with sufficient length can directly invade into dsDNA without the need for the complementary PNA strand,[48] invasion by two strands of acpcPNA simultaneously should provide a much larger driving force. It also suggests the possibility of using single-stranded pyrrolidinyl PNA to directly invade into dsDNA in a similar fashion.

DOI: 10.1021/acs.accounts.5b00080
Acc. Chem. Res. 2015, 48, 1645−1656

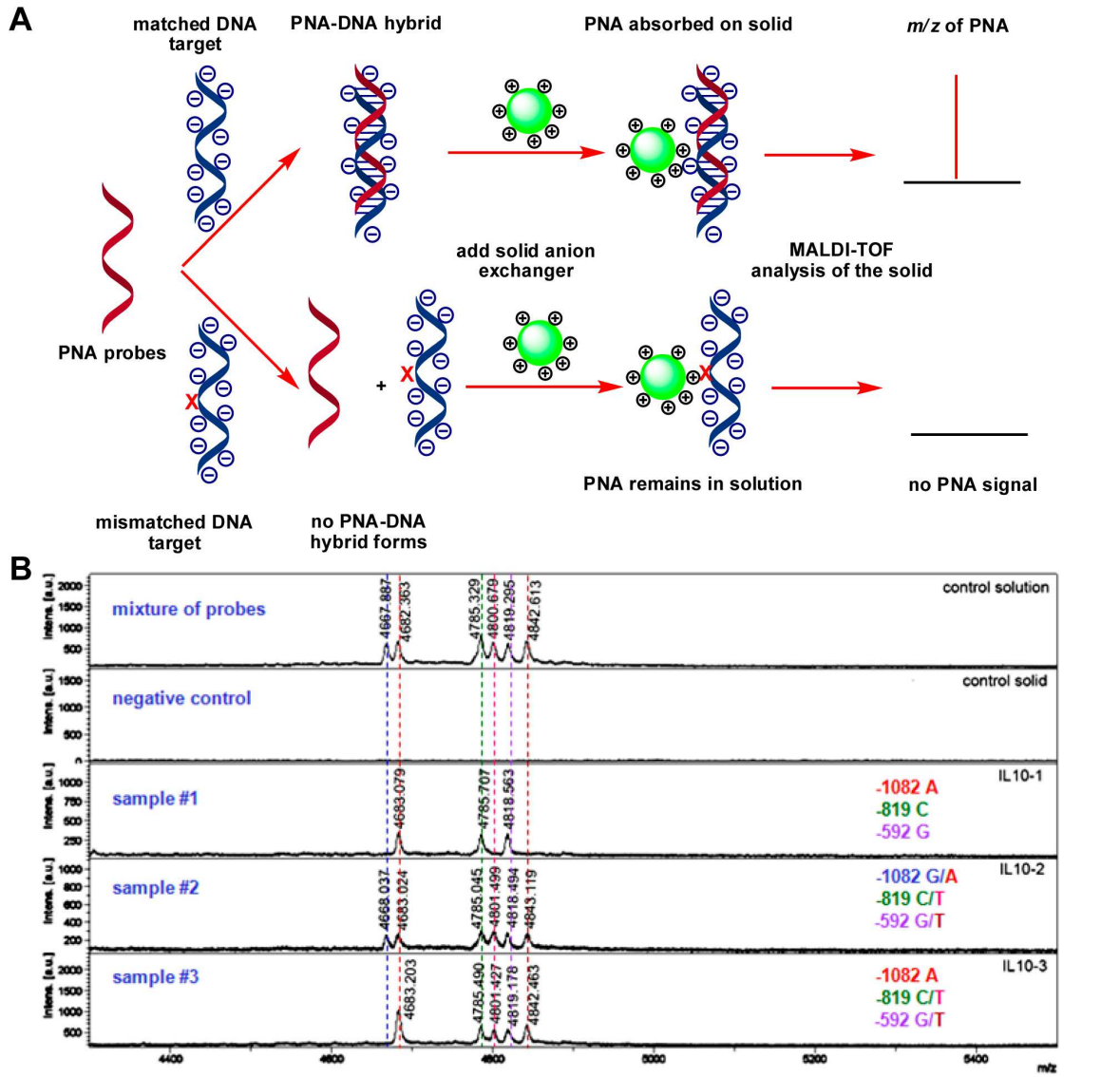


Figure 12. (A) Electrostatic capture of PNA·DNA hybrids. (B) SNP typing of human *IL-10* promotor region by MALDI-TOF analyses of the captured acpcPNA probes. Adapted from ref 63. Copyright 2008 American Chemical Society.

5. APPLICATIONS OF PYRROLIDINYL PNA

5.1. Sensor Probes

The excellent chemical and biological stability, the ability to form stable hybrids at low ionic strength, and the ability to recognize structured nucleic acid targets by strand invasion or triplex formation suggest the promising potential of PNA to improve the performance of nucleic acid biosensors.[49] Excellent mismatch discrimination has been demonstrated in various acpcPNA-based DNA detection platforms, including quartz crystal microbalance (QCM),[50] SPR,[44,51] voltammetric,[52] and capacitive detection.[53,54]

5.2. Self-Reporting Fluorescence Probes

PNA generally adopts a compact structure in aqueous solution, thereby ensuring that dye-labeled single-stranded PNAs have distinctly different environments from duplexes without the requirement of a stem−loop structure as in classical beacons.[55] This, together with the potential for better mismatch discrimination, prompted us to develop self-reporting fluorescence acpcPNA probes (Figure 11A). The ability of PNA to protect DNA from digestion by S1 nuclease offers a unique opportunity to improve the discrimination further.[56]

As an example, 5-pyren-1-yluracil (U^{py}) incorporated into acpcPNA can specifically recognize dA in DNA and provides a strong fluorescence increase at 465 nm upon base pairing (3−42-fold, depending on the sequence).[57] This fluorescence enhancement was interpreted in terms of changes in the local environment and twisting between the pyrene and uracil moieties, which controls the degree of charge transfer.

To facilitate backbone labeling in acpcPNA, (3*R*,4*S*)-3-aminopyrrolidine-4-carboxylic acid (apc) was incorporated into the acpcPNA backbone to create a chimeric apc/acpcPNA. The (3*R*,4*S*)-apc spacer is structurally compatible with the acpcPNA backbone, as shown by the observation of very little

DOI: 10.1021/acs.accounts.5b00080
Acc. Chem. Res. 2015, 48, 1645−1656

destabilization of the apc-containing PNA·DNA duplexes.[36] The inserted apc spacer provides a convenient handle for the introduction of various dyes or labels to the acpcPNA backbone via acylation, reductive alkylation, or click chemistry in a postsynthetic fashion (Figure 11B).[58] Pyrene appended to the acpcPNA backbone through a flexible linker is efficiently quenched by adjacent nucleobases ($T > C > G \gg A$) in the single-stranded acpcPNA. Hybridization with the DNA target restores the fluorescence (2.9−73-fold fluorescence increase). MD simulations suggest that the pyrene is located in the minor groove of the acpcPNA·DNA duplex and thus can no longer interact with the nucleobases.[59]

The unsymmetrical cyanine dye thiazole orange (TO) has been extensively used in combination with aegPNA in light-up[60] and forced intercalation (FIT) probes.[61] acpcPNA with a TO-labeled backbone shows an extremely large fluorescence increase upon hybridization to DNA. Nonspecific binding can be eliminated by S1 nuclease digestion, resulting in excellent mismatch discrimination (Figure 11C).[58] The solvatochromic benzophenoxazine dye Nile red attached to the acpcPNA backbone shows enhanced and blue-shifted fluorescence upon hybridization with DNA. This suggests that the Nile red in the PNA·DNA duplex is located in a more hydrophobic environment than in single-stranded PNA, and the effect may be used to probe local structures of the duplex such as bulge formation.[62]

5.3. DNA Sensing Based on Differential Electrostatic Properties of PNA and DNA

The electrostatically neutral backbone of PNA provides a unique means for the development of novel DNA sensing methods. The different electrostatic properties of acpcPNA and acpcPNA·DNA hybrids allows selective capture of the hybridized PNA probe by a positively charged solid support such as Q-sepharose[63] or polymer-coated magnetite particles.[64] MALDI-TOF mass spectrometry can be used for sensitive detection of the captured PNA probe and hence identification of the DNA sequence in a label-free fashion (Figure 12). The high specificity of acpcPNA allows simultaneous multiplex discrimination of single nucleotide polymorphism (SNP), which can be difficult to achieve with conventional PNA probes.[65]

A similar concept has been applied to the fabrication of a paper-based DNA sensor by functionalization of the cellulose paper with a positively charged polymer brush that can electrostatically capture the DNA sample together with its complementary biotinylated PNA probe. The presence or absence of captured PNA probes, which determines the identity of the DNA sequence, is revealed by an enzymatically amplified colorimetric reaction.[66]

6. CONCLUSION AND OUTLOOK

This Account has highlighted our contribution to the development of conformationally constrained pyrrolidinyl PNAs having α/β-dipeptide backbones. The modular nature of the design enables the rapid synthesis and exploration of the base-pairing properties of these systems. AcpcPNA, a representative member of such pyrrolidinyl PNA systems, binds to DNA with excellent affinity and specificity. In addition, acpcPNA possesses other unique and potentially useful characteristics: strong antiparallel selectivity, the preference for pairing to DNA over RNA, and the unprecedented inability to form self-hybrids. It is important to note that only minor changes in the pyrrolidinyl PNA structure can lead to significantly different base-pairing behaviors, allowing one to fine-tune properties such as self-pairing or RNA binding to suit the desired application. Although the structural contribution of the amino acid part to the binding characteristics of pyrrolidinyl PNA is largely understood, little is known about the effect of the pyrrolidine part, and there are opportunities for improvement. Understanding factors contributing to these unusual behaviors through a combination of structural and theoretical studies will contribute to targeted, tailored "new generation" pyrrolidinyl PNAs with improved/customizable properties. Finally, while diagnostic applications of pyrrolidinyl PNA have been clearly demonstrated, its therapeutic/biological applications[67] and other areas such as functional materials[68] are only emerging. We invite others to join us as we continue to explore the full potential of utilizing acpcPNA and related pyrrolidinyl PNAs in these cutting-edge research areas and beyond.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: vtirayut@chula.ac.th.

Notes

The author declares no competing financial interest.

Biography

Tirayut Vilaivan was born in Bangkok, Thailand, in 1971 and obtained his D.Phil. from Oxford in 1996. He is currently a professor of chemistry at Chulalongkorn University in Bangkok. His research interests involve organic synthesis and its applications to the areas of peptide nucleic acid and medicinal chemistry.

■ ACKNOWLEDGMENTS

The author acknowledges the inspiration provided by the late Prof. Gordon Lowe, FRS, and contributions from members of the research group and collaborators as well as financial support from The Thailand Research Fund and Chulalongkorn University (DPG5780002).

■ REFERENCES

(1) Silverman, S. K. DNA as a Versatile Chemical Component for Catalysis, Encoding, and Stereocontrol. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 7180−7201.

(2) Zhang, F.; Nangreave, J.; Liu, Y.; Yan, H. Structural DNA Nanotechnology: State of the Art and Future Perspective. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 11198−11211.

(3) Rothemund, P. W. K. Folding DNA To Create Nanoscale Shapes and Patterns. *Nature* **2006**, *440*, 297−302.

(4) Saccà, B.; Niemeyer, C. M. DNA Origami: The Art of Folding DNA. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, *51*, 58−66.

(5) Schmidt, M. Xenobiology: A New Form of Life as the Ultimate Biosafety Tool. *Bioessays* **2010**, *32*, 322−331.

(6) Pinheiro, V. B.; Taylor, A. I.; Cozens, C.; Abramov, M.; Renders, M.; Zhang, S.; Chaput, J. C.; Wengel, J.; Peak-Chew, S.-Y.; McLaughlin, S. H.; Herdewijn, P.; Holliger, P. Synthetic Genetic Polymers Capable of Heredity and Evolution. *Science* **2012**, *336*, 341−344.

(7) Nielsen, P. E.; Egholm, M.; Berg, R. H.; Buchardt, O. Sequence-Selective Recognition of DNA by Strand Displacement with a Thymine-Substituted Polyamide. *Science* **1991**, *254*, 1497−1500.

(8) Nielsen, P. E. Peptide Nucleic Acid. A Molecule with Two Identities. *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 624−630.

(9) *Peptide Nucleic Acid: Protocols and Applications*; Nielsen, P. E., Ed.; Horizon Bioscience: Norfolk, U.K., 2004.

(10) Armitage, B. A. The Impact of Nucleic Acid Secondary Structure on PNA Hybridization. *Drug Discovery Today* **2003**, *8*, 222−228.

DOI: 10.1021/acs.accounts.5b00080
Acc. Chem. Res. 2015, 48, 1645−1656

(11) Singhal, A.; Nielsen, P. E. Cross-Catalytic Peptide Nucleic Acid (PNA) Replication Based on Templated Ligation. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 6901−6907.
(12) Plöger, T. A.; von Kiedrowski, G. A Self-Replicating Peptide Nucleic Acid. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 6908−6914.
(13) Sugiyama, T.; Kittaka, A. Chiral Peptide Nucleic Acids with a Substituent in the *N*-(2-Aminoethyl)glycine Backbone. *Molecules* **2013**, *18*, 287−310.
(14) Kumar, V. A.; Ganesh, K. N. Conformationally Constrained PNA Analogues: Structural Evolution toward DNA/RNA Binding Selectivity. *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 404−412.
(15) Pokorski, J. K.; Witschi, M. A.; Purnell, B. L.; Appella, D. H. (*S*,*S*)-*trans*-Cyclopentane-Constrained Peptide Nucleic Acids. A General Backbone Modification That Improves Binding Affinity and Sequence Specificity. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15067−15073.
(16) Govindaraju, T.; Kumar, V. A.; Ganesh, K. N. (*SR*/*RS*)-Cyclohexanyl PNAs: Conformationally Preorganized PNA Analogues with Unprecedented Preference for Duplex Formation with RNA. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4144−4145.
(17) Dragulescu-Andrasi, A.; Rapireddy, S.; Frezza, B. M.; Gayathri, C.; Gil, R. R.; Ly, D. H. A Simple γ-Backbone Modification Preorganizes Peptide Nucleic Acid into a Helical Structure. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10258−10267.
(18) Sahu, B.; Sacui, I.; Rapireddy, S.; Zanotti, K. J.; Bahal, R.; Armitage, B. A.; Ly, D. H. Synthesis and Characterization of Conformationally Preorganized, (*R*)-Diethylene Glycol-Containing γ-Peptide Nucleic Acids with Superior Hybridization Properties and Water Solubility. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 5614−5627.
(19) Sahu, B.; Chenna, V.; Lathrop, K. L.; Thomas, S. M.; Zon, G.; Livak, K. J.; Ly, D. H. Synthesis of Conformationally Preorganized and Cell-Permeable Guanidine-Based γ-Peptide Nucleic Acids (γGPNAs). *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 1509−1516.
(20) Jain, D. R.; Anandi V, L.; Lahiri, M.; Ganesh, K. N. Influence of Pendant Chiral C^{γ}-(Alkylideneamino/Guanidino) Cationic Side-Chains of PNA Backbone on Hybridization with Complementary DNA/RNA and Cell Permeability. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 9567−9577.
(21) Englund, E. A.; Appella, D. H. γ-Substituted Peptide Nucleic Acids Constructed from L-Lysine are a Versatile Scaffold for Multifunctional Display. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 1414−1418.
(22) Jain, D. R.; Ganesh, K. N. Clickable C^{γ}-Azido(methylene/butylene) Peptide Nucleic Acids and Their Clicked Fluorescent Derivatives: Synthesis, DNA Hybridization Properties, and Cell Penetration Studies. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 6708−6714.
(23) Kitamatsu, M.; Takahashi, A.; Ohtsuki, T.; Sisido, M. Synthesis of Pyrrolidine-Based Oxy-Peptide Nucleic Acids Carrying Four Types of Nucleobases and Their Transport into Cytoplasm. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 9659−9666.
(24) Worthington, R. J.; Micklefield, J. Biophysical and Cellular-Uptake Properties of Mixed-Sequence Pyrrolidine−Amide Oligonucleotide Mimics. *Chem.—Eur. J.* **2011**, *17*, 14429−14441.
(25) Lowe, G.; Vilaivan, T. Solid Phase Synthesis of Novel Peptide Nucleic Acids. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1997**, 555−560.
(26) Vilaivan, T.; Suparpprom, C.; Harnyuttanakorn, P.; Lowe, G. Synthesis and Properties of Novel Pyrrolidinyl PNA Carrying β-Amino Acid Spacers. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 5533−5536.
(27) Cheng, R. P.; Gellman, S. H.; DeGrado, W. F. β-Peptides: From Structure to Function. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3219−3232.
(28) Lowe, G.; Vilaivan, T. Amino Acids Bearing Nucleobases for the Synthesis of Novel Peptide Nucleic Acids. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1997**, 539−546.
(29) 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.
(30) Vilaivan, C.; Srisuwannaket, C.; Ananthanawat, C.; Suparpprom, C.; Kawakami, J.; Yamaguchi, Y.; Tanaka, Y.; Vilaivan, T. Pyrrolidinyl Peptide Nucleic Acid with α/β-Peptide Backbone: A Conformationally Constrained PNA with Unusual Hybridization Properties. *Artif. DNA: PNA XNA* **2011**, *2*, 50−59.
(31) Lowe, G.; Vilaivan, T. Dipeptides Bearing Nucleobases for Synthesis of Novel Peptide Nucleic Acids. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1997**, 547−554.
(32) Vilaivan, T.; Lowe, G. A Novel Pyrrolidinyl PNA Showing High Sequence Specificity and Preferential Binding to DNA over RNA. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9326−9327.
(33) Vilaivan, T.; Suparpprom, C.; Duanglaor, P.; Harnyuttanakorn, P.; Lowe, G. Synthesis and Nucleic Acid Binding Studies of Novel Pyrrolidinyl PNA Carrying an *N*-Amino-*N*-methylglycine Spacer. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 1663−1666.
(34) Suparpprom, C.; Srisuwannaket, C.; Sangvanich, 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.
(35) Mansawat, W.; Vilaivan, C.; Balázs, Á.; Aitken, D. J.; Vilaivan, T. Pyrrolidinyl Peptide Nucleic Acid Homologues: Effect of Ring Size on Hybridization Properties. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 1440−1443.
(36) Reenabthue, N.; Boonlua, C.; Vilaivan, C.; Vilaivan, T.; Suparpprom, C. 3-Aminopyrrolidine-4-carboxylic Acid as Versatile Handle for Internal Labeling of Pyrrolidinyl PNA. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 6465−6469.
(37) Shoulders, M. D.; Satyshur, K. A.; Forest, K. T.; Raines, R. T. Stereoelectronic and Steric Effects in Side Chains Preorganize a Protein Main Chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 559−564.
(38) Taechalertpaisarn, J.; Sriwarom, P.; Boonlua, C.; Yotapan, N.; Vilaivan, C.; Vilaivan, T. DNA-, RNA- and Self-Pairing Properties of a Pyrrolidinyl Peptide Nucleic Acid with a (2′*R*,4′*S*)-Prolyl-(1*S*,2*S*)-2-aminocyclopentanecarboxylic Acid Backbone. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 5822−5826.
(39) Morvan, F.; Debart, F.; Vasseur, J.-J. From Anionic to Cationic α-Anomeric Oligodeoxynucleotides. *Chem. Biodiversity* **2010**, *7*, 494−535.
(40) Fernandes, C.; Faure, S.; Pereira, E.; Théry, V.; Declerck, V.; Guillot, R.; Aitken, D. J. 12-Helix Folding of Cyclobutane β-Amino Acid Oligomers. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 3606−3609.
(41) Siriwong, K.; Chuichay, P.; Saen-oon, S.; Suparpprom, C.; Vilaivan, T.; Hannongbua, S. Insight into Why Pyrrolidinyl Peptide Nucleic Acid Binding to DNA Is More Stable than the DNA·DNA Duplex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *372*, 765−771.
(42) Poomsook, N.; Siriwong, K. Structural Properties and Stability of PNA with (2′*R*,4′*R*)- and (2′*R*,4′*S*)-Prolyl-(1*S*,2*S*)-2-aminocyclopentanecarboxylic Acid Backbone Binding to DNA: A Molecular Dynamics Simulation Study. *Chem. Phys. Lett.* **2013**, *588*, 237−241.
(43) Vasudev, P. G.; Chatterjee, S.; Shamala, N.; Balaram, P. Structural Chemistry of Peptides Containing Backbone Expanded Amino Acid Residues: Conformational Features of β, γ, and Hybrid Peptides. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 657−687.
(44) Ananthanawat, C.; Vilaivan, T.; Hoven, V. P.; Su, X. Comparison of DNA, Aminoethylglycyl PNA and Pyrrolidinyl PNA as Probes for Detection of DNA Hybridization Using Surface Plasmon Resonance Technique. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25*, 1064−1069.
(45) Stubinitzky, C.; Vilaivan, T.; Wagenknecht, H.-A. The Base Discriminating Potential of Pyrrolidinyl PNA Demonstrated by Magnetic Fe_xO_y Particles. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 3586−3589.
(46) Lohse, J.; Dahl, O.; Nielsen, P. E. Double Duplex Invasion by Peptide Nucleic Acid: A General Principle for Sequence-Specific Targeting of Double-Stranded DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 11804−11808.
(47) Ishizuka, T.; Yoshida, J.; Yamamoto, Y.; Sumaoka, J.; Tedeschi, T.; Corradini, R.; Sforza, S.; Komiyama, M. Chiral Introduction of Positive Charges to PNA for Double-Duplex Invasion to Versatile Sequences. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 1464−1471.
(48) He, G.; Rapireddy, S.; Bahal, R.; Sahu, B.; Ly, D. H. Strand Invasion of Extended, Mixed-Sequence B-DNA by γPNAs. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 12088−12090.
(49) Briones, C.; Moreno, M. Applications of Peptide Nucleic Acids (PNAs) and Locked Nucleic Acids (LNAs) in Biosensor Development. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *402*, 3071−3089.
(50) Ananthanawat, C.; Vilaivan, T.; Hoven, V. P. Synthesis and Immobilization of Thiolated Pyrrolidinyl Peptide Nucleic Acids on

DOI: 10.1021/acs.accounts.5b00080
Acc. Chem. Res. 2015, 48, 1645−1656

Gold-Coated Piezoelectric Quartz Crystals for the Detection of DNA Hybridization. *Sens. Actuators, B* **2009**, *137*, 215−221.
(51) Ananthanawat, C.; Vilaivan, T.; Mekboonsonglarp, W.; Hoven, V. P. Thiolated Pyrrolidinyl Peptide Nucleic Acids for the Detection of DNA Hybridization Using Surface Plasmon Resonance. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 3544−3549.
(52) Jampasa, S.; Wonsawat, W.; Rodthongkum, N.; Siangproh, W.; Yanatatsaneejit, P.; Vilaivan, T.; Chailapakul, O. Electrochemical Detection of Human Papillomavirus DNA Type 16 Using a Pyrrolidinyl Peptide Nucleic Acid Probe Immobilized on Screen Printed Carbon Electrodes. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *54*, 428−434.
(53) Thipmanee, O.; Samanman, S.; Sankoh, S.; Numnuam, A.; Limbut, W.; Kanatharana, P.; Vilaivan, T.; Thavarungkul, P. Label-Free Capacitive DNA Sensor Using Immobilized Pyrrolidinyl PNA Probe: Effect of the Length and Terminating Head Group of the Blocking Thiols. *Biosens. Bioelectron.* **2012**, *38*, 430−435.
(54) Sankoh, S.; Samanman, S.; Thipmanee, O.; Numnuam, A.; Limbut, W.; Kanatharana, P.; Vilaivan, T.; Thavarungkul, P. A Comparative Study of a Label-Free DNA Capacitive Sensor Using a Pyrrolidinyl Peptide Nucleic Acid Probe Immobilized through Polyphenylenediamine and Polytyramine Non-conducting Polymers. *Sens. Actuators, B* **2013**, *177*, 543−554.
(55) Kuhn, H.; Demidov, V. V.; Coull, J. M.; Fiandaca, M. J.; Gildea, B. D.; Frank-Kamenetskii, M. D. Hybridization of DNA and PNA Molecular Beacons to Single-Stranded and Double-Stranded DNA Targets. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1097−1103.
(56) Komiyama, M.; Ye, S.; Liang, X.; Yamamoto, Y.; Tomita, T.; Zhou, J.-M.; Aburatani, H. PNA for One-Base Differentiating Protection of DNA from Nuclease and Its Use for SNPs Detection. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3758−3762.
(57) Boonlua, C.; Vilaivan, C.; Wagenknecht, H.-A.; Vilaivan, T. 5-(Pyren-1-yl)uracil as a Base-Discriminating Fluorescent Nucleobase in Pyrrolidinyl Peptide Nucleic Acids. *Chem.—Asian J.* **2011**, *6*, 3251−3259.
(58) Ditmangklo, B.; Boonlua, C.; Suparpprom, C.; Vilaivan, T. Reductive Alkylation and Sequential Reductive Alkylation−Click Chemistry for On-Solid-Support Modification of Pyrrolidinyl Peptide Nucleic Acid. *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24*, 614−625.
(59) Boonlua, C.; Ditmangklo, B.; Reenabthue, N.; Suparpprom, C.; Poomsuk, N.; Siriwong, K.; Vilaivan, T. Pyrene-Labeled Pyrrolidinyl Peptide Nucleic Acid as a Hybridization-Responsive DNA Probe: Comparison between Internal and Terminal Labeling. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 8817−8827.
(60) Svanvik, N.; Westman, G.; Wang, D.; Kubista, M. Light-Up Probes: Thiazole Orange-Conjugated Peptide Nucleic Acid for Detection of Target Nucleic Acid in Homogeneous Solution. *Anal. Biochem.* **2000**, *281*, 26−35.
(61) Köhler, O.; Jarikote, D. V.; Seitz, O. Forced Intercalation Probes (FIT Probes): Thiazole Orange as a Fluorescent Base in Peptide Nucleic Acids for Homogeneous Single-Nucleotide-Polymorphism Detection. *ChemBioChem* **2005**, *6*, 69−77.
(62) Yotapan, N.; Charoenpakdee, C.; Wathanathavorn, P.; Ditmangklo, B.; Wagenknecht, H.-A.; Vilaivan, T. Synthesis and Optical Properties of Pyrrolidinyl Peptide Nucleic Acid Carrying a Clicked Nile Red Label. *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 2166−2174.
(63) Boontha, B.; Nakkuntod, J.; Hirankarn, N.; Chaumpluk, P.; Vilaivan, T. Multiplex Mass Spectrometric Genotyping of Single Nucleotide Polymorphisms Employing Pyrrolidinyl Peptide Nucleic Acid in Combination with Ion-Exchange Capture. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 8178−8186.
(64) Theppaleak, T.; Rutnakornpituk, B.; Wichai, U.; Vilaivan, T.; Rutnakornpituk, M. Magnetite Nanoparticle with Positively Charged Surface for Immobilization of Peptide Nucleic Acid and Deoxyribonucleic Acid. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2013**, *9*, 1509−1520.
(65) Griffin, T. J.; Tang, W.; Smith, L. M. Genetic Analysis by Peptide Nucleic Acid Affinity MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Nat. Biotechnol.* **1997**, *15*, 1368−1372.
(66) Laopa, P. S.; Vilaivan, T.; Hoven, V. P. Positively Charged Polymer Brush-Functionalized Filter Paper for DNA Sequence Determination following Dot Blot Hybridization Employing a Pyrrolidinyl Peptide Nucleic Acid Probe. *Analyst* **2013**, *138*, 269−277.
(67) Arayachukiat, S.; Seemork, J.; Pan-In, P.; Amornwachirabodee, K.; Sangphech, N.; Sansureerungsikul, T.; Sathornsantikun, K.; Vilaivan, C.; Shigyou, K.; Pienpinijtham, P.; Vilaivan, T.; Palaga, T.; Banlunara, W.; Hamada, T.; Wanichwecharungruang, S. Bringing Macromolecules into Cells and Evading Endosomes by Oxidized Carbon Nanoparticles. *Nano Lett.* **2015**, *15*, 3370−3376.
(68) Sezi, S.; Varghese, R.; Vilaivan, T.; Wagenknecht, H.-A. Conformational Control of Dual Emission by Pyrrolidinyl PNA−DNA Hybrids. *ChemistryOpen* **2012**, *1*, 173−176.

DOI: 10.1021/acs.accounts.5b00080
Acc. Chem. Res. 2015, 48, 1645−1656

JOC The Journal of Organic Chemistry

Article

pubs.acs.org/joc

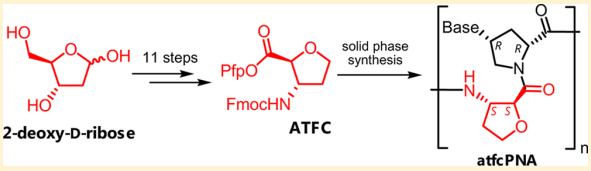
Synthesis and DNA/RNA Binding Properties of Conformationally Constrained Pyrrolidinyl PNA with a Tetrahydrofuran Backbone Deriving from Deoxyribose

Pitchanun Sriwarom, Panuwat Padungros, and Tirayut Vilaivan*

Organic Synthesis Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand

Supporting Information

ABSTRACT: Sugar-derived cyclic β-amino acids are important building blocks for designing of foldamers and other biomimetic structures. We report herein the first synthesis of a C-activated *N*-Fmoc-protected *trans*-(2*S*,3*S*)-3-aminotetrahydrofuran-2-carboxylic acid as a building block for Fmoc solid phase peptide synthesis. Starting from 2-deoxy-D-ribose, the product is obtained in a 6.7% overall yield following an 11-step reaction sequence. The tetrahydrofuran amino acid is used as a building block for a new peptide nucleic acid (PNA), which exhibits excellent DNA binding affinity with high specificity. It also shows preference for binding to DNA over RNA and specifically in the antiparallel orientation. In addition, the presence of the hydrophilic tetrahydrofuran ring in the PNA structure reduces nonspecific interactions and self-aggregation, which is a common problem in PNA due to its hydrophobic nature.

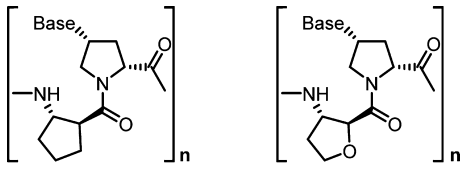


INTRODUCTION

Foldamers are synthetic oligomeric molecules that can mimic naturally occurring biological macromolecules by folding into well-defined secondary structures such as helices, turns, or sheets in solution states.[1] Amino acids, especially cyclic β-amino acids,[2] constitute an important class of building blocks for foldamers.[3] A diverse range of secondary structures were obtained from simple cyclic β-amino acids building blocks with different ring size, stereochemistry, and substituents.[4] The ability to precisely program the folding pattern is not only important from the molecular design aspect but also leads to desirable biological functions. Carbohydrate-derived amino acids[5] have recently attracted much interest as potential building blocks for novel foldamers.[6] It can be readily obtained from inexpensive sources in stereochemically defined configurations and possess a number of functional groups that can be fine-tuned as desired.

Deoxyribonucleoside-derived cyclic β-amino acids have been used in designing nucleobase-containing foldamers,[7] some of which showed promising DNA and RNA binding properties.[7d] These foldamers can therefore be regarded as a new class of peptide nucleic acid (PNA).[8,9] Our research group had introduced a series of conformationally constrained pyrrolidinyl peptide nucleic acids derived from alternating nucleobase-modified D-proline and cyclic β-amino acids.[10,11] A representative member of such pyrrolidinyl PNA is acpcPNA (Scheme 1) which carries *trans*-(1*S*,2*S*)-2-aminocyclopentanecarboxylic acid (ACPC) in the backbone.[10b,d] This acpcPNA showed some distinct properties from DNA and commercial PNA that could be useful for many applications.[12] A recent study on ring homologues suggested that four- or five-membered ring cyclic β-amino acids with specific configurations are essential to provide a balance between rigidity and flexibility that allows the PNA to adopt a DNA-binding conformation.[10e] In addition to ACPC, other five-membered ring heterocyclic β-amino acids had been successfully incorporated into pyrrolidinyl PNA, including 1-aminopyrrolidine-2-carboxylic acid[10a] and 3-aminopyrrolidine-4-carboxylic acid.[10c]

Scheme 1. Structures of acpcPNA and atfcPNA



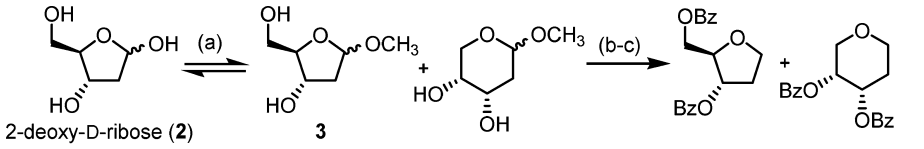
In view of the structural similarity between 3-aminotetrahydrofuran-2-carboxylic acid (ATFC) and ACPC, it is not surprising that oligomers of ATFC and its ring-substituted derivatives can also form well-defined helical foldamers.[13] Oligomers of *trans*-ATFC formed a 12-helix similar to *trans*-ACPC. On the other hand, the *cis*-isomer adopted a 14-helix structure instead of the extended sheetlike structure of *cis*-ACPC, which was explained based on molecular modeling studies by a more favorable interaction between the less sterically hindered ring of ATFC and the backbone amide group.[13a] We propose that replacement of ACPC in the acpcPNA backbone with *trans*-ATFC should provide a new pyrrolidinyl PNA that can still retain the excellent nucleic acid

Received: April 21, 2015
Published: June 17, 2015

ACS Publications © 2015 American Chemical Society

DOI: 10.1021/acs.joc.5b00890
J. Org. Chem. 2015, 80, 7058−7065

Scheme 2. Structural Assignment of Methyl Glycoside Mixture by Conversion into Their 1-Deoxy Perbenzoylated Derivatives



Reaction conditions: (a) methanesulfonic acid, MeOH, time, rt; (b) BzCl, Et_3N, CH_2Cl_2, 0 °C to rt; (c) Et_3SiH, $BF_3{\cdot}OEt_2$, 0 °C to rt

rxn. time	furanose : pyranose
12 h	1.5 : 1
30 min	4 : 1

binding characteristics of acpcPNA. Moreover, it is expected that the more hydrophilic nature of tetrahydrofuran ring in ATFC as opposed to the cyclopentane ring in ACPC should be beneficial in reducing self-aggregation and nonspecific interactions occasionally observed in acpcPNA and other PNA systems due to their uncharged and hydrophobic peptide backbone.[14] Herein, we report the synthesis of a new pyrrolidinyl PNA with an ATFC backbone (will be named atfcPNA, Scheme 1) and a comparison with acpcPNA in terms of DNA/RNA binding properties and nonspecific binding behavior.

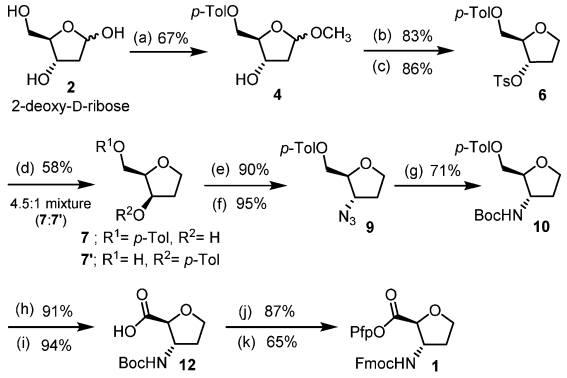
RESULTS AND DISCUSSION

Synthesis of Deoxyribose-Derived Cyclic *β*-Amino Acid (*SS*-ATFC). Our previous reports on the effects of stereochemistry of acpcPNA on DNA binding[11] suggests that the appropriately protected (2*S*,3*S*) enantiomer of the *trans*-ATFC (*SS*-ATFC) is required as a key building block. Interestingly, this particular configuration of ATFC is unknown in the literature despite some reports on the remaining stereoisomers.[13a] We proposed that the required *SS*-ATFC monomer **1** should be readily synthesized starting from commercially available 2-deoxy-D-ribose (**2**). The key steps involved reductive removal of the anomeric hydroxyl group, stereospecific introduction of the amino group by a double inversion of configuration at C-3, and oxidation of the C-5 alcohol to the carboxylic acid.

With this synthetic strategy in mind, the anomeric hydroxyl group of 2-deoxy-D-ribose (**2**) was first converted to its methylglycoside derivative in the presence of an acid catalyst (Scheme 2).[15,16] It should be noted that the reaction time played an important role for the outcome of the reaction.[17] ^{1}H NMR analysis of the product mixture was simplified by perbenzoylation followed by reduction of the anomeric methyl ether with $BF_3{\cdot}Et_2O/Et_3SiH$.[18] Prolonged treatment of **2** with catalytic methanesulfonic acid in MeOH (12 h) provided a 1.5:1 mixture of furanoside **3** and the thermodynamically more stable pyranoside. However, immediate quenching of the reaction after consumption of the starting material (ca. 30 min) afforded the methylfuranoside **3** as the major product (>80% of the crude reaction mixture).

With the optimized conditions in hand, 2-deoxy-D-ribose (**2**) was smoothly converted to methylfuranoside **3** followed by selective protection[19] of the C-5 primary hydroxyl group as the *p*-toluoyl ester to afford furanoside **4** in 67% yield over 2 steps (Scheme 3). Removal of the anomeric methoxy group by treatment with $BF_3{\cdot}Et_2O/Et_3SiH$ was previously reported on a fully protected 2-deoxyribose derivative,[18] and thus it was uncertain if these conditions would be compatible with the unprotected C-3 hydroxyl group of furanoside **4**. It was envisioned that the C-3 hydroxyl group could be "protected" as a sulfonate ester prior to the anomeric reduction. Gratifyingly,

Scheme 3. Synthesis of *SS*-ATFC Starting from 2-Deoxy-D-ribose (2)



Reaction conditions: (a) i) methanesulfonic acid (cat), MeOH, rt, 30 min, ii) p-toluoyl chloride, pyridine, CH_2Cl_2, 0 °C (b) p-TsCl, DMAP (cat), Et_3N, CH_2Cl_2, 0 °C to rt (c) Et_3SiH, $BF_3{\cdot}OEt_2$, 0 °C to rt (d) $NaNO_2$, DMSO, 120 °C (e) MsCl, DMAP (cat), Et_3N, CH_2Cl_2, 0 °C (f) NaN_3, DMSO, 90-100 °C (g) Pd/C, H_2 (1 atm), Boc_2O, MeOH (h) LiOH, THF:H_2O (1:1), rt (i) TEMPO (cat), BAIB, MeCN:H_2O (1:1), rt (j) i) TFA:CH_2Cl_2 (1:1) ii) FmocOSu, $NaHCO_3$, MeCN:H_2O (1:1), pH 8, rt (k) PfpOTfa, DIEA, CH_2Cl_2

the furanoside **4** was tosylated to afford **5** in 83% yield, and the anomeric methoxy group was successfully reduced to provide intermediate **6** in 86% yield.

We next focused on the nucleophilic displacement of the tosylated furanoside **6**. The nitrite ion ($NaNO_2$) is relatively overlooked as an oxygen nucleophile for the stereochemical inversion of a hydroxyl group. It has been successfully employed in the inversion of various alcohols including carbohydrate derivatives.[20] The nucleophilic substitution of furanoside **6** with excess $NaNO_2$ at 120 °C for 5 h provided a 1:1 mixture of the expected inverted alcohol **7** and a side-product **7′** resulting from migration of the *p*-toluoyl group to the neighboring inverted C-3 hydroxyl group in moderate yield. Shortening the reaction time to 2 h gave a 4.5:1 regioisomeric mixture of **7**:**7′** in 58% yield. The sterically hindered C-3 hydroxyl group of **7** is much less reactive than the free C-5 hydroxyl group of **7′**, and therefore, benzoylation of the mixture facilitated the chromatographic purification of unreacted **7** from benzoylated **7′** in 89% recovery yield.

The C-3 hydroxyl group of **7** was next converted to the mesylate **8** in 90% yield. It is worth noting that attempts to perform Mitsunobu reaction of furanoside **4** with MeOTs or methanesulfonic acid to yield the mesylate with inverted configuration at C-3 gave only complex mixtures.[21] Reaction of **8** with excess NaN_3 at 90−100 °C for 2 h gave the expected azide **9** in 95% yield. Hydrogenation of **9** in the presence of Boc_2O gave the Boc-protected amine **10** in 71% yield as a white solid. Hydrolysis of *p*-toluoyl group in **10** followed by BAIB-TEMPO[22] oxidation gave the Boc-protected amino acid **12** in high yield. Treatment with trifluoroacetic acid (TFA) liberated

DOI: 10.1021/acs.joc.5b00890
J. Org. Chem. 2015, 80, 7058−7065

Table 1. Sequence and Characterization Data of atfcPNA

PNA	sequence (N→C)	N/C-terminal modification	t_R min[a]	m/z (calcd)[b]	m/z (found)[c]	yield %[d]
T9	TTTTTTTTT	Ac/LysNH$_2$	30.6	3198.2	3197.1	44
M10	GTAGATCACT	Ac/LysNH$_2$	25.1	3578.6	3578.4	22
M10Flu	GTAGATCACT	Flu/LysNH$_2$	28.4, 29.2	3894.8	3893.3	15
M10AT	TATGTACTAT	Bz/LysNH$_2$	29.1	3630.6	3630.7	20
M10CG	GCTACGTCGC	Bz/LysNH$_2$	28.1	3617.6	3617.9	10

[a]HPLC conditions: C18 column, 4.6 × 50 mm, 3 μ, gradient 0.1% TFA in H$_2$O:MeOH 90:10 for 5 min then linear gradient to 10:90 over 30 min, flow rate 0.5 mL/min, 260 nm. [b]Average mass of M + H$^+$. [c]MALDI-TOF. [d]Isolated yield after HPLC purification, spectrophotometrically determined.

Table 2. T_m of atfcPNA/acpcPNA and DNA/RNA

PNA (N→C)	DNA or RNA (5′→3′)	T_m atfcPNA (ΔT_m)[a]	T_m acpcPNA (ΔT_m)[a,b]	note
GTAGATCACT (**M10**)	dAGTGATCTAC	52.5	53.3	complementary DNA
	dAGTG<u>C</u>TCTAC	23.4 (−29.1)	23.8 (−29.5)	mismatched DNA
	dAGTG<u>G</u>TCTAC	23.4 (−29.1)	23.9 (−29.4)	mismatched DNA
	dAGTG<u>T</u>TCTAC	25.4 (−27.1)	29.4 (−23.9)	mismatched DNA
	dCATCTAGTGA	<20	<20	parallel DNA
	rAGUGAUCUAC	36.0	42.3	complementary RNA
	rAGUG<u>C</u>UCUAC	<20	23.6 (−18.7)	mismatched RNA
	rAGUG<u>G</u>UCUAC	<20	24.8 (−17.5)	mismatched RNA
	rAGUG<u>U</u>UCUAC	<20	<20	mismatched RNA
	rCAUCUAGUGA	<20	<20	parallel RNA
TATGTACTAT (**M10AT**)	dATAGTACATA	49.6	54.2	complementary DNA
	dATAG<u>A</u>ACATA	25.4 (−24.2)	23.4 (−30.8)	mismatched DNA
	dATAG<u>C</u>ACATA	30.2 (−19.4)	30.2 (−24.0)	mismatched DNA
	dATAG<u>G</u>ACATA	<20	24.4 (−29.8)	mismatched DNA
	dATACATGATA	<20	<20	parallel DNA
	rAUAGUACAUA	29.2	32.6	complementary RNA
	rAUACUAGAUA	<20	<20	parallel RNA
GCTACGTCGC (**M10CG**)	dGCGACGTAGC	56.4	54.5	complementary DNA
	dGCGA<u>A</u>GTAGC	23.4 (−33.0)	<20	mismatched DNA
	dGCGA<u>G</u>GTAGC	31.2 (−25.2)	30.2 (−24.3)	mismatched DNA
	dGCGA<u>T</u>GTAGC	36.0 (−20.4)	35.1 (−19.4)	mismatched DNA
	dCGATGCAGCG	<20	<20	parallel DNA
	rGCGACGUAGC	41.8	48.0	complementary RNA
	rCGAUGCAGCG	24.4 (−17.4)	39.2 (−8.8)	parallel RNA

[a]All T_m were measured at PNA = 1 μM, 100 mM NaCl, 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, heating rate 1 °C/min; and $\Delta T_m = T_m - T_m^{\text{complementary hybrid}}$ [b]The T_m data of acpcPNA are provided for comparison purposes. Except for the mismatched hybrids of **M10AT** and **M10CG**, T_m data of all acpcPNA hybrids were taken from ref 10d. Mismatch positions in DNA sequence are indicated by the underline.

the free amino acid which was further reacted with FmocOSu to give the desired Fmoc-protected amino acid **13** in 87% yield over 2 steps. Finally, the Fmoc-protected amino acid **13** was activated as its pentafluorophenyl (Pfp) ester **1** in 65% yield. The presence of the Pfp group was confirmed by ^{19}F NMR analysis. In summary, the target cyclic β-amino acid spacer (*SS*-ATFC) **1** was successfully synthesized from commercially available 2-deoxy-D-ribose (**2**) in a straightforward fashion over 11 steps in 6.7% overall yield.

Synthesis of atfcPNA. Four different sequences of atfcPNA (**T9**, **M10**, **M10AT**, and **M10CG**) were synthesized from the activated *SS*-ATFC spacer **1** and the four Fmoc-protected pyrrolidinyl PNA monomers (A^{Bz}, T, C^{Bz}, and G^{Ibu}) following the stepwise coupling protocol for Fmoc solid phase synthesis of PNA previously developed in our laboratory (Table 1).[10b] The atfcPNA sequences were end-capped at the *N*-termini by acetylation or benzoylation. In addition, an atfcPNA sequence (**M10**) was also end-capped with 5(6)-carboxyfluorescein to yield a **M10Flu** sequence in order to study nonspecific interactions. All atfcPNAs were purified by reverse phase HPLC and their identities were confirmed by MALDI-TOF mass spectrometry. In all cases, the PNAs were obtained with >90% purity, except for the **M10Flu** sequence which is split into two peaks on the HPLC chromatogram due to the presence of two carboxyfluorescein isomers. Isolated yields in the range of 10−44% were obtained, depending on the sequence. The poor isolated yields, which are typical for most solid phase syntheses, are attributed to the loss of product during HPLC purification due to separation issues rather than the synthetic efficiency. All PNAs are readily soluble in water (>1 mM). The sequences and characterization data of all atfcPNA are summarized in Table 1.

DNA and RNA Binding Properties of atfcPNA. Preliminary DNA binding studies were performed on the **T9** sequence. Since homopyrimidine/homopurine PNA sequences are known to form triplex structures, it is important to first determine the stoichiometry of binding. This was accomplished by UV titration (Figure S22 of the Supporting Information), which clearly confirms a 1:1 stoichiometry of atfcPNA:DNA as shown by the inflection point at ca. 50 mol % DNA. This is in agreement with other pyrrolidinyl PNA, whereby no $(PNA)_2$·

DOI: 10.1021/acs.joc.5b00890
J. Org. Chem. 2015, 80, 7058−7065

DNA triplex formation could be observed, presumably due to the bulkiness of the pyrrolidinyl PNA backbone.

Melting temperature measurements by UV spectrophotometry suggest that the **T9** atfcPNA binds cooperatively to its complementary DNA (dA_9), giving well-defined melting curves with melting temperatures (T_m) of 60.3 and 64.1 °C (in the presence and absence of 100 mM NaCl, respectively). These T_m figures are somewhat lower than the corresponding **T9** acpcPNA (T_m = 72.5 and >76.8 °C, in the presence and absence of 100 mM NaCl, respectively).[10d,e] Nevertheless, it is clear that **T9** atfcPNA can form a stable hybrid with its complementary DNA. In the presence of a mismatched base in the DNA strand, the T_m was dramatically decreased (−21.6, −21.9, and −31.8 °C for pT-dC, pT-dT, and pT-dG mismatches, respectively). The large decrease of T_m suggests that the atfcPNA binds to DNA with high specificity similar to that of acpcPNA.

Next, the DNA and RNA binding properties of mixed base atfcPNA were investigated and compared with the corresponding acpcPNA sequences (Table 2). Three sequences with different G+C content were compared (%G+C content: **M10AT** = 20; **M10** = 40; and **M10CG** = 70). As shown in Table 2, all atfcPNA sequences showed a strong DNA binding affinity, and specifically in antiparallel orientation similar to acpcPNA. They also exhibit very high sequence specificity as shown by a large decrease in T_m values of mismatched compared to the complementary hybrids ($\Delta T_m \sim 19–33$ °C), which are in the same range as acpcPNA ($\Delta T_m \sim 19–31$ °C) and are much more discriminating than aegPNA.[11] It is interesting to note that while acpcPNA·DNA hybrids did not show a definite relationship between T_m and the base composition,[10d] the T_m of atfcPNA showed a normal correlation with base composition (i.e., the T_m is increased with %G+C content). Further studies are clearly required in order to understand the basis of different behaviors between the two PNA systems, but it is beyond the scope of the present study.

In addition to DNA, atfcPNA can also bind to RNA in an antiparallel fashion, albeit with much lower affinity compared to the corresponding antiparallel DNA. Parallel hybrids with RNA were observed in G+C-rich sequences for both atfcPNA and acpcPNA, but the parallel hybrid was much less stable than the antiparallel hybrid, especially in the case of atfcPNA. Moreover, the RNA binding was highly sequence-specific as shown by a large decrease of T_m value in the presence of mismatched RNA targets. The normal correlation between T_m and base composition was again observed in atfcPNA·RNA hybrids. In addition, atfcPNA exhibits a greater selectivity for binding to DNA over RNA than acpcPNA as shown by the larger T_m difference between atfcPNA·RNA and atfcPNA·DNA hybrids (−20.4, −16.5, and −14.6 °C for **M10AT**, **M10**, and **M10CG**, respectively) compared to acpcPNA·RNA and acpcPNA·DNA hybrids (−21.6, −11.0, and −6.5 °C for **M10AT**, **M10**, and **M10CG**, respectively). Smaller differences were observed at higher G+C content in both PNA systems. The results suggest that atfcPNA and acpcPNA cannot effectively adjust themselves to the more limited conformational space of RNA duplexes exerted by the 2′-hydroxyl group in RNA, and that there are subtle differences between structures of A+T-rich and G+C-rich sequences.

Circular dichroism (CD) spectroscopy was also used to study the binding between the **T9** atfcPNA and DNA (Figure 1a). The **T9** atfcPNA exhibited weak CD signals in single-stranded form. The only prominent features were the positive band at 210 nm and a very small negative band at 280 nm. The single-stranded dA_9 DNA showed two minima at 206 and 250 nm and maxima at 220, 232 (shoulder), and 275 nm. Upon hybrid formation, the negative band at 250 nm was markedly intensified and shifted to a slightly shorter wavelength (248 nm). Moreover, significant changes were observed in the nucleobase absorption region (260–300 nm) as shown by the appearance of a new negative band at 268 nm and a positive band at 285 nm. These probably reflect a change in the orientation of the nucleobase, most likely as a result of base–base pairing and stacking in the atfcPNA·DNA duplex. The overall shape of the CD spectrum of atfcPNA·DNA hybrid is quite similar to the corresponding acpcPNA·DNA and DNA·DNA hybrid.[10b,d] It is therefore reasonable to assume that these hybrids adopt similar right-handed helical conformations. Heating caused the CD signal to return to the sum of the single-stranded components (Figure S23 of the Supporting Information). A plot of the CD signal at 248 nm as a function of temperature gave a sigmoidal curve (Figure S23 of the Supporting Information, inset). From this CD melting curve, a CD T_m of around 60 °C was obtained which is in good agreement to the T_m obtained by UV–vis spectrophotometry.

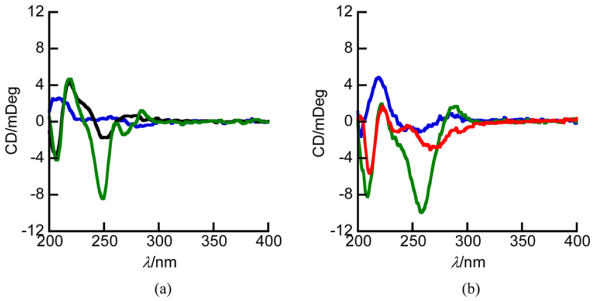


Figure 1. CD spectra of (a) **T9** atfcPNA (blue), dA_9 (black), and their 1:1 hybrid (green) and (b) **M10CG** atfcPNA (blue) and its hybrids with antiparallel DNA (green) or antiparallel RNA (red). Conditions: PNA = DNA = 2.5 μM in 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) and 100 mM NaCl at 20 °C.

In contrast to the homothymine sequence, CD spectra of single-stranded mixed base atfcPNA suggested pronounced intrastrand base stacking (Figure 1b, see also Figures S28–S30 of the Supporting Information). The CD spectra are remarkably similar to single-stranded DNA as shown by a negative band at 205 nm, a strong positive band at 220 nm, a negative band at 256–260 nm, and a positive band around 280 nm with a crossover point around 267–273 nm.[23] Hybridization with antiparallel DNA did not change the overall shape of the CD spectra. However, the negative band at 260 nm became more intense and slightly shifted toward a longer wavelength. These are in agreement with tightening of the helical pitch after duplex formation.[14] The effect is most clearly observed in the G+C-rich sequence **M10CG**. The overall shape of the CD spectra of atfcPNA·DNA hybrids corresponds to the B-form of DNA·DNA duplexes.[24] On the other hand, CD spectra of atfcPNA·RNA hybrids exhibited distinct features in the 250–300 nm region (Figure 1b, see also Figures S28–S30 of the Supporting Information). A positive band was observed between 245–256 nm together with a negative band with minima around 265 nm. This suggests that the atfcPNA·DNA and atfcPNA·RNA hybrids adopt different conformations, which could contribute to their different stabilities.

DOI: 10.1021/acs.joc.5b00890
J. Org. Chem. 2015, 80, 7058–7065

The shorter C−O bond as well as the presence of lone pair electrons in atfcPNA resulted in reduced steric effects compared to acpcPNA. It may also provide an additional potential hydrogen-bonding site and repulsion with the negatively charged phosphate group in the DNA/RNA strand. These factors could potentially contribute to the subtle difference in nucleic acid binding properties of atfcPNA and acpcPNA. An NMR study of oligomers of the opposite enantiomer (2*R*,3*R*) of *trans*-atfc suggested torsional angle (θ) values in the range of 52−64° based on coupling constant ($^3J_{H-H}$) analyses.[13a] These values are much smaller than the optimal values obtained from MD simulations of acpcPNA·DNA hybrids (99−102°).[11] The fact that atfcPNA can still form stable hybrids with DNA suggests that the tetrahydrofuran ring should be sufficiently flexible to adopt the required torsional angle. On the basis of NMR experiments, no evidence of intramolecular hydrogen bonding between the amide bonds and the oxygen atom of the atfc ring was observed in *trans*-atfc oligomers.[13a] However, this does not rule out the possibilities of interstrand hydrogen bonding and/or additional interactions such as repulsion with the phosphate group of DNA or RNA. The absence of detailed three-dimensional structures of atfcPNA and its DNA/RNA hybrids precludes us from drawing a more definite conclusion.

Solubility and Nonspecific Binding Properties of atfcPNA versus acpcPNA. It was expected that the replacement of the cyclopentane ring in acpcPNA with the hydrophilic tetrahydrofuran ring in atfcPNA should result in a less hydrophobic PNA backbone. The more polar nature of atfcPNA is evidenced in the decreased retention time from reverse-phase HPLC analyses (**T9**: atfcPNA 30.6 min, acpcPNA 33.3 min; **M10**: atfcPNA 25.1 min, acpcPNA 30.0 min) (Figures S14, S19, S15, and S20 of the Supporting Information). Due to the small synthesis scale, it was not possible to directly compare the solubility because all lysine-modified PNA sequences are readily soluble in water and saturation could not be achieved. Acetylation of the C-terminal lysine modifier allowed the comparison of solubility between **T9** acpcPNA and atfcPNA. Unfortunately, the solubility of **T9** atfcPNA was only marginally improved (425 ± 21 μM or ca. 1.4 mg/mL) over **T9** acpcPNA (348 ± 10 μM or ca. 1.1 mg/mL). This unexpected solubility behavior might be interpreted in terms of a combination between stable packing of the PNA molecules in the solid state and unfavorable entropy of dissolution as proposed to explaining the low aqueous solubility of cellulose[25] and cyclodextrins.[26]

Similar to conventional PNA,[14] nonspecific binding with hydrophobic materials was occasionally observed with acpcPNA. This becomes a serious problem when the PNA is modified with one or more hydrophobic dyes. To compare the nonspecific binding behaviors of atfcPNA and acpcPNA, *N*-terminal fluorescein-labeled atfcPNA and acpcPNA **M10Flu** were synthesized and compared. Both fluorescein-labeled PNAs form stable hybrids with their complementary DNA target with T_m of 45.7 and 46.7 °C, respectively. The nonspecific adsorption of the fluorescein-labeled PNAs by two different brands of polypropylene plastic tubes were investigated (Figure 2a). Fluorescence measurements of PNA solutions (50 nM) were recorded before and after repeated transfer between the plastic tube and the cuvette until there was no further change in the fluorescence intensity. It was observed that the acpcPNA signal decreased quite significantly (80.1 ± 3.6 and 53.3 ± 2.3% of the original value for brands 1 and 2, respectively), while the atfcPNA signal does not change as much (95.8 ± 3.6 and 105.8 ± 1.4% of the original value for brands 1 and 2, respectively).

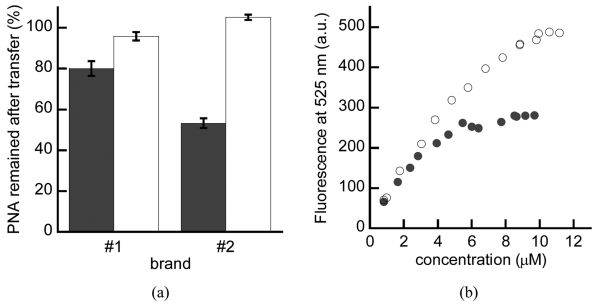


Figure 2. Comparison of fluorescein-labeled acpcPNA (gray) and atfcPNA (white) (**M10Flu**) for (a) nonspecific adsorption onto polypropylene microcentrifuge tube and (b) self-aggregation as demonstrated by fluorescence spectrophotometry.

Reduction of the nonspecific self-aggregation of **M10Flu** atfcPNA was further demonstrated by fluorescence spectroscopy (Figure 2b). At low concentrations (≤1 μM), both PNAs showed comparable fluorescence. However, at higher concentrations, the fluorescence of **M10Flu** acpcPNA was significantly lower and reached a plateau at concentrations above 5 μM due to self-aggregation of the PNA, resulting in self-quenching of the fluorescein label. The same leveling effect was also observed in **M10Flu** atfcPNA but at twice as high a concentration. Accordingly, at 10 μM, the fluorescence of **M10Flu** atfcPNA is 70% brighter than acpcPNA at the same concentration. Addition of complementary DNA to **M10Flu** acpcPNA and to atfcPNA restored the fluorescence of both PNAs to the same level due to repulsion between the negatively charged PNA·DNA hybrids, which separated the fluorescein dyes from each other. These results support the beneficial effects of the hydrophilic ATFC spacer in reducing nonspecific interactions of pyrrolidinyl PNA, which should further expand the applications of these PNAs.

■ CONCLUSION

In conclusion, we report an efficient synthesis of Fmoc-protected tetrahydrofuran cyclic-β-amino acid from 2-deoxy-D-ribose. The cyclic amino acid was successfully incorporated as a building block for synthesizing a new tetrahydrofuran-containing pyrrolidinyl PNA (atfcPNA). This novel atfcPNA retained the excellent DNA binding affinity and specificity of pyrrolidinyl PNA, with improved selectivity toward hybridization to DNA over RNA, a fact that is interesting in its own right and should deserve further investigation in the context of development of a selective DNA binding agent. In addition, the hydrophilic tetrahydrofuran backbone provided beneficial effects in reducing nonspecific interactions and self-aggregation generally observed in acpcPNA and most other PNA systems.

■ EXPERIMENTAL SECTION

General Methods. All chemicals were purchased from commercial sources and were used as received without further purification. Solvents were dried over CaH_2 or 4 Å molecular sieves and then freshly distilled under argon prior to use. IR spectra were acquired on a FT-IR spectrometer using either attenuated total reflection (ATR) or transmission module. Optical rotations ($[\alpha]_D$) were measured at the specified temperature using sodium light (D line, 589.3 nm); concentrations (c) are reported as g/100 mL. ^{1}H and ^{13}C NMR spectra were recorded at 400 and 100 MHz, respectively. High-

DOI: 10.1021/acs.joc.5b00890
J. Org. Chem. 2015, 80, 7058−7065

resolution mass spectra (HRMS) were recorded in electrospray ionization-time-of-flight (ESI-TOF) mode. MALDI-TOF mass spectra of all atfcPNAs were obtained in linear positive ion mode using α-cyano-4-hydroxy cinnamic acid (CCA) as a matrix.

*Methyl 2-Deoxy-D-ribofuranoside (**3**) (Mixture of α and β Anomers).* Methyl 2-deoxy-D-ribofuranoside **3** was synthesized according to the literature procedure with a slight modification on the catalyst quantity and reaction time.[16,17] 2-Deoxy-D-ribose (11.4 g, 85.0 mmol) was dissolved in anhydrous methanol (55 mL) under a nitrogen atmosphere, and then methanesulfonic acid (0.27 mL, 4.16 mmol) was added at room temperature. The reaction reached completion after stirring for 30 min at room temperature as confirmed by TLC analysis (CH_2Cl_2:MeOH 9:1, *p*-anisaldehyde stain; R_f = 0.42). The reaction was then quenched by portionwise addition of 4-(*N*,*N*-dimethylamino)pyridine (DMAP) (1.02 g, 8.35 mmol). The reaction mixture was concentrated under reduced pressure by azeotropic distillation with toluene to afford a brown syrup (14.15 g, >90% purity by TLC), which was used for the next steps without further purification.

*Methyl 5-O-p-toluoyl-2-deoxy-D-ribofuranoside (**4**) (Mixture of α and β Anomers).* *p*-Toluoyl chloride (13 mL, 98.3 mmol) dissolved in anhydrous CH_2Cl_2 (20 mL) was added dropwise to a solution of crude **3** (prepared from 85.0 mmol of **2**) in 1:3 anhydrous pyridine/CH_2Cl_2 (80 mL) at 0 °C and stirred for 5 h. The reaction mixture was then diluted with CH_2Cl_2 (20 mL) and washed with cold H_2O (2 × 50 mL) and 5% aqueous $CuSO_4$. The combined organic extracts were washed with saturated $NaHCO_3$ (2 × 50 mL), followed by 2 M HCl (2 × 50 mL), and then dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure to afford a brown syrup (21.64 g). The crude product was purified by column chromatography on silica gel to yield compound **4** as a colorless oil (15.1 g, 56.8 mmol, 67% yield from **2**). TLC analysis (hexanes:EtOAc 3:2; *p*-anisaldehyde stain; R_f = 0.27). $[\alpha]_D^{24}$ +67° (*c* 0.5, $CHCl_3$). IR (thin film): 3467.5, 2949.5, 2917.7, 2828.0, 1716.7, 1609.7, 1447.6, 1268.2, 1181.4, 1077.2, 842.8, 758.8 cm^{-1}. ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) (major isomer): δ 7.92 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.25 (d, *J* = 8.1 Hz, 4H), 5.16 (m, 1H), 4.32−4.41 (m, 3H), 4.26 (m, 1H), 3.42 (s, 3H), 3.01 (m, 1H), 2.43 (s, 3H), 2.20 (m, 1H), 2.08 (m, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) (major isomer): δ 166.4, 143.9, 129.7, 129.1, 127.0, 105.5, 85.1, 73.1, 64.4, 54.9, 40.9, 21.6. HRMS (ESI+): *m*/*z* calcd for $C_{14}H_{18}O_5Na$ [M + Na^+], 289.1052; found, 289.1061.

*Methyl 5-O-p-toluoyl-3-O-tosyl-2-deoxy-D-ribofuranoside (**5**).* A solution of **4** (4.26 g, 16.0 mmol) and DMAP (183 mg, 1.5 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (10 mL) was cooled to 0 °C under a N_2 atmosphere and then treated with Et_3N (5.00 mL, 35.8 mmol) and a solution of TsCl (4.011 g, 21.0 mmol) in CH_2Cl_2 (5 mL). The reaction mixture was allowed to warm to room temperature and monitored by TLC (hexanes:EtOAc 3:2; *p*-anisaldehyde stain; R_f = 0.42). After completion, the reaction mixture was quenched at 0 °C with 2 M HCl, neutralized with saturated aqueous $NaHCO_3$ and extracted with EtOAc. The combined organic extracts were washed with water (40 mL), brine (40 mL), dried over Na_2SO_4, and evaporated. The crude product (6.40 g) was purified by column chromatography on silica gel to afford compound **5** (5.59 g, 13.3 mmol, 83%). $[\alpha]_D^{24}$ +75° (*c* 0.5, $CHCl_3$). IR (thin film): 3027.6, 2949.5, 2929.3, 2836.7, 1922.2, 1716.7, 1606.8, 1450.5, 1363.7, 1276.8, 1172.7, 1106.1, 1056.9, 984.6, 920.9, 848.5, 810.9, 753.0, 666.2, 567.8, 550.5 cm^{-1}. ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.85 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.77 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.27 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.24 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 5.06 (m, 1H), 4.93 (m, 1H), 4.38−4.44 (m, 2H), 4.20 (m, 1H), 3.36 (s, 3H), 2.42 (s, 3H), 2.39 (s, 3H), 2.34 (m, 1H), 2.13 (m, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 166.0, 145.1, 144.0, 133.4, 129.9, 129.7, 129.1, 127.9, 126.9, 104.5, 80.1, 79.4, 63.0, 55.1, 39.2, 21.7, 21.6. HRMS (ESI+): *m*/*z* calcd for $C_{21}H_{24}O_7SNa$ [M + Na^+], 443.1135; found, 443.1137.

*5-O-p-toluoyl-3-O-tosyl-1,2-dideoxy-D-ribose (**6**).* A solution of compound **5** (2.41 g, 5.73 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (2 mL) was cooled to 0 °C and treated with Et_3SiH (2.90 mL, 18.2 mmol), followed by dropwise addition of $BF_3{\cdot}OEt_2$ (2.00 mL, 16.2 mmol). The progress of the reaction was monitored by TLC (Hexanes:EtOAc 1:1; negative *p*-anisaldehyde stain; R_f = 0.58). After completion, the reaction mixture was neutralized with saturated aqueous $NaHCO_3$ (30 mL) and extracted with CH_2Cl_2 (3 × 10 mL). The combined organic extracts were dried over Na_2SO_4 and evaporated. The crude product (2.31 g) was purified by column chromatography to afford compound **6** as a colorless oil (1.92 g, 4.92 mmol, 86%). $[\alpha]_D^{23}$ +30° (*c* 1.0, CH_2Cl_2). IR (thin film): 2958.2, 2880.1, 1716.8, 1606.8, 1447.6, 1363.7, 1268.2, 1172.7, 1091.6, 1016.4, 955.6, 906.4, 816.7, 753.0, 669.1, 553.4 cm^{-1}. ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.87 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.77 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.28 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.24 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 5.00 (m, 1H), 4.15−4.25 (m, 3H), 4.05 (m, 1H), 3.94 (m, 1H), 2.42 (s, 3H), 2.40 (s, 3H), 2.15−2.20 (m, 2H). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 166.1, 145.1, 144.0, 133.6, 130.0, 129.7, 129.2, 127.8, 126.9, 82.2, 81.6, 67.4, 63.6, 33.1, 21.7, 21.6. HRMS (ESI+): *m*/*z* calcd for $C_{20}H_{22}O_6SNa$ [M + Na^+], 413.1029; found, 413.1026.

*[(2R,3R)-3-Hydroxytetrahydrofuran-2-yl]methyl-4-methylbenzoate (**7**).* A mixture of compound **6** (1.08 g, 2.77 mmol) and $NaNO_2$ (0.96 g, 13.9 mmol) in DMSO (10 mL) was heated to 120 °C for 5 h. After completion as monitored by TLC analysis (hexanes:EtOAc 1:1; R_f = 0.27), the reaction was diluted with water. The aqueous layer was then extracted with CH_2Cl_2 (3 × 10 mL) and the combined organic extracts were washed with brine, dried over Na_2SO_4, and evaporated. The crude product was purified by column chromatography to afford a mixture of **7** and the toluoyl migrate product **7′** in a 1:1 ratio as determined by NMR analysis (0.41 g, 1.75 mmol, combined yield 63%). When the reaction time was reduced to 2 h at 120 °C, the product was obtained as 4.5:1 regioisomeric mixture of product **7**:**7′** in 58% combined yield.

For characterization purposes, the 1:1 regioisomeric mixture from the experiment above (0.41 g, 1.75 mmol) was dissolved in anhydrous CH_2Cl_2 (3 mL), cooled to 0 °C, and then treated with Et_3N (1.25 mL, 8.96 mmol) and Bz_2O (0.3370 g, 1.49 mmol). The reaction mixture was concentrated to dryness and purified by column chromatography to yield **7** as colorless oil (0.18 g, 0.76 mmol, 28% overall yield from **6**). This corresponds to a 89% recovery from the mixture. Mp: 65−67 °C; $[\alpha]_D^{23}$ −4° (*c* 1, CH_2Cl_2). IR (ATR) 3420.7, 2986.2, 2950.6, 2923.3, 2896.0, 2868.7, 1704.4, 1611.5, 1444.7, 1269.8, 1174.2, 1100.4, 1021.1, 969.2, 834.5, 750.6, 693.2 cm^{-1}. ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.94 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.24 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 4.77 (dd, *J* = 7.1, 11.6 Hz, 1H), 4.34−4.39 (m, 2H), 4.11 (m, 1H), 3.96 (ddd, *J* = 3.3, 5.4, 7.1 Hz, 1H), 3.89 (dt, *J* = 3.8, 8.6 Hz, 1H), 2.41 (s, 3H), 2.18 (m, 1H), 2.05 (m, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 167.2, 144.1, 129.8, 129.2, 126.9, 80.6, 71.5, 66.5, 62.6, 35.1, 21.7. HRMS (ESI+): *m*/*z* calcd for $C_{13}H_{16}O_4Na$ [M + Na^+], 259.0946; found, 259.0941.

*[(2R,3R)-3-(Methylsulfonyloxy)tetrahydrofuran-2-yl]methyl 4-methylbenzoate (**8**).* A solution of **7** (0.49 g, 2.07 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (4 mL) was cooled to 0 °C and treated with DMAP (50 mg, 0.41 mmol), Et_3N (1.15 mL, 8.25 mmol), and MsCl (0.48 mL, 6.20 mmol). After 1 h, the reaction was complete as indicated by TLC (CH_2Cl_2:acetone 4:1; R_f = 0.76) and was diluted with H_2O (10 mL) and EtOAc (10 mL). The aqueous layer was extracted with EtOAc (3 × 10 mL), and the combined organic extracts were washed with brine, dried over Na_2SO_4, and concentrated under reduced pressure. The crude product (0.62 g) was purified by column chromatography to afford **8** as a white solid (0.58 g, 1.85 mmol, 90%). Mp: 102−104 °C. $[\alpha]_D^{23}$ −44° (*c* 1.0, CH_2Cl_2). IR (KBr): 3424.1, 3024.8, 2964.0, 2940.8, 2891.6, 2862.7, 1722.5, 1609.6, 1349.2, 1271.1, 1178.5, 1109.0, 1010.6, 967.2, 897.7, 750.2, 524.4 cm^{-1}. ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 7.94 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.24 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 5.38 (m, 1H), 4.53 (m, 2H), 4.25 (dt, *J* = 4.0, 6.1 Hz, 1H), 4.15 (m, 1H), 3.96 (dt, *J* = 2.7, 8.5 Hz, 1H), 3.01 (s, 3H), 2.41 (s, 3H), 2.39 (m, 2H). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 166.2, 144.0, 129.8, 129.2, 127.0, 79.9, 78.8, 66.5, 62.2, 38.5, 34.0, 21.7; HRMS (ESI+): *m*/*z* calcd for $C_{14}H_{18}O_6SNa$ [M + Na^+], 337.0722; found, 337.0716.

*[(2S,3S)-3-Azidotetrahydrofuran-2-yl]methyl-4-methylbenzoate (**9**).* A solution of **8** (0.14 g, 0.46 mmol) in DMSO (2 mL) was treated with NaN_3 (0.21 g, 3.15 mmol) and then heated at 90 °C for 2 h. After the reaction reached completion as monitored by TLC analysis (hexanes:EtOAc 3:2; R_f = 0.62), it was diluted with water (15 mL) and extracted with EtOAc (3 × 15 mL). The combined organic extracts were dried over Na_2SO_4 and concentrated to dryness to afford compound **9** as a colorless oil (113 mg, 0.43 mmol, 95%), which was subjected to the next step without further purification. $[\alpha]_D^{23}$ +64° (*c*

DOI: 10.1021/acs.joc.5b00890
J. Org. Chem. 2015, 80, 7058−7065

1.6, CH_2Cl_2). IR (thin film): 2952.4, 2872.4, 2098.7, 1716.7, 1606.7, 1271.1, 1172.7, 1103.2, 750.2 cm^{-1}. ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.93 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.25 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 4.38 (m, 2H), 4.03−4.12 (m, 3H), 3.95 (m, 1H), 2.42 (s, 3H), 2.29 (m, 1H), 2.08 (m, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 166.3, 144.0, 129.7, 129.2, 127.0, 81.5, 67.4, 64.4, 62.9, 32.2, 21.7. HRMS (ESI+): m/z calcd for $C_{13}H_{15}N_3O_3Na$ [M + Na^+], 284.1006; found, 284.1003.

*[(2S,3S)-3-(tert-Butoxycarbonylamino)tetrahydrofuran-2-yl]-methyl 4-methylbenzoate (**10**).* A solution of **9** (0.47 g, 1.8 mmol) in MeOH (5 mL) was treated with Boc_2O (1.03 g, 4.72 mmol) and Pd/C (20% w/w, 74.2 mg). The reaction flask was flushed with H_2 gas and a H_2 balloon was attached through a rubber septum. The reaction was monitored by TLC analysis (hexanes:EtOAc 3:2; ninhydrin stain; R_f = 0.46) until it reached completion. It was then filtered through Celite, concentrated to dryness, and the residue was washed with hexanes to afford **10** as a white solid (0.43 g, 1.28 mmol, 71%). Mp: 108−110 °C. $[\alpha]_D^{23}$ +28° (c 1.0, CH_2Cl_2). IR (KBr): 3348.9, 2975.6, 2937.9, 2868.5, 1724.8, 1682.0, 1609.0, 1528.6, 1432.5, 1369.5, 1271.1, 1172.7, 1108.3, 1077.2, 1021.5, 1001.2, 882.6, 884.9, 753.1, 607.6 cm^{-1}. ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.93 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.22 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 4.71 (br s, 1H), 4.49 (dd, J = 3.5, 11.7 Hz, 1H), 4.34 (dd, J = 5.9, 11.8 Hz, 1H), 4.16 (m, 1H), 3.92−4.06 (m, 3H), 2.40 (s, 3H), 2.34 (m, 1H), 1.83 (dt, J = 5.7, 12.8 Hz, 1H), 1.44 (s, 9H). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 166.5, 155.5, 143.7, 129.8, 129.1, 127.2, 82.9, 79.9, 67.2, 65.1, 53.2, 33.3, 28.4, 21.6. HRMS (ESI+): m/z calcd for $C_{18}H_{25}NO_5Na$ [M + Na^+], 358.1625; found, 358.1635.

*tert-Butyl (2S,3S)-2-(Hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-ylcarbamate (**11**).* A mixture of **10** (0.39 g, 1.16 mmol) and LiOH·H_2O (0.13 g, 3.1 mmol) was dissolved in 1:1 THF:H_2O (4 mL) and stirred at room temperature overnight. The completion of the reaction was confirmed by TLC analysis (EtOAc:hexanes 4:1; ninhydrin stain; R_f = 0.33), and then the organic solvent was removed by rotary evaporation, and the aqueous residue was extracted with CH_2Cl_2 (3 × 10 mL). The combined organic phases were dried over anhydrous Na_2SO_4 and evaporated to give compound **11** as a white solid (0.23 g, 1.06 mmol, 91%). Mp: 85−87 °C. $[\alpha]_D^{23}$ −11° (c 1.0, CH_2Cl_2). ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 4.47 (s, 1H), 3.85−4.00 (m, 3H), 3.65−3.69 (m, 3H), 2.87 (s, 1H), 2.29 (m, 1H), 1.79 (m, 1H), 1.44 (s, 9H). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 155.9, 85.1, 80.2, 66.7, 63.1, 52.9, 33.1, 28.3. IR (ATR): 3346.8, 2987.4, 2964.1, 2908.1, 2849.5, 1676.0, 1522.0, 1363.3, 1300.3, 1239.6, 1160.3, 1097.3, 1073.9, 1015.6, 866.3, 621.2 cm^{-1}. HRMS (ESI+): m/z calcd for $C_{10}H_{19}NO_4Na$ [M + Na^+], 240.1206; found, 240.1207.

*(2S,3S)-3-(tert-Butoxycarbonylamino)tetrahydrofuran-2-carboxylic acid (**12**).* To a solution of **11** (0.27 g, 1.24 mmol) in 1:1 acetonitrile:H_2O was added TEMPO (95 mg, 0.61 mmol) and bis(acetoxy)iodobenzene (BAIB) (1.13 g, 3.5 mmol). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The completion of the reaction was monitored by TLC analysis (EtOAc; ninhydrin stain; R_f = 0.17). The pH of the resulting solution was adjusted 8−9 by addition of solid $NaHCO_3$ and extracted with EtOAc. The collected aqueous phase was acidified to pH 2 with solid $NaHSO_4$ followed by extraction with EtOAc. The combined organic phases were evaporated to dryness to give **12** as a colorless oil (0.27 g, 1.2 mmol, 94%). $[\alpha]_D^{22}$ +49° (c 1.5, DMSO). IR (thin film): 3328.6, 2972.7, 1710.9, 1528.6, 1363.7, 1279.7, 1161.1, 1100.3, 1016.4 cm^{-1}. ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ 12.60 (br s, 1H), 7.27 (d, J = 6.9 Hz, 1H), 4.10 (m, 1H), 4.04 (m, 1H), 3.83−3.92 (m, 2H), 2.06 (m, 1H), 1.76 (dt, J = 6.3, 12.0 Hz, 1H), 1.38 (s, 9H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6): δ 172.7, 154.9, 81.0, 77.9, 67.1, 54.9, 31.6, 28.1. HRMS (ESI+): m/z calcd for $C_{10}H_{17}NO_5Na$ [M + Na^+], 254.0999; found, 254.0992.

*(2S,3S)-3-{[(9H-Fluoren-9-yl)methoxy]carbonylamino}tetrahydrofuran-2-carboxylic acid (**13**).* Compound **12** (0.21 g, 0.91 mmol) was dissolved in 1:1 TFA:CH_2Cl_2 (6 mL) and stirred at room temperature for 30 min. The solvent was removed by flushing with N_2. The crude amino acid was dissolved in H_2O (4 mL), and the pH of the solution was adjusted to 8−9 by the addition of solid $NaHCO_3$. Next, FmocOSu (0.31 g, 0.92 mmol) dissolved in 0.5 mL of DMSO was added in small portions along with more $NaHCO_3$ to maintain the pH around 8−9. To this mixture, MeCN was added to make a homogeneous solution. After stirring overnight, the solution was diluted with water and extracted with diethyl ether. The aqueous phase was acidified to pH 2 with concentrated HCl to give a white suspension. After filtration, the precipitate was air-dried to afford compound **13** as a white solid (0.28 g, 0.79 mmol, 87%). Mp: 166−168 °C. $[\alpha]_D^{23}$ +42° (c 1.0, DMSO). IR (KBr): 3308.4, 3062.4, 2946.6, 2362.1, 2341.8, 1722.5, 1690.7, 1540.2, 1447.6, 1259.6, 1099.4, 732.8 cm^{-1}. ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ 12.75 (br s, 1H), 7.89 (d, J = 7.4 Hz, 2H), 7.74 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.69 (m, 2H), 7.42 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 7.34 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 4.33 (d, J = 6.4 Hz, 2H), 4.22 (t, J = 6.9 Hz, 1H), 4.17 (m, 1H), 4.09 (m, 1H), 3.90 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.09 (m, 1H), 1.79 (m, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6): δ 172.8, 155.5, 143.7, 140.6, 127.5, 127.0, 125.0, 120.0, 81.1, 67.0, 65.3, 55.3, 46.6, 31.8. HRMS (ESI+): m/z calcd for $C_{20}H_{19}NO_5Na$ [M + Na^+], 376.1155; found, 376.1180.

*Pentafluorophenyl (2S,3S)-3-{[(9H-fluoren-9-yl)methoxy]-carbonylamino}tetrahydrofuran-2-carboxylate (**1**).* A suspension of compound **13** (0.22 g, 0.62 mmol) in CH_2Cl_2 (2 mL) was treated with DIEA (600 μL, 3.45 mmol) and PfpOTfa (600 μL, 3.39 mmol) in three portions. The completion of the reaction was monitored by TLC analysis (hexanes:EtOAc 1:1; R_f = 0.50). The reaction mixture was diluted with CH_2Cl_2 (10 mL), washed with 1 M HCl and saturated aqueous $NaHCO_3$ and dried over anhydrous Na_2SO_4. After removal of the solvent, the resulting pink oil was sonicated with hexanes to give a white suspension which was collected by filtration to give **1** as a white solid (0.207 g, 0.40 mmol, 65%). Mp: 123−125 °C. $[\alpha]_D^{23}$ +57° (c 1.0, CH_2Cl_2). IR (ATR): 3309.4, 1799.7, 1687.6, 1550.0, 1519.6, 1291.0, 1234.9, 1066.9, 1031.9, 994.6, 761.2, 735.6, 665.6. ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.77 (d, J = 7.4 Hz, 2H), 7.58 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 7.41 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 7.31 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 5.06 (d, J = 5.3, 1H), 4.70 (m, 1H), 4.62 (m, 1H), 4.50 (m, 2H), 4.19 (m, 2H), 4.12 (m, 1H), 2.36 (m, 1H), 1.98 (m, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 167.3, 155.5, 143.7, 141.4, 127.8, 127.0, 124.9, 120.0, 81.7, 68.3, 66.9, 56.2, 47.3, 31.9. ^{19}F NMR (376 MHz, $CDCl_3$): δ −161.8 (t, J = 20.2 Hz), −157.1 (t, J = 19.9 Hz), −152.4 (d, J = 18.0 Hz). HRMS (ESI+) m/z calcd for $C_{26}H_{18}F_5NO_4K$ [M + K^+], 542.0788; found, 542.0795.

Synthesis of atfcPNA. All atfcPNA were manually synthesized at 1.5 μmol scale on a Tentagel S-RAM resin (0.24 mmol/g loading) from the four Fmoc-protected pyrrolidinyl PNA monomers (A^{Bz}, T, C^{Bz}, and G^{Ibu}) and pentafluorophenyl-activated ATFC spacer 1 following the previously published protocol for acpcPNA synthesis.[10b,d] The nucleobase protecting groups (Bz, Ibu) were removed by treating the resin with 1:1 aqueous ammonia:dioxane at 60 °C overnight. The crude PNA was obtained by TFA cleavage and purified by reverse-phase HPLC (C18 column, 0.1% TFA in water−methanol gradient).

Fluorescence Spectroscopy to Compare Nonspecific Interactions and Self-Aggregation of acpcPNA and atfcPNA. (a) Nonspecific adsorption of fluorescein-modified acpcPNA and atfcPNA **M10Flu** were compared by fluorescence measurements. The PNA samples were prepared at 0.05 μM in 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 (1000 μL) at 25 °C. The solution was transferred back and forth between the cuvette and a 1.5 mL polypropylene microcentrifuge tube, and the fluorescence spectra were recorded after each transfer until no further change was observed. The average fluorescence at 520 nm and standard deviation were calculated from the last three measurements after the signal was constant. The excitation wavelength was 480 nm, slit widths 5 nm, and the PMT voltage was set to high. (b) Self-aggregation of fluorescein-modified acpcPNA and atfcPNA **M10Flu** were compared by fluorescence measurements. The fluorescence data was plotted against concentration in the range of 1 to 10 μM or until a plateau was reached. The excitation wavelength was 480 nm, slit widths 5 nm, and the PMT voltage was set to 500.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

^1H and ^{13}C NMR spectra for numbered compounds, HPLC chromatogram, and MALDI-TOF mass spectra of PNA, as well as additional spectroscopic data. The Supporting Information is

DOI: 10.1021/acs.joc.5b00890
J. Org. Chem. 2015, 80, 7058−7065

available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.joc.5b00890.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: vtirayut@chula.ac.th.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

Financial support of this work provided by the Thailand Research Fund (DPG5780002) and the Thai government stimulus package 2 (TKK2555, SP2) under the Project for Establishment of Comprehensive Center for Innovative Food, Health Products and Agriculture is gratefully acknowledged. We thank Haruthai Pansuwan and Nattawut Yotapan for partial data collection.

REFERENCES

(1) (a) Gellman, S. H. *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 173−180. (b) Hill, D. J.; Mio, M. J.; Prince, R. B.; Hughes, T. S.; Moore, J. S. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3893−4011.

(2) (a) Fülöp, F. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2181−2204. (b) Fülöp, F.; Martinek, T. A.; Tóth, G. K. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 323−334.

(3) (a) Cheng, R. P.; Gellman, S. H.; DeGrado, W. F. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3219−3232. (b) Vasudev, P. G.; Chatterjee, S.; Shamala, N.; Balaram, P. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 657−687.

(4) (a) Appella, D. H.; Christianson, L. A.; Klein, D. A.; Powell, D. R.; Huang, X.; Barchi, J. J., Jr; Gellman, S. H. *Nature* **1997**, *387*, 381−384. (b) Appella, D. H.; Christianson, L. A.; Karle, I. L.; Powell, D. R.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6206−6212. (c) Appella, D. H.; Christianson, L. A.; Klein, D. A.; Richards, M. R.; Powell, D. R.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7574−7581. (d) Wang, X.; Espinosa, J. F.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4821−4822. (e) LePlae, P. R.; Fisk, J. D.; Porter, E. A.; Weisblum, B.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6820−6821. (f) Izquierdo, S.; Rúa, F.; Sbai, A.; Parella, T.; Álvarez-Larena, Á.; Branchadell, V.; Ortuño, R. M. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 7963−7971. (g) Fernandes, C.; Faure, S.; Pereira, E.; Théry, V.; Declerck, V.; Guillot, R.; Aitken, D. J. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 3606−3609.

(5) (a) Chakraborty, T. K.; Srinivasu, P.; Tapadar, S.; Mohan, B. K. *Glycoconjugate J.* **2005**, *22*, 83−93. (b) Risseeuw, M. D. P.; Overhand, M.; Fleet, G. W. J.; Simone, M. I. *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 2001−2010. (c) Risseeuw, M. D. P.; Overhand, M.; Fleet, G. W. J.; Simone, M. I. *Amino Acids* **2013**, *45*, 613−689. (d) Rjabovs, V.; Turks, M. *Tetrahedron* **2013**, *69*, 10693−10710.

(6) (a) Claridge, T. D. W.; Goodman, J. M.; Moreno, A.; Angus, D.; Barker, S. F.; Taillefumier, C.; Watterson, M. P.; Fleet, G. W. J. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 4251−4255. (b) Chandrasekhar, S.; Reddy, M. S.; Jagadeesh, B.; Prabhakar, A.; Rao, M. H. V. R.; Jagannadh, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13586−13587. (c) Siriwardena, A.; Pulukuri, K. K.; Kandiyal, P. S.; Roy, S.; Bande, O.; Ghosh, S.; Fernández, J. M. G.; Martin, F. A.; Ghigo, J.-M.; Beloin, C.; Ito, K.; Woods, R. J.; Ampapathi, R. S.; Chakraborty, T. K. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *52*, 10221−10226.

(7) (a) Threlfall, R.; Davies, A.; Howarth, N.; Cosstick, R. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* **2006**, *26*, 611−614. (b) Threlfall, R.; Davies, A.; Howarth, N. M.; Fisher, J.; Cosstick, R. *Chem. Commun.* **2008**, 585−587. (c) Chandrasekhar, S.; Reddy, G. P. K.; Kiran, M. U.; Nagesh, Ch.; Jagadeesh, B. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 2969−2973. (d) Gogoi, K.; Kumar, V. A. *Chem. Commun.* **2008**, 706−708. (e) Bagmare, S.; D'Costa, M.; Kumar, V. A. *Chem. Commun.* **2009**, 6646−6648. (f) Bagmare, S.; Varada, M.; Banerjee, A.; Kumar, V. A. *Tetrahedron* **2013**, *69*, 1210−1216.

(8) Merino, P.; Matute, R. Chemical Synthesis of Conformational Constrained PNA Monomers. In *Chemical Synthesis of Nucleoside Analogues*; Merino, P., Ed.; Wiley-VCH: New Jersey, 2013; pp 847−880.

(9) (a) Egholm, M.; Buchardt, O.; Christensen, L.; Behrens, C.; Freier, S. M.; Driver, D. A.; Berg, R. H.; Kim, S. K.; Norden, B.; Nielsen, P. E. *Nature* **1993**, *365*, 566−568. (b) Nielsen, P. E. *Chem. Biodiversity* **2010**, *7*, 786−804.

(10) (a) Vilaivan, T.; Lowe, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9326−9327. (b) Vilaivan, T.; Srisuwannaket, C. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1897−1900. (c) Reenabthue, N.; Boonlua, C.; Vilaivan, C.; Vilaivan, T.; Suparpprom, C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 6465−6469. (d) Vilaivan, C.; Srisuwannaket, C.; Ananthanawat, C.; Suparpprom, C.; Kawakami, J.; Yamaguchi, Y.; Tanaka, Y.; Vilaivan, T. *Artif. DNA: PNA & XNA* **2011**, *2*, 50−59. (e) Mansawat, W.; Vilaivan, C.; Balázs, Á.; Aitken, D. J.; Vilaivan, T. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 1440−1443.

(11) Vilaivan, T. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 1645−1656.

(12) (a) Boontha, B.; Nakkuntod, J.; Hirankarn, N.; Chaumpluk, P.; Vilaivan, T. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 8178−8186. (b) Boonlua, C.; Vilaivan, C.; Wagenknecht, H.-A.; Vilaivan, T. *Chem.—Asian J.* **2011**, *6*, 3251−3259. (c) Laopa, P. S.; Vilaivan, T.; Hoven, V. P. *Analyst* **2013**, *138*, 269−277. (d) Jampasa, S.; Wonsawat, W.; Rodthongkum, N.; Siangproh, W.; Yanatatsaneejit, P.; Vilaivan, T.; Chailapakul, O. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *54*, 428−434.

(13) (a) Pandey, S. K.; Jogdand, G. F.; Oliveira, J. C. A.; Mata, R. A.; Rajamohanan, P. R.; Ramana, C. V. *Chem.—Eur. J.* **2011**, *17*, 12946−12954. (b) Giri, A. G.; Jogdand, G. F.; Rajamohanan, P. R.; Pandey, S. K.; Ramana, C. V. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 2656−2663.

(14) Sahu, B.; Sacui, I.; Rapireddy, S.; Zanotti, K. J.; Bahal, R.; Armitage, B. A.; Ly, D. H. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 5614−5627.

(15) Larsen, C. H.; Ridgway, B. H.; Shaw, J. T.; Woerpel, K. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 12208−12209.

(16) Rabi, J. A. U.S. patent application 2004/0266996 A1, 2004.

(17) (a) Pedersen, C.; Diehl, H. W.; Fletcher, H. G., Jr *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 3425−3428. (b) Chenault, H. K.; Mandes, R. F. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 11033−11038. (c) Adamo, M. F. A.; Adlington, R. M.; Baldwin, J. E.; Day, A. L. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 841−849.

(18) Takeshita, M.; Chang, C. N.; Johnson, F.; Will, S.; Grollman, A. P. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 10171−10179.

(19) Chong, Y.; Gumina, G.; Mathew, J. S.; Schinazi, R. F.; Chu, C. K. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 3245−3256.

(20) (a) Dong, H.; Pei, Z.; Ramström, O. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 3306−3309. (b) Kornblum, N.; Blackwood, R. K.; Mooberry, D. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 1501−1504. (c) Albert, R.; Dax, K.; Link, R. W.; Stütz, A. E. *Carbohydr. Res.* **1983**, *118*, C5−C6. (d) McGeary, R. P.; Amini, S. R.; Tang, V. W. S.; Toth, I. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 2727−2730. (e) Dong, H.; Rahm, M.; Thota, N.; Deng, L.; Brinck, T.; Ramström, O. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 648−653. (f) Ren, B.; Dong, H.; Ramström, O. *Chem.−Asian J.* **2014**, *9*, 1298−1304.

(21) (a) Guo, X.; Liu, C.; Zheng, L.; Jiang, S.; Shen, J. *Synlett* **2010**, 1959−1962. (b) Swamy, K. C. K.; Kumar, N. N. B.; Balaraman, E.; Kumar, K. V. P. P. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2551−2651.

(22) (a) Tojo, G.; Fernandez, M. TEMPO-mediated Oxidations. In *Oxidation of Primary Alcohols to Carboxylic Acids: A Guide to Current Common Practices*; Tojo, G., Ed.; Springer: New York, 2007; pp 79−103. (b) Dettwiler, J. E.; Lubell, W. D. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 177−179. (c) Epp, J. B.; Widlanski, T. S. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 293−295.

(23) (a) Johnson, W. C. CD of Nucleic Acids. In *Circular Dichroism: Principles and Applicaions*; Berova, N., Nakanishi, K., Woody, R. W., Eds.; Wiley-VCH: New York, 2000; pp 703−718. (b) Kang, H.; Chou, P.-J.; Johnson, W. C., Jr; Weller, D.; Huang, S.-B.; Summerton, J. E. *Biopolymers* **1992**, *32*, 1351−1363.

(24) Vorličková, M.; Kejnovská, I.; Bednářová, K.; Renčiuk, D.; Kypr, J. *Chirality* **2012**, *24*, 691−698.

(25) Bergenstråhle, M.; Wohlert, J.; Himmel, M. E.; Brady, J. W. *Carbohydr. Res.* **2010**, *345*, 2060−2066.

(26) Jozwiakowski, M. J.; Connors, K. A. *Carbohydr. Res.* **1985**, *143*, 51−59.

DOI: 10.1021/acs.joc.5b00890
J. Org. Chem. 2015, 80, 7058−7065

Organic & Biomolecular Chemistry

PAPER

View Article Online
View Journal | View Issue

Published on 22 July 2015. Downloaded by Mahidol University on 31/08/2015 12:22:17.

Cite this: *Org. Biomol. Chem.*, 2015, **13**, 9223

Strand displacement and duplex invasion into double-stranded DNA by pyrrolidinyl peptide nucleic acids†

Peggy R. Bohländer,[a] Tirayut Vilaivan*[b] and Hans-Achim Wagenknecht*[a]

The so-called acpcPNA system bears a peptide backbone consisting of 4′-substituted proline units with (2′*R*,4′*R*) configuration in an alternating combination with (2*S*)-amino-cyclopentane-(1*S*)-carboxylic acids. acpcPNA forms exceptionally stable hybrids with complementary DNA. We demonstrate herein (i) strand displacements by single-stranded DNA from acpcPNA–DNA hybrids, and by acpcPNA strands from DNA duplexes, and (ii) strand invasions by acpcPNA into double-stranded DNA. These processes were studied *in vitro* using synthetic oligonucleotides and by means of our concept of wavelength-shifting fluorescent nucleic acid probes, including fluorescence lifetime measurements that allow quantifying energy transfer efficiencies. The strand displacements of preannealed 14mer acpcPNA–7mer DNA hybrids consecutively by 10mer and 14mer DNA strands occur with rather slow kinetics but yield high fluorescence color ratios (blue : yellow or blue : red), fluorescence intensity enhancements, and energy transfer efficiencies. Furthermore, 14mer acpcPNA strands are able to invade into 30mer double-stranded DNA, remarkably with quantitative efficiency in all studied cases. These processes can also be quantified by means of fluorescence. This remarkable behavior corroborates the extraordinary versatile properties of acpcPNA. In contrast to conventional PNA systems which require 3 or more equivalents PNA, only 1.5 equivalents acpcPNA are sufficient to get efficient double duplex invasion. Invasions also take place even in the presence of 250 mM NaCl which represents an ionic strength nearly twice as high as the physiological ion concentration. These remarkable results corroborate the extraordinary properties of acpcPNA, and thus acpcPNA represents an eligible tool for biological analytics and antigene applications.

Received 22nd June 2015,
Accepted 21st July 2015

DOI: 10.1039/c5ob01273b

www.rsc.org/obc

Introduction

Peptide nucleic acid (PNA) represents a very important nucleic acid analog and chemical-biological tool based on its important features like affinity, sequence selectivity and stability against degradation by nucleases and proteases.[1] Especially the uncharged pseudopeptide backbone makes PNA an attractive scaffold for diagnostic applications. PNA with *N*-(2-aminoethyl)glycine backbone (aegPNA) is able to form complexes with double-stranded DNA either by binding from outside forming triplexes, or by duplex, double-duplex or triplex invasion.[1–4] The attempt to increase affinity and, more importantly, sequence selectivity of PNA by incorporation of cyclic derivatives in the peptide backbone failed in many cases since the nucleic acid hybridization properties are deteriorated.[5,6] Among several of those PNA architectures reported to date, and especially among those with cyclic structures as part of the backbone,[7–9] the so-called acpcPNA system (Fig. 1) exhibits significant features. The peptide backbone consists of 4′-substituted proline units with (2′*R*,4′*R*) configuration in an alternating combination with (2*S*)-amino-cyclopentane-(1*S*)-carboxylic acids. As a result of this structural design, acpcPNA forms stable hybrids with complementary DNA but significantly less stable hybrids with complementary RNA.[10–13] The

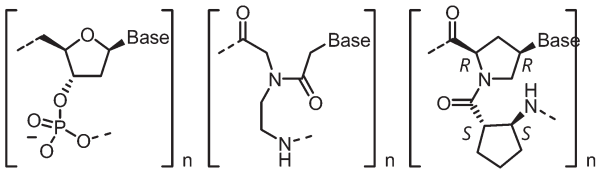


Fig. 1 Monomeric unit of DNA (left), aegPNA (middle) and acpcPNA (right) in comparison.

[a]*Institute of Organic Chemistry, Karlsruhe Institute of Technology (KIT), Fritz-Haber-Weg 6, 76131 Karlsruhe, Germany. E-mail: Wagenknecht@kit.edu; Fax: +49-721-608-44825; Tel: +49-721-608-47486*

[b]*Organic Synthesis Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand. E-mail: vtirayut@chula.ac.th; Fax: +66-2-2187598; Tel: +66-2-2187627*

†Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c5ob01273b

Published on 22 July 2015. Downloaded by Mahidol University on 31/08/2015 12:22:17.

recognition and binding to DNA shows high sequence selectivity and does not tolerate single base mismatches. The sequence selectivity can be visualized by fluorescent dyes such as pyrene,[14,15] thiazole orange[16] and nile red,[17] that were synthetically incorporated into acpcPNA. Most importantly, self-paired hybrids are not formed by acpcPNA.[11] This feature stands in contrast to many other PNA scaffolds that bind to themselves equally or even better than to naturally occurring nucleic acids.[4]

Base and/or PNA backbone modifications are traditionally required to destabilize PNA–PNA duplexes in order to allow efficient double duplex invasion of DNA.[18,19] Alternatively, PNA modifications like carcinogenic acridine moieties or nucleobase substitutions of cytosine (G-clamp) also promote invasion into mixed sequence B-DNA.[20–23] To prevent extensive or biologically harmful modifications, a chiral derivative of PNA called γPNA that exhibits even higher DNA affinity than normal PNA with extended strand length was employed. However, 20 equivalents of γPNA and incubating times of 8 hours are necessary to accomplish quantitative invasion and complex formation with double-stranded DNA.[24] Moreover, limitations for applications *in vivo* still remain due to the high affinity of γPNA to both DNA and RNA. In order to demonstrate the advantages of acpcPNA in this regard we report herein (i) strand displacements by single-stranded DNA from acpcPNA–DNA hybrids, and by acpcPNA strands from DNA duplexes, and (ii) strand invasions by acpcPNA strands into double-stranded DNA with high efficiency. These processes have high biological significance; however, we studied them *in vitro* with model PNA strands by means of fluorescence color changes as well as fluorescent intensity enhancements using our concept of wavelength-shifting nucleic acid probes ("DNA traffic lights").[25]

Results and discussion

Strand displacements

DNA strand displacements are biologically relevant and enzymatically driven processes inside living cells.[26–29] Furthermore, these processes play a crucial role in DNA nanotechnology.[30] Consecutive annealing and strand displacement steps represent the methodological basis to dynamically control the formation of highly ordered and self-assembled DNA nanoarchitectures, such as DNA switches, DNA tweezers,[31–34] DNA-based logic gates,[34–38] DNA walkers[39–42] and others. In order to readout the strand displacement dynamics with acpcPNA not only by conventional fluorescence intensity changes at a single emission wavelength, we followed our concept of wavelength-shifting nucleic acid probes.[25] Five years ago, we introduced this concept that is based on energy transfer between thiazole orange and thiazole red as fluorescent DNA base substitutions and applied it for molecular beacons.[25,43] Moreover, we showed that this concept works also for pairs of fluorescent dyes attached to the 2′-positions in two different DNA strands and yields even better emission color contrasts as readout.[44]

In order to apply such fluorescence color changes to directly report the dynamics of strand displacements *in vitro* we synthesized the 14mers **PNA1** and **PNA2** that carry the blue emitting dye **1** in the middle of the sequence (Fig. 2). These acpcPNA modifications were introduced by post-synthetic copper(I)-catalyzed cycloaddition between the precursor of dye **1** bearing an azide group and the synthesized precursors of **PNA1** and **PNA2** that carry an alkyne functionality. The only difference between the two PNA strands is the position of dye **1** as modification of the aminopyrrolidinecarboxylic acid spacers either on the carboxy or on the amino side of the central thymine unit in the sequence. All synthesized PNA strands bear five lysine residues at the C-terminus to enhance solubility. Five DNA counterparts of different lengths were synthesized. The shortest one, 7mer **DNA1**, was not labelled. The 10mers **DNA2** and **DNA4** were labelled by the yellow emitting dye **2** attached to the 2′-position of uridine next to the central adenosine unit (either on the 5′or 3′ side). The longest

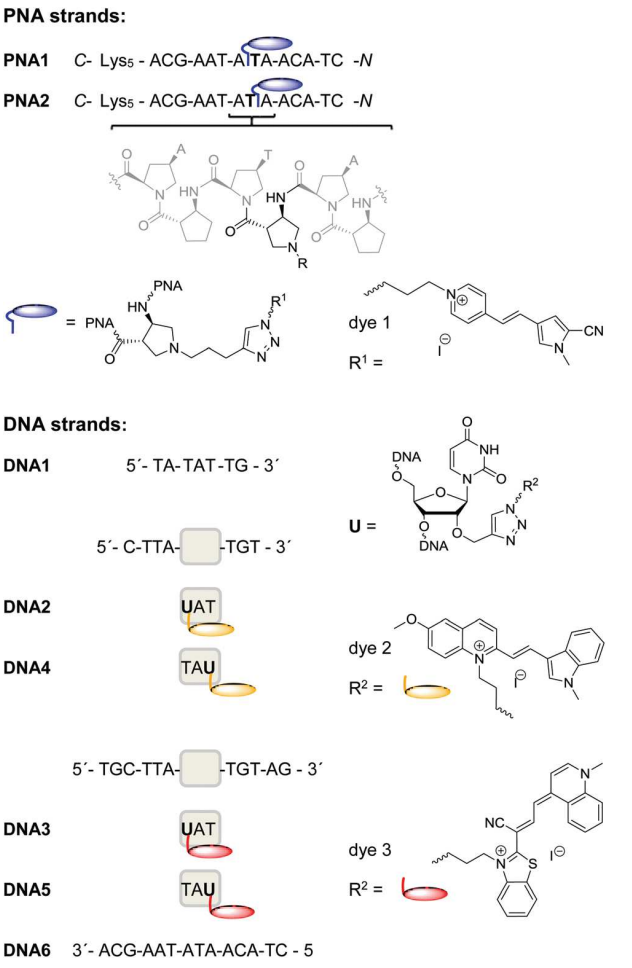


Fig. 2 Sequences of **PNA1**, **PNA2**, **DNA1**–**DNA6** and structures of acpcPNA and of dyes 1–3 as PNA or DNA labels, respectively.

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2015

Published on 22 July 2015. Downloaded by Mahidol University on 31/08/2015 12:22:17.

counterparts, 14mers **DNA3** and **DNA5**, were modified at corresponding positions by the red emitting dye **3** (for the syntheses of dyes **1**–**3** and PNA/DNA labelling procedures see ESI†).[44,45]

The dye **1**-labeled **PNA1** and **PNA2** were separately annealed with the unmodified 7mer oligonucleotide counterstrand **DNA1** to obtain the starting duplexes for strand displacement experiments. Both samples were consecutively titrated with 1.0 equivalent of **DNA2** or **DNA4**, followed by **DNA3** or **DNA5**, respectively (Fig. 3). The first titrations with **DNA2** or **DNA4** place the energy acceptor dye **2** into proximity to donor dye **1**. If the excitation wavelength is kept constant at 389 nm, the efficient (*vide infra*) energy transfer between these two dyes causes significant fluorescence color changes from blue to yellow which were observed in all four cases (**PNA1**-**DNA1** and **PNA2**-**DNA1**, each with **DNA2** or **DNA4**). The second titrations with **DNA3** or **DNA5**, respectively, remove dye **2** from the hybrids and place the energy acceptor dye **3** into close proximity to dye **1**. As a result the fluorescence color changes from yellow to red; again at the same excitation wavelength (389 nm).

From these titrations the following two observations have been made and further investigated. (i) The first strand displacements of 7mer **DNA1** by 10mer **DNA2** or **DNA4** take place relatively fast (within 5 minutes). The second strand displacements of 10mer **DNA2** or **DNA4** as part of the intermediate acpcPNA hybrids by 14mer **DNA3** or **DNA5** occur significantly slower than the first displacement processes (approximately 1 h). This can be explained by the increasing affinity of acpcPNA to longer DNA pieces during the strand displacements and the exceptionally high stability of acpcPNA–DNA hybrids in general. Melting temperatures of the starting, intermediate and final acpcPNA–DNA hybrids were determined (Table 1). The representative titration of hybrid **PNA2–DNA1** with **DNA2** and **DNA3** is shown in Fig. 3 and exhibits a T_m increase from 71.5 °C over 77.2 °C to >90 °C. As expected all PNA–DNA hybrids possess far higher T_m than comparable DNA–DNA duplexes (see ESI†). Both PNA strands, **PNA1** and **PNA2**, form especially stable hybrids with unmodified DNA counterstrands as shown by T_m of >90 °C (see ESI†), whereas singly and doubly modified acpcPNA–DNA hybrids exhibit lower T_m values. The singly modified duplex **DNA6–DNA3** exhibits a T_m which is around 50 °C lower in comparison to the corresponding acpcPNA–14mer DNA hybrid (see ESI†) and hence, affirms strong binding between acpcPNA and DNA even

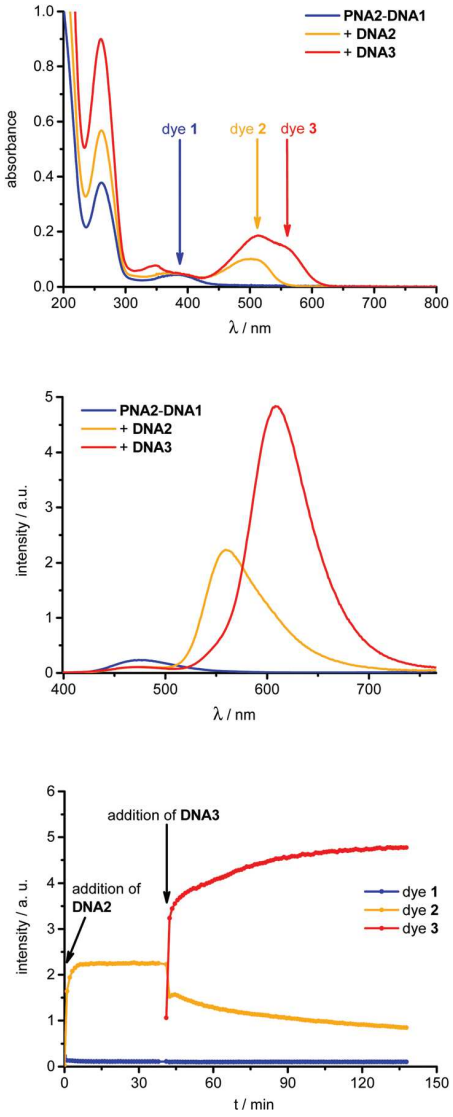


Fig. 3 Optical spectra of the representative strand displacement experiment with **PNA2–DNA1** (2.5 μM in 10 mM Na–P_i buffer, pH 7) by consecutive addition of **DNA2** (1.0 equiv.) and **DNA3** (1.0 equiv.): UV/Vis absorption (top), fluorescence (middle, λ_{exc} = 389 nm) and time-dependent fluorescence intensity changes (dye **1**: λ_{em} = 478 nm, dye **2**: λ_{em} = 560 nm, dye **3**: λ_{em} = 606 nm) after addition of **DNA2** (0–41 min, and **DNA3** (41–138 min).

Table 1 Color contrasts, fluorescence intensity increase factors, energy transfer efficiencies and melting temperatures T_m of PNA/DNA hybrids

Duplex	Color contrast	Fluorescence intensity increase factor[a]	Energy transfer efficiency[b]	T_m[c] [°C]
PNA1–DNA1	—	—	—	71.0
PNA1–DNA2	1 : 34[d]	16.6	0.82 ± 0.13	78.2
PNA1–DNA3	1 : 141[e]	21.1	0.99 ± 0.13	> 90
PNA1–DNA4	1 : 38[f]	15.0	0.79 ± 0.12	> 90
PNA1–DNA5	1 : 173[g]	8.9	0.98 ± 0.16	> 90
PNA2–DNA1	—	—	—	71.5
PNA2–DNA2	1 : 20[d]	10.8	0.78 ± 0.11	77.2
PNA2–DNA3	1 : 47[e]	20.1	0.98 ± 0.05	> 90
PNA2–DNA4	1 : 49[f]	9.8	0.75 ± 0.10	82.7
PNA2–DNA5	1 : 223[g]	19.8	0.98 ± 0.07	> 90
DNA6–DNA3	—	—	—	32.7

[a] See definition in text. [b] Calculated by fluorescence lifetimes (see ESI). [c] λ = 260 nm, 5–95 °C, interval: 0.5 °C min^{-1}, 2.5 μM duplex in 10 mM Na–P_i, pH 7. [d] $I_{478\ nm}/I_{560\ nm}$. [e] $I_{478\ nm}/I_{606\ nm}$. [f] $I_{478\ nm}/I_{579\ nm}$. [g] $I_{478\ nm}/I_{600\ nm}$.

Published on 22 July 2015. Downloaded by Mahidol University on 31/08/2015 12:22:17.

in the presence of an attached dye. In case of the majority of acpcPNA–10mer DNA hybrids, *e.g.* **PNA1–DNA2**, the T_m values show that the fluorescent dye labels are destabilizing and require carefully chosen placements in complementary hybrids.[17] Especially the dye attachment in the hybrid **PNA1–DNA4** causes less destabilizing effects and gives a T_m of >90 °C. (ii) Large fluorescence color ratios blue : yellow/blue : red and fluorescence intensity enhancements were accomplished by an efficient energy transfer (*vide infra*) from donor dye **1** to both acceptor dyes **2** and **3**, respectively (Table 1). The highest blue : red contrast ($I_{478\ nm}/I_{600\ nm}$) of 1 : 223 is obtained during displacement of 10mer **DNA4** by 14mer **DNA5** yielding hybrid **PNA2–DNA5**. The enhancements of the yellow and red fluorescence signals were quantified by the fluorescence intensity increase factors (Table 1) that were determined for both acceptor dyes **2** or **3**, respectively, at their corresponding emission maximum. The factors represent the ratios of the fluorescence intensities of the acceptor dyes after excitation at the absorption maximum of donor dye **1** to the fluorescence intensities of the acceptor dyes upon excitation at the same wavelength but in the absence of the donor dye **1**. The latter fluorescence intensities were obtained with single-stranded **DNA1** to **DNA5**. The largest fluorescence enhancement factor of 21.1 was obtained during the strand displacement of **PNA1–DNA2** by **DNA3**.

In order to calculate energy transfer efficiencies, fluorescence lifetimes of dye **1** (λ_{exc} = 389 nm, λ_{em} = 478 nm) were determined for all modified PNA–DNA hybrids (see ESI†). In the absence of energy acceptor, dye **1** in hybrids of **PNA1** and **PNA2** with full length DNA counterstrands (see ESI†) exhibits lifetimes of approximately 1.6 ns and 1.5 ns, respectively. Due to the presence of acceptor dyes **2**, or **3**, respectively, these lifetimes are significantly shortened to the sub-ns range in all doubly labeled acpcPNA–DNA hybrids yielding excellent energy transfer efficiencies between 75% and 99%.

The following strand displacement experiment representatively shows the ability of acpcPNA to displace one DNA strand out of the 14mer duplex **DNA6–DNA3**. The recorded fluorescence of dye **3** shows a significant intensity increase due to the fact that the unmodified **DNA6** is replaced by **PNA1** bearing the energy donor which is dye **1** (Fig. 4). This clearly demonstrates that strand displacement of **DNA6** by **PNA1** occurs efficiently within several minutes due to the large increase in stability from 32.7 °C (**DNA6–DNA3**) to >90 °C (**PNA1–DNA3**). This kind of strand displacement is an important prerequisite for the *in vitro* strand invasion experiments described in the second part below.

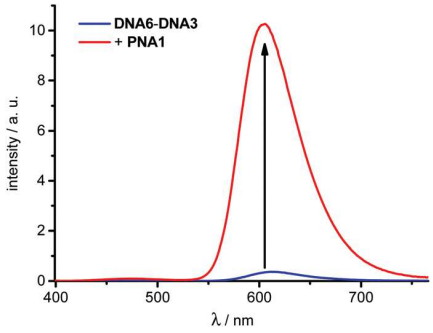


Fig. 4 Fluorescence intensity change during the strand displacement of **DNA6–DNA3** (2.5 μM in 10 mM Na–P_i buffer, pH 7) by **PNA1** (1.0 equiv.), λ_{exc} = 389 nm, for UV/Vis absorption spectra and time-dependent fluorescence intensity changes see ESI.†

Strand invasions

Antigene targeting of double stranded (ds) DNA by PNA is an important goal for biological applications inside living cells. It was shown[10,11] that the conformationally restricted acpcPNA is not able to form triplex structures like conventional PNA that binds to dsDNA in several different binding modes, including triplex formation, triplex invasion, duplex invasion and double duplex invasion.[4,46] In order to confirm that acpcPNA is able to undergo double duplex invasion and to follow this process by fluorescence spectroscopy, ds**DNA7** to ds**DNA10** were synthesized (Fig. 5). They were labeled by the blue emitting dye **1** or the red emitting dye **3**, respectively, at the central A (ds**DNA7**, ds**DNA9**) or at the U on the 3′-side (ds**DNA8**, ds**DNA10**). **PNA3** to **PNA5** contain 14mer sequences that are complementary to the central part of the sequences of ds**DNA7** to ds**DNA10**, and again 5 lysine residues to get enough solubility. Based on studies in other PNA systems[47,19] it can be assumed that the lysine residues facilitate the strand invasion process by stabilizing the PNA–DNA duplex and destabilizing the PNA–PNA self duplex, although whether their presence is essential for the invasion is difficult to confirm due to the poor solubility of dye-labeled PNA without lysine. The stability of these double strands is only slightly diminished, if at all, by the attached dyes: the T_m difference is only between −1.7 °C and +0.1 °C, if compared to a 30mer, completely unmodified DNA double strand (**DNA16–DNA15**, T_m = 70.4 °C, see Table S5 in ESI†). **PNA3** was modified with the yellow emitting dye **2** that serves as energy acceptor for dye **1** in ds**DNA7** and ds**DNA8**, whereas **PNA4** is modified with the green emitting dye **4** that represents the energy donor for dye **3** in ds**DNA9** and ds**DNA10** (for synthesis of dye **4**, see ESI†). With respect to the biological context, **PNA3** and **PNA4** are complementary to the TIAM1 sequence that is regulated by miRNA-21 and miRNA-31 in colon carcinoma cells.[46] The unmodified **PNA5** serves as the fourth strand that was originally thought to be essential for the double duplex invasions. **PNA6** bears a nonsense sequence for control experiments. Invasions were detected by blue : yellow or green : red fluorescence color contrasts (*e.g.* $I_{475\ nm}/I_{585\ nm}$) and by fluorescence intensity increase factors (Table 2) that were determined similarly as described above, for both acceptor dyes **2** or **3**, respectively, at their corresponding emission maximum. The factors represent

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2015

Published on 22 July 2015. Downloaded by Mahidol University on 31/08/2015 12:22:17.

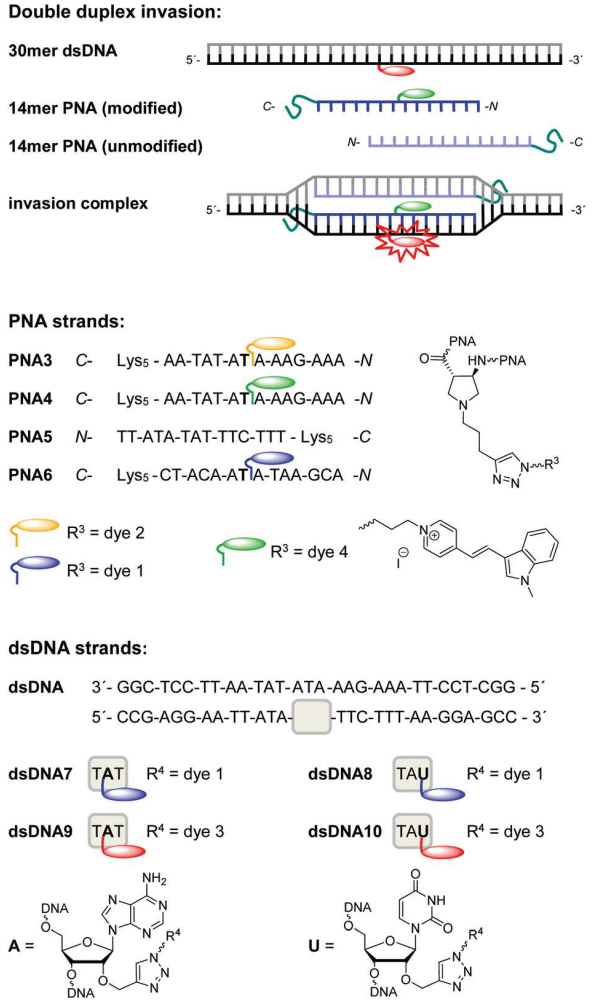


Fig. 5 Schematic drawing of double duplex invasion, sequences of **PNA3**–**PNA6**, structure of dye **4** and sequences of ds**DNA7**–ds**DNA10** (from top to bottom).

the ratios of the fluorescence intensities of the acceptor dyes after excitation at the absorption maxima of donor dyes **1** or **4**, respectively, to the fluorescence intensities of the acceptor dyes upon excitation at the same wavelength but in the absence of the donor dyes **1** or **4**. The latter fluorescence intensities were obtained with the non-invaded ds**DNA7** to ds**DNA10**.

Energy transfer efficiencies (Table 2) of all invasion complexes were calculated from the corresponding fluorescence lifetimes of donor dyes **1** (λ_{exc} = 370 nm, λ_{em} = 475 nm) and **4** (λ_{exc} = 435 nm, λ_{em} = 528 nm). All strand invasion experiments were performed in presence and absence of 250 mM NaCl since we assumed that duplex invasions by acpcPNA might be salt-dependent processes. At first, we studied kinetics of strand invasion into ds**DNA7** and ds**DNA8** by 1.0 equiv. of **PNA3** together with 1.0 equiv. of **PNA5**. Constant fluorescence intensities are reached within 60 minutes with NaCl and

Table 2 Color contrasts, fluorescence intensity in-crease factors and energy transfer efficiencies of acpcPNA strand invasion into dsDNA

Invasion complex	NaCl[a]	Color contrast	Fluo-rescence intensity increase factor[b]	Energy transfer efficiency[c]
ds**DNA7**–	+	1 : 2.1[d]	18.1	0.67 ± 0.09
PNA3–**PNA5**	–	1 : 7.5[e]	19.6	0.74 ± 0.12
ds**DNA8**–	+	1 : 1.4[f]	14.6	0.66 ± 0.15
PNA3–**PNA5**	–	1 : 4.8[g]	20.8	0.76 ± 0.12
ds**DNA9**–	+	1 : 43.0[h]	16.6	0.97 ± 0.04
PNA4–**PNA5**	–	1 : 87.0[i]	23.2	0.99 ± 0.01
ds**DNA9**–	+	1 : 23.7[h]	14.4	0.94 ± 0.03
PNA4	–	1 : 23.0[i]	17.4	0.94 ± 0.13
ds**DNA9**–**PNA6**	+	1 : 2.2[j]	1.8	—
ds**DNA10**–	+	1 : 28.6[k]	10.0	0.93 ± 0.06
PNA4–**PNA5**	–	1 : 61.1[l]	13.3	0.97 ± 0.02

[a] 250 mM. [b] I_{sample}/I_{dsDNA} (definition see text). [c] Calculated by fluorescence lifetimes (see ESI). [d] $I_{475\ nm}/I_{585nm}$. [e] $I_{477\ nm}/I_{580\ nm}$. [f] $I_{472\ nm}/I_{583\ nm}$. [g] $I_{475\ nm}/I_{574\ nm}$. [h] $I_{528\ nm}/I_{604\ nm}$. [i] $I_{528\ nm}/I_{600\ nm}$. [j] $I_{477\ nm}/I_{613\ nm}$. [k] $I_{529\ nm}/I_{611\ nm}$. [l] $I_{528\ nm}/I_{608\ nm}$.

90 minutes without NaCl (see ESI†). Although NaCl-free conditions show comparable kinetics, they yield stronger increase of emission intensities and considerably higher color contrasts blue : yellow. Obviously the dye interactions with DNA in the hybrids with DNA are salt dependent and alter the fluorescence intensities. Further titrations revealed that the fluorescence color change is maximized upon addition of 3.0 equiv. of acpcPNA (see ESI†). Hence, full double-duplex invasions into ds**DNA7** and ds**DNA8**, respectively, were carried out by addition of 3.0 equiv. of **PNA3** together with **PNA5**. In absence of acceptor dyes, the blue emitting dye **1** exhibit lifetimes of approximately 2.4–2.6 ns in ds**DNA7** and ds**DNA8**. The lifetimes are shortened down to 0.6–0.9 ns in the invasion complexes with **PNA3** and **PNA5**, which yields energy transfer efficiencies in the range from 66% to 76% (see ESI†). Moreover, strand invasion efficiencies could be determined based on these energy transfer efficiencies. As fluorescence reference for complete invasion, reference hybrids of **PNA3** with full-length complementary DNA strands bearing dye **1** at the central A were annealed. The energy transfer efficiencies of these hybrids were measured and represent 100% reference values. Remarkably, invasion efficiencies of approximately 99% could be accomplished in all cases (see ESI†). Best results with this dye combination were accomplished *e.g.* with ds**DNA7** in absence of NaCl (Fig. 6). The invasion by **PNA3** together with **PNA5** exhibits an intensity increase of the yellow emission by a factor of 19.6, a color contrast blue : yellow ($I_{477\ nm}/I_{580\ nm}$) of 1 : 7.5 and an energy transfer efficiency of 74%.

Similarly, double-duplex invasion kinetics of ds**DNA9** and ds**DNA10** after adding 1.0 equivalent **PNA4** together with **PNA5** were recorded. It is important to note that titrations revealed that 1.5 equiv. **PNA4** and **PNA5** were sufficient for this type of strand invasions to obtain maximal fluorescence change (see ESI†). Hence, quantification of energy transfer efficiencies,

Published on 22 July 2015. Downloaded by Mahidol University on 31/08/2015 12:22:17.

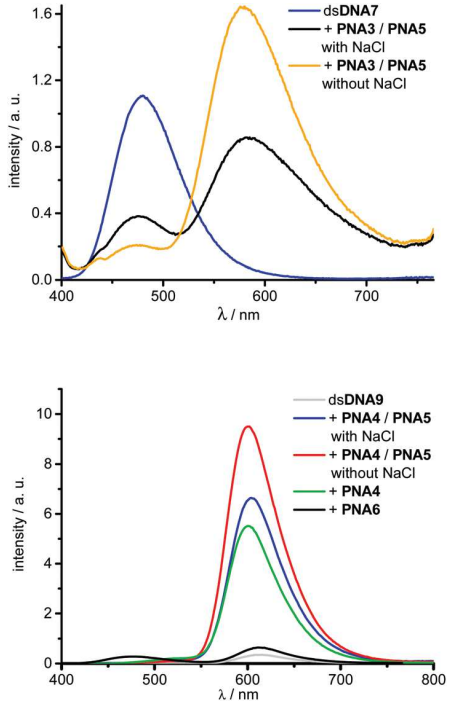


Fig. 6 Representative fluorescence spectra before and after double duplex invasion: ds**DNA7** (2.5 μM in 10 mM Na–P_i buffer, pH 7) invaded by 3.0 equiv. **PNA3** together with **PNA5**, in absence and presence of NaCl (250 mM), λ_{exc} = 391 nm (top); ds**DNA9** (2.5 μM in 10 mM Na–P_i buffer, pH 7) invaded by 1.5 equiv. **PNA4** together with **PNA5** in absence and presence of NaCl (250 mM), by 1.5 equiv. **PNA4** without **PNA5**, and by 1.5 equiv. non-sense **PNA6**, λ_{exc} = 391 nm (bottom).

fluorescence intensity increase factors and color contrasts green : red were carried out under these conditions, in absence and presence of NaCl, respectively (Table 2).

Remarkably, energy transfer from donor dye **4** to acceptor dye **3** occurs with 97–99% efficiency which yields very large increase factors and color contrasts. Here again, invasion efficiencies of 99% were achieved in all cases (see ESI†). Especially the modification at the central adenosine by dye **3** (ds**DNA9**) and invasion in the absence of NaCl turned out to be the optimal condition for double duplex invasion (Fig. 6). After addition of 1.5 equiv. of **PNA3** together with **PNA5** an increase factor of 23.3 and a color contrast green : red ($I_{528\ nm}$/$I_{600\ nm}$) of 1 : 87 could be accomplished. The observed variation of intensity enhancements and color contrasts could be assigned to the different anchor point of the post-synthetic DNA labeling by dye **3**. Reference measurements with corresponding DNA duplexes bearing the dye **3** modification at an adenosine (ds**DNA9**) *vs.* uridine (ds**DNA10**) clearly show approximately 20% stronger fluorescence intensities (see ESI†). Importantly, the possibility of strand invasion of ds**DNA9** by using only one PNA strand (**PNA4**) yields a D-loop and could be evidenced by energy transfer efficiency of 94% and invasion efficiency of 96% (see ESI†) which is only slightly lower compared to 99% invasion efficiencies obtained for double duplex invasions. Hence, the latter result demonstrates that single stranded acpcPNA may be sufficient to open double stranded DNA without requiring the other acpcPNA strand.

The duplex of the 14mer PNA with DNA containing a single mismatch base was still quite stable under the experimental conditions, therefore the invasion also proceeded with dsDNA target containing a mismatch at the invasion site (data not shown). In order to rule out that unspecific PNA aggregation to dsDNA occurs instead of the expected invasion, a random sequence and non-sense **PNA6** was synthesized and modified with the blue donor dye **1** (Fig. 5). A rather small fluorescence enhancement after addition of 1.5 equiv. non-sense **PNA6** to ds**DNA9** was observed (Fig. 6, Table 2). As proven in strand displacement experiments above, an efficient energy transfer is only possible between dye **1** and dye **3** if they get in close proximity to each other. Thus, the very small intensity increase factor of 1.8 in case of **PNA6** clearly excludes non-specific PNA–DNA aggregation.

In order to support the duplex invasions by **PNA3** and **PNA4**, melting temperatures of dsDNAs, acpcPNA–DNA-hybrids, their DNA–DNA-analogs and of complexes invaded by 1.0 equiv. acpcPNA were determined, in the absence or presence of NaCl, respectively (see ESI†). Fig. 7 representatively displays the normalized absorption changes during T_m determination of the complex ds**DNA8** invaded by only 1.0 equiv. **PNA3** together with **PNA5** without NaCl. It should be noted here that strand invasion with 1.0 equiv. of **PNA3** is not complete. Accordingly, discrete melting temperature regions for each part of the invading complex are explicitly visible: (i) Comparison 8mer ds**DNA13** (overhang on both ends of ds**DNA8**) that invasion takes place without dissociation of the remaining duplex regions on both sides of invasion, and with a locally displaced complementary strand. (ii) The melting transition of ds**DNA8** which corresponds to the non-invaded

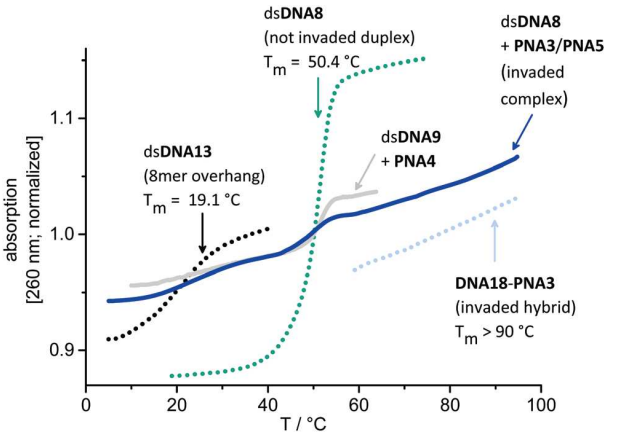


Fig. 7 Representative, normalized melting temperature determination of ds**DNA8** invaded by 1.0 equiv. **PNA3** and **PNA5** (blue line), and ds**DNA9** invaded by **PNA4** only (gray line), and those of references ds**DNA8** (green dotted), 8mer ds**DNA13** (black dotted) and **DNA18–PNA3**-hybrid (light blue dotted), in absence of NaCl.

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2015

duplex vanishes with more equivalents of **PNA3**/**PNA5**. (iii) The T_m of the **DNA18**–**PNA3** hybrid is >90 °C represents the T_m and the exceptionally stability of the invaded duplex (for sequences of ds**DNA13** and **DNA18** see ESI†).

Experimental

All experimental details, syntheses and spectroscopic data are described in the ESI.†

Conclusions

In conclusion to the first part of experiments, it became clear that displacements of DNA strands from acpcPNA–DNA hybrids can be followed by fluorescence color changes using our concept of wavelength probes ("DNA traffic lights") and are possible with longer oligonucleotides than the preannealed ones. The kinetics of these strand displacements are rather slow due to the high stability of the acpcPNA–DNA hybrids. Moreover, acpcPNA is able to displace a DNA strand from double stranded DNA of the same length. There is important significance of these *in vitro* experiments for cell biological applications. The intracellular transport could potentially be facilitated by annealing acpcPNA to a short DNA counter-strand. In combination with attached positively charged lysine residues on the termini of acpcPNA strands, such acpcPNA/DNA hybrids may potentially be easier delivered into the cells.

In the second part, we demonstrated that acpcPNA is able not only to displace one of the strands in double-stranded DNA of the same length, but also to invade into long double-stranded A–T rich DNA, remarkably with quantitative efficiency. Again, these processes can be followed by means of fluorescence color changes. Compared to conventional PNA systems which require 3 or more equiv. PNA, only 1.5 equiv. acpcPNA are sufficient to get efficient invasion. Although initial DNA duplex invasion experiments were performed with two non-self-pairing acpcPNA strands, single stranded acpcPNA was also able to invade into DNA duplex without requiring the other PNA strand, at least in the A–T rich sequence context being studied. Beyond that, our findings clearly confirm that the invasion takes place even at high ionic strength, a condition that is known to decrease the PNA duplex invasion efficiency. Therefore, acpcPNA exhibits sophisticated properties which are highly desirable in the field of biological analytics and antigene applications.

Acknowledgements

Financial support by the DFG (grant WA1387/17-1, GRK 2039), KIT and the Thailand Research Fund (DPG5780002) is gratefully acknowledged. P. Bohländer thanks the Karlsruhe House of Young Scientists (KHYS) for a fellowship to support a research stay in Bangkok.

Notes and references

1 P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg and O. Buchardt, *Science*, 1991, **254**, 1497–1500.
2 M. Egholm, O. Buchardt, L. Christensen, C. Behrens, S. M. Freier, D. A. Driver, R. H. Berg, S. K. Kim, B. Norden and P. E. Nielsen, *Nature*, 1993, 566–568.
3 P. E. Nielsen, *Acc. Chem. Res.*, 1999, **32**, 624–630.
4 P. E. Nielsen, *Chem. Biodiversity*, 2010, **7**, 786–804.
5 K. N. Ganesh and P. E. Nielsen, *Curr. Org. Chem.*, 2000, **4**, 931–943.
6 V. Kumar and K. N. Ganesh, *Acc. Chem. Res.*, 2005, **38**, 494–412.
7 K. Matsumoto, E. Nakata, T. Tamura, I. Saito, Y. Aizawa and T. Morii, *Chem. – Eur. J.*, 2013, **19**, 5034–5040.
8 J. K. Pokorski, M. A. Witschi, B. L. Purnell and D. H. Appella, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 15067–15073.
9 C. M. Micklitsch, B. Y. Oquare, C. Zhao and D. H. Appella, *Anal. Chem.*, 2012, **85**, 251–257.
10 T. Vilaivan and C. Srisuwannaket, *Org. Lett.*, 2006, **8**, 1897–1900.
11 C. Vilaivan, C. Srisuwannaket, C. Ananthanawat, C. Suparpprom, J. Kawakami, Y. Yamaguchi, Y. Tanaka and T. Vilaivan, *Artificial DNA: PNA & XNA*, 2011, **2**, 50–59.
12 J. Taechalertpaisarn, P. Sriwarom, C. Boonlua, N. Yotapan, C. Vilaivan and T. Vilaivan, *Tetrahedron Lett.*, 2010, **51**, 5822–5826.
13 T. Vilaivan, *Acc. Chem. Res.*, 2015, **48**, 1645–1656.
14 C. Boonlua, C. Vilaivan, H. A. Wagenknecht and T. Vilaivan, *Chem. – Asian J.*, 2011, **6**, 3251.
15 C. Boonlua, B. Ditmangklo, N. Reenabthue, C. Suparpprom, N. Poomsuk, K. Siriwong and T. Vilaivan, *RSC Adv.*, 2014, **4**, 8817–8827.
16 B. Ditmangklo, C. Boonlua, C. Suparpprom and T. Vilaivan, *Bioconjugate Chem.*, 2013, **24**, 614–625.
17 N. Yotapan, C. Charoenpakdee, P. Wathanathavorn, B. Ditmangklo, H.-A. Wagenknecht and T. Vilaivan, *Beilstein J. Org. Chem.*, 2014, **10**, 2166–2174.
18 J. Lohse, O. Dahl and P. E. Nielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1999, **96**, 11804–11808.
19 T. Ishizuka, J. Yoshida, Y. Yamamoto, J. Sumaoka, T. Tedeschi, R. Corradini, S. Sforza and M. Komiyama, *Nucleic Acids Res.*, 2008, **36**, 1464–1471.
20 T. Bentin and P. E. Nielsen, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 6378–6379.
21 S. Rapireddy, G. He, S. Roy, B. A. Armitage and D. H. Ly, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 15596–15600.
22 V. Chenna, S. Rapireddy, B. Sahu, C. Ausin, E. Pedroso and D. H. Ly, *ChemBioChem*, 2008, **9**, 2388–2391.
23 M. E. Hansen, T. Bentin and P. E. Nielsen, *Nucleic Acids Res.*, 2009, 4498–4507.
24 G. He, S. Rapireddy, R. Bahal, B. Sahu and D. H. Ly, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 12088–12090.
25 C. Holzhauser and H.-A. Wagenknecht, *J. Org. Chem.*, 2013, **78**, 7373–7379.

Published on 22 July 2015. Downloaded by Mahidol University on 31/08/2015 12:22:17.

Published on 22 July 2015. Downloaded by Mahidol University on 31/08/2015 12:22:17.

26 Q. Zheng, M. F. Juette, S. Jockusch, M. R. Wasserman, Z. Zhou, R. B. Altman and S. C. Blanchard, *Chem. Soc. Rev.*, 2014, **43**, 1044–1056.
27 P. V. Chang and C. R. Bertozzi, *Chem. Commun.*, 2012, **48**, 8864–8879.
28 B. A. Armitage, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2011, **15**, 806–812.
29 R. W. Sinkeldam, N. J. Greco and Y. Tor, *Chem. Rev.*, 2010, **110**, 2579–2619.
30 D. Y. Zhang and G. Seelig, *Nat. Chem.*, 2011, **3**, 103–113.
31 B. Yurke, A. J. Turberfield, A. P. Mills, F. C. Simmel and J. L. Neumann, *Nature*, 2000, **406**, 605–608.
32 H. Yan, X. Zhang, Z. Shen and N. C. Seeman, *Nature*, 2002, **415**, 62–65.
33 B. Chakraborty, R. Sha and N. C. Seeman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2008, **105**, 17245–17249.
34 K. Takahashi, S. Yaegashi, A. Kameda and M. Hagiya, in *DNA computing*, Springer, 2006, pp. 347–358.
35 G. Seelig, D. Soloveichik, D. Y. Zhang and E. Winfree, *Science*, 2006, **314**, 1585–1588.
36 B. M. Frezza, S. L. Cockroft and M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 14875–14879.
37 J. M. Picuri, B. M. Frezza and M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 9368–9377.
38 L. Qian, D. Soloveichik and E. Winfree, in *DNA computing and molecular programming*, Springer, 2011, pp. 123–140.
39 W. B. Sherman and N. C. Seeman, *Nano Lett.*, 2004, **4**, 1203–1207.
40 J.-S. Shin and N. A. Pierce, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 10834–10835.
41 H. Gu, J. Chao, S.-J. Xiao and N. C. Seeman, *Nature*, 2010, **465**, 202–205.
42 I. K. Astakhova, K. Pasternak, M. A. Campbell, P. Gupta and J. Wengel, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 2423–2426.
43 C. Holzhauser, R. Liebl, A. Goepferich, H.-A. Wagenknecht and M. Breunig, *ACS Chem. Biol.*, 2013, **8**, 890–894.
44 P. R. Bohländer and H. A. Wagenknecht, *Eur. J. Org. Chem.*, 2014, 7547–7551.
45 P. R. Bohländer and H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.*, 2013, **11**, 7458–7462.
46 T. Bentin, H. J. Larsen and P. E. Nielsen, *Biochemistry*, 2003, **42**, 13987–13995.
47 A. Abibi, E. Protozanove, V. V. Demidov and M. D. Frank-Kamenetskii, *Biophys. J.*, 2004, **86**, 3070–3078.

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2015

Talanta 146 (2016) 318–325

Contents lists available at ScienceDirect

Talanta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/talanta

Immobilization-free electrochemical DNA detection with anthraquinone-labeled pyrrolidinyl peptide nucleic acid probe

Jutatip Kongpeth [a], Sakda Jampasa [b], Piyasak Chaumpluk [c], Orawon Chailapakul [d], Tirayut Vilaivan [a,*]

[a] Organic Synthesis Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand
[b] Program in Petrochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand
[c] Laboratory of Plant Transgenic Technology and Biosensor, Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand
[d] Electrochemistry and Optical Spectroscopy Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:
Received 15 June 2015
Received in revised form
25 August 2015
Accepted 26 August 2015
Available online 28 August 2015

Keywords:
Redox active label
Peptide nucleic acid
Electrochemical detection
DNA biosensor
Screen-printed carbon electrode

ABSTRACT

Electrochemical detection provides a simple, rapid, sensitive and inexpensive method for DNA detection. In traditional electrochemical DNA biosensors, the probe is immobilized onto the electrode. Hybridization with the DNA target causes a change in electrochemical signal, either from the intrinsic signal of the probe/target or through a label or a redox indicator. The major drawback of this approach is the requirement for probe immobilization in a controlled fashion. In this research, we take the advantage of different electrostatic properties between PNA and DNA to develop an immobilization-free approach for highly sequence-specific electrochemical DNA sensing on a screen-printed carbon electrode (SPCE) using a square-wave voltammetric (SWV) technique. Anthraquinone-labeled pyrrolidinyl peptide nucleic acid (AQ-PNA) was employed as a probe together with an SPCE that was modified with a positively-charged polymer (poly quaternized-(dimethylamino-ethyl)methacrylate, PQDMAEMA). The electrostatic attraction between the negatively-charged PNA–DNA duplex and the positively-charged modified SPCE attributes to the higher signal of PNA–DNA duplex than that of the electrostatically neutral PNA probe, resulting in a signal change. The calibration curve of this proposed method exhibited a linear range between 0.35 and 50 nM of DNA target with a limit of detection of 0.13 nM ($3SD_{blank}$/Slope). The sub-nanomolar detection limit together with a small sample volume required (20 μL) allowed detection of <10 fmol (<1 ng) of DNA. With the high specificity of the pyrrolidinyl PNA probe used, excellent discrimination between complementary and various single-mismatched DNA targets was obtained. An application of this new platform for a sensitive and specific detection of isothermally-amplified shrimp's white spot syndrome virus (WSSV) DNA was successfully demonstrated.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The ability to precisely and sensitively identify specific DNA sequence has found widespread applications in many areas e.g. medical diagnostics, agricultural and food sciences [1], and environmental monitoring [2]. In addition to the direct sequencing that require expensive instrument and gel-based approaches that are labor intensive and time-consuming, various DNA sensing platforms that are more suitable for point-of-care diagnostics have been developed over the past decades [3–5]. Among these, electrochemical DNA biosensors offer several advantages including the operational simplicity, high sensitivity, miniaturization and low cost of instrument [6,7]. In general, a probe that can specifically recognize the nucleic acid target is first immobilized onto the electrode. Binding to the target results in a measurable signal change either directly or through a redox-active indicator or labels [8–14]. The most frequently employed immobilization methods include gold–thiol interaction [15–17] and amide bond formation [18,19]. The immobilization step is time-consuming, requires large excess of the probe, and needs careful optimization. Attempts were made to avoid this by using biotin-streptavidin [20,21], host–guest interaction [22], or by electrostatic adsorption [23]. Alternatively, an intercalating redox indicator [24] or a redox-active probe [25–27] had been used in combination with PCR or other

* Corresponding author. Fax: +66 22187598.
E-mail address: vtirayut@chula.ac.th (T. Vilaivan).

http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2015.08.059
0039-9140/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

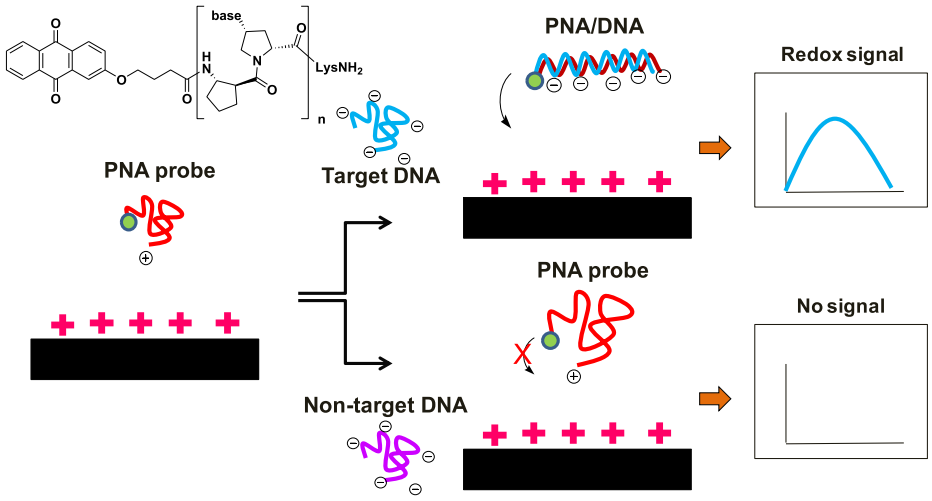


Fig. 1. The principle of immobilization-free electrochemical DNA biosensor employing AQ-PNA probe (structure of AQ-PNA shown in the inset).

enzymatic reactions for immobilization-free DNA detection.

Although DNA had been the most frequently employed probe, several new DNA analogs such as locked nucleic acid (LNA), morpholino and peptide nucleic acid (PNA) are becoming more popular alternatives because they can offer additional advantages including higher sensitivity, specificity and stability [28]. We recently reported a new conformationally constrained pyrrolidinyl peptide nucleic acid that showed excellent DNA hybridization properties [29–31] and demonstrated its applications as a probe for DNA sensing [32,33], including electrochemical detection [34–36].

The electrostatically neutral backbone of PNA allows designing of novel immobilization/detection concepts [37,38]. Luo et al. had recently developed an immobilization-free DNA sensing platform employing ferrocene-labeled PNA probes and indium-tin oxide (ITO) electrodes [39–41]. They observed that the signal detection can be switched from on-off to off-on mode by modifying the surface charge of the electrode [39]. Here we propose an immobilization-free electrochemical DNA sensing platform employing PNA and a polymer-modified screen-printed carbon electrode (SPCE), which can be easily and inexpensively prepared in one step. The electrostatic properties of the electrode can be readily controlled by adding the polymer modifier into the carbon ink without the need to form a monolayer or coating as usually the cases with other electrodes. A practical application was demonstrated in a highly specific detection of WSSV-a shrimp viral pathogen that causes large economic losses to shrimp aquaculture [42].

2. Material and methods

2.1. General materials and methods

Graphite powder (mesh size < 100) was purchased from Sigma-Aldrich. Carbon ink and silver/silver chloride were purchased from Acheson (California, USA). Other reagents and solvents were obtained from commercial suppliers and used without further purification. Poly quaternized-(dimethylamino)ethyl methacrylate (PQDMAEMA, $M_n = 1.38 \times 10^4$ Da) was synthesized and supplied by Dr. Voravee Hoven and Miss Pornpen Sae-ung (Chulalongkorn University). NMR spectra were recorded on a Bruker Avance 400 instrument operating at 400 MHz for ^{1}H and 100 MHz for ^{13}C. Chemical shifts were referenced to the residual protonated solvent peaks. MALDI-TOF MS spectra were measured on a Microflex MALDI-TOF mass spectrometer (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) in linear positive mode using α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CCA) matrix. Synthetic oligodeoxynucleotides were purchased from Pacific Science (Bangkok, Thailand) and were used as received. The sequences of PNA and DNA oligonucleotides used in this study, which correspond to a partial sequence of WSSV, are as follows:

AQ-labeled WSSV PNA probe (AQ-PNA): 2AQ-CTAAATTCAGA-LysNH$_2$

Target DNA (Dcomp): 5′-TCTGAATTTAG-3′

Single base mismatched DNA (DsmC): 5′-TCTGACTTTAG-3′

Long single stranded complementary DNA (ssDcomp19):
5′-CTAAGTCTGAATTTAGGGG-3′

Long single stranded mismatched DNA (ssDsmC19):
5′-CTAAGTCTGACTTTAGGGG-3′

Long double stranded complementary DNA (dsDcomp19):
5′-CTAAGTCTGAATTTAGGGG-3′
3′-GATTCAGACTTAAATCCCC-5′

Long double stranded mismatched DNA (dsDsmC19):
5′-CTAAGTCTGACTTTAGGGG-3′
3′-GATTCAGACTGAAATCCCC-5′

Other oligonucleotides used in the specificity test include (mismatch positions underlined):

DsmC6: 5′-TCTGACTTTAG-3′ DsmA4: 5′-TCTAAATTTAG-3′
DsmG6: 5′-TCTGAGTTTAG-3′ DsmT4: 5′-TCTTAATTTAG-3′
DsmT6: 5′-TCTGATTTTAG-3′ DsmA7: 5′-TCTGAAATTAG-3′
DsmC5: 5′-TCTGCATTTAG-3′ DsmC7: 5′-TCTGAACTTAG-3′
DsmG5: 5′-TCTGGATTTAG-3′ DsmG7: 5′-TCTGAAGTTAG-3′
DsmT5: 5′-TCTGTATTTAG-3′ DsmA11: 5′-TCTGAATTTAA-3′

2.2. General procedure for synthesis and labeling of the PNA probe

The WSSV PNA probe (AQ-PNA) used in this study is a pyrrolidinyl PNA with prolyl-2-aminocyclopentanecarboxylic acid backbone (acpcPNA) with a sequence of 2AQ-CTAAATTCAGA-LysNH$_2$ (Fig. 1). The unlabeled PNA probe was synthesized by Fmoc solid-phase peptide synthesis on a TentaGel resin with a Rink amide linker following a previously described protocol [30]. The Fmoc group at the *N*-terminus of the PNA on the solid support was next removed by treatment with 2% 1,8-diazabicycloundec-7-ene (DBU) and 20% piperidine in dimethylformamide (DMF) (100 μL) for 5 min. The free PNA (0.5 μmol) was next reacted with 4-(anthraquinone-2-oxy)butyric acid (pre-activated as a pentafluorophenyl ester, 7.5 μmol) and diisopropylethylamine (DIEA) (20 μL) in DMF (100 μL). After completion of the reaction

(monitored by MALDI-TOF MS), the AQ-PNA was heated with 1:1 (v/v) aqueous ammonia:dioxane in a sealed tube at 60 °C overnight to remove the nucleobase protecting groups. Following a cleavage from the solid support with trifluoroacetic acid (TFA), the crude AQ-PNA was purified by reverse phase HPLC (C18 column, 0.1% v/v TFA in H_2O–MeOH gradient).

2.3. Preparation of the PQDMAEMA-modified screen-printed carbon electrode (PQDMAEMA-SPCE)

The SPCE used in this study consisted of a three-electrode system prepared as described previously [36,43] (Fig. S1, SI). The only difference is that the carbon ink mixture was prepared by mixing PQDMAEMA solution (1% w/v), graphite powder and carbon ink together at a ratio of 0.35:0.2:1 (0.26% w/v PQDMAEMA in the ink mixture) followed by the binder solution (1 mL/g carbon ink) and sonicated to give a homogenous mixture.

2.4. DNA extraction and amplification by Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)

DNA of total genomic and associated WSSV viral DNA was extracted via a commercialized Genomic DNA Extraction Mini Kit (RBC, USA) using 50 mg broodstock specimen. The extracted DNA specimen was amplified by LAMP [44] with a set of primers consisting of WSSV F3, WSSV B3, WSSV FIP, and WSSV BIP (Table S1). The reaction mixture consisted of 40 mM Tris pH 8.8, 20 mM KCl, 16 mM $MgSO_4$, 0.2% Tween 20, 1.6 M betaine, 2.8 mM dNTP, and 8 U *Bst* DNA polymerase. After the incubation at 63 °C for 30 min, the LAMP products were examined by electrophoresis on 3% agarose gel and visualized under a UV transilluminator after staining with ethidium bromide.

For the specificity test, four strains of shrimp virus including WSSV, Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV), Yellow Head Virus (YHV), and Taura Syndrome Virus (TSV) were included in the specificity test (Fig. S2, SI). The WSSV and IHHNV DNA samples were extracted and amplified by LAMP as described above. For RNA viruses (YHV and TSV), total RNA was extracted based on the Nucleospin RNA kit (RBC, USA) as recommend in the manufacturer's protocol. The YHV and TSV RNA were amplified by RT-LAMP [44]. The first two viral-infected specimens were kindly provided by Chachoengsao Coastal Fisheries Research and Development Center, Chachoengsao, Thailand, and the latter two specimens were from a private hatchery in Phang Nga, Thailand.

The sensitivity of the assay was determined using equivalent copy numbers of control plasmid nucleic acid at 10-fold dilutions [45]. These samples having copy number covering from 10^7 to 10 copies were then amplified by LAMP at 63 °C for 30 min. The sensitivity of assay was analyzed and compared with standard PCR [46] via gel electrophoresis (Fig. S3, SI). To construct plasmid DNA for standard control, the DNA products corresponding to the transmembrane signal peptide gene were cloned into the TA vector as described by manufacturer (Invitrogen, Madison USA). This vector was transformed to *Escherichia coli* [47] and the nucleotide sequence was confirmed via direct nucleotide sequencing prior to use as control DNA. These plasmid DNAs were also used as a standard template of known copy number DNA.

2.5. Sample preparation and electrochemical measurement

2.5.1. Sample preparation

The concentrated stock solutions of AQ-PNA and DNA were mixed to give the desired concentration in an appropriate buffer. Twenty microliters of the AQ-PNA or AQ-PNA+DNA sample was dropped onto the PQDMAEMA-modified electrode. For double-stranded synthetic DNA and appropriately diluted LAMP samples, the AQ-PNA+DNA mixture was heated at 90 °C for 10 min and was cooled to room temperature before the measurement.

2.5.2. Electrochemical measurement

Electrochemical measurements were carried out on the PQDMAEMA-modified SPCE (surface area of the working electrode = 0.16 cm^2) by using PGSTAT 30 potentiostat (Metrohm Siam Company Ltd., Switzerland) and controlled with the General Purpose Electrochemical System (GPES) software version 4.9 (Eco Chemie B.V., Utrecht, The Netherlands). Unless otherwise specified, all measurements were conducted using a square-wave voltammetric method at room temperature (25 °C) in 10 mM Tris–HCl buffer pH 8.0. The redox signal was measured by SWV, with baseline subtraction. The measured signals are shown as average of three independent measurements ± standard deviations.

2.5.3. Optimization of parameters

For optimization of SWV parameters (amplitude, step potential and frequency), the SPCE prepared from 0.26% PQDMAEMA-modified carbon ink was used. The initial concentration of the AQ-PNA probe and DNA targets was 50 µM and was decreased to 50 nM during the optimization steps.

2.5.4. Specificity test and effects of excess non-target DNA

Specificity test was performed by measurement of the SWV signals of various mismatched DNA (see the sequence in Section 2.1) (50 nM) after hybridized with the AQ-PNA probe (50 nM) in 10 mM Tris–HCl buffer (pH 8.0) under the optimized conditions. Effects of excess non-target DNA to the signal of PNA and complementary PNA–DNA hybrid were studied with AQ-PNA (50 nM) and complementary DNA (Dcomp) (50 nM or 0 nM), in the presence of non-target DNA (DsmC) (0, 50, 500 and 5000 nM) in 10 mM Tris–HCl buffer (pH 8.0) under the optimized conditions.

2.5.5. Reproducibility test

Six PQDMAEMA-modified electrodes were prepared with the same process, and the signal was measured in the presence of AQ-PNA and complementary DNA (50 nM each) under the optimized conditions. Percent relative standard deviations (%RSD) were calculated according to Eq. (1), where SD is the standard deviation of current signal.

$$\%RSD = (SD/mean) \times 100 \quad (1)$$

3. Results and discussion

3.1. Synthesis and characterization of the AQ-PNA probe

Anthraquinone [48,49] was chosen as the redox active reporter group in this study because of its simple structure and excellent chemical stability. The carboxy-containing anthraquinone label 4-(anthraquinone-2-oxy)butyric acid was synthesized from commercially available 2-hydroxyanthraquinone (see details in Supporting information) and was characterized spectroscopically (Fig. S4-S6). It was next coupled to the PNA at the N-terminus to install the anthraquinone label. The *m/z* value of unlabeled PNA probe was 3844.2 (calcd *m/z* = 3842.2) and that of the AQ-PNA was 4134.5 (calcd *m/z* = 4134.3) (Fig. S7, SI). The mass increase of 290 Da corresponds to the AQ label, thus it can be concluded that the redox-active reporter AQ was successfully incorporated into the PNA probe. The purity of the AQ-PNA was confirmed to be > 90% by reverse phase HPLC (Fig. S8, SI)

Melting temperature (T_m) of the hybrid between the AQ-

Table 1
Thermal stability data of AQ-PNA: 2AQ-CTAAATTCAGA-LysNH$_2$ after hybridized with various DNA.

DNA	Sequence (5′→3′)	T_m (°C)[a]	ΔT_m[b]
Dcomp	TCTGAATTTGA	82.7	22.2
DsmC	TCTGACTTTGA	60.5	
Dcomp19	CTAAGTCTGAATTTAGGGG	> 90 (83.7)[c]	> 20 (22.7)[c]
DsmC19	CTAAGTCTGACTTTAGGGG	70.5 (61.0)[c]	

[a] T_m was measured in 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, [PNA] = [DNA] = 1.0 μM.
[b] T_m (complementary hybrid) – T_m (single base mismatched hybrid).
[c] Values in parenthesis were obtained in the presence of 100 mM NaCl.

labeled probe and its complementary DNA was 82.7 °C, which was higher than the corresponding DNA hybrid with the unlabeled probe (80.0 °C). Furthermore, the T_m value of the AQ-PNA decreased by more than 20 °C when hybridized with single base mismatched DNA (60.5 °C). These results (Table 1) indicate that the AQ-PNA probe binds to DNA with high affinity and specificity.

3.2. Preliminary electrochemical characterization of AQ-PNA probe

To test the possibility of using the labeled PNA as a probe for immobilization-free electrochemical detection of DNA sequence, the single stranded AQ-PNA was subjected to a SWV measurement on an unmodified SPCE that was pre-conditioned in 0.5 M aqueous NaOH at 1.3 V for 30 s [50]. A redox peak was observed at –0.71 V which corresponds well to that of the free AQ label (Fig. S9, SI). After hybridization with the complementary DNA target (Dcomp), the signal was completely suppressed. Hybridization with the single base mismatched DNA (DsmC) resulted in less signal suppression. It was hypothesized that the unmodified electrode possesses a negatively-charged surface after conditioning due to partial oxidation of the electrode surface to form carboxylate groups [50]. This can electrostatically interact with the AQ-PNA (carrying a positively-charged lysine residue) but not the corresponding PNA–DNA hybrid (negatively-charged due to the phosphate groups), resulting in the observed signal change.

3.3. Preparation and characterization of PQDMAEMA-modified electrode

It was proposed that if the electrode was first modified to provide a positively-charged surface, an electrochemical detection should be possible according to the principle shown in Fig. 1.

According to Fig. 1, no signal of the labeled PNA probe should be observed due to the unfavorable electrostatic interaction between the free AQ-PNA probe and the positively-charged electrode. Upon binding to the complementary DNA, the negatively-charged PNA–DNA hybrid should electrostatically attract to the electrode surface, allowing efficient electron transfer, resulting in a detectable electrochemical signal. A related concept for signal on PNA-based electrochemical DNA detection had been previously performed on a poly(allylamine hydrochloride) (PAH)-coated indium tin oxide (ITO) electrode [39].

In this work, a much simpler approach was proposed whereby the positively-charged polymer was mixed into the carbon ink mixture to be used for screening of the electrode [51]. Chitosan was previously incorporated into the SPCE to provide a handle for immobilization of the PNA probe [36]. Since chitosan contains positively-charged amino groups, we proposed that chitosan could be employed to provide positive charges on the electrode. Although a preliminary experiment confirmed that the immobilization-free electrochemical DNA detection was possible with the chitosan-modified SPCE, the limited solubility and operating pH range of chitosan [52] prompted us to find a more suitable candidate. The positively-charged quaternized polymer PQDMAEMA was found to be the most suitable polymer and was selected as the modifier in all subsequent studies. In a control experiment (Fig. S10, SI), the SWV signal at –0.78 V corresponding to the anthraquinone label in AQ-PNA was observed only when the complementary DNA was present and not in bare electrode, AQ-PNA or DNA alone, thus validating the concept proposed in Fig. 1.

3.4. Optimization of parameters and calibration curve

First, the buffer was optimized by comparing the SWV signals between free and hybridized probes (with complementary and mismatched DNA) and Tris–HCl buffer pH 8.0 was chosen (Fig. S11, SI). To determine the optimal amount of the polymer modifier, the percentage of the polymer in the carbon ink mixture to be used for the electrode screening was varied from 0.13% to 5.2% w/v and the electrochemical signal of the PNA probe was measured in the absence and presence of the complementary DNA target (Fig. S12, SI). Increasing the polymer amount resulted in higher signals, but also higher backgrounds. The carbon ink containing 0.26% PQDMAEMA was chosen for the next studies because it gave the best compromise between the signal and background. The performances of unmodified and PQDMAEMA-modified SPCE were also evaluated by cyclic voltammetry. At identical scan rate, the signal of $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ was stronger in the PQDMAEMA-modified electrode, which is to be expected based on its positively-charged nature. The signal of $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ increased as a linear function of square root of scan rate, providing linearity in the range of 0.2–0.6 V s^{-1} with $R^2 = 0.9974$ and 0.9986 for oxidation and reduction processes, respectively (Fig. S13, SI). The results imply that the oxidation and reduction of the redox active reporter on these modified electrodes is diffusion controlled. However, when the target DNA or PNA–DNA duplex are present, they may strongly adsorb onto the electrode surface, which makes the conclusion based on the response to $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ not applicable.

By employing 50 nM AQ-PNA–DNA hybrids on 0.26% PQDMAEMA-modified SPCE, the optimal SWV parameters including frequency 40 Hz, step potential 0.0075 V and amplitude 100 mV were identified (Fig. S14, SI). At 50 nM AQ-PNA probe concentration, the measured SWV signal showed a logarithmic relationship with the concentration of complementary DNA (Dcomp) (Fig. 2A). The calibration curve exhibited a linear range between 0.35 and 50 nM of DNA (log scale) with $R^2 = 0.9757$ (Fig. 2B). At high concentrations of DNA, the signal decreased (at 350 nM, the signal was approximately 50% of the maximum signal at 50 nM) which can be explained by a competitive adsorption of the excess unhybridized DNA (vide infra, Section 3.6). The limit of detection (LOD), as calculated from 3 times the ratio between the standard deviation of the blank signal and slope of the calibration graph was 0.13 nM (130 pM). The single mismatched DNA target (DsmC) yielded signals that are indistinguishable from the background at all concentrations tested. The sub-nanomolar LOD are comparable to other non-amplified electrochemical DNA detection platforms that employ covalently-labeled redox-active probes [11,53], see also Table 2. The small sample volume required (20 μL) means that the total amount of detectable DNA sample is small (LOD < 10 fmol or < 1 ng for 300nt ssDNA). This is considerably better than the detection limit obtained from the PAH-modified ITO electrode by Luo et al. (40 fmol) [39]. Although not the best by electrochemical detection standard, this level of sensitivity is better than what can be achieved by optical dyes commonly used in gel staining (1–50 ng of DNA), and is more than sufficient for detection of real DNA samples obtained from PCR or other suitable amplification methods. Moreover, the quantity of the probe required for each measurement (50 nM, 20 μL or 1 pmol) was also

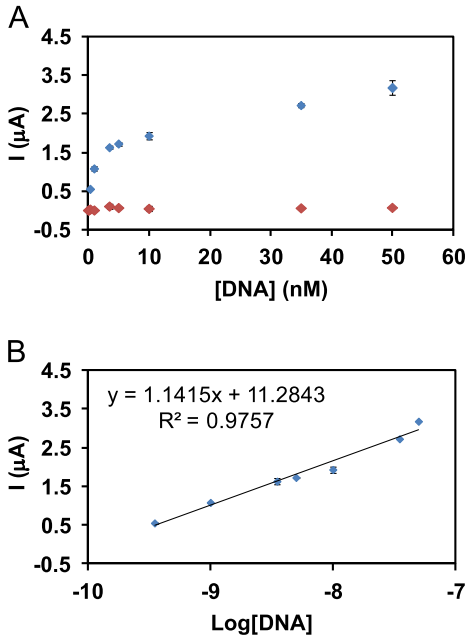


Fig. 2. (A) Scan of linear range of AQ-PNA (50 nM) after addition of complementary DNA (blue) and non-complementary DNA (red) at 0.1, 0.35, 1, 3.5, 5, 10, 35 and 50 nM (total volume=20 μL in 10 mM Tris–HCl buffer pH 8.0) on PQDMAEMA-modified SPCE (polymer content 0.26% in the carbon ink composition before screening) under optimized conditions (frequency 40 Hz, step potential 0.075 V, amplitude 0.100 V) (B) same as (A), but the concentrations were expressed in log scale. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

much smaller than the typical concentration required for probe immobilization (μM range), and the hybridization and the measurement take only a few minutes to complete.

It should be noted that the sensor exhibits satisfactory reproducibility. Since the screen-printed carbon electrodes employed are disposable type, only the electrode-to-electrode reproducibility was calculated at 50 nM AQ-PNA probe and two concentrations of DNA at low and high ends of the linearity range (3.5 nM and 35 nM). The percent relative standard deviations (RSD) of 9.06% and 8.50% were obtained at 3.5 and 35 nM DNA, respectively.

3.5. Specificity of AQ-PNA probe

Specificity is one of the most important aspects in DNA sequence detection. The specificity of this new immobilization-free PNA-based platform was investigated with several DNA targets containing a single base mismatch in the sequence at various positions. From Fig. 3, it is clear that the developed DNA sensing platform exhibits excellent specificity without the requirement for elevated temperature [39], addition of organic co-solvents [56], or more elaborated design [57]. The signal was observed only with complementary DNA and the mismatched DNA DsmA11 carrying a single base mismatched at the 3′-end of the strand. This is not unexpected considering the small difference in stabilities of complementary and terminal mismatched hybrids [58]. All other single base mismatched DNA targets gave virtually no detectable signal, hence it is important to design the probe that include the hotspot towards the middle of the sequence for single mismatch discrimination purposes. The high specificity of the sensor can be attributed to the high specificity of the pyrrolidinyl PNA probe (acpcPNA) used. The large difference in stability (ΔT_m=22 °C, see Table 1) means that the mismatched PNA–DNA hybrid is much less stable than the complementary hybrid, and therefore cannot

Table 2
Comparison of performance of the present work with previous works.

Electrode[a]	Probe[b]	Detection	Linear range	Detection limit	References
ITO	19nt Fc-labeled PNA (non-immobilized)	DPV	0.25×10^{-6}–2×10^{-6} M	0.25×10^{-6} M	[39]
PAH/ITO	19nt Fc-labeled PNA (non-immobilized)	DPV	20×10^{-9}–100×10^{-9} M	20×10^{-9} M	[39]
ITO	11nt Fc-labeled PNA and 47nt hairpin-forming oligonucleotide (non-immobilized)	DPV (with DNA polymerase-assisted target recycling)	0.1×10^{-9}–20×10^{-9} M	0.1×10^{-9} M	[27]
ITO	28nt MB-labeled hairpin DNA oligonucleotide (non-immobilized)	DPV (with Exonuclease III-assisted target recycling)	20×10^{-12}–0.3×10^{-9} M	20×10^{-12} M	[26]
ITO	37nt Fc-labeled hairpin DNA oligonucleotide (non-immobilized)	DPV (with Exonuclease III-assisted autocatalytic target recycling)	0.1×10^{-12}–0.1×10^{-9} M	0.1×10^{-12} M	[54]
AuE	77nt Fc-labeled hairpin DNA oligonucleotide with streptavidin aptamer region (non-immobilized)	SWV (with polymerase/nicking-induced isothermal signal amplification)	5×10^{-15}–10×10^{-12} M	2.56×10^{-15} M	[55]
Poly(p-phenylenediamine)-AuE	9–12nt unlabeled acpcPNA (immobilized)	Capacitive	1×10^{-12}–1×10^{-8} M	0.2×10^{-12} M	[34]
Chitosan-modified SPCE	14nt AQ-labeled acpcPNA (immobilized)	SWV	0.02×10^{-6}–12×10^{-6} M	4×10^{-9} M	[36]
PQDMAEMA-modified SPCE	11nt AQ-labeled acpcPNA (non-immobilized)	SWV	0.35×10^{-9}–35×10^{-9} M	0.13×10^{-9} M	This work

[a] AuE=gold electrode; ITO=indium tin oxide; SPCE=screen print carbon electrode.
[b] Fc=ferrocene; MB=methylene blue; AQ=anthraquinone.

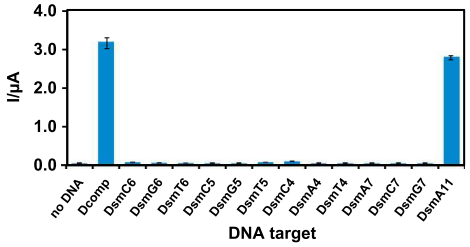


Fig. 3. Specificity test of AQ-PNA (50 nM) with various mismatched DNA (50 nM) in 10 mM Tris–HCl buffer (pH 8.0) under optimized conditions.

efficiently form and be adsorbed by the positively charged electrode. The excellent mismatch discrimination of acpcPNA had been repeatedly demonstrated in prior publications [31–36,38].

3.6. Effects of excess target and non-target DNA

Since both unhybridized and hybridized DNA are negatively charged and can be electrostatically adsorbed by the electrode, any DNA detection platforms that rely on the differential adsorption DNA and PNA–DNA hybrids onto the electrode are subjected to interference by competitive adsorption of free DNA that may result in decreased signal [39]. In the case of complementary DNA target, the signal does decrease when the concentration of the DNA exceeds that of the probe (Section 3.4). In principle, one could solve this problem by increasing the probe concentration in order to avoid the situation of having excess of target DNA over the probe. Next, the effect of non-complementary DNA target was investigated. When non-complementary DNA was added into the solution in 1, 10 and 100 folds relative to the complementary DNA, it competes with the PNA–DNA hybrids in adsorption to the electrode as shown by the decreased electrochemical signals. Nevertheless, a clear signal could still be observed at the amount of non-complementary DNA as high as 100 times to that of the complementary DNA. It should be noted that in all cases, the non-complementary DNA does not contribute to the electrochemical signal even at high concentrations (Fig. 4). The negative effect due to high concentration of unhybridized DNA was also observed in Luo's work [39], which was so pronounced that the signal decreased to $<20\%$ in the presence of 10 equiv. of non-complementary DNA, and almost completely disappeared at 15 equiv. Our sensor is less sensitive to the interference by the non-target DNA, about 50% and 20% of the signal relative to the maximum was retained at 10 and 100 equiv., respectively (Fig. 4). In addition, the possible interferences by proteins were studied using bovine serum albumin (BSA) as a model protein. It was observed that more than 90% of the PNA–DNA signal was retained at BSA concentrations of 0.7% or less. However, at high concentrations of BSA, the signal was suppressed considerably (Fig. S15, SI). Nevertheless, these potential interferences by excess of DNA and proteins should not negatively affect the analysis of amplified DNA samples, which contain predominantly the DNA target of interest in nanomolar concentration ranges (see Section 3.8).

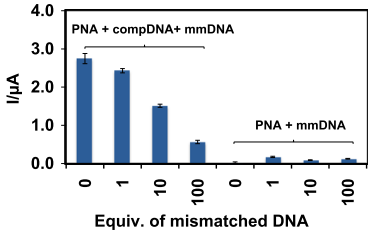


Fig. 4. Effects of non-target DNA to the signal of PNA and complementary PNA–DNA hybrid; concentrations: PNA=50 nM, complementary DNA (Dcomp)=50 or 0 nM and non-target DNA (DsmC)=0, 50, 500 and 5000 nM (0, 1, 10 and 100 equiv.) in 10 mM Tris–HCl buffer (pH 8.0) under optimized conditions.

3.7. Effects of long and duplex target DNA

The situation for detection of real DNA samples will be significantly different from the proof-of-principle experiments above because real DNA samples are usually much longer than the probe and exist as a duplex. The ability of this platform to detect long and duplex DNA targets was therefore investigated. A single stranded 19bp DNA target (ssDcomp19) having a central region that is complementary to the AQ-PNA probe gave comparable signal to the short DNA target, suggesting that the extra hanging part in the DNA strand does not interfere with the detection (Fig. S16A and B, SI). The electrochemical signal was still observed with the duplex DNA target (dsDcomp19) formed by annealing ssDcomp19 and its complementary DNA strand. However, longer times are required for the signal to reach maximum (10 and 20 min in the absence and presence of 100 mM NaCl, respectively). To improve the PNA–DNA binding kinetics, the DNA duplex and PNA was mixed and heated to 90 °C and cooled down, after which the maximum signal was reached immediately. No signals were observed in the analogous experiment carried out with single and double stranded DNA target containing a mismatched base (dsDsmC19), thus confirming the high specificity of the PNA probe (Fig. S16C, SI).

3.8. Detection of real DNA samples

In detection of real DNA samples, the DNA extracted from the shrimp was first amplified by LAMP [44]. This technique was chosen because it offers several advantages over PCR including high specificity, larger amplification factor and the ability to operate at a constant temperature (no need for thermal cycling). The LAMP samples were mixed with the probe before denaturation by heating to 90 °C before cooling down. As shown in Fig. 5A and B, a clear signal was observed with the WSSV-positive sample and not

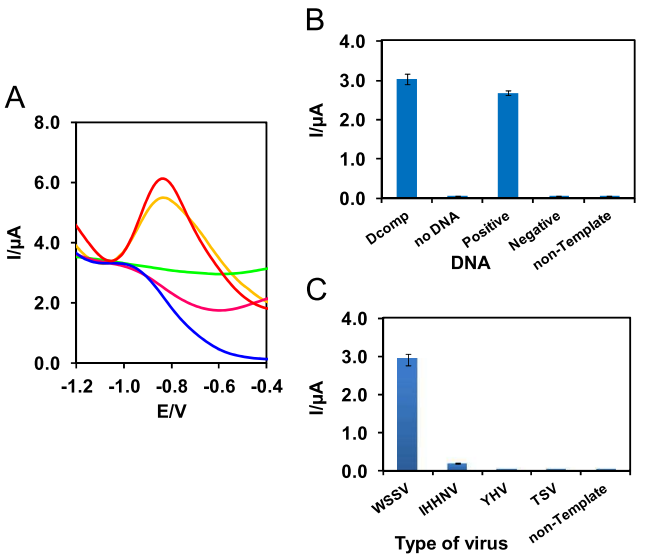


Fig. 5. Comparison of SWV signals [(A) raw data, (B) bar graph] obtained from detection of various LAMP-amplified WSSV samples: positive (orange), negative (pink), non-template control (green), synthetic complementary DNA (Dcomp, red), no DNA (blue) and (C) specificity test for WSSV among other samples including non-template control, IHHNV, YHV and TSV. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 3
Comparison of detection limit of this work with other WSSV detection methods.

DNA amplification	Detection	Detection limit	References
PCR	Gel electrophoresis (EtBr staining)	100 pg	[59]
Nested PCR	Gel electrophoresis (EtBr staining)	100 fg	[59]
LAMP	Gel electrophoresis (EtBr staining)	1 fg	[59]
Real-time LAMP	Turbidity	100 copies	[60]
LAMP	Fluorescence (FRET probes)	100 copies	[61]
LAMP	Colorimetric (gold nanoparticles)	200 copies	[62]
Real time, isothermal recombinase polymerase amplification	Fluorescence (SYBR green)	5 copies	[63]
Insulated isothermal PCR	Fluorescence (TaqMan probe)	10 copies	[64]
LAMP	Electrochemical (PNA probe/SPCE)	10 copies	This work

with the negative samples and non-template DNA control.

The specificity of the DNA detection was further studied by comparison of the signals of LAMP samples obtained from various types of shrimp virus including IHHNV, YHV, and TSV. The results suggested that this PNA-based sensor is highly specific and can unambiguously differentiate WSSV from other types of virus (Fig. 5C). Finally, the sensitivity test suggested that in combination with LAMP technique as low as 10 copies of WSSV DNA in the sample could be readily detected (Fig. S17, SI). This level of sensitivity is competitive with other PCR and LAMP-based WSSV DNA assays with optical detection (Table 3). Therefore, the new technique shows a great promise in high throughput analysis of DNA samples.

4. Conclusions

An immobilization-free miniaturized electrochemical platform for DNA sequence detection based on anthraquinone-labeled pyrrolidinyl peptide nucleic acid (AQ-PNA) probe was successfully developed. The working principle involves a differential electrostatic adsorption between PNA and PNA–DNA hybrids onto a screen-printed carbon electrode modified with a positively-charged polymer (PQDMAEMA) that result in a positive signal only when the AQ-PNA is hybridized with the complementary DNA target. Although the same basic principle has been reported and implemented in previous works, the combination of pyrrolidinyl PNA probe and PQDMAEMA-modified screen print carbon electrode for DNA detection in an immobilization-free format is previously unreported. Hence, the ability of the developed DNA sensing platform to exhibit an excellent specificity in discriminating of complementary DNA from various non-complementary, including single-mismatched, DNA targets with a sub-nanomolar detection limit, and its applications in sensitive detection of real DNA samples should be considered as a significant achievement. The immobilization-free procedure means that there is no extra probe immobilization step that is time-consuming (several hours) and requires large excess of probes (usually in the μM range) [15,34]. The amount of probe required for each measurement in this immobilization-free system is very small (1 pmol or less), which compensates for its disposable nature. In addition to the performance, this DNA sensing platform offers significant advantages when compared to other related DNA sensing platforms in terms of operational simplicity, costs and portability. However, one limitation that requires further improvement is the inability to reuse the electrode due to potential loss of the water-soluble linear polymers upon washing, which could be solved by using more highly cross-linked polymers. Another additional limitation is the signal suppression by competitive adsorption of DNA and proteins at high concentrations which could complicate the DNA analysis in the presence of large excess of such interferences. Even with such limitations, the developed sensor was successfully used in combination with LAMP for a rapid and specific detection of WSSV from shrimp DNA with a higher sensitivity than gel- or fluorescence-based detection.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge financial supports from the Thailand Research Fund (DPG5780002) and Center of Innovative Nanotechnology (CIN). We also gratefully acknowledge Dr. Voravee Hoven and Miss Pornpen Sae-ung for kindly providing the PQDMAEMA samples.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2015.08.059.

References

[1] D.S. Elenis, D.P. Kalogianni, K. Glynou, P.C. Ioannou, T.K. Christopoulos, Anal. Bioanal. Chem. 392 (2008) 347–354.
[2] I. Palchetti, M. Mascini, Analyst 133 (2008) 846–854.
[3] K. Glynou, P.C. Ioannou, T.K. Christopoulos, V. Syriopoulou, Anal. Chem. 75 (2003) 4155–4160.
[4] V. Gubala, L.F. Harris, A.J. Ricco, M.X. Tan, D.E. Williams, Anal. Chem. 84 (2012) 487–515.
[5] X. Mao, Y. Ma, A. Zhang, L. Zhang, L. Zeng, G. Liu, Anal. Chem. 81 (2009) 1660–1668.
[6] X. Luo, I.M. Hsing, Analyst 134 (2009) 1957–1964.
[7] B.C. Janegitz, J. Cancino, V. Zucolotto, J. Nanosci. Nanotechnol. 14 (2014) 378–389.
[8] M.I. Pividori, A. Merkoçi, S. Alegret, Biosens. Bioelectron. 15 (2000) 290–303.
[9] T.G. Drummond, M.G. Hill, J.K. Barton, Nat. Biotechnol. 10 (2003) 1192–1199.
[10] F. Lucarelli, G. Marrazza, A.P.F. Turner, M. Mascini, Biosens. Bioelectron. 19 (2004) 515–530.
[11] P. de-los-Santos-Álvarez, M.J. Lobo-Castañón, A.J. Miranda-Ordieres, P. Tuñón-Blanco, Anal. Bioanal. Chem. 378 (2004) 104–118.
[12] P. He, Y. Xu, Y. Fang, Anal. Lett. 38 (2005) 2597–2623.
[13] R.Y. Lai, E.T. Lagally, S.-H. Lee, H.T. Soh, K.W. Plaxco, A.J. Heeger, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103 (2006) 4017–4021.
[14] J. Labuda, A.M.O. Brett, G. Evtugyn, M. Fojta, M. Mascini, M. Ozsoz, L. Palchetti, E. Palecek, J. Wang, Pure Appl. Chem. 82 (2010) 1161–1187.
[15] Y. Xiao, X. Qu, K.W. Plaxco, A.J. Heeger, J. Am. Chem. Soc. 129 (2007) 11896–11897.
[16] A. Abi, E.E. Ferapontova, J. Am. Chem. Soc. 134 (2012) 14499–14507.
[17] E. Farjami, L. Clima, K. Gothelf, E.E. Ferapontova, Anal. Chem. 83 (2011) 1594–1602.
[18] H. Cai, X. Cao, Y. Jiang, P. He, Y. Fang, Anal. Bioanal. Chem. 375 (2003) 287–293.
[19] N. Zhu, Z. Chang, P. He, Y. Fang, Anal. Chim. Acta 545 (2005) 21–26.
[20] A. Erdem, P. Papakonstantinou, H. Murphy, M. McMullan, H. Karadeniz, S. Sharma, Electroanalysis 22 (2010) 611–617.
[21] G. Liu, Y. Wan, V. Gau, J. Zhang, L. Wang, S. Song, C. Fan, J. Am. Chem. Soc. 130 (2008) 6820–6825.
[22] H. Fan, Y. Xu, Z. Chang, R. Xing, Q. Wang, P. He, Y. Fang, Biosens. Bioelectron. 26 (2011) 2655–2659.
[23] C. Xu, H. Cai, P.G. He, Y.Z. Fang, Analyst 126 (2001) 62–65.
[24] M. Kobayashi, T. Kusakawa, M. Saito, S. Kaji, M. Oomura, S. Iwabuchi, Y. Morita,

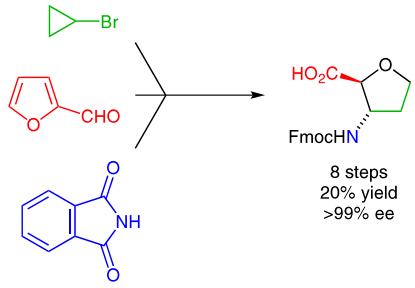
Q. Hasan, E. Tamiya, Electrochem. Commun. 6 (2004) 337–343.
[25] X. Luo, I.M. Hsing, Electrochem. Commun. 13 (2011) 742–745.
[26] F. Xuan, X. Luo, I.M. Hsing, Anal. Chem. 84 (2012) 5216–5220.
[27] F.X.L. Xuan, I.M. Hsing, Biosens. Bioelectron. 35 (2012) 230–234.
[28] C. Briones, M. Moreno, Anal. Bioanal. Chem. 402 (2012) 3071–3089.
[29] C. Vilaivan, C. Srisuwannaket, C. Ananthanawat, C. Suparpprom, J. Kawakami, Y. Yamaguchi, Y. Tanaka, T. Vilaivan, Artif. DNA: PNA XNA 2 (2011) 50–59.
[30] T. Vilaivan, C. Srisuwannaket, Org. Lett. 8 (2006) 1897–1900.
[31] T. Vilaivan, Acc. Chem. Res. 48 (2015) 1645–1656.
[32] C. Ananthanawat, T. Vilaivan, V.P. Hoven, X. Su, Biosens. Bioelectron. 25 (2010) 1064–1069.
[33] W. Janrungroatsakul, T. Vilaivan, C. Vilaivan, S. Watchasit, C. Suksai, W. Ngeontae, W. Aeungmaitrepirom, T. Tuntulani, Talanta 105 (2013) 1–7.
[34] S. Sankoh, S. Samanman, O. Thipmanee, A. Numnuam, W. Limbut, P. Kanatharana, T. Vilaivan, P. Thavarungkul, Sens. Actuators B 177 (2013) 543–554.
[35] O. Thipmanee, S. Samanman, S. Sankoh, A. Numnuam, W. Limbut, P. Kanatharana, T. Vilaivan, P. Thavarungkul, Biosens. Bioelectron. 38 (2012) 430–435.
[36] S. Jampasa, W. Wonsawat, N. Rodthongkum, W. Siangproh, P. Yanatatsaneejit, T. Vilaivan, O. Chailapakul, Biosens. Bioelectron. 54 (2014) 428–434.
[37] K. Kerman, M. Vestergaard, N. Nagatani, Y. Takamura, E. Tamiya, Anal. Chem. 78 (2006) 2182–2189.
[38] B. Boontha, J. Nakkuntod, N. Hirankarn, P. Chaumpluk, T. Vilaivan, Anal. Chem. 80 (2008) 8178–8186.
[39] X. Luo, T.H. Lee, I.M. Hsing, Anal. Chem. 80 (2008) 7341–7346.
[40] X. Luo, I.M. Hsing, Electroanalysis 21 (2009) 1557–1561.
[41] X. Luo, I.M. Hsing, Biosens. Bioelectron. 25 (2009) 803–808.
[42] C.M. Escobedo-Bonilla, V. Alday-Sanz, M. Wille, P. Sorgeloos, M.B. Pensaert, H. J. Nauwynck, J. Fish Dis. 31 (2008) 1–18.
[43] E. Khaled, H.N.A. Hassan, A. Girgis, R. Metelka, Talanta 77 (2008) 737–743.
[44] T. Notomi, H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino, T. Hase, Nucleic Acids Res. 28 (2000) e63.
[45] ⟨http://www6.appliedbiosystems.com/support/tutorials/pdf/quant_pcr.pdf⟩, accessed 27.07.14.
[46] L.M. Nunan, D.V. Lightner, J. Virol. Methods 171 (2011) 318–321.
[47] J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York, 1989.
[48] S. Kumamoto, M. Watanabe, N. Kawakami, M. Nakamura, K. Yamana, Bioconjugate Chem. 19 (2008) 65–69.
[49] M.T. Tierney, M.W. Grinstaff, J. Org. Chem. 65 (2000) 5355–5359.
[50] J. Wang, M. Pedrero, H. Sakslund, O. Hammerich, J. Pingarron, Analyst 121 (1996) 345–350.
[51] E. Khaled, H.N.A. Hassan, I.H.I. Habib, R. Metelka, Int. J. Electrochem. Sci. 5 (2010) 158–167.
[52] W. Cao, C.J. Easley, J.P. Ferrance, J.P. Landers, Anal. Chem. 78 (2006) 7222–7228.
[53] M. Lazerges, F. Bedioui, Anal. Bioanal. Chem. 405 (2013) 3705–3714.
[54] S. Liu, Y. Lin, L. Wang, T. Liu, C. Cheng, W. Wei, B. Tang, Anal. Chem. 86 (2014) 4008–4015.
[55] J. Zhuang, D. Tang, W. Lai, G. Chen, H. Yang, Anal. Chem. 86 (2014) 8400–8407.
[56] A.I.K. Lao, X. Su, K.M.M. Aung, Biosens. Bioelectron. 24 (2009) 1717–1722.
[57] M. Inouye, R. Ikeda, M. Takase, T. Tsuri, J. Chiba, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (2005) 11606–11610.
[58] G.L. Igloi, Proc Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998) 8562–8567.
[59] T. Kono, R. Savan, M. Sakai, T. Itami, J. Virol. Methods 115 (2004) 59–65.
[60] T. Mekata, R. Sudhakaran, T. Kono, K. Supamattaya, N.T. Linh, M. Sakai, T. Itami, Lett. Appl. Microbiol. 48 (2009) 25–32.
[61] P.H. Chou, Y.C. Lin, P.H. Teng, C.L. Chen, P.Y. Lee, J. Virol. Methods 173 (2011) 67–74.
[62] Y. Seetang-Nun, W. Jaroenram, S. Sriurairatana, R. Suebsing, W. Kiatpathomchai, Mol. Cell. Probes 27 (2013) 71–79.
[63] X. Xia, Y. Yu, M. Weidmann, Y. Pan, S. Yan, Y. Wang, PLoS One 9 (2014) e104667.
[64] Y.-L. Tsai, H.-T.T. Wang, H.-F.G. Chang, C.-F. Tsai, C.-K. Lin, P.-H. Teng, C. Su, C.-C. Jeng, P.-Y. Lee, PLoS One 7 (2014) e45278.

Synthesis of a Tetrahydrofuranyl β-Amino Acid for Peptide Nucleic Acid Construction

Roderick W. Bates[*a]
Tirayut Vilaivan[b]
Suryavanshi Padmakar Apparao[a]
Tu Thanh Ho[a]

[a] Division of Chemistry and Biological Chemistry, School of Physical and Mathematical Sciences, Nanyang Technological University, 21 Nanyang Link, 637371, Singapore
roderick@ntu.edu.sg
[b] Organic Synthesis Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand

Dedicated to Professor Steven Ley on the occasion of his 70th birthday

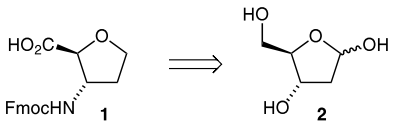


Received: 21.08.2015
Accepted after revision: 13.09.2015
Published online: 13.10.2015
DOI: 10.1055/s-0035-1560649; Art ID: st-2015-d0655-l

Abstract A tetrahydrofuranyl β-amino acid has been prepared by using the asymmetric dihydroxylation of a furyl alkene to establish the stereochemistry. The furan moiety was employed as a carboxylic acid surrogate.

Key words amino acid, tetrahydrofuran, dihydroxylation, oxidation, furan

β-Amino acids have gained in importance as building blocks in bio-organic chemistry over the last few decades with the realisation that they offer advantages over the traditional α-amino acids.[1] The peptides resulting from such novel amino acids have been studied for diverse reasons. These include the effect on peptide structure, such as folding properties,[2] and on function, as well as their use in peptide nucleic acids (PNA).[3] Indeed, certain PNAs, especially those using unnatural amino acids, can bind more strongly to the complementary strand of DNA than DNA itself. Studies on such systems, and their applications are, naturally, constrained by the availability of such amino acids. Recently, one of our laboratories reported the use of a PNA containing the novel tetrahydrofuranyl β-amino acid **1**.[3b,4] This compound, in an N-protected/C-activated form, was synthesised in 11 steps from, appropriately, 2-deoxyribose **2** (Scheme 1). The use of carbohydrates as chiral starting materials (the 'chiron approach') can be enormously effective;[5] on the other hand, the synthetic scheme may become encumbered with multiple functional group transformations. In this instance, we speculated that a synthesis from achiral, noncarbohydrate starting materials, taking advantage of asymmetric dihydroxylation (AD),[6] might prove advantageous. The core of the strategy was to employ dihydroxylation of a furyl alkene,[7] bearing a homoallylic leaving group, to form the tetrahydrofuran, with the furyl group acting as a carboxylic acid surrogate. We anticipated that the presence of the furyl group would be advantageous for the dihydroxylation.

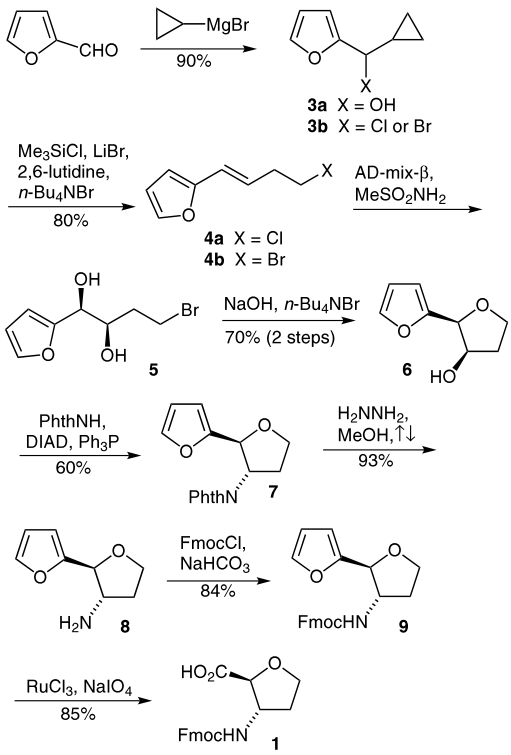


Scheme 1 THF β-amino acid **1** from deoxyribose **2**

Alkene **4** was prepared by nucleophilic ring opening of cyclopropyl alcohol **3a**, a reaction originally developed by Julia et al.[8] Alcohol **3a** is readily available by the addition of cyclopropyl magnesium bromide to 2-furaldehyde (Scheme 2).

Ring-opening substitution with hydrochloric acid in a variety of solvents gave modest yields of the desired chloride **4a** (Table 1, entries 1–3). Use of magnesium bromide[9] also gave modest yields of the corresponding bromide **4b** but, in most cases, the product was contaminated with the direct substitution product **3b** (entries 4 and 5). The use of either lithium bromide or lithium chloride in diethyl ether at reflux resulted in no reaction. The use of zinc chloride gave predominantly the direct substitution product, with only a trace of ring opening (entry 6). Ultimately, the use of a combination of trimethylsilyl chloride and lithium bromide was found to be effective, giving bromide **4b** in 80% yield.[10,11] Running this reaction in the presence of 2,6-lutidine as a Brønsted acid scavenger, and tetra-*n*-butylammonium bromide (TBAB) as a phase-transfer catalyst gave the cleanest product. Notably, even though chloride is present, the product was exclusively obtained as the bromide **4b**.

Downloaded by: Mahidol University. Copyrighted material.



Scheme 2 Synthesis of THF β-amino acid **1**

Dihydroxylation of bromide **4b** was achieved by using AD-mix-β, with the addition of methane sulfonamide[12] and an extra amount of potassium osmate. Interestingly, the product bromodiol **5**, did not cyclise in situ despite the basicity of the AD conditions. Further exposure to hydroxide under phase-transfer conditions was required to ensure cyclisation. The enantiomeric excess of the resulting tetrahydrofuran **6** was determined at a later stage. To introduce the nitrogen atom of the amino group, we initially tried to form the corresponding mesylate, but without success. Application of the Rollin modification of the Mitsunobu reaction using the bis-pyridine complex of zinc azide gave none of the desired product and returned the starting alcohol **6**.[13] The Mitsunobu reaction with phthalimide, however, proceeded smoothly to give the desired phthalimide **7**.[14] We speculate that the zinc-activated diisopropyl azodicarboxylate (DIAD)–triphenylphosphine adduct was too bulky to react with the relatively hindered secondary alcohol. The proton-activated adduct is, in contrast, sufficiently reactive. At this point, the enantiomeric excess of the material could be determined by chiral HPLC analysis, and was found to be >99%. The structure of phthalimide **7** was also confirmed by X-ray crystallographic analysis (Figure 1),[15] demonstrating the clean inversion during the Mitsunobu reaction.[16] The phthaloyl group could then be removed by hydrazinolysis in the traditional way and amine **8** was reprotected as its Fmoc derivative **9**. Finally, oxidative destruction of the furyl moiety using ruthenium(VIII) oxide generated in situ[17,18] gave carboxylic acid **1**, which was suitable for use in PNA synthesis or other synthetic applications.

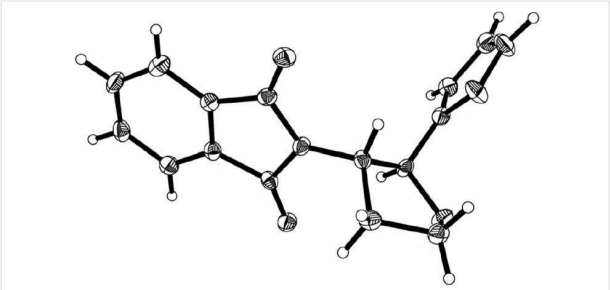


Figure 1 ORTEP structure of phthalimide **7**

In conclusion, vinyl furan dihydroxylation has provided a more efficient access to the title compound, and the approach should be applicable to related β-amino acids. The overall sequence from furaldehyde consists of eight steps and has an overall yield of 20%.

Table 1 Ring-Opening-Substitution of Cyclopropyl Alcohol **3a**

Entry	Reagent	Conditions	Product	Yield (%)
1	aq HCl	Et_2O, r.t.	**4a**	45[a]
2	aq HCl	dioxane, r.t.	**4a**	19[a]
3	aq HCl	CH_3CN, r.t.	**4a**	50
4	$MgBr_2$	Et_2O, reflux	**4b**	34[a,b]
5	$MgBr_2$	Et_2O, 0 °C	**4b**	30[a]
6	$ZnCl_2$	CH_2Cl_2, reflux	**4a**	trace[c]
7	Me_3SiCl, LiBr, 2,6-lutidine, TBAB	CH_2Cl_2, r.t.	**4b**	80

[a] The direct substitution product **3b** was also obtained.
[b] Addition of MgO as a Brønsted acid scavenger had no effect on the yield.
[c] The direct substitution product **3b** was formed predominantly (67%).

Downloaded by: Mahidol University. Copyrighted material.

Acknowledgment

R.W.B., S.P.A. and T.T.H. thank NTU for financial support of this work. T.V. acknowledges financial support from the Thailand Research Fund (DPG5780002).

Supporting Information

Supporting information for this article is available online at http://dx.doi.org/10.1055/s-0035-1560649.

References and Notes

(1) (a) Seebach, D.; Beck, A. K.; Capone, S.; Deniau, G.; Groselj, U.; Zass, E. *Synthesis* **2009**, 1. (b) Seebach, D.; Matthews, J. L. *Chem. Commun.* **1997**, 2015.
(2) (a) Cheng, R. P.; Gellman, S. H.; DeGrado, W. F. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3219. (b) Vasudev, P. G.; Chatterjee, S.; Shamala, N.; Balaram, P. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 657. (c) Pandey, S. K.; Jogdand, G. F.; Oliveira, J. C. A.; Mata, R. A.; Rajamohanan, P. R.; Ramana, C. V. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 12946.
(3) (a) Vilaivan, T. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 1645. (b) Sriwarom, P.; Padungros, P.; Vilaivan, T. *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 7058; see also ref. 2c.
(4) Rjabovs, V.; Turks, M. *Tetrahedron* **2013**, *69*, 10693.
(5) Hanessian, S. *Total Synthesis of Natural Products: The 'Chiron' Approach*; Pergamon: Oxford, **1983**.
(6) Kolb, H. C.; VanNieuwenhze, M. S.; Sharpless, K. B. *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 2483.
(7) (a) Harris, J. M.; Keränen, M. D.; Nguyen, H.; Young, V. G.; O'Doherty, G. A. *Carbohydr. Res.* **2000**, *328*, 17. (b) Takeuchi, M.; Taniguchi, T.; Ogasawara, K. *Synthesis* **1999**, 341. (c) Harris, J. M.; Keranen, M. D.; O'Doherty, G. A. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2982. (d) Kobayashi, Y.; Nakano, M.; Biju Kuamr, G.; Kishihara, K. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 7505. (e) For the aminohydroxylation of vinylfurans, see: Bushey, M. L.; Haukaas, M. H.; O'Doherty, G. A. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2984.
(8) (a) Julia, M.; Julia, S.; Guegan, R. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1960**, 1072. (b) A one-pot Grignard addition and ring-opening substitution has been reported, see: Qi, W.; Wang, P.; Fan, L.; Zhang, S. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 5918.
(9) McCormick, J. P.; Barton, D. L. *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 2566.
(10) Balme, G.; Fournet, G.; Gore, J. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 1907.
(11) Cheskis, B. A.; Ivanova, N. M.; Moiseenkov, A. M.; Nefedov, O. M. *Bull. Acad. Sci. USSR, Div. Chem. Sci. (Engl. Transl.)* **1990**, *39*, 1839; *Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Khim.* **1990**, 2025.
(12) Sharpless, K. B.; Amberg, W.; Youssef, L. B.; Crispino, G. A.; Hartung, J.; Jeong, K.-S.; Morikawa, K.; Wang, Z.-M.; Xu, D.; Zhang, X.-L. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 2768.
(13) Viaud, M. C.; Rollin, P. *Synthesis* **1990**, 130.
(14) (a) Mitsunobu, O. *Synthesis* **1981**, 1. (b) Hughes, D. L. *Org. Prep. Proced. Int.* **1996**, *28*, 129. (c) Simon, C.; Hosztafi, S.; Makleit, S. *J. Heterocycl. Chem.* **1997**, *34*, 349.
(15) Details of the X-ray structure determination for compound **7** have been deposited with the Cambridge Crystallographic Database, CCDC-1408970. Copies of the data may be obtained, free of charge, on application to CCDC, 12 Union Road, Cambridge, CB2 1EZ, UK (fax:+44 1223 336033 or e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk).
(16) Inversion is also shown by the change of $J_{2,3}$ in the ^{1}H NMR spectrum from 4 Hz in **6** to 8.4 Hz in **7**.
(17) (a) Carlsen, P. H. J.; Katsuki, T.; Martin, V. S.; Sharpless, K. B. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 3936. (b) Plietker, B. *Synthesis* **2005**, 2453. (c) Begliomini, S.; Sernissi, L.; Scarpi, D.; Occhiato, E. G. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 5448.
(18) **(+)-(2*S*,3*S*)-3-[(9*H*-Fluoren-9-yl)(methoxy)(carbonyl)amino]-tetrahydrofuran-2-carboxylic Acid (1):** Ruthenium trichloride hydrate (55 mg, 0.026 mmol) was added to a solution of sodium periodate (1.98 g, 9.33 mmol) in a mixture of EtOAc (1.5 mL), CH_3CN (2 mL) and H_2O (1 mL) at 0 °C. The mixture was stirred for 15 min, then carbamate **9** (0.5 g, 1.33 mmol) in the minimum of EtOAc was slowly added. The mixture was stirred for an additional 10 min, H_2O (10 mL) was added and the mixture was extracted with EtOAc (2 × 15 mL). The combined organic layers were washed with $NaHCO_3$ (20 mL) and acidified with 2 M HCl then extract with EtOAc (3 × 15 mL). The combined organic phase was dried over anhydrous Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure to give amino acid derivative **1** (85%, 400 mg) as a colourless solid. Mp 90–92 °C; $[\alpha]_D^{25}$ +40 (*c* 1.0, DMSO). IR (neat): 3332, 2924, 2854, 1720, 1535, 1450, 1095, 1049 cm^{-1}. ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 1.80–1.81 (m, 1 H), 2.07–2.11 (m, 1 H), 3.89–3.91 (m, 2 H), 4.10 (d, *J* = 4.0 Hz, 1 H), 4.18–4.24 (m, 2 H), 4.34 (d, *J* = 6.5 Hz, 2 H), 7.32–7.35 (m, 2 H), 7.41–7.44 (m, 2 H), 7.70–7.77 (m, 3 H), 7.89 (d, *J* = 7.5 Hz, 2 H), 12.7 (br. s, 1 H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6): δ = 32.2, 47.1, 55.8, 65.8, 67.7, 81.4, 120.6, 125.6, 127.5, 128.1, 141.2, 144.3, 156.0, 173.2. MS (ESI$^+$): *m*/*z* = 354.3 [M + H]$^+$. HRMS: *m*/*z* [M + H]$^+$ calcd. for $C_{20}H_{20}NO_5$: 354.1318; found: 354.1341.

Downloaded by: Mahidol University. Copyrighted material.

LANGMUIR

Article

pubs.acs.org/Langmuir

Clickable and Antifouling Platform of Poly[(propargyl methacrylate)-*ran*-(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)] for Biosensing Applications

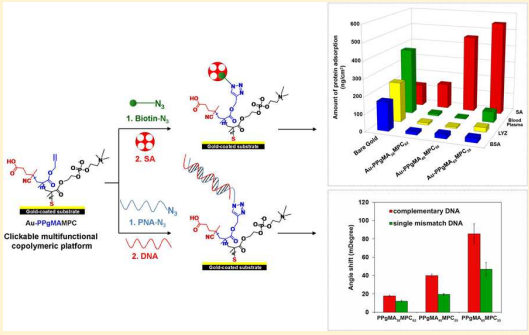
Oraphan Wiarachai,[†] Tirayut Vilaivan,[‡] Yasuhiko Iwasaki,[§] and Voravee P. Hoven*[,‡]

[†]Program in Petrochemistry, Faculty of Science, and [‡]Organic Synthesis Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Pathumwan, Bangkok 10330, Thailand

[§]Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University, 3-3-35 Yamate-cho, Suita-shi, Osaka 564-8680, Japan

Supporting Information

ABSTRACT: A functional copolymer platform, namely, poly[(propargyl methacrylate)-*ran*-(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)] (PPgMAMPC), was synthesized by reversible addition−fragmentation chain-transfer polymerization. In principle, the alkyne moiety of propargyl methacrylate (PgMA) should serve as an active site for binding azide-containing molecules via a click reaction, i.e., Cu-catalyzed azide/alkyne cycloaddition (CuAAC), and 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC), the hydrophilic monomeric unit, should enable the copolymer to suppress nonspecific adsorption. The copolymers were characterized using Fourier transform infrared (FTIR) and ^{1}H NMR spectroscopies. Thiol-terminated, PPgMAMPC-SH, obtained by aminolysis of PPgMAMPC, was immobilized on a gold-coated substrate using a "grafting to" approach via self-assembly. Azide-containing species, namely, biotin and peptide nucleic acid (PNA), were then immobilized on the alkyne-containing copolymeric platform via CuAAC. The potential use of surface-attached PPgMAMPC in biosensing applications was shown by detection of specific target molecules, i.e., streptavidin (SA) and DNA, by the developed sensing platform using a surface plasmon resonance technique. The copolymer composition strongly influenced the performance of the developed sensing platform in terms of signal-to-noise ratio in the case of the biotin−SA system and hybridization efficiency and mismatch discrimination for the PNA−DNA system.



INTRODUCTION

Effective functionalization with biomolecules is important in the development of materials for biotechnology-related applications such as biosensors, protein/cell microarrays, microfluidic devices, and tissue engineering. Polymeric platforms are becoming increasingly attractive for biomolecule immobilization because a variety of functional groups can be conveniently incorporated and proportionally customized using combinations of specific monomers in the polymerization step. The superiority of this approach, which provides a three-dimensional platform and therefore offers a higher functional group density for biomolecular probe binding per surface area than in the case of a conventional two-dimensional platform based on self-assembled monolayers (SAMs)[1−3] of end-functionalized alkanethiols, for biosensing applications has been shown by our group[4,5] and other researchers.[6−9]

Most biomolecules (e.g., proteins, antibodies, enzymes, and DNA) carry carboxyl and/or amino groups. Polymers with versatile functionalities that can accommodate covalent bond formation, particularly via hydrolytically stable amide linkages, including poly[oligo(ethylene glycol) methacrylate],[8,10,11] poly(2-hydroxyethyl methacrylate),[12,13] and poly(acrylic acid) (PAA),[4,5,14−19] are therefore commonly used as platforms for biomolecule conjugation. However, an additional activation step using an appropriate coupling reagent is required for biomolecule conjugation to such polymers. PAA, in particular, suffers from nonspecific adsorption of positively charged components such as lysozyme (LYZ) because its carboxyl groups (−COOH) can be ionized to negatively charged carboxylate ions (−COO$^-$).[5] This is problematic in the analyses of complex samples. Precursor polymers have recently emerged as alternative and ready-to-use functional materials that can directly bind with designated nucleophilic modifiers such as amino-containing biomolecules, without having to undergo activation. Well-known precursor polymeric systems include polymers bearing succimidyl ester[20−22] or pentafluorophenyl ester groups,[23,24] poly[propargyl (me)thacrylate] [PPg(M)A],[25,26] and poly(glycidyl methacrylate) (PGMA).[27,28] From the perspective of chemical robustness, PPg(M)A is a good choice because the alkynyl side group in

Received: July 23, 2015
Revised: December 8, 2015
Published: December 22, 2015

ACS Publications © 2015 American Chemical Society

DOI: 10.1021/acs.langmuir.5b02727
Langmuir 2016, 32, 1184−1194

each repeat unit specifically undergoes a Huisgen 1,3-dipolar azide−alkyne cycloaddition with azide-containing molecules, or thiol−yne reactions with thiol-containing molecules; the reaction yields under mild conditions are high, and no byproducts are generated. Socaci and co-workers[25] prepared core−shell nanoparticles consisting of magnetite cores and poly(*O*-propargyl acrylate) shells. They showed that acryloyl-containing phosphonates or methacryloyl phosphates anchored to the magnetic nanoparticle (MNP) surfaces acted as initiating sites for polymerization of a series of alkyne-terminated acrylate monomers with different spacers between the carboxyl oxygen atom and the alkyne moiety. The ability of the alkyne moieties on MNPs to form triazole linkages via azide−alkyne cycloaddition was tested using azide-terminated biotin fluorescently labeled with dansyl groups. Wang and co-workers[26] successfully developed an alkyne-functionalized microporous polypropylene membrane via a combination of plasma treatment and UV-induced graft polymerization of 3-(trimethylsilyl)propargyl methacrylate. The PPgMA-modified membrane obtained after trimethylsilyl removal can directly bind with a thiol-containing carbohydrate ligand, 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-*β*-D-glucopyranoside thiol, and yields a glycosylated membrane via a thiol−yne click reaction. The glycosyl density of the glycosylated membrane can be tuned based on the polymer graft density, and the membrane showed specific adsorption of lectin concanavalin A over peanut agglutinin.

Specific detection of target molecules rather than the nontargeted components or the ability to resist nonspecific adsorption, known as antifouling, is another key element in biosensor development, especially for the analysis of real biologically relevant samples in which numerous types of interference exist concurrently. A number of copolymeric platforms have therefore been designed to incorporate biocompatible and highly hydrophilic polymers along with precursor polymers. Among the developed hydrophilic polymers, zwitterionic polymers, which contain positively and negatively charged moieties within the same structure, such as poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) (PMPC), poly(carboxybetaine methacrylate) (PCBMA), and poly(sulfobetaine methacrylate) (PSBMA) have received growing attention for use in new-generation antifouling materials.[29−31] Emmenegger and co-workers[30] reported that plasma protein adsorption completely suppressed on surface-immobilized PCBMA, whereas PMPC and PSBMA prevented adsorption of the main plasma proteins (human serum albumin, IgG, Fbg, and LYZ) from single-protein solutions, but could not prevent plasma deposition. In this study, based on our previous work using MPC-containing copolymer brushes between PMPC and poly(methacrylic acid) (PMA) as precursor layers for biosensor applications,[14] we used PMPC as an antifouling zwitterionic polymer to prevent nonspecific adsorption. It has been proven that PMPC helps to suppress undesirable nonspecific adsorption of proteins and cells,[32−36] and also provides a suitable environment for preserving the stability and activity of immobilized biomolecular probes.[37−39] Ishihara and co-workers[39] used monitoring with a quartz crystal balance to show that poly[2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC)-*co*-*n*-butyl methacrylate (BMA)-*co*-*p*-nitrophenyloxycarbonyl poly(ethylene glycol) methacrylate (MEONP)] (PMBN), adsorbed on a gold-coated substrate and conjugated with anti-C-reactive protein antibodies via nitrophenyloxycarbonyl active ester binding sites in the MEONP unit can specifically bind with the respective antigens. The developed platform simultaneously prevented adsorption of bovine serum albumin and *γ*-globulin. PMBN physically adsorbed on poly(methyl methacrylate) microchips and polystyrene well plates has also been used for antigen detection via ELISA-based assays, and for affinity-based protein separation when deposited on poly(L-lactic acid) nanoparticles.[40−43] Iwata et al.[44] generated block copolymer brushes of PGMA, another precursor polymer, and PMPC via surface-initiated atom-transfer radical polymerization. An antibody fragment was conjugated to the surface-grafted copolymer brushes via a thiol−disulfide interchange reaction with pyridyl disulfide linkages, previously introduced by epoxide ring opening of GMA repeat units in the copolymer. The activity of the conjugated antibody fragment in antigen detection was better for the PMPC copolymer platform than those for platforms based on PGMA alone or epoxysilane.

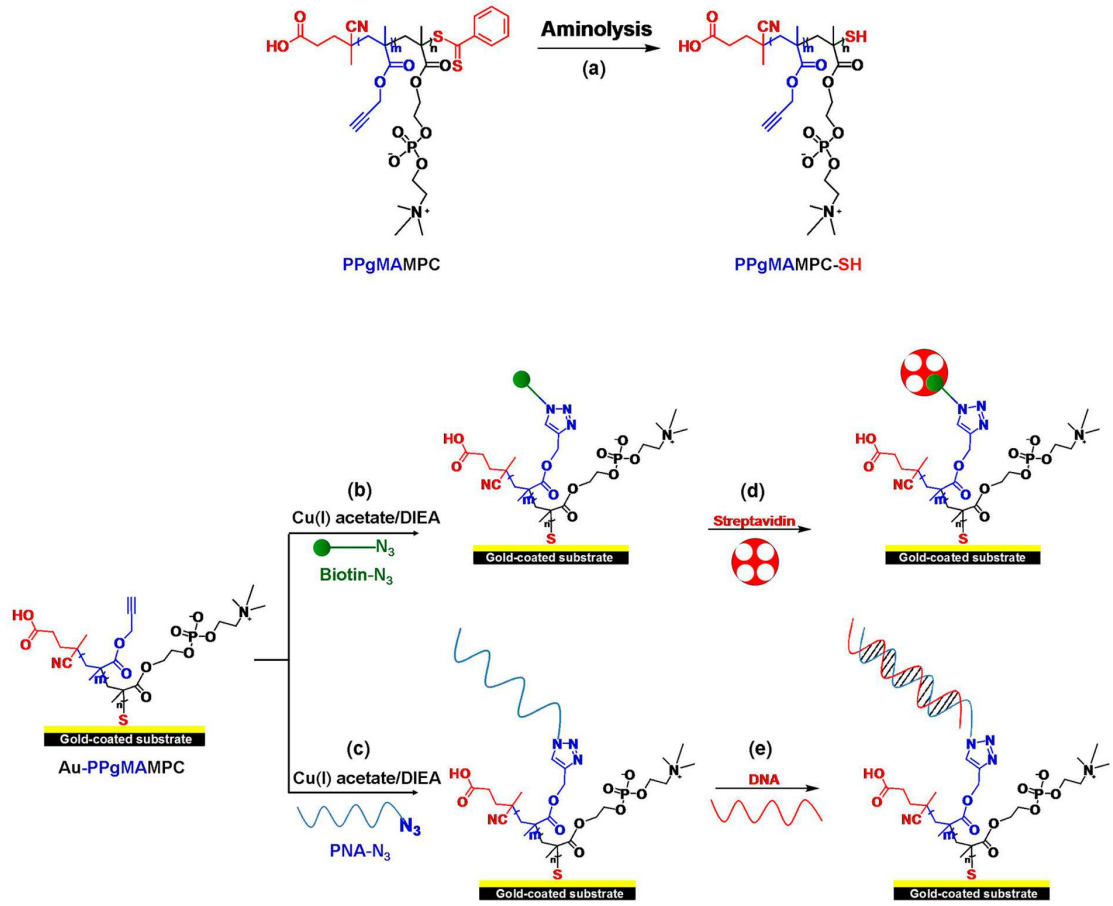
Inspired by the research described above, the aim of this study was to develop a multifunctional copolymer platform based on clickable PPgMA and antifouling PMPC, a combination that, to the best of our knowledge, has never been explored. The alkyne moiety of the PgMA unit should serve as an active site for binding of azide-containing molecules via a Cu-catalyzed azide/alkyne cycloaddition (CuAAC) click reaction, without the need for activation. The hydrophilic monomeric unit, MPC, should enable the copolymer to suppress nonspecific adsorption. The copolymer poly[(propargyl methacrylate)-*ran*-(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)] (PPgMAMPC) was first synthesized by reversible addition−fragmentation chain-transfer (RAFT) polymerization. Thiol-terminated PPgMAMPC (PPgMAMPC-SH), obtained by aminolysis of PPgMAMPC, was immobilized on a gold-coated substrate using a "grafting to" method via Au−S bond formation between the thiol end groups of the copolymer and the gold surface. Azide-containing biotin and peptide nucleic acid (PNA) were used as model probes to demonstrate the potential of the surface-attached PPgMAMPC for probe immobilization and subsequent detection of target molecules, namely, streptavidin (SA) and deoxyribonucleic acid (DNA), using a surface plasmon resonance (SPR) technique. The parameters that may affect the sensitivity and specificity, in terms of the signal-to-noise (*S*/*N*) ratio, in detecting SA in a complex sample using a biotin-based sensor were also investigated. The hybridization efficiency (%HE) and mismatch discrimination (%MD) for DNA detection were evaluated for the PNA-based sensor.

EXPERIMENTAL SECTION

Materials. MPC was purchased from the NOF Corp. (Japan). Methacrylic acid (MA), 4,4′-azobis(4-cyanovaleric acid) (ACVA), 4-cyano-4-(phenylcarbonothioylthio)pentanoic acid (CPADB), azide-PEG_3-biotin conjugate (biotin-N_3), copper(I) acetate, bovine serum albumin (BSA), and LYZ were purchased from Aldrich. MA was distilled under reduced pressure to remove hydroquinone monomethyl ether, a polymerization inhibitor, prior to use. Phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4) was purchased from Sigma. Hydrazine monohydrate and *N*,*N*′-diisopropylethylamine (DIEA) were purchased from Sigma-Aldrich. SA was purchased from Thermo Fisher Scientific Inc. PgMA was synthesized using the method reported by He et al.[45] DNA was purchased from the Pacific Science Co., Ltd. PNA was synthesized by solid-phase peptide synthesis on Tentagel S RAM resin (Fluka) preloaded with 9-fluorenylmethoxycarbonyl-L-lysine(*tert*-butoxycarbonyl)-pentafluorophenyl ester (Fmoc-L-Lys(Boc)-oPfp) (CalbiochemNovabiochem Co., Ltd.) using a previously reported procedure.[46] The PNA was modified at the N-terminus by reductive alkylation with $N_3(CH_2)_3CHO$ to prepare azide-terminated PNA (PNA-N_3).[47] After cleavage of PNA-N_3 from the solid support

DOI: 10.1021/acs.langmuir.5b02727
Langmuir 2016, 32, 1184−1194

Scheme 1. Schematic Diagram of (a) Preparation of PPgMAMPC-SH, (b,c) Immobilization of Biotin-N_3 and PNA-N_3 on PPgMAMPC-Modified SPR Chip, and (d,e) Specific Binding between Conjugated Probe and Target Molecule



using trifluoroacetic acid, the crude PNA-N_3 was purified using reverse-phase high performance liquid chromatography (HPLC) and analyzed by matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (Bruker Daltonik GmbH, Germany) (see Figure S1 in the Supporting Information for chromatogram and mass spectra). Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) was purchased from Fluka. Human platelet-poor plasma was donated by a healthy volunteer. Milli-Q water was purified using an ultrapure water system with a Millipak-40 filter unit (0.22 μm, Millipore) and a Millipore Milli-Q system that involved reverse osmosis followed by ion exchange and filtration steps (18.2 MΩ). All reagents and materials were analytical grade and used without further purification unless specified.

Synthesis of Thiol-Terminated Poly[(propargyl methacrylate)-*ran*-(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)] (PPgMAMPC-SH). MPC monomer (0.59 g, 2.0 mmol), ACVA (0.7 mg, 2.5 μmol), and CPADB (5.6 mg, 20 μmol) were dissolved in 2 mL of an ethanol/tetrahydrofuran (EtOH:THF) (1:1 v/v) mixture. PgMA (0.25 mL, 2.0 mmol) was added to the solution under magnetic stirring. The clear pink solution was purged with nitrogen gas for 30 min and then immersed in an oil bath at 70 °C, and polymerization was performed for a set reaction time. The reaction was terminated in an ice bath. The resulting PPgMAMPC was purified, using a dialysis membrane (molecular weight cutoff = 3500 g/mol), against EtOH for 2 d, and then against deionized water for 2 d. An orange cotton-like material was obtained after lyophilization. The copolymer composition was varied by varying the molar ratio of PgMA to MPC in the feed. PPgMAMPC was characterized using ^{1}H NMR and Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopies. The molar percentage contents of PgMA and MPC units in the copolymer (PPgMA$_m$MPC$_n$) were denoted by m and n, respectively.

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm): characteristic peaks of PgMA unit (−C≡C*H* 3.10, −O−C*H*$_2$−C≡CH 4.55−4.80), MPC unit [(−N(C*H*$_3$)$_3$ 3.25, −N−C*H*$_2$CH$_2$−O− 3.75, −POC*H*$_2$CH$_2$N−, −COOC*H*$_2$, −C*H*$_2$OP 4.0−4.4], and aromatic protons (−C$_6$*H*$_5$ 7.40−7.95).

PPgMAMPC-SH was prepared by aminolysis of the dithioester groups at the chain ends of the copolymer with hydrazine monohydrate (Scheme 1a).[48] PPgMAMPC (0.2 g) was dissolved in EtOH (3 mL) for PPgMA$_{38}$MPC$_{62}$−SH and PPgMA$_{45}$MPC$_{55}$−SH, or a mixture of EtOH and THF (7:3 v/v) for PPgMA$_{65}$MPC$_{35}$−SH, until the solution was clear. Hydrazine monohydrate (30 mol equiv with respect to dithioester groups) was added to the copolymer solution under magnetic stirring. When addition was complete, the solution was stirred for 2 h at ambient temperature and then added dropwise to aqueous 1.0 M HCl (10 mL) and stirred for 1 h. The obtained PPgMAMPC-SH was purified using a dialysis membrane (molecular weight cutoff = 3500 g/mol) against aqueous HCl, pH 3−4, for 2 d, and then against deionized water for 2 d. A white cotton-like product was obtained after lyophilization. The copolymer was characterized using ^{1}H NMR, FTIR, and UV−vis spectroscopies.

Immobilization of PPgMAMPC-SH on Gold-Coated SPR Chip. A gold-coated SPR chip was cleaned with air plasma in a plasma cleaner (Harrick Plasma PDC-32G, Power 18 W) for 5 min, washed with Milli-Q water for 5 min, and dried under a nitrogen stream. The cleaned SPR sensor chip was immersed in 3 mL of a 0.1

DOI: 10.1021/acs.langmuir.5b02727
Langmuir 2016, 32, 1184−1194

mM copolymer solution [$PPgMA_{38}MPC_{62}$−SH and $PPgMA_{45}MPC_{55}$−SH in EtOH, $PPgMA_{65}MPC_{35}$−SH in EtOH/THF (7:3 v/v)] at ambient temperature for 48 h. The modified SPR chip was removed from the solution and rinsed five times by constant agitation, for 5 min each time, in EtOH for Au−$PPgMA_{38}MPC_{62}$ and Au−$PPgMA_{45}MPC_{55}$, and in EtOH/THF (7:3 v/v) for Au−$PPgMA_{65}MPC_{35}$. The SPR sensor chip with the immobilized copolymer was dried under a nitrogen stream and characterized using contact angle and SPR measurements and attenuated total reflection (ATR)-FTIR spectroscopy.

Characterization. Dynamic advancing (θ_A) water contact angles were measured using a contact angle goniometer equipped with a Gilmont syringe and a 24-gauge flat-tipped needle (Ramé-Hart, model 200-F1). All measurements were performed in air at ambient temperature. Data for each sample were collected from five different areas of the substrate and analyzed using DROPimage standard 2.0 software. The characteristic functional groups of the copolymer brushes on the SPR sensor chip were characterized using ATR-FTIR spectroscopy (Nicolet 6700 FTIR spectrometer). Spectra were recorded in the IR region (4000−650 cm^{-1}) based on 32 scans, at a spectral resolution of 4 cm^{-1}. ^1H NMR spectra were recorded in CD_3OD using a Varian NMR spectrometer (Mercury-400; USA) operated at 400 MHz. The disappearance of the dithioester groups of the copolymer was monitored using UV−vis spectroscopy (CARY 100Bio UV−visible spectrophotometer, Varian Inc., Palo Alto, CA, USA). Gel permeation chromatography (GPC) was performed using a refractive index detector equipped with a Shodex Asahipak GF-1G guard column and a 7.0 μm bead GF-7 M HQ column (exclusion limit ~10^7) at 40 °C and a flow rate of 0.6 mL/min. A phosphate buffer (pH 9) containing 10 vol % acetonitrile was used as the eluent. The M_n and M_w/M_n values were calibrated with standard sodium poly(styrenesulfonate) samples. The elemental composition on a selected SPR chip with an immobilized copolymer was determined by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS; AXIS Ultra DLD, Kratos Analytical Ltd., Manchester, UK) using an Al Kα X-ray source. All XPS data were collected at a takeoff angle of 90°. Atomic force microscopy (AFM) images were obtained using a scanning probe microscope (NanoScopeIV, Veeco, Plainview, NY, USA). Measurements were performed in air in tapping mode with a silicon nitride tip at a resonance frequency of 267−295 kHz and a spring constant of 20−80 N/m. The thickness of the polymer brushes was measured using a spectroscopic ellipsometer (J. A. Woollam Co., Lincoln, NE, USA) at an incident angle of 70−80° in steps of 5°. The calculation was performed based on a Cauchy layer model with assumed refractive index of 1.34 ± 0.09 for gold-coated substrate at 632.8 nm.

SPR Measurements. SPR measurements were performed using a double-channel AutoLab ESPR instrument (Eco Chemie, Utrecht, The Netherlands) at 25 °C, with the plane face of the prism coupled to the gold-coated glass via an index-matching fluid. The instrument uses a laser diode at a wavelength of 670 nm and a vibrating mirror to modulate the angle of incidence of the p-polarized light beam on the SPR substrate. An autosampler was used to inject the test solution, and the SPR angle shift measurements were performed under nonflow liquid conditions. The SPR angle shift at the end-point of each step and after baseline subtraction (angle shift) was used to calculate the density of molecules bound to the surface or the target density, using a sensitivity factor of 120 mdeg, equal to 100 ng/cm^2. This sensitivity factor is specifically calibrated for the AutoLab ESPR, which uses an N-BK 7 prism refractive index of 1.518, and incident light wavelength of 670 nm. Each gold-coated SPR chip bearing PPgMAMPC was first seated in an SPR cell before being stabilized with a running solution of 10 mM PBS (pH 7.4). When the equilibrium SPR angle frequency in the buffer solution was obtained, the substrate was ready to be used.

Probe Conjugation on Copolymer-Modified SPR Chip by CuAAC Reaction. For conjugation of biotin-N_3 (Scheme 1b), Cu(I) acetate (1.23 mg, 0.01 mmol) and biotin-N_3 (0.5 M, 4.0 μL, 2.0 μmol) were dissolved in 10 mM PBS (pH 7.4, 2 mL) for 10 min to obtain a final biotin-N_3 concentration of 1.0 mM. The PPgMAMPC-modified SPR chip was immersed in the mixture, with constant agitation for 5 min. DIEA (1.71 μL, 0.01 mmol) was added to the reaction mixture, and the SPR chip was immersed in the mixture for 24 h under constant agitation at ambient temperature. The modified SPR chip was removed from the solution and then rinsed by constant agitation in 10 mM EDTA for 1 min and 10 mM PBS (pH 7.4) five times for 5 min each. The azide-containing PNA (PNA-N_3) probe was immobilized on the PPgMAMPC-modified SPR chip (Scheme 1c) by dissolving Cu(I) acetate (0.1 mg, 8.2 μmol) and PNA-N_3 (10 nmol) in methanol (2 mL) for 10 min to obtain a final PNA-N_3 concentration of 5.0 μM. The modified SPR chip was immersed in the solution with constant agitation for 5 min. A solution of DIEA (50 μM, 1.0 mL) was added to the reaction mixture, and then the SPR chip was immersed in this mixture for 24 h under constant agitation at ambient temperature. The modified SPR chip was removed from the solution and rinsed by constant agitation in 10 mM EDTA for 1 min and in methanol five times for 5 min each. The SPR sensor chip was dried under a nitrogen stream and characterized using contact angle and SPR measurements and ATR-FTIR spectroscopy.

Specific Interactions between Conjugated Probes and Target Molecules. A PPgMAMPC-modified SPR chip conjugated with the desired probe was seated in an SPR cell and then rinsed with a running solution of 10 mM PBS buffer (pH 7.4). Once the baseline SPR response was stable, the target molecule was applied to the chip. In the case of the PPgMAMPC-modified SPR chip conjugated with biotin-N_3 (Scheme 1d), SA (0.1 mg/mL, equivalent to 1.9 μM) in blood plasma solution (0.1 mg/mL, 0.14% in PBS buffer) was applied to the surface and left for 15 min. Unbound SA was removed by washing with 10 mM PBS buffer (pH 7.4) for 5 min. The specific binding of SA was quantified from the shift in the SPR response angle at the end-point of the washing step and after baseline subtraction. Nonspecific binding (binding in the absence of SA in blood plasma solution) was also determined to quantify the specific binding of SA in blood plasma in terms of the S/N ratio; this ratio was calculated using the following equation:

$$S/N = \frac{\text{SPR angle shift after exposure to blood plasma with streptavidin}}{\text{SPR angle shift after exposure to blood plasma without streptavidin}} \quad (1)$$

For the PPgMAMPC-modified SPR chip conjugated with a PNA-N_3 probe (Scheme 1e), DNA (50 μM) in 10 mM PBS (pH 7.4) containing 100 mM NaCl was applied to the surface and left for 15 min. Unbound DNA was removed by washing with PBS for 5 min. The specific binding of DNA was quantified from the shift in the SPR response angle at the end-point of the washing step and after baseline subtraction. The sensor was regenerated by washing with 50 mM NaOH for 5 min. The %HE and %MD were calculated using the following equations:

$$\%HE = \frac{\text{target density}}{\text{probe density}} \times 100 \quad (2)$$

$$\%MD = \frac{\%HE \text{ of complementary DNA} - \%HE \text{ of mismatched DNA}}{\%HE \text{ of complementary DNA}} \times 100 \quad (3)$$

RESULTS AND DISCUSSION

Synthesis and Characterization of Thiol-Terminated Poly[(propargyl methacrylate)-*ran*-(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)] (PPgMAMPC-SH). A PPgMAMPC copolymer was synthesized via RAFT polymerization using CPADB and ACVA as the chain transfer agent (CTA) and radical initiator (In), respectively. The molar percentage contents of PgMA and MPC units in the copolymer ($PPgMA_mMPC_n$) are denoted by m and n, respectively. Our survey suggested that the optimum [CTA]/[In] ratio for obtaining a copolymer with a well-controlled molecular weight was 8; the data are shown in Table S1 in the Supporting Information. The control over the copolymerization process

DOI: 10.1021/acs.langmuir.5b02727
Langmuir 2016, 32, 1184−1194

was also demonstrated for a targeted degree of polymerization (DP) of 200 based on the linear first-order relationship between $\ln[M]_0/[M]$ and the polymerization time (Figure S2, Supporting Information), suggesting that the polymeric radical concentration remained unaltered throughout the polymerization. ^{1}H NMR spectroscopy (Figure S3 and explanation in the Supporting Information) showed that the copolymer composition varied as a function of the monomer ratio in the feed (Table 1). The molecular weight of the copolymer was close to the target (35 375−46 327 kDa). We also attempted to determine the molecular weight and polydispersity indices (PDIs) of the copolymers using GPC. The data are shown in Figure S4 (Supporting Information). It should be emphasized that it is not possible to dissolve the copolymers in a common polar protic solvent (such as methanol) generally used for GPC analysis of MPC-based copolymers. And it was rather difficult to dissolve them in the mobile phase used for GPC analysis, phosphate buffer (pH 9) containing 10 vol % acetonitrile, especially the copolymer having high PgMA composition, $PPgMA_{65}MPC_{35}$, of which molecular weight information cannot be obtained. The fact that the $\bar{M}_n$ determined by GPC analysis are underestimated and proportionally decreased as a function of PgMA content suggested that the molecular weight information obtained via GPC analysis is somewhat not reliable. Additionally, PDI values were high, which may be ascribed to possible copolymer self-assembly in the phosphate buffer solution. This is why ^{1}H NMR spectroscopy was used as the main tool for determining the molecular weight of the copolymer. Despite the relatively high PDI, the unimodal distribution evidenced from GPC chromatograms (also shown in Figure S4) is reasonable evidence of copolymer formation. The functional groups in the synthesized copolymer were identified using FTIR spectroscopy (Figure 1). The characteristic peaks for C═O (ester) stretching, at 1725 cm^{-1}, asymmetric O═P−O− stretching, at 1240 cm^{-1}, symmetric O═P−O− stretching, at 1087 cm^{-1}, and $-N^+(CH_3)_3$, at 960 cm^{-1} for the MPC units were observed; a −C≡C− stretching peak was observed at 2127 cm^{-1}, and its intensity increased proportionally with the PgMA content. These results confirm copolymer formation.

Table 1. Copolymer Compositions and Molecular Weights of PPgMAMPC (Target DP 200) Synthesized by RAFT Polymerization

monomer composition in feed (mol %)		monomer composition in copolymer (mol %)[a]				
PgMA	MPC	PgMA	MPC	$\bar{M}_n$[a] (kDa)	DP[a]	copolymer abbreviation
70	30	65	35	38.4	208	$PPgMA_{65}MPC_{35}$
50	50	45	55	46.7	213	$PPgMA_{45}MPC_{55}$
30	70	38	62	40.0	173	$PPgMA_{38}MPC_{62}$

[a]Calculated from ^{1}H NMR data.

Aminolysis with hydrazine transformed the dithiobenzoate groups at the chain ends of the PPgMAMPC copolymer into thiol groups, yielding PPgMAMPC-SH,[48] as shown by the disappearance after aminolysis of the aromatic proton signals at 7.40−7.95 ppm in the ^{1}H NMR spectrum and the UV−vis absorption peak at 305 nm (Figure S5, Supporting Information).

Immobilization of PPgMAMPC-SH on Gold-Coated SPR Chip. Unlike $PPgMA_{38}MPC_{62}$−SH and $PPgMA_{45}MPC_{55}$−SH, $PPgMA_{65}MPC_{35}$−SH, which has a higher content of the more hydrophobic PgMA unit, is not soluble in EtOH but dissolves in a mixture of EtOH and THF (7:3 v/v). Au−S bond formation between the gold layer of the SPR chip and the thiol-terminated copolymer (PPgMAMPC-SH) via a "grafting to" approach was performed at ambient temperature for 48 h. The presence of PPgMAMPC brushes on the SPR chip was confirmed using water contact angle

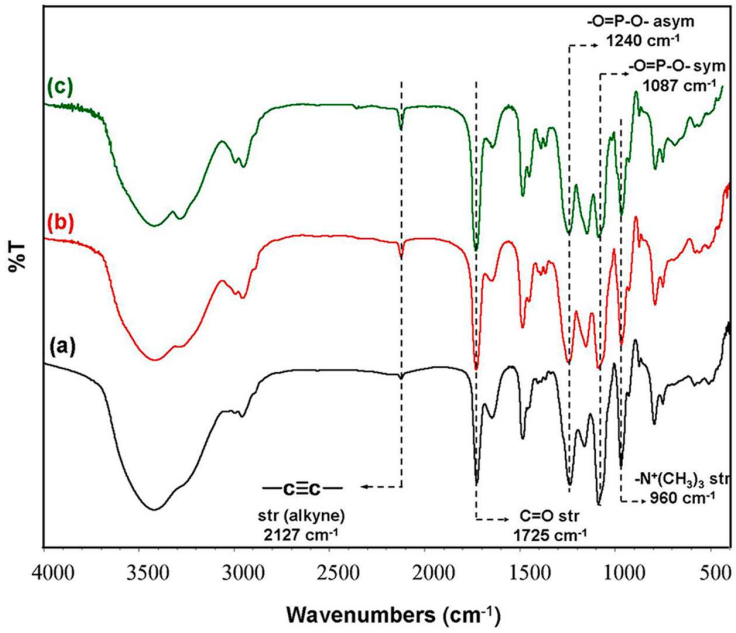


Figure 1. FTIR spectra of (a) $PPgMA_{38}MPC_{62}$ (40.0 kDa), (b) $PPgMA_{45}MPC_{55}$ (46.7 kDa), and (c) $PPgMA_{65}MPC_{35}$ (38.4 kDa).

DOI: 10.1021/acs.langmuir.5b02727
Langmuir 2016, 32, 1184−1194

measurements, and SPR, ATR-FTIR, and XPS analyses. The data in Table 2 show that the advancing (θ_A) water contact angle of the SPR chip decreased from 71.9 ± 1.3° to 44.6 ± 0.9° and 46.6 ± 3.5° upon immobilization of $PPgMA_{38}MPC_{62}$–SH and $PPgMA_{45}MPC_{55}$–SH, respectively, indicating their highly hydrophilic characters. The copolymer with the highest content of hydrophobic PgMA, i.e., $PPgMA_{65}MPC_{35}$–SH, yielded a gold surface with a contact angle (87.9 ± 4.2°) higher than that of the pristine gold surface. Chemisorption of the copolymer brushes on the gold-coated SPR chip was monitored using an SPR technique. The SPR angle shift upon PPgMAMPC-SH immobilization was used to calculate the amount of copolymer bound to the surface, using a sensitivity factor of 120 mDegree, which is equivalent to 100 ng/cm^2 (Table 2).[49,50]

Table 2. Water Contact Angle and SPR Data for Gold-Coated SPR Chips after PPgMAMPC-SH Immobilization and Subsequent Conjugation with Biotin-N_3

		SPR data	
sample	advancing water contact angle (deg)	angle shift (mDegree)	amount adsorbed for each modification step (ng/cm^2)
Au	71.9 ± 1.3	-	-
Au–$PPgMA_{38}MPC_{62}$	44.6 ± 0.9	1024.8 ± 81.8	854.0 ± 68.1
Au–$PPgMA_{45}MPC_{55}$	46.6 ± 3.5	882.1 ± 166.6	735.0 ± 138.9
Au–$PPgMA_{65}MPC_{35}$	87.9 ± 4.2	1323.1 ± 56.1	1102.0 ± 46.8
Au–$PPgMA_{38}MPC_{62}$–biotin	32.7 ± 2.7	15.2 ± 7.4	12.7 ± 6.1
Au–$PPgMA_{45}MPC_{55}$–biotin	41.6 ± 1.3	229.5 ± 50.4	191.2 ± 42.0
Au–$PPgMA_{65}MPC_{35}$–biotin	62.2 ± 1.7	209.5 ± 6.7	174.5 ± 5.6

Figure S6 (Supporting Information) shows the XPS atomic spectra of the gold-coated substrate with immobilized $PPgMA_{45}MPC_{55}$–SH and the substrate before immobilization (bare gold). At a takeoff angle of 90°, phosphorus (P_{2p}) and nitrogen (N_{1s}) signals attributed to the phosphorylcholine group of the MPC units were observed on the substrate, indicating that the copolymer is bound to the gold-coated substrate. The S_{2p} signal of the bound thiol, at a binding energy of 163 eV, was also detected, implying that the copolymer was strongly adsorbed on the substrate by interactions between the thiol groups of the copolymer and the gold surface. The characteristic absorption peaks of the MPC unit, i.e., C═O stretching (ester) at 1725 cm^{-1}, O═P–O–$_{asym}$ stretching at 1264 cm^{-1}, O═P–O–$_{sym}$ stretching at 1091 cm^{-1}, and $-N^+(CH_3)_3$ stretching at 968 cm^{-1}, were observed in the ATR-FTIR spectra (Figure S7, Supporting Information), but the characteristic absorption peak of the PgMA unit, i.e., –C≡C– stretching at 2127 cm^{-1}, was not clearly observed because of overlap with the characteristic peak of diamond (in the region 1500–2650 cm^{-1}), which is the reflectance material used for ATR-FTIR measurements. This signal from diamond dominates the other signals, particularly when the adsorbed material to be characterized is very thin, 1.89–3.12 nm in our case (estimated by ellipsometry).

Surface grafting of PPgMAMPC brushes on the gold-coated substrate was confirmed using AFM. The surface roughness before and after grafting with PPgMAMPC brushes were similar (1.5 vs 1.3 nm), suggesting that the gold surface was smooth and homogeneously covered with the copolymer. The thicknesses (t), measured using ellipsometry, of $PPgMA_{38}MPC_{62}$, $PPgMA_{45}MPC_{55}$, and $PPgMA_{65}MPC_{35}$ were 1.89 ± 0.12, 2.66 ± 0.26, and 3.12 ± 0.19 nm, respectively. The thickness can be used to calculate the graft density (σ) as follows:

$$\sigma = \frac{t\rho N_A}{M_n} \quad (4)$$

where ρ is the mass density (1.1 g/cm^3 for $PPgMA_{65}MPC_{35}$ and 1.2 g/cm^3 for $PPgMA_{45}MPC_{55}$ and $PPgMA_{38}MPC_{62}$), $\bar{M}_n$ is the molecular weight of the free polymer, and N_A is Avogadro's number. The copolymer mass densities were estimated proportionally using ρ_{PMPC} = 1.3 g/cm^3[38] and ρ_{PPgMA} = 1.085 g/cm^3, on the assumption that they are equal to that of poly(propyl methacrylate),[51] which has the same number of carbon atoms. For the copolymer synthesized with $\bar{M}_n$ in the range 38.4–46.7 kDa (DP 173-213), the calculated graft densities of surface-grafted $PPgMA_{38}MPC_{62}$, $PPgMA_{45}MPC_{55}$, and $PPgMA_{65}MPC_{35}$ were 0.04, 0.04, and 0.05 chain/nm^2, respectively. These values are below 0.08 chains/nm^2,[52] which suggests that the PPgMAMPC brushes can be categorized as being in the "mushroom regime."

Biotin Conjugation on Copolymer-Modified SPR Chip by CuAAC Reaction and Subsequent Binding with Streptavidin. Biotin was used as the first sensing probe model. It has a high binding affinity with SA (dissociation constant $K_D \approx 10^{-14}$ M).[53] Biotin-N_3 was immobilized on the PPgMAMPC-modified SPR chip outside the SPR instrument by CuAAC.[54,55] The data in Table 2 show that the water contact angles of the PPgMAMPC-modified SPR chip decreased after biotin attachment, indicating that the hydrophobic alkyne moieties from the PgMA repeat units were consumed and bound with biotin with three repeat units of the hydrophilic PEG spacer. The amounts of immobilized biotin increased significantly, from 12.7 ± 6.1 to 191.2 ± 42.0 ng/cm^2, when the PgMA content of the copolymer was increased from 38% to 45%. However, further increasing the PgMA composition to 65% reduced the quantity of bound probe, implying that biotin may have limited access to the alkyne moieties of copolymers with high PgMA contents, in which the swellability would be suppressed because of the inherent hydrophobicity. This is confirmed by the water contact angle (87.9 ± 4.2°) being much higher than those of the PPgMAMPC-modified SPR chips with PgMA contents of 38% and 45% (44.6 ± 0.9° and 46.6 ± 3.5°, respectively). As shown in Figure S6 in the Supporting Information, similar characteristic atomic spectra of the PPgMAMPC-modified SPR chips were observed after biotin and PNA immobilization but with much better signal, especially for N_{1s}, S_{2p}, P_{2p} peaks in comparison with those before probe immobilization. A Cu peak appears in the Au–PPgMAMPC spectra after probe immobilization (both biotin and PNA), suggesting that Cu remained after the click reaction, although the surface was thoroughly rinsed with 10 mM EDTA and 10 mM PBS (pH 7.4). However, we believe that the Cu contamination should not affect the target molecule detection efficiency.

DOI: 10.1021/acs.langmuir.5b02727
Langmuir 2016, 32, 1184–1194

Nonspecific adsorption of the biotin-modified PPgMAMPC copolymer platform with different copolymer compositions on gold-coated SPR chips was investigated by comparison of adsorption of nontargeted proteins, bovine serum albumin (BSA; 69 kDa, pI = 4.8), LYZ (14 kDa, pI = 12), and 0.14% blood plasma (equivalent to 0.1 mg/mL of protein in PBS buffer, pH 7.4) with that of a targeted analyte, SA (60 kDa, pI = 5). BSA and LYZ were selected as model proteins with negative and positive charges, respectively, at pH 7.4 in PBS. Blood plasma is a complex biological-mimic medium comprising about 7% (70 mg of proteins per milliliter of plasma) of different proteins, e.g., fibrinogen, albumin, and globulin, and other components such as water, inorganic ions, and organic compounds.[56] As anticipated, the biotin-conjugated PPgMAMPC platform was specifically bound to the targeted SA (Figure 2). The bound content of SA increased with

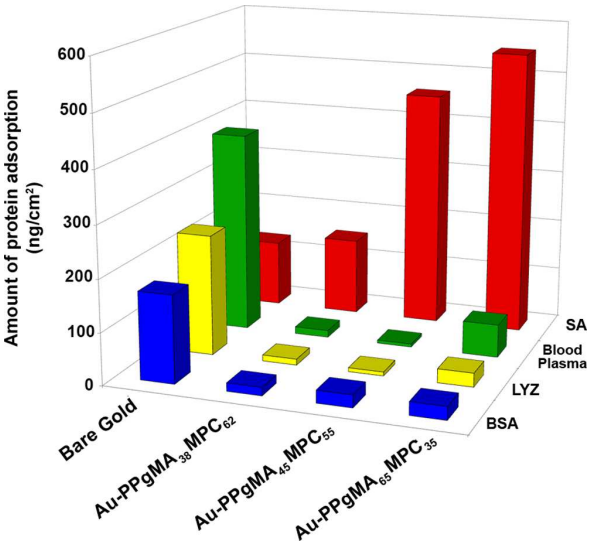


Figure 2. Protein adsorption on biotin-conjugated PPgMAMPC platforms with various copolymer compositions.

increasing PgMA content in the copolymer and increasing biotin content (Table 2). Nonspecific adsorption of the nontargeted proteins (BSA, LYZ, 0.14% blood plasma) was greatly suppressed on the biotin-conjugated PPgMAMPC platform compared with that on the bare gold surface. These results indicate that the MPC units in the PPgMAMPC copolymer are of paramount importance in suppressing nonspecific protein adsorption. This agrees well with reported studies of other MPC-containing (co)polymers.[14,34,37,57] Although the copolymer platform with the highest PgMA content, i.e., 65%, had the greatest bound SA content, it also gave the highest nonspecific adsorption of blood plasma.

In principle, the biotin/SA binding ratio should be 4 if all biotin molecules can be bound to SA. However, the biotin/SA binding ratios, listed in Figure 3, were much higher than the theoretical value, indicating that not all of the conjugated biotin molecules were bound to SA. The biotin/SA binding ratios were extremely high for the Au−PPgMAMPC platforms with high contents of hydrophobic PPgMA (45% and 65%). This may be because of the limited accessibility of SA, which is a large protein (MW = 60 kDa), to the immobilized biotin embedded inside the inner layer of the polymer brushes. Au−

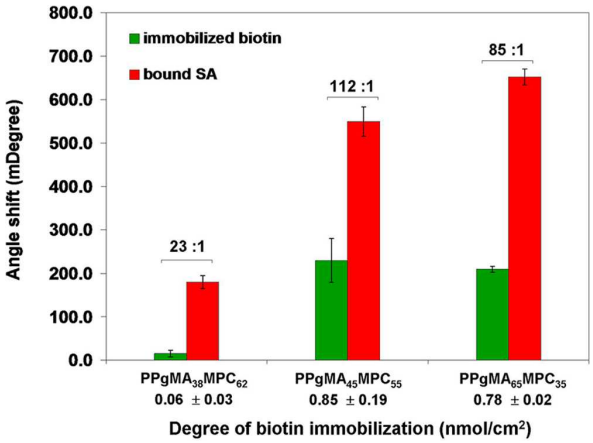


Figure 3. SPR angle shifts corresponding to the amounts of immobilized biotin, and subsequent SA (0.1 mg/mL) binding in PBS solution (10 mM, pH 7.4) on SPR chip modified with PPgMAMPC copolymers of various compositions. Biotin/SA binding ratio is shown on each set of bar charts.

$PPgMA_{38}MPC_{62}$ had the lowest immobilized biotin content, because it had the lowest content of PgMA, which provides active binding sites for biotin immobilization, and because its assembled layer on the gold-coated SPR chip was very thin (1.89 ± 0.12 nm). Although the amount of biotin bound on the Au−$PPgMA_{65}MPC_{35}$ platform (0.78 ± 0.02 nmol/cm^2) was lower than that on the $PPgMA_{45}MPC_{55}$ platform (0.85 ± 0.19 nmol/cm^2), it had a higher content of bound SA. To verify this contradictory outcome, we performed additional experiments to determine the nonspecific adsorption of SA (0.1 mg/mL SA in 10 mM PBS) on Au−$PPgMA_{45}MPC_{55}$ and Au−$PPgMA_{65}MPC_{35}$ before biotin immobilization, using an SPR technique. The data shown in Figure S8 in the Supporting Information indicate that nonspecific adsorption of SA on the Au−$PPgMA_{65}MPC_{35}$ platform was approximately 3 times higher than that on the $PPgMA_{45}MPC_{55}$ brushes. This helps to explain why the Au−$PPgMA_{65}MPC_{35}$ platform (with the highest PgMA content) bound the most SA, although it bound slightly less biotin than did the Au−$PPgMA_{45}MPC_{55}$ platform. SA can bind to the biotin-conjugated Au−PPgMAMPC platform not only by specific interactions with biotin probes but also by nonspecific interactions with the PgMA units of the copolymers.

The amount of SA adsorbed on the biotin-modified PPgMAMPC was low, particularly on the Au−$PPgMA_{38}MPC_{62}$−biotin platform. The adsorbed quantity of SA, 149.8 ± 12.3 ng/cm^2, was less than that in the SA monolayer adsorbed on a mixed monolayer containing 10% thiol-terminated biotin and 90% thiol-terminated ethylene glycol (379.7 ng/cm^2), as reported by Su et al.[50] This seems reasonable because the amount of biotin immobilized on the Au−$PPgMA_{38}MPC_{62}$ platform was lower than the amounts adsorbed on the platforms based on $PPgMA_{45}MPC_{55}$ and $PPgMA_{65}MPC_{35}$. Nevertheless, the amounts of SA adsorbed on Au−$PPgMA_{45}MPC_{55}$−biotin and Au−$PPgMA_{65}MPC_{35}$−biotin, i.e., 457.8 ± 28.6 and 549.5 ± 14.8 ng/cm^2, respectively, were well above that in the monolayer, suggesting three-dimensional character of the deposited copolymer in binding with the biotin probes.

DOI: 10.1021/acs.langmuir.5b02727
Langmuir 2016, 32, 1184−1194

The biotin-modified PPgMAMPC platforms with different copolymer compositions were further investigated to determine the lowest SA concentration detectable in a complex protein sample (blood plasma). The SA concentration was varied in the range 0.19−190 nM (equivalent to 0.01 to 0.1 mg/mL) in 0.14% blood plasma (0.1 mg/mL). Nonspecific binding with 0.14% blood plasma (in the absence of SA) was also measured to evaluate the sensor efficiency in terms of the S/N ratio, as shown in Figure 4. The S/N ratio can be calculated from eq 1.[8,14] The SPR angle shift obtained for the complex sample containing SA is considered to be the signal, whereas that obtained from the sample without SA, i.e., the target molecules, is considered to be background or noise. The results shown in Figure 4 indicate that the SPR chip modified with a copolymer platform containing 65% PgMA ($PPgMA_{65}MPC_{35}$−SH) showed the highest nonspecific binding with blood plasma in a control experiment (absence of SA in 0.14% blood plasma). This may be the result of nonspecific adsorption between the remaining alkyne moieties on the copolymer platform and nontargeted proteins in the blood plasma. The limits of detection (LODs) of the sensor platforms that can discriminate between target and nontargeted binding signals ($S/N \geq 3$) were 190, 0.95, and 190 nM for $PMA_{38}MPC_{62}$−SH, $PMA_{45}MPC_{55}$−SH, and $PMA_{65}MPC_{35}$−SH, respectively. These results suggest that the platform based on a copolymer containing 45% PgMA was the most efficient for detecting SA in blood plasma solution. The LOD of this $PPgMA_{45}MPC_{55}$ platform (0.95 nM) was even lower than that (1.5 nM) obtained for a platform based on poly[(methacrylic acid)-*ran*-(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)] (PMAMPC), previously developed by our group, and approximately 158 times lower than that of a platform based on a SAM of mercaptoundecanoic acid.[14] The fact that the PPgMAMPC sensor platform can directly immobilize an azide-containing biotin probe via a click reaction, without a functional group activation step, as required for the PMAMPC platform, makes it an attractive copolymer platform for probe binding in biosensing applications.

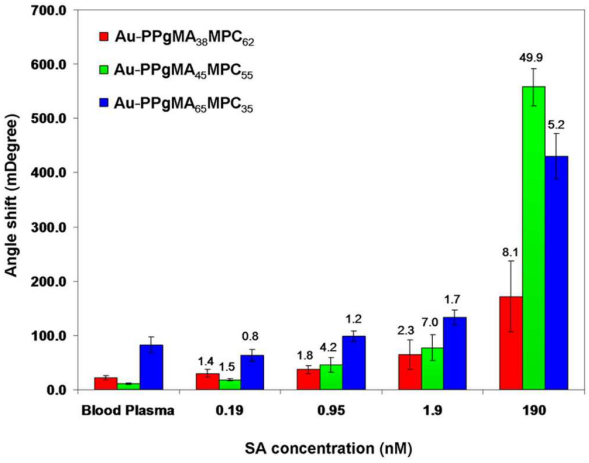


Figure 4. SPR angle shifts corresponding to SA binding on Au−PPgMAMPC−biotin platforms from SA solutions of various concentrations in 0.14% blood plasma. S/N ratios are shown as the number above each bar graph.

The developed PPgMAMPC platforms with clickable PgMA units for probe binding and MPC antifouling units were also used to immobilize a PNA-N_3 probe to explore its applicability as a DNA sensor. PNA is a DNA mimic with a peptide-like backbone, first introduced by Nielsen and co-workers in 1991.[58] Because it is uncharged, PNA·DNA hybrids are more stable than DNA·DNA hybrids, because electrostatic repulsion between negatively charged phosphate groups in the DNA backbone are absent. This, together with its greater specificity for complementary DNA than mismatched DNA, makes PNA an attractive nucleotide probe with potential applications as a DNA sensor. In this study, a conformationally restricted pyrrolidinyl PNA with D-prolyl-2-aminocyclopentanecarboxylic acid backbones (*acpc*PNA), developed by Vilaivan and co-workers, was selected as a model nucleic acid probe. It has been reported that its binding affinity and sequence specificity toward DNA are higher than those of Nielsen's PNA.[46,59,60] We previously showed that *acpc*PNA can act as an effective probe for DNA detection when immobilized on a gold-coated SPR chip either by Au−S bond formation between thiolated PNA (PNA-SH) and the gold surface[61] or by biotin−SA−biotin linkage between biotinylated PNA (PNA−biotin) and an SA layer assembled on a biotin-functionalized gold substrate.[59] Besides blocking, which is a necessary step in most SAM-based sensors, the longer and greater hydrophilicity of the spacer between the PNA part and the thiol end of the thiolated PNA has a positive impact on the %HE of the platform developed by direct immobilization of thiolated PNA. Both %HE and %MD were significantly improved for the platform later developed by indirect PNA conjugation via biotin−SA−biotin linkage, which yielded PNA with a reasonably well-controlled density and orientation (see Table 3 for comparison). The results of these two studies suggest that the clickable and antifouling PPgMAMPC platforms developed in the current study should meet all the above-mentioned criteria for developing an effective PNA-based sensor for DNA detection. Anchoring the copolymer to the gold surface prior to PNA binding should provide a reasonable distance between the immobilized PNA probes and the gold substrate, and allow the PNA molecules to interact freely with the incoming DNA targets. PMPC provides a hydrophilic environment for the platform so that nonspecific adsorption of nontargeted DNA can be suppressed. It is anticipated that good control of the content of clickable PgMA units in the copolymer will enable the density of immobilized PNA to be tailored using efficient CuAAC-based reactions.

Table 3. Values of $\%HE_{com}$ and %MD for DNA Detection by Surface-Modified Gold-Coated SPR Chips Conjugated with PNA

sample	$\%HE_{com}$	%MD
Au−$PPgMA_{38}MPC_{62}$−PNA	20	32
Au−$PPgMA_{45}MPC_{55}$−PNA	61	52
Au−$PPgMA_{65}MPC_{35}$−PNA	71	58
Au−S−PNA[61]	20	> 54
Au−biotin−SA−biotin−PNA[59]	58	> 90

In this work, azide-terminated PNA with a T_9 sequence (PNA-N_3), selected as a PNA probe model, was immobilized by the alkyne moieties of sensing platforms with various copolymer compositions, i.e., $PPgMA_{38}MPC_{62}$−SH, $PPgMA_{45}MPC_{55}$−SH, and $PPgMA_{65}MPC_{35}$−SH, via CuAAC reactions. Specific binding of 50 μM DNA in 10 mM PBS was

DOI: 10.1021/acs.langmuir.5b02727
Langmuir 2016, 32, 1184−1194

monitored using an SPR technique. The %HE and %MD were calculated using eqs 2 and 3, respectively, to evaluate the efficiency of the sensor. As shown in Figure 5, the sensing

PNA probe	N_3-TTT TTT TTT-LysNH_2
Complementary DNA	5'-AAA AAA AAA-3'
Single mismatch DNA	5'-AAA ATA AAA-3'

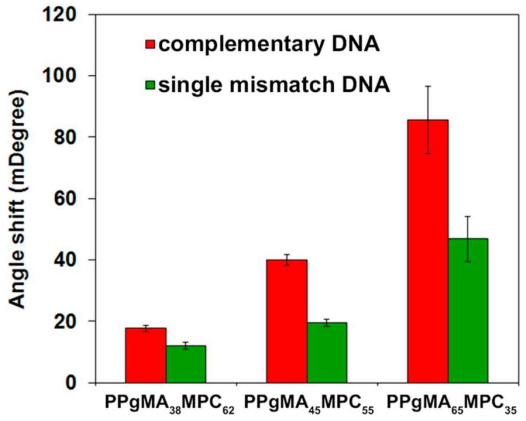


Figure 5. SPR angle shifts corresponding to DNA binding to Au–PPgMAMPC–PNA platforms in 10 mM PBS.

platform based on Au–PPgMA$_{65}$MPC$_{35}$–PNA, which had the highest amount of PgMA units, gave the greatest detectable signal, corresponding to binding of the complementary DNA sequence, A_9 (85.5 ± 10.9 mdeg), with a %HE of 71%, which is higher than those for sensing platforms based on Au–S–PNA[61] and Au–biotin–PNA,[59] as shown in Table 3. However, this copolymer platform still showed high nonspecific interactions toward a single mismatched DNA sequence (AAAATAAAA), therefore its %MD was not satisfactorily high compared with that for a platform based on Au–biotin–SA–biotin–PNA. Despite this limitation, a %HE as high as 71% may be suitable for other DNA-based applications, such as affinity-based DNA separation, in which the mismatch discrimination efficiency is not a critical issue. There is also room for improvement in terms of %MD. For example, possible nonspecific interactions between the remaining unreacted alkyne moieties of PgMA and mismatched DNA may be decreased by blocking the unreacted PgMA with hydrophilic molecules, enabling %HE of mismatched DNA to be minimized. Stable triazole linkages between the PNA probe and the sensing platform should have the additional advantage of being more robust to the regeneration conditions than Au–S or Au–biotin–SA–biotin linkages. This should enable probe recycling, making the process economically viable.

■ CONCLUSIONS

Clickable and antifouling PPgMAMPC copolymer platforms were successfully synthesized by RAFT polymerization. The dithioester end groups of the copolymer were converted to thiol groups before surface immobilization on a gold-coated SPR chip via a "grafting to" approach. The alkyne moieties of PgMA bound azide-containing molecules (biotin-N_3 and PNA-N_3) via a CuAAC reaction, and the hydrophilic monomeric MPC unit suppressed nonspecific adsorption of nontargeted analytes, namely BSA, LYZ, and blood plasma. Specific detection of SA by biotin probes conjugated with the PPgMAMPC platforms in 0.14% blood plasma was investigated using an SPR technique. Among all the platforms investigated, copolymer brushes of PPgMA$_{45}$MPC$_{55}$ performed best, giving the lowest detection limit, i.e., 0.95 nM. The potential of the surface-attached PPgMAMPC as a sensing layer for DNA detection was investigated by conjugating a PNA-N_3 probe with PPgMAMPC platforms with various copolymer compositions. The sensor platform based on Au–PPgMA$_{65}$MPC$_{35}$–PNA detected the highest amount of complementary DNA sequence, with 71%HE, and a reasonable degree of mismatch discrimination (58%MD) between the fully complementary DNA and single-mismatched DNA. These results suggest that substrate-modified PPgMAMPC brushes are potential copolymer platforms for azide-containing probe immobilization for detecting target molecules in diagnostic and related applications. Both types of probe functioned effectively, which shows the versatility of the developed platform, and suggests that it can be used for both antibody-based and DNA-based biosensors.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.langmuir.5b02727.

HPLC chromatogram and MALDI-TOF MS spectrum of PNA, data and calculations related to RAFT polymerization (% conversion, MW, PDIs, GPC chromatograms, and copolymer composition), ^{1}H NMR and UV–vis spectra of copolymer, XPS and ATR-FTIR for copolymer brushes grafted on gold-coated SPR chips, and amounts of SA adsorbed on PPgMAMPC platforms (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

* Tel.: +66-2218-7627; fax: +66-2218-7598; E-mail address: vipavee.p@chula.ac.th.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was financially supported by a Directed Basic Research Grant by the Thailand Research Fund (DBG5580003), a Distinguished Research Professor Grant by the Thailand Research Fund and Chulalongkorn University (DPG5780002), the Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund of Chulalongkorn University (RES560530126-AM), and the Thai Government Stimulus Package 2 (TKK2555), under the Project for Establishment of a Comprehensive Center for Innovative Food, Health Products, and Agriculture. O.W. acknowledges receipt of an academic scholarship from Chulalongkorn University Dutsadiphiphat Scholarship for her Ph.D. study. The authors are grateful to Professor Shin-ichi Yusa and Mr. Keita Nakai from the Graduate School of Engineering, University of Hyogo, Japan, for their assistance in GPC analysis.

■ REFERENCES

(1) Nakamura, F.; Ito, E.; Hayashi, T.; Hara, M. Fabrication of COOH-Terminated Self-Assembled Monolayers for DNA Sensors. *Colloids Surf., A* **2006**, *284–285*, 495–498.

DOI: 10.1021/acs.langmuir.5b02727
Langmuir 2016, 32, 1184–1194

(2) Senaratne, W.; Andruzzi, L.; Ober, C. K. Self-Assembled Monolayers and Polymer Brushes in Biotechnology: Current Applications and Future Perspectives. *Biomacromolecules* **2005**, *6* (5), 2427−48.
(3) Su, X. L.; Li, Y. A Self-Assembled Monolayer-Based Piezoelectric Immunosensor for Rapid Detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Biosens. Bioelectron.* **2004**, *19* (6), 563−574.
(4) Akkahat, P.; Hoven, V. P. Introducing Surface-Tethered Poly(acrylic acid) Brushes as 3D Functional Thin Film for Biosensing Applications. *Colloids Surf., B* **2011**, *86* (1), 198−205.
(5) Akkahat, P.; Mekboonsonglarp, W.; Kiatkamjornwong, S.; Hoven, V. P. Surface-Grafted Poly(acrylic acid) Brushes as a Precursor Layer for Biosensing Applications: Effect of Graft Density and Swellability on the Detection Efficiency. *Langmuir* **2012**, *28* (11), 5302−5311.
(6) Henry, O. Y.; Mehdi, A. D.; Kirwan, S.; Sanchez, J. L.; O'Sullivan, C. K. Three-Dimensional Arrangement of Short DNA Oligonucleotides at Surfaces via the Synthesis of DNA-Branched Polyacrylamide Brushes by SI-ATRP. *Macromol. Rapid Commun.* **2011**, *32* (18), 1405−1410.
(7) Kurosawa, S.; Aizawa, H.; Talib, Z. A.; Atthoff, B.; Hilborn, J. Synthesis of Tethered-Polymer Brush by Atom Transfer Radical Polymerization from a Plasma-Polymerized-Film-Coated Quartz Crystal Microbalance and Its Application for Immunosensors. *Biosens. Bioelectron.* **2004**, *20* (6), 1165−1176.
(8) Lee, B. S.; Chi, Y. S.; Lee, K.-B.; Kim, Y.-G.; Choi, I. S. Functionalization of Poly(oligo(ethylene glycol) methacrylate) Films on Gold and Si/SiO_2 for Immobilization of Proteins and Cells: SPR and QCM Studies. *Biomacromolecules* **2007**, *8* (12), 3922−3929.
(9) Yang, N.; Su, X.; Tjong, V.; Knoll, W. Evaluation of Two- and Three-Dimensional Streptavidin Binding Platforms for Surface Plasmon Resonance Spectroscopy Studies of DNA Hybridization and Protein-DNA Binding. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22* (11), 2700−2706.
(10) Jeong, S. P.; Lee, B. S.; Kang, S. M.; Ko, S.; Choi, I. S.; Lee, J. K. Binding Behaviors of Protein on Spatially Controlled Poly[oligo-(ethylene glycol) methacrylate] Brushes Grafted from Mixed Self-Assembled Monolayers on Gold. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (40), 5291−5293.
(11) Trmcic-Cvitas, J.; Hasan, E.; Ramstedt, M.; Li, X.; Cooper, M. A.; Abell, C.; Huck, W. T. S.; Gautrot, J. E. Biofunctionalized Protein Resistant Oligo(ethylene glycol)-Derived Polymer Brushes as Selective Immobilization and Sensing Platforms. *Biomacromolecules* **2009**, *10* (10), 2885−2894.
(12) Gam-Derouich, S.; Lamouri, A.; Redeuilh, C.; Decorse, P.; Maurel, F.; Carbonnier, B.; Beyazit, S.; Yilmaz, G.; Yagci, Y.; Chehimi, M. M. Diazonium Salt-Derived 4-(Dimethylamino)phenyl Groups as Hydrogen Donors in Surface-Confined Radical Photopolymerization for Bioactive Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) Grafts. *Langmuir* **2012**, *28* (21), 8035−8045.
(13) Vaisocherova, H.; Sevcu, V.; Adam, P.; Spac kova, B.; Hegnerova, K.; de los Santos Pereira, A.; Rodriguez-Emmenegger, C.; Riedel, T.; Houska, M.; Brynda, E.; Homola, J. Functionalized Ultra-Low Fouling Carboxy- and Hydroxy-Functional Surface Platforms: Functionalization Capacity, Biorecognition Capability and Resistance to Fouling from Undiluted Biological Media. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *51*, 150−157.
(14) Akkahat, P.; Kiatkamjornwong, S.; Yusa, S.-i.; Hoven, V. P.; Iwasaki, Y. Development of a Novel Antifouling Platform for Biosensing Probe Immobilization from Methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine-Containing Copolymer Brushes. *Langmuir* **2012**, *28* (13), 5872−5881.
(15) Audouin, F.; Larragy, R.; Fox, M.; O'Connor, B.; Heise, A. Protein Immobilization onto Poly(acrylic acid) Functional Macroporous PolyHIPE Obtained by Surface-Initiated ARGET ATRP. *Biomacromolecules* **2012**, *13* (11), 3787−3794.
(16) Cullen, S. P.; Liu, X.; Mandel, I. C.; Himpsel, F. J.; Gopalan, P. Polymeric Brushes as Functional Templates for Immobilizing Ribonuclease A: Study of Binding Kinetics and Activity. *Langmuir* **2008**, *24* (3), 913−920.
(17) Dai, J. H.; Bao, Z. Y.; Sun, L.; Hong, S. U.; Baker, G. L.; Bruening, M. L. High-Capacity Binding of Proteins by Poly(acrylic acid) Brushes and Their Derivatives. *Langmuir* **2006**, *22* (9), 4274−4281.
(18) Qu, Z.; Chen, K.; Gu, H.; Xu, H. Covalent Immobilization of Proteins on 3D Poly(acrylic acid) Brushes: Mechanism Study and a More Effective and Controllable Process. *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25* (2), 370−378.
(19) Thilakarathne, V.; Briand, V. A.; Zhou, Y.; Kasi, R. M.; Kumar, C. V. Protein Polymer Conjugates: Improving the Stability of Hemoglobin with Poly(acrylic acid). *Langmuir* **2011**, *27* (12), 7663−7671.
(20) Baek, M.-G.; Roy, R. Relative Lectin Binding Properties of T-Antigen-Containing Glycopolymers: Copolymerization of *N*-Acryloylated T-Antigen Monomer vs. Graft Conjugation of Aminated T-Antigen Ligands onto Poly(*N*-acryloxysuccinimide). *Macromol. Biosci.* **2001**, *1* (7), 305−311.
(21) Chen, J.-P.; Chiu, S.-H. A Poly(*N*-isopropylacrylamide-*co*-*N*-acryloxysuccinimide-*co*-2-hydroxyethyl methacrylate) Composite Hydrogel Membrane for Urease Immobilization to Enhance Urea Hydrolysis Rate by Temperature Swing. *Enzyme Microb. Technol.* **2000**, *26* (56), 359−367.
(22) Minard-Basquin, C.; Chaix, C.; D'Agosto, F.; Charreyre, M.-T.; Pichot, C. Oligonucleotide Synthesis onto Poly(*N*-acryloylmorpholine-*co*-*N*-acryloxysuccinimide): Assessment of The Resulting Conjugates in a DNA Sandwich Hybridization Test. *J. Appl. Polym. Sci.* **2004**, *92* (6), 3784−3795.
(23) Duque, L.; Menges, B.; Borros, S.; Forch, R. Immobilization of Biomolecules to Plasma Polymerized Pentafluorophenyl Methacrylate. *Biomacromolecules* **2010**, *11* (10), 2818−2823.
(24) McRae, S.; Chen, X.; Kratz, K.; Samanta, D.; Henchey, E.; Schneider, S.; Emrick, T. Pentafluorophenyl Ester-Functionalized Phosphorylcholine Polymers: Preparation of Linear, Two-Arm, and Grafted Polymer-Protein Conjugates. *Biomacromolecules* **2012**, *13* (7), 2099−2109.
(25) Socaci, C.; Rybka, M.; Magerusan, L.; Nan, A.; Turcu, R.; Liebscher, J. Magnetite Nanoparticles Coated with Alkyne-Containing Polyacrylates for Click Chemistry. *J. Nanopart. Res.* **2013**, *15* (6), 1747.
(26) Wang, C.; Fan, Y.; Hu, M. X.; Xu, W.; Wu, J.; Ren, P. F.; Xu, Z. K. Glycosylation of the Polypropylene Membrane Surface via Thiol-Yne Click Chemistry for Lectin Adsorption. *Colloids Surf., B* **2013**, *110*, 105−112.
(27) Liu, Y.; Li, C. M.; Hu, W.; Lu, Z. High Performance Protein Microarrays Based on Glycidyl Methacrylate-Modified Polyethylene Terephthalate Plastic Substrate. *Talanta* **2009**, *77* (3), 1165−1171.
(28) Xiu, K. M.; Cai, Q.; Li, J. S.; Yang, X. P.; Yang, W. T.; Xu, F. J. Anti-Fouling Surfaces by Combined Molecular Self-Assembly and Surface-Initiated ATRP for Micropatterning Active Proteins. *Colloids Surf., B* **2012**, *90*, 177−183.
(29) Chang, Y.; Shu, S.-H.; Shih, Y.-J.; Chu, C.-W.; Ruaan, R.-C.; Chen, W.-Y. Hemocompatible Mixed-Charge Copolymer Brushes of Pseudozwitterionic Surfaces Resistant to Nonspecific Plasma Protein Fouling. *Langmuir* **2010**, *26* (5), 3522−3530.
(30) Rodriguez Emmenegger, C.; Brynda, E.; Riedel, T.; Sedlakova, Z.; Houska, M.; Alles, A. B. Interaction of Blood Plasma with Antifouling Surfaces. *Langmuir* **2009**, *25* (11), 6328−6333.
(31) Zhang, Z.; Zhang, M.; Chen, S.; Horbett, T. A.; Ratner, B. D.; Jiang, S. Blood Compatibility of Surfaces with Superlow Protein Adsorption. *Biomaterials* **2008**, *29* (32), 4285−4291.
(32) Fuchs, A. V.; Ritz, S.; Putz, S.; Mailander, V.; Landfester, K.; Ziener, U. Bioinspired Phosphorylcholine Containing Polymer Films with Silver Nanoparticles Combining Antifouling and Antibacterial Properties. *Biomater. Sci.* **2013**, *1* (5), 470−477.
(33) Fuchs, A. V.; Walter, C.; Landfester, K.; Ziener, U. Biomimetic Silver-Containing Colloids of Poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) and Their Film-Formation Properties. *Langmuir* **2012**, *28* (11), 4974−4983.

DOI: 10.1021/acs.langmuir.5b02727
Langmuir 2016, 32, 1184−1194

(34) Ishihara, K.; Nomura, H.; Mihara, T.; Kurita, K.; Iwasaki, Y.; Nakabayashi, N. Why do Phospholipid Polymers Reduce Protein Adsorption? *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, *39* (2), 323−330.
(35) Ishihara, K.; Ueda, T.; Nakabayashi, N. Preparation of Phospholipid Polymers and Their Properties as Polymer Hydrogel Membranes. *Polym. J.* **1990**, *22* (5), 355−360.
(36) Iwasaki, Y.; Fujke, A.; Kurita, K.; Ishihara, K.; Nakabayashi, N. Protein Adsorption and Platelet Adhesion on Polymer Surfaces Having Phospholipid Polar Group Connected with Oxyethylene Chain. *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* **1997**, *8* (2), 91−102.
(37) Ishihara, K.; Oshida, H.; Endo, Y.; Ueda, T.; Watanabe, A.; Nakabayashi, N. Hemocompatibility of Human Whole Blood on Polymers with a Phospholipid Polar Group and Its Mechanism. *J. Biomed. Mater. Res.* **1992**, *26* (12), 1543−1552.
(38) Iwata, R.; Suk-In, P.; Hoven, V. P.; Takahara, A.; Akiyoshi, K.; Iwasaki, Y. Control of Nanobiointerfaces Generated from Well-Defined Biomimetic Polymer Brushes for Protein and Cell Manipulations. *Biomacromolecules* **2004**, *5* (6), 2308−2314.
(39) Park, J.; Kurosawa, S.; Takai, M.; Ishihara, K. Antibody Immobilization to Phospholipid Polymer Layer on Gold Substrate of Quartz Crystal Microbalance Immunosensor. *Colloids Surf., B* **2007**, *55* (2), 164−172.
(40) Goto, Y.; Matsuno, R.; Konno, T.; Takai, M.; Ishihara, K. Polymer Nanoparticles Covered with Phosphorylcholine Groups and Immobilized with Antibody for High-Affinity Separation of Proteins. *Biomacromolecules* **2008**, *9* (3), 828−833.
(41) Mark, S. S.; Nishizawa, K.; Takai, M.; Ishihara, K. A Bioconjugated Phospholipid Polymer Biointerface with Nanometer-Scaled Structure for Highly Sensitive Immunoassays. In *Bioconjugation Protocols*; Mark, S. S., Ed. Humana Press: New York, 2011; Vol. *751*, pp 491−502.
(42) Nishizawa, K.; Konno, T.; Takai, M.; Ishihara, K. Bioconjugated Phospholipid Polymer Biointerface for Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Biomacromolecules* **2008**, *9* (1), 403−407.
(43) Sakai-Kato, K.; Kato, M.; Ishihara, K.; Toyo'oka, T. An Enzyme-Immobilization Method for Integration of Biofunctions on a Microchip Using a Water-Soluble Amphiphilic Phospholipid Polymer Having a Reacting Group. *Lab Chip* **2004**, *4* (1), 4−6.
(44) Iwata, R.; Satoh, R.; Iwasaki, Y.; Akiyoshi, K. Covalent Immobilization of Antibody Fragments on Well-Defined Polymer Brushes via Site-Directed Method. *Colloids Surf., B* **2008**, *62* (2), 288−298.
(45) He, H.; Zhang, Y.; Gao, C.; Wu, J. 'Clicked' Magnetic Nanohybrids with a Soft Polymer Interlayer. *Chem. Commun.* **2009**, *13*, 1655−1657.
(46) Vilaivan, T.; Srisuwannaket, C. Hybridization of Pyrrolidinyl Peptide Nucleic Acids and DNA: Selectivity, Base-Pairing Specificity, and Direction of Binding. *Org. Lett.* **2006**, *8* (9), 1897−1900.
(47) Ditmangklo, B.; Boonlua, C.; Suparpprom, C.; Vilaivan, T. Reductive Alkylation and Sequential Reductive Alkylation-Click Chemistry for On-Solid-Support Modification of Pyrrolidinyl Peptide Nucleic Acid. *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24* (4), 614−625.
(48) Shen, W.; Qiu, Q.; Wang, Y.; Miao, M.; Li, B.; Zhang, T.; Cao, A.; An, Z. Hydrazine as a Nucleophile and Antioxidant for Fast Aminolysis of RAFT Polymers in Air. *Macromol. Rapid Commun.* **2010**, *31* (16), 1444−1448.
(49) Metallo, S. J.; Kane, R. S.; Holmlin, R. E.; Whitesides, G. M. Using Bifunctional Polymers Presenting Vancomycin and Fluorescein Groups to Direct Anti-Fluorescein Antibodies to Self-Assembled Monolayers Presenting d-Alanine-d-Alanine Groups. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (15), 4534−4540.
(50) Su, X.; Wu, Y.-J.; Knoll, W. Comparison of Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Quartz Crystal Microbalance Techniques for Studying DNA Assembly and Hybridization. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *21* (5), 719−726.
(51) Ellis, B.; Smith, R. *Polymers: A Property Database*, 2nd ed.; Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL, 2008.
(52) Wu, T.; Gong, P.; Szleifer, I.; Vlcek, P.; Subr, V.; Genzer, J. Behavior of Surface-Anchored Poly(acrylic acid) Brushes with Grafting Density Gradients on Solid Substrates:1. Experiment. *Macromolecules* **2007**, *40* (24), 8756−8764.
(53) Green, N. M. Avidin. *Adv. Protein Chem.* **1975**, *29*, 85−133.
(54) Huisgen, R. 1,3-Dipolar cycloadditions. Past and future. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1963**, *2* (10), 565−598.
(55) Tornoe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. Peptidotriazoles on Solid phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (9), 3057−3064.
(56) Hansen, J. T. *Netter's Clinical Anatomy*, 3rd ed.; Elsevier, Inc: Philadelphia, PA, 2014.
(57) Kim, G.; Park, S.; Jung, J.; Heo, K.; Yoon, J.; Kim, H.; Kim, I. J.; Kim, J. R.; Lee, J. I.; Ree, M. Novel Brush Polymers with Phosphorylcholine Bristle Ends: Synthesis, Structure, Properties, and Biocompatibility. *Adv. Funct. Mater.* **2009**, *19* (10), 1631−1644.
(58) Nielsen, P.; Egholm, M.; Berg, R.; Buchardt, O. Sequence-Selective Recognition of DNA by Strand Displacement with a Thymine-Substituted Polyamide. *Science* **1991**, *254* (5037), 1497−1500.
(59) Ananthanawat, C.; Vilaivan, T.; Hoven, V. P.; Su, X. Comparison of DNA, Aminoethylglycyl PNA and Pyrrolidinyl PNA as Probes for Detection of DNA Hybridization Using Surface Plasmon Resonance Technique. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25* (5), 1064−1069.
(60) Suparpprom, C.; Srisuwannaket, C.; Sangvanich, P.; Vilaivan, T. Synthesis and Oligodeoxynucleotide Binding Properties of Pyrrolidinyl Peptide Nucleic Acids Bearing Prolyl-2-Aminocyclopentanecarboxylic Acid (ACPC) Backbones. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46* (16), 2833−2837.
(61) Ananthanawat, C.; Vilaivan, T.; Mekboonsonglarp, W.; Hoven, V. P. Thiolated Pyrrolidinyl Peptide Nucleic Acids for the Detection of DNA Hybridization Using Surface Plasmon Resonance. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24* (12), 3544−3549.

DOI: 10.1021/acs.langmuir.5b02727
Langmuir 2016, 32, 1184−1194

Biosensors and Bioelectronics 82 (2016) 99–104

Contents lists available at ScienceDirect

Biosensors and Bioelectronics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bios

Enhancing capacitive DNA biosensor performance by target overhang with application on screening test of HLA-B*58:01 and HLA-B*57:01 genes

Orawan Thipmanee [a,b,c], Apon Numnuam [a,b,c], Warakorn Limbut [a,b,d], Chittanon Buranachai [a,e], Proespichaya Kanatharana [a,b,c], Tirayut Vilaivan [f], Nattiya Hirankarn [g,h,**], Panote Thavarungkul [a,b,e,*]

[a] Trace Analysis and Biosensor Research Center, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand
[b] Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand
[c] Department of Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand
[d] Department of Applied Science, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand
[e] Department of Physics, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand
[f] Organic Synthesis Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand
[g] Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand
[h] Center of Excellence in Immunology and Immune-Mediated Diseases, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:
Received 18 December 2015
Received in revised form
12 March 2016
Accepted 24 March 2016
Available online 28 March 2016

Keywords:
Label-free capacitive DNA biosensor
acpcPNA probe
Target DNA overhang
HLA-B*58:01
HLA-B*57:01

ABSTRACT

A highly sensitive label-free DNA biosensor based on PNA probes immobilized on a gold electrode was used to detect a hybridization event. The effect of a target DNA overhang on the hybridization efficiency was shown to enhance the detected signal and allowed detection at a very low concentration. The sensors performances were investigated with a complementary target that had the same length as the probe, and the signal was compared to the target DNAs with different lengths and overhangs. A longer target DNA overhang was found to provide a better response. When the overhang was on the electrode side the signal enhancement was greater than when the overhang was on the solution side due to the increased thickness of the sensing surface, hence produced a larger capacitance change. Using conformationally constrained acpcPNA probes, double stranded DNA was detected sensitively and specifically without any denaturing step. When two acpcPNA probes were applied for the screening test for the double stranded HLA-B*58:01 and HLA-B*57:01 genes that are highly similar, the method differentiated the two genes in all samples. Both purified and unpurified PCR products gave comparable results. This method would be potentially useful as a rapid screening test without the need for purification and denaturation of the PCR products.
© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Specific-sequence detection of DNA has potential applications in many areas such as clinical diagnostics (O'Connor and Glynn, 2010), detection of genetically modified organisms (Manzanares-Palenzuela et al., 2015) and environmental monitoring (Paniel et al., 2013). DNA biosensors are generally composed of single stranded DNA (ssDNA) or peptide nucleic acid (PNA) probes immobilized on a transducer surface that are able to form a duplex with the target DNAs (Odenthal and Gooding, 2007). We have recently reported the formation of label-free DNA biosensors based on the sensitive capacitive detection using pyrrolidinyl PNA with a conformationally rigid D-prolyl-2-aminocyclopentanecarboxylic acid (ACPC) backbone (acpcPNA) (Sankoh et al., 2013; Thipmanee et al., 2012; Vilaivan, 2015). When tested with target DNAs of the same length as the PNA probe, they provided excellent performance. However, real DNA samples are usually much longer than the probe, and exist in double-stranded forms. It was therefore of interest to investigate the performance of a biosensor with a long and double stranded DNA target, as this was a more realistic situation when testing real samples.

The influence of target length, or more accurately the overhang, on the hybridization response in a label-free biosensor has been reported using cantilevers (Mukhopadhyay et al., 2005) and mostly by detection using electrochemical impedance spectrometry (EIS)

* Corresponding author at: Department of Physics, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand.
** Corresponding author at: Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.
E-mail addresses: Nattiya.H@chula.ac.th (N. Hirankarn), panote.t@psu.ac.th (P. Thavarungkul).

http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2016.03.065
0956-5663/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

(Booth et al., 2011; Corrigan et al., 2014; Riedel et al., 2014; Shamsi and Kraatz, 2011). It was expected that the response would increase with the length of the overhang. However, using the EIS response (charge transfer resistance – R_{ct}), the results seemed to vary, from an increased response with the length of the overhang (on the solution side) (Booth et al., 2011) to the existence of an optimal overhang length for the highest response (Corrigan et al., 2014) and to a decrease in the response with the length of overhang despite the increased mass on the sensing surface (Riedel et al., 2014). In all cases the explanation for these behaviors was attributed to the increased negative charges from the overhang target DNA but with different principles on its effect on the electrode/electrolyte charge transfer, hence, the different outcomes. The position of the overhang in the DNA target was also of interest (Riedel et al., 2014; Shamsi and Kraatz, 2011), however, the results were inconclusive, possibly due to the different experimental conditions. Since a capacitive system relies on the ability of an electrode to store a charge without any charge transfer, it was important to see how the target DNAs with different overhangs contributed to the capacitive detection. Capacitance determination is generally performed via EIS or by a potentiostatic step method (Berggren et al., 2001). In this case when a potential was given to an electrode, with the insulating sensing layer on the surface, the electrode will possess the same amount of charge as the solution but with an opposite sign. It was expected that the overhang, with its increased mass on the electrode surface changed the thickness of the insulating sensing layer, hence, increased the change in the capacitance.

In this work the effect of the target DNA overhang on the hybridization efficiency of a potentiostatic step capacitive DNA sensor based on an acpcPNA probe was, for the first time, studied with the objective that this effect may help to enhance the detected signal and that the system could be readily applied to a real sample. The detection of the single stranded target DNAs with different lengths and overhangs was first explored. The advantage of using the acpcPNA probe for binding with the double stranded target DNAs was also reported. As a proof of the application we investigated the performance of the developed DNA biosensor on the screening test for the PCR products of two interesting genes HLA-B*58:01 and HLA-B*57:01 in which the targeted sequences have only two nucleotides different (Robinson et al., 2015), and both had long non-hybridizing segments. HLA-B*58:01 is strongly associated with hypersensitivity to allopurinol that is used to treat hyperuricemia and recurrent gout, as for HLA-B*57:01, it strongly predicts hypersensitivity to the anti-retroviral drug abacavir (Yun et al., 2012). A detection system that can differentiate and detect the PCR product rapidly with high accuracy is needed, to screen for patients with HLA-B*57:01 or HLA-B*58:01 in the clinic to identify those who should avoid the prescription of potentially harmful drugs. The standard method to detect a specific HLA type in the laboratory is usually conducted by the polymerase chain reaction (PCR) that employs several sets of primers (Hein et al., 1995) or by using nested PCR (Martin et al., 2005) followed by the time consuming detection of the PCR products by gel electrophoresis. The ability of this capacitive DNA biosensor to achieve a rapid, sensitive and selective differentiation between HLA-B*57:01 and HLA-B*58:01 genes was demonstrated.

2. Experimental

2.1. Materials

The 11-mer lysine-modified acpcPNA probes were synthesized by Mrs. Chotima Vilaivan at Chulalongkorn University, Thailand according to the published protocol (Vilaivan and Srisuwannaket, 2006). The acpcPNA probes were purified by reverse phase HPLC (to 90% purity) and their identities were verified by MALDI-TOF mass spectrometry. The sequence of the lysine-modified acpcPNA probes for both the HLA-B*58:01 (P1 and P2) and the HLA-B*57:01 (P3) genes are shown in Table 1.

The synthetic target DNAs used in this work were synthesized and purified by the Bioservice Unit, National Science and Technology Development Agency and BioDesign Co., Ltd., Thailand, and their sequences are shown in Table 1. The HLA-B*58:01 and HLA-B*57:01 PCR-amplified DNA samples were 200 bases in length, with only a 2-nucleotide difference (Table 1). These genes were amplified from the genomic DNA, extracted from white blood cells (see Supplementary material for the PCR protocol) and their concentrations were determined from the optical density at 260 nm using a Nanodrop spectrophotometer (Wilmington, USA).

The blocking thiol, 11-mercapto-1-undecanol (11-MUL) was from Aldrich (Steinheim, Germany). para-phenylenediamine (*p*-PD) was from UNILAB reagent (Sydney-Melbourne, Australia). Glutaraldehyde was from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). All buffers were prepared with deionized water treated with a reverse osmosis-deionizing system (Pentair, Inc., USA). Before use, buffers were filtered through a nylon membrane (0.2 μm pore size, 47 mm diameter, Vertical®, Spain) before being degassed. Other chemicals were analytical reagent grade and were used as received.

2.2. Immobilization of acpcPNA probe

Gold rod electrodes (99.99% purity) with a diameter of 3.0 mm were cleaned by dipping in piranha solution (3:1%v/v of conc. H_2SO_4: 30%H_2O_2) for 20 min followed by rinsing with distilled water. Then, they were polished using an alumina slurry (5, 1, and 0.3 μm), on a polishing cloth until a mirror-like surface was obtained and subsequently washed with distilled water. The electrodes were placed inside a plasma cleaner (Model PDC-32G, Harrick, New York, USA) to remove organic and inorganic molecules adsorbed on the surface of the electrodes.

The P1, P2 and P3 PNA probes were immobilized on separate electrodes via a polymer layer of *p*PD (P*p*PD) following an earlier reported protocol (Sankoh et al., 2013) (Supplementary material Fig. S1). The *p*PD monomer of 5.0 mM was first prepared in 1.0 mM sodium acetate buffer pH 5.18. Electropolymerization was carried out by cyclic voltammetry at 15 scans using the potential range from 0.0 to 0.8 V vs. Ag/AgCl with a scan rate of 50 mVs^{-1}. The P*p*PD coated electrode was cleaned by rinsing with distilled water and treated with 5.0% (v/v) glutaraldehyde in 10 mM phosphate buffer pH 7.00 at room temperature for 20 min to activate the aldehyde group. Then 20 μL of 5.0 μM of acpcPNA probe was placed on the P*p*PD coated electrode and left for 24 h at 4 °C. The electrode was then treated with 1.0 mM ethanolamine pH 8.00 for 7 min to deactivate all the remaining aldehyde groups not coupled to the immobilized acpcPNA probe. Finally, 1.0 mM 11-MUL solution was applied for 1 h to block the remaining pinholes, hence, preventing any non-specific binding on the electrode surface.

2.3. Capacitance measurement

The measurements were performed in a flow-injection system. The modified gold electrode was used as the working electrode together with an Ag/AgCl reference electrode and a Pt wire counter electrode connected to a potentiostat (Model EA161, EDAQ, New South Wales, Australia). The conditions were, carrier buffer: 10 mM phosphate buffer pH 7.00, flow rate: 50 μL min^{-1}, sample volume: 300 μL and the regeneration solution: 50 mM NaOH, 300 μL.

The capacitance was obtained based on a potential step method (Berggren et al., 2001) as previously described (Sankoh et al., 2013) (Supplementary material Fig. S1). In brief, the transient current response of an applied potential step (50 mV, 1 pulse/min) was used to obtain the linear least-square fitting of ln i(t) versus t. The

Table 1
Sequence of PNA probes and target DNAs. The italic and underlining alphabets indicate the mismatched and non-hybridizing segment, respectively.

Name	Type	Sequence	Number of base
P1	acpcPNA probe for HLA-B*58:01 gene	Ac-GCTCCGTCCTC-LysNH_2 (N–C)	11
P2	acpcPNA probe for HLA-B*58:01 gene (one base shift from P1)	Ac-CTCCGTCCTCG-LysNH_2 (N–C)	11
P3	acpcPNA probe for HLA-B*57:01 gene	Ac-CGCCATCCTCG-LysNH_2 (N–C)	11
T1	Single stranded complementary to P1	5′-**GAGGACGGAGC**-3′	11
T2	Single stranded complementary to P1 Overhang, 15 bases on each side	5′-CGACGCCGCGAGTCC **GAGGACGGAGC** CCCGGGCGCC ATGGA-3′	41
T2mis1	Single stranded, single mismatched to P1 Overhang, 15 bases on each side	5′-CGACGCCGCGAGTCC **GAGGA*T*GGAGC**CCCGGGCGCC ATGGA-3′	41
T2mis2	Single stranded, double mismatched to P1 Overhang, 15 bases on each side	5′-CGACGCCGCGAGTCC **GAGG*TCT*GAGC**CCCGGGCGCC ATGGA-3′	41
T3	Single stranded complementary to P1 Overhang, 25 bases on each side	5′-GGTTCGAGAGCGACGCCGCGAGTCC**GAGGACGGAGC**CCCGGGCGCCATGGATAGAGCAGGA-3′	61
T4	Single stranded complementary to P1 Overhang, 54 bases on solution side	5′-**GAGGACGGAGC**CCCGGGCGCC ATGGATAGAGCAGGAGGGGCCGGA GTATTGGGACGGGGAGACAC-3′	65
T5	Single stranded complementary to P1 Overhang, 54 bases on electrode side	5′-GGGCTACGTGGACGACACCCAGTT CGTGAGGTTCGACAGCGACG CCGCGAGTCC **GAGGACGGAGC**-3′	65
HLA-B*58:01	Double stranded PCR product Overhang, 107 bases on electrode side, 82 bases on solution side Bold alphabets show the sequence complementary to P2, the sequence complementary to P1 is one base shift to the left	5′-TTTCTACACCGCCATGTC CCGGCCCGGCCGCGGGGAGC CCCGCTTCATCGCAGTGGGC TACGTGGACGA-CACCCAGTT CGTGAGGTTCGACAGCGACG CCGCGAGTC**CGAGGACGGAG** CCCCGGGCGCCATGGATAGA GCAGGAGGGGCCGGAGTATT GGGACGGGGAGACACGGAAC ATGAAGGCCTCCGCGCAGACTT-3′	200
HLA-B*57:01	Double stranded PCR product, 2-nucleotide difference from the HLA-B* 5801 Overhang, 107 bases on electrode side, 82 bases on solution side Bold alphabets show the sequence complementary to P3	5′-TTTCTACACCGCCATGTC CCGGCCCGGCCGCGGGGAGC CCCGCTTCATCGCAGTGGGC TACGTGGACGA-CACCCAGTT CGTGAGGTTCGACAGCGACG CCGCGAGTC**CGAGGA*T*GGCG** CCCCGGGCGCCATGGATAGA GCAGGAGGGGCCGGAGTATT GGGACGGGGAGACACGGAAC ATGAAGGCCTCCGCGCAGACTT-3′	200

value of the capacitance of the electrode surface, C_{total}, was then obtained from the slope of the linear regression equation. The measuring flow cell had a dead volume of approximately 10 μL. The flow of the carrier buffer through the measuring cell was maintained by a peristaltic pump (Miniplus3, Gilson, France) that provided a baseline capacitance. Then, the synthetic target DNA or the gene sample with a volume of 300 μL was injected into the flow system and the hybridization between the PNA probes on the electrode surface and the target DNAs in the flow through sample was performed at room temperature. The decrease in the total capacitance upon hybridization due to the increase of the dielectric layer thickness can be described by Eq. (1)

$$\frac{1}{C_{total}} = \frac{1}{C_{PpPD}} + \frac{1}{C_{acpcPNA}} + \frac{1}{C_{DNA}} \quad (1)$$

where C_{total} is the total double layer capacitance measured at the electrode-solution interface, C_{PpPD} is the capacitance of the P*p*PD modified layer, $C_{acpcPNA}$ is the capacitance of the acpcPNA layer, and C_{DNA} is the capacitance of the DNA layer. The measure C_{total} was plotted as a function of time. The capacitance change (ΔC) is the difference between the capacitance obtained before and after the binding of the PNA probe and the target DNA (Supplementary material Fig. S1). The regeneration solution (50 mM NaOH, 300 μL) was then injected and flowed through the electrode surface to break the binding between the probe and the target and the capacitance returned to its baseline, ready for a new analytical cycle.

3. Results and discussion

3.1. Effect of target DNA overhang

The hybridization between the PNA probe and target DNA of unequal lengths results in non-hybridized segments. The target DNA overhang was first investigated, with an immobilized P1 probe, using different lengths of synthetic ssDNAs with overhangs

on either side between 1.0×10^{-14} and 1.0×10^{-6} M. Linear relationship between ΔC and the logarithm of the concentration of all targets were between 1.0×10^{-12} and 1.0×10^{-8} M. The limit of detection (LOD) of the capacitive biosensor for the complementary target DNA (T1) was 1.0 pM (Buck and Lindner, 1994). For the 41 and 61 bases target DNAs (T2 and T3) with a 15 and 25 nt overhang on each side, the limit of detection improved slightly with the length of the overhang, i.e., 0.8 pM and 0.5 pM for the target with a 15 and 25 nt overhang, respectively. For the sensitivity (expressed by the slope of the calibration plot), the results in Fig. 1a indicated that the targets T2 and T3 had higher sensitivities (18.0 ± 1.0 and 23.2 ± 1.1 –nF cm^{-2} $(\log M)^{-1}$, respectively) than the 11 bases DNA without the overhang (11.1 ± 0.2 – nF cm^{-2} $(\log M)^{-1}$). As anticipated a longer overhang (25 bases of the 61 bases T3), which added more mass to the surface, gave a higher sensitivity (and a better LOD). This was in contrast to some earlier reports based on EIS in which the highest R_{ct} was obtained from the hybridization between the DNA probe and the complementary target DNA that has no overhang. The lower response was said to be due to the lower charge transfer resistance caused by the lower hybridization efficiency of a target with an overhang on the electrode side (Shamsi and Kraatz, 2011) or to the direct increase of the negative charges (of the target DNA) near the electrode, which disturbed the permeation of ferri-/ferrocyanide on the electrode (Riedel et al., 2014). These effects were probably overcome by the use of the PNA probe, which has proven to be very efficient for hybridization with target DNA (Vilaivan, 2015; Vilaivan and Srisuwannaket, 2006) and for the detection of the change in capacitance as it does not depend on the charge transfer.

Further experiments were carried out to see the effect of the position of the overhanging part. This was investigated using two 65 bases as target DNAs with a 54 base overhang on either side (T4 and T5). As shown in Fig. 1b, a much higher sensitivity was obtained from the target DNA with the overhanging part on the electrode surface (27.1 ± 1.5 –nF cm^{-2} $(\log M)^{-1}$) compared to the one with the overhang in the solution (11.1 ± 0.2 –nF cm^{-2} $(\log M)^{-1}$). This is most likely because the overhang on the electrode surface pushed the electrolyte further away from the electrode surface, i.e., making the interface thicker resulted in a decreased capacitance (Berggren et al., 2001; Gebbert et al., 1992), and thus increased the ΔC. On the other hand the target DNA with the overhang in the solution gave the same sensitivity as the fully complementary DNA (11 bases) but with a slightly higher signal. It was therefore likely that an overhang of the target DNA on the electrode surface was more effective for displacing water and electrolyte molecules away from the surface, and provided for a more enhanced sensitivity. This is in contrast to the results of Shamsi and Kraatz (2011). Using DNA probes they found that the same length of an overhang on the electrode side, compared to the solution side, decreased the response (ΔR_{ct}). They reasoned that this was most likely due to the decrease in hybridization efficiency caused by steric congestions at the electrode surface. This again confirmed the advantage of this newly reporting system, i.e., the use of a neutral PNA probe can reduce such a steric effect from the DNA-DNA hybridization.

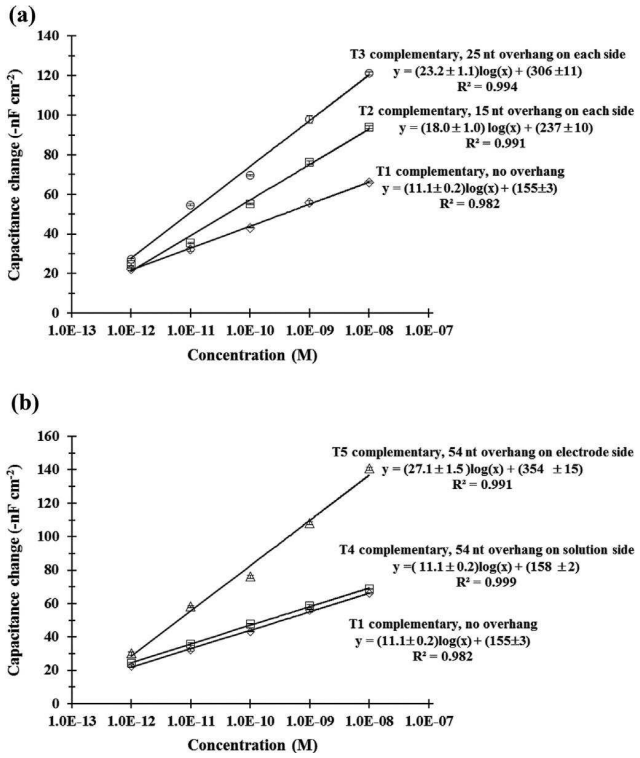


Fig. 1. Capacitance change from the hybridization of probe P1 with the same length target DNA (T1) and (a) target DNAs with different lengths of overhang on both sides, T2 and T3 (b) target DNAs with the same length of overhang (54 bases) but on opposite side (T4 and T5) (n=3).

3.2. Detection of double stranded target DNA

As most DNA targets are in duplex forms (dsDNA), almost all previous DNA sensors require denaturation of the target dsDNA prior to detection. One advantage of using PNA is that it can also bind directly to dsDNA or other structured DNA targets in various configurations depending on the base sequence (Armitage, 2003; Wang and Xu, 2004). For the first time, a direct capacitive detection with immobilized PNA probes was investigated for its binding capability to dsDNA targets, with and without denaturation. Two dsDNAs were tested with the P1 probe, i.e., the PCR products of the target HLA-B*58:01 gene and the HLA-B*57:01 gene that had only two nucleotides different. The denaturation was carried out by heating at 90 °C in a water bath for 15 min and rapidly cooled down on ice for 10 min. The responses from the DNAs with and without denaturation are shown in Fig. 2. The slightly higher response of the denatured DNA was most likely due to the better accessibility of the PNA probe to the hybridization segment. However, the responses of the DNA without denaturation were only about 10% lower than those from non-denatured DNA. As expected the responses to the HLA-B*57:01 gene were much lower than those to the HLA-B*58:01, but a similar behavior was obtained, i.e., the denatured DNA gave a higher response than the dsDNA. From the results, this system could be applied to

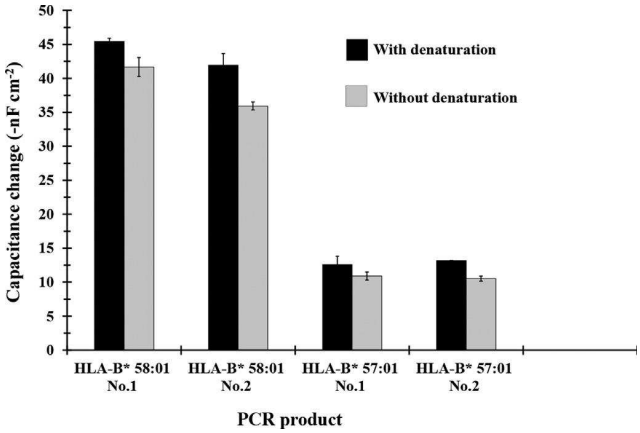


Fig. 2. Capacitance change from the hybridization of probe P1 with 1.0×10^{-11} M PCR product of the HLA-B*58:01 and HLA-B*57:01 genes, with and without denaturation (n=3).

detect target dsDNA without the need for denaturation, and therefore reduced the time taken and simplified the method.

3.3. Analysis of the purified HLA-B*58:01 and HLA-B*57:01 genes

Using the electrode with the immobilized P1 probes, the purified HLA-B*58:01 and HLA-B*57:01 genes were first tested in the concentration range from 1.0×10^{-14} and 1.0×10^{-7} M. The linear range of both targets were from 1.0×10^{-12} to 1.0×10^{-8} M, with the same LOD of 0.4 pM. However, the %signal suppression values (%SS = 100 × (complementary response − mismatched response)/complementary response) within the linear range were only 15–30%. This led to the investigation of using a hybridization suppressor (additive) that helped to control the hybridization behavior of the perfect matched and mismatched target DNA (Lao et al., 2009). Two additives were tested, using the carrier buffer of 100 mM phosphate buffer, pH 7.00. Acetamide (0.10, 0.25, 0.50, 0.80, 0.90 and 1.0 M) and formamide (0.25 M) were investigated with the P1 probe to detect a 41 base target DNA (T2) at 1.0×10^{-10} M.

The additives did lower the responses for both the complementary (T2) and mismatched DNAs (T2mis1 and T2mis2). However, the presence of the additive considerably improved the %SS values (Supplementary material Table S1). Comparing the presence of formamide and acetamide at the same concentration (0.25 M) the latter provided a better %SS. This is because acetamide has a lower dielectric constant (D) than formamide (D = 4.7 and 109.5 at 25 °C, respectively) (Covington and Dickinson, 1973), so gave a lower baseline that resulted in a larger ΔC response. The optimum concentration for acetamide was studied and found to be 0.25 M. This provided the highest %SS for both a single (75%) and double (81%) mismatched DNAs. The HLA-B*58:01 and HLA-B*57:01 genes within the same concentration range were then tested again by adding 0.25 M acetamide in the buffer. The %SS improved by 50–70%, compared to when there was no additive, and therefore the acetamide additive was included for the remaining experiments.

The use of the P2 probe with a slightly different sequence to P1 (one base shift towards the C-terminus: Table 1) for the detection of HLA-B*58:01 was also tested. A calibration curve was established from a purified PCR product of HLA-B*58:01. The linearity between the capacitance change (–nF cm^{-2}) and the logarithm of the HLA-B*58:01 concentration (log M) was observed between 1.0×10^{-12} and 1.0×10^{-8} M (Fig. 3a). The very low concentration of the linear range would allow for detecting a sample with a very small amount of DNA. For samples with high concentration, dilution can be easily performed, hence only a small sample volume is required. The dilution will also reduce any interfering effect from the sample matrix. The performance of the P2 probe was comparable to P1 (data not shown), P2 was then used for further experiments. It should also be noted that the dsDNA of the HLA-B*58:01 gene with a 107-base non-hybridizing segment on the electrode side provided a much higher sensitivity (36.0 ± 1.3 –nF cm^{-2} $(\log M)^{-1}$) (Fig. 3a) than the ssDNA target with a 54 base overhang (27.1 ± 1.5 – nF cm^{-2} $(\log M)^{-1}$) (Fig. 1b). This also confirmed that a longer non-hybridizing segment provided a better sensitivity.

The detection for the HLA-B*57:01 genes yielded a sensitivity of 8.1 ± 0.2 –nF cm^{-2} $(\log M)^{-1}$ (Fig. 3a). Although the sensitivity from the purified HLA-B*58:01 was 4.4 times more than the one from the HLA-B*57:01 genes, an incorrect quantitative result may still be obtained. For example, a sample with a large amount of the HLA-B*57:01 genes might give the same response as a sample with a lower amount of the HLA-B*58:01 genes. Therefore, the same samples were detected twice using two probes, and the signals were compared to eliminate the effect of concentration. In this set up, the same sample was tested with two modified electrodes, one with the P2 probes and the other with the P3 probes. Using the P3 probes, the sensitivity to the complementary HLA-B*57:01 was 4.6 times higher than that for the highly similar HLA-B*58:01 (Fig. 3b).

By following this protocol of using two PNA probes, a total of 21 blind purified PCR gene samples (SP1-SP21) from human white blood cells were analyzed. Samples were sequentially diluted from the initial concentration to be approximately 10^{-10} M. This was done to eliminate any interferences from the PCR matrix as well as to adjust the concentration of the sample to be within the linear range

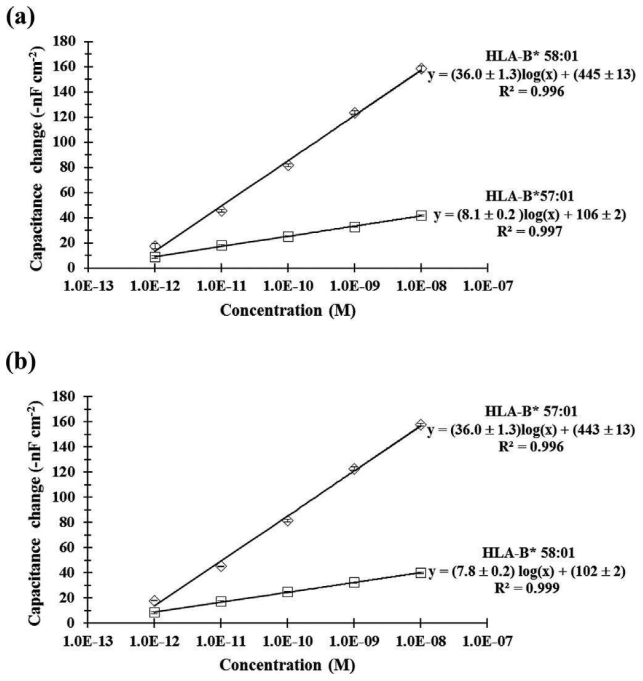


Fig. 3. Calibration plots of purified HLA-B*58:01 and HLA-B*57:01 using modified electrodes with (a) P2 probe (for HLA-B*58:01) and (b) P3 probe (for HLA-B*57:01) with 0.25 M acetamide in phosphate buffer (n = 3).

Table 2
The results of the blind purified PCR gene samples obtained from the white blood cell using a direct capacitive system (this work, n = 3) and the Sanger sequencing technique.

Sample	Concentration (M)	Capacitive DNA biosensor			Sanger sequencing
		Capacitance change (–nF cm^{-2})		Gene	
		Probe P2	Probe P3		Gene
SP1	2.3×10^{-10}	34 ± 1	105 ± 2	5701	5701
SP2	2.2×10^{-10}	95 ± 2	23 ± 1	5801	5801
SP3	1.7×10^{-10}	29 ± 1	99 ± 2	5701	5701
SP4	2.3×10^{-10}	99 ± 3	25 ± 1	5801	5801
SP5	1.3×10^{-10}	88 ± 2	23 ± 2	5801	5801
SP6	2.1×10^{-10}	97 ± 3	28.0 ± 0.2	5801	5801
SP7	2.9×10^{-10}	35 ± 1	103 ± 3	5701	5701
SP8	2.1×10^{-10}	98 ± 1	27 ± 2	5801	5801
SP9	3.3×10^{-10}	102 ± 3	25.0 ± 0.2	5801	5801
SP10	4.1×10^{-10}	34 ± 2	112 ± 1	5701	5701
SP11	4.1×10^{-10}	33 ± 1	113 ± 1	5701	5701
SP12	4.3×10^{-10}	103 ± 2	28 ± 1	5801	5801
SP13	4.1×10^{-10}	33 ± 1	111.0 ± 0.3	5701	5701
SP14	4.2×10^{-10}	106 ± 1	27 ± 1	5801	5801
SP15	4.1×10^{-10}	108 ± 4	27 ± 1	5801	5801
SP16	4.1×10^{-10}	34 ± 2	112 ± 1	5701	5701
SP17	4.1×10^{-10}	34 ± 2	110.0 ± 0.2	5701	5701
SP18	1.8×10^{-10}	32 ± 1	100 ± 1	5701	5701
SP19	1.6×10^{-10}	93 ± 1	25 ± 1	5801	5801
SP20	1.7×10^{-10}	31 ± 1	99 ± 1	5701	5701
SP21	1.8×10^{-10}	97 ± 1	28 ± 1	5801	5801

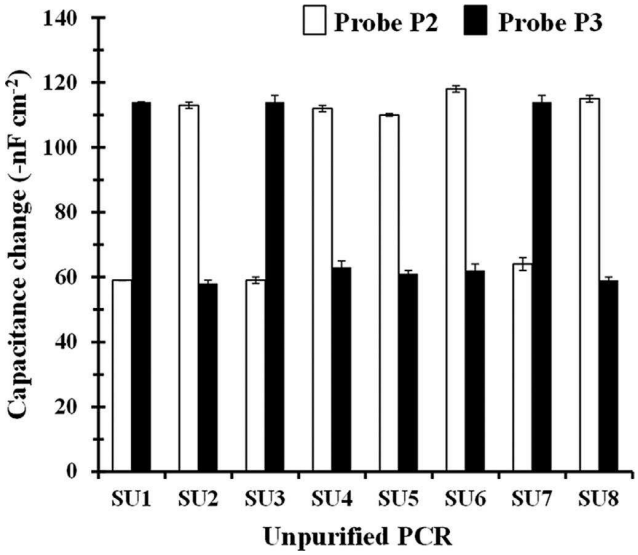


Fig. 4. Capacitance change of the blind unpurified HLA-B*58:01 and HLA-B*57:01 gene samples with 0.25 M acetamide in phosphate buffer (n=3).

of the sensor. The results in Table 2 clearly showed that the responses of each sample based on the two probes differed by at least 3 fold. A higher response from the P2 probe indicated a HLA-B*58:01 gene and vice versa. That is, this method had a distinct ability to distinguish between the HLA-B*58:01 and the HLA-B*57:01 genes.

To verify the results, the blind samples were independently tested by the Sanger sequencing technique (Ward Medic Ltd., PART, Malaysia) using the forward primer (5′-TTT CTA CAC CGC CAT GTC C-3′) and the reverse primer (5′-AAG TCT GCG CGG AGG C-3′). The results of the capacitive system and the Sanger sequencing technique were in complete agreement (Table 2). Therefore, a direct capacitive DNA biosensor can be used to differentiate between the purified PCR products of HLA-B*58:01 and HLA-B*57:01 with a high specificity. In addition, it required a very small sample volume, of only 1–2 μL of the original PCR product for each measurement.

3.4. Analysis of unpurified PCR samples

Although there was an exceptionally good discrimination between the two genes, the experiments above were carried out with purified PCR products. If a similar discrimination could be achieved with an unpurified product much process time and cost could be reduced. Eight unpurified DNA samples (SU1-SU8, unpurified versions of blind samples SP1-SP8: diluted to be approximately 10^{-10} M) were then tested. A good differentiation between the two genes was obtained (Fig. 4). The results provided a high %SS and the type of genes were in complete agreement with the purified samples SP1-SP8 (Supplementary material Table S2). It is clear that the two genes can be easily distinguished without the need for purification of the PCR sample.

4. Conclusions

This research has shown that enhancement of the capacitive signal can be achieved by using the overhanging part of the target DNA. The longer the overhanging part on the electrode surface the better the signal, i.e., more capacitance change. This would be useful for the detection of samples that have a small amount of DNA. Another advantage is that dsDNA targets can be detected by the immobilized PNA probe without an additional denaturation step so the method for detection becomes much simpler. This work also demonstrated the successful use of a direct capacitive system based on two acpcPNA probes that could discriminate between the HLA-B*58:01 and HLA-B*57:01 genes from both purified and unpurified PCR samples. Adding acetamide to the carrier buffer improved the discrimination. This method provided for a rapid screening test, with a high sensitivity and specificity, and required only a small sample volume (1–2 μL from the original PCR product). In addition, the unpurified PCR products can be tested directly, without the need for a denaturing step.

Acknowledgements

The authors are grateful to Grants from the Thailand Research Fund (TRF, DPG5780002). The Office of the Higher Education Commission (CHE-SSR-Ph.D-THA); the Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), the Office of the Higher Education Commission; the Higher Education Research Promotion and National Research University Project of Thailand, Office of the Higher Education Commission; the Trace Analysis and Biosensor Research Center (TAB-RC), and Graduate School, Prince of Songkla University, Hat Yai, Thailand are all gratefully acknowledged. NH would like to acknowledge the Grant for International Research Integration, Chula Research Scholar, Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund. The authors thank Dr. Brian Hodgson, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, Thailand for assistance with English.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2016.03.065.

References

Armitage, B.A., 2003. Drug Discov. Today 8 (5), 222–228.
Berggren, C., Bjarnason, B., Johansson, G., 2001. Electroanalysis 13, 173–180.
Booth, M.A., Harbison, S., Travas-Sejdic, J., 2011. Biosens. Bioelectron. 28, 362–367.
Buck, R.P., Lindner, E., 1994. Pure Appl. Chem. 66, 2527–2536.
Corrigan, D.K., Schulze, H., McDermott, R.A., Schmüser, I., Henihan, G., Henry, J.B., Bachmann, T.T., Mount, A.R., 2014. J. Electroanal. Chem. 732, 25–29.
Covington, A.K., Dickinson, T., 1973. Introduction and solvent properties. In: Covington, A.K., Dickinson, T. (Eds.), Physical Chemistry of Organic Solvent Systems. Springer, US, pp. 1–22.
Gebbert, A., Alvarez-Icaza, M., Stoecklein, W., Schmid, R.D., 1992. Anal. Chem. 64, 997–1003.
Hein, J., Böttcher, K., Grundmann, R., Kirchner, H., Bein, G., 1995. Tissue Antigens 45, 27–35.
Lao, A.I.K., Su, X., Aung, K.M.M., 2009. Biosens. Bioelectron. 24, 1717–1722.
Manzanares-Palenzuela, C.L., Martín-Fernández, B., Sánchez-Paniagua López, M., López-Ruiz, B., 2015. TrAC – Trends Anal. Chem. 66, 19–31.
Martin, A.M., Nolan, D., Mallal, S., 2005. Tissue Antigens 65, 571–574.
Mukhopadhyay, R., Lorentzen, M., Kjems, J., Besenbacher, F., 2005. Langmuir 21, 8400–8408.
O'Connor, L., Glynn, B., 2010. Expert Rev. Med. Devices 7, 529–539.
Odenthal, K.J., Gooding, J.J., 2007. Analyst 132, 603–610.
Paniel, N., Baudart, J., Hayat, A., Barthelmebs, L., 2013. Methods 64, 229–240.
Riedel, M., Kartchemnik, J., Schöning, M.J., Lisdat, F., 2014. Anal. Chem. 86, 7867–7874.
Robinson, J., Halliwell, J.A., Hayhurst, J.D., Flicek, P., Parham, P., Marsh, Steven, G.E., 2015. Nucleic Acids Res. 43, D423–D431.
Sankoh, S., Samanman, S., Thipmanee, O., Numnuam, A., Limbut, W., Kanatharana, P., Vilaivan, T., Thavarungkul, P., 2013. Sens. Actuators B – Chem. 177, 543–554.
Shamsi, M.H., Kraatz, H.-B., 2011. Analyst 136, 3107–3112.
Thipmanee, O., Samanman, S., Sankoh, S., Numnuam, A., Limbut, W., Kanatharana, P., Vilaivan, T., Thavarungkul, P., 2012. Biosens. Bioelectron. 38, 430–435.
Vilaivan, T., 2015. Acc. Chem. Res. 48, 1645–1656.
Vilaivan, T., Srisuwannaket, C., 2006. Org. Lett. 8, 1897–1900.
Wang, G., Xu, X.S., 2004. Cell Res. 14, 111–116.
Yun, J., Adam, J., Yerly, D., Pichler, W.J., 2012. Allergy 67, 1338–1346.



Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition

ISSN: 0920-5063 (Print) 1568-5624 (Online) Journal homepage: http://www.tandfonline.com/loi/tbsp20

Recyclable magnetite nanoparticle coated with cationic polymers for adsorption of DNA

B. Rutnakornpituk, T. Theppaleak, M. Rutnakornpituk & T. Vilaivan

To cite this article: B. Rutnakornpituk, T. Theppaleak, M. Rutnakornpituk & T. Vilaivan (2016) Recyclable magnetite nanoparticle coated with cationic polymers for adsorption of DNA, Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 27:11, 1200-1210, DOI: 10.1080/09205063.2016.1189378

To link to this article: http://dx.doi.org/10.1080/09205063.2016.1189378

View supplementary material

Accepted author version posted online: 20 May 2016.
Published online: 02 Jun 2016.

Submit your article to this journal

Article views: 14

View related articles

View Crossmark data

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=tbsp20

Download by: [Aston University] **Date:** 19 June 2016, At: 23:50

JOURNAL OF BIOMATERIALS SCIENCE, POLYMER EDITION, 2016
VOL. 27, NO. 11, 1200–1210
http://dx.doi.org/10.1080/09205063.2016.1189378

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

Recyclable magnetite nanoparticle coated with cationic polymers for adsorption of DNA

B. Rutnakornpituk[a,b], T. Theppaleak[a], M. Rutnakornpituk[a,b] and T. Vilaivan[c]

[a]Faculty of Science, Department of Chemistry and Center of Excellence in Biomaterials, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand; [b]Faculty of Science, The Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand; [c]Organic Synthesis Research Unit, Faculty of Science, Department of Chemistry, Chulalongkorn University, Bangkok Thailand

ABSTRACT

Magnetite nanoparticle (MNP) grafted with a cationic copolymer between poly(2-(*N*,*N*-diethylamino) ethyl methacrylate) and poly(poly(ethylene glycol) methyl ether methacrylate)) for efficient and recyclable adsorption of 5′-fluorescein-tagged DNA (FAM-dT_9) was prepared. MNP having highest degree of positive charge (+32.1 ± 1.9 mV) retained 100% adsorption of FAM-dT_9 during eight adsorption–separation–desorption cycles. The MNP having lower degree of positive charge showed a slight decrease in adsorption percentages (94–98% adsorption) after multiple recycling processes. This biocompatible hybrid material with charged surface and magnetic-responsive properties might be applicable for use as a nanosolid support for efficient and facile separation of various bioentities.

ARTICLE HISTORY
Received 3 February 2016
Accepted 10 May 2016

KEYWORDS
Magnetite; nanoparticle; ionic adsorption; recyclable; DNA

Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition 2016.27:1200-1210.

1. Introduction

During the last decade, surface modification of magnetite nanoparticle (MNP) has become a rapidly developed strategy for a wide range of applications, especially in biomedical areas such as site-specific drug transfer system,[1] diagnostics,[2] hyperthermia treatment of tumors,[3] and contrast enhancement agents in magnetic resonance imaging.[4] Because of the large surface area-to-volume ratio of MNP, it tends to form macroscopic aggregation due to attractive forces, e.g. dipole–dipole interaction and magnetic force. In an attempt to prevent them from proximity to each other, steric and/or electrostatic stabilization mechanisms were usually employed by coating the particles surface with long-chain polymers and/or charged molecules. In addition, the grafted polymers on the MNP surface can also serve as a platform for designing and tailoring to have specific interactions with various bioentities such as protein,[5] amino acid [6], and DNA.[7]

Recently, two efficient approaches for surface modification of MNP, 'grafting to' and 'grafting from' strategies, have been developed. The 'grafting to' approach involves the anchoring of the pre-synthesized polymers having suitable functional groups to the particle surface,

CONTACT B. Rutnakornpituk boonjirab@nu.ac.th
Supplemental data for this article can be accessed http://dx.doi.org/10.1080/09205063.2016.1189378.

© 2016 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition 2016.27:1200-1210.

while the 'grafting from' approach involves the polymerization initiated directly from its surface.[8–10] The latter approach seemed to be an effective synthetic strategy to functionalize MNP surface with high polymer density. The grafted polymer composition and structure on the MNP surface were well controllable particularly when the controlled radical polymerization techniques, such as reversible addition fragmentation chain transfer [11] and atom transfer radical polymerization (ATRP) were employed.[12–14]

In particular, surface modification of MNP with stimuli-responsive polymers has gained much attention because it can produce 'smart' hybrid materials that can sense environmental changes, e.g. temperature, pH, and ionic strength. These materials possessed both magnetically guidable properties of MNP and stimuli-responsive properties of the polymers. These multifunctional materials have been reported for use in many biomedical fields, such as controlled release and immobilization of bioentities. pH-responsive polymers such as poly (2-(N,N-diethylamino) ethyl methacrylate) (PDEAEMA) and/or its derivatives,[15–17] chitosan [18], and poly(ethylenimine), have been grafter from or grafted to the MNP surface. [19,20] These charged polymers-grafted MNP can electrostatically adsorb to charged bioentities such as phosphate groups of DNA [21–23] and amino groups of protein or peptide to applied as hydrophobic affinity for conveniently, efficiently, and quickly concentrating low-concentration peptides.[24,25] Hao and co-workers have reported the use of a magnetic-responsive polycationic poly(2-(dimethylamino) ethyl methacrylate) in the applications for gene vector.[26] In addition, other bio-applications of polycation-grafted MNP such as gene delivery,[27] cell separation [28], and biosensor,[29] have also been reported.

Adsorption of bioentities on MNP surface could be advantageous for practical applications because magnetic MNP can facilitate the separation process with an assistance of an external magnet. In addition, the adsorption percentages of the nanoparticle should be greatly enhanced due to its high surface area-to-volume ratio. Taking advantages of the facile magnetic separation, poly(quaternary ammonium)-coated MNP was synthesized and repeatedly used for an antibacterial purpose.[30] The MNP retained 100% biocidal efficiency against *Escherichia coli* at least eight exposure/collect/recycle procedures without washing with any solvents or water. Recyclable MNP for other applications such as protein separation [31,32] has been reported. Mesoporous silica nanoparticle comprising of magnetite inner core and mesoporous silica shell was reported for use for DNA adsorption/desorption.[33] The use of recyclable cationic MNP for DNA adsorption was previously reported from our group.[34] However, the effect of degree of positive charges of the grafted polymer on the efficiency in DNA adsorption and recycling has never been investigated.

Therefore, the novelty of the current work is that we herein demonstrated the use of MNP grafted with the polymer having various degrees of positive charge for efficient and recyclable adsorption of DNA. The positively charged polymer-grafted MNP was prepared via a surface-initiated ATRP copolymerization of diethylamino ethyl methacrylate (DEAEMA) and/or poly(ethylene glycol) methyl ether methacrylate (PEGMA) in an attempt to tune the degree of positive charge on the MNP surface after quaternization. Effect of the degree of positive charge on the MNP surface on adsorption percentages of a model DNA (T_9) tagged with fluorescein at 5'-position (FAM-dT_9) was investigated. Adsorption percentages of FAM-dT_9 on the MNP were determined by fluorescence spectroscopy and the recycling efficiency of the copolymer-grafted MNP in the adsorption of FAM-dT_9 was also discussed (Figure 1).

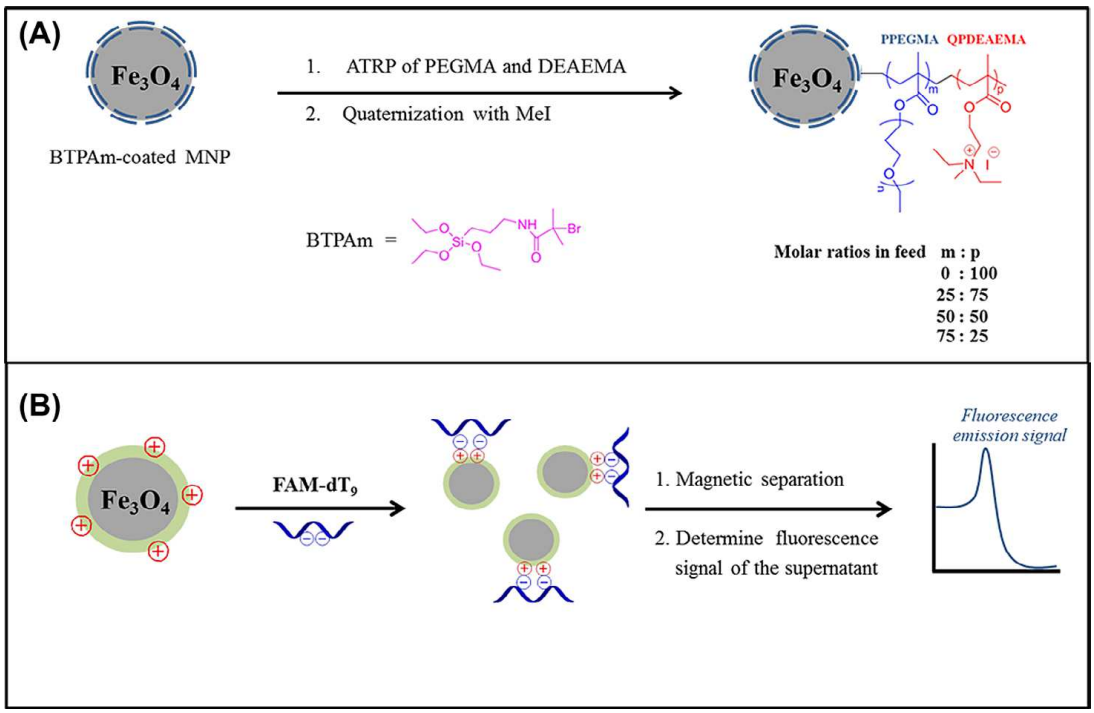


Figure 1. (A) Synthesis of positively charged polymer-grafted MNP and (B) the concept and detection of DNA adsorption on the particle surface. (Please see the online article for the color version of this figure: http://dx.doi.org/10.1080/09205063.2016.1189378.)

2. Experimental

2.1. Materials

DEAEMA (99%, Acros) and PEGMA ($\overline{M_n}$ ~ 300 g/mol) were passed through a basic alumina column and stored at 4 °C until used. Triethylamine (97%, Carlo Erba) and toluene were purified by distillation over CaH_2. Iron (III) acetylacetonate (99%, Acros), 3-aminopropyl triethoxysilane (APS, 99%, Acros), 2-bromoisobutyryl bromide (BIBB, 98%, Acros), *N*,*N*,*N*',*N*',*N*'-pentamethyl diethylenetriamine (PMDETA, 99%, Aldrich) and CuBr (98%, Acros) were used as received, DNA T_9 tagged with fluorescein at 5'-position (FAM-dT_9) were purchased from BioDesign (Thailand) and used as received, TE buffer was prepared by the mixing of tris(hydroxymethyl) aminomethane pH 7.5 (99%, Labscan) and diaminoethane tetraacetic acid pH 8 (99%, Carlo Erba) in water, $CaCl_2{\cdot}2H_2O$ (99.5%, Merck), NaCl (99.5%, Labscan) and other organic solvents were used as received.

2.2. Synthesis of positively charged poly(PEGMA-co-DEAEMA)-grafted MNP

The details of the synthesis of the cationic copolymer-grafted MNP have been described in our previously reported paper.[35] Briefly, oleic acid-coated MNP was first synthesized by the thermal decomposition of $Fe(acac)_3$ (5 g) in benzyl alcohol (90 ml) at 175 °C for 48 h under N_2 gas. After washing the resultant mixture with ethanol and CH_2Cl_2, oleic acid (4 ml) was then added to the MNP-toluene dispersion, followed by sonication for 3 h under N_2 to obtain oleic acid-coated MNP. BTPAm, an ATRP initiator and synthesized according to the previously reported procedure,[36] was then immobilized onto the oleic acid-coated MNP through the combination of a ligand exchange reaction and silanization.

Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition 2016.27:1200-1210.

Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition 2016.27:1200-1210.

To prepare the copolymers via a surface-initiated ATRP from the BTPAm-coated MNP, the reaction having 50:50:1:1 molar ratio of PEGMA:DEAEMA:CuBr:PMDETA, respectively, is herein explained in details as an example. Other reactions were performed in a similar manner with an appropriate PEGMA-to-DEAEMA molar ratio. PEGMA (2.4 ml, 8.4 mmol), DEAEMA (1.7 ml, 8.4 mmol), CuBr (0.024 g, 0.17 mmol) and BTPAm-coated MNP (0.1 g, 8.89 μmol Br) were dissolved in toluene (2.4 ml) in a Schenk tube. After applying three fr eeze-pump-thaw cycles to the mixture, PMDETA (0.035 ml, 0.17 mmol) was added to the mixture and the ATRP was performed at 50 °C for 3 h to obtain about 50% monomer conversion. After centrifugation, the MNP was thoroughly washed with ethanol and dried *in vacuo*. To quaternize the copolymer-grafted MNP, methyl iodide (5 ml) was added dropwise to the MNP (0.1 g) suspended in THF (tetrahydrofuran) (5 ml). After sonication for 3 h in dark, the MNP was separated by an external magnet and washed with THF. The particles were dried *in vacuo* to give a fine black powder of quaternized poly(PEGMA-co-DEAEMA)-grafted MNP.

2.3. Determination of FAM-dT_9 adsorption percentages on the positively charged copolymer-grafted MNP

After sonication of MNP dispersion (1.5 mg in 2 ml of TE buffer) for 30 min, 100 μl of the dispersion was then mixed with 3 μl of 10 μM FAM-dT_9 solution (30 pmol of FAM-dT_9 used) by stirring. After applying a permanent magnet, the adsorption percentages of the copolymer-grafted MNP to FAM-dT_9 were determined from the fluorescence signal intensity of the non-adsorbed FAM-dT_9 remaining in the supernatant. The fluorescence emission signal at λ_{max}=520 nm was used to determine the absorption percentages of FAM-dT_9 on the MNP according to Equation (1),

$$\text{Adsorption percentage} = \left[(A - B)/A\right] \times 100 \tag{1}$$

where A is the initial concentration of FAM-dT_9 before adsorption and B is the concentration of FAM-dT_9 in the supernatant after adsorption.

2.4. Determination of the recycling efficiency of the copolymer-grafted MNP in adsorption of FAM-dT_9

To recycle the copolymer-grafted MNP for adsorption of FAM-dT_9, the precipitated MNP was thoroughly washed with 3 × 100 μl of an optimal salt solution (NaCl or $CaCl_2$) to wash off the FAM-dT_9 adsorbed on the MNP surface. The fluorescence emission signal at λ_{max} = 520 nm was used to investigate of the salt solutions after washing the FAM-dT_9 adsorbed on the MNP. After complete desorption of FAM-dT_9 from the MNP, 100 μl of dispersion particles were then suspended in 3 μl of fresh 10 μM FAM-dT_9 solutions (30 pmol of FAM-dT_9 used) with stirring. After precipitation of the MNP, the FAM-dT_9 in the supernatant (non-adsorbed portion) was again quantified by fluorescence spectroscopy. The fluorescence emission signal at λ_{max} = 520 nm was used to determine desorption percentages of FAM-dT_9 from the MNP according to Equation (2),

$$\text{Desorption percentage} = \left[(C)/D\right] \times 100 \tag{2}$$

where C is the concentration of FAM-dT_9 in the supernatant after washing process and D is the concentration of FAM-dT_9 adsorbed of the MNP. The adsorption–separation–desorption process was performed repeatedly to evaluate the recycling efficiency of the copolymer-grafted MNP in adsorption with FAM-dT_9 using Equation (3),

$$\text{Recycling efficiency}\,(\%) = \left[(E)/F\right] \times 100 \tag{3}$$

where E is the adsorption percentage of the MNP after recycling and F is the adsorption percentage of the MNP at initial.

2.5. Characterization

Zeta potential of the particles was measured by photocorrelation spectroscopy using NanoZS4700 nanoseries Malvern instrument. The sample dispersions were sonicated for 30 min before the measurement at 25 °C without filtration. The DNA-binding capability of the MNP was determined by fluorescence spectrometer on a Perkin-Elmer instrument model LS 55 using a DNA T_9 tagged with fluorescein at the 5'-position (FAM-dT_9) with $\lambda_{excited}/\lambda_{emission}$ = 495/520 nm.

3. Results and discussion

This work presents the use of the magnetically guidable and recyclable MNP having positively charged surface for recyclable adsorption of DNA. The degree of positive charge on the MNP surface can be fine-tuned by systematically varying molar ratio of PEGMA to DEAEMA on the particle surface. The preparation and characterization of the polymer-grafted MNP has been previously reported from our group;[35] the main objective of the current work is to demonstrate the applications of such particles for DNA adsorption and recovery. The effect of degree of positive charge of the particles on its recycling efficiency in adsorption of DNA was investigated using FAM-dT_9 as a representative negatively charged bioentity because it can be quantitatively determined via fluorescence spectroscopy.

To investigate the composition of the copolymer-grafted MNPs, the relative amount of the copolymer that can be grafted on the particle surface was investigated via TGA (thermogravimetric analysis). Using the hypothesis that char yield was the weight of magnetite core remaining at 600 °C, the weight loss of the samples was the decomposed organic components including BTPAm and the copolymers that grafted to the particle surface. From the TGA results shown in the supporting information (Figure 1S), BTPAm content in BTPAm-coated MNP was about 10% and those of the copolymers in each sample were not significantly different from each other (ranging between 10% and 17%).

To validate the concept of adsorption of FAM-dT_9 on the MNP, FAM-dT_9 was loaded in the MNP dispersed in buffer solutions (Figure 2) and the adsorption percentages at equilibrium of FAM-dT_9 to the particle was then determined. After the magnetic separation of the FAM-dT_9-adsorbed MNP, the fluorescence emission signals of the supernatant were determined at 5-min interval and compared to a calibration curve (Figure 2S in the supporting information). The decrease in the fluorescence signal reflected the FAM-dT_9 adsorbed on the MNP surface and this can be calculated according to Equation (1).

Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition 2016.27:1200-1210.

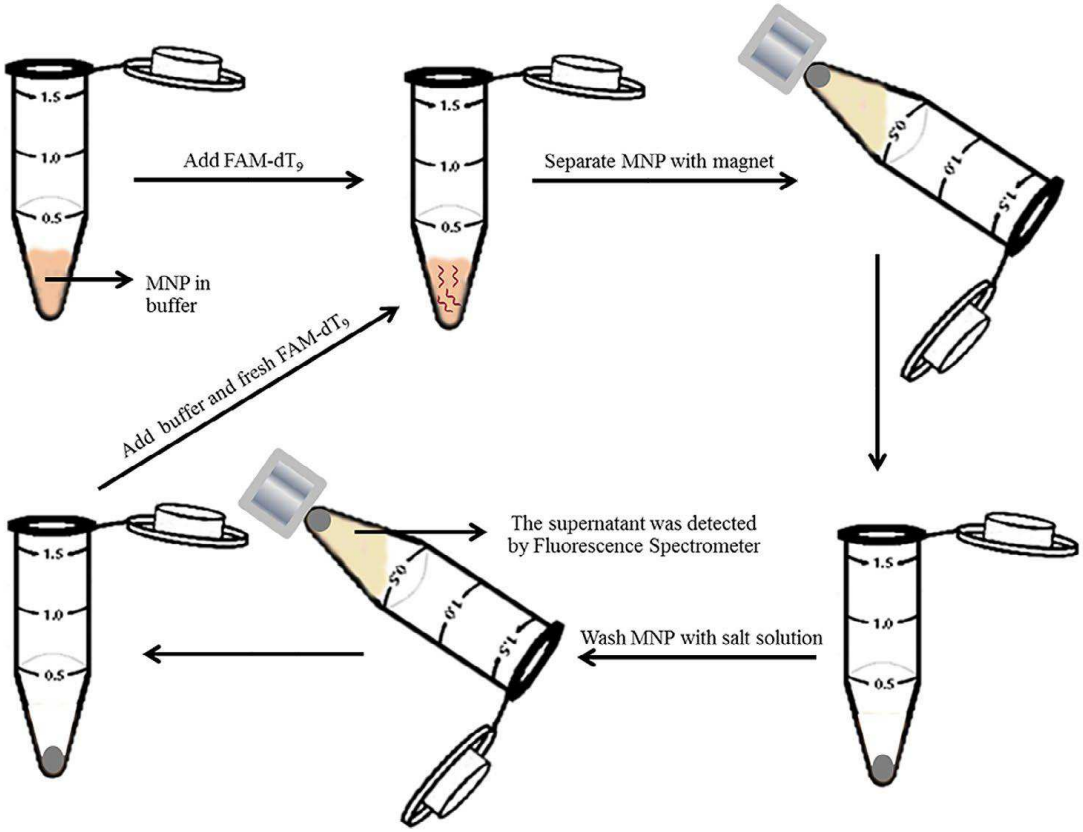


Figure 2. A schematic illustration of the adsorption–separation–desorption cycles of the recyclable PDEAEMA-grafted MNP in adsorption of FAM-dT_9. (Please see the online article for the color version of this figure: http://dx.doi.org/10.1080/09205063.2016.1189378.)

Figure 3 shows the adsorption percentages of FAM-dT_9 on the particles having different molar ratios of PEGMA to DEAEMA on their surface. In all cases, the adsorption percentages of FAM-dT_9 rapidly increased during the first 5 min and then reached their equilibrium within 60 min. The adsorption percentages at equilibrium consistently increased with increasing DEAEMA moiety in the copolymers. The results are in good agreement with the increase in zeta potential values of the MNP with increasing DEAEMA moiety in the copolymer (Figure 4). It was hypothesized that the negatively charged FAM-dT_9 can bind to the positively charged MNP via ionic interaction; the high degree of positive charge of the MNP resulted in high FAM-dT_9 adsorption percentages to its surface (Figure 4).

To prove the recycling concept of the particles, an appropriate washing solution for desorption of the FAM-dT_9 from the MNP surface was then investigated. After 60-min adsorption, the particles were removed from the dispersions with the assistance of a permanent magnet. The solutions of $CaCl_2$ or NaCl at 0.1, 0.5, 1.0, and 2.5 M were used for desorption of FAM-dT_9 from the MNP by washing. The fluorescence emission signals of the salt solutions after washing FAM-dT_9 adsorbed on the MNP were investigated and their desorption percentages were calculated (Figure 3S in the supporting information). Figure 5(A) illustrates the percentage of FAM-dT_9 desorption of washed solutions in the case of 0:100 PEGMA:DEAEMA copolymer-grafted MNP. It was apparent that 2.5 M $CaCl_2$ salt solutions showed the most promising washing solution for removal of the adsorbed FAM-dT_9 from the MNP surface (95.00% FAM-dT_9 desorbed). The time course of FAM-dT_9 desorption

Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition 2016.27:1200-1210.

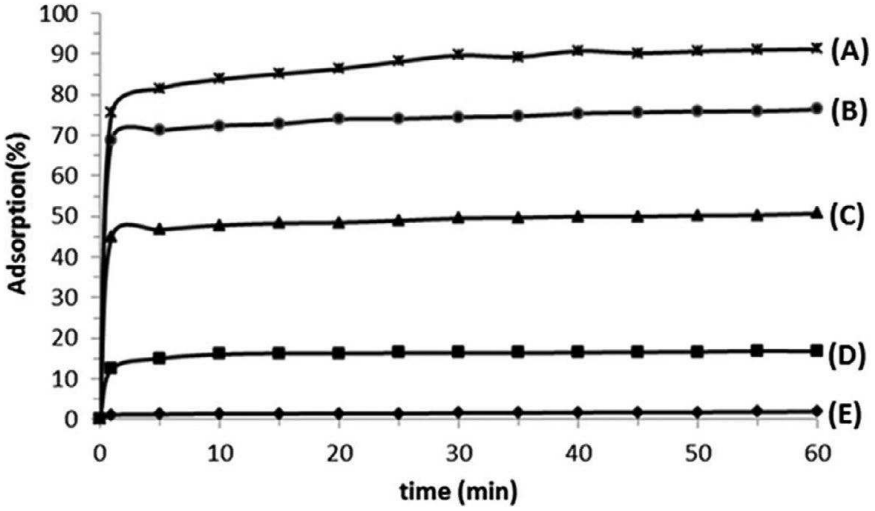


Figure 3. Adsorption percentages of DNA to the copolymer-grafted MNP, where PEGMA:DEAEMA molar ratios are (A) 0:100, (B) 25:75, (C) 50:50, (D) 75:25, and (E) 100:0, respectively. The concentrations of FAM-dT_9 DNA used in these experiments were equivalent (0.3 μM of FAM-dT_9 used).

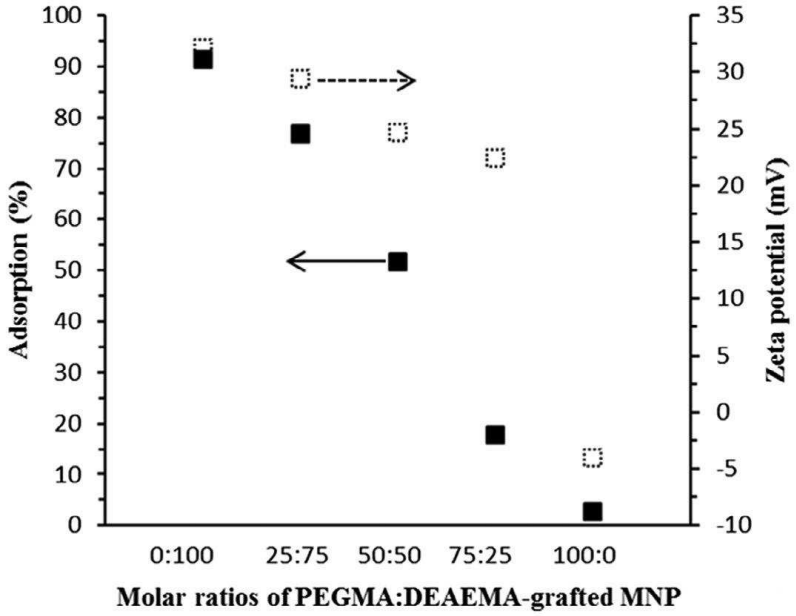


Figure 4. Zeta potential (□) and DNA adsorption percentage (■) of the copolymer-grafted MNP having various molar ratios of PEGMA to DEAEMA after 60-min adsorption.

from the MNP surface after washing with 2.5 M $CaCl_2$ solution was about 25–30 min (Figure 5(B)). Emission fluorescence signals of the desorption kinetics are provided in the supporting information (Figure 4S). The washing process was repeated until the fluorescence signals of the washed solutions were no longer observed (Figure 5S in supporting information). In the MNP grafted with other copolymers, similar washing process of the particles using 2.5 M $CaCl_2$ solution was applied.

Because these particles possess magnetically guidable properties, which thus facilitate the recycling process, the investigation of the recycling efficiency of the copolymer-grafted

Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition 2016.27:1200-1210.

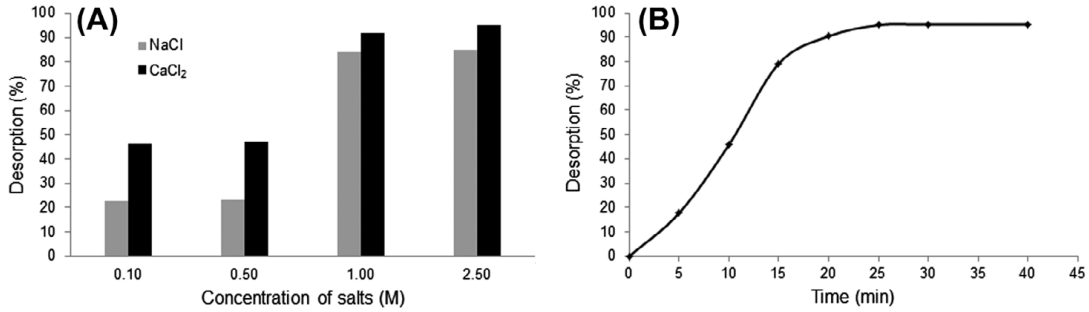


Figure 5. (A) Desorption percentages of FAM-dT_9 after washing the FAM-dT_9 adsorbed on the copolymer-grafted MNP with various NaCl and $CaCl_2$ concentrations and (B) the time course of FAM-dT_9 desorption from the MNP surface after washing with 2.5 M $CaCl_2$ solution. The MNP having 0:100 molar ratio of PEGMA:DEAEMA was used in this experiment. The concentration of FAM-dT_9 in this experiment was 0.3 μM.

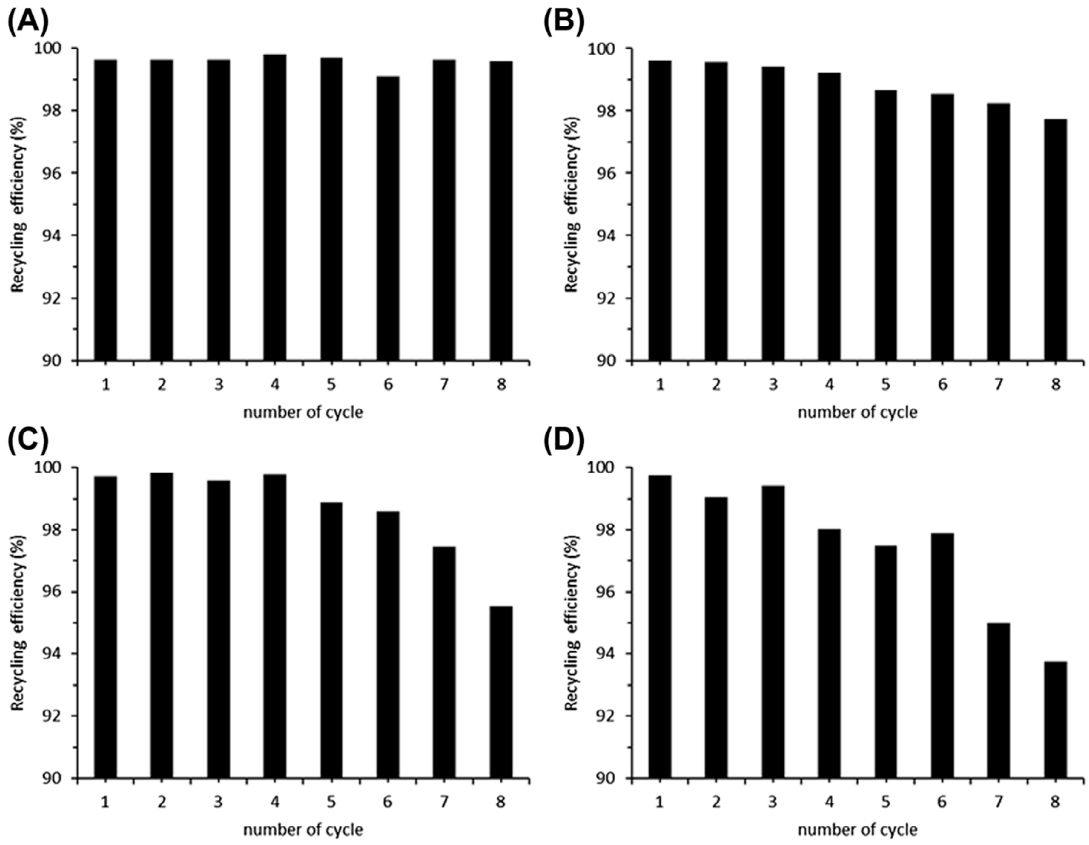


Figure 6. The recycling efficiency of the copolymer-grafted MNP in adsorption with FAM-dT_9, where PEGMA:DEAEMA molar ratios are (A) 0:100, (B) 25:75, (C) 50:50, and (D) 75:25, respectively.

MNP was of our interest. This concept is greatly beneficial to magnetic separation applications, especially in biomedical fields, in which the MNP for the biomolecule separation is usually costly. The MNP having consistent adsorption percentages after multiple recycling processes is greatly desirable.

Figure 6 illustrates FAM-dT_9 adsorption percentages of the MNP grafted with the copolymers having PEGMA:DEAEMA molar ratio of 0:100, 25:75, 50:50, and 75:25, respectively. The MNP grafted with 100:0 PEGMA:DEAEMA molar ratio was not used in this experiment because, according to Figure 4, the amounts of FAM-dT_9 adsorbed by the particle

Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition 2016.27:1200-1210.

was insignificant (2% adsorption) which is consistent with its negatively charged surface. After the adsorption–separation process, the fluorescence signals of the washed solutions (2.5 M $CaCl_2$ solution) from each cycle were then determined. The decrease in the signal corresponded to the FAM-dT_9 adsorbed on the MNP surface; the percent adsorption can be determined using Equation (1). In Figure 6, the recycling efficiency of the MNP in adsorption with FAM-dT_9 was calculated according to Equation (3). The increase in the fluorescence intensity of the supernatants corresponded to the depletion of these values after multiple adsorption–separation–desorption cycles (Figure 6S in the supporting information). In the case of the MNP grafted with PEGMA:DEAEMA copolymer (0:100 molar ratio), the recycling efficiency retained at 100% after 8-recycling process. The MNP having other copolymer ratios showed a slight decrease in the recycling efficiency (94–98%) after eight-recycling process. The recycling efficiency after multiple cycles seemed to correspond to the degree of positive charge on the MNP; the recycling efficiency decreased from 100 to 94% when the degree of positive charge decreased from 32 to 22 mV (Figures 4 and 6).

4. Conclusions

The recyclable MNP grafted with cationic copolymers having various degrees of positive charge for adsorption of DNA was prepared. The copolymer-grafted MNP was first synthesized via a surface-initiated ATRP copolymerization of DEAEMA and PEGMA with various loading ratios of each monomer to obtain different degrees of positive charges on its surface. Adsorption/desorption percentages and recycling efficiency of the cationic MNP using FAM-dT_9 as a model compound was investigated by fluorescence spectroscopy. The adsorption percentages of FAM-dT_9 on the particle surface highly depended on the degree of positive charge; increasing degree of positive charge of the particles seemed to enhance the DNA adsorption percentages. Likewise, in the recycling efficiency study, the particles grafted with poly(DEAEMA) homopolymer (the highest degree of positive charge in the series) retained their good adsorption percentages (100% DNA adsorbed) even after eight-recycling process, while the recycling efficiency seemed to be decreased after eight-recycling process (94–98%) when degree of positive charge decreased. This hybrid material with positively charged surface and magnetic properties might be applicable for use as a nanosolid support for efficient and facile separation/pre-concentration of various bioentities.

Acknowledgment

The Thailand Research Fund (TRG5780124)(DPG5780002). The Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), Commission on Higher Education, Ministry of Education are gratefully acknowledged for financial support

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

This work was supported by the Royal Golden Jubilee for the scholarship [grant number PHD/0325/2550]; Thailand Research Fund [grant number TRG5780124], [grant number DPG5780002]

Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition 2016.27:1200-1210.

References

[1] Verma NK, Crosbie-Staunton K, Satti A, et al. Magnetic core-shell nanoparticles for drug delivery by nebulization. J. Nanobiotechnol. 2013;11:1–12.
[2] Hergt R, Hiergeist R, Zeisberger M, et al. Magnetic properties of bacterial magnetosomes as potential diagnostic and therapeutic tools. J. Magn. Magn. Mater. 2005;293:80–86.
[3] Akbarzadeh A, Samiei M, Joo SW, et al. Synthesis, characterization and in vitro studies of doxorubicin-loaded magnetic nanoparticles grafted to smart copolymers on A549 lung cancer cell line. J. Nanobiotechnol. 2012;10:46–58.
[4] Hoskins C, Min Y, Gueorguieva M, et al. Hybrid gold-iron oxide nanoparticles as a multifunctional platform for biomedical application. J. Nanobiotechnol. 2012;10:27–38.
[5] Arakaki A, Masuda F, Amemiya Y, et al. Control of the morphology and size of magnetite particles with peptides mimicking the Mms6 protein from magnetotactic bacteria. J. Colloid Interface Sci. 2010;343:65–70.
[6] Lee HJ, Jang KS, Jang S, et al. Poly(amino acid)s micelle-mediated assembly of magnetite nanoparticles for ultra-sensitive long-term MR imaging of tumors. Chem. Commun. 2010;46:3559–3561.
[7] Chiang CL, Sung CS, Chen CY. Application of silica–magnetite nanocomposites to the isolation of ultrapure plasmid DNA from bacterial cells. J. Magn. Magn. Mater. 2006;305:483–490.
[8] Mu B, Wang T, Wu Z, et al. Fabrication of functional block copolymer grafted superparamagnetic nanoparticles for targeted and controlled drug delivery. Colloids Surf., A. 2011;375:163–168.
[9] Cheng G, Böker A, Zhang M, et al. Amphiphilic cylindrical core−shell brushes via a 'grafting from' process using ATRP. Macromolecules. 2001;34:6883–6888.
[10] Garcia I, Zafeiropoulos NE, Janke A, et al. Functionalization of iron oxide magnetic nanoparticles with poly(methyl methacrylate) brushes via grafting-from atom transfer radical polymerization. J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem. 2007;45:925–932.
[11] Saoud FM, Tonge MP, Weber WG, et al. Magnetite nanoparticles for the preparation of ultrapure RAFT polymers. Macromolecules. 2008;41:1598–1600.
[12] Braunecker WA, Matyjaszewski K. Controlled/living radical polymerization: features, developments, and perspectives. Prog. Polym. Sci. 2007;32:93–146.
[13] Matyjaszewski K, Xia J. Atom transfer radical polymerization. Chem. Rev. 2001;101:2921–2990.
[14] Sun Y, Ding X, Zheng Z, et al. Surface-initiated ATRP in the synthesis of iron oxide/polystyrene core/shell nanoparticles. Eur. Polymer J. 2007;43:762–772.
[15] Zhou L, Yuan J, Yuan W, et al. Synthesis, characterization, and controllable drug release of pH-sensitive hybrid magnetic nanoparticles. J. Magn. Magn. Mater. 2009;321:2799–2804.
[16] Papaphilippou P, Christodoulou M, Marinica OM, et al. Multiresponsive polymer conetworks capable of responding to changes in pH, temperature, and magnetic field: synthesis, characterization, and evaluation of their ability for controlled uptake and release of solutes. ACS Appl. Mater. Interfaces. 2012;4:2139–2147.
[17] Yuan L, Tang Q, Yang D, et al. Preparation of pH-responsive mesoporous silica nanoparticles and their application in controlled drug delivery. J. Phys. Chem. B. 2011;115:9926–9932.
[18] Salehizadeh H, Hekmatian E, Sadeghi M, et al. Synthesis and characterization of core-shell Fe_3O_4-gold-chitosan nanostructure. J. Nanobiotechnol. 2012;10:3–9.
[19] Wang X, Zhou L, Ma Y, et al. Control of aggregate size of polyethyleneimine-coated magnetic nanoparticles for magnetofection. Nano Res. 2009;2:365–372.
[20] Goon IY, Lai LMH, Lim M, et al. Fabrication and dispersion of gold-shell-protected magnetite nanoparticles: systematic control using polyethyleneimine. Chem. Mater. 2009;21:673–681.
[21] Zhang J, Sun W, Bergman L, et al. Magnetic mesoporous silica nanospheres as DNA/drug carrier. Mater. Lett. 2012;67:379–382.
[22] Lellouche JP, Senthil G, Joseph A, et al. Magnetically responsive carboxylated magnetite-polydipyrrole/polydicarbazole nanocomposites of core–shell morphology. Preparation, characterization, and use in DNA hybridization. J. Am. Chem. Soc. 2012;127:11998–12006.
[23] Sen T, Sebastianelli A, Bruce IJ. Mesoporous silica magnetite nanocomposite: fabrication and applications in magnetic bioseparations. J. Am. Chem. Soc. 2006;128:7130–7131.

Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition 2016.27:1200-1210.

[24] Shinkai M. Functional magnetic particles for medical application. J. Biosci. Bioeng. 2002;94:606–613.
[25] Chen H, Liu S, Li Y, et al. Development of oleic acid-functionalized magnetite nanoparticles as hydrophobic probes for concentrating peptides with MALDI-TOF-MS analysis. Proteomics. 2011;11:890–897.
[26] Hao Y, Zhang M, He J, et al. Magnetic DNA vector constructed from PDMAEMA polycation and PEGylated brush-type polyanion with cross-linkable shell. Langmuir. 2012;28:6448–6460.
[27] Lee K, Bae KH, Lee Y,et al. Pluronic/polyethylenimine shell crosslinked nanocapsules with embedded magnetite nanocrystals for magnetically triggered delivery of siRNA. Macromol Biosci. 2010;10:239–245
[28] Jiang C, Xu S, Zhang S, et al. Chitosan functionalized magnetic particle-assisted detection of genetically modified soybeans based on polymerase chain reaction and capillary electrophoresis. Anal. Biochem. 2012;420:20–25.
[29] Hsing IM, Xu Y, Zhao W. Micro- and nano- magnetic particles for applications in biosensing. Electroanalysis. 2007;19:755–768.
[30] Dong H, Huang J, Koepsel RR, et al. Recyclable antibacterial magnetic nanoparticles grafted with quaternized poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate) brushes. Biomacromolecules. 2011;12:1305–1311.
[31] Liu Z, Li M, Yang X, et al. The use of multifunctional magnetic mesoporous core/shell heteronanostructures in a biomolecule separation system. Biomaterials. 2011;32:4683–4690.
[32] Liao Y, Cheng Y, Li Q. Preparation of nitrilotriacetic acid/Co^{2+}-linked, silica/boron- coated magnetite nanoparticles for purification of 6 × histidine-tagged proteins. J. Chromatogr. A. 2007;1143:65–71.
[33] Li X, Zhang J, Gu H. Adsorption and desorption behaviors of DNA with magnetic mesoporous silica nanoparticles. Langmuir. 2011;27:6099–6106.
[34] Theamdee P, Rutnakornpituk B, Wichai U, et al. Recyclable magnetic nanoparticle grafted with pH-responsive polymer for adsorption with DNA. J. Nanopart. Res. 2014;16:2494–2506.
[35] Theppaleak T, Rutnakornpituk B, Wichai U, et al. Magnetite nanoparticle with positively charged surface for immobilization of peptide nucleic acid and deoxyribonucleic acid. J. Biomed. Nanotechnol. 2013;9:1509–1520.
[36] Rutnakornpituk M, Puangsin N, Theamdee P, et al. Poly(acrylic acid)-grafted magnetic nanoparticle for conjugation with folic acid. Polymer. 2011;52:987–995.

Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition 2016.27:1200-1210.

J Nanopart Res (2016)18:263
DOI 10.1007/s11051-016-3574-z

RESEARCH PAPER

Anionic magnetite nanoparticle conjugated with pyrrolidinyl peptide nucleic acid for DNA base discrimination

Sudarat Khadsai · Boonjira Rutnakornpituk · Tirayut Vilaivan · Maliwan Nakkuntod · Metha Rutnakornpituk

Received: 9 May 2016 / Accepted: 20 August 2016
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2016

Abstract Magnetite nanoparticles (MNPs) were surface modified with anionic poly(*N*-acryloyl glycine) (PNAG) and streptavidin for specific interaction with biotin-conjugated pyrrolidinyl peptide nucleic acid (PNA). Hydrodynamic size (D_h) of PNAG-grafted MNPs varied from 334 to 496 nm depending on the loading ratio of the MNP to NAG in the reaction. UV–visible and fluorescence spectrophotometries were used to confirm the successful immobilization of streptavidin and PNA on the MNPs. About 291 pmol of the PNA/mg MNP was immobilized on the particle surface. The PNA-functionalized MNPs were effectively used as solid supports to differentiate between fully complementary and non-complementary/single-base mismatch DNA using the PNA probe. These novel anionic MNPs can be efficiently applicable for use as a magnetically guidable support for DNA base discrimination.

Keywords Magnetite · Nanoparticle · PNA probe · DNA · Base discrimination

Introduction

Magnetite nanoparticles (MNPs) (Fe_3O_4) modified with polymers have recently shown a great potential in biomedical applications, including magnetic resonance imaging (MRI) enhancement (Mornet et al. 2006; Li et al. 2005; Xu et al. 2012), magnetic hyperthermia (Maity et al. 2010), drug delivery (Sahoo et al. 2013; Wang et al. 2013a, b), magnetic separation and diagnosis of biomolecules such as deoxyribonucleic acid (DNA) and antibodies (Prai-in et al. 2012; Pita et al. 2008; Anirudhan and Rejeena 2013; Cui et al. 2011; Bayrakcl et al. 2013). Apart from that, the use of ultrananocrystalline Fe_3O_4 (UNCFO) as catalyst for comprehensive quantitative analysis of biocrudes was reported (Rojas-Pérez et al. 2015). They have been of particular interest in scientific and technological aspects because of their good magnetic responsiveness and good biocompatibility (Srivastava et al. 2012). However, without nanoparticle stabilization, they tend to aggregate to each other when dispersed in water/organic solvents, resulting in the loss in their nanoscale-related

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11051-016-3574-z) contains supplementary material, which is available to authorized users.

S. Khadsai · B. Rutnakornpituk · M. Rutnakornpituk (✉)
Department of Chemistry and Center of Excellence in Biomaterials, Faculty of Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand
e-mail: methar@nu.ac.th

T. Vilaivan
Department of Chemistry, Organic Synthesis Research Unit, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand

M. Nakkuntod
Department of Biology, Faculty of Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand

Published online: 31 August 2016

properties. Coating MNPs with long-chain polymers is a promising approach to improving their stability because it provides steric stabilization, dispersibility in the media and biocompatibility to the particles. In addition, the polymers grafted on the MNP surface can also serve as a platform for desirable conjugation with various biological functional molecules (Theamdee et al. 2015). Surface grafting of charged polymers is one of the most effective approaches for stabilization of MNPs because they can provide electrostatic repulsion to the particles in addition to the steric repulsion mechanism and can be used for ionic adsorption of other bioentities having opposite charges (Theppaleak et al. 2013a, b).

DNA separation using magnetic particles has attracted much attention in the recent years (Stubinitzky et al. 2014). Particularly for DNA pre-concentration purpose, magnetic particles can be a great advantage because they simplified the purification process by the use of an external magnetic field. The so-called FluMag-Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (FluMag-SELEX) method was previously reported for DNA aptamer selection involved the use of magnetic beads as immobilizing matrix for the target molecules and utilizing a fluorescence label for quantification of the DNA (Stoltenburg et al. 2005; Sun et al. 2014). Amino-functionalized silica-coated MNPs have been demonstrated for use as solid supports for DNA separation process (Park and Chang 2007). In addition, previous works also reported the use of streptavidin-immobilized magnetic particles/beads and biotinylated target DNA for DNA enrichment applications (Stoltenburg et al. 2005; Horák et al. 2011; Erdem et al. 2007; Ashtari et al. 2005; Holmberg et al. 2005; Deng et al. 2003; Liu et al. 2008; Xia and O'Connor 2001).

Recently, much attention has been paid on the use of peptide nucleic acid (PNA) as a probe for enrichment of DNA targets (Ahour et al. 2013; Yaroslavsky and Smolina 2013; Choi et al. 2014; Thipmanee et al. 2012; Ananthanawat et al. 2010; Meebungpraw et al. 2015; Bertucci et al. 2015; Liu et al. 2010). PNA was of great interest in this application because it has strong binding affinity, high specificity toward complementary DNA and high Watson–Crick specificity in recognition of DNA and enables the formation of PNA/DNA or PNA/RNA duplex with excellent thermal stability and unique ionic strength effect (Shi et al. 2015). Moreover, the binding of PNA/DNA strand is stronger than DNA/DNA strand due to the lack of electrostatic repulsion (Vilaivan and Srisuwannaket 2006). However, reports about the utilization of MNP immobilized with PNA as a probe for specific adsorption with DNA target are quite limited (Theppaleak et al. 2013a, b). The concept was to use this MNP to immobilize PNA ("anchoring strand") permanently on the surface and used it to capture its complementary DNA ("working strand") (Stubinitzky et al. 2014; Kerman et al. 2004).

In this research, MNPs were coated with anionic poly(*N*-acryloyl glycine) (PNAG) which functioned as particle stabilizer as well as provided a handle for immobilization of positively charged biological entities. PNAG has attracted our attention in the present work because it shows pH-responsive properties and possesses high degree of negative charges (Deng et al. 2011; Barbucci et al. 1991; Moon et al. 2010). The PNAG-grafted MNPs were further covalently functionalized with streptavidin and then with biotin-conjugated pyrrolidinyl PNA (Vilaivan 2015) via the specific biotin–streptavidin interaction. These pyrrolidinyl PNA-functionalized MNPs were then used to differentiate between fully complementary and non-complementary/single-base mismatch DNA sequences.

In this report, ^{1}H NMR spectroscopy was used to confirm the chemical structures of synthesized NAG monomer. The particle size and its distribution in each step of modification on MNPs were investigated via transmission electron microscopy (TEM). Hydrodynamic size (D_h) and zeta potential values of PNAG-grafted MNPs were measured via photon correlation spectroscopy (PCS). Vibrating sample magnetometer (VSM) was used to study the magnetic properties of MNPs, indicating the presence of the polymers in the surface-modified MNP. The PNA immobilization and DNA base discrimination were detected by UV–visible and fluorescence spectrophotometries, respectively. In addition, gel electrophoresis was used to confirm that the DNA was adsorbed with PNA probe on the MNPs (Fig. 1).

Experimental

Materials

Unless otherwise stated, all reagents were used without further purification: glycine (AR grade),

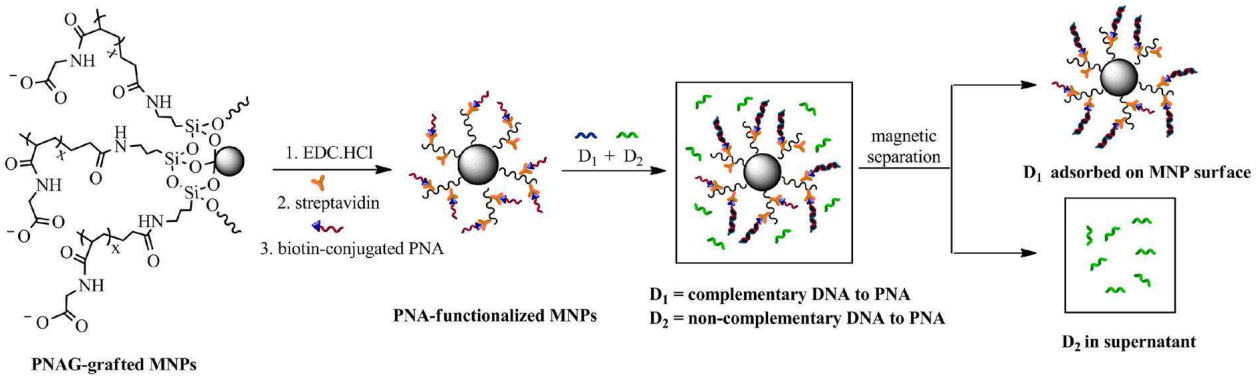


Fig. 1 Overall view of the bioconjugation of PNAG-grafted MNPs with streptavidin and biotinylated PNA for DNA base discrimination

iron(III) chloride anhydrous ($FeCl_3$, 98 %, Acros), iron(II) chloride tetrahydrate ($FeCl_2{\cdot}4H_2O$, 99 %, Acros organic), ammonium hydroxide (NH_4OH, 28–30 %, J.T. Baker), sodium hydroxide (NaOH, 98 %, Aldrich), oleic acid (Carlo Erba), 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES, 99 %, Acros), triethylamine (TEA, 97 %, Carlo Erba) and ammonium persulfate (APS, 98 %, Carlo Erba) were used as received. Acryloyl chloride was freshly prepared via a chloride exchange reaction between acrylic acid (98 %, Acros) and benzoyl chloride (99 %, Acros) at 75 °C to give a colorless liquid: 60 % yield. 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC.HCl, GL Biochem (Shanghai) Ltd.) and 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (MES, 99 %, Acros) were used as received. Fluorophore-tagged DNAs and streptavidin (95 %, Pacific Science) were used as received. Biotin-conjugated pyrrolidinyl peptide nucleic acid (biotin-acpcPNA) were synthesized via a manual Fmoc solid-phase peptide synthesis and purified by reverse-phase HPLC as described earlier (Vilaivan and Srisuwannaket 2006).

Syntheses

Synthesis of N-acryloyl glycine (NAG) monomer (Deng et al. 2011)

A solution of acryloyl chloride (10 mL, 123.6 mmol) in tetrahydrofuran was slowly added to a solution of glycine (9.28 g, 123.6 mmol) in NaOH solution (9.89 g NaOH, 247.25 mmol, in 30 mL DI water) at 0 °C, and the mixture was vigorously stirred for 3 h. The solution was extracted with diethyl ether, and the aqueous layer was acidified with conc. HCl to pH 2, followed by extraction with ethyl acetate. The combined organic extracts were dried with anh. Na_2SO_4, filtered and evaporated under reduced pressure: 66 % yield (10.50 g of NAG obtained). ^{1}H NMR (400 MHz, D_2O) δ_H: 4.08 [s, 2H, –NH–C<u>H</u>$_2$–C=O], 5.84 [m, 1H, CH_2=C<u>H</u>–CO–] and 6.27–6.35 [m, 2H, C<u>H</u>$_2$=CH–CO–].

Synthesis of MNPs via a co-precipitation method and their stabilization with oleic acid

$FeCl_3$ (1.66 g, 10.23 mmol, in 10 mL deionized water) and $FeCl_2{\cdot}4H_2O$ (1.00 g, 5.03 mmol, in 10 mL deionized water) were mixed together with rigorously stirring. After addition of 30 % NH_4OH solution (10 mL), a black precipitate was observed, signifying the formation of MNPs. After stirring for another 30 min to complete the reaction, the dispersion was centrifuged at 5000 rpm for 20 min and the aqueous supernatant was discarded. To stabilize the particles in the dispersion, an oleic acid solution (2 mL in 10 mL hexane) was slowly added into the MNPs with stirring for 30 min. The oleic acid-coated MNPs were re-precipitated in acetone (three times) and dried *in vacuo*.

Synthesis of acrylamide-grafted MNPs (Fig. 2)

TEA (2 mL) was added into the oleic acid-coated MNP–toluene dispersion (200 mg of the MNP in 30 mL toluene), followed by the addition with APTES (5 mL). The mixture was stirred at room temperature under N_2 atmosphere for 24 h. The particles were

separated using an external magnet and washed with ethanol and DI water to obtain amino-grafted MNPs. After drying, 200 mg of the amino-grafted MNPs was re-dispersed in a NaOH solution (3.96 g NaOH in 15 mL DI water), followed by an addition of acryloyl chloride (8 mL, 98.9 mmol) at 0 °C. The mixture was stirred at room temperature under nitrogen atmosphere for 24 h to obtain acrylamide-grafted MNPs. They were magnetically separated and repeatedly washed with DI water. The particles were re-dispersed in DI water to obtain the dispersion of 0.2 g MNPs in 20 mL water.

Synthesis of PNAG-grafted MNPs (Fig. 2)

The aqueous dispersion of acrylamide-grafted MNPs (25 mg MNPs in 2.5 mL water) was added to a NAG solution (0.5 g, 3.88 mmol, in 20 mL water). Ninety microliters of aqueous ammonium persulfate (APS) (10 % in water) was added to the solution to initiate the polymerization. It should be noted that 1:100 molar ratio of the initiator to monomer was used in this reaction. The mixture was incubated at 70 °C for 3 h under nitrogen gas flow. After the polymerization, the PNAG-grafted MNPs were repeatedly washed with DI water with an assistance of a permanent magnet to remove unreacted monomers and ungrafted polymers from the particles and then dried under *vacuo*. The PNAG-grafted MNPs will be characterized by FTIR, TEM, TGA, VSM and PCS techniques.

Bioconjugation of PNAG-grafted MNPs with PNA for DNA base discrimination

Specific interaction of streptavidin with biotin-conjugated PNA onto the MNP surface EDC·HCl (16 mg, 0.0835 mmol) was added to a PNAG-grafted MNP dispersion (5 mg MNPs in 5 mL of 10 mM MES buffer, pH 5.2) with stirring to activate the carboxylate groups on the particle surface, followed by addition of a streptavidin solution (0.1 mg streptavidin in 200 µL of MES buffer). After stirring for 24 h, the streptavidin-grafted MNPs were separated by a magnet, repeatedly washed with 10 mM MES buffer and dried *in vacuo*. The supernatant was analyzed via UV–visible spectrophotometry to confirm the decrease in streptavidin concentration in the solution due to its grafting on the MNPs surface (Fig. 3a).

Next, the streptavidin-grafted MNPs (2 mg) were stirred with 30 µL of biotin-acpcPNA solution (30.16 µM in pH 7 phosphate buffer) for 45 min to immobilize the PNA onto the MNPs surface via a

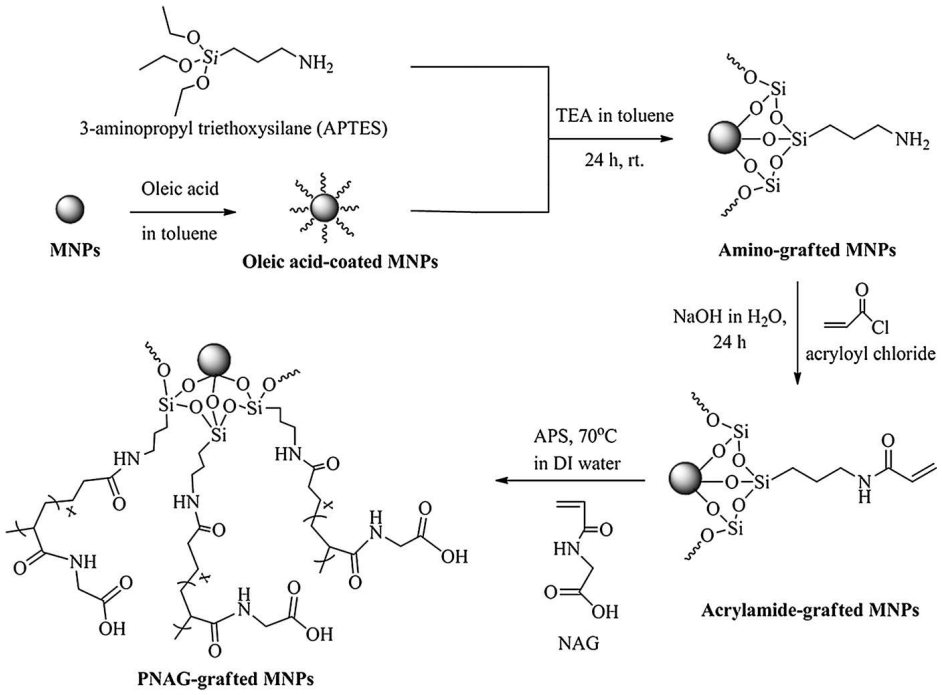


Fig. 2 Synthetic scheme of PNAG-grafted MNPs

specific biotin–streptavidin interaction. The supernatant was then analyzed via UV–Vis spectrophotometry to quantify the decrease in the PNA in the solution, corresponding to the amounts of the PNA functionalized on the MNP surface (Fig. 3b). The calibration curve of biotin-conjugated PNA was constructed as shown in supporting information (Figure S1).

DNA base discrimination using PNA-functionalized MNPs Two milligrams of the PNA-functionalized MNPs was stirred for 45 min with 2 mL of fluorophore-tagged DNA solution (0.8 μM in pH 7 phosphate buffer) and separated with a magnet (Fig. 3c). The supernatant was analyzed via fluores cence spectrophotometry and gel electrophoresis. It was hypothesized that the PNA-functionalized MNPs can specifically interact with only the complementary DNA, leaving the mismatched DNA (non-comple mentary and single-base mismatch) in the supernatant. In addition, the possibilities of non-specific adsorption between the MNP surface and DNA were also investigated using the streptavidin-grafted MNPs (without PNA immobilization).

Characterization

^{1}H NMR spectroscopy was performed on a 400-MHz Bruker NMR spectrometer using D_2O as a solvent. FTIR spectrophotometry was performed on a Perkin–Elmer Model 1600 Series FTIR Spectrophotometer. The particles size and size distribution were observed from TEM. The TEM images were taken using a Philips Tecnai 12 operated at 120 kV equipped with Gatan model 782 CCD camera. The particles were re-suspended in water with sonication before deposition on a TEM grid. The hydrodynamic diameter (D_h) of the particles was measured by PCS using NanoZS4700 nanoseries Malvern instrument. The sample dispersions were sonicated for 30 min before the

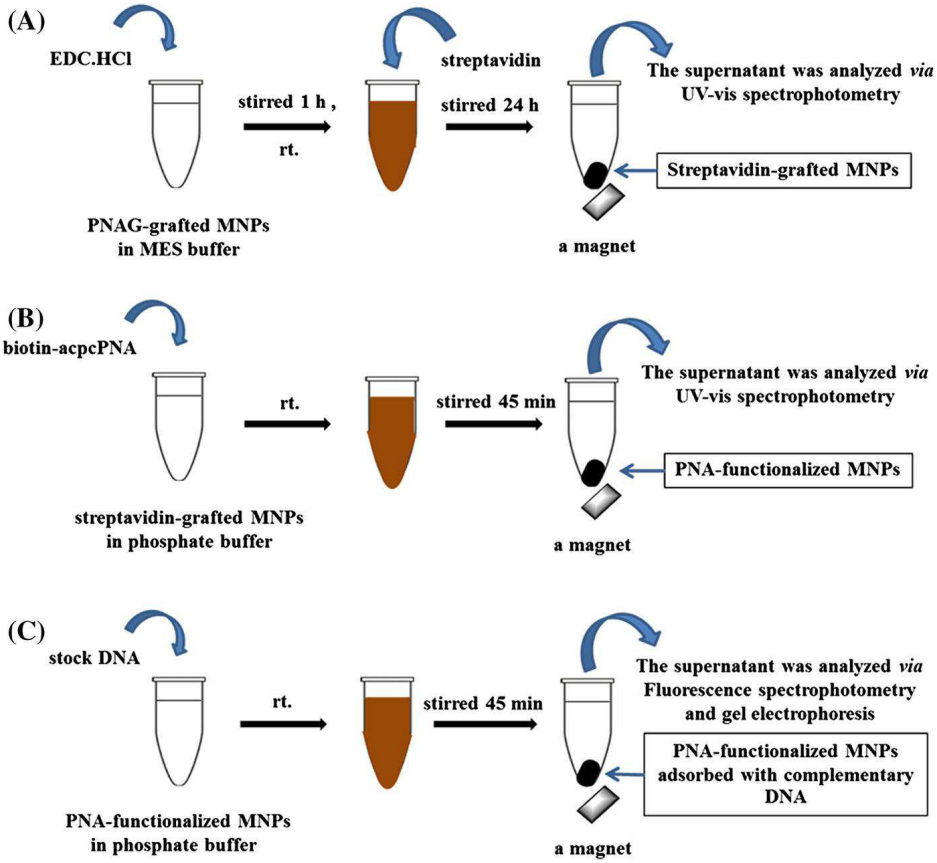


Fig. 3 Preparations of **a** streptavidin-grafted MNPs, **b** PNA-functionalized MNPs and **c** the DNA base discrimination using the PNA-functionalized MNPs

measurement at 25 °C without filtration. Magnetic properties of the particles were measured at room temperature using a Standard 7403 Series, Lakeshore vibrating sample magnetometer (VSM). Magnetic moment of each sample was investigated over a range of ±15,000 G of applied magnetic fields. TGA was performed on Mettler–Toledo's SDTA 851 at the temperature ranging between 25 and 600 °C and a heating rate of 20 °C/min under oxygen atmosphere.

UV–visible spectrophotometry was performed on Thermo Scientific NanoDrop 2000 UV–Vis Spectrophotometer at $\lambda = 260$ nm. Fluorescence spectrophotometry was conducted on a Varian Eclipse Fluorescence Spectrophotometer using 12-mer DNA sequences tagged with a fluorophore at the 5′-position. The fluorophores used in the work included 6-carboxyfluorescein (FAM) and 6-carboxytetramethylrhodamine (TAMRA) where their $\lambda_{excited}/\lambda_{emission}$ ratios are 494/521 nm and 552/584 nm, respectively. The gels in the gel electrophoresis experiments were prepared using 2 % agarose in 1× Tris–acetate (TAE) buffer.

Results and Discussion

In this work, anionic PNAG-grafted MNPs were synthesized via a radical polymerization of NAG in the presence of acrylamide-grafted MNPs, followed by the immobilization of PNA on their surface via streptavidin–biotin interaction. The PNA-functionalized MNPs were then used as magnetic solid supports for DNA base discrimination. To use these MNPs for DNA base discrimination using a PNA probe specific for the DNA sequence, high negatively charged surface was desirable in order to minimize the non-specific adsorption between non-complementary DNA sequences and the MNP surface. In our previous works, MNPs coated with positively charged poly((2-diethylamino)ethyl methacrylate) (PDEAEMA) were synthesized for ionic adsorption with negatively charged DNA for use in various applications such as detection of DNA sequences and magnetic separation of DNA (Theppaleak et al. 2013, b, 2014; Rutnakornpituk et al. 2016). However, the colloidal stability of these particles was rather dependent on the change in the dispersion pH. Therefore, in the current report, the carboxylic acid groups of PNAG on the MNP surface were chemically coupled with streptavidin via an amide bond formation to obtain streptavidin-grafted MNPs. These MNPs with streptavidin on their surface should specifically interact with biotinylated PNA probe to form PNA-functionalized MNPs. It is well known that these biotin–streptavidin interactions are highly specific and rather stable in various pHs, temperatures, organic solvents and denaturing agents (Liu et al. 2010).

Synthesis and characterization of PNAG-grafted MNPs

FTIR spectra of the products from each step of the reactions are shown in Fig. 4. The FTIR spectrum of MNP cores showed the signal at 585 cm^{-1} of Fe–O bonds, and this signal was observed in all FTIR spectra of the MNPs (Fig. 4a, c–e). After the reaction of the MNPs with APTES, N–H stretching (3360 cm^{-1}), N–H bending (1551 cm^{-1}) and Si–O stretching (1011 cm^{-1}) were observed, indicating the formation of amino-grafted MNPs (Fig. 4b, c). After the reaction of the MNPs with acryloyl chloride, C=C stretching signals (1535–1430 cm^{-1}) and amide bond signals (1619 and 1538 cm^{-1}) were observed, indicating the existence of acryloyl groups on the particle surface (Fig. 4d). After the polymerization of NAG monomers in the presence of acrylamide-grafted MNPs, the FTIR spectrum shows the characteristic adsorption signals of C=O stretching (1740 cm^{-1}), C–O stretching (1261 cm^{-1}) of carboxyl groups and C–C stretching (800 cm^{-1}) of PNAG (Fig. 4e; Deng et al. 2011). In addition, the FTIR spectrum of bare PNAG is shown in supporting information (Fig. S2). It should be noted that the MNPs in each step of the reactions were repeatedly washed with ethanol/water to completely remove unreacted species from the particles before the FTIR analyses.

To determine the composition of the PNAG-grafted on MNPs, TGA was used to investigate their weight loss at 600 °C (Fig. 5). It was hypothesized that the residue weight was the weight of iron oxide from oxidized MNP cores remaining at 600 °C, while the weight loss was attributed to the organic contents including the acrylamide linker and PNAG on the MNP surface. The observed residual weights in each step of the reaction consistently decreased, indicating more organic contents in the composites. According to the TGA thermograms in thermograms c and d in Fig. 5a, there was about 14 % weight of PNAG coated

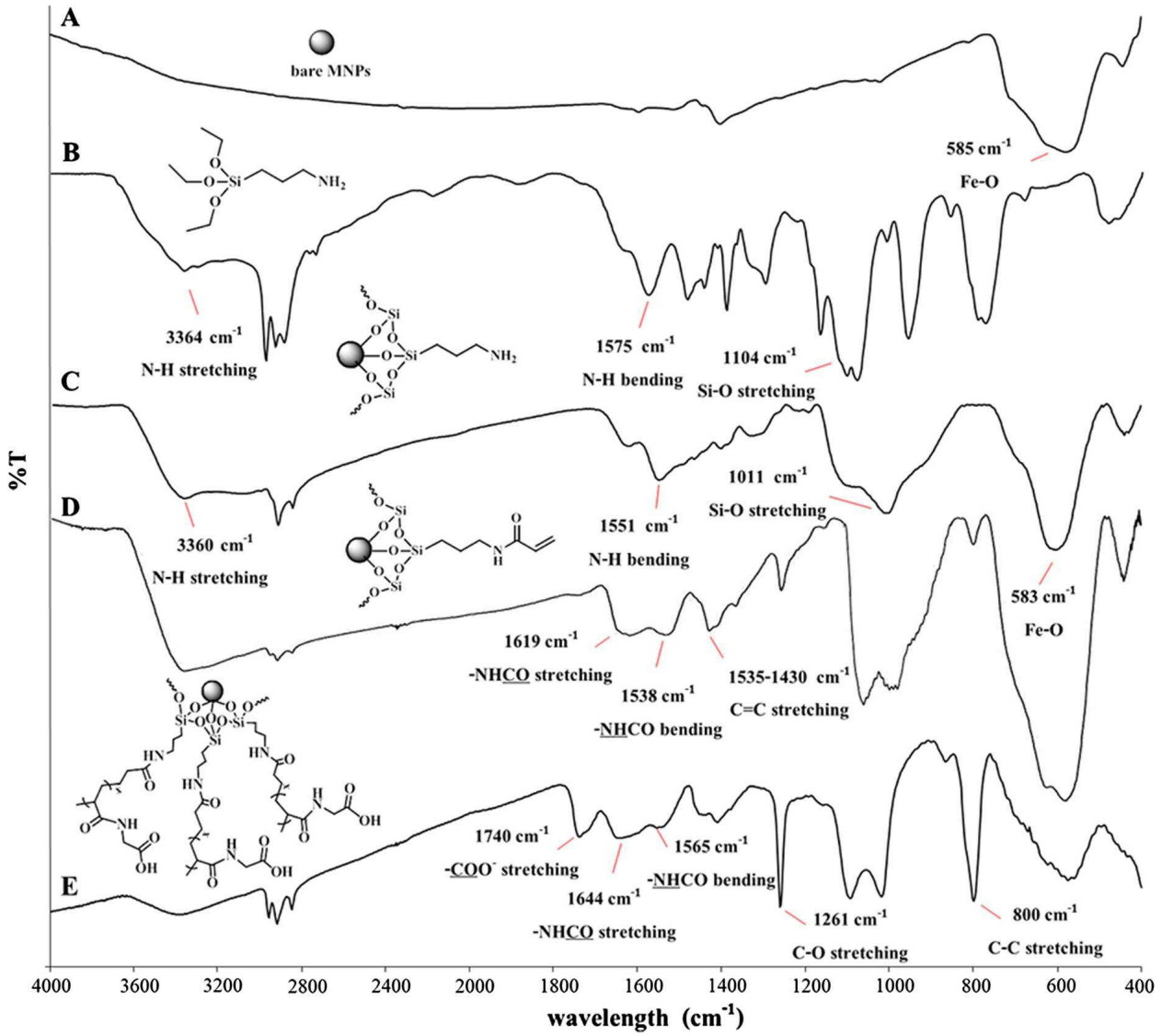


Fig. 4 FTIR spectra of **a** bare MNPs, **b** 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES), **c** amino-grafted MNPs, **d** acrylamide-grafted MNPs and **e** PNAG-grafted MNPs

on the MNP surface. This result corresponded well with their improved water dispersibility as opposed to those without PNAG coating. PNAG-grafted MNPs were well dispersible in aqueous dispersion without noticeable aggregation after standing for 3 h, and some slight aggregation was observed after 6 h (Fig. 5b), signifying that coating with PNAG provided an improved colloidal stability to the particles due to steric and/or electrostatic repulsion mechanisms. The stability of the dispersions after longer aging time (48 h) is shown in supporting information (Fig. S3). On the other hand, bare MNPs showed large particle aggregation only a few minutes after dispersing in water (Fig. 5b).

Magnetic properties of bare MNPs and PNAG-grafted MNPs were investigated via VSM technique (Fig. 6). PNAG-grafted MNPs showed superparamagnetic behavior at room temperature as indicated by the absence of magnetic remanence (M_r) and coercivity (H_c) (the top inset in Fig. 6). The saturation magnetization (M_s) values of PNAG-grafted MNPs (31 emu/g) were lower than those of bare MNPs (55 emu/g). This was attributed to the decrease in the magnetite content (% of MNP) in the nanocomposite

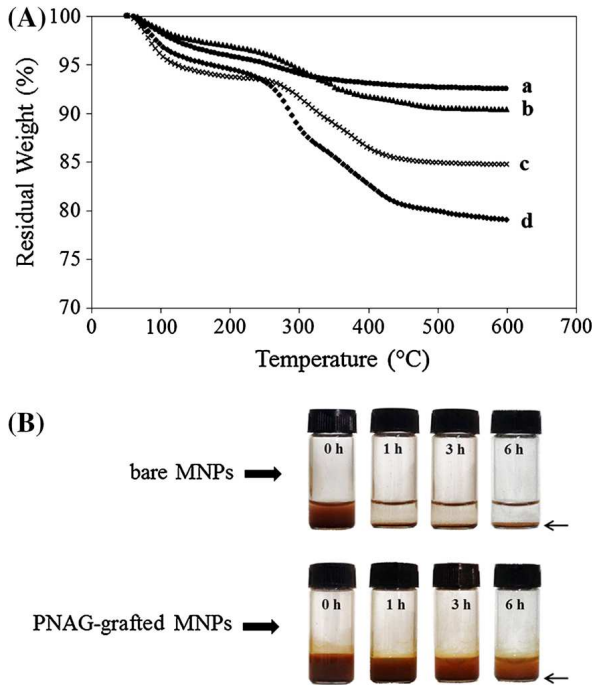


Fig. 5 **A** TGA curves of *a* bare MNPs, *b* amino-grafted MNPs, *c* acrylamide-grafted MNPs and *d* PNAG-grafted MNPs, **B** apparent dispersibilities of MNPs in water with and without PNAG coatings (*arrows* indicate the formation of particle aggregation)

due to the surface coating with diamagnetic PNAG. These results were in good agreement with those observed in TGA experiments (the decrease in the residual weights). Despite some decrease in the M_s values due to the presence of PNAG in the nanocomposite, these particles are still well responsive to a permanent magnet. PNAG-grafted MNPs can be completely separated from the dispersion within 5 min upon applying a permanent magnet as shown in the bottom inset in Fig. 6. The complete removal of the MNPs from the dispersion was necessary for the analysis of adsorbed moiety on the particle surface in this work, and this would be discussed in details in the later section.

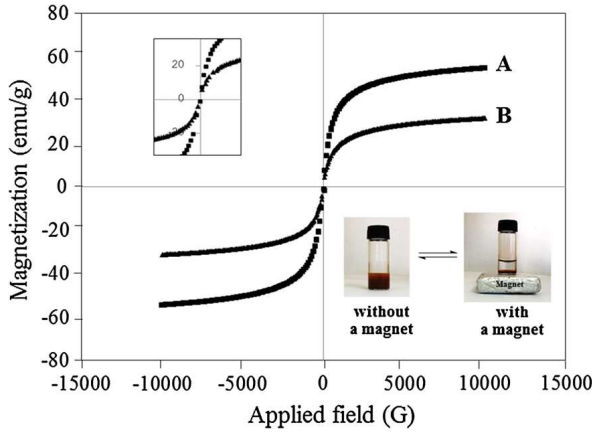


Fig. 6 *M–H* curves of **a** bare MNPs and **b** PNAG-grafted MNPs. The *top inset* shows an expansion of the ±2000 G region and the *bottom inset* shows the magnetic separation of the particles after 5 min upon applying a permanent magnet

Zeta potential values of PNAG-grafted MNPs as a function of dispersion pH are shown in Fig. 7. The presence of ionizable carboxylic acid groups of PNAG in the structure should make them a polyelectrolyte in aqueous dispersion. In addition to serving as steric and electrostatic stabilizers, the PNAG polyelectrolyte should also advantageously provide pH-responsive properties to the particles due to their large electrostatic potentials. The results in Fig. 7 suggest that these particles were indeed pH responsive. Zeta potential values of these particles in water continuously decreased with increasing pH of the dispersion and became highly negatively charged in basic pH. This was attributed to the formation of various degrees of deprotonated carboxylates ($-COO^-$) depending on the dispersion pH. It is worth to mention that the surface charge of these particles was highly negative at pH 7 (−55 mV), which is important in terms of decreasing non-specific interaction between PNAG-grafted MNPs and DNA in the base discrimination experiments.

Hydrodynamic diameter (D_h) of PNAG-grafted MNPs was found to be in the range of 334–494 nm, regardless of the pH. The observed sizes of D_h were rather high, which could be attributed to the formation

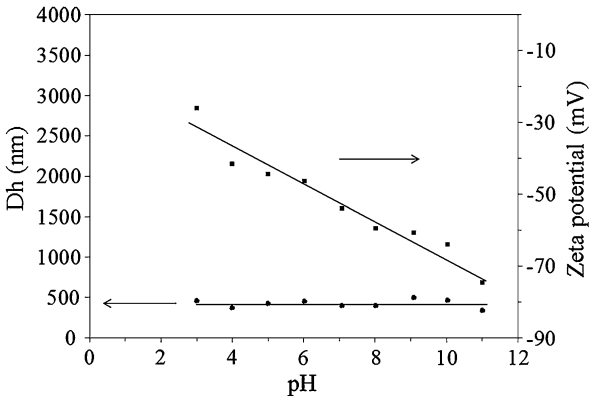


Fig. 7 Hydrodynamic size (D_h) and zeta potential values of PNAG-grafted MNPs at pH 3–11

of nanoclusters of multiple particles in the dispersion. The acrylamide-grafted MNPs can copolymerize with PNAG in the radical polymerization due to the presence of polymerizable acrylamide groups on their surface and eventually formed anionic magnetic nanoclusters. It should be noted that some degree of MNP nanoclustering might be necessary for use in magnetic separation applications (Meerod et al. 2015).

Bioconjugation of PNAG-grafted MNPs with PNA for DNA base discrimination

Representative TEM images of the MNPs from each step of the reactions are shown in Fig. 8. TEM samples of acrylamide-grafted MNPs were prepared from toluene dispersions, while those of PNAG-grafted MNPs, streptavidin-grafted MNPs and PNA-functionalized MNPs were prepared from pH 7 aqueous dispersions. Acrylamide-grafted MNPs were spherical in shape with the size of 6–10 nm in diameter without any aggregation visually observed (Fig. 8a). After the polymerization of PNAG in the presence of MNPs, formation of particle nanoclusters was observed (Fig. 8b), which was in good agreement with the rather high D_h of PNAG-grafted MNPs observed in PCS experiments (Fig. 7). This was attributed to the presence of polymerizable acrylamide on the particle surface, allowing for the inter-particle polymerization reactions (Fig. 9). It should be noted that PNAG homopolymers might also be formed in the solutions during the polymerization, but these were magnetically separated from the MNP nanoclusters.

The size of PNAG-grafted MNPs ranged between 200 and 400 nm in diameter, which correspond to approximately 50 nanoparticles/cluster (Fig. 8b). As opposed to well-dispersible single nanoparticles, these nanoclusters would be great advantageous for use as supports for magnetically assisted separation of DNA discussed in this work. Although these particles showed a sign of nanoclustering, they still well dispersed in aqueous dispersions for more than 6 h without macroscopic aggregation (Fig. 5b).

Streptavidin-grafted MNPs and PNA-functionalized MNPs (Fig. 8c, d) also showed the MNP nanoclustering with slightly larger sizes (400–600 nm in diameter) than those of PNAG-grafted MNPs (Fig. 8b). This was attributed to the large molecular structures of streptavidin and PNA, resulting in higher degrees of aggregation of the particles. The increase in D_h of the particles after the conjugations with streptavidin and then PNA (from $\approx$500 nm to $\approx$700 nm) also supported those observed in TEM experiments. In addition, the UV spectrophotometry was also used to confirm that the streptavidin was successfully grafted on the MNP surface as indicated by the decrease in the UV spectrum intensity (shown in supporting information, Table S1 and Fig. S4). Interestingly, due to the good solubilities of streptavidin and PNA in buffers, the water dispersibilities of both streptavidin-grafted MNPs and PNA-functionalized MNPs were apparently improved (shown in supporting information, Figure S5).

To determine the amount of PNA adsorbed on the MNP surface, the MNP nanoclusters were magnetically separated from the dispersion and repeatedly washed with phosphate buffer solutions (Fig. 3b). The supernatant was then analyzed via UV–visible spectrophotometry at 15-min interval to quantify the decrease in the PNA in the solution, corresponding to the amount of PNA immobilized on the MNPs surface. It was found that the maximum amount of PNA adsorbed on the particle surface was 291 pmol/mg MNP after 45 min of mixing. The adsorption kinetics and the calculation of the PNA adsorbed on the particles are shown in supporting information (Fig. S6). These MNPs were then used as magnetic nanosolid supports with PNA as a probe for selective adsorption with targeted DNA.

To proof the concept for use of these MNPs for selective adsorption with targeted DNA, one biotin-conjugated PNA probe (P1) and three DNA sequences (D1–D3) were selected as a model in this study (Table 1). These three DNA sequences were tagged with 6-carboxytetramethylrhodamine (TAMRA) or 6-carboxyfluorescein (FAM). Two different fluorophores having different emission wavelengths were employed in order to differentiate complementary and non-complementary DNA targets by the PNA probe. The level of non-specific background adsorption between DNA and the MNPs was first investigated. This non-specific interaction might arise from physical adsorption between hydrophobic moiety of DNA and that of streptavidin on MNP surface. This non-specific adsorption is not desirable because the principle for DNA base discrimination here relies on the specific hybridization between DNA and the PNA immobilized on the particle surface. Due to the negatively charged repulsion of carboxylate groups

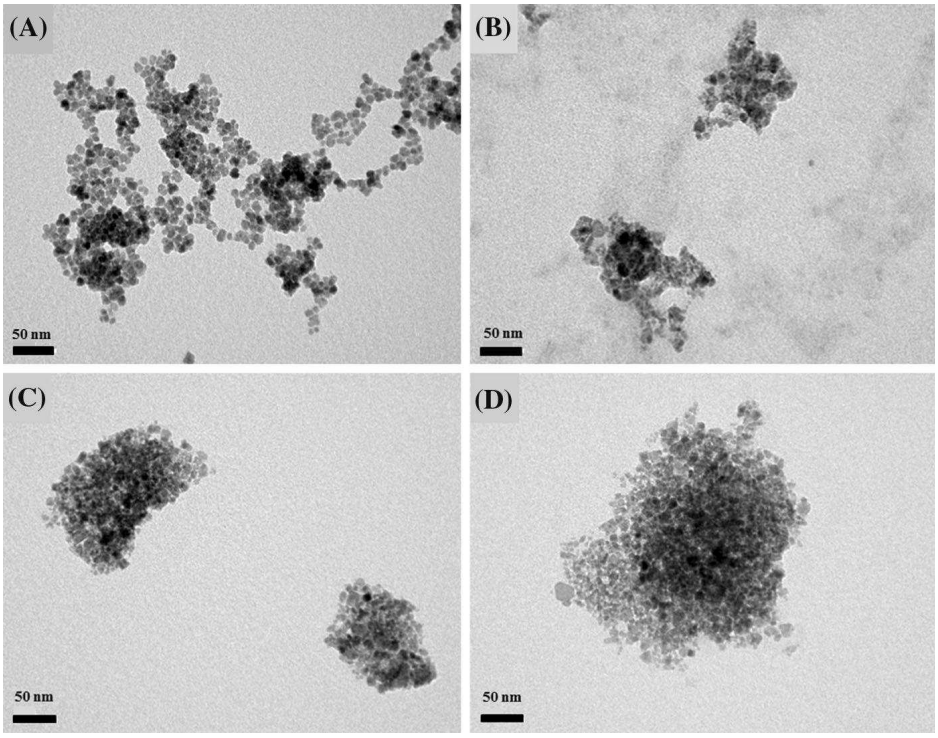


Fig. 8 TEM images of **a** acrylamide-grafted MNPs, **b** PNAG-grafted MNPs, **c** streptavidin-grafted MNPs and **d** PNA-functionalized MNPs

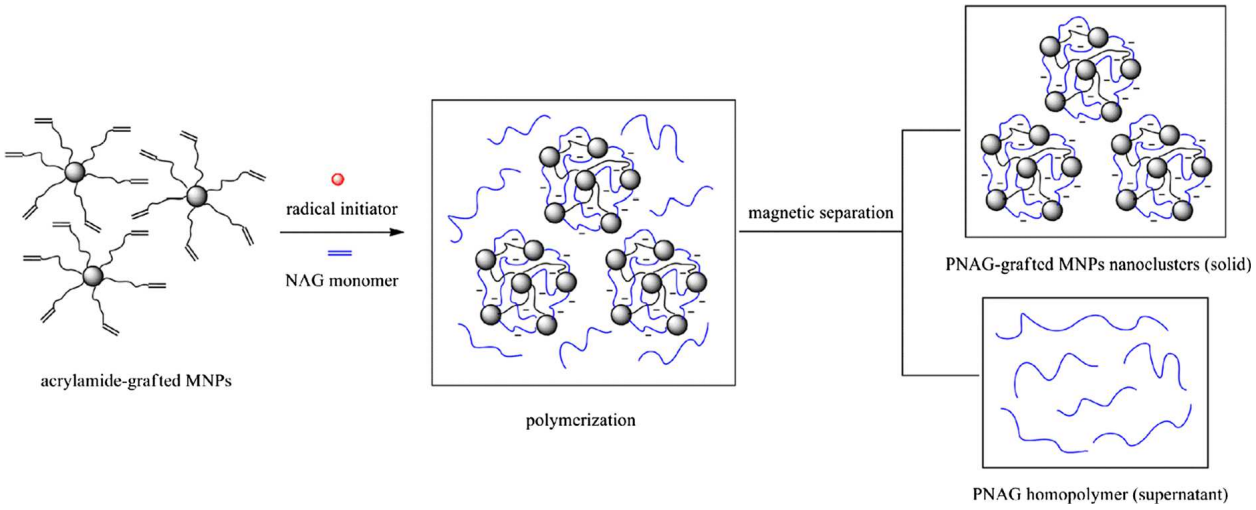


Fig. 9 Proposed mechanism of the formation of PNAG–MNPs nanoclusters

of PNAG and deoxyribophosphate groups of DNA, coating the particle surface with anionic PNAG should minimize this undesired non-specific adsorption of DNA.

To study the non-specific interaction, streptavidin-grafted MNPs (without PNA) were dispersed in phosphate buffer solutions, followed by addition of the DNA (D1, D2 or D3). After magnetic separation of the particles, the fluorescence spectra of the supernatant showed no change in their intensities, indicating that there was no non-specific adsorption of the DNA on the particle surface in all DNA samples (Fig. 10a–c).

PNA-functionalized MNPs were then tested in the differentiation between complementary and non-

Table 1 Sequences of biotin-conjugated PNA and fluorophore-tagged DNAs used in this work

Biotin-conjugated PNA	Sequence of DNAs used	Excitation wavelength (nm)	Emission wavelength (nm)
P1: Biotin-CTACA AGCATAT-lys-NH_2	D1: 5′-ATATGCTTGTAG-3′ (FAM) (fully complementary)	494	521
	D2: 5′-CACGTTCCAGGA-3′ (TAMRA) (non-complementary)	552	584
	D3: 5′-ATATGCATGTAG-3′ (TAMRA) (single-base mismatch)	552	584

complementary, including completely mismatch and single-base mismatch DNA targets. The DNA targets (D1, D2 or D3; 2 mL of 0.8 μM DNA, 1600 pmol each) were added to the dispersions of PNA-functionalized MNPs (P1, 582 pmol/2 mg MNP) in phosphate buffer solutions (Fig. 3c). The amount of PNA used in this experiment was equivalent to the calculated amounts of PNA adsorbed on the particles discussed in the previous section (291 pmol/mg MNP). It was found that the fluorescence spectrum in the complementary case showed a significant decrease in its intensity (Fig. 10a), corresponding to about 33 % of D1 adsorbed on the particles (Fig. 11a). Ones might question that the adsorption of D1 on the particles was probably due to the physical adsorption of FAM molecules tagged at the terminal of D1 because different types of fluorophores were used in this experiment. Additional studies were performed with the use of fully complementary DNA (D1) and non-complementary DNA (D1′: 5′-CACgTTCCAGGA-3′) both tagged with FAM (shown in supporting information Table S2 and Figure S7). It was found that the case of DÍ exhibited no change in the fluorescence intensity, indicating that the depletion of fluorescence intensity in Fig. 10a was due to the hybridization of P1 and D1.

On the other hand, the non-complementary DNAs exhibited no change in the fluorescence intensity (Fig. 10b, c). These results indicated that the PNA (P1) probe immobilized on the MNPs can clearly differentiate between the complementary (D1) and non-complementary (D2) as well as single-base mismatch (D3) DNAs. The comparative plot of the percent DNA (D1–D3) adsorbed by the PNA-functionalized MNP nanoclusters is shown in Fig. 11a. The fluorescence spectra and calibration curve of DNA (D1) (fully complementary), DNA (D2) (non-complementary) and DNA (D3) (single-base mismatch) are provided in Fig. S8.

Gel electrophoresis was also used to confirm that PNA-functionalized MNPs can differentiate between the complementary DNA (D1) and non-complementary DNA (D2 and D3) (Fig. 11b). In good agreement with the fluorescence spectrophotometry results discussed above, the supernatant after removing PNA-functionalized MNPs (number 2) only in the case of fully complementary DNA showed the obvious decrease in the band intensity as compared to the band of the initial DNA (number 1) at the same DNA concentration (1600 pmol or 2 mL of 0.8 μM). Interestingly, those of the MNPs without PNA (number 3) showed no decrease in the band intensity, indicating that there was no non-specific interaction between DNA and the particle surface, as well as PNA and streptavidin.

The specific hybridization between DNA and PNA immobilized on the particle surface was further investigated using the mixture of two DNA sequences. An equimolar mixture of the fully complementary DNA (D1) and non-complementary DNA (D2) in phosphate buffer was mixed with the PNA-functionalized MNPs (582 pmol/2 mg MNPs). After mixing for 45 min and magnetic separation, the supernatant was then analyzed by fluorescence spectrophotometry. It was found that only the fluorescence spectrum in the complementary case showed a significant decrease in its intensity (Fig. 12a), corresponding to about 42.42 % of DNA (D1) adsorbed on the particles (Fig. 12c). Similar results were obtained with the equimolar mixture of fully complementary DNA (D1) and single-base mismatch DNA (D3). In the presence of PNA-functionalized MNPs, only the fluorescence intensity of the complementary case decreased

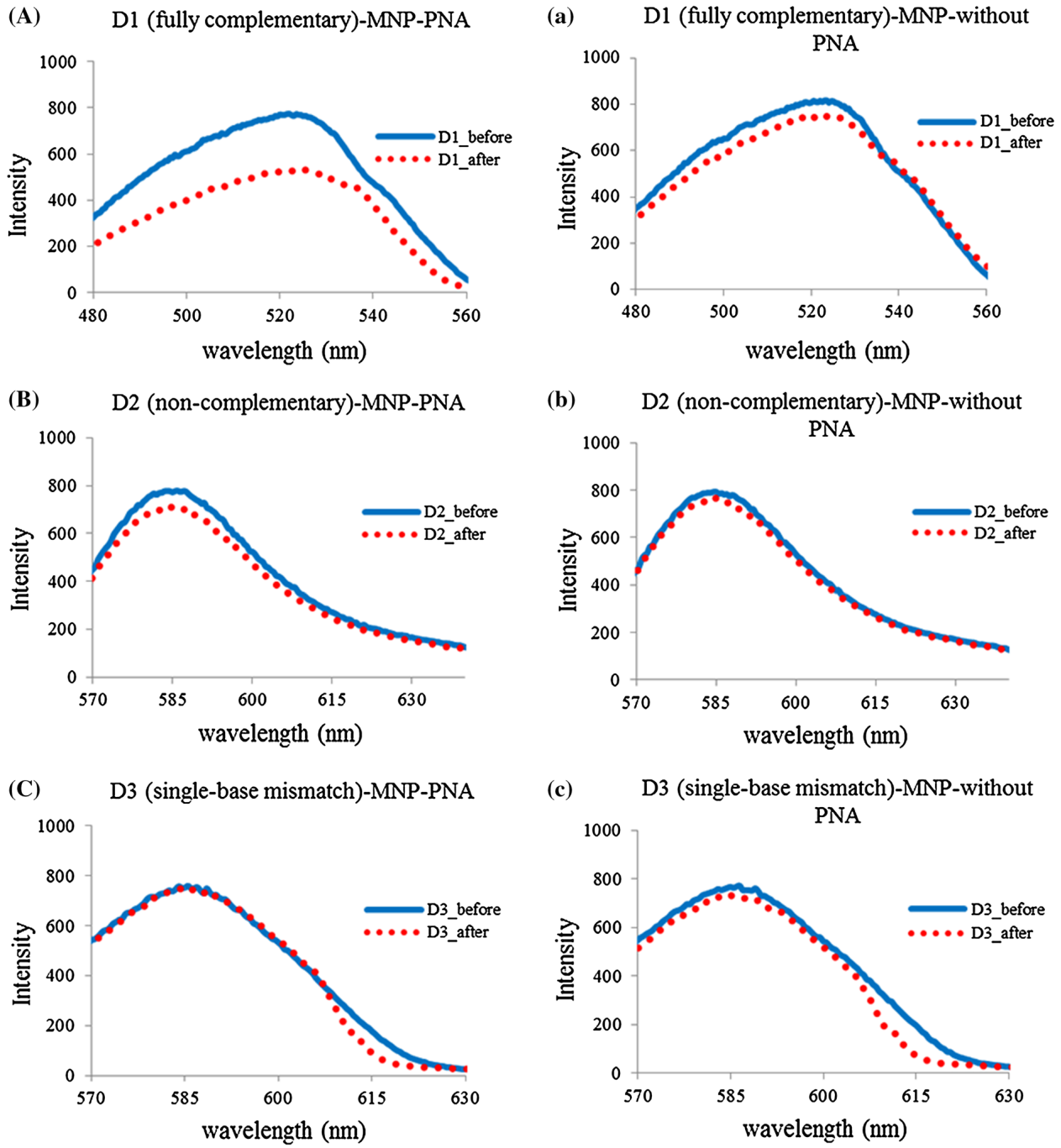


Fig. 10 Fluorescence spectra of **a–c** the dispersions before and after magnetic separations, and **a–c** the studies in non-specific adsorptions (without PNA functionalized)

(Fig. 12b) (about 35.66 % of DNA (D1) adsorbed) (Fig. 12c). These results confirmed that PNA-functionalized MNPs can be effectively used for selective adsorption of targeted DNA.

Due to the high stability and high specificity between PNA and DNA hybrids, these novel anionic MNPs might be potentially great advantage for use as magnetic nanosupports for various future technologies, such as diagnostics of genetic diseases and enrichment of DNA mixture. The applications of these MNPs in real DNA samples are underway and will be reported in the future studies.

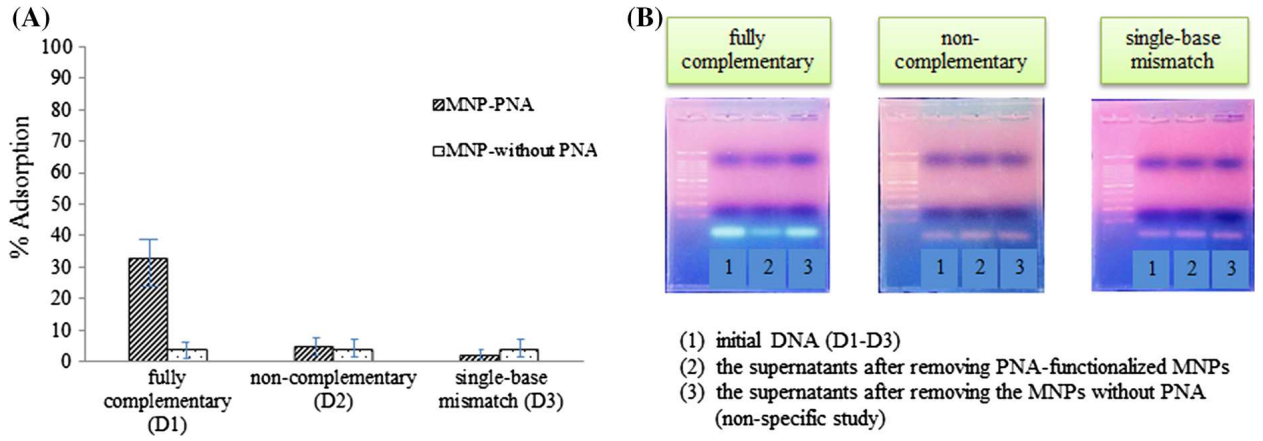


Fig. 11 **a** % Adsorption of DNA (D1–D3) on MNP nanoclusters and **b** gel electrophoresis (agarose gel) showing the decrease in band intensity in the complementary case (fully complementary)

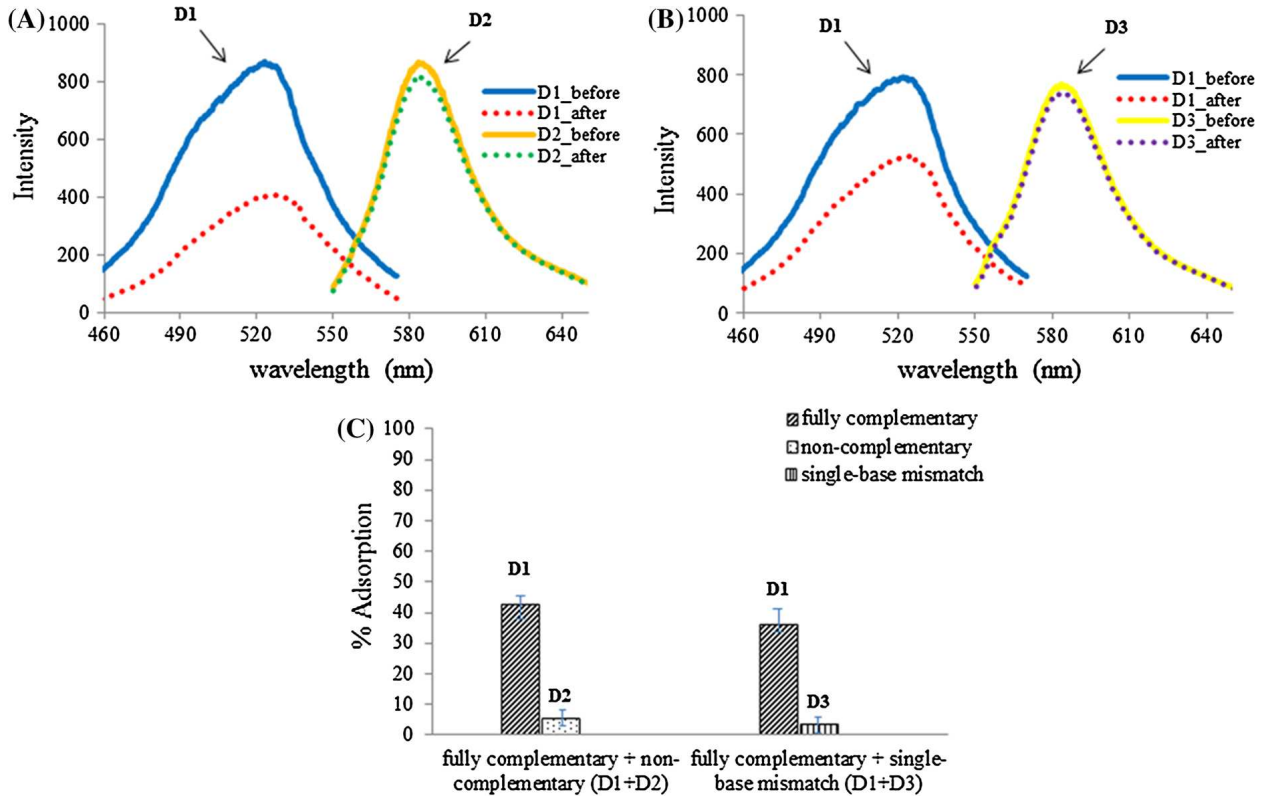


Fig. 12 Fluorescence spectra of the dispersions before and after magnetic separations of DNA mixture **a** DNA (D1) + DNA (D2), **b** DNA (D1) + DNA (D3) and **c** % Adsorption of DNA (D1–D3) on MNP nanoclusters

Conclusions

The MNPs surface was successfully modified with PNAG via a one-step free radical polymerization to obtain the magnetic nanoclusters with negatively charged surface, high magnetic responsiveness, good dispersibility and good stability in water. PNA was efficiently functionalized onto the particle surface through the streptavidin–biotin interaction. The PNA-functionalized MNP nanoclusters were then used as solid supports to differentiate between fully complementary and single-base mismatch/non-comple

mentary DNA sequences using the PNA probe. These novel anionic MNP nanoclusters can be potentially applicable for use as a magnetically guidable tool for pre-concentration of DNA mixtures.

Acknowledgments The authors thank the Thailand Research Fund (TRF) (DPG5780002) for financial support. SK especially acknowledges the Royal Golden Jubilee PhD program for the scholarship (PHD/0250/2553).

References

Ahour F, Pournaghi-Azar MH, Alipour E, Hejazi MS (2013) Detection and discrimination of recombinant plasmid encoding hepatitis C virus core/E1 gene based on PNA and double-stranded DNA hybridization. Biosens Bioelectron 45:287–291

Ananthanawat C, Vilaivan T, Hoven VP, Su X (2010) Comparison of DNA, aminoethylglycyl PNA and pyrrolidinyl PNA as probes for detection of DNA hybridization using surface plasmon resonance technique. Biosens Bioelectron 25:1064–1069

Anirudhan TS, Rejeena SR (2013) Poly(methacrylic acid-co-vinyl sulfonic acid)-grafted-magnetite/nanocellulose superabsorbent composite for the selective recovery and separation of immunoglobulin from aqueous solutions. Sep Purif Technol 119:82–93

Ashtari P, He X, Wang K, Gong P (2005) An efficient method for recovery of target ssDNA based on amino-modified silica-coated magnetic nanoparticles. Talanta 67: 548–554

Barbucci R, Casolaro M, Magnani A (1991) The role of polyelectrolytes in the permeability control of insulin: behavior of poly(*N*-acryloyl glycine) grafted on porous cellulose membrane. J Control Release 17:79–88

Bayrakcl M, Maltas E, Yigiter S, Özmen M (2013) Synthesis and application of novel magnetite nanoparticle based azacrown ether for protein recognition. Macromol Res 21:1029–1035

Bertucci A, Manicardi A, Candiani A, Giannetti S, Cucinotta A, Spoto G, Konstantaki M, Pissadakis S, Selleri S, Corradini R (2015) Detection of unamplified genomic DNA by a PNA-based microstructured optical fiber (MOF) bragg-grating optofluidic system. Biosens Bioelectron 63:248–254

Choi Y, Metcalf G, Sleiman MH, Vair-Turnbull D, Ladame S (2014) Oligonucleotide-templated reactions based on Peptide Nucleic Acid (PNA) probes: concept and biomedical applications. Bioorgan Med Chem 22: 4395–4398

Cui YR, Hong C, Zhou YL, Li Y, Gao XM, Zhang XX (2011) Synthesis of orientedly bioconjugated core/shell Fe_3O_4@Au magnetic nanoparticles for cell separation. Talanta 85:1246–1252

Deng WG, Zhu Y, Montero A, Wu KK (2003) Quantitative analysis of binding of transcription factor complex to biotinylated DNA probe by a streptavidin-agarose pull-down assay. Anal Biochem 323:12–18

Deng K, Li Q, Bai Y, Gou Y, Dong L, Huang C, Wang S, Gao T (2011) A pH/Thermo-responsive injectable hydrogel system based on poly(N-acryloyl glycine) as a drug carrier. Iran Polym J 20(3):185–194

Erdem A, Sayar F, Karadeniz H, Guven G, Ozsoz M, Piskin E (2007) Development of streptavidin carrying magnetic nanoparticles and their applications in electrochemical nucleic acid sensor systems. Electroanal 19:798–804

Holmberg A, Blomstergren A, Nord O, Lukacs M, Lundeberg J, Uhlén M (2005) The biotin-streptavidin interaction can be reversibly broken using water at elevated temperatures. Electrophoresis 26:501–510

Horák D, Španová A, Tvrdíková J, Rittich B (2011) Streptavidin-modified magnetic poly(2-hydroxyethyl methacrylate-coglycidyl methacrylate) microspheres for selective isolation of bacterial DNA. Eur Polym J 47:1090–1096

Kerman K, Matsubara Y, Morita Y, Takamura Y, Tamiya E (2004) Peptide nucleic acid modified magnetic beads for intercalator based electrochemical detection of DNA hybridization. Sci Technol Adv Mater 5:351–357

Li Z, Wei L, Gao MY, Lei H (2005) One-pot reaction to synthesize biocompatible magnetite nanoparticles. Adv Mater 17(8):1001–1005

Liu YJ, Yao DJ, Chang HY, Liu CM, Chen C (2008) Magnetic bead-based DNA detection with multi-layers quantum dots labeling for rapid detection of Escherichia coli O157:H7. Biosens Bioelectron 24:558–565

Liu X, Qu X, Fan H, Ai S, Han R (2010a) Electrochemical detection of DNA hybridization using a water-soluble branched polyethyleneimine-cobalt(III)-phenanthroline indicator and PNA probe on Au electrodes. Electrochim Acta 55:6491–6495

Liu Z, Galli F, Janssen KGH, Jiang L, van der Linden HJ, de Geus DC, Voskamp P, Kuil ME, Olsthoorn RCL, Oosterkamp TH, Hankemeier T, Abrahams JP (2010b) Stable single-walled carbon nanotube-streptavidin complex for biorecognition. J Phys Chem C 114:4345–4352

Maity D, Chandrasekharan P, Yang CT, Chuang KH, Shuter B, Xue JM, Ding J, Feng SS (2010) Facile synthesis of water-stable magnetite nanoparticles for clinical MRI and magnetic hyperthermia applications. Nanomedicine 5:1571–1584

Meebungpraw J, Wiarachai O, Vilaivan T, Kiatkamjornwong S, Hoven VP (2015) Quaternized chitosan particles as ion exchange supports for label-free DNA detection using PNA probe and MALDI-TOF mass spectrometry. Carbohyd Polym 131:80–89

Meerod S, Rutnakornpituk B, Wichai U, Rutnakornpituk M (2015) Hydrophilic magnetic nanoclusters with thermo-responsive properties and their drug controlled release. J Magn Magn Mater 392:83–90

Moon JM, Kim BS, Choi YS, Lee JO, Nakahara T, Yoshinaga K (2010) Preparation of polymer-coated magnetite fine particles for immunoassay magnetic marker. Macromol Res 8:793–799

Mornet S, Vasseur S, Grasset F, Verveka P, Goglio G, Demourgues A, Portier J, Pollert E, Duguet E (2006) Magnetic nanoparticle design for medical applications. Prog Solid State Chem 34:237–247

Park ME, Chang JH (2007) High throughput human DNA purification with aminosilanes tailored silica-coated magnetic nanoparticles. Mater Sci Eng 27:1232–1235

Pita M, Abad JM, Vaz-Dominguez C, Briones C, Mateo-Martí E, Martín-Gago JA, Morales MP, Fernandez VM (2008) Synthesis of cobalt ferrite core/metallic shell nanoparticles for the development of a specific PNA/DNA biosensor. J Colloid Interface Sci 321:484–492

Prai-in Y, Tankanya K, Rutnakornpituk B, Wichai U, Montembault V, Pascual S, Fontaine L, Rutnakornpituk M (2012) Azlactone functionalization of magnetic nanoparticles using ATRP and their bioconjugation. Polymer 53:113–120

Rojas-Pérez A, Diaz-Diestra D, Frias-Flores CB, Beltran-Huarac J, Das KC, Weiner BR, Morell G, Díaz-Vázquez LM (2015) Catalytic effect of ultrananocrystalline Fe_3O_4 on algal bio-crude production via HTL process. Nanoscale 7:17664–17671

Rutnakornpituk B, Theppaleak T, Rutnakornpituk M, Vilaivan T (2016) Recyclable magnetite nanoparticle coated with cationic polymers for adsorption of DNA. J Biomater Sci Polym E 27:1200–1210

Sahoo B, Devi KSP, Banerjee R, Maiti TK, Pramanik P, Dhara D (2013) Thermal and pH responsive polymer-tethered multifunctional magnetic nanoparticles for targeted delivery of anticancer drug. ACS Appl Mater Interfaces 5:3884–3893

Shi H, Yang F, Li W, Zhao W, Nie K, Dong B, Liu Z (2015) A review: fabrications, detections and applications of peptide nucleic acids (PNAs) microarray. Biosens Bioelectron 66:481–489

Srivastava M, Singh J, Yashpal M, Gupta DK, Mishra RK, Tripathi S, Ojha AK (2012) Synthesis of superparamagnetic bare Fe_3O_4 nanostructures and core/shell (Fe_3O_4/alginate) nanocomposites. Carbohyd Polym 89:821–829

Stoltenburg R, Reinemann C, Strehlitz B (2005) FluMag-SELEX as an advantageous method for DNA aptamer selection. Anal Bioanal Chem 383:83–91

Stubinitzky C, Vilaivan T, Wagenknecht HA (2014) The base discriminating potential of pyrrolidinyl PNA demonstrated by magnetic Fe_xO_y particles. Org Biomol Chem 12:3586–3589

Sun MQ, Cao FQ, Hu XL, Zhang YR, Lu XW, Zeng LB (2014) DNA aptamer selection in vitro for determining ketamine by FluMag-SELEX. J Forensic Med 30(5):346–349

Theamdee P, Rutnakornpituk B, Wichai U, Rutnakornpituk M (2014) Recyclable magnetic nanoparticle grafted with pH-responsive polymer for adsorption with DNA. J Nanopart Res 16:2494–2506

Theamdee P, Rutnakornpituk B, Wichai U, Nakkuntod M, Rutnakornpituk M (2015) Recyclable silver-magnetite nanocomposite for antibacterial application. J Ind Eng Chem 29:63–70

Theppaleak T, Rutnakornpituk M, Wichai U, Vilaivan T, Rutnakornpituk B (2013a) Anion-exchanged nanosolid support of magnetic nanoparticle in combination with PNA probes for DNA sequence analysis. J Nanopart Res 15:2106–2117

Theppaleak T, Rutnakornpituk B, Wichai U, Vilaivan T, Rutnakornpituk M (2013b) Magnetite nanoparticle with positively charged surface for immobilization of peptide nucleic acid and deoxyribonucleic acid. J Biomed Nanotechnol 9:1509–1520

Thipmanee O, Samanman S, Sankoh S, Numnuam A, Limbut W, Kanatharana P, Vilaivan T, Thavarungkul P (2012) Label-free capacitive DNA sensor using immobilized pyrrolidinyl PNA probe: effect of the length and terminating head group of the blocking thiols. Biosens Bioelectron 38:430–435

Vilaivan T (2015) Pyrrolidinyl PNA with α/β-dipeptide backbone: from development to applications. Acc Chem Res 48:1645–1656

Vilaivan T, Srisuwannaket C (2006) Hybridization of pyrrolidinyl peptide nucleic acids and DNA: selectivity, base-pairing specificity and direction of binding. Org Lett 8(9):1897–1900

Wang Y, Ibrahim NL, Jiang J, Gao S, Erathodiyil N, Ying JY (2013a) Construction of block copolymers for the coordinated delivery of doxorubicin and magnetite nanocubes. J Control Release 169:211–219

Wang N, Guan Y, Yang L, Jia L, Wei X, Liu H, Guo C (2013b) Magnetic nanoparticles (MNPs) covalently coated by PEO–PPO–PEO block copolymer for drug delivery. J Colloid Interface Sci 395:50–57

Xia L, O'Connor TR (2001) DNA glycosylase activity assay based on streptavidin paramagnetic bead substrate capture. Anal Biochem 298:322–326

Xu B, Lu R, Dou H, Tao K, Sun K, Qiu Y, Ding J, Zhang D, Li J, Shi W, Sun K (2012) Exploring the structure-property relationships of ultrasonic/MRI dual imaging magnetite/PLA microbubbles: magnetite@cavity versus magnetite@shell systems. Colloid Polym Sci 290:1617–1626

Yaroslavsky AI, Smolina IV (2013) Fluorescence imaging of single-copy DNA sequences within the human genome using PNA-directed padlock probe assembly. Chem Biol 20:445–453

RSC Advances

PAPER



Cite this: *RSC Adv.*, 2016, **6**, 74314

Synthesis and fluorescence properties of 3,6-diaminocarbazole-modified pyrrolidinyl peptide nucleic acid†

Aukkrapon Dangsopon,[a] Nattawee Poomsuk,[b] Khatcharin Siriwong,[b] Tirayut Vilaivan[c] and Chaturong Suparpprom*[a]

This work aims to explore a new clickable carbazole-based fluorescent label, its incorporation into pyrrolidinyl peptide nucleic acid (acpcPNA), and the interactions between the labeled PNA probe and DNA by fluorescence spectrophotometry and molecular dynamics simulation. A carbazole derivative, namely 3,6-diaminocarbazole (DAC), was synthesized and incorporated into the internal and terminal positions of azide-modified acpcPNA *via* a sequential reductive alkylation and click reaction previously developed by our group. The DAC-modified acpcPNA can form a stable hybrid with complementary DNA with somewhat lower stability compared to unmodified acpcPNA. Most importantly, the DAC-modified acpcPNA exhibits a remarkable fluorescence increase in the presence of DNA (up to 35.5 fold with complementary DNA). Non-complementary as well as single mismatched DNA targets gave a smaller fluorescence increase (1.1 to 18.6 fold), and the discrimination could be further improved by increasing the temperature to dissociate the mismatched hybrids. Molecular dynamic simulations revealed that the DAC interacts with adjacent nucleobases in single stranded PNA, resulting in quenching of the fluorescence signal. When the PNA formed a hybrid with DNA, the DAC was pushed away from the duplex, resulting in a fluorescence increase. Thus, the DAC-labeled acpcPNA is a potential candidate as a self-reporting probe for determination of DNA sequences.

Received 30th June 2016
Accepted 26th July 2016

DOI: 10.1039/c6ra15861g

www.rsc.org/advances

Introduction

Self-reporting fluorescence oligonucleotides have been extensively used as a probe for the determination of DNA sequences. Several approaches have been explored in order to introduce a mechanism for fluorescence changes upon hybridization of the probe with the correct DNA target. Classically, two labels that can interact by static quenching,[1] Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)[2–4] or excimer/exciplex formation[5] are used in combination. More recently, there are attempts to develop singly labeled self-reporting probes by attachment of an intercalative or environment sensitive dye to the oligonucleotide.[6] However, the performance of these singly-labeled probes is generally variable, depending on the sequence and therefore still leaves room for improvements.

Carbazole is an electron rich aromatic molecule that showed many interesting properties such as high thermal stability, excellent photophysical and electroconductive properties and the ease of synthesis and chemical modification at 3-, 6- and 9-positions. Carbazole derivatives, both in monomeric and oligomeric forms, have found widespread applications as photoconductivity polymers,[7–10] polymeric light emitting devices,[11,12] high temperature thermostable polymers,[13] electrochromic materials,[14–16] dye-sensitized solar cell and dendrimeric electro phosphorescent devices.[17–19] In addition, carbazole derivatives have been used as fluorophores in sensor applications, including DNA detection.[20] Carbazole derivatives with cationic groups at 3,6-positions have been reported to bind in the DNA groove of AT-rich sequences.[21–24] However, the use of carbazole derivatives in combination with an oligonucleotide or analogues for sequence-specific detection of DNA sequences is unknown.

Peptide nucleic acid or PNA is a DNA mimic consisting of nucleobases attached onto a peptide-like backbone.[25,26] PNA can hybridize with DNA according to Watson–Crick base pairing rules with high affinity and sequence specificity. The absence of phosphate group in the PNA backbone results in decreasing of the electrostatic repulsion with DNA, and therefore PNA can form a more stable duplex with DNA than DNA itself. In addition, the binding of PNA and DNA is highly sequence specific

[a]*Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Naresuan University, Muang, Phitsanulok 65000, Thailand. E-mail: chaturongs@nu.ac.th*

[b]*Materials Chemistry Research Center, Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand*

[c]*Organic Synthesis Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand*

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c6ra15861g

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2016

and is not sensitive to ionic strength. These properties, together with the excellent chemical and biological stabilities, make PNA a promising tool for several applications in medical and biotechnology fields. Recently, we reported a series of new PNA system with restricted conformation flexibility as a result of incorporation of cyclic structures into the PNA backbone.[27–30] Pyrrolidinyl PNA probes labeled with environment sensitive dyes such as pyrene,[31,32] Nile red,[32,33] or other DNA binding dyes such as thiazole orange[34] have been successfully applied as self-reporting fluorescence probes for DNA sequence detection.

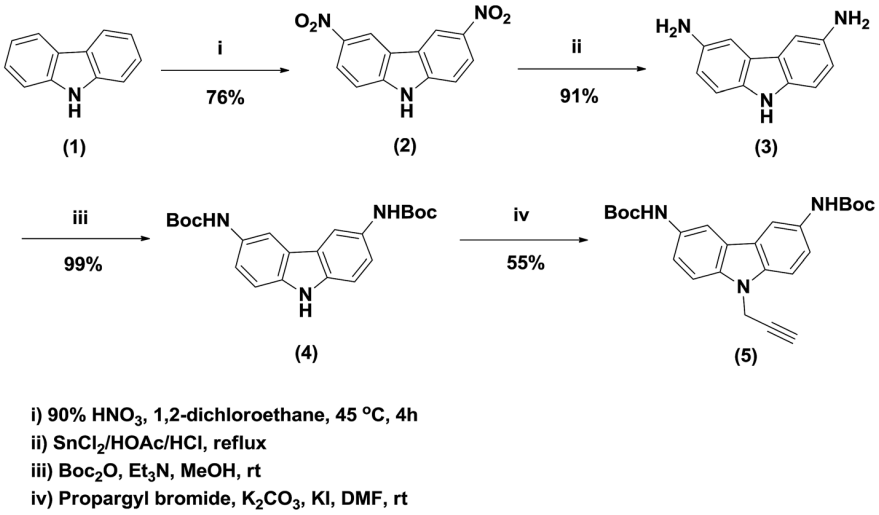
From the remarkable photophysical properties and DNA binding ability mentioned above, carbazole has a potential to be developed into a probe for DNA detection by fluorescence spectroscopy. In the present work, an electron rich carbazole derivative, namely 3,6-diaminocarbazole (DAC), was incorporated at an internal position of acpcPNA in order to develop a new self-reporting fluorescence hybridization probe. Here we report the synthesis, thermal stabilities and fluorescence properties of DAC-modified acpcPNA probes, as well as their ability to discriminate between complementary and single-mismatched DNA targets. Moreover, molecular dynamics simulation was performed to explain the behavior of DAC-labeled acpcPNA probes.

Results and discussion

Synthesis of diaminocarbazole (DAC)-labeled PNA

A novel clickable 3,6-diaminocarbazole for labeling of the acpcPNA was first prepared. N^9-Propargylated, Boc-protected-3,6-diaminocarbazole (**5**) was prepared in 4 steps with 37% overall yield starting from carbazole (Scheme 1). Controlled nitration of the carbazole (**1**) with fuming nitric acid in 1,2-dichloroethane at 45 °C afforded the dinitration product **2** in good yield. Subsequent reduction of the dinitro-compound **2** with tin(II) chloride in a mixture of acetic acid and concentrated hydrochloric acid provided the desired diaminocarbazole **3** in excellent yield after simple precipitation. The amino groups in **3** were protected to avoid undesired side reactions at this position during subsequent steps. Boc group was chosen as it could be easily introduced and subsequently cleaved under acidic conditions required for the cleavage of the modified PNA from the solid support. The Boc-protected DAC (**4**) was next alkylated with propargyl bromide in the presence of K_2CO_3/KI to get the desired clickable diaminocarbazole derivative (**5**).

AcpcPNA sequences were synthesized manually by Fmoc solid phase peptide synthesis as described previously.[27,35] In order to provide a handle for attachment of the DAC *via* the previously reported reductive alkylation-Click chemistry strategy,[34] one of the 2-amino cyclopentanecarboxylic acid (ACPC) spacer in the middle of the acpcPNA strand was replaced with 3-aminopyrrolidine-4-carboxylic acid (APC) for internal labeling.[35] For terminal labeling, no modification with APC was required, but the last ACPC residue was omitted from the PNA sequence. After end-capping by acetylation (this step was skipped for the terminal modification) and removal of all protecting groups from the nucleobase and the APC spacer, the azide group was introduced by reductive alkylation with 4-azidobutanal. Finally, the clickable DAC label (**5**) was attached to the azide-modified acpcPNA on the solid support by Cu-catalyzed click chemistry. Four DAC-modified acpcPNA sequences were designed to investigate the DNA binding and fluorescent properties under different sequence context. These include an internally-labeled homothymine (**T9^{DAC}**), two internally-labeled mix sequences with different flanking bases (A/T and C/G pairs) (**M10AT^{DAC}** and **M10GC^{DAC}**) and a terminally-labeled mix sequence (**DAC-M10**). All modified PNAs were purified by reverse phase HPLC (to >90% purity). The identities of the obtained PNA sequences were confirmed by MALDI-TOF mass spectrometry, which showed the mass signals that are in a good agreement with the expected values. The sequences and characterization data of all PNA involved in this studies are shown in Table 1.



Scheme 1 Synthesis of clickable 3,6-diaminocarbazole label (**5**).

Table 1 Sequence and characterization data of DAC-labeled acpcPNA

PNA	Sequence (N → C)	t_R[a] (min)	Yield[b] (%)	m/z (calcd)	m/z (found)
T9^{DAC}	Ac-TTTT$^{(DAC)}$TTTTT-LysNH$_2$	32.0	5.8	3513.6	3512.4
M10AT^{DAC}	Ac-GTAGA$^{(DAC)}$TCACT-Lys NH$_2$	29.5	5.2	3892.8	3894.1
M10GC^{DAC}	Ac-GTAGC$^{(DAC)}$GCACT-Lys NH$_2$	27.7	4.4	3893.8	3893.2
DAC-M10	DAC-GTAGATCACT-Lys NH$_2$	29.0	5.4	3738.8	3738.3

[a] HPLC condition: C18 column 4.6 × 50 mm, particle size 3 μm, gradient 0.1% TFA in H_2O : MeOH 90 : 10 for 5 min then linear gradient to 10 : 90 over 30 min, flow rate 0.5 mL min^{-1}. [b] Isolated yield after HPLC.

Thermal stability and fluorescent properties of DAC-labeled acpcPNA

To investigate the binding properties with DNA, the stabilities of complementary and mismatched DAC-modified PNA·DNA hybrids were determined by thermal denaturation experiments. Thermal stability (T_m) and fluorescent properties of DAC-labeled acpcPNA are summarized in Table 2. The complementary DNA hybrid of **T9^{DAC}** sequence showed a T_m of 65.2 °C, which was considerably lower than the corresponding DNA hybrid of unmodified T9 acpcPNA (>80 °C). The T_m of the DNA hybrid of the **M10AT^{DAC}** sequence of 53.4 °C was also reduced compared to the unmodified PNA (57.0 °C). This suggests that the internal modification with the DAC dye destabilizes the acpcPNA·DNA duplex, probably due to steric effect. This behavior was also observed in our previous studies with the same apc/acpcPNA system with different labels.[34,35] The mix-base sequences PNA **M10GC^{DAC}** and **DAC-M10** showed T_m values of 59.0 and 58.2 °C, respectively. The T_m value of the terminally DAC-modified **DAC-M10** duplex was in fact larger than that of the unmodified duplex (ΔT_m = +1.2 °C). This can be explained by the additional stabilization from the end stacking of the DAC at the terminal base pair of the PNA·DNA duplex as observed in the case of pyrene label.[31] All single mismatched PNA·DNA hybrids exhibited considerably lower T_m than complementary hybrids (ΔT_m = −27.0 to −41.6 °C for **T9^{DAC}** and −18.4 to −28.9 °C for **M10GC^{DAC}**/**M10AT^{DAC}** and less than −38.2 °C for **DAC-M10**). The ΔT_m values are comparable to those of unmodified PNA, which indicated that the base pairing specificity of the DAC-labeled acpcPNA remained high.

Next, fluorescence experiments were performed with all PNA sequences and their DNA hybrids. The responsiveness of the PNA probe was reported in terms of fluorescence intensity ratio (F/F_0; where F = fluorescence intensity of PNA·DNA hybrid, F_0 = fluorescence intensity of single stranded PNA; λ_{ex} 315 nm; λ_{em} 450 nm). While free 3,6-diaminocarbazole showed a high Φ_F of 0.489, all internally-labeled single stranded PNA probes exhibited very low Φ_F values of 0.01 or less, regardless of the identity of the neighboring nucleobase (Table 2, entries 1, 6, 11). This suggests that the DAC label is quenched upon incorporation into the PNA, probably by interactions with the nucleobases similar to pyrene.[31] The sequences **M10AT^{DAC}** and **T9^{DAC}** showed lower quantum yields than **M10GC^{DAC}**, which means that A/T are better quenchers than C/G bases for DAC label. Nevertheless, judging from the uniformly low quantum yields of all PNA probes, the difference in quenching efficiency by different nucleobases is much less than pyrene, which emphasizes the important feature of the DAC label.[31]

Table 2 Thermal stability (T_m) and fluorescence properties of DAC-labeled acpcPNA[a]

Entry	PNA	DNA (3′ → 5′)	T_m (°C)	F/F_0	Φ_F	Φ_F (ds)/Φ_F (ss)[b]	Notes[c]
1	**T9^{DAC}**	None	—	—	0.009	—	ss
2		AAAAAAAAA	65.2	35.5	0.242	26.7	comp
3		AAAACAAAA	33.7	18.6	0.139	15.3	smC
4		AAAAGAAAA	23.6	6.0	0.041	4.5	smG
5		AAAATAAAA	38.2	15.7	0.160	17.6	smT
6	**M10AT^{DAC}**	None	—	—	0.007	—	ss
7		AGTGATCTAC	53.4	13.2	0.083	11.9	comp
8		AGTGCTCTAC	29.0	2.7	0.012	1.7	smC
9		AGTGGTCTAC	24.5	1.7	0.014	2.0	smG
10		AGTGTTCTAC	35.0	6.5	0.034	4.8	smT
11	**M10GC^{DAC}**	None	—	—	0.011	—	ss
12		AGTGCGCTAC	59.0	10.2	0.117	11.1	comp
13		AGTGATCTAC	30.8	4.9	0.099	9.4	smA
14		AGTGGTCTAC	33.4	7.0	0.085	8.0	smG
15		AGTGTTCTAC	39.2	9.1	0.104	9.9	smT

[a] All measurements were performed in 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), [PNA] = 1.0 μM, [DNA] = 1.2 μM, λ_{ex} 315 nm, λ_{em} 450 nm. [b] Quantum yields were measured in phosphate buffer using quinine sulfate (0.540) as a reference. [c] ss = single stranded PNA, comp = complementary, sm = single mismatched.

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2016

A remarkable increase in fluorescence signal was observed upon hybridization with complementary DNA, as shown by the fluorescence intensity ratio (F/F_0) between 10.2 and 35.5 (Table 2, entries 2, 7, 12). The quantum yield of the DAC-labeled PNA·DNA duplexes was also consistently increased by >10-fold to around 0.08–0.24, which is still considerably lower than the free DAC (**3**). This indicates that the interaction between the DAC and the neighboring nucleobases is reduced in PNA·DNA duplexes due to the formation of base pairs. This behavior is similar to pyrene label and a similar mechanism of fluorescence increase is proposed.[31] It should be noted that free DAC also interact with single stranded DNA, resulting in fluorescence quenching, which is consistent with the proposed mechanism (see ESI Fig. S22†). CD spectra of **M10GC^{DAC}** and its complementary DNA hybrid (see ESI Fig. S23†) also clearly confirms the formation of PNA·DNA hybrids as shown by the change in CD signals at 210 and 260 nm. No CD signal was observed in the UV absorption region of DAC, suggesting that the DAC label was not well-oriented and thus did not appreciably interact with the PNA·DNA duplex.

Single mismatched PNA·DNA hybrids generally showed smaller fluorescence increase, but some variations in the sequence context were observed (Fig. 1). The **M10AT^{DAC}** showed a better mismatch discrimination than the **T9^{DAC}** and **M10GC^{DAC}** probes. Possible explanation is that certain mismatched PNA·DNA hybrids (Table 2, entries 3, 5, 10, 13–15) are still sufficiently stable at 20 °C – the temperature at which the fluorescent experiments were carried out. Completely unrelated DNA target provided a signal that was indistinguishable from the single stranded probes in all cases. For terminal labeled PNA probe **DAC-M10**, no fluorescence change could be observed for both complementary and mismatched DNA targets (Fig. 1b). Since the single stranded PNA probe exhibited low fluorescence similar to internally labeled PNA probes, it can be concluded that the quenching by neighboring nucleobases still operates. T_m measurement confirms the strong binding between the **DAC-M10** probe and DNA in a sequence specific fashion (58 °C for complementary duplexes and <20 °C for mismatched

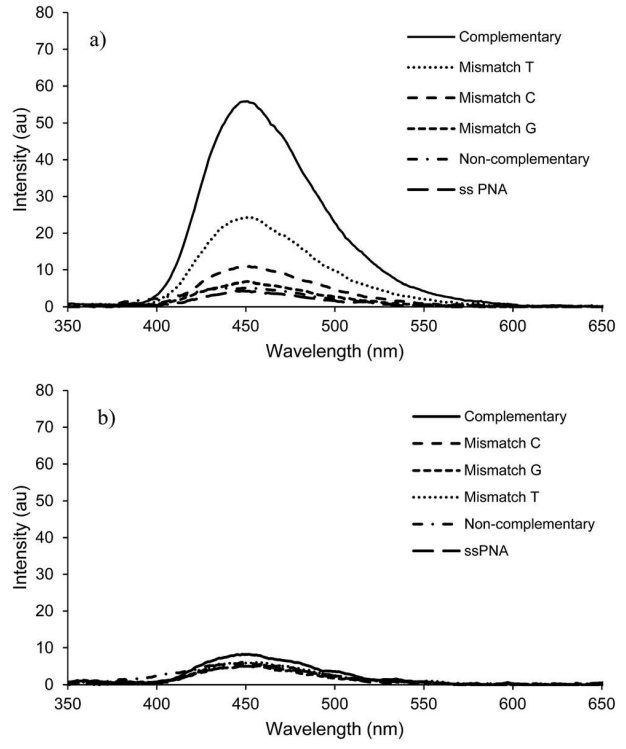


Fig. 1 Fluorescence spectra of DAC-labeled acpcPNA with complementary, single mismatch, non-complementary and single strand form of (a) **M10AT^{DAC}** (b) **DAC-M10**. Conditions: 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0 at 25 °C, [PNA] = 1.0 μM and [DNA] = 1.2 μM, excitation wavelength = 315 nm. Complementary DNA = AGTGATCTAC, mismatch C DNA = AGTGCTCTAC, mismatch G DNA = AGTGGTCTAC and mismatch T DNA = AGTGTTCTAC.

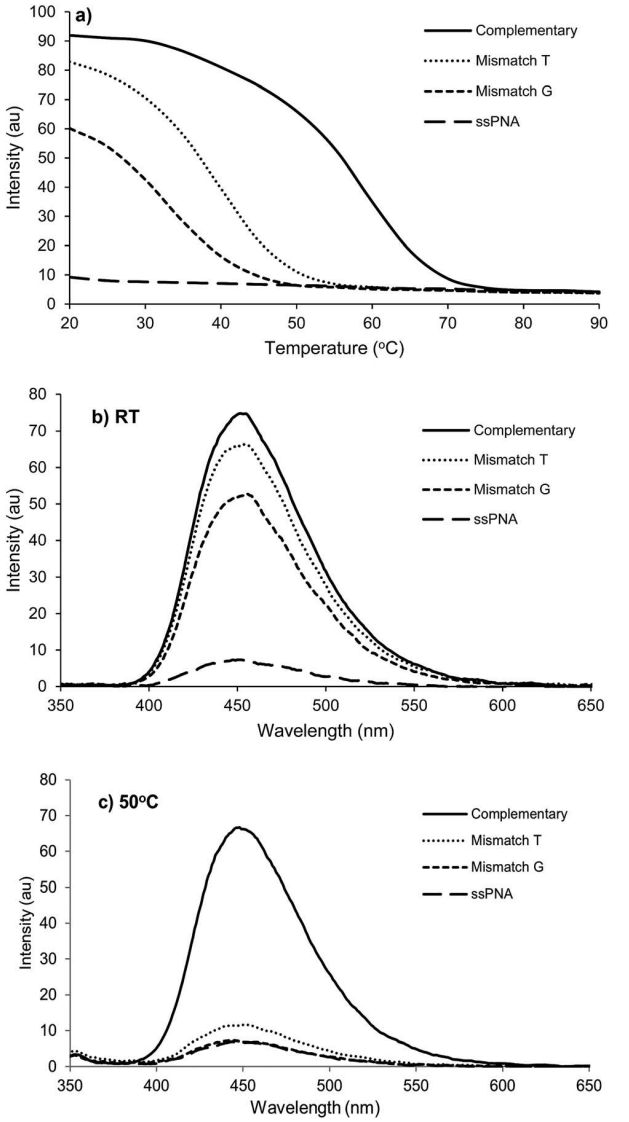


Fig. 2 (a) Fluorescence melting curves of **M10GC^{DAC}** (b) fluorescence spectra of **M10GC^{DAC}** at RT (c) fluorescence spectra of **M10GC^{DAC}** at 50 °C. All experiments was performed in 10 mM phosphate-buffered pH 7.0, [PNA] = 1.0 μM, [DNA] = 1.2 μM, λ_{ex} 315 nm, PMT voltage = medium.

duplexes). The absence of fluorescence increase upon duplex formation was therefore explained by the interaction between the DAC and the terminal GC base pair of the PNA·DNA duplex similar to the pyrene label.[31]

These results clearly demonstrate that the fluorescence of internally DAC-labeled acpcPNA is low in single stranded PNA probes due to quenching by neighboring nucleobases, especially T and A bases. This interaction diminished – resulting in a large fluorescence increase – when the PNA·DNA duplexes are formed, provided that the DAC label does not locate at the end of the duplex which allows interactions with the terminal base pairs.

Improving single mismatch discrimination of the DAC-labeled acpcPNA probes

Although the T_m measurement indicated the high specificity as shown by a large decrease in the T_m values between complementary and single mismatch PNA·DNA duplexes (ΔT_m ranging from −18.4 to −31.5 °C), but the fluorescence spectra of certain mismatch duplexes still showed relatively high fluorescence signal. Based on a hypothesis that the high fluorescence was due to the high stability of some mismatched duplexes at room temperature, the temperature was increased to improve the single mismatch discrimination by fluorescence spectrophotometry. Single mismatch hybrids should dissociate more easily than complementary hybrids, and therefore the temperature increase should be able to enhance the mismatch discrimination ability of DAC-labeled acpcPNA. The experiment was carried out only with the complementary hybrids and mismatched hybrids that does not show satisfactory discrimination in Table 2. The fluorescence spectra were measured at different temperature from 20 °C to 90 °C (see ESI†). Upon heating, the duplex dissociated with concomitant decrease in the fluorescence intensity. The plots between the fluorescence signal at 450 nm and temperature appeared in the form of reverse S-curves (Fig. 2a).

Since the maximal difference will be obtained at the temperature whereby the mismatched duplexes were dissociated as much as possible and the complementary duplexes are still stable, it is important to vary the temperature to find the optimal value case by case. The specific temperature that provided maximum differentiation in the case of **T9^{DAC}**, **M10AT^{DAC}** and **M10GC^{DAC}** was 55, 45 and 50 °C, respectively. The mismatched hybrids of **T9^{DAC}** and **M10GC^{DAC}** were more stable than those of **M10AT^{DAC}** and therefore required a higher temperature to complete the separation. At the aforementioned optimal temperature, the fluorescence ratio between complementary and single mismatch hybrids improved from 1.0–2.5 folds to 6.0–21.1 folds (Fig. 2b and c and Table 3). The results confirm that the specificity of DAC-labeled acpcPNA in distinguishing between complementary and single-mismatched DNA by DAC-labeled PNA probes can be improved by simply increasing the temperature without requiring more complex operations such as enzymatic digestion.

Next, to support the proposed mechanism of fluorescence change of the DAC-labeled PNA probe, molecular dynamics simulation and energy calculation were performed on both single stranded and duplex PNA probe.

Molecular modeling

MD structures. For both simulated systems (ssPNA and PNA·DNA duplex), the structure of DAC started by pointing to bulk solvent was rolled and close to PNA strand after 0.5 ns and then fluctuated in such position along 10 ns of simulation time, as displayed in Fig. 3. The root mean squared deviations (RMSDs) of the MD structures with respect to their starting structures were 4.42 ± 0.67 Å and 4.02 ± 0.40 Å for ssPNA and PNA·DNA systems, respectively, averaged over the last 2000 structures, see Fig. S25† for the RMSD profiles. Clearly, single stranded PNA provides larger fluctuation because of a less restriction of its structure. The average structure revealed that the DAC is closer to the nucleobases in the single stranded PNA than that in the PNA·DNA

Table 3 Comparison of F/F_0 of DAC-labeled acpcPNA at room temperature and high temperature[a]

Entry	PNA	DNA (3′ → 5′)	F/F_0 (25 °C)	F_{comp}/F_{mm} (25 °C)	F/F_0 (high temp)[b]	F_{comp}/F_{mm} (high temp)[b]
1	**T9^{DAC}**	AAAAAAAAA	35.4	—	35.7	—
2		AAAACAAAA	18.6	1.9	2.5	14.2
3		AAAAGAAAA	6.0	5.9	—	—
4		AAAATAAAA	15.7	2.3	1.7	21.1
5		TTTTTTTTT	1.1	32.4	—	—
6	**M10AT^{DAC}**	AGTGATCTAC	13.2	—	12.9	—
7		AGTGCTCTAC	2.6	5.2	1.3	10.0
8		AGTGGTCTAC	1.6	8.2	—	—
9		AGTGTTCTAC	5.7	2.3	1.2	10.6
10		GGGGGGGGGG	1.2	10.9	—	—
11	**M10GC^{DAC}**	AGTGCGCTAC	10.1	—	10.2	—
12		AGTGATCTAC	5.3	1.9	—	—
13		AGTGGTCTAC	7.1	1.4	1.0	10.3
14		AGTGTTCTAC	9.0	1.1	1.7	6.0
15		GGGGGGGGGG	0.9	11.1	—	—

[a] All measurements were performed in 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), [PNA] = 1.0 μM, [DNA] = 1.2 μM, λ_{ex} 315 nm, λ_{em} 450 nm. [b] High temperature: **T9^{DAC}** = 55 °C; **M10AT^{DAC}** = 45 °C; **M10GC^{DAC}** = 50 °C.

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2016

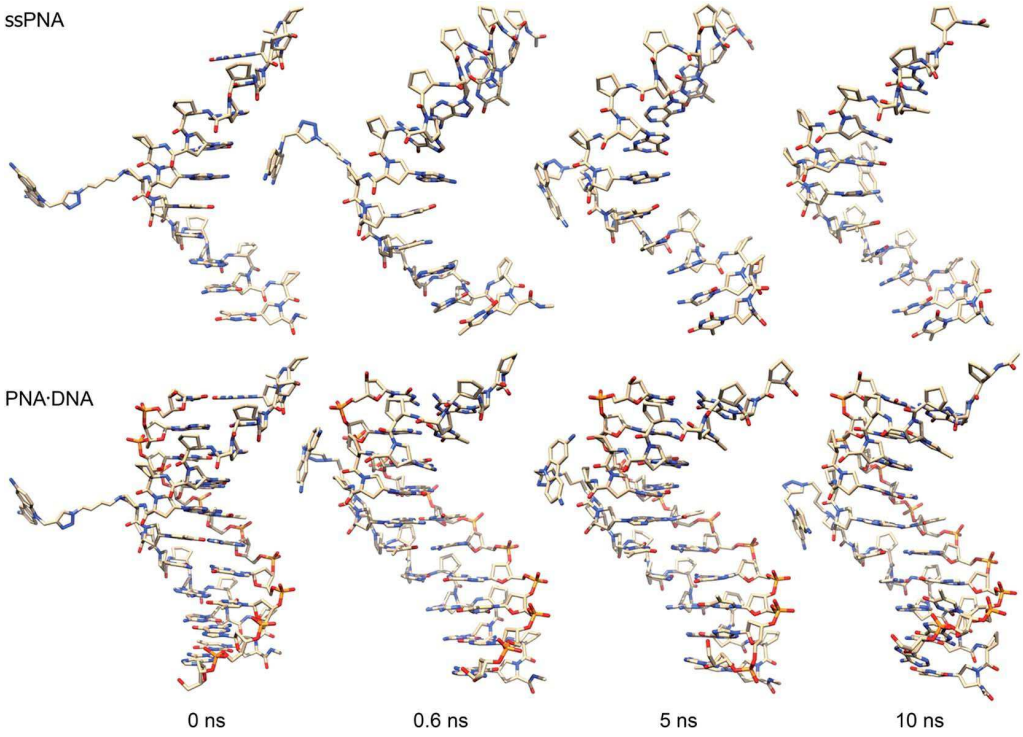


Fig. 3 MD snapshots of a single stranded PNA and the corresponding PNA·DNA duplex.

duplex (Fig. 4), which should lead to a larger interaction between DAC and PNA for the single stranded PNA system.

Energy calculation. In order to investigate the DAC–PNA interactions between DAC and nucleobases in single stranded PNA as well as PNA·DNA duplexes in more details, we have calculated the binding energy between the DAC and three closest PNA nucleobases, whereas other fragments were omitted. The calculations were performed using Gaussian 09 program with the density functional theory B3LYP/6-31G* level based on the average MD structures for ssPNA and PNA·DNA systems. As shown in Table 4, the binding energy of single stranded PNA system is significantly higher than that of PNA·DNA duplex. This confirms that there are stronger interactions between DAC and nucleobases in single stranded PNA than in PNA·DNA duplex, and further supports the mechanism of fluorescence change proposed above.

Table 4 The binding energy ($\Delta E_{binding}$) between DAC and three closest PNA nucleobases[a]

System	$\Delta E_{binding}$ (kcal mol^{-1})
ssPNA	−11.40
PNA·DNA	−3.86

[a] The calculation is expressed as $\Delta E_{binding} = E_{DAC-PNA} - E_{DAC} - E_{PNA}$, where $E_{DAC-PNA}$, E_{DAC} and E_{PNA} are the total energy of DAC and three PNA nucleotides, DAC moiety and three PNA nucleotides, respectively.

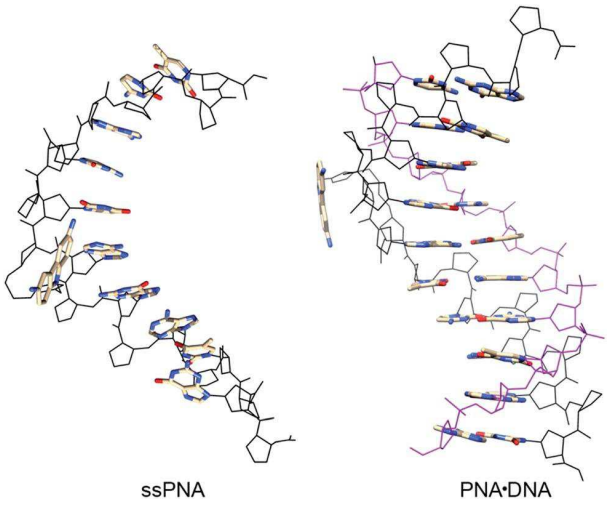


Fig. 4 Average MD structures of single stranded PNA and PNA·DNA duplex.

Experimental section

General procedures

Carbazole (reagent grade for synthesis) was purchased from Merck. All reagent grade chemicals and solvents were purchased from standard suppliers and were used without further purification. ^{1}H and ^{13}C NMR spectra were recorded on Bruker Avance 400 NMR spectrometer operating at 400 MHz for ^{1}H and 100 MHz

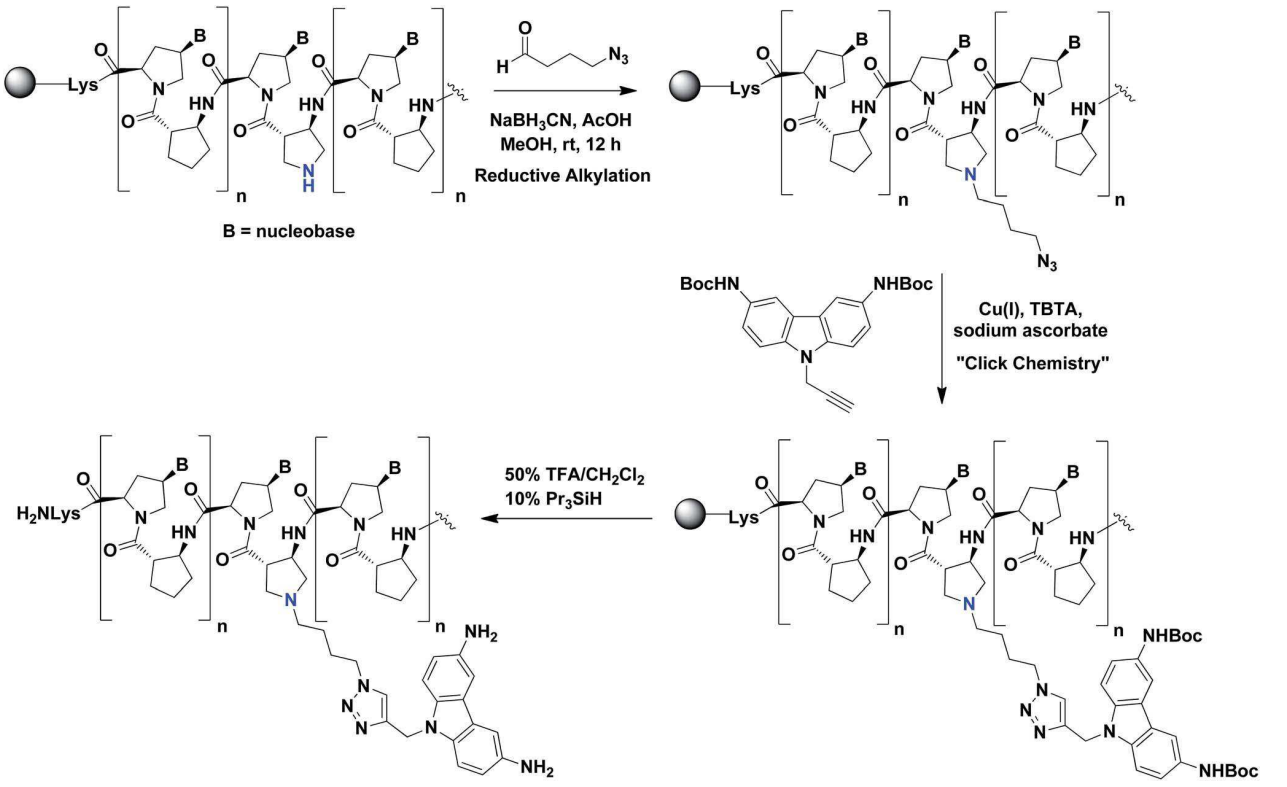
for ^{13}C. RP-HPLC experiments were performed on a Waters Delta 600 HPLC system. Oligonucleotides were obtained from Pacific Science (Thailand) or BioDesign (Thailand).

N^9-Propargyl-3,6-bis(*tert*-butoxycarbonylamino)carbazole (5)

A reaction mixture containing 3,6-bis(*tert*-butoxycarbonylamino) carbazole (**4**) (0.80 g, 2.00 mmol) (see ESI†), propargyl bromide (0.28 mL, 3.00 mmol), KI (0.33 g, 2.00 mmol) and K_2CO_3 (2.77 g, 20.0 mmol) in dry DMF (5 mL) was stirred under N_2 atmosphere at room temperature overnight. The reaction mixture was diluted with water and extracted with CH_2Cl_2. The combined organic extracts were washed with water and brine, dried over anhydrous Na_2SO_4 and evaporated to dryness. The crude product was purified by column chromatography on silica gel to obtain the pure compound as a yellow solid. ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ 1.49 (s, 18H), 3.20 (t, $J = 2.2$ Hz, 1H), 5.18 (s, 2H), 7.41 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.49 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 8.21 (s, 2H), 9.30 (s, 2H) ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6): δ 153.2, 136.2, 131.9, 122.3, 118.2, 109.5, 79.2, 78.7, 74.3, 31.9, 28.2, 27.9; IR: 3397, 3254, 2974, 2112 (C≡C), 1720, 1702 (C═O), 1524, 1490, 1048, 1023, 864, 792, 578 cm^{-1}; HRMS (ESI+): *m*/*z* calcd for $C_{25}H_{29}N_3O_4Na^+$: 458.2056 $[M + Na]^+$ found: 458.2092, *m*/*z* calcd for $C_{25}H_{29}N_3O_4K^+$: $[M + K]^+$ 474.1795 found: 474.1826.

Synthesis, purification and characterization of DAC-modified acpcPNA

The apc-modified acpcPNA was synthesized *via* solid phase peptide synthesis using the four Fmoc-protected pyrrolidine monomers (Fmoc-A^{Bz}-OPfp, Fmoc-T-OPfp, Fmoc-C^{Bz}-OPfp, and Fmoc-G^{Ibu}-OPfp) and spacers [Fmoc-(1*S*,2*S*)-ACPC-OPfp, Fmoc-(3*R*,4*S*)-APC(Tfa)-OPfp] at 1.5 μmol scale on Tentagel S-RAM resin according to the previously published protocol.[27,28,35] Lysine was included at the C-terminus in the form of Fmoc-Lys(Boc)-OPfp to improve the water solubility of the PNA. After completion of the PNA synthesis, the N-terminal Fmoc group was removed and the free amino group was capped by acetylation. The apc-modified acpcPNA was split to 0.5 μmol portions for further labeling experiments. The nucleobase protecting groups (Bz, Ibu) and APC spacer protection (Tfa) were removed by heating with 1 : 1 aqueous ammonia/dioxane at 60 °C overnight. The apc-modified acpcPNA (0.5 μmol) was alkylated at the pyrrolidine ring nitrogen of the APC spacer with 4-azidobutanal (15 μmol, 30 equiv.) in the presence of sodium cyanoborohydride (30 μmol, 60 equiv.) and acetic acid (30 μmol, 60 equiv.) in methanol (100 μL) at room temperature overnight.[34] The azide-modified acpcPNA was further reacted with N^9-propargyl-3,6-bis(Boc-amino)carbazole (**5**) (7.5 μmol, 15 equiv.) while still attached on the solid support in the presence of tris[(1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4yl)methyl]amine (TBTA, 30 μmol, 60 equiv.), tetrakis(acetonitrile)copper(I) hexafluorophosphate (15 μmol, 30 equiv.) and (+)-sodium-L-ascorbate (60 μmol, 120 equiv.) in 3 : 1 (v/v) DMSO : ^{t}BuOH at room temperature overnight.[34] After the reaction was completed as monitored by MALDI-TOF analyses (12 h), the diaminocarbazole-modified acpcPNA was cleaved from the resin with 50% trifluoroacetic acid (TFA) in dichloromethane



Scheme 2 Synthesis of DAC-modified acpcPNA.

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2016

and 10% triisopropylsilane (TIS) (500 μL × 30 min × 3). The combined cleavage solution was dried under a stream of nitrogen gas and the crude PNA was precipitated by addition of diethyl ether (Scheme 2). The crude PNA was purified by reverse-phase HPLC with using mobile phase A : B (A: 0.1% TFA in H_2O; B: 0.1% TFA in MeOH) 9 : 1 for 5 min followed by a linear gradient to A : B 1 : 9 over 55 min. The purified PNA was characterized by MALDI-TOF mass spectrometry (Microflex, Bruker Daltonics) by using α-cyano-4-hydroxy-cinnamic acid (CCA) as a matrix.

Spectroscopic experiments

All samples were prepared at PNA concentration = 1.0 μM and DNA concentration = 1.2 μM in 10 mM phosphate buffer pH 7.0. UV-visible spectra and thermal stabilities (T_m) were measured on a CARY 100 Bio UV-vis spectrophotometer at 260 nm from 20–90 °C at a rate of 1 °C min^{-1}. The melting temperatures were determined from first derivative plots. Fluorescence spectra were measured on Cary Eclipes Fluorescence Spectrophotometer at excitation wavelength of 315 nm. Both excitation and emission slits were set to 5 nm and PMT voltage = medium.

Fluorescence quantum yield (Φ_F) measurement

The fluorescence quantum yield (Φ_F) of 3,6-diaminocarbazole (**3**), single stranded-PNA and PNA·DNA duplexes [$\mathbf{T9^{DAC}}$, $\mathbf{M10AT^{DAC}}$ and $\mathbf{M10GC^{DAC}}$] were calculated using quinine sulfate ($\Phi_F = 0.540$) as a ref. 36 Absorption and fluorescence spectra were measured on CARY 100 Bio UV-vis spectrophotometer (Varian) and CARY Eclipse Fluorescence spectrophotometer (Varian/Agilent Technologies), respectively. Seven concentrations (1.0, 2.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.0 μM) of quinine sulfate samples in phosphate buffer were prepared from a stock solution (1.0 mM quinine sulfate in 0.1 M H_2SO_4). The absorbance at 315 nm was less than 0.1 for all concentrations. The magnitudes of integrated fluorescence intensity were plotted against the absorbance of the solution absorbance. The quantum yield of sample was then calculated according to eqn (1).[31]

$$\Phi_F(\text{sample}) = \Phi_F(\text{standard})[m(\text{sample})/m(\text{standard})][\eta(\text{sample})^2/\eta(\text{standard})^2] \quad (1)$$

where m is the slope from the plot of integrated fluorescence intensity *vs.* absorbance and η is the refractive index of the solvent.

Molecular dynamics (MD) simulation. MD simulations were performed on single stranded acpcPNA with a sequence of GTAGATCACT whereby the DAC was linked to the apc spacer at the underlined position, and the corresponding acpcPNA·DNA duplex. Because the three-dimensional structures of ssPNA and PNA·DNA duplex were not available, the starting structure of PNA·DNA duplex was built up based on the corresponding sequence of DNA·DNA duplex (dGTAGATCACT·dAGTGATCTAC) which was generated using the NAB module of the AMBER 12 package.[37] The first strand of the duplex was replaced with PNA strand in an antiparallel direction yielding the PNA·DNA duplex.[38] The structure of diaminocarbazole (DAC) linked to backbone of PNA was first optimized with B3LYP/6-31G* calculation using Gaussian 09 (ref. 39) before adding to the PNA strand. The initial structure of single stranded acpcPNA was obtained in a similar manner. The force field parameters of the PNA and DAC were generated using the standard procedure.[38] To setup the simulations, the starting structure of each system was immersed in a rectangular water box with TIP3P water molecules[40] extended by 10 Å in each direction from the solute and then neutralized by adding Na^+ counterions (for PNA·DNA system). The MD simulations were carried out using AMBER 12 suite of program with parm10 force field complemented with the prepared parameters of PNA and DAC, SHAKE algorithm[41] employed for all hydrogen atoms, a 9 Å cutoff applied to the non-bonding Lennard-Jones interactions, the particle mesh Ewald method used to account for long-range interactions,[42] time step of 1 fs and NPT ensemble ($P = 1$ atm and $T = 300$ K). The simulation protocol consists of heating, equilibration and production steps, and was described in details elsewhere.[38] The MD trajectories were generated for 10 ns and the coordinates were stored every 1 ps, totally 10 000 structures.

Conclusion

In conclusion, we successfully synthesized novel internally and terminally 3,6-diamino-carbazole-labeled acpcPNA and evaluated their binding and fluorescence properties. Thermal denaturation experiments revealed the high stability (T_m 53.4–65.2 °C) and high specificity (ΔT_m > 20 °C) of PNA·DNA hybrid similar to unmodified acpcPNA. Single stranded DAC-labeled acpcPNA showed low fluorescence signals due to quenching of the DAC label with neighboring nucleobases. After hybridization with DNA, the internally DAC-labeled acpcPNA showed moderate to large fluorescence increase (10.1–35.5 folds) compared to the single stranded PNA. The specificity was further improved to allow discrimination between complementary and single mismatched DNA targets by increasing the temperature. Terminally DAC-labeled acpcPNA showed no significant fluorescence change after hybridization with DNA. A model was proposed to explain the mechanism of fluorescence change, which was further supported by MD simulations and energy calculation. These results demonstrate the potential of DAC as a fluorescence label to be used in combination with oligonucleotide probes for detection of specific DNA sequences.

Acknowledgements

We acknowledge Naresuan University (NU grant No. P2558C371 to CS) and The Thailand Research Fund (DPG5780002, to TV and KS) for financial supports and National e-Science Infrastructure Consortium (URL: http://www.e-science.in.th) for computing resources. Partial technical supports by Ms Boonsong Ditmangklo (Chulalongkorn University) are also gratefully acknowledged.

References

1 M. K. Johansson, H. Fidder, D. Dick and R. M. Cook, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 6950–6956.
2 L. Giestas, G. N. M. Ferreira, P. V. Baptista and J. C. Lima, *Sens. Actuators, B*, 2008, **134**, 146–157.
3 E. G. Matveeva, Z. Gryczynski, D. R. Stewart and I. Gryczynski, *J. Lumin.*, 2010, **130**, 698–702.
4 P. Rashatasakhon, K. Vongnam, W. Siripornnoppakhun, T. Vilaivan and M. Sukwattanasinitt, *Talanta*, 2012, **88**, 593–598.
5 N. Maneelun and T. Vilaivan, *Tetrahedron*, 2013, **69**, 10805–10810.
6 B. S. Gaylord, A. J. Heeger and G. C. Bazan, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 896–900.
7 Z.-K. Xu, B.-K. Zhu and Y.-Y. Xu, *Chem. Mater.*, 1998, **10**, 1350–1354.
8 D. Li-yun, J. De-sheng, H. Jun, D. Lei, L. Cheng, W. Jun-tao and L. Bin, *Trans. Nonferrous Met. Soc. China*, 2006, **16**, s191–s194.
9 D. W. Kim, H. Moon, S. Y. Park and S. I. Hong, *React. Funct. Polym.*, 1999, **42**, 73–86.
10 I. F. Perepichka, D. D. Mysyk and N. I. Sokolov, *Synth. Met.*, 1999, **101**, 9–10.
11 X. Pan, S. Liu, H. S. O. Chan and S. C. Ng, *Macromolecules*, 2005, **38**, 7629–7635.
12 J. Sun, H.-J. Jiang, J.-L. Zhang, Y. Tao and R.-F. Chen, *New J. Chem.*, 2013, **37**, 977–985.
13 J. P. Chen and A. Natansohn, *Macromolecules*, 1999, **32**, 3171–3177.
14 A. Oral, S. Koyuncu and I. Kaya, *Synth. Met.*, 2009, **159**, 1620–1627.
15 S. Koyuncu, I. Kaya, F. B. Koyuncu and E. Ozdemir, *Synth. Met.*, 2009, **159**, 1034–1042.
16 F. B. Koyuncu, S. Koyuncu and E. Ozdemir, *Electrochim. Acta*, 2010, **55**, 4935–4941.
17 C.-H. Tao, N. Zhu and V. W.-W. Yam, *J. Photochem. Photobiol., A*, 2009, **207**, 94–101.
18 P. Thongkasee, A. Thangthong, N. Janthasing, T. Sudyoadsuk, S. Namuangruk, T. Keawin, S. Jungsuttiwong and V. Promarak, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2014, **6**, 8212–8222.
19 G. Sathiyan, E. K. T. Sivakumar, R. Ganesamoorthy, R. Thangamuthu and P. Sakthivel, *Tetrahedron Lett.*, 2016, **57**, 243–252.
20 B. Dumat, G. Bordeau, E. Faurel-Paul, F. Mahuteau-Betzer, N. Saettel, M. Bombled, G. Metgé, F. Charra, C. Fiorini-Debuisschert and M.-P. Teulade-Fichou, *Biochimie*, 2011, **93**, 1209–1218.
21 F. A. Tanious, D. Y. Ding, D. A. Patrick, R. R. Tidwell and W. D. Wilson, *Biochemistry*, 1997, **36**, 15315–15325.
22 F. A. Tanious, D. Y. Ding, D. A. Patrick, C. Bailly, R. R. Tidwell and W. D. Wilson, *Biochemistry*, 2000, **39**, 12091–12101.
23 F. A. Tanious, W. D. Wilson, D. A. Patrick, R. R. Tidwell, P. Colson, C. Houssier, C. Tardy and C. Bailly, *Eur. J. Biochem.*, 2001, **268**, 3455–3464.
24 T. Jia, J. Xiang, J. Wang, P. Guoa and J. Yu, *Org. Biomol. Chem.*, 2013, **11**, 5512–5520.
25 P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg and O. Buchardt, *Science*, 1991, **254**, 1497–1500.
26 M. Egholm, O. Buchardt, L. Christensen, C. Behrens, S. M. Freier, D. A. Driver, D. A. R. H. Berg, S. K. Kim, B. Norden and P. E. Nielsen, *Nature*, 1993, **365**, 566–568.
27 T. Vilaivan and C. Srisuwannaket, *Org. Lett.*, 2006, **8**, 1897–1900.
28 C. Vilaivan, C. Srisuwannaket, C. Ananthanawat, C. Suparpprom, J. Kawakami, Y. Yamaguchi, Y. Tanaka and T. Vilaivan, *Artif. DNA*, 2011, **2**, 50–59.
29 W. Mansawat, C. Vilaivan, A. Balazs, D. J. Aitken and T. Vilaivan, *Org. Lett.*, 2012, **14**, 1440–1443.
30 T. Vilaivan, *Acc. Chem. Res.*, 2015, **48**, 1645–1656.
31 C. Boonlua, B. Ditmangklo, N. Reenabthue, C. Suparpprom, N. Poomsuk, K. Siriwong and T. Vilaivan, *RSC Adv.*, 2014, **4**, 8817–8827.
32 S. Sezi, R. Varghese, T. Vilaivan and H.-A. Wagenknecht, *ChemistryOpen*, 2012, **1**, 173–176.
33 N. Yotapan, C. Charoenpakdee, P. Wathanathavorn, B. Ditmangklo, H.-A. Wagenknecht and T. Vilaivan, *Beilstein J. Org. Chem.*, 2014, **10**, 2166–2174.
34 B. Ditmangklo, C. Boonlua, C. Suparpprom and T. Vilaivan, *Bioconjugate Chem.*, 2013, **24**, 614–625.
35 N. Reenabthue, C. Boonlua, C. Vilaivan, T. Vilaivan and C. Suparpprom, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2011, **21**, 6465–6469.
36 W. H. Melhuish, *J. Phys. Chem.*, 1961, **65**, 229–235.
37 *AMBER 12*, University of California, San Francisco, 2012.
38 N. Poomsuk and K. Siriwong, *Chem. Phys. Lett.*, 2012, **588**, 237–241.
39 *GAUSSIAN 09 (Revision B.01)*, Gaussian, Inc., Wallingford, Connecticut, 2009.
40 W. L. Jorgensen, *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, **103**, 335–340.
41 J. P. Ryckaert, G. Cicotti and J. C. Berendsen, *J. Comput. Phys.*, 1997, **23**, 327–341.
42 T. Darden, D. York and L. Pedersen, *J. Chem. Phys.*, 1993, **98**, 10089–10092.

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2016

ChemPubSoc Europe

DOI: 10.1002/slct.201601075

Chemistry SELECT Full Papers

Biological Chemistry & Chemical Biology

Preparation and Performance Evaluation of a Pyrrolidinyl Peptide Nucleic-Acid-Based Displacement Probe as a DNA Sensor

Chalothorn Boonlua, Chayan Charoenpakdee, Tirayut Vilaivan, and Thanit Praneenararat*[a]

A new displacement probe based on pyrrolidinyl peptide nucleic acid was designed and evaluated for DNA sequence recognition. The probe was prepared by combining an *N*-terminally fluorophore-modified pyrrolidinyl peptide nucleic acid (Flu- or TMR-acpcPNA) and a 3'-Dabcyl-modified DNA as a quencher. Fluorescence studies showed that the fluorophore in the acpcPNA strand was efficiently quenched by the quencher strand. After some optimisation, the fluorescence was significantly restored upon the addition of the complementary DNA target, while the fluorescence stayed at a low level with the addition of mismatched DNA. Even with double-stranded DNA analytes, the high specificity of the PNA-based displacement probes allowed unambiguous discrimination between complementary and single mismatched DNA targets. Furthermore, immobilisation of the probes onto agarose resin could also recognise only the complementary DNA, thereby demonstrating its potential as a practical DNA sensor.

Introduction

Synthetic analogues of nucleic acids have been extensively studied as their utilities can have profound impact on a variety of scientific disciplines. Among these, peptide nucleic acid (PNA) remains as a prominent class of analogues that exhibits several promising properties such as great stability and high affinity towards nucleic acids (even higher than duplexes from nucleic acids themselves due to reduced electrostatic repulsion).[1] Of much interest to chemists is the development of novel types of PNAs with the aim to improve the binding affinity and specificity even further.[2] The conformational flexibility of the original aminoethylglycyl (aeg) backbone suggests considerable entropic penalty from conformation change to accommodate the duplex formation. Pyrrolidinyl PNA with a conformationally restricted PNA dipeptide backbone deriving from prolyl-aminocyclopentanecarboxylic acid (acpcPNA) was proposed by Vilaivan et al. to overcome this problem.[3] Owing to several by-design advantages over the original PNA such as higher affinity towards DNA, greater mismatch discrimination and exclusive binding in antiparallel fashion, this PNA system has been utilised in a number of applications, especially in the field of DNA sensor.[4]

Fluorescence resonance energy transfer (FRET) is a spectroscopic phenomenon that has been extensively studied and applied in several molecular systems including nucleic acids.[5] This process is known to provide a reliable means to gauge the distance between the donor and the acceptor due to its extremely sensitive nature to distance. Therefore, several forms of nucleic acids studies involving FRET have been demonstrated. For example, molecular beacons are a class of hybridisation probe that can report the presence of specific nucleic acid sequences by providing hybridisation-dependent conformational changes, which led to a change of the distance between the fluorescence reporter and the quencher, and thus the fluorescence.[6] Another important class of probes is nucleic acids displacement probes, whose designs can vary to serve diverse applications.[7] This type of probes is usually constructed by forming a double-stranded oligonucleotide - each strand would carry either a fluorescence reporter or a quencher (Figure 1). Initially, these molecular scaffolds arrange the dyes in

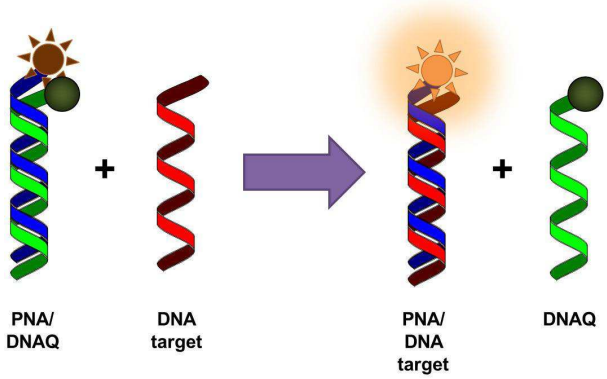


Figure 1. A typical construction of a displacement probe. A DNA target with higher duplex stability can displace a quencher-bound oligonucleotide to release the quencher and restore the fluorescence signal.

[a] *Dr. C. Boonlua, C. Charoenpakdee, Prof. T. Vilaivan, Prof. T. Praneenararat*
Organic Synthesis Research Unit, Department of Chemistry
Faculty of Science, Chulalongkorn University
Phayathai Rd., Pathumwan, Bangkok 10330, Thailand
E-mail: Thanit.P@chula.ac.th

Supporting information for this article is available on the WWW under http://dx.doi.org/10.1002/slct.201601075

© 2016 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

close proximity and quenching is effective. When the system is allowed to interact with another nucleic acid strand possessing higher affinity to any of the strands in the initial duplex, strand exchange will occur and a new duplex is eventually formed, thus restoring fluorescence as a result of the separation between the fluorophore and the quencher. The key to the success of displacement probes lies in the subtle difference in stabilities of probe-quencher duplex and probe-target DNA duplex. The quencher is usually designed to have slightly less affinity towards the probe than the DNA analyte so that it could be displaced later by the complementary DNA analyte. This could be achieved by two methods: 1) using quenchers with shorter length than the fluorophore probe; 2) using quenchers with some mismatches in the strand.[7a] After extensive investigations, this concept has been demonstrated in a number of studies, and paved the way to real applications such as the use of displacement probes in quantitative polymerase chain reaction (qPCR).[8]

Nevertheless, conventional probes based on natural oligonucleotides still have some limitations. For example, molecular beacons, despite being carefully designed, can occasionally suffer from complication from other unwanted intramolecular interactions. Sometimes this is found only after testing the probe in real experiments, thus leading to the process of re-tuning the probe with inevitably additional costs. In the case of DNA-based displacement probes, the minimum required length for reliable hybridisation is usually long enough to promote the formation of secondary structures. Thus, it can sometimes be tedious for the whole designing process to get suitable probes for certain DNA sequences. In this study, we aimed to investigate the possibility of adopting acpcPNA as a displacement probe. Since acpcPNA has greater affinity to DNA than DNA itself, the minimum length to obtain reliable hybridisation is much lower, i.e., a PNA strand with 10 nucleotides could serve as a probe. This, in addition to the low tendency of acpcPNA to form self-pairing duplexes, automatically simplifies the designing process. Regarding with the probe construction, this can be achieved by forming a duplex between a strand of acpcPNA containing a fluorophore, and another DNA strand containing a quencher. Thereafter, a DNA target can be recognised by allowing it to form a more stable duplex with the PNA strand, thereby releasing the quencher from the fluorophore and resulting in the increase of fluorescence (Figure 1). As anticipated, the new type of displacement probes was shown to provide reliable recognition power without complicated design or fine-tuning.[9] The design, construction, and performance evaluation of the acpcPNA displacement probes are described as follows.

Results and Discussion

Design, synthesis and characterisation of acpcPNAs and DNAs

We designed the displacement probes by appending acpcPNAs with a fluorophore (fluorescein or tetramethylrhodamine) at the *N*-terminus via the activated ester coupling (see experimental section). We chose to add the fluorophores on this end due to the ease of synthesis based on our previously established chemistry.[10] After the deprotection of the side-chain protecting groups and the cleavage of the PNA from the resin, fluorophore-labelled PNAs (Figure 2) were obtained. HPLC

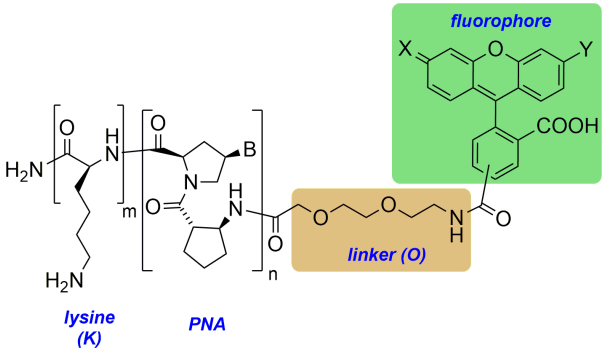


Figure 2. A general structure of fluorophore-appended acpcPNAs used in this study (B is a standard nucleobase (A, T, C, and G). X = O; Y = OH for fluorescein; X = NMe_2^+; Y = NMe_2 for tetramethylrhodamine).

analysis indicated that all synthesised PNAs were > 95 % purity, while MALDI-TOF mass spectrometry confirmed the identity of all synthesised PNA used in this work (Figure S1-S7 in the Supporting Information). Since it is known that acpcPNA binds to DNA only in anti-parallel arrangement (where the *N*- and *C*-termini correspond to the 5′ and 3′ ends, respectively),[10b] the DNA quenchers were thus modified with the dabcyl group on the 3′ end so that both counterparts are in close proximity for effective quenching upon duplex formation (Figure 1).

The sequences of PNAs and DNAs used in this study are shown in Table 1 and 2. There were mainly four PNA sequences in this study, with some variations of fluorophores and *C*-terminus extensions on the PNAs. DNA quenchers (DNAQ) were also varied to probe a variety of effects. In addition, melting temperatures (T_m) of selected duplexes were measured (Table S1) to gain some insight in the strand exchange process as discussed below.

Construction and evaluation of the displacement probes

To test the utility of the displacement probes, a series of fluorescence experiments was conducted with a model sequence corresponding to a shrimp white spot syndrome virus (WSSV) DNA.[11] In a preliminary experiment, **K1Flu1**, after mixing with the quencher carrying a mismatched base **dSmQ1**, exhibited significantly reduced fluorescence, which can be fully restored within 100 minutes (see Figure S8 in the Supporting Information for full spectra containing fluorescence signals at 10-min interval along with a kinetics plot at the wavelength of emission maximum) to the original level after the addition of the complementary single-stranded DNA, **DNA1a** (the 3′-terminal base was changed to adenine instead of guanine due to known quenching effect).[12] On the other hand, the

© 2016 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Table 1. The sequences of fluorophore-modified acpcPNAs, DNA quenchers (DNAQ), and DNA oligos used in this study.

Type	Name	Sequence	Name	Sequence
PNA	K1Flu1	Flu-O-CTAAATTCAGA-KNH_2	K1Flu2	Flu-O-AGTTATCCCTGC-KNH_2
	K4Flu1	Flu-O-CTAAATTCAGA-$KKKKNH_2$	K5Flu3	Flu-O-GCGCCGACTGTCGGCG-$KKKKKNH_2$
	K4TMR1	TMR-O-CTAAATTCAGA-$KKKKNH_2$		
DNAQ	dSmQ1	Dabcyl-GATTTACGTCT-5′	d8Q1	Dabcyl-GATTTAAG-5′
	dSmQ2	Dabcyl-TCAATTGGGACG-5′	d9Q2	Dabcyl-TCAATAGGG-5′
	dCmQ3	Dabcyl-CGCGGCTGACA-5′	d8Q2	Dabcyl-TCAATAGG-5′
DNA	DNA1a	3′-AATTTAAGTCT-5′	DNA2a	3′-TCAATAGGGACG-5′
	DNA1b	3′-AATTTACGTCT-5′	DNA2b	3′-TCAATTGGGACG-5′
	DNA1c	3′-AATTTAAGACT-5′	DNA2c	3′-TCAATCGGGACG-5′
	DNA1d	3′-AATTTTAGTCT-5′	DNA2d	3′-TCAATGGGGACG-5′
	DNA1e	3′-AATTGAAGTCT-5′	DNA2e	3′-TCAAAAGGGACG-5′
	DNA1f	3′-AACTTAAGTCT-5′	DNA2f	3′-TCAATAGCGACG-5′
	comp-dsDNA1	3′-ATACAATTTAAGTCTGAATC-5′+ 5′-TATGTTAAATTCAGACTTAG-3′	DNA3a	3′-CGCGGCTGACAGCCGC-5′
			DNA3b	3′-CGCGGCTTACAGCCGC-5′
	sm-dsDNA1	3′-ATACAATTTACGTCTGAATC-5′+ 5′-TATGTTAAATGCAGACTTAG-3′		

A, T, C and G are the abbreviations of the standard nucleobases, whereas K is lysine. The 2-aminoethoxyethoxyacetyl linker, used to join the *N*-terminal base and the fluorophore is abbreviated as *O*. Flu = fluorescein. TMR = tetramethylrhodamine. PNAs are written from *N* to *C* termini, while the orientations of DNAs are clearly noted. Red underlined bases are mismatches compared to the original sequences, while blue bases are extra hanging bases. Purple underlined bases are purposely placed mismatches due to a known quenching effect of the G base (see text).

fluorescence signal of **K1Flu1/dSmQ1** probe stayed at the quenching level after the addition of a single mismatched **DNA1b**, thereby demonstrating the discrimination power of this type of probes (Figure 3).

Next, the effect of the lysine linker at the *C*-terminus was studied. It was found that **K4Flu1**, having four units of lysine at the *C*-terminus, did not show significant difference when combined with the same quencher, **dSmQ1** (Figure S9 in the Supporting Information). We then investigated the scope of fluorophores in this probe setting by replacing fluorescein with tetramethylrhodamine. The probe **K4TMR1**, when combined with the quencher **dSmQ1**, could also effectively differentiate between the two DNA sequences described before (**DNA1a** vs **DNA1b**), indicating some flexibility in terms of fluorophores variety (Figure 4).

The difference in the level of fluorescence restoration between complementary and mismatched DNA targets, which may be defined as discrimination factor $[(F/F_0)_{comp}/(F/F_0)_{mismatch}]$, is most likely determined by the difference in stabilities between probe-quencher and probe-target duplexes. It is therefore important to choose a quencher probe that can form a sufficiently stable duplex with the PNA probe to exert effective quenching, and still allow strand exchange with complementary DNA target, but not with the mismatched DNA target. As shown in Table S1, the T_m values of the duplexes **K1Flu1/dSmQ1**, **K1Flu1/DNA1a** and **K1Flu1/DNA1b** are 53.5, 63.1 and 33.1 °C, respectively. It can be clearly seen that only **DNA1a** could displace the **dSmQ1** form the **K1Flu1/dSmQ1** to form a more stable **K1Flu1/DNA1a** duplex. The analogous

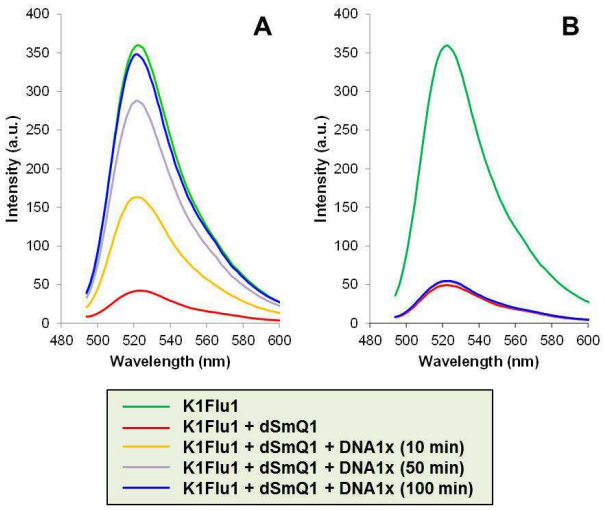


Figure 3. Fluorescence profiles of **K1Flu1/dSmQ1** in discriminating between A) complementary DNA (**DNA1 x** = **DNA1 a**), and B) single mismatched DNA (**DNA1 x** = **DNA1 b**). [**K1Flu1**] = 0.05 μM, [**dSmQ1**] = [**DNA1 x**] = 0.50 μM, excitation wavelength = 480 nm. All experiments were performed at 20 °C.

© 2016 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

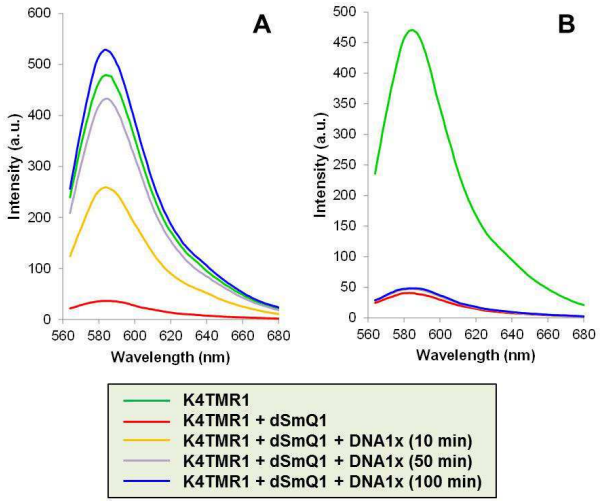


Figure 4. Fluorescence profiles of **K4TMR1/dSmQ1** in discriminating between A) complementary DNA (**DNA1 x** = **DNA1 a**), and B) single mismatched DNA (**DNA1 x** = **DNA1 b**). [**K4TMR1**] = 0.05 μM, [**dSmQ1**] = [**DNA1 x**] = 0.50 μM, excitation wavelength = 550 nm. All experiments were performed at 20 °C.

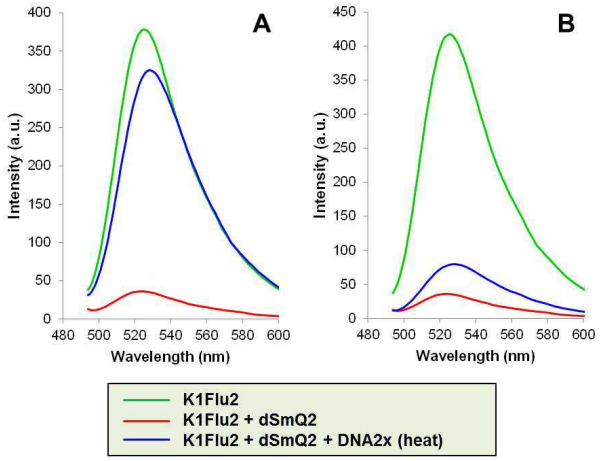


Figure 5. Fluorescence profiles of **K1Flu2/dSmQ2** in discriminating between A) complementary DNA (**DNA2 x** = **DNA2 a**), and B) single mismatched DNA (**DNA2 x** = **DNA2 b**). Heating was included at 95 °C for 5 min. [**K1Flu2**] = 0.05 μM, [**dSmQ2**] = [**DNA2 x**] = 0.50 μM, excitation wavelength = 480 nm.

exchange with **DNA1b** would be energetically unfavourable, resulting in a large discrimination factor of 7.5 between **DNA1a** and **DNA1b.** While the stability of the probe-target hybrid is fixed by their base sequence, the stability of the probe-quencher hybrid is tunable. The effect of different quencher sequences (shorter strand vs extra mismatches) was thus also investigated. In this regard, fluorescence profiles of another PNA probe, **K1Flu2**, with three DNA quenchers (**d8Q2**, **d9Q2**, and **dSmQ2**), were obtained. As expected, the longer quencher probe **d9Q2** reduced the fluorescence of **K1Flu2** to a greater degree (94% reduction, Figure S10) than did **d8Q2** (76% reduction, Figure S11) due to increased duplex stability from an extra base pair. On the other hand, the mismatched quencher probe **dSmQ2** exhibited 90% reduction (Figure S12), which is comparable to **d9Q2.** Based on quenching power, it could be concluded that both **d9Q2** and **dSmQ2** are suitable as a quencher for our displacement probe system. Nevertheless, the fluorescence restoration must also be taken into account. In this regard, although **K1Flu2/d8Q2** showed restoration that was significantly higher than the other two systems (Figure S13), we surmised that there is still room for improvement in terms of kinetics and discrimination power on all of these systems. Fortunately, heating the solution briefly seemed to promote the strand exchange,[13] and the fluorescence signals of **K1Flu2/dSmQ2** and **K1Flu2/d9Q2** were thus found to significantly increase (nearly instantly in almost all cases), albeit to different degrees which may reflect the different extent of the strand displacement reactions. Specifically, **dSmQ2** showed a greater extent of fluorescence restoration (Figure 5) than did **d9Q2** (Figure S14). Nevertheless, the discrimination factors suggested that **K1Flu2/d9Q2** gave higher factors to all mismatched targets compared to **K1Flu2/dSmQ2** and certainly **K1Flu2/d8Q2** (Table S5). Thus, although nearly complete fluorescence restoration may be generally desired, discrimination factors should rather be used to determine probe efficiency. In this particular case, **d9Q2** was likely a better quencher.

Encouraged by the results, we expanded the scope of the sensing system by testing all aforementioned probeswith more DNA sequences (**DNA1c**-**DNA1f** to be tested with **K1Flu1**/**dSmQ1**, **K4Flu1**/**dSmQ1**, and **K4TMR1**/**dSmQ1**; **DNA2c**-**DNA2f** to be tested with **K1Flu2**/**d8Q2**, **K1Flu2**/**d9Q2**, and **K1Flu2**/**dSmQ2**). As shown in Tables S2-S5, the complementary sequence gave fluorescence signals that were about 3.5-13 folds higher than those of mismatches (obtained by comparing fluorescence signals of the final time points with those before the addition of each DNA target). It is worth noting that this was found to be true for all systems tested (with an exception of only two cases where lower than 3.5-fold fluorescence change was observed), thereby showcasing the versatile nature of the PNA displacement probes. Although the absolute fluorescence values may vary from one experiment to another due to minor variation in concentrations and other parameters, the range of complementary/mismatched fluorescence ratios held pretty well, indicating that this system is robust enough for use with various probes and targets.

In addition, an extra-long PNA probe (**K5Flu3**) was also tested for its performance as a displacement probe, together with a complementary, but shorter-in-length quencher (**dCmQ3**). This 16-nt PNA represented a long PNA system that offers more flexibility in generating unique sequences for broader applications. As illustrated in Figure 6, the displacement probe could provide sufficient discrimination power (over 2 folds) although the mismatched case resulted in visible fluorescence restoration. Notably, this behaviour could be predicted from T_m data (Table S1), which showed lower T_m for PNA/DNAQ than PNA/mismatched target. Also, this issue is specific to certain sequences; therefore, the whole principle

© 2016 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

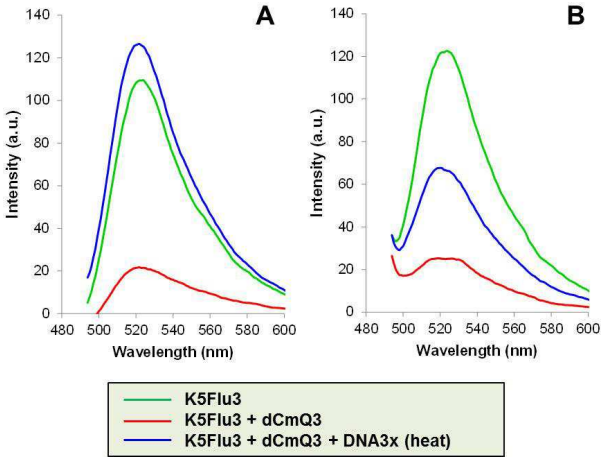


Figure 6. Fluorescence profiles of **K5Flu3/dCmQ3** in discriminating between A) complementary DNA (**DNA3 x** = **DNA3 a**), and B) single mismatched DNA (**DNA3 x** = **DNA3 b**). Heating was included at 95 °C for 5 min. [**K5Flu3**] = 0.05 μM, [**dCmQ3**] = [**DNA3 x**] = 0.50 μM, excitation wavelength = 480 nm.

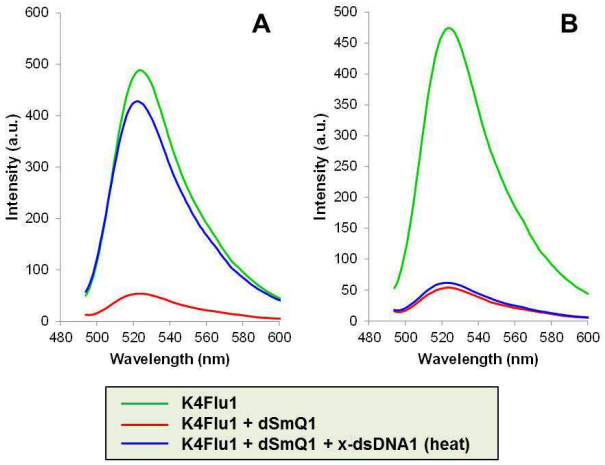


Figure 7. Fluorescence profiles of **K4Flu1/dSmQ1** in discriminating between A) complementary double-stranded DNA (x = **comp**), and B) single mismatched double-stranded DNA (x = **sm**). Heating was included at 95 °C for 5 min. [**K4Flu1**] = 0.05 μM, [**dSmQ1**] = [**x–dsDNA1**] = 0.50 μM, excitation wavelength = 480 nm.

should work fine in many more applications using different base sequences.

Investigation of the performance of the displacement probes with double–stranded DNAs

Since DNA exists as a stable duplex, the ability to efficiently recognise the DNA analyte without sample pre-treatment, i.e., to separate DNA strands, is highly desirable. Therefore, the PNA displacement probes were also tested for the in-situ recognition of different double-stranded DNAs. Using **K4Flu1/dSmQ1** as a model, the results (Figure S15) showed that fluorescence restoration of a double-stranded DNA target (**comp–dsDNA1**) was much slower at ambient temperature compared to the single-stranded version (**DNA1a**), although the high specificity was still retained. To resolve the slow kinetics issue, brief heating was again applied and found to expectedly promote efficient strand exchange, leading to almost complete fluorescence restoration and successful discrimination between the complementary DNA (**comp–dsDNA1**) and a single mismatched DNA (**sm–dsDNA1**) (Figure 7 for **K4Flu1/dSmQ1**, and Figure S16 and S17 for **K1Flu1/dSmQ1** and **K4TMR1/dSmQ1**, respectively). These results, along with our recently published study,[14] corroborated the power of acpcPNA in undergoing duplex invasion, thus suggesting that the displacement probe should be well applicable to double stranded DNA targets.

To further demonstrate the utility of our PNA displacement probe, the possibility of detecting different DNA sequences in multiplex manner was also investigated. In this regard, we selected DNA sequences derived from single nucleotide polymorphisms (SNP) in the human *IL10* promoter gene that are found to be associated with systemic lupus erythematosus (SLE) disease (Table 2).[15] Two acpcPNAs differing by one nucleobase were synthesised and these were appended with

Table 2. Sequences of PNA, DNAQ, and DNA analytes used for the multiplex detection experiments.

Type	Name	Sequence
PNA	Flu-SLE(T)	Flu-O-ATGTAATATCTC-KNH$_2$
	TMR-SLE(C)	TMR-O-ATGTAACATCTC-KNH$_2$
DNAQ	dSm-SLE(T)	Dabcyl-TACATTTTAGAG-5′
DNA	DNA4a	3′-CTACATTATAGAG-5′
	DNA4b	3′-CTACATTGTAGAG-5′
	SLE(A)-dsDNA	3′-CCACTACATTATAGAGACAC-5′ + 5′-GGTGATGTAATATCTCTGTG-3′
	SLE(G)-dsDNA	3′-CCACTACATTGTAGAGACAC-5′ + 5′-GGTGATGTAACATCTCTGTG-3′

different fluorophores, namely fluorescein (**Flu-SLE(T)**) and tetramethylrhodamine (**TMR-SLE(C)**). In the same solution, a DNA quencher with one mismatch to both sequences, **dSm-SLE(T)**, was used to quench both PNAs, and the DNA analyte would be added. The presence of the complementary DNAs to each PNA would result in the fluorescence increase specific to the emission wavelengths of each fluorophore. Hence, both signals can be independently but simultaneously monitored in the spectrophotometer.

In a preliminary experiment, each probe system (**Flu-SLE(T)/dSm-SLE(T)** and **TMR-SLE(C)/dSm-SLE(T)**) was first tested individually for its ability to detect single DNA sequence in the solution. As expected, although these duplexes especially with **TMR-SLE(C)** showed incomplete fluorescence restoration (which, in turn, was supported by the T_m difference between probe-quencher and probe-target duplexes), each SLE probe could successfully distinguish its complementary sequence

© 2016 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

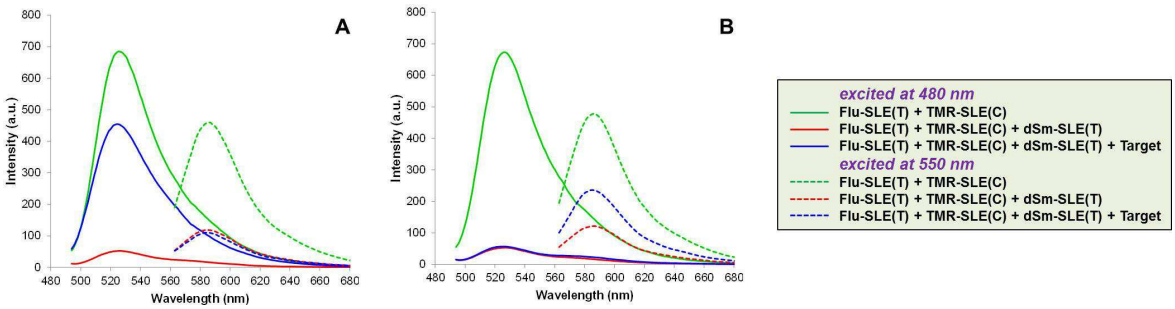


Figure 8. A multiplex experiment showing the ability of the SLE PNA probe system (consisting of **Flu-SLE(T)/TMR-SLE(C)/dSm-SLE(T)**) in discriminating double-stranded DNAs. Each experiment consists of two sets of spectra, which were obtained from excitations at 480 nm (fluorescein) and 550 nm (tetramethylrhodamine). A) Target = **SLE(A)-dsDNA.** B) Target = **SLE(G)-dsDNA.** The data in solid lines were obtained from the excitation at 480 nm. The data in dashed lines were obtained from the excitation at 550 nm. Heating was included at 95 °C for 5 min. [**Flu-SLE (T)**] = [**TMR-SLE(C)**] = 0.05 μM, [**dSm-SLE(T)**] = [**Target**] = 0.50 μM.

(**DNA4a** or **DNA4b**) from single mismatches, with both single-stranded and double-stranded systems (after heating; Figure S18 for **Flu-SLE(T)/dSm-SLE(T)**, and Figure S19 for **TMR-SLE(C)/dSm-SLE(T)**). Encouraged by these results, we proceeded to test the system in the multiplex mode. In each experiment, both PNA probes and the DNA quencher were added into a solution, followed by the addition of one double-stranded DNA analyte. Thereafter, spectra were obtained by exciting the solution with either 480-nm, or 550-nm light. As shown in Figure 8, our PNA displacement probe could clearly distinguish between two DNA sequences differing only by single base. For instance, the 530-nm fluorescence signal of fluorescein increased significantly after the addition of **SLE(A)-dsDNA** (Figure 8 A), while the same signal (at the same excitation wavelength) remained low and unchanged after the addition of **SLE(G)-dsDNA** (Figure 8B). This obviously suggested an existence of significant duplex formation between **Flu-SLE(T)** and **SLE(A)-dsDNA**, thus inferring that both are complementary sequences. Even though the signal restoration may not be as high as previous experiments, it proved to be ample for unambiguous DNA sequence determination.

acpcPNA-immobilised agarose resin as a solid-phase displacement probe

Solid-phase platforms have recently been exploited in a variety of chemical research due to their unique advantages, e.g., the ease of purification in combinatorial chemistry on polystyrene resin. Therefore, we sought to study the feasibility of constructing the displacement probe on resin and applying such system as a DNA sensor. The experiments were set up in a similar manner as in solution-phase experiments with some modifications. Since the agarose resin contains an *N*-hydroxysuccinimide (NHS) ester, a side-chain amino group on lysine residues of the PNA is expected to react and covalently immobilise the PNA (and the DNAQ) onto the resin. A DNA analyte was then incubated and the fluorescence signal was observed under the 365-nm UV lamp. Preliminary results showed that, with the solid-phase condition, the single mismatched probe (**dSmQ1**) could not quench the fluorophore PNA to a satisfactorily level - this is likely due to the increased difficulty of duplex formation in the resin matrix. Therefore, another probe, **d8Q1**, was tested and, to our surprise, was found to give a more satisfactory quenching - this outcome was opposite to the trend of duplex stability found in aforementioned experiments. We surmised that the resin matrix may contribute to this complication. Consequently, we proceeded to prepare the **K1Flu1**/**d8Q1** displacement probe and found that this system could restore the fluorescence signal only with the addition of the complementary sequence (**DNA1a** - tube 3, Figure 9), while a single

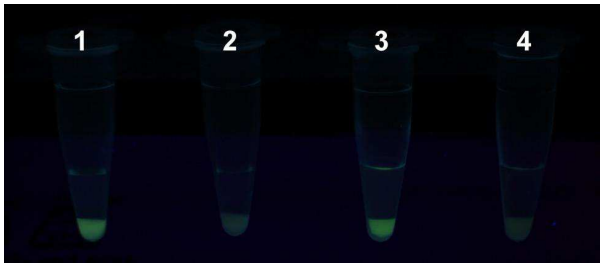


Figure 9. Fluorescence of NHS-agarose resins under 365-nm light. 1) agarose + **K1Flu1**; 2) agarose + **K1Flu1** + **d8Q1**; 3) agarose + **K1Flu1** + **d8Q1** + **DNA1a**; 4) agarose + **K1Flu1** + **d8Q1** + **DNA1b.** All experiments started simultaneously, and the photo was taken after the last condition was finished, which is an incubation step of 1 hour after **DNA1a** and **DNA1b** were added to 3) and 4), respectively.

mismatched sequence (**DNA1b** - tube 4, Figure 9) could not appreciably increase the fluorescence signal. These results confirmed that the acpcPNA displacement probe can also work on a solid phase system. Further development and elucidation of the dynamics of this resin probe will be investigated and reported elsewhere.

© 2016 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Conclusions

We reported herein a construction of displacement probes based on acpcPNA, which has been shown to provide several attractive features as a DNA probe. The results showed that the systems could unambiguously recognise the complementary sequence by giving significant fluorescence increase only after the complementary DNA was added (but not with any type of mismatched DNA targets). In most cases, brief heating was found to improve fluorescence restoration and is thus recommended if no other concern exists. On the other hand, temperature-sensitive samples may be incubated at ambient temperature. Although this resulted in incomplete fluorescence restoration and long reaction time, it should be emphasised that, in many cases, the signal from the complementary sequence was far higher than that of mismatches since early time points. Therefore, maximum restoration may not be required, thereby resulting in significantly reduced incubation time. Also, the displacement probes worked well even with double-stranded DNA analytes, indicating that the probe is applicable with real DNA samples. Combined with a possibility to couple the probe with a solid phase system, this new type of displacement probes could become another practical tool for DNA detection.

Acknowledgements

This research is financially supported by the Thailand Research Fund (DPG5780002), the Development and Promotion of Science and Technology Talents Project (DPST) (Ph.D. scholarship to CB) and the 100th Anniversary Chulalongkorn University for Doctoral Scholarship (to CC).

Keywords: peptide nucleic acid · biosensors · DNA recognition · fluorescence probes

[1] a) P. Wittung, P. E. Nielsen, O. Buchardt, M. Egholm, B. Norden, *Nature* **1994**, *368*, 561–563; b) Y. Choi, G. Metcalf, M. H. Sleiman, D. Vair-Turnbull, S. Ladame, *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 4395–4398; c) R. Gambari, *Expert Opin. Ther. Pat.* **2014**, *24*, 267–294; d) H. Shi, F. Yang, W. Li, W. Zhao, K. Nie, B. Dong, Z. Liu, *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *66*, 481–489.

[2] a) V. A. Kumar, K. N. Ganesh, *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 404–412; b) T. Sugiyama, A. Kittaka, *Molecules* **2013**, *18*, 287–310.

[3] T. Vilaivan, *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 1645–1656.

[4] a) T. Theppaleak, M. Rutnakornpituk, U. Wichai, T. Vilaivan, B. Rutnakornpituk, *J. Nanopart. Res.* **2013**, *15*, 2106; b) C. Stubinitzky, T. Vilaivan, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 3586–3589; c) N. Jirakittiwut, N. Panyain, T. Nuanyai, T. Vilaivan, T. Praneenararat, *RSC Adv.* **2015**, *5*, 24110–24114.

[5] a) S. Preus, L. M. Wilhelmsson, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1990–2001; b) G. Chen, F. Song, X. Xiong, X. Peng, *Ind. Eng. Chem. Res.* **2013**, *52*, 11228–11245.

[6] a) J. Guo, J. Ju, N. J. Turro, *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *402*, 3115–3125; b) K. Huang, A. A. Marti, *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *402*, 3091–3102.

[7] a) Q. Q. Li, G. Y. Luan, Q. P. Guo, J. X. Liang, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, e5; b) J. P. Cheng, Y. Y. Zhang, Q. G. Li, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, e61; c) Z. H. Mo, X. C. Yang, K. P. Guo, Z. Y. Wen, *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *389*, 493–497.

[8] W. Shengqi, W. Xiaohong, C. Suhong, G. Wei, *Anal. Biochem.* **2002**, *309*, 206–211.

[9] D. Y. Zhang, S. X. Chen, P. Yin, *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 208–214.

[10] a) C. Suparpprom, C. Srisuwannaket, P. Sangvanich, T. Vilaivan, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 2833–2837; b) T. Vilaivan, C. Srisuwannaket, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1897–1900.

[11] C. M. Escobedo-Bonilla, V. Alday-Sanz, M. Wille, P. Sorgeloos, M. B. Pensaert, H. J. Nauwynck, *J. Fish Dis.* **2008**, *31*, 1–18.

[12] a) W. Wang, C. Chen, M. X. Qian, X. S. Zhao, *Sens. Actuators, B* **2008**, *129*, 211–217; b) J. N. Wilson, Y. Cho, S. Tan, A. Cuppoletti, E. T. Kool, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 279–285; c) D. S. Xiang, K. Zhai, L. Z. Wang, *Analyst* **2013**, *138*, 5318–5324.

[13] T. N. Grossmann, S. Sasaki, M. Ritzefeld, S. W. Choi, A. Maruyama, O. Seitz, *Biorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 34–39.

[14] P. R. Bohlander, T. Vilaivan, H. -A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 9223–9230.

[15] N. Hirankarn, J. Wongpiyabovorn, O. Hanvivatvong, J. Netsawang, S. Akkasilpa, J. Wongchinsri, P. Hanvivadhanakul, W. Korkit, Y. Avihingsanon, *Tissue Antigens* **2006**, *68*, 399–406.

Submitted: August 5, 2016
Accepted: October 21, 2016

© 2016 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Tetrahedron 72 (2016) 7992–7999

Contents lists available at ScienceDirect

Tetrahedron

journal homepage: www.elsevier.com/locate/tet

Pyrrolidinyl peptide nucleic acid terminally labeled with fluorophore and end-stacking quencher as a probe for highly specific DNA sequence discrimination☆

Nattawut Yotapan, Duangrat Nim-anussornkul, Tirayut Vilaivan *

Organic Synthesis Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:
Received 19 June 2016
Received in revised form 3 October 2016
Accepted 14 October 2016
Available online 17 October 2016

Keywords:
Molecular beacons
Fluorescence
Hybridization probes
DNA
PNA

ABSTRACT

Peptide nucleic acid (PNA) labeled with a dye/quencher pair is useful as a high-performance fluorescence probe for DNA sequence determination. Previous work has mainly focused on placing the dye/quencher at different ends of the PNA strand. In this work, we propose a new pyrrolidinyl PNA probe bearing a fluorescent dye and an anthraquinone quencher at the same end of the PNA molecule. The single-stranded PNA probe exhibits a weak fluorescence as a result of close contact between the dye and the quencher. End-stacking of the anthraquinone to the terminal base pair of the PNA·DNA duplex disrupts the fluorophore-quencher interaction, resulting in a large fluorescence increase in the presence of complementary DNA. The high specificity of the present PNA probe allows multicolor, multiplex detection of single mismatched DNA targets. In addition, direct detection of double stranded DNA target by double duplex invasion was demonstrated.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Fluorescence oligonucleotides are useful as probes for molecular diagnostic applications such as the determination of DNA or RNA sequences[1,2] as well as other targets such as proteins[3,4] and small molecules.[5–7] To enable the detection of these targets in homogeneous format which does not require immobilization or washing and thus applicable for in vivo detection, a mechanism that can modulate the fluorescence properties of the probe in response to the target binding must be introduced. A classic example of such probes is molecular beacon[8]—an oligonucleotide carrying two labels at the opposite end with a partial self-complementary sequence so that it can form a stem-loop structure in the free state. Binding with the correct target DNA at the loop region leads to a conformational change that result in different interactions between the two labels when compared to the free probes,[9] leading to a fluorescence change. Limitations of this probe design are the requirement of a rather long sequence to form the stem-loop structure which is expensive to make, slow reaction kinetics and further functionalization being difficult since both ends are occupied. Several alternative designs to overcome one or more these limitations have been proposed such as in-stem molecular beacons,[10,11] strand displacement probes,[12] binary probes,[13] and quencher-free molecular beacons.[14,15] The performance of these probes could be improved further by the use of oligonucleotide analogues that offer stronger binding affinity/specificity such as locked nucleic acid (LNA) or peptide nucleic acid (PNA).[16] The latter is particularly promising because the design of PNA beacons does not generally require the stem-loop structure.[17,18] The potential problem of non-specific binding in unstructured probes[19] is compensated by the high specificity of PNA probes, and thus several impressive examples of linear PNA beacons have been reported.[20,21] Most of these PNA beacons carry either an environment sensitive label or two labels placed at different positions in the PNA strand.

Linear oligonucleotide probes bearing two labels attached to the same end or adjacent positions have been reported as early as 1994.[22] Instead of relying on conformational change as in classical molecular beacons, the mechanisms of fluorescence change in these linear probes upon hybridization with the target was due to the change in the interactions between the two labels as a result of end stacking, intercalation,[23–25] or uncoupling of excitons.[26,27] This probe design tends to give a lower background signal than linear DNA probes in general due to the more efficient quenching as a results of a better contact between the dye and the quencher. Inspired by this promising probe design and our long interest in the development of self-reporting PNA probes,[28–30] we proposed to

☆ In remembrance of His Majesty King Bhumibol Adulyadej (1927–2016), for his life-time dedication to Thailand.

* Corresponding author. E-mail address: vtirayut@chula.ac.th (T. Vilaivan).

http://dx.doi.org/10.1016/j.tet.2016.10.040
0040-4020/© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

combine the concept of a doubly-end-labeled linear probe with our new conformationally constrained acpcPNA.[31] In this report, we synthesize and evaluate the performance for DNA detection of some doubly-end-labeled linear PNA probes bearing a fluorophore (FAM or TMR) and a quencher with end-stacking ability (anthraquinone) at the same end of the molecule. The anthraquinone is expected to stack on top of terminal base pairs of the PNA·DNA duplexes. As a result, hybridization with the correct DNA target is expected to produce a signal by fluorescence change.

2. Results and discussion

2.1. Design and synthesis of doubly-end-labeled acpcPNA probes

The present doubly-end-labeled PNA probe design consists of a fluorophore and a quencher (denoted X and Y). Both of which are attached to a diamine linker (lysine or APC) at the *N*-termini of the acpcPNA probes (Fig. 1). One or more lysine residues were incorporated at the *C*-termini to improve water solubility and stability of the PNA·DNA hybrids. Anthraquinone (AQ) was chosen as the quencher because of its known ability to intercalate and/or end-stack with DNA duplexes.[24] The previously observed increased in T_m of duplexes with terminally anthraquinone-labeled acpcPNA suggests that the end stacking should also be possible in acpcPNA·DNA duplexes.[32]

The strategy for end-labeling of acpcPNA with the fluorophore-quencher pair involves attachment of the orthogonally protected (Fmoc/Tfa) diamine linker (lysine or 3-amino-4-pyrrolidine carboxylic acid, APC) at the *N*-terminus of the PNA. The amino groups were selectively deprotected and modified with the label (FAM or TMR) or the quencher (AQ or Dab). The crude PNA was purified by reversed phase HPLC (to >90% purity) and characterized by MALDI-TOF mass spectrometry. Characterization data of all PNA probes, as well as selected thermal stability data of their DNA hybrids are shown in Table 1.

2.2. Fluorescence properties of acpcPNA probes bearing various end-labeling groups and liker chemistry

The performance of several end-labeled acpcPNA probe designs was first evaluated by measuring fluorescence spectra of the probes

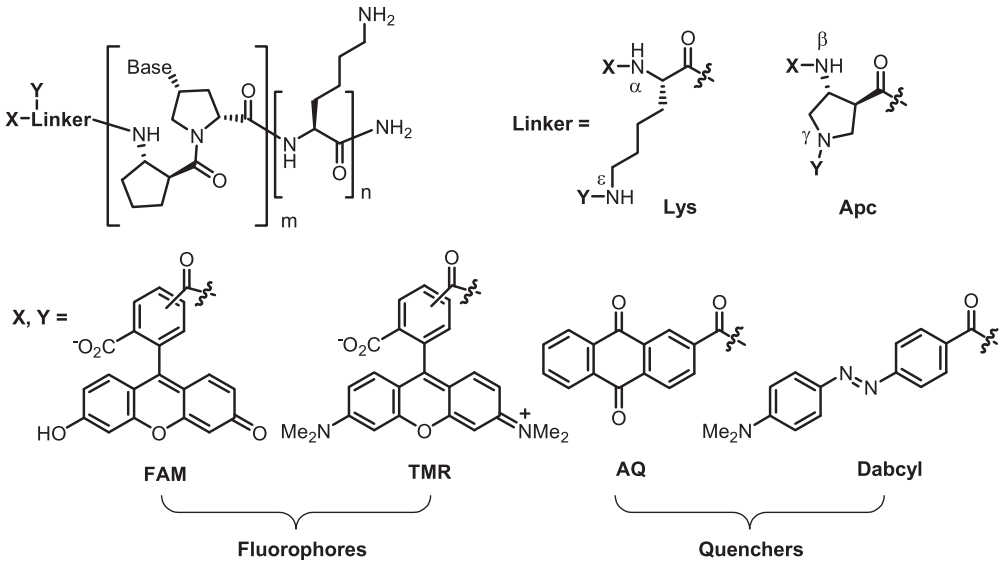


Fig. 1. Chemical structure of doubly-end-labeled acpcPNA probes described in this study.

Table 1
Sequence and characterization data of end-labeled acpcPNA probes synthesized in this study

PNA	Sequence (N→C)	t_R (min)[a]	Yield (%)[b]	*m/z* (calcd)[c]	*m/z* (found)[d]	T_m (°C)[e]
(AQ/FAM)Lys-P1	$N_\varepsilon^{AQ}N_\alpha^{FAM}$Lys-GTAGATCACT-LysNH$_2$	31.2	3.0	4239.5	4237.6	58
(AQ/TMR)Lys-P1	$N_\varepsilon^{AQ}N_\alpha^{TMR}$Lys-GTAGATCACT-LysNH$_2$	33.8, 34.3	8.3	4293.6	4294.6	55
(AQ/FAM)Apc-P1	$N_\gamma^{AQ}N_\beta^{FAM}$Apc-GTAGATCACT-LysNH$_2$	30.5	6.9	4111.3	4111.1	N.D.
(FAM/AQ)Lys-P1	$N_\varepsilon^{FAM}N_\alpha^{AQ}$Lys-GTAGATCACT-LysNH$_2$	30.8	6.8	4239.5	4237.6	N.D.
(FAM)Lys-P1	N_α^{FAM}Lys-GTAGATCACT-LysNH$_2$	31.2, 31.5	12.0	4004.2	4002.5	65
(Dab/FAM)Lys-P1	$N_\varepsilon^{Dab}N_\alpha^{FAM}$Lys-GTAGATCACT-LysNH$_2$	31.2	5.5	4256.5	4253.6	N.D.
(AQ/TMR)Lys-P2	$N_\varepsilon^{AQ}N_\alpha^{TMR}$Lys-GTACATCACT-LysNH$_2$	34.0	8.2	4253.6	4250.5	N.D.
(AQ/FAM)Lys-P3	$N_\varepsilon^{AQ}N_\alpha^{FAM}$Lys-TACAGACATC-LysNH$_2$	34.1, 34.3	9.1	4208.5	4205.9	50
(AQ/FAM)Lys-P4	$N_\varepsilon^{AQ}N_\alpha^{FAM}$Lys-CTAAATTCAGA-LysNH$_2$	34.4, 34.5	3.8	4564.9	4564.1	74
(AQ/FAM)Lys-P5	$N_\varepsilon^{AQ}N_\alpha^{FAM}$Lys-AGTTATCCCTGC-LysNH$_2$	34.5, 34.8	4.1	4865.2	4863.6	71
(AQ/FAM)Lys-P6	$N_\varepsilon^{AQ}N_\alpha^{FAM}$Lys-GAACAAGCTGGGAA-LysNH$_2$	33.1, 33.4	2.0	5671.0	5673.0	84
(AQ/FAM)Lys-P1-Lys5	$N_\varepsilon^{AQ}N_\alpha^{FAM}$Lys-GTAGATCACT-Lys$_5NH_2$	33.1, 33.5	5.4	4752.2	4752.7	66

[a] HPLC conditions: flow rate 0.5 mL/min, The gradient consists of two solvent systems: A (0.1% TFA in MilliQ water) and B (0.1% TFA in methanol). The elution started with 90:10 A:B for 5 min, followed by a linear gradient to 10:90 A:B over 35 min. Some peaks are doubled due to the presence of two fluorescein isomers from the commercially available 5(6)-carboxyfluorescein used.
[b] Isolated yield after HPLC.
[c] Average mass ($M+H^+$).
[d] MALDI-TOF.
[e] T_m with complementary DNA as determined by fluorescence spectrophotometry; conditions: 10 mM phosphate buffer pH 7.0; [PNA]=1.0 μM, [DNA]=1.2 μM, λ_{ex}=490 nm, λ_{em}=520 nm.

Table 2
Fluorescence properties of selected doubly-end-labeled PNA probes in the absence and presence of DNA

Entry	PNA	F_{ss}[a]	F_{ds}/F_{ss}[b]		
			DNA (comp)	DNA (sm)	DNA (non)
1	**(FAM)Lys-P1**	383.2 (100)	0.6 (60)	0.7 (65)	1.0 (100)
2	**(Dab/FAM)Lys-P1**	2.7 (1)	4.7 (3)	2.3 (2)	1.1 (0.8)
3	**(AQ/FAM)Lys-P1**	19.0 (5)	18.9 (95)	6.0 (5)	1.1 (5)
4	**(FAM/AQ)Lys-P1**	31.5 (8)	6.4 (53)	4.7 (39)	2.5 (21)
5	**(AQ/FAM)Apc-P1**	92.4 (24)	2.4 (54)	1.2 (28)	1.1 (28)

[a] Fluorescence of single stranded PNA; %fluorescence relative to the control sequence **(FAM)Lys-P1** are shown in parentheses.
[b] DNA sequence (5′→3′): DNA(comp) AGTGATCTAC; DNA(sm) AGTGCTCTAC; DNA(non) TCTGCATTTAG; %fluorescence relative to the control sequence **(FAM)Lys-P1** is shown in parentheses; conditions: 10 mM phosphate buffer pH 7.0; [PNA]=1.0 μM, [DNA]=1.2 μM, λ_{ex}=490 nm, λ_{em}=520 nm.

bearing the same 10-mer sequence before and after the addition of complementary DNA. The fluorescence emissions were compared with a control acpcPNA probe **(FAM)Lys-P1** carrying only the fluorescein label without the quencher. The results are summarized in Table 2.

All single stranded doubly-labeled acpcPNA probes exhibited significantly weaker fluorescence at 520 nm than the control acpcPNA probe **(FAM)Lys-P1** (Φ=0.154). The most efficient quenching effects were observed in **(Dab/FAM)Lys-P1** (>99%; Φ=0.002), as well as **(AQ/FAM)Lys-P1** (ca. 95%; Φ=0.019) (Table 2, entries 2 and 3; see also Table S1 for fluorescence quantum yields Φ). The smallest quenching (i.e., highest fluorescence) was observed in **(AQ/FAM)Apc-P1** when the fluorophore and quenchers were attached via a rigid APC (Table 2, entry 5). In this particular situation, the two labels cannot directly interact due to the rigid nature of the linker. This suggests that contact quenching is the major mechanism for quenching in these doubly-labeled probes. The proposal is supported by the UV spectra of the quenched probe, which clearly show the reduction in magnitude and red-shifting of the absorption spectra compared to the singly-labeled probe (Fig. S14).[33] However, since the **(AQ/FAM)Apc-P1** probe with a rigid linker also exhibited quite significant quenching effects (ca. 76%), additional quenching mechanisms such as FRET cannot be ruled out.

In the presence of the complementary DNA strand, the fluorescence emissions of all AQ/FAM-labeled PNA probes were increased relative to the single stranded probes. The most pronounced change was observed in the **(AQ/FAM)Lys-P1** probe, whereby the signal was increased by 18.9 fold (Fig. 2A, Table 2 entry 3; see also Table S1 for fluorescence quantum yields Φ). This value is almost the same as that of single stranded **(FAM)Lys-P1** probe without the quencher (i.e., maximum possible fluorescence). The observed un-quenching upon binding to DNA is explained by end-stacking of the anthraquinone on the terminal base pairs of the PNA·DNA duplexes, resulting in separation of the quencher from the fluorophore and thus the fluorescence increase. The decreased interaction between the fluorescein label and the anthraquinone quencher was supported by the change in UV absorption spectra in the presence of DNA as shown by the increase in the intensity and blue-shifting (Fig. 2A). The UV spectra of the duplex became similar to the singly labeled PNA probe (Fig. S14). Reversing the position of the two dyes as in **(FAM/AQ)Lys-P1** probe resulted in a smaller fluorescence increase after adding the DNA, which could be explained by the poor stacking ability of the anthraquinone attached to a shorter/more rigid N_α of the lysine linker. The singly labeled **(FAM)Lys-P1** probe exhibited a slight decrease of fluorescence upon hybridization with complementary target DNA, presumably due to interactions of the fluorescein label and the terminal G·C base pair of the PNA·DNA duplex as previously observed in the case of DNA.[34] Other probes showed a considerably smaller fluorescence increase, especially **(Dab/FAM)Lys-P1**. This is not totally unexpected considering the poor stacking ability of the dabcyl group compared to the planar fused ring system of anthraquinone. This further emphasizes the unique ability of anthraquinone used as a quencher in this particular doubly-end-labeled beacon design. Importantly, the contact quenching mechanism suggests that anthraquinone can act as a quencher for a broad range of fluorescence labels.[35,36] This is demonstrated by the quenching of the TMR label in single stranded PNA probe **(AQ/TMR)Lys-P1** as well as the 18-fold enhancement of the fluorescence upon addition of complementary DNA (Fig. 2B).

The specificity of the PNA probes was evaluated by comparison of fluorescence properties of the PNA probes in the presence of complementary DNA target and unrelated DNA (Table 2). In all cases, the presence of non-complementary DNA does not significantly change the fluorescence of the probe, indicating the requirement of a specific interaction between the probe and the DNA target to the unquenching of the probe. The fluorescence intensity ratios (F_{ds}/F_{ss}) of the single mismatched and complementary duplexes are also quite different. In the case of **(AQ/FAM)Lys-P1** probe, the F_{ds}/F_{ss} ratios of internal mismatched and non-complementary DNA hybrids were 6.0 and 1.1, respectively. Although the fluorescence increase in the case of single mismatched DNA target was still relatively high compared to single stranded probe, the value is still much smaller than the complementary DNA (18.9) (Table 2, entry 3). A similar level of mismatch discrimination (F_{ds}/F_{ss} 18.1 for complementary vs 4.9 for single mismatched DNA) was observed in

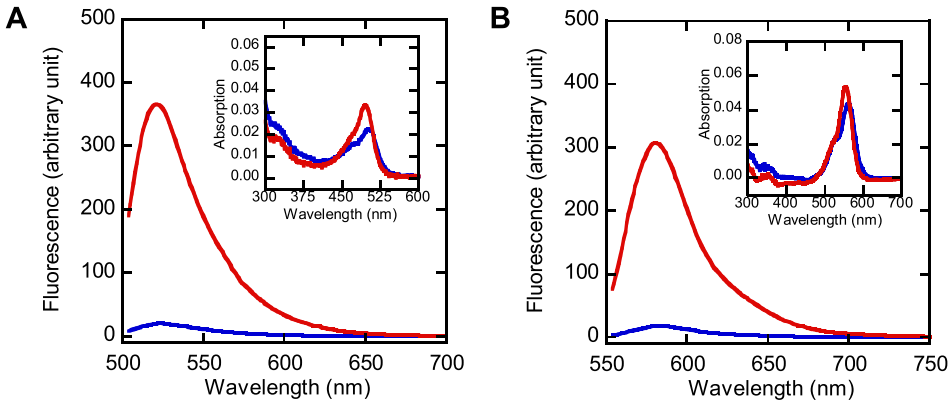


Fig. 2. Fluorescence and UV absorption spectra (inset) of (A) **(AQ/FAM)Lys-P1** (blue) and its hybrid with complementary DNA (red) (B) **(AQ/TMR)Lys-P1** (blue) and its hybrid with complementary DNA (red). Conditions: 10 mM phosphate buffer pH 7.0; [PNA]=1.0 μM, [DNA]=1.2 μM, λ_{ex}=490 nm (FAM) or 540 nm (TMR).

(AQ/TMR)Lys-P1 probe. Poorer selectivities in terms of single mismatch discrimination were observed with other PNA probes. From the results, it can be concluded that the fluorescence of the **(AQ/FAM)Lys-P1** probe is highly sensitive to its hybridization state and is specific to the DNA hybridization event.

2.3. Effects of terminal nucleobase in the doubly-end-labeled acpcPNA probes

Since the fluorescence change event relies on the end stacking ability of the anthraquinone quencher to the terminal base pair, the nature of terminal nucleobase that may directly interact with the anthraquinone should exert significant effects on the performance of the probe. To investigate the effects of different terminal nucleobases, fluorescence experiments were performed with (AQ/FAM)PNA probes bearing different terminal nucleobases [**(AQ/FAM)Lys-P1** (G), **(AQ/FAM)Lys-P3** (T), **(AQ/FAM)Lys-P4** (C), **(AQ/FAM)Lys-P5** (A)] and their DNA hybrids. The results are summarized in Fig. 3 and Fig. S15.

The single stranded **(AQ/FAM)Lys-P4** and **(AQ/FAM)Lys-P5** probes showed comparable fluorescence to **(AQ/FAM)Lys-P1** (F_{ss} 19–24 a.u.), but **(AQ/FAM)Lys-P3** was significantly brighter than the others. This may be interpreted as the combined quenching effects of the anthraquinone and neighboring nucleobases,[36] but other factors such as different secondary structures of the probes may also involve. In all cases, hybridization with complementary DNA resulted in fluorescence increases relative to single stranded probes. Larger fluorescence increases were observed with **(AQ/FAM)Lys-P1** and **(AQ/FAM)Lys-P5** (19.3 and 14.4-fold) than **(AQ/FAM)Lys-P4** and **(AQ/FAM)Lys-P3** (8.1 and 5.8-fold). Although larger fluorescence increases were observed with a purine as the terminal nucleobase in the PNA strand, the results clearly demonstrate that the principle of using anthraquinone as an end-stacking quencher is quite general. In all cases, no significant fluorescence increase was observed in the presence of non-complementary DNA targets.

In another experiment to probe the effect of terminal nucleobases in the DNA strand, fluorescence of the **(AQ/FAM)Lys-P1** and **(AQ/TMR)Lys-P1** probes and various DNA bearing different terminal nucleobases were measured (Table 3). Hybridization with DNA bearing 3′-terminal base extension resulted in an even larger fluorescence increase than the perfectly complementary hybrid (Table 3, entries 1 and 2). In this case, the end-stacking of the anthraquinone is still possible, and may even be further stabilized by the adjacent nucleobase in the hanging DNA segment. DNA with 3′-terminal base deletion showed very little fluorescence change from the single stranded probe. A much lower fluorescence increase was also observed in DNA with mismatched base at 3′-terminus. All of these observations are consistent with the expectation based on the proposed working principle of the doubly-end-labeled PNA beacon described herein. It is also important to note that terminal mismatches, which are generally difficult to detect due to the similar stabilities of the complementary and terminal mismatched duplexes, can be readily distinguished from complementary DNA by this probe.[37]

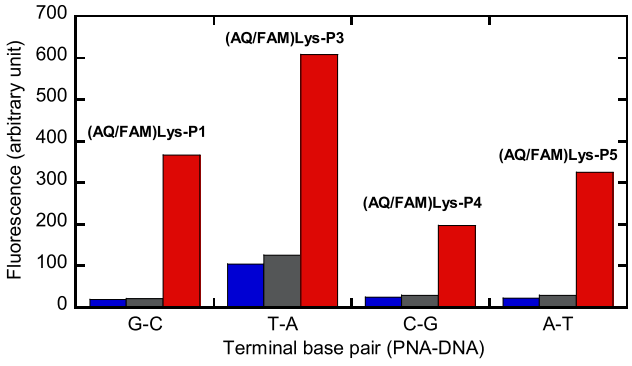


Fig. 3. Effects of terminal base pairs to the fluorescence of (AQ/FAM)PNA probes before (blue) and after addition of non-complementary DNA (gray) or complementary DNA (red); sequences of DNA involved are listed in Fig. S15; conditions: 10 mM phosphate buffer pH 7.0; [PNA]=1.0 μM, [DNA]=1.2 μM, λ_{ex}=490 nm, λ_{em}=520 nm.

Table 3
F_{ds}/F_{ss} of AQ/FAM-acpcPNA beacons

Entry	PNA[a]	DNA (5′→3′)[b]	Remarks	F_{ds}/F_{ss}
1	**(AQ/FAM)Lys-P1**	AGTGATCTAC	complementary	18.9
2	**(AQ/FAM)Lys-P1**	AGTGATCTAC*TAC*	3′-terminal extension	22.4
3	**(AQ/FAM)Lys-P1**	AGTGCTCT__	3′-terminal deletion	2.4
4	**(AQ/FAM)Lys-P1**	AGTGATCTA*A*	3′-terminal mismatch	7.0
5	**(AQ/TMR)Lys-P1**	AGTGATCTAC	complementary	18.1
6	**(AQ/TMR)Lys-P1**	AGTGATCTA*A*	3′-terminal mismatch	3.0

[a] PNA sequence: N-GTAGATCACT-C.
[b] mismatch base and base extension are indicated by underlined and italicized letters, base deletion is indicated by underscore; conditions: 10 mM phosphate buffer pH 7.0; [PNA]=1.0 μM, [DNA]=1.2 μM, λ_{ex}=490 nm (FAM) or 540 nm (TMR), λ_{em}=520 nm (FAM) or 580 nm (TMR).

2.4. Improving the mismatch discrimination of the PNA probe

While the threefold difference in the fluorescence of the complementary and single mismatched DNA hybrids of the PNA probe **(AQ/FAM)Lys-P1** is quite acceptable compared to other reports,[23–25] it would be highly advantageous to improve the discrimination even further. In principle, increasing the temperature should improve the discrimination between complementary and single mismatched hybrids if one can find a temperature at which the mismatch hybrid is completely dissociated, while the complementary hybrid is still stable. The large difference in the stabilities of complementary and single mismatched PNA·DNA hybrids facilitate this process as it offers a large window for temperature adjustment. The T_m curves of the DNA hybrids of **(AQ/FAM)Lys-P1** are shown in Fig. 4A. The fluorescence T_m values of 58 and 27 °C were obtained for complementary and internal single-mismatched hybrids, respectively. Beyond 40 °C, the fluorescence of the single mismatched hybrid was almost the same as that of single stranded **(AQ/FAM)Lys-P1** PNA probe. However, the fluorescence of single stranded PNA probe was also increased, presumably due to the heat-induced dissociation of the two interacting dyes. The maximum discrimination, as expressed by discrimination factor [$F_{ds(comp)}/F_{ds(mm)}$], of 5.5-fold was observed around 40 °C. This is considerably better than the selectivity observed at 20 °C. Beyond 70 °C, no discrimination was observed because both the complementary and mismatched duplexes were completely dissociated. Similar results were obtained with other PNA probes, but the maximum discrimination in each case was observed at different temperature. The benefit of increasing temperature was more pronounced in longer PNA probe sequences such as in **(AQ/FAM)Lys-P6** (14 bases), whereby a decent discrimination factor of 3.3 was observed at 80 °C—a temperature at which the mismatched hybrid was completely dissociated. Almost no discrimination was observed at 20 °C in this case (Fig. 4B).

In an alternative strategy for improving mismatch discrimination without increasing temperature, the concept of displacement probe[12] was employed, taking advantage of the low fluorescence increase of the probe upon hybridization with a short DNA with 3′-base deletion (see Table 3, entry 3). In contrast to the single stranded probe which binds readily to either complementary or mismatched DNA target as long as the resulting hybrids are sufficiently stable

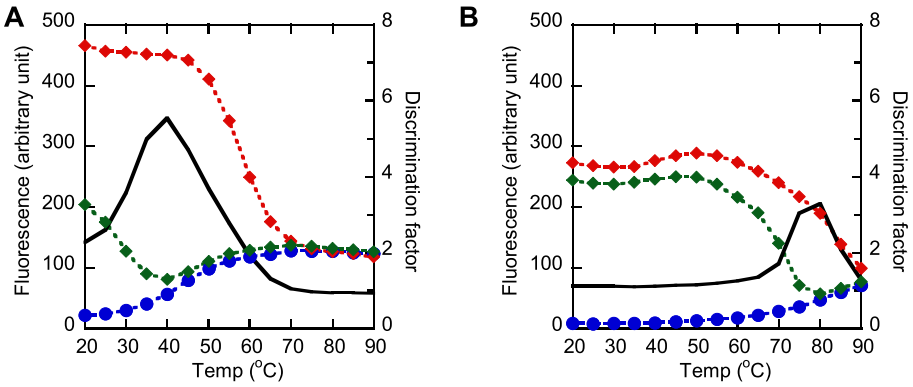


Fig. 4. Fluorescence T_m curves of single stranded PNA probes (blue) and their hybrids with complementary (red) and single mismatched DNA (green) together with the discrimination factor at different temperature (black) (A) **(AQ/FAM)Lys-P1** (B) **(AQ/FAM)Lys-P6**; conditions: 10 mM phosphate buffer pH 7.0; [PNA]=1.0 μM, [DNA]=1.2 μM, λ_{ex}=490 nm, λ_{em}=520 nm.

under the experimental condition, the displacement probe requires displacement of the short DNA strand by a new DNA strand. This will be energetically feasible only if the new PNA·DNA hybrid is more stable than the original displacement probe complex. Since the mismatched duplex is generally much less stable than a short complementary duplex, this strategy should help improve the specificity for mismatch discrimination.

The concept was demonstrated by first forming a duplex between **(AQ/FAM)Lys-P1** and a short complementary DNA with 3′-terminal base deletion. The fluorescence of this displacement probe complex (F_0) is only slightly higher than the single stranded probe. Addition of complementary DNA resulted in a rapid increase of the fluorescence (F). The F/F_0 ratio reach a high value of ~11 after 60 min. Much less fluorescence increase was observed with the mismatched DNA. The discrimination factor [$F_{(comp)}/F_{(mm)}$] improved from ~3 (without strand displacement) to ~5 (with strand displacement) (Fig. 5). This experiment showed the specificity of the dual end-labeled PNA probe can be further improved by the strand displacement concept.

2.5. Multicolor detection of two DNA targets

The possibilities of using two PNA probes to simultaneously detect two DNA targets differing by only one base was evaluated. One of the PNA probes was the fluorescein-labeled **(AQ/FAM)Lys-P1** ('AQ/FAM probe') and another probe **(AQ/TMR)Lys-P2** having a similar sequence but with one mismatch base was labeled with TAMRA ('AQ/TMR probe'). The mixture of the two probes exhibited very low fluorescence (Fig. 6) in the absence of DNA. Addition of a DNA target complementary to the AQ/FAM probe resulted in a large fluorescence increase at the emission wavelength of FAM upon excitation at 490 nm. No fluorescence change at the emission wavelength of TMR was observed upon excitation at either 490 or 540 nm. This sample exhibited green fluorescence when observed under a UV lamp. Likewise, addition of the DNA target complementary to the AQ/TMR probe to the probe mixture similarly resulted in an increased fluorescence of TMR but not FAM. The sample gave orange fluorescence under UV light. When both DNAs are present, the sample exhibited yellow fluorescence (a combination of red and

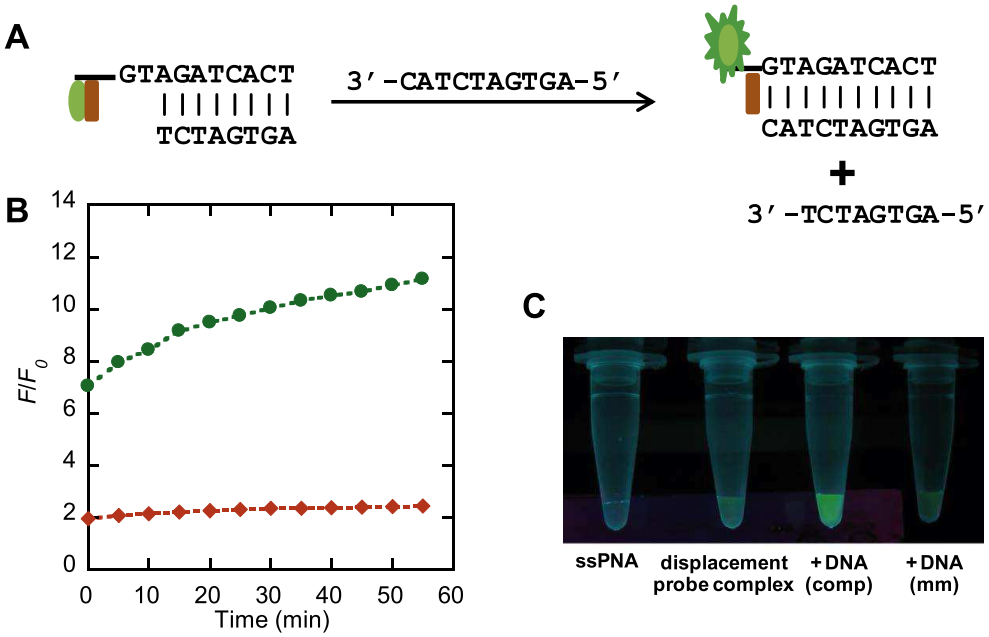


Fig. 5. (A) The working principle of strand displacement probe (B) fluorescence ratios of the displacement probe **(AQ/FAM)Lys-P1**+dAGTGATAT after addition of complementary DNA (dAGTGATCTAC, green) and mismatched DNA (dAGTGCTCTAC, red) as a function of time; conditions: 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, [PNA]=1.0 μM and [DNA]=1.2 μM, λ_{ex}=490 nm, λ_{em}=520 nm (C) photograph of the strand displacement experiment under UV lamp (365 nm); conditions: 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, [PNA]=10 μM and [DNA]=12 μM.

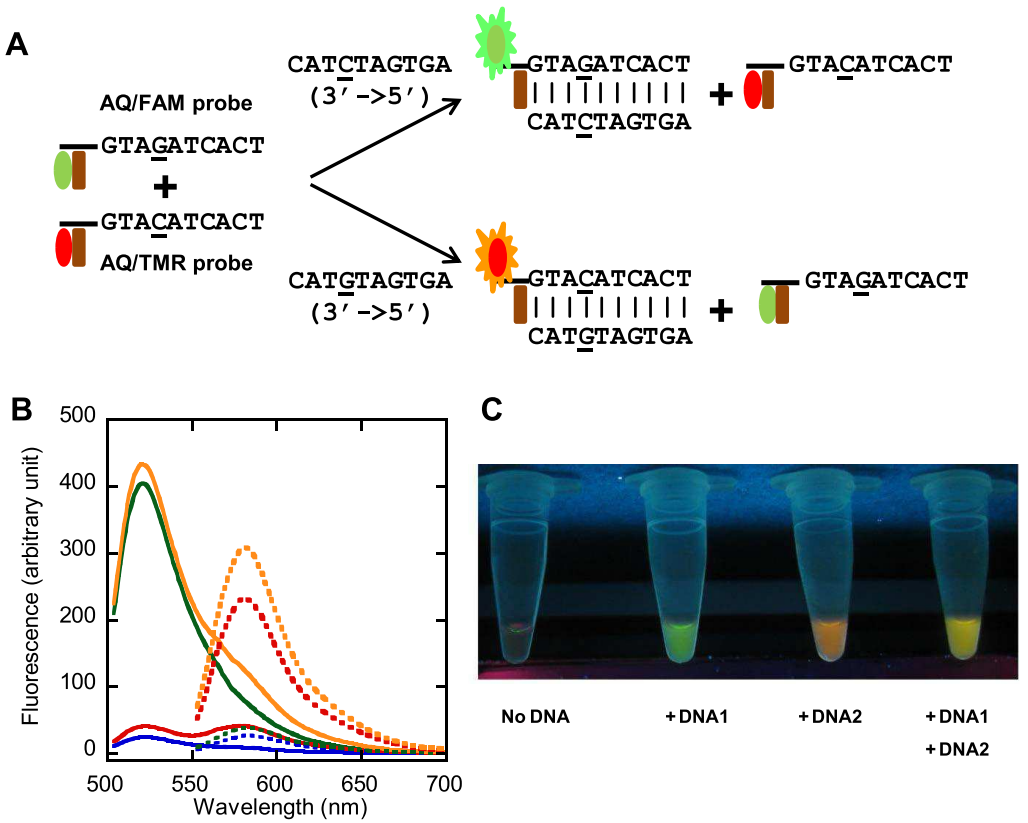


Fig. 6. (A) The concept of multiplex detection by two PNA probes (B) fluorescence spectra of the mixture of AQ/FAM and AQ/TMR probes before (blue) and after addition of DNA complementary to the AQ/FAM probe (green), DNA complementary to the AQ/TMR probe (red) and both (orange) at λ_{ex}=490 nm (solid lines) and 540 nm (dashed lines); conditions: 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, [PNA]=1.0 μM and [DNA]=1.2 μM (C) photograph of the multiplex DNA detection experiment under UV lamp (365 nm); conditions: 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, [PNA]=10 μM and [DNA]=12 μM.

green). The results are fully consistent with the expected high discrimination ability of the PNA probes.

2.6. DNA double duplex invasion by doubly-end-labeled acpcPNA probes

Finally, the possibilities of directly detecting dsDNA targets by the doubly-end-labeled PNA probe were evaluated (Fig. 7). The inability of two complementary strands of acpcPNA to form self-hybrids[31] suggests the possibility of targeting dsDNA by the so-called double duplex invasion mechanism.[38,39] The **(AQ/FAM)Lys-P1** probe could not efficiently invade into a 30-mer DNA duplex carrying a 10-base region corresponding to the PNA probe sequence as shown by the rather weak fluorescence increase relative to the single stranded probe (estimated to be less than 10% invasion efficiency). Addition of another unlabeled acpcPNA probe designed to

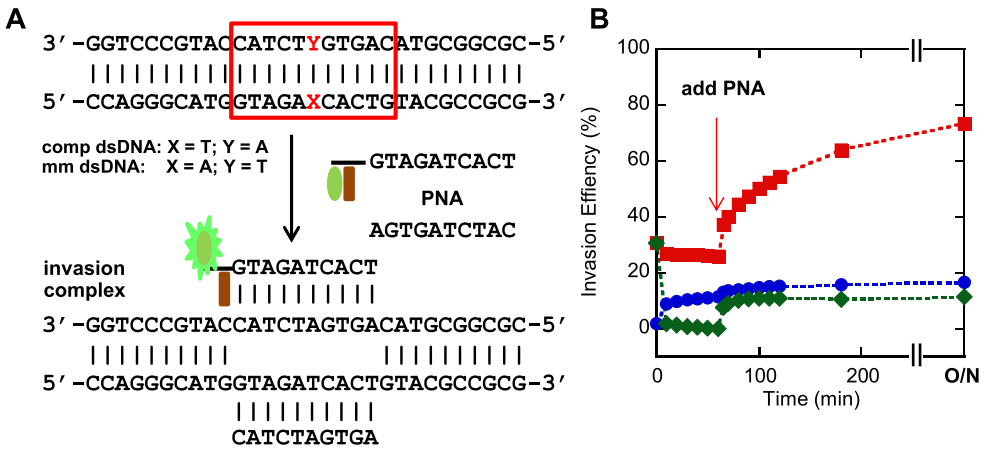


Fig. 7. (A) Double duplex invasion experiment (B) %invasion as calculated from fluorescence change at 520 nm of the labeled PNA probe [**(AQ/FAM)Lys-P1**+comp dsDNA (blue), **(AQ/FAM)Lys-P1-Lys5**+comp dsDNA (red); **(AQ/FAM)Lys-P1-Lys5**+mismatched dsDNA (green)] before and after addition of the second unlabeled complementary PNA strand (shown by arrow at 60 min); conditions: 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, [labeled PNA]=[DNA]=1.0 μM; [unlabeled PNA]=1.2 μM; λ_{ex}=490 nm.

bind to the opposite strand of DNA in the same region only slightly improved the invasion efficiency to around 15% after leaving overnight. A control experiment by mixing the two acpcPNA strands did not give any fluorescence increase due to the inability of acpcPNA to form self-hybrids therefore the fluorescence increase must be due to the formation of the PNA·DNA invasion complex (Fig. S19). Increasing the number of positive charge by adding a polylysine tail as in the **(AQ/FAM)Lys-P1-Lys5** probe improves the duplex invasion efficiency further to more than 70%.[40] A control double duplex invasion experiment with a dsDNA target carrying a mismatched invasion site showed a negligible fluorescence increase and the extent of the invasion was estimated to be less than 10%. In addition, polyacrylamide gel electrophoresis also clearly demonstrated the invasion only in the case of complementary PNA/DNA duplexes (Fig. S20), thus confirming the specificity of the duplex invasion process. It should be noted that accurate quantification of the extent of duplex invasion is difficult by this fluorescence approach due to the variable degree of quenching of the probe upon contact with the dsDNA, most likely by non-specific interaction between the polylysine and the phosphate backbone of DNA. Nevertheless, it is clear that the PNA probe can be used for direct sequence-specific detection of dsDNA target by double duplex invasion.

3. Conclusion

We have successfully synthesized doubly-end-labeled fluorescence conformationally constrained acpcPNA probes and demonstrate their potential for specific detection of single and double stranded DNA sequences in homogeneous format. The presently described PNA probes gave a low background and good response with DNA (F_{ds}/F_{ss} ~6 to 20) which outperforms other linear DNA probes with similar design,[23–25] and compares favorably with conventional stem-loop DNA beacons[17,20] or linear PNA probes bearing the fluorophore and the quencher at the opposite ends of the molecule (F_{ds}/F_{ss} ~ 10).[17] The large difference between the stabilities of the complementary and mismatched acpcPNA·DNA duplexes allows effective discrimination between complementary and single mismatched DNA targets at room temperature, and could be further improved by increasing the temperature or by using the strand displacement concept ($F_{comp}/F_{mismatch}$ ~ 3–5). The specificity was further demonstrated in a multicolor, multiplex detection of DNA targets that are different by just one base. As the mechanism of un-quenching relies on the end stacking of the quencher and the terminal base pairs of the PNA·DNA duplexes, DNA with terminal base mismatches and short DNA with terminal deletion could also be readily distinguished from complementary DNA. Finally, the inherently pseudocomplementary acpcPNA which could not form self-duplexes allowed direct detection of double stranded DNA targets via DNA double duplex invasion.

4. Experimental

4.1. Synthesis of doubly-end-labeled acpcPNA

The acpcPNA probes were synthesized by Fmoc solid phase peptide synthesis on TentagelS-RAM resin (0.24 mmol/g). The resin was first loaded with one or five lysine residues via Fmoc-Lys(Boc)-OPfp. The four Fmoc-protected acpcPNA monomers (A^{Bz}, T, C^{Bz}, G^{Ibu}) and ACPC spacers were next incorporated until the desired PNA sequence was obtained. Finally, the N-terminus was capped with Fmoc-Lys(Tfa)-OH or Fmoc-Apc(Tfa)-OH via HATU activation. The Fmoc protecting group was removed and the free amino group was modified with the fluorophore (FAM or TMR) via the corresponding succinimidyl esters. Next, the Tfa protecting group was removed by treatment with aqueous ammonia:dioxane (1:1) at 65 °C overnight. This procedure also simultaneously removed the nucleobase side chain protection. This was followed by attachment of the quencher (AQ or Dab) via the corresponding HATU-activated carboxylic acids. The reaction progress was monitored by MALDI-TOF mass spectrometry. After completion of the reaction, the labeled PNA probes were cleaved from the resin by treatment with TFA followed by reversed phase HPLC purification. The isolated yield of PNA with 90% purity or more were in the range of 3–12%.

4.2. Fluorescence experiments

Fluorescence experiments were performed on Cary Eclipse fluorescence spectrophotometer (Varian/Agilent Technologies). All fluorescence experiments were carried out at the specified concentrations of PNA and DNA in 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) (1000 μL) in a 10 mm quartz cell with a Teflon stopper. The excitation and emission slits were set to 5 nm, and the photomultiplier tube (PMT) voltage set to an appropriate value (to give the fluorescence read-out not exceeding 1000 a.u.). Fluorescence melting experiments were carried out by preparing the sample as in normal fluorescence experiments. The fluorescence emission was recorded from 20 to 90 °C at 5 °C intervals with temperature ramp of 1 °C/min. The temperature recorded was the block temperature and was uncorrected. T_m values were estimated from first derivative plots of the fluorescence melting curves.

4.3. UV–vis experiments

UV–vis experiments were performed on Cary 100 UV–vis spectrophotometer (Varian/Agilent Technologies) at 20 °C under similar conditions to the fluorescence experiments.

Acknowledgements

This work was supported by the Thailand Research Fund (DPG5780002), Chulalongkorn University (postdoctoral fellowship to NY), the Royal Golden Jubilee Ph.D. Program (RGJ PhD Grant No. PHD/0316/2550, to NY and TV), and Science Achievement Scholarship of Thailand (SAST, to DN).

Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.tet.2016.10.040.

References and notes

1. Ranasinghe, R. T.; Brown, T. *Chem. Commun.* **2005**, 5487–5502.
2. Guo, J.; Ju, J.; Turro, N. J. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *402*, 3115–3125.
3. Shibata, A.; Abe, H.; Furukawa, K.; Tsuneda, S.; Ito, Y. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2009**, *53*, 157–158.
4. Thurley, S.; Röglin, L.; Seitz, O. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12693–12695.
5. Tang, Z.; Mallikaratchy, P.; Yang, R.; Kim, Y.; Zhu, Z.; Wang, H.; Tan, W. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11268–11269.
6. Zhao, Q.; Cheng, L. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405*, 8233–8239.
7. Liu, Z.; Chen, S.; Liu, B.; Wu, J.; Zhou, Y.; He, L.; Ding, J.; Liu, J. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 12229–12235.
8. Tyagi, S.; Kramer, R. *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 303–308.
9. Marras, S. A. E. *Mol. Biotechnol.* **2008**, *38*, 247–255.
10. Kashida, H.; Takatsu, T.; Fujii, T.; Sekiguchi, K.; Liang, X.; Niwa, K.; Takase, T.; Yoshida, Y.; Asanuma, H. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 7044–7047.
11. Holzhauser, C.; Wagenknecht, H.-A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 7268–7272.
12. Li, Q.; Luan, G.; Guo, Q.; Liang, J. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, e5.
13. Kolpashchikov, D. M. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 4709–4723.
14. French, D. J.; Archard, C. L.; Brown, T.; McDowell, D. G. *Mol. Cell Probes* **2001**, *15*, 363–374.
15. Venkatesan, N.; Seo, Y. J.; Kim, B. H. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 648–663.
16. Briones, C.; Moreno, M. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *402*, 3071–3089.
17. Seitz, O. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, *39*, 3249–3252.
18. Kuhn, H.; Demidov, V. V.; Coull, J. M.; Fiandaca, M. J.; Gildea, B. D.; Frank-Kamenetskii, M. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1097–1103.
19. Bonnet, G.; Tyagi, S.; Libchaber, A.; Kramer, F. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 6171–6176.

20. Socher, E.; Bethge, L.; Knoll, A.; Jungnick, N.; Herrmann, A.; Seitz, O. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 9555–9559.
21. Socher, E.; Knoll, A.; Seitz, O. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 7363–7371.
22. Shinozuka, K.; Sato, Y.; Sawai, H. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 1377–1378.
23. Ranasinghe, R. T.; Brown, L. J.; Brown, T. *Chem. Commun.* **2001**, 1480–1481.
24. Kodama, S.; Asano, S.; Moriguchi, T.; Sawai, H.; Shinozuka, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 2685–2688.
25. Yamane, K. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, e97.
26. Ikeda, S.; Okamoto, A. *Chem.—Asian. J.* **2008**, *3*, 958–968.
27. Ikeda, S.; Kbota, T.; Yuki, M.; Okamoto, A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 6480–6484.
28. Boonlua, C.; Ditmangklo, B.; Reenabthue, N.; Suparpprom, C.; Poomsuk, N.; Siriwong, K.; Vilaivan, T. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 8817–8827.
29. Ditmangklo, B.; Boonlua, C.; Suparpprom, C.; Vilaivan, T. *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24*, 614–625.
30. Boonlua, C.; Vilaivan, C.; Wagenknecht, H.-A.; Vilaivan, T. *Chem.—Asian J.* **2011**, *6*, 3251–3259.
31. Vilaivan, T. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 1645–1656.
32. Kongpeth, J.; Jampasa, S.; Chaumpluk, P.; Chailapakul, O.; Vilaivan, T. *Talanta* **2016**, *146*, 318–325.
33. Bernacchi, S.; Mély, Y. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, e62.
34. Nazarenko, I.; Pires, R.; Lowe, B.; Obaidy, M.; Rashtchian, A. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 2089–2195.
35. Johansson, M. K.; Fidder, H.; Dick, D.; Cook, R. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6950–6956.
36. Marras, S. A. E.; Kramer, F. R.; Tyagi, S. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, e122.
37. Asseline, U.; Chassignol, M.; Auberta, Y.; Roiga, V. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 1949–1957.
38. Lohse, J.; Dahl, O.; Nielsen, P. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 11804–11808.
39. Demidov, V. V.; Protozanova, E.; Izvolsky, K. I.; Price, C.; Nielsen, P. E.; Frank-Kamenetskii, M. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 5953–5958.
40. Ishizuka, T.; Yoshida, J.; Yamamoto, Y.; Sumaoka, J.; Tedeschi, T.; Corradini, R.; Sforza, S.; Komiyama, M. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 1464–1471.

Analytica Chimica Acta 952 (2017) 32–40

Contents lists available at ScienceDirect

Analytica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aca

Electrochemical paper-based peptide nucleic acid biosensor for detecting human papillomavirus

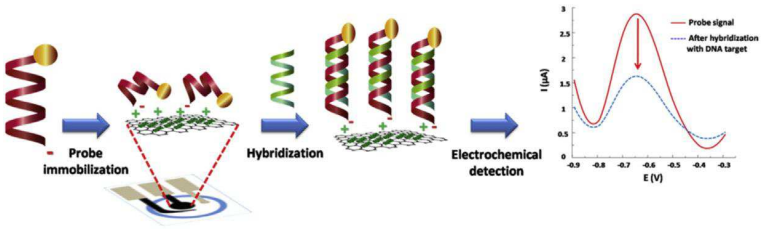
Prinjaporn Teengam [a], Weena Siangproh [b], Adisorn Tuantranont [c], Charles S. Henry [d], Tirayut Vilaivan [e], Orawon Chailapakul [f, g, *]

[a] Program in Petrochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok, 10330, Thailand
[b] Department of Chemistry, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, Bangkok, 10110, Thailand
[c] Nanoelectronics and MEMS Laboratory, National Electronics and Computer Technology Center, Pathumthani, 12120, Thailand
[d] Department of Chemistry, Colorado State University, Fort Collins, CO, 80523, United States
[e] Organic Synthesis Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok, 10330, Thailand
[f] Electrochemistry and Optical Spectroscopy Research Unit, Department of Chemistry, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok, 10330, Thailand
[g] Nanotec-CU Center of Excellence on Food and Agriculture, Bangkok, 10330, Thailand

HIGHLIGHTS

- A paper-based DNA biosensor using AQ-PNA probe and G-PANI modified electrode was first developed.
- This developed DNA biosensor was highly specific over the non-complementary DNA.
- This sensor was successfully applied to detect the HPV-DNA type 16 obtained from cancer cell lines.
- This sensor is inexpensive and disposable, which can be incinerated easily and safely after use.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:
Received 23 July 2016
Received in revised form
21 October 2016
Accepted 29 November 2016
Available online 3 December 2016

Keywords:
Graphene
Polyaniline
Paper-based electrochemical DNA biosensor
acpcPNA
Electrochemical detection
Human papillomavirus

ABSTRACT

A novel paper-based electrochemical biosensor was developed using an anthraquinone-labeled pyrrolidinyl peptide nucleic acid (acpcPNA) probe (AQ-PNA) and graphene-polyaniline (G-PANI) modified electrode to detect human papillomavirus (HPV). An inkjet printing technique was employed to prepare the paper-based G-PANI-modified working electrode. The AQ-PNA probe baring a negatively charged amino acid at the N-terminus was immobilized onto the electrode surface through electrostatic attraction. Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) was used to verify the AQ-PNA immobilization. The paper-based electrochemical DNA biosensor was used to detect a synthetic 14-base oligonucleotide target with a sequence corresponding to human papillomavirus (HPV) type 16 DNA by measuring the electrochemical signal response of the AQ label using square-wave voltammetry before and after hybridization. It was determined that the current signal significantly decreased after the addition of target DNA. This phenomenon is explained by the rigidity of PNA-DNA duplexes, which obstructs the accessibility of electron transfer from the AQ label to the electrode surface. Under optimal conditions, the detection limit of HPV type 16 DNA was found to be 2.3 nM with a linear range of 10–200 nM. The performance of this biosensor on real DNA samples was tested with the detection of PCR-amplified DNA samples from the SiHa cell line. The new method employs an inexpensive and disposable device, which

* Corresponding author. Electrochemistry and Optical Spectroscopy Research Unit, Department of Chemistry, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok, 10330, Thailand.
E-mail address: corawon@chula.ac.th (O. Chailapakul).

http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2016.11.071
0003-2670/© 2016 Published by Elsevier B.V.

easily incinerated after use and is promising for the screening and monitoring of the amount of HPV-DNA type 16 to identify the primary stages of cervical cancer.

© 2016 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

The most important factors for diagnostic devices, especially for developing countries, are low cost, simplicity and speed of results for early screening and monitoring of disease biomarkers. To achieve this goal, paper-based analytical devices (PADs) have been widely used as an alternative device design for point-of-care (POC) applications [1–3]. Two detection modes that have been most frequently used with PADs include colorimetric and electrochemical detections. Since first reported by Dungchai et al. [4], PADs with electrochemical detection (ePADs) have increasingly attracted attention as they offer a combination of simplicity, low power requirements, low limits of detection, and ease of quantitation [5–8]. ePADs are therefore an ideal platform for developing sensitive, selective DNA biosensors for point-of-care applications.

In electrochemical DNA biosensors, many different electrode types have been used, including a gold [9–11], hanging mercury drop (HMDE) [12,13] and various carbon-based materials [14–17]. Carbon is considered a good electrode material due to its low cost, wide potential range, chemical inertness and low background current. Furthermore, carbon electrodes have a fast response time and can be easily fabricated in different configurations. These features make carbon suitable for use in ePAD DNA biosensors. However, the use of micro-scale electrodes as part of ePAD is a major obstacle due to limited sensitivity. To overcome this problem, graphene (G) has been used as a carbon-based nanomaterial and has achieved significant popularity due to the large specific surface area and unique electrochemical properties of G [18–20]. G-based electrodes exhibited superior performance compared to other carbon-based electrodes in terms of their electro-catalytic activity and electrical conductivity [21,22]. G has also been used in combination with various types of functional materials to fabricate high-performance electrodes. Among them, polyaniline (PANI) is a useful conducting polymer that has been widely used for electronic, optical and electrochemical applications such as enzyme-based biosensors and DNA assays due to its excellent environmental stability and unusual doping/dedoping chemistry [23–25]. Moreover, PANI improves the dispersion and reduces the agglomeration of the planar sp^2-carbon of G [23,26]. PANI also possesses free amino groups, which can act as a handle for the covalent immobilization of suitable detection probes via amide bonds [27,28]. Finally, doped PANI possesses the positive charge of the amino group, which can immobilize negatively-charged probes via electrostatic interactions. Thus, it is a challenge to evaluate alternative systems for immobilization of various bio-recognition elements via electrostatic interaction.

For most electrochemical DNA biosensors, a probe that is designed to detect a specific sequence of target DNA is first immobilized on the electrode. Then, the electrochemical signal of an electroactive species, which was either covalently attached to the probe or added later as an indicator, is recorded and compared before and after the hybridization with the complementary DNA target [12,29]. The probe is a key parameter that determines the detection selectivity. While most DNA biosensors employ short oligodeoxynucleotide probes, several alternative probes have been used with great success. Peptide nucleic acid (PNA) [30,31], a synthetic DNA mimic with a peptide-like backbone of repeating N-(2-aminoethyl)-glycine units replacing the sugar-phosphate in natural DNA or RNA, has attracted increasing interest as the probe for electrochemical DNA biosensors [12,32–34] due to its sequence-specific binding to DNA or RNA, resistance to nuclease and protease enzymes, and strong binding to the target DNA. Recently, Vilaivan's group [35–37] proposed a new conformationally constrained pyrrolidinyl PNA system (known as acpcPNA) that possesses an α,β-peptide backbone derived from D-proline/2-aminocyclopentanecarboxylic acid. This new acpcPNA demonstrates a stronger binding affinity and higher specificity towards complementary DNA compared to DNA and Nielsen's PNA, and there are several applications of acpcPNA as a probe for DNA biosensors [38–40].

Human papillomavirus or HPV is the common virus that can be passed through any type of sexual contact. There are some high-risk types of HPV including type 16 and 18, which can cause abnormal changes to the cells of the cervix. These changes can lead to cervical cancer which, is one of the most important health problems for woman. The mortality occurring from cervical cancer has continuously increased especially in developing countries that have limited medical facilities [41].

In our previous work [38], the electrochemical sensor based-on acpcPNA probe for HPV detection was reported. Although the good limit of detection (LOD) was achieved, the use of PVC-based sensor was costly and the procedure relies on covalent method for probe immobilization was complicated and time-consuming. Cost is the most critical challenge for disposable POC electrochemical sensors. In this work, using PAD has potential to address all of challenges of disposable sensor in term of low-cost and simple fabrication. Electrostatic immobilization is also a key step of this work. This method eliminated the complicate steps of covalent process and significantly reduced time. Moreover, inkjet printing used for electrode modification step is advantageous due to it provided electrode reproducibility and high pattern resolution [42]. Inkjet-printing is scalable of mass production, while small amount of modifier is wasted in the modification process.

Here, we aim to develop a novel paper-based electrochemical DNA biosensor using an AQ-labeled acpcPNA probe in combination with a G-PANI modified electrode. In this new DNA biosensor, the acpcPNA probe labeled with anthroquinone (AQ) was first incorporated onto a G-PANI-modified ePAD using electrostatic immobilization. In the absence of complementary DNA, a strong signal was observed for the AQ. Hybridization with the complementary DNA target resulted in a decrease of the electrochemical signal that linearly correlated with the concentration of the target. The application of the biosensor to the sensitive detection of HPV DNA type 16 is demonstrated. The proposed method is applicable to the screening and monitoring of HPV-DNA type 16 in the primary stage of cervical cancer, a disease that leads to the death of women around the world, particularly in developing countries that have limited resources for public healthcare.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and materials

Graphene (G) was purchased from A.C.S (Medford, USA).

Polyaniline, camphor-10-sulfonic acid ($C_{10}H_{16}O_4S$), glutamic acid and N-methyl-2-pyrrolidone (NMP) were ordered from Sigma Aldrich (St.Louis, USA). Carbon and silver/silver chloride ink were obtained from Gwent group (Torfaen, United Kingdom). The screen-printed block was made by Chaiyaboon Co. Ltd. (Bangkok, Thailand). The labeling electroactive spices, 4-(anthraquinone-2-oxy)butyric acid, was synthesized as described previously [39]. Analytical grade reagents, including NaCl, KH_2PO_4, Na_2HPO_4 and KCl, were purchased from Merck and used without further purification. Synthetic oligonucleotides which correspond to partial sequences of HPV type 16 and other types of high risk HPV (HPV types 18, 31 and 33) used in the specificity test, were obtained from Pacific Science (Bangkok, Thailand). The sequences of the DNA oligonucleotides used are shown in Table 1.

The forward (5′-CACTATTTTGGAGGACTGGA-3′) and reverse primer (5′-GCCTTAAATCCTGCTTGTAG-3′) used for the PCR cell-line samples were purchase from Pacific Science (Bangkok, Thailand). The cervical cancer cell-lines with (SiHa) HPV types 16 were obtained from the Human Genetics Research Group, Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University.

2.2. Apparatus

The electrochemical measurements using square-wave voltametry (SWV) were performed using a CHI1232A electrochemical analyzer (CH Instruments, Inc., USA). A three electrode system was used and the working electrode was a G-PANI-modified screen-printed carbon electrode (4 mm in diameter). The electrochemical impedance spectroscopy (EIS) was carried out using PGSTAT 30 potentiostat (Metrohm Siam Company Ltd., Switzerland) in a solution of 1.0 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ with the frequency range from 0.1 to 10^{-5} Hz. The Dimatix™ Materials Printer (DMP-2800, FUJIFILM Dimatix, Inc., Santa Clara, USA) was used for the electrode modification. JEM-2100 transmission electron microscope (Japan Electron Optics Laboratory Co., Ltd, Japan) was used for characterization of G-PANI composites. MALDI-TOF MS spectra was performed on a Microflex MALDI-TOF mass spectrometer (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany).

2.3. Fabrication of a paper-based electrochemical DNA sensor

A paper-based electrochemical DNA sensor was fabricated using the wax-printing method [43,44]. Initially, the patterned paper was designed using Adobe Illustrator and printed onto the filter paper (Whatman No.1) using a wax printer (Xerox Color Qube 8570, Japan). The printed paper was then placed on a hot plate (175 °C, 50 s) to melt the wax and create a hydrophobic barrier. For electrode fabrication, three electrode systems were prepared using an in-house screen-printing method. First, carbon ink was screened as a working electrode (WE) and counter electrode (CE). Afterward, silver/silver chloride was screened as a reference electrode (RE) and conductive pad. The basic design of the paper-based electrochemical DNA biosensor was shown in Fig. S1.

Table 1
List of oligonucleotides.

Oligonucleotide	Sequence (5′–3′)
Complementary DNA (HPV type 16)	5′-GCTGGAGGTGTATG-3′
Non-complementary DNA 1 (HPV type 18)	5′-GGATGCTGCACCGG-3′
Non-complementary DNA 2 (HPV type 31)	5′-CCAAAAGCCCAAGG-3′
Non-complementary DNA 3 (HPV type 33)	5′-CACATCCACCCGCA-3′

2.4. Inkjet-printing of a G-PANI composite modified paper-based electrochemical DNA biosensor

Prior to electrode modification, a G-PANI composite was prepared using a physical mixing method following procedures extracted from relevant literature [45]. Graphene powder (10 mg) was dispersed in N-methyl-2-pyrrolidone (NMP) and sonicated for 20 h at room temperature. Subsequently, 20 mg of PANI (emeraldine base) was doped with 25 mg of camphor-10-sulfonic acid (CSA) to generate a positively charged amino group and also dissolved in 10 mL of NMP. For the preparation of the G-PANI conductive ink, the solutions of G and PANI were mixed together and stirred for 1 h. The mixture was centrifuged at 5000 rpm and filtered through a 0.43 μm filter membrane before use. The morphology of G-PANI conductive ink was characterized by transmission electron microscopy (TEM).

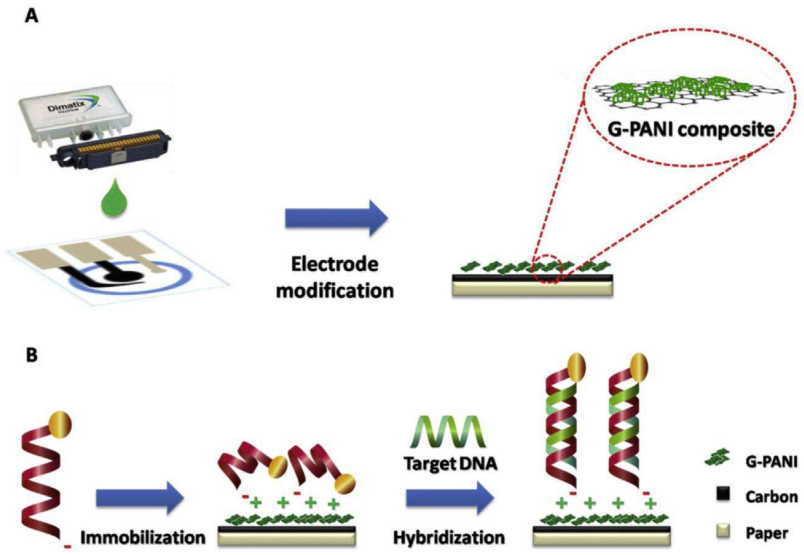
For electrode modification, the G-PANI composite solution was used as the ink for inkjet printing. The G-PANI conductive ink was loaded into a cartridge and printed onto the working electrode of the paper-based electrochemical DNA sensor using a Dimatix™ Materials Printer (DMP-2800, FUJIFILM Dimatix, Inc., Santa Clara, USA) at 30 °C, 20 V of applied voltage and 25 μM of drop spacing. Modification of the electrode is shown in Scheme 1A. Six layers of G-PANI composite solution were printed onto the surface area of the working electrode. Next, the modified electrode was heated at 65 °C for 30 min to dry the solvents from the G-PANI conductive ink.

2.5. Synthesis and labeling of the acpcPNA probe

The acpcPNA probe with the sequence Ac-$(Glu)_3$-CATACACCTCCAGC-Lys(AQ)NH_2 (written in the N→C direction, Ac = acetyl; AQ = anthraquinone; Glu = glutamic acid; Lys = lysine) was designed to detect 14 base synthetic oligonucleotide target with a sequence corresponding to human papillomavirus (HPV) type 16. The probe, referred to as AQ-PNA, was synthesized by solid-phase peptide synthesis using Fmoc chemistry as previously described [35]. The probe was modified with three glutamic acid residues at the N-terminus to incorporate the negative charge, which was followed by end-capping with an acetyl group. At the C-terminus, the acpcPNA probe was labeled with anthraquinone (AQ) via 4-(anthraquinone-2-oxy) butyric acid to the amino side chain of a C-terminal lysine residue. The progress of the reaction was monitored by MALDI-TOF-MS analysis on a Microflex MALDI-TOF mass spectrometer (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany). The modified PNA on the solid support was treated with 1:1 (v/v) aqueous ammonia:dioxane in a sealed tube at 60 °C overnight to remove the nucleobase protecting groups. Following cleavage from the solid support with trifluoroacetic acid (TFA), the AQ-PNA was purified by reverse-phase HPLC (C18 column, 0.1% (v/v) TFA in H_2O-MeOH gradient). The identity of AQ-PNA was verified by MALDI-TOF MS analysis, and the purity was confirmed to be >90% by reverse-phase HPLC.

2.6. Immobilization and hybridization of the PNA probe

First, the AQ-PNA probe (3 μL, 125 nM) was immobilized onto the G-PANI modified screen-printed carbon electrode surface by the drop-casting method and incubated for 15 min at room temperature. Next, 50 μL of PBS was placed onto the electrode surface. After immobilization of the probe, the AQ-PNA/G-PANI/SPCE modified electrode was hybridized with 3 μL of target DNA for 15 min. Then, the electrochemical signal response was measured using square-wave voltammetry. The immobilization and hybridization procedures are illustrated in Scheme 1B.



Scheme 1. Schematic illustration of (A) electrode modification and (B) immobilization and hybridization steps of paper-based electrochemical DNA biosensor.

2.7. PCR amplification of the cell line DNA sample

The SiHa (HPV type 16 positive) cell line DNA sample was amplified using PCR as previously reported [38]. Briefly, the amplification mixture containing 0.2 mM deoxynucleotide triphosphate mixture, 1× buffer (KCl, Tris) + 1.5 mM $MgCl_2$, 0.5 U of Taq polymerase, 0.4 μM of each of the primers and 100 ng/μL of the cell line DNA sample was amplified at 95 °C for 10 min, follow by 30 cycles at 52 °C for 30 s and finally 72 °C for 7 min. The success of the PCR was confirmed by gel electrophoresis in 2% (w/v) agarose TBE gel followed by staining with ethidium bromide and visualization under a UV-transilluminator.

2.8. Electrochemical measurement

For electrochemical measurements, the square-wave voltammetry was used throughout the experiment using a potentiostat (CHI1232A). After the immobilization process, 50 μL of PBS was dropped onto the modified working electrode, followed by adding the DNA target. Hybridization with AQ-PNA probe was done for 15 min. The electrochemical detection was performed under the optimal parameters including a frequency of 20 Hz, an amplitude of 100 mV and a step potential of 20 mV. The electrochemical signal after the hybridization was measured and compared with the signal in the absence of the DNA sample.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of the G-PANI conductive ink

To confirm the success of the preparation of the G-PANI conductive ink, the morphology of the ink was characterized by transmission electron microscopy (TEM). Fig. S2A shows a TEM image of the G-PANI composite, which indicates a strong dispersion of G inside the composites without aggregation. Moreover, the electron diffraction pattern of G (Fig. S2B) matches very well with the standard, single crystal graphene.

The influence of the G-PANI ratio on the electrochemical conductivity of the modified electrodes was investigated. The anodic current of 1.0 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ in a 0.1 M KCl solution was measured using different proportions of G and PANI. Interestingly, the anodic peak current of 1.0 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ increased with an increasing G:PANI ratio. The highest anodic current of $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ was observed with the G-PANI modified electrode at the ratio of 1:2 indicating the optimal sensitivity of the modified sensor (Fig. S3). In addition, the peak currents gradually decrease for the higher G:PANI ratio, which could be due to the agglomeration of G within the G-PANI modifier [45]. Moreover, the effect of the number of printed G-PANI layers was also investigated as shown in Fig. S4. The anodic peak current of 1.0 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ tends to increase with an increase in the number of G-PANI layers. However, the current of the printed G-PANI modified electrode slightly decreased over 6 printing layers. We also believe that this phenomenon arises from the aggregation of excess G on the modified electrode surface causing a decrease in the anodic current response.

Next, the electroactive surface area (A) of SPCE and G-PANI modified electrode were determined to illustrate that the G-PANI conductive ink increases the surface area of the SPCE by solving the Randles-Sevcik equation (Equation (1)):

$$I_p = \left(2.69x10^5\right)n^{3/2}ACD^{1/2}v^{1/2} \quad (1)$$

where I_p = current, n = number of electron transfer, C = concentration of electroactive species (mol cm^{-3}), D = diffusion coefficient (cm^2 s^{-1}) and v = scan rate (v s^{-1}). As shown in Fig. S5, the cyclic voltamograms of 5.0 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ in a 0.1 M KCl solution for SPCE and G-PANI modified electrode were obtained. The current (i_p) is directly proportional to the square root of scan rate. According to the Randles-Sevcik equation, an approximate value of A was calculated to be 0.041 cm^2 and 0.222 cm^2 for SPCE and G-PANI modified electrode, respectively. This result provided a 5.4 times increase of electrode-electroactive surface area, thus, G-PANI conductive ink can improve the surface area of electrode, leading to enhance the sensitivity. As a result, the six G-PANI-layered modified electrode and the 1:2 ratio of G:PANI were considered to be the optimal conditions and were used for subsequent experiments.

3.2. Characterization of labeled acpcPNA probe

In order to confirm the success of the synthesis and labeling of

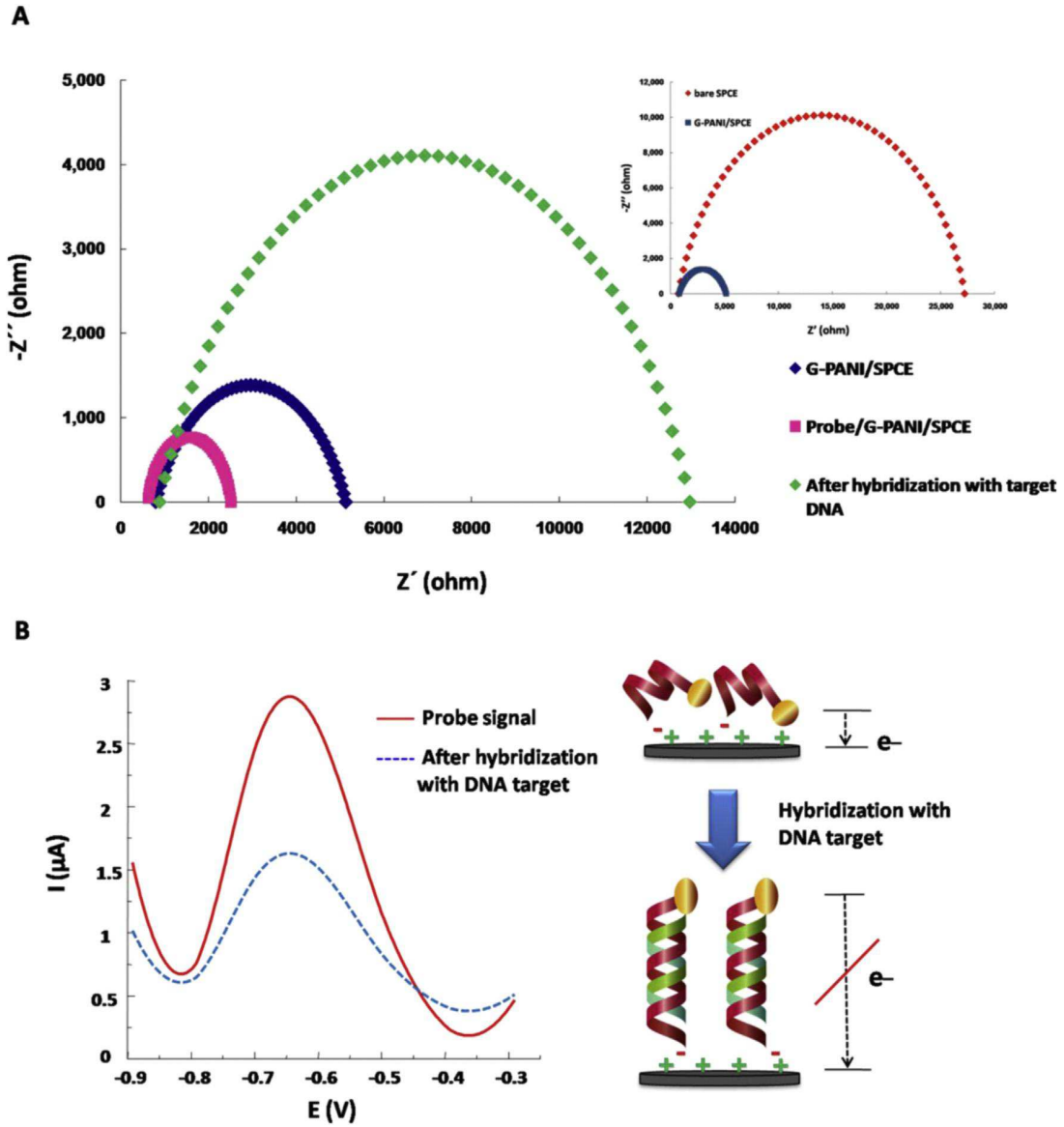


Fig. 1. (A) Nyquist plot of SPCE (inset), G-PANI/SPCE (inset), AQ-PNA/G-PANI/SPCE before and after hybridization with target DNA in 0.1 M $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$. (B) Square-wave voltammograms of immobilized AQ-PNA probe on G-PANI/SPCE before and after hybridization with an equimolar concentration of target DNA.

the AQ-PNA probe, MALDI-TOF mass spectrometry was used to characterize the unlabeled and labeled acpcPNA probes. The 14-mers unlabeled acpcPNA showed a mass peak at 4754 *m*/*z*. After labeling, the mass increased to 5477 *m*/*z*. This increase of 723 *m*/*z* coincides with the mass of AQ and three glutamic acid residues plus an acetyl group. Therefore, the labeling of the acpcPNA probe with the electroactive species and the negatively charged polyglutamate was confirmed.

3.3. Electrochemical characterization

Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) was used to characterize the AQ-PNA probe immobilization onto the working electrode. In general, the shape of the semicircle portion obtained from the EIS spectrum relates to either the electron transfer limited process or electron transfer resistance. Fig. 1A shows the Nyquist plots obtained from SPCE, G-PANI/SPCE and AQ-PNA/G-PANI/SPCE before and after hybridization with the target DNA in a solution of 1.0 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$. Fig. 1A (inset) shows the Nyquist curve of unmodified SPCE (red line) with an R_{ct} value of 27.5 kΩ. This value is larger than that obtained from G-PANI/SPCE, and indicates that the unmodified SPCE has a higher charge-transfer resistance. Therefore, the decrease in R_{ct} to 5.08 kΩ of G-PANI/SPCE (blue line) indicates that G-PANI improves the electron transfer rates. After the immobilization step (Fig. 1A), the semicircular portion of AQ-PNA/G-PANI/SPCE (pink line) dramatically decreased with the R_{ct} value of 2.67 kΩ. This result can be explained theoretically as AQ is electroactive and can improve conductivity. Thus, the AQ-labeled PNA probe, which was immobilized onto the electrode surface, can facilitate the electron transfer process at the interface between the G-PANI/SPCE surface and the electrolyte. For this reason, the Nyquist curve of AQ-PNA/G-PANI/SPCE should have possessed the smallest semicircular portion. In order to confirm the success of the immobilization of the AQ-PNA probe, the heterogeneous electron-

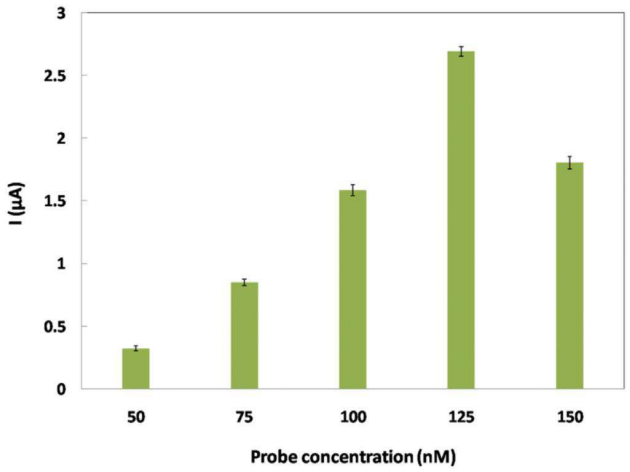


Fig. 2. The effect of AQ-PNA probe concentration on AQ electrochemical oxidation during the immobilization step.

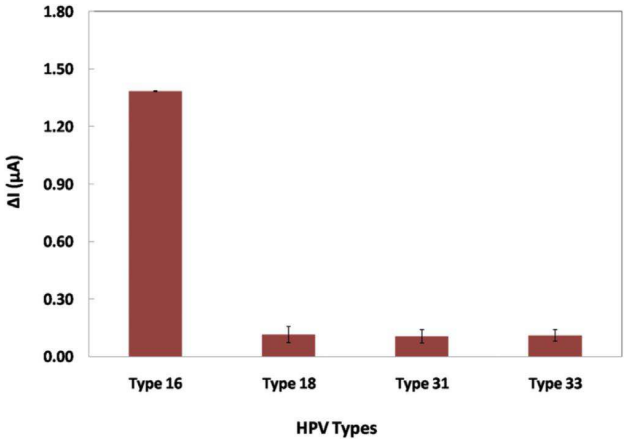


Fig. 4. The electrochemical signal response derived from AQ-PNA/G-PANI/SPCE probe after hybridized with various HPV types.

transfer rate constant (K_{et}) value was obtained from Equation (2), which shows the relationship between R_{ct} and K_{et}.

$$K_{et} = \frac{RT}{n^2F^2R_{et}AC_{redox}} \quad (2)$$

where n = number of electron transfer, F = faraday's constant (KJ mol^{-1}), A = electrode surface area (cm^2), C_{redox} = concentration of the redox couple (mol cm^{-3}). From the equation, the K_{et} values for SPCE, G-PANI/SPCE and AQ-PNA/G-PANI/SPCE were calculated to be 7.45 x 10^{-5} cm s^{-1}, 40.28 x 10^{-5} cm s^{-1} and 76.70 x 10^{-5} cm s^{-1}, respectively. The increasing of K_{et} values inferred that the electron transfer process on AQ-PNA/G-PANI/SPCE is easier and faster than that on G-PANI/SPCE and SPCE. These results indicate that the negatively charged AQ-PNA probe was successfully immobilized onto the positively charged G-PANI modified electrode surface through electrostatic attraction.

Next, the electrochemistry of the immobilized AQ-PNA/G-PANI/SPCE probe before and after hybridization with the DNA target were investigated using square-wave voltammetry (SWV), (Fig. 1B). The immobilization of the AQ-PNA/G-PANI/SPCE probe displayed a redox peak at approximately −0.65 V. After hybridization with an equimolar quantity of the complementary target DNA, the electrochemical response significantly decreased due to the increased rigidity of the PNA-DNA duplex relative to the native PNA probe. The rigidity hinders the electron transfer between the redox-active label (AQ) and the electrode surface [46,47].

3.4. Optimization of experimental variables

The experimental conditions were optimized next. The effect of

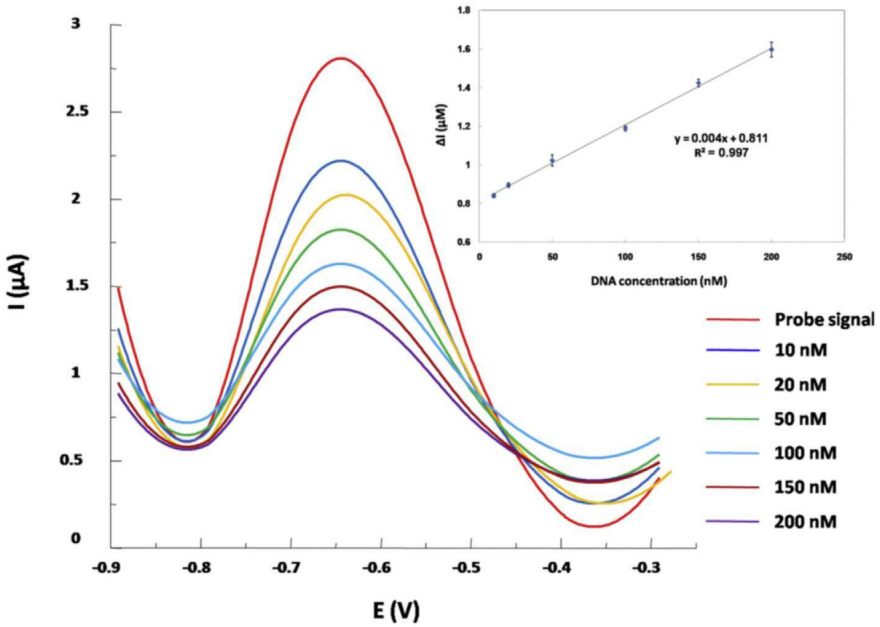


Fig. 3. Square-wave voltamograms of AQ-PNA/G-PANI/SPCE after hybridize with the target DNA in the concentration range of 10–200 nM and the calibration plots of the change in the probe electrochemical current (ΔI) versus the target DNA concentration (inset) at optimal condition; 125 nM of AQ-PNA probe concentration, a frequency of 20 Hz, an amplitude of 100 mV and a step potential of 20 mV.

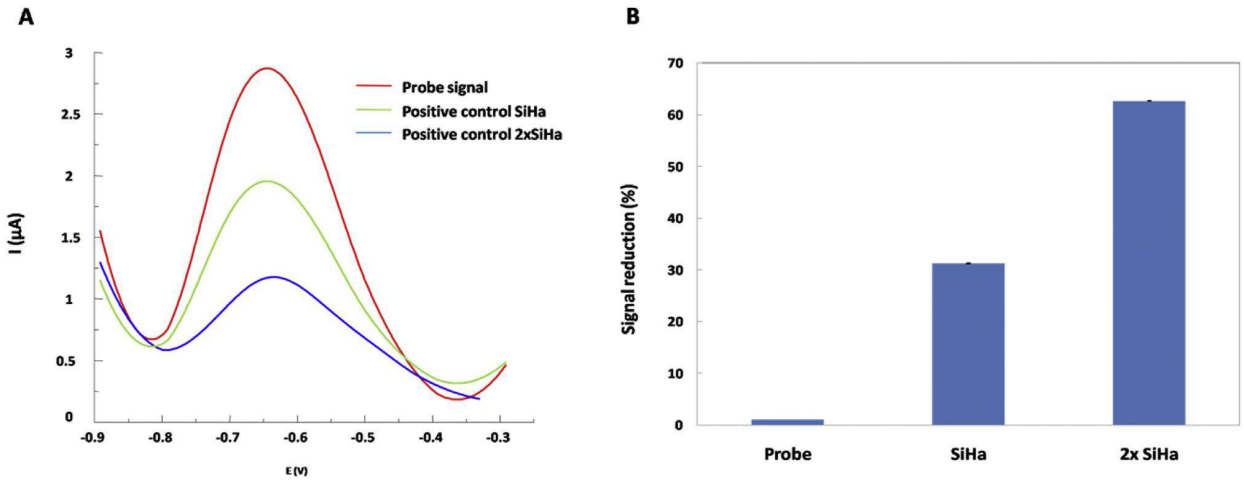


Fig. 5. Square-wave voltammograms of AQ-PNA/G-PANI/SPCE probe in the presence of PCR-amplified HPV type 16 positive sample from SiHa cell-line.

AQ-PNA probe concentration on AQ electrochemical oxidation was investigated first. The oxidation current obtained for different concentrations of the AQ-PNA probe measured by square wave voltammetry are shown in Fig. 2. The current continuously increased up to 125 nM. Above 125 nM, the current decreased significantly. The decrease in peak current at high AQ-PNA concentrations can potentially be caused do to an increased thickness of the organic layer [48,49], which leads to a lower electron transfer between AQ and the working electrode surface. Hence, the probe concentration of 125 nM was selected as the optimal concentration for further experiments.

For electrochemical detection using SWV, the variable parameters including frequency, step potential and amplitude were optimized using a 125 nM AQ-PNA probe concentration without DNA target shown in Fig. S6. The optimal parameters for electrochemical detection of this system was found to be 20 Hz of frequency, 100 mV of amplitude and 20 mV of step potential.

3.5. Analytical performance

To evaluate the analytical performance of the AQ-PNA/G-PANI/SPCE modified electrode, different concentrations of DNA target were determined using SWV analysis. Fig. 3 shows the voltammograms as well as the calibration curve (inset) as a function of target DNA concentrations. The calibration curve provided a linear range from 10 nM to 200 nM with a correlation coefficient of 0.997. The limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ), which were calculated as the concentration that produced a signal at 3 times and 10 times of the standard deviation of the blank (N = 5) [4], were found to be 2.3 nM and 7.7 nM, respectively. Our proposed method provides a wide linear range and sufficiently low detection limit for HPV detection. Table S1 shows a comparison of electrochemical performance between AQ-PNA/G-PANI/SPCE and the other modified electrodes used for HPV detection. It can be seen that a sufficiently low detection limit for HPV detection could be obtained from our proposed method. Importantly, this ePAD DNA biosensor can be easily and inexpensively prepared compared to the other HPV DNA biosensors [38,48,50].

3.6. Selectivity of the HPV type 16 detection

In order to investigate the selectivity of the acpcPNA probe, the current response obtained from the 14-nucleotide oligomer HPV type 16 DNA target was compared to non-complementary 14-nucleotide oligomers, which originate from the other types of high risk HPV (types 18, 31 and 33), under the same experimental conditions. As shown in Fig. 4, a significantly different current was only obtained from the complementary DNA relative to the non-complementary DNA. Therefore, the immobilized AQ-PNA probe selectively binds to the HPV type 16 DNA target sequences. Accordingly, the proposed DNA biosensor demonstrated high selectivity to HPV type 16 DNA.

3.7. Reproducibility and stability of the paper-based electrochemical DNA biosensor

The electrode-to-electrode reproducibility and stability of the paper-based electrochemical DNA biosensor was examined. The relative standard deviations (RSDs) of five electrodes were tested in the concentration range of 10–200 nM. The % RSDs was determined to be between 2.16% and 7.79%. These results indicate that the proposed DNA biosensor offers acceptable reproducibility. Moreover, the storage stability is another important parameter for DNA biosensor development. The ePAD DNA biosensor was stored at room temperature (25 °C) for 2 weeks before recording the current response to 10 nM target DNA. It was determined that 90.2% of the initial current response was retained in the aged sensor compared to the response obtained from the freshly prepared sensor. The stability of this DNA sensor is mainly attributed to the environmental stability of PANI.

3.8. Detection of the PCR DNA sample

To test the ePAD biosensor, DNA was extracted from the SiHa cell line, HPV type 16 and amplified using PCR. Fig. 5A shows the SWV response of the proposed DNA biosensor in the presence of positive PCR products. It was observed that the current response decreased in the presence of the PCR product from the HPV type 16-positive cell line. Moreover, the current response decreased with increasing amounts of sample, as shown in Fig. 5B. These results indicate that the paper-based electrochemical DNA biosensor has potential for detecting HPV type 16 DNA in PCR samples in clinical samples in future work.

4. Conclusions

A novel paper-based electrochemical DNA biosensor was developed and used for the determination of high-risk HPV type 16 using AQ-PNA probe immobilized on a G-PANI/SPCE modified electrode. The AQ-PNA probe was modified with negatively charged amino acids at the C-terminus to enable electrostatic immobilization on the cationic G-PANI electrode. Using SWV, the electrochemical current decreased after hybridization with the complementary target DNA. Under optimal conditions, a linear range of 10–200 nM was obtained and the limit of detection was determined to be 2.3 nM. The proposed DNA sensor also exhibited very high selectivity against non-complementary 14-base oligonucleotides, including HPV types 18, 31 and 33 DNA. Finally, this sensing system was successfully applied to detect the PCR amplified DNA from HPV type 16 positive SiHa cells. As was demonstrated, several features make this highly sensitive ePAD DNA biosensor suited as an alternative tool for the diagnostic screening and detection of cervical cancer. First, the ePAD can provide a low-cost, disposable sensor for this POC application. Second, the immobilization through electrostatic attraction using G-PANI modified electrode is attractive relative to covalent immobilization because of its inherent simplicity. Third, the inkjet printing method for electrode modification process provides the potential for mass production while helping to reduce the variation among individual sensors, which is crucial for disposable sensor.

Acknowledgments

The authors gratefully appreciate the financial supports from Thailand Graduate Institute of Science and Technology (TGIST 01-55-014), the 90th Anniversary of Chulalongkorn University Fund (GCUGR1125582020D) and the Thailand Research Fund (DPG5780002). Also, this research was funded by the Ratchadapisek Sompoch Endowment Fund (2016), Chulalongkorn University (CU-59-008-HR). CSH acknowledges funding from Colorado State University.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2016.11.071.

References

[1] J.C. Cunningham, N.J. Brenes, R.M. Crooks, Paper electrochemical device for detection of DNA and thrombin by target-induced conformational switching, Anal. Chem. 86 (2014) 6166–6170.
[2] T. Songjaroen, W. Dungchai, O. Chailapakul, W. Laiwattanapaisal, Novel, simple and low-cost alternative method for fabrication of paper-based microfluidics by wax dipping, Talanta 85 (2011) 2587–2593.
[3] A. Apilux, W. Dungchai, W. Siangproh, N. Praphairaksit, C.S. Henry, O. Chailapakul, Lab-on-Paper with dual electrochemical/colorimetric detection for simultaneous determination of gold and iron, Anal. Chem. 82 (2010) 1727–1732.
[4] W. Dungchai, O. Chailapakul, C.S. Henry, Electrochemical detection for paper-based microfluidics, Anal. Chem. 81 (2009) 5821–5826.
[5] J. Mettakoonpitak, K. Boehle, S. Nantaphol, P. Teengam, J.A. Adkins, M. Srisa-Art, C.S. Henry, Electrochemistry on paper-based analytical devices: a review, Electroanalysis 28 (2016) 1420–1436.
[6] J.-M. Oh, K.-F. Chow, Recent developments in electrochemical paper-based analytical devices, Anal. Methods 7 (2015) 7951–7960.
[7] Z. Nie, C.A. Nijhuis, J. Gong, X. Chen, A. Kumachev, A.W. Martinez, M. Narovlyansky, G.M. Whitesides, Electrochemical sensing in paper-based microfluidic devices, Lab. Chip 10 (2010) 477–483.
[8] J. Adkins, K. Boehle, C. Henry, Electrochemical paper-based microfluidic devices, Electrophoresis 36 (2015) 1811–1824.
[9] J. Zhang, S. Song, L. Wang, D. Pan, C. Fan, A gold nanoparticle-based chronocoulometric DNA sensor for amplified detection of DNA, Nat. Protoc. 2 (2007) 2888–2895.
[10] R. Lao, S. Song, H. Wu, L. Wang, Z. Zhang, L. He, C. Fan, Electrochemical interrogation of DNA monolayers on gold surfaces, Anal. Chem. 77 (2005) 6475–6480.
[11] T. García, M. Revenga-Parra, L. Añorga, S. Arana, F. Pariente, E. Lorenzo, Disposable DNA biosensor based on thin-film gold electrodes for selective Salmonella detection, Sens. Actuator B Chem. 161 (2012) 1030–1037.
[12] D. Ozkan, P. Kara, K. Kerman, B. Meric, A. Erdem, F. Jelen, P.E. Nielsen, M. Ozsoz, DNA and PNA sensing on mercury and carbon electrodes by using methylene blue as an electrochemical label, Bioelectrochemistry 58 (2002) 119–126.
[13] P. Palaska, E. Aritzoglou, S. Girousi, Sensitive detection of cyclophosphamide using DNA-modified carbon paste, pencil graphite and hanging mercury drop electrodes, Talanta 72 (2007) 1199–1206.
[14] D. Du, S. Guo, L. Tang, Y. Ning, Q. Yao, G.-J. Zhang, Graphene-modified electrode for DNA detection via PNA–DNA hybridization, Sens. Actuator B Chem. 186 (2013) 563–570.
[15] L. Santiago-Rodríguez, G. Sánchez-Pomales, C.R. Cabrera, Electrochemical DNA sensing at single-walled carbon nanotubes chemically assembled on gold surfaces, Electroanalysis 22 (2010) 2817–2824.
[16] Z. Wang, J. Zhang, P. Chen, X. Zhou, Y. Yang, S. Wu, L. Niu, Y. Han, L. Wang, P. Chen, F. Boey, Q. Zhang, B. Liedberg, H. Zhang, Label-free, electrochemical detection of methicillin-resistant staphylococcus aureus DNA with reduced graphene oxide-modified electrodes, Biosens. Bioelectron. 26 (2011) 3881–3886.
[17] M. Zhou, Y. Zhai, S. Dong, Electrochemical sensing and biosensing platform based on chemically reduced graphene oxide, Anal. Chem. 81 (2009) 5603–5613.
[18] K.S. Novoselov, V.I. Falko, L. Colombo, P.R. Gellert, M.G. Schwab, K. Kim, A roadmap for graphene, Nature 490 (2012) 192–200.
[19] W. Choi, I. Lahiri, R. Seelaboyina, Y.S. Kang, Synthesis of graphene and its applications: a review, Crit. Rev. Solid State 35 (2010) 52–71.
[20] M.J. Allen, V.C. Tung, R.B. Kaner, Honeycomb carbon: a review of graphene, Chem. Rev. 110 (2010) 132–145.
[21] J.R. Potts, D.R. Dreyer, C.W. Bielawski, R.S. Ruoff, Graphene-based polymer nanocomposites, Polymer 52 (2011) 5–25.
[22] A.K. Geim, K.S. Novoselov, The rise of graphene, Nat. Mater 6 (2007) 183–191.
[23] X.-M. Feng, R.-M. Li, Y.-W. Ma, R.-F. Chen, N.-E. Shi, Q.-L. Fan, W. Huang, One-step electrochemical synthesis of graphene/polyaniline composite film and its applications, Adv. Funct. Mater. 21 (2011) 2989–2996.
[24] P. Manivel, M. Dhakshnamoorthy, A. Balamurugan, N. Ponpandian, D. Mangalaraj, C. Viswanathan, Conducting polyaniline-graphene oxide fibrous nanocomposites: preparation, characterization and simultaneous electrochemical detection of ascorbic acid, dopamine and uric acid, RSC Adv. 3 (2013) 14428–14437.
[25] N. Ruecha, R. Rangkupan, N. Rodthongkum, O. Chailapakul, Novel paper-based cholesterol biosensor using graphene/polyvinylpyrrolidone/polyaniline nanocomposite, Biosens. Bioelectron. 52 (2014) 13–19.
[26] J.-D. Qiu, L. Shi, R.-P. Liang, G.-C. Wang, X.-H. Xia, Controllable deposition of a platinum nanoparticle ensemble on a polyaniline/graphene hybrid as a novel electrode material for electrochemical sensing, Chem. Eur. J. 18 (2012) 7950–7959.
[27] Y. Bo, H. Yang, Y. Hu, T. Yao, S. Huang, A novel electrochemical DNA biosensor based on graphene and polyaniline nanowires, Electrochim. Acta 56 (2011) 2676–2681.
[28] H. Chang, Y. Yuan, N. Shi, Y. Guan, Electrochemical DNA biosensor based on conducting polyaniline nanotube array, Anal. Chem. 79 (2007) 5111–5115.
[29] X. Luo, T.M.-H. Lee, I.M. Hsing, Immobilization-free sequence-specific electrochemical detection of DNA using ferrocene-labeled peptide nucleic acid, Anal. Chem. 80 (2008) 7341–7346.
[30] M. Egholm, O. Buchardt, L. Christensen, C. Behrens, S.M. Freier, D.A. Driver, R.H. Berg, S.K. Kim, B. Norden, P.E. Nielsen, PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules, Nature 365 (1993) 566–568.
[31] P.E. Nielsen, M. Egholm, R.H. Berg, O. Buchardt, Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide, Sci. N. Y. N.Y. 254 (1991) 1497–1500.
[32] D. Ozkan, A. Erdem, P. Kara, K. Kerman, J. Justin Gooding, P.E. Nielsen, M. Ozsoz, Electrochemical detection of hybridization using peptide nucleic acids and methylene blue on self-assembled alkanethiol monolayer modified gold electrodes, Electrochem. Commun. 4 (2002) 796–802.
[33] M. Steichen, Y. Decrem, E. Godfroid, C. Buess-Herman, Electrochemical DNA hybridization detection using peptide nucleic acids and $[Ru(NH_3)_6]^{3+}$ on gold electrodes, Biosens. Bioelectron. 22 (2007) 2237–2243.
[34] J. Wang, E. Palecek, P.E. Nielsen, G. Rivas, X. Cai, H. Shiraishi, N. Dontha, D. Luo, P.A.M. Farias, Peptide nucleic acid probes for sequence-specific DNA biosensors, J. Am. Chem. Soc. 118 (1996) 7667–7670.
[35] T. Vilaivan, C. Srisuwannaket, Hybridization of pyrrolidinyl peptide nucleic acids and DNA: selectivity, base-pairing specificity, and direction of binding, Org. Lett. 8 (2006) 1897–1900.
[36] C. Vilaivan, C. Srisuwannaket, C. Ananthanawat, C. Suparpprom, J. Kawakami, Y. Yamaguchi, Y. Tanaka, T. Vilaivan, Pyrrolidinyl peptide nucleic acid with α/β-peptide backbone: a conformationally constrained PNA with unusual hybridization properties, Artif. DNA PNA XNA 2 (2011) 50–59.
[37] T. Vilaivan, Pyrrolidinyl PNA with α/β-dipeptide backbone: from development to applications, Acc. Chem. Res. 48 (2015) 1645–1656.
[38] S. Jampasa, W. Wonsawat, N. Rodthongkum, W. Siangproh, P. Yanatatsaneejit,

T. Vilaivan, O. Chailapakul, Electrochemical detection of human papillomavirus DNA type 16 using a pyrrolidinyl peptide nucleic acid probe immobilized on screen-printed carbon electrodes, Biosens. Bioelectron. 54 (2014) 428–434.
[39] J. Kongpeth, S. Jampasa, P. Chaumpluk, O. Chailapakul, T. Vilaivan, Immobilization-free electrochemical DNA detection with anthraquinone-labeled pyrrolidinyl peptide nucleic acid probe, Talanta 146 (2016) 318–325.
[40] N. Jirakittiwut, N. Panyain, T. Nuanyai, T. Vilaivan, T. Praneenararat, Pyrrolidinyl peptide nucleic acids immobilised on cellulose paper as a DNA sensor, RSC Adv. 5 (2015) 24110–24114.
[41] Global Burden of Disease Cancer Collaboration, The Global Burden of Cancer 2013, JAMA Oncol. 1 (2015) 505–527.
[42] C. Karuwan, C. Sriprachuabwong, A. Wisitsoraat, D. Phokharatkul, P. Sritongkham, A. Tuantranont, Inkjet-printed graphene-poly(3,4-ethylenedioxythiophene):poly(styrene-sulfonate) modified on screen printed carbon electrode for electrochemical sensing of salbutamol, Sens. Actuator B Chem. 161 (2012) 549–555.
[43] M.M. Mentele, J. Cunningham, K. Koehler, J. Volckens, C.S. Henry, Microfluidic paper-based analytical device for particulate metals, Anal. Chem. 84 (2012) 4474–4480.
[44] Y. Lu, W. Shi, J. Qin, B. Lin, Fabrication and characterization of paper-based microfluidics prepared in nitrocellulose membrane by wax printing, Anal. Chem. 82 (2010) 329–335.
[45] C. Bardpho, P. Rattanarat, W. Siangproh, O. Chailapakul, Ultra-high performance liquid chromatographic determination of antioxidants in teas using inkjet-printed graphene–polyaniline electrode, Talanta 148 (2016) 673–679.
[46] A. Abi, E.E. Ferapontova, Unmediated by DNA electron transfer in redox-labeled DNA duplexes end-tethered to gold electrodes, J. Am. Chem. Soc. 134 (2012) 14499–14507.
[47] E. Farjami, L. Clima, K. Gothelf, E.E. Ferapontova, “Off-on” electrochemical hairpin-DNA-based genosensor for cancer diagnostics, Anal. Chem. 83 (2011) 1594–1602.
[48] D.S. Campos-Ferreira, G.A. Nascimento, E.V.M. Souza, M.A. Souto-Maior, M.S. Arruda, D.M.L. Zanforlin, M.H.F. Ekert, D. Bruneska, J.L. Lima-Filho, Electrochemical DNA biosensor for human papillomavirus 16 detection in real samples, Anal. Chim. Acta 804 (2013) 258–263.
[49] M.H. Pournaghi-Azar, M.S. Hejazi, E. Alipour, Developing an electrochemical deoxyribonucleic acid (DNA) biosensor on the basis of human interleukine-2 gene using an electroactive label, Anal. Chim. Acta 570 (2006) 144–150.
[50] L.D. Tran, D.T. Nguyen, B.H. Nguyen, Q.P. Do, H. Le Nguyen, Development of interdigitated arrays coated with functional polyaniline/MWCNT for electrochemical biodetection: application for human papillomavirus, Talanta 85 (2011) 1560–1565.

ACES Asian Chemical Editorial Society

DOI: 10.1002/ajoc.201600575

ASIAN JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY
Full Paper

Oxetin Synthesis

Enantioselective Synthesis of (2*S*,3*S*)-*epi*-Oxetin and Its Incorporation into Conformationally Constrained Pyrrolidinyl PNA with an Oxetane Backbone

Pattarakiat Seankongsuk,[a] Viwat Vchirawongkwin,[b] Roderick W. Bates,[c] Panuwat Padungros,[a] and Tirayut Vilaivan*[a]

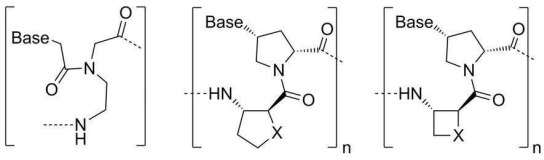
In remembrance of His Majesty King Bhumibol Adulyadej (1927–2016), for his life-time dedication to Thailand.

Abstract: Fmoc-protected (2*S*,3*S*)-*epi*-oxetin was synthesized from (*E*)-4-(benzyloxy)but-2-enal via enantioselective organocatalytic epoxidation, epoxide ring opening with azide, alcohol activation and ring closure, followed by functional-group manipulation in eight steps with 12% overall yield and 94% *ee*. The amino acid was used as a building block for a new conformationally constrained pyrrolidinyl PNA with an oxetane-containing backbone. The unexpected sensitivity of the oxetane backbone posed considerable synthetic challenges under standard Fmoc-solid-phase peptide synthesis conditions, and a mechanism for acid-catalyzed degradation was proposed. In addition, the DNA- and RNA-binding properties of the oxetane PNA were investigated. The presence of an oxetane ring decreased the stability of the PNA·DNA and PNA·RNA duplexes when compared to PNA with a cyclobutane-containing backbone, which could be explained by the flattening of the oxetane ring, leading to a suboptimal torsional angle.

Introduction

Peptide nucleic acid (PNA) is a DNA mimic first introduced in 1990s by Nielsen and co-workers.[1] The original PNA consists of an amide backbone derived from *N*-2-aminoethylglycine (aeg) and DNA bases, hence it is known as aegPNA. AegPNA recognizes DNA and RNA according to Watson–Crick base pairing rules; however, aegPNA·DNA duplexes are more stable, and the binding is more specific than that of natural nucleic acids.[2] The electrostatically neutral polyamide backbone of PNA contributes to its remarkable nucleic acid binding properties, as well as to its resistance to proteases and nucleases.[1] These properties led to various practical uses of PNA especially for diagnostic and therapeutic purposes.[3]

During the past 25 years, several research groups have proposed a number of structural modifications of aegPNA to increase the binding affinities and mismatch discrimination ability even further. One of the most successful approaches is by constraining the flexible backbone of aegPNA by incorporation of cyclic moieties or bulky substituents.[4] Our laboratory developed a conformationally constrained pyrrolidinyl PNA derived from a nucleobase-modified proline and (1*S*,2*S*)-2-aminocyclopentane carboxylic acid dipeptide backbone (acpcPNA) that exhibited greater DNA binding affinity and specificity than aegPNA (Scheme 1).[5] The structure and stereochemistry of the cyclic β-amino acid played a critical role in determining the DNA/RNA binding properties of the pyrrolidinyl PNA. For example, pyrrolidinyl PNA with a four-membered ring (1*S*,2*S*)-2-



Scheme 1. Structures of aegPNA (left), acpcPNA/atfcPNA (middle), and acbcPNA/aocPNA (right).

[a] *P. Seankongsuk, P. Padungros, T. Vilaivan*
Department of Chemistry
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Organic Synthesis Research Unit
Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330 (Thailand)
E-mail: vtirayut@chula.ac.th

[b] *V. Vchirawongkwin*
Department of Chemistry
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330 (Thailand)

[c] *R. W. Bates*
Division of Chemistry and Biological Chemistry
School of Physical and Mathematical Sciences
Nanyang Technological University
21 Nanyang Link, Singapore 637371 (Singapore)

Supporting information and the ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under http://dx.doi.org/10.1002/ajoc.201600575.

© 2017 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

aminocyclobutanecarboxylic acid backbone (acbcPNA) formed even stronger hybrids with DNA and RNA than acpcPNA.[6]

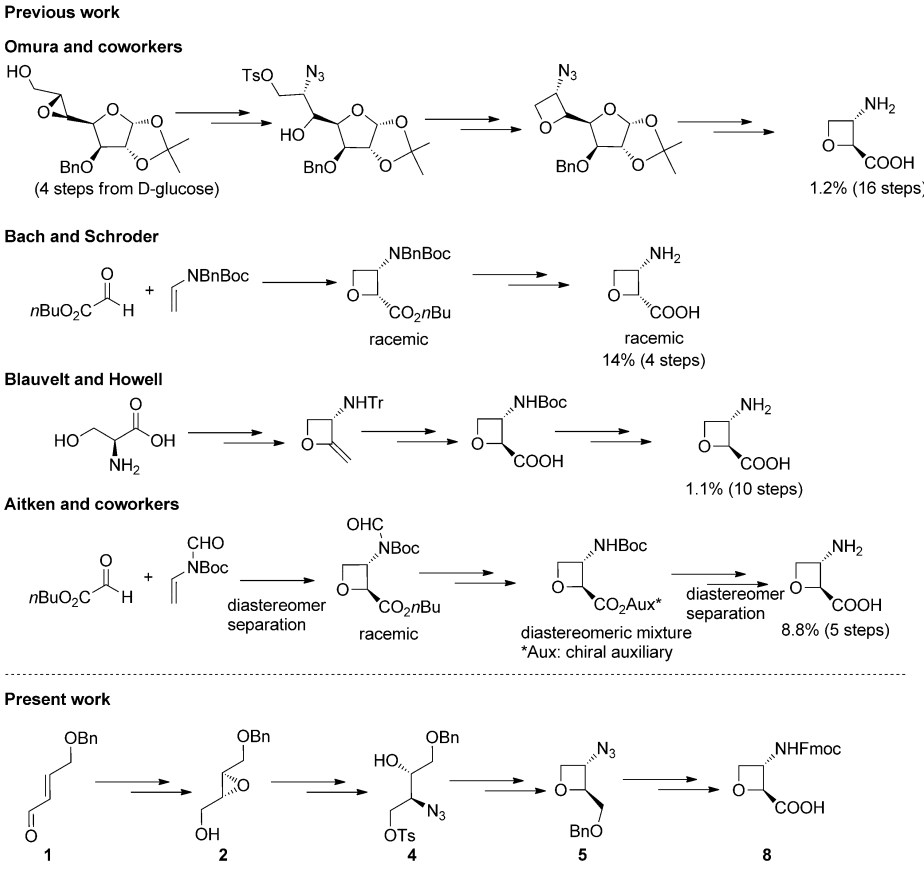
Although the affinity and specificity towards recognition of DNA/RNA have been enhanced, practical uses of PNAs are still limited by their poor water solubility and the tendency of non-specific interactions with hydrophobic materials. Ly and co-workers demonstrated that incorporation of polar groups into aegPNA ($^{R\text{-}MP}\gamma$PNA) via a diethylene glycol side-chain can overcome the hydrophobicity problem without negative effects on PNA·DNA/RNA binding properties.[7] In our recent work, the hydrophilicity of acpcPNA was enhanced by replacing the cyclopentane ring in acpcPNA with a tetrahydrofuran ring in (2*S*,3*S*)-3-aminotetrahydrofuran-2-carboxylic acid (atfcPNA) while the DNA/RNA binding affinities and sequence specificity were still retained.[8]

Oxetanes possess unique structural features and reactivities that make them useful as building blocks in medicinal chemistry[9,10] and as intermediates for organic synthesis.[11] Considering the beneficial effects of replacing the cyclopentane ring of acpcPNA with a cyclobutane in acbcPNA and with tetrahydrofuran in aftcPNA, herein we propose to combine both modifications into a novel pyrrolidinyl PNA with an oxetane-containing backbone derived from (2*S*,3*S*)-3-aminooxetane-2-carboxylic acid (aoc). The (2*S*,3*S*) enantiomer of the oxetane-containing β-amino acid, which is an epimer of a naturally occurring metabolite known as oxetin,[12] was required as a building block. In addition to showing some biological activity,[12] oxetin, *epi*-oxetin and their ring-substituted derivatives are potentially useful as building blocks for novel foldamers.[13] In this work, we report a concise enantioselective synthesis of (2*S*,3*S*)-*epi*-oxetin and its incorporation into a new pyrrolidinyl PNA (aocPNA) as well as DNA/RNA binding properties of the new aocPNA.

Results and Discussion

Synthesis of Fmoc-protected (2*S*,3*S*)-*epi*-oxetin

Fmoc-*trans*-(2*S*,3*S*)-*epi*-oxetin **8** is required as a key building block for the synthesis of aocPNA. The (2*S*,3*S*) configuration was chosen in accordance with the configurations of acpcPNA and acbcPNA that had been previously optimized in our research group.[4] Syntheses of various stereoisomers of oxetin have been described in the literature (Scheme 2).[14] Omura and co-workers reported the synthesis of all four diastereomers of oxetin by using D-glucose as a common precursor.[14a] However, the syntheses were lengthy, had low stereoselectivity, and were non-atom-economical since only two carbon atoms from glucose remained in the final oxetin molecule. The overall yield of the *trans*-(2*S*,3*S*)-*epi*-oxetin from this 16-step synthesis was 1.2%.[14a] Bach and Schröder reported the synthesis of racemic *cis*-oxetin via a concise four-step reaction sequence in



Scheme 2. Previous syntheses of oxetin and *epi*-oxetin, and the synthetic plan for the present work.

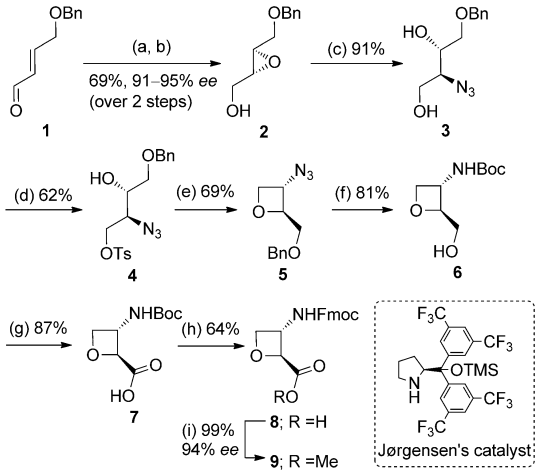
© 2017 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

14% overall yield via a Paterno–Büchi reaction between butyl glyoxylate and a Boc-protected enamine.[14b] More recently, Blauvelt and Howell reported a synthesis of (2*S*,3*S*)-*epi*-oxetin starting from L-serine via a 10-step reaction sequence in 1.1% overall yield.[14c] Very recently, Aitken and co-workers adapted Bach's procedure to synthesize all four stereoisomers of oxetin on gram scale by diastereomeric separation using a chiral oxazolidinone auxiliary, leading to (2*S*,3*S*)-*epi*-oxetin in 8.8% overall yield within a five-step reaction sequence.[14d]

All of these previously reported syntheses have limitations. Thus, development of a concise enantioselective synthesis of Fmoc-protected (2*S*,3*S*)-*epi*-oxetin **8** is in our interest. The synthetic plan (Scheme 2) relying on the optically pure epoxyalcohol **2** as a key intermediate, is conceptually related to Omura's route.[14a] However, the number of functional group transformations was shortened considerably by employing an organocatalytic asymmetric oxidation instead of using D-glucose as a source of chirality. Regioselective ring opening of the epoxide **2** with a suitable nitrogen nucleophile such as an azide, followed by selective activation of the primary OH group of intermediate **4**, ring closure and straightforward functional group transformation should provide the desired Fmoc-(2*S*,3*S*)-*epi*-oxetin **8**.

Enantioselective synthesis of the chiral epoxyalcohol **2** by catalytic asymmetric epoxidation is well-documented.[15] While the Sharpless epoxidation has been reported to give the desired epoxide in as high as 97–98% *ee*,[15c,d] in our hands it was difficult to achieve this level of enantioselectivity owing to several reaction parameters. Accordingly, we chose a more user-friendly organocatalytic epoxidation route reported by Jørgensen and co-workers in 2005.[15e] Following the synthetic route outlined in Scheme 3, Jørgensen's organocatalytic epoxidation of (*E*)-4-(benzyloxy)but-2-enal (**1**)[16] with aqueous hydrogen peroxide in the presence of 10 mol% (*S*)-2-(bis(3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl)(trimethylsilyl-oxy)methyl) pyrrolidine (Jørgensen's catalyst) afforded an unstable epoxyaldehyde intermediate. It was immediately subjected to $NaBH_4$ reduction without further purification to give the epoxyalcohol **2** in 69% yield over two steps with *ee* values of 91–95%.[15e] The absolute configuration was ascertained by comparison of the optical rotation with the literature.[15a]

The azido moiety was introduced by a $B(OMe)_3$-mediated regioselective ring opening of the epoxyalcohol **2** with sodium azide to yield the azidoalcohol **3** in 91% yield.[17] Next, the primary alcohol of **3** was activated in order to create a leaving group for ring closure. Under standard tosylation conditions (1 equiv TsCl, 2.2 equiv Et_3N and catalytic DMAP),[18] the desired monotosylated **4** was observed in only 38% yield accompanied by 13% yield of ditosylated product. Several monotosylation attempts were performed without success. The best result was obtained only when 2-aminoethyldiphenylborinate (2-ADP) was employed as a catalyst in the presence of diisopropylethylamine (DIEA) as a base.[19] Thus, in the presence of 10 mol% 2-ADP boron catalyst, the monotosylate intermediate **4** was obtained in 62% yield. Subsequent phase-transfer-catalyzed ring closure under basic conditions in the presence of tetrabutylammonium hydrogen sulfate (TBAHS)[20] generated



Reagents and conditions: (a) (*S*)-2-(bis(3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl)(trimethylsilyl-oxy)methyl) pyrrolidine (Jorgensen's catalyst, 10 mol%), 30% aq. H_2O_2, CH_2Cl_2, 10-20 °C, 4.5 h; (b) $NaBH_4$, MeOH, 0 °C, 30 min; (c) NaN_3, $B(OMe)_3$, DMF, 50 °C, 5 h; (d) TsCl, DIEA, 2-aminoethyl diphenylborinate (2-ADP,10 mol%), MeCN, RT, 5 d; (e) NaOH, TBAHS (cat), toluene, H_2O, RT, 20 min; (f) $Pd(OH)_2/C$ (cat), H_2 (1 atm), MeOH, Boc_2O, 7 d; (g) DAIB, TEMPO (cat), MeCN, H_2O, RT, 24 h; (h) i. TFA, CH_2Cl_2. ii. FmocOSu, $NaHCO_3$, MeCN, H_2O, RT, 24 h; (i) CH_2N_2 (generated from Diazald® and NaOH), EtOAc, RT, 30 min.

Scheme 3. Synthesis of Fmoc-(2*S*,3*S*)-*epi*-oxetin **8** starting from (*E*)-4-(benzyloxy)but-2-enal (**1**).

the azido-oxetane intermediate **5** in 69% yield. The remaining steps were straightforward functional group transformations, starting with catalytic hydrogenation to deprotect the benzyl ether and to reduce the azide group of **5** to the amino group, which was concomitantly protected in situ with di-*tert*-butyl dicarbonate to give the Boc-protected amino alcohol **6** in 81% yield. The alcohol **6** was then oxidized[21] to the Boc-protected (2*S*,3*S*)-*epi*-oxetin **7** in 87% yield. Finally, removal of the Boc group followed by Fmoc installation yielded the desired Fmoc-(2*S*,3*S*)-*epi*-oxetin **8** in 64% yield. The *ee* of **8** was determined by chiral HPLC to be 94% from the corresponding methyl ester **9**, which was obtained by methylation of **8** with diazomethane. In conclusion, the target building block Fmoc-(2*S*,3*S*)-*epi*-oxetin **8** was successfully synthesized from the readily available (*E*)-4-(benzyloxy)but-2-enal (**1**) following an eight-step reaction sequence in 12% overall yield and high optical purity. As Aitken and co-workers reported a quantitative yield on Boc deprotection of Boc-(2*S*,3*S*)-*epi*-oxetin **7** to generate free (2*S*,3*S*)-oxetin,[14d] the efficiency of the present synthesis of *epi*-oxetin should be calculated from the starting aldehyde **1** to Boc-(2*S*,3*S*)-oxetin **7**. This translated into 19% overall yield, which is higher than those reported by Omura (1.2%),[12] Blauvelt (1.1%)[14c] and Aitken (8.8%).[14d]

Synthesis of aocPNA and its stability issues

For the synthesis of the aocPNA, the carboxylic acid moiety of Fmoc-(2*S*,3*S*)-*epi*-oxetin **8** was converted to a reactive pentafluorophenyl (Pfp) ester immediately, prior to use, by treatment with pentafluorophenyl trifluoroacetate (PfpOTfa) in the presence of DIEA.[8] A representative mix-sequence 10mer aocPNA

© 2017 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

was synthesized from the corresponding Fmoc-protected pyrrolidinyl PNA monomers (A^{Bz}, T, C^{Bz}, and G^{Ibu}) and the Pfp-activated Fmoc-(2*S*,3*S*)-*epi*-oxetin **8**. The peptide syntheses were performed via Fmoc-solid phase peptide synthesis (Fmoc-SPSS) on TentaGel® S RAM resin according to the previously reported protocols for other pyrrolidinyl PNAs.[4,5a,8] The *N*-terminal amino group of the aocPNA was optionally capped by acetylation or benzoylation. The overall coupling efficiency, as spectrophotometrically estimated from the final Fmoc deprotection, was 23%, which translates into 93% per coupling step. This value was only slightly lower than those typically obtained with acpcPNA or acbcPNA. In addition, the oxetane-containing aocPNA are much more susceptible towards degradation under both basic and acidic conditions. The nucleobase deprotection was initially performed on 10mer *N*-terminal benzoyl-capped aocPNA (Figure 1). The 10mer aocPNA sequence Bz-GTAGATCACT-LysNH_2 (*m/z* calcd for $[M+H^+]=3501.4$) was treated with 1:1 concentrated aqueous ammonia/dioxane at 60 °C for 12 h, which are standard conditions for other pyrrolidinyl PNA deprotections.[5a] Unfortunately, these conditions caused extensive degradation of the aocPNA as shown by a very small signal in the MALDI-TOF mass spectrum at the expected *m/z* of 3501.4 and a series of peaks differing by one unit of proline–aoc "nucleotide" (Figure 1a, Table S1). These fragment peaks did not derive from incomplete coupling otherwise they would have carried an acetyl group from the final capping step. Stepwise degradation of aegPNA[22] and some pyrrolidinyl PNA[23] under basic conditions from the attack of the carbonyl by the free amino group at the *N*-terminus of the PNA is well known. A similar mechanism could also account for the observed degradation of aocPNA, although such degradation had not been observed in related systems such as acpcPNA, atfcPNA and acbcPNA.

We hypothesized that the decomposition might be caused by the harsh deprotection conditions employed, thus milder deprotection and minimization of the reaction time were carried out. Milder deprotection conditions (1:1:2 *tert*-butylamine/MeOH/H_2O at 60 °C)[24] provided better results. With short reaction times (1–2 h), the deprotection was incomplete, as shown by the signal of partially deprotected aocPNA at $m/z=3607.4$ (Figure 1b). Extension of the reaction time up to 2.5 h led to some fragmentation of the aocPNA (Figure 1c). Thus, the optimal cleavage time of 2 h was chosen.

In addition to base sensitivity, the aocPNA was also susceptible to the standard trifluoroacetic acid (TFA) treatment required for cleavage of the PNA from the resin, as shown by MALDI-TOF mass spectrometric analyses. The degradation is evidenced on preparative scale whereby a long cleavage time was employed to ensure good recovery of the PNA from the solid support. The sensitivity of aocPNA to TFA was systematically evaluated on aocPNA with uncapped *N*-terminus (*m/z* calcd for $[M+H^+]=3397.2$) (Figure 2). A series of peaks with 18 mass units above the expected *m/z* of aocPNA were visible even after 10 minutes (Figure 2a) and the +18 *m/z* peaks became more pronounced, with additional degradation observed after prolonged acid treatment (Figure 2b). Addition of a carbocation scavenger, triisopropylsilane (TIPS), typically used in peptide cleavage mixtures,[25] could not suppress this side reaction (Figure 2c). However, when a more dilute acid solution (1:1 TFA/CH_2Cl_2) was employed for less than 20 min, no water adducts or degradation was observed (Figure 2d). Prolonging the cleavage process and/or increasing the concentra-

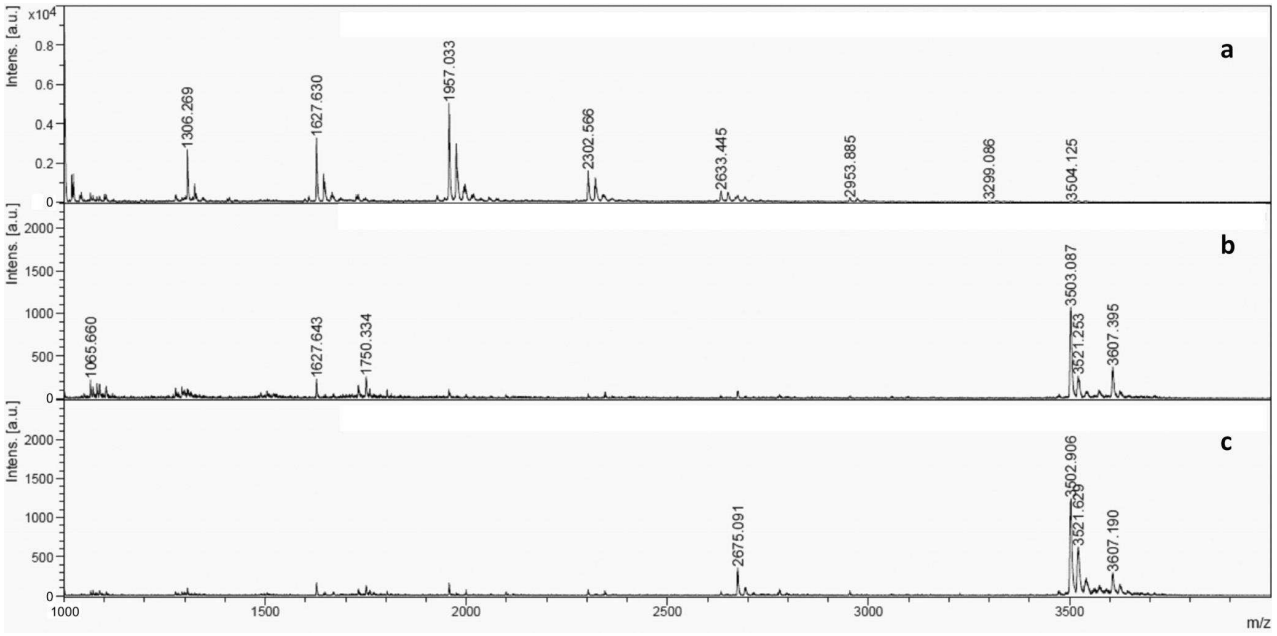


Figure 1. MALDI-TOF mass spectra of aocPNA under basic nucleobase deprotection conditions: a) 1:1 aqueous ammonia/dioxane at 60 °C for 12 h b) 1:1:2 *tert*-butylamine/MeOH/H_2O at 60 °C for 2 h and c) 1:1:2 *tert*-butylamine/MeOH/H_2O at 60 °C for 2.5 h. All PNAs (a–c) were cleaved from the solid support by treatment with TFA for 10 min at room temperature. The 10mer aocPNA in this study was Bz-GTAGATCACT-LysNH_2 (*m/z* calcd for $[M+H^+]=3501.4$).

© 2017 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

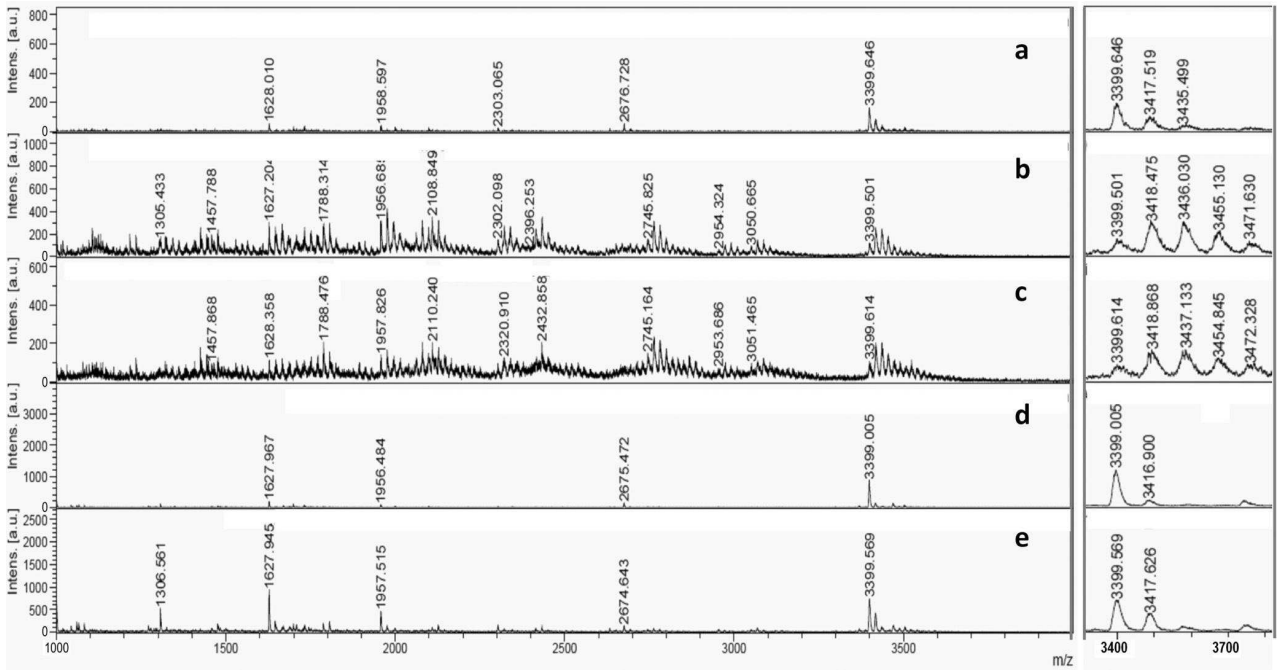


Figure 2. MALDI-TOF mass spectra of aocPNA in optimization of PNA cleavage from the solid support under various conditions: a) TFA at RT for 10 min b) TFA at RT for 3 h c) 1% TIPS in TFA at RT for 3 h d) 1:1 TFA/CH_2Cl_2 at RT for 20 min e) 4:1 TFA/CH_2Cl_2 at RT for 28 min. The 10mer aocPNA in this study was H-GTAGATCACT-LysNH_2 (*m/z* calcd for $[M+H^+]=3397.2$).

tion of TFA resulted in the formation of the +18 *m/z* peaks and other fragmentation products again (Figure 2e). The cleavage of aocPNA from the solid support was therefore accomplished by multiple treatments with 1:1 TFA/CH_2Cl_2 (2 min for each treatment). The completion of the cleavage was monitored by MALDI-TOF mass spectrometry. The cleavage mixture was immediately dried and precipitated with diethyl ether before being purified by reverse-phase HPLC. By this procedure, new aocPNA sequences H-GTAGATCACT-LysNH_2 ($t_R=$ 25.9 min, *m/z* calcd for $M+H^+$ 3397.2; found 3397.1) and Ac-GTAGATCACT-LysNH_2 ($t_R=30.1$ min, *m/z* calcd for $M+H^+$ 3439.3; found 3440.9) were successfully obtained. The low isolated yields (1.2% and 1.3%, respectively) could be attributed to the partial acid-induced degradation, resulting in poor recovery of the PNA during the final cleavage steps in addition to loss during HPLC purification (typical isolated yields of other pyrrolidinyl PNAs were 10–30%).[4]

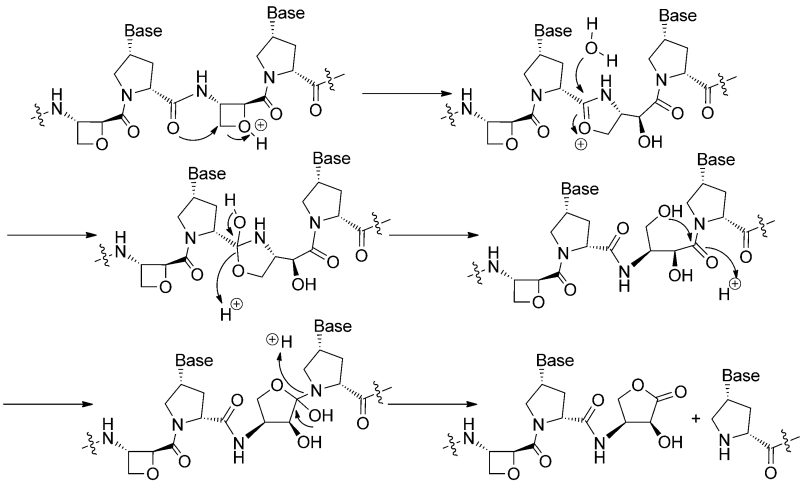
Since acpcPNA and acbcPNA are completely stable towards TFA treatment, the unprecedented acid sensitivity of aocPNA is proposed to be a direct consequence of the oxetane moiety of aoc in the PNA molecule. The mass increase by 18 *m/z* units accompanying the degradation products suggests that the aocPNA reacted with adventitious water to form a ring opened product followed by fragmentation. Such acid-catalyzed cleavage processes of oxetane ring are known in the literature,[9,11,26] although, surprisingly, the Boc-deprotection of **7** by TFA does not result in ring cleavage of the *epi*-oxetin. This, together with the well-documented cases of acid-catalyzed ring opening of oxetane through intramolecular nucleophilic attack[27] or neighboring group participation,[28] led to a hypothesis that the oxetane ring cleavage in aocPNA was facilitated by the intramolecular attack by the amide carbonyl group. To support this hypothesis, the TFA-catalyzed ring cleavage of racemic *epi*-oxetin (*rac*-**10**) and its *N*-benzoyl derivative *rac*-**12** (Scheme S1, Supporting Information) in D_2O were monitored by ^1H NMR spectroscopy (Figure S17). The results clearly showed that while *rac*-**10** was stable in aqueous TFA, decomposition of *N*-benzoyl-*epi*-oxetin *rac*-**12** was readily apparent in a matter of hours and was completed over a period of a few days.

Mass spectrometric studies (MALDI-TOF) of the remaining solution after TFA treatment for seven days confirmed the integrity of the acid-treated racemic *epi*-oxetin (*rac*-**10**, *m/z*= 117.0). It also confirmed the ring opening of *N*-benzoyl-*epi*-oxetin *rac*-**12** by water as shown by the disappearance of the peak of *rac*-**12** at *m/z*=221.1 and formation of a new peak at *m/z* 239.1 (Figure S18). The mechanism for the acid-induced fragmentation of aocPNA was proposed as outlined in Scheme 4 based on the susceptibility of *N*-acyl-*epi*-oxetin to undergo amide-bond-assisted hydrolytic ring opening under acidic conditions, together with the fragmentation pattern of the aocPNA after acid treatment (Table S2).

DNA and RNA binding properties of aocPNA

Thermal denaturation experiments were next performed to evaluate the DNA and RNA binding properties of aocPNA by recording the UV absorption at 260 nm as a function of temperature. Sigmoidal melting curves indicated the cooperative binding with DNA and RNA. The stabilities of DNA and RNA hybrids of aocPNA, as shown by the melting temperatures (T_m) in

© 2017 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim



Scheme 4. A proposed mechanism for the acid-induced fragmentation of aocPNA.

Table 1, are considerably lower than the corresponding hybrids of acbcPNA, acpcPNA and atfcPNA (T_m decrease relative to DNA or RNA hybrids of acpcPNA: −19.8, −7.0 and −6.2 °C for Dcom, and −26.9, −11.0 and −4.7 °C for Rcom, respectively). A strong preference for DNA binding over RNA was still observed similar to other pyrrolidinyl PNAs previously reported (Table 1, entries 1, 6 and 2, 7).[6] No significant differences were observed in affinities of H-aocPNA and Ac-aocPNA towards complementary DNA and RNA (T_m difference between H-acoPNA and Ac-aocPNA was less than 1.0 °C, entries 1, 2 and 6, 7). The specificity of the DNA and RNA binding of aocPNA was confirmed by the low T_m or absence of melting in the cases of non-complementary hybrids of DNA and aocPNA (ΔT_m 18.0 to >26.1 °C) (Table 1, entries 1, 3–5). These T_m differences are comparable to acbcPNA (ΔT_m range = 19.5–29.7 °C), acpcPNA (ΔT_m range = 23.8–29.4 °C) and atfcPNA (ΔT_m range = 27.1–29.1 °C), which suggests a similar level of mismatch discrimination by aocPNA compared to other pyrrolidinyl PNA systems. It should be noted that since the enantiomeric excess of the building block **8** was only 94%, which translated to 97% of the desired (2*S*,3*S*)-enantiomer of *epi*-oxetin, the aocPNA synthesized by repetitive addition of **8** may contain some diastereomeric impurities. However, it was estimated that the 10mer aocPNA should have still contained at least 74% of the desired all-(2*S*,3*S*)-enantiomer and therefore the presence of diastereomeric impurities should not have been the reason for the relatively poor DNA and RNA binding properties of aocPNA.

Table 1. Binding affinities of aocPNA to DNA/RNA compared to previously reported PNAs.

Entry	X[a]	DNA/RNA[b]	T_m[c,d] [°C] aocPNA	acbcPNA[e]	acpcPNA[e]	atfcPNA[e]
1	Ac	Dcom	46.3	66.1	53.3	52.5
2	H	Dcom	46.1	–	–	–
3	H	DsmC	<20 (>26.1)	39.8 (26.3)	23.8 (29.4)	23.4 (29.1)
4	H	DsmG	<20 (>26.1)	36.4 (29.7)	23.9 (29.3)	23.4 (29.1)
5	H	DsmT	28.1 (18.0)	46.6 (19.5)	29.4 (23.8)	25.4 (27.1)
6	Ac	Rcom	31.3	58.2	42.3	36.0
7	H	Rcom	30.3	–	–	–

[a] aocPNA sequence: X-GTAGATCACT-LysNH_2. [b] DNA/RNA sequence: 5′-d(AGTGYTCTAC)-3′; Y = A (Dcom), C (DsmC), G (DsmG), T (DsmT) and 5′-r(AGUGAUCUAC)-3′ (Rcom). [c] condition: 1.0 μM PNA, 1.0 μM DNA/RNA, 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, 100 mM NaCl. Heating rate 1 °C min^{-1}. [d] values in parentheses are $\Delta T_m = T_m$(complementary)-T_m(mismatch). [e] Literature data for acetyl-capped PNAs with the same sequence under the same conditions.[6,8].

Theoretical calculations

The effect of cyclobutane and oxetane on the binding affinity was investigated by ab initio calculations of the model compounds shown in Figure 3a. The energy profiles for each structure were computed by the optimized geometry with constraining of the torsional angle, which is the angle between the carbon and the nitrogen atoms bonding to the 4-membered ring, from 80 to 140 degrees with 1-degree steps. The relative energies for each model were then compared with the energy of the local minimum for the corresponding geometry. Figure 3b displays the optimized torsional angle at 95 and 110° for cyclobutane and oxetane amino acid, respectively. These results match with the values obtained from the full optimizations of 95.3 and 110.3° for the respective structures. The torsional angle value of the cyclobutane amino acid is also in good agreement with the value of 95–100° obtained from the X-ray structures of acbc-derived oligomers.[29] Since previous computational simulations suggest that the optimal torsional angle in acpcPNA·DNA hybrid was around 99–102°,[30] more conformational adjustment was required for the oxetane amino acid than for the cyclobutane amino acid in order to adopt the optimal DNA binding conformation. This may account for the observed lower stability of the aocPNA·DNA hybrids.[31]

© 2017 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

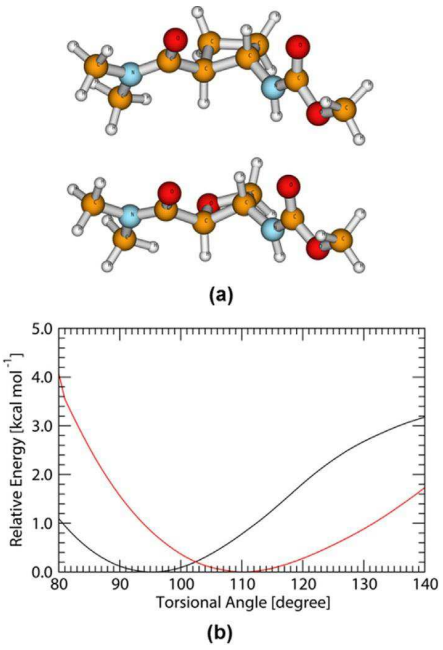


Figure 3. (a) The structures of cyclobutane (top) and oxetane amino acid (bottom) utilized as the models to investigate the torsional energy profiles. (b) Torsional energy profiles of cyclobutane (black line) and oxetane amino acid (red line).

Conclusions

In conclusion, we have reported an efficient and stereoselective synthesis of (2*S*,3*S*)-3-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)oxetane-2-carboxylic acid [Fmoc-(2*S*,3*S*)-*epi*-oxetin] starting from (*E*)-4-(benzyloxy)but-2-enal in 12% overall yield and 94%*ee* over 8 steps. The Fmoc-protected (2*S*,3*S*)-*epi*-oxetin was successfully incorporated as a building block for the synthesis of a novel oxetane-containing pyrrolidinyl PNA (aocPNA). However, the aocPNA was unstable under both basic and acidic conditions which are required for the nucleobase deprotection and cleavage of the PNA from the solid support, thus leading to low isolated yields. The degradation mechanism under acidic conditions was proposed to involve an amide-group-assisted hydrolysis of oxetane ring followed by cleavage of the amide linkage. The aocPNA binds sequence-specifically to both DNA and RNA, but the binding affinity of aocPNA to DNA and RNA was considerably lower than acbcPNA, acpcPNA and atfcPNA with the same base sequence as a result of a wider torsional angle compared to the optimal value required for the DNA-binding conformation of pyrrolidinyl PNA. The information should be useful for future design of conformationally constrained PNA, and suggests that special care should be taken in handling of oxetane-containing foldamers.

Experimental Section

((2*R*,3*R*)-3-(Benzyloxymethyl)oxiran-2-yl)methanol (2). Aqueous hydrogen peroxide (30% w/v, 0.60 mL, 5.20 mmol) was added dropwise to a solution of **1** (0.7102 g, 4.0 mmol) and (*S*)-2-(bis(3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl)(trimethylsilyloxy)methyl)pyrrolidine (Jorgensen's catalyst, 0.2300 g, 0.4 mmol) in CH_2Cl_2 (8 mL). The reaction mixture was stirred at 10–20 °C for 4.5 h and monitored by TLC (hexanes/EtOAc = 1:1, R_f 0.29). After reaction completion, the organic layer was separated and the aqueous phase was extracted twice with CH_2Cl_2. The combined extracts was evaporated and redissolved in MeOH (8 mL), followed by addition of $NaBH_4$ (0.1529 g, 4.50 mmol) and stirring at 0 °C for 30 min. The reaction was completed as indicated by TLC (hexanes/EtOAc = 1:1, R_f 0.22). Approximately 2–3 mL of water were added, followed by neutralization with citric acid and evaporated to dryness. The crude mixture was extracted from the residue by CH_2Cl_2 and subjected to column chromatography on silica gel to afford compound **2** as yellow oil (0.5391 g, 2.78 mmol, 69%). The enantiomeric excess was determined to be 91% by chiral HPLC (column: OJ-H chiral column, mobile phase: 15% *i*PrOH in *n*-hexane, flow rate: 0.6 mL min^{-1}, 210 nm, t_R major: 36.2 min, t_R minor: 41.7 min). $[\alpha]_D^{23} = +17^\circ$ ($c = 0.5$ in $CHCl_3$) {$[\alpha]_D^{25} = +19.6^\circ$ ($c = 0.24$ in $CHCl_3$)[15a]}; ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7.48$–7.26 (m, 5H), 4.60 (ABq, $J_{AB} = 11.9$ Hz, 2H), 3.95 (dd, $J = 12.7$, 1.8 Hz, 1H), 3.79 (dd, $J = 11.5$, 3.0 Hz, 1H), 3.67 (dd, $J = 12.5$, 3.4 Hz, 1H), 3.55 (dd, $J = 11.5$, 5.5 Hz, 1H), 3.26 (dt, $J = 5.4$, 2.7 Hz, 1H), 3.12 ppm (dt, $J = 4.5$, 2.4 Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 137.8$, 128.5, 127.8, 127.7, 73.4, 69.7, 61.2, 55.8, 54.3 ppm; IR (thin film): $\tilde{\nu} = 3415$, 2921, 2863, 1456, 1280, 1106 cm^{-1}; HRMS (ESI+): *m/z* calcd for $C_{11}H_{14}O_3$+Na^+ 217.0841 [*M*+Na^+]; found, 217.0838.

(2*S*,3*S*)-2-Azido-4-(benzyloxy)butane-1,3-diol (3). Trimethyl borate (1.18 mL, 10.5 mmol) was added to a solution of **2** (1.0234 g, 5.3 mmol) and NaN_3 (0.6862 g, 10.6 mmol) in anhydrous DMF (10 mL). The mixture was stirred vigorously under N_2 at 50 °C for 6 h and monitored by TLC (CH_2Cl_2/acetone = 9:1, R_f 0.26). After completion, the reaction was cooled to 0 °C followed by addition of saturated aqueous $NaHCO_3$ (20 mL) and stirring for 30 min, and then extracted with EtOAc (3×20 mL). The combined organic layers were washed with water four times and the solvent was evaporated to obtain compound **3** as a yellow oil (1.1371 g, 4.79 mmol, 91%). $[\alpha]_D^{23} = +22^\circ$ ($c = 1.0$ in $CHCl_3$); ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7.38$–7.18 (m, 5H), 4.50 (s, 2H), 3.91–3.62 (m, 3H), 3.65–3.33 ppm (m, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 137.4$, 128.6, 128.1, 127.9, 73.6, 71.0, 70.8, 63.9, 62.8 ppm; IR (thin film): $\tilde{\nu} = 3404$, 2921, 2866, 2096, 1453, 1074 cm^{-1}; HRMS (ESI+): *m/z* calcd for $C_{11}H_{15}N_3O_3$+Na^+ 260.1011 [*M*+Na^+]; found, 260.1016.

(2*S*,3*S*)-2-Azido-4-(benzyloxy)-3-hydroxybutyl 4-methylbenzenesulfonate (4). DIEA (0.63 mL, 3.59 mmol) was added to a mixture of **3** (0.5657 g, 2.39 mmol), 2-aminoethyl diphenylborinate (2-ADP, 0.0535 g, 0.24 mmol), TsCl (0.5262 g, 2.76 mmol) and 4 Å molecular sieves (0.0619 g) in anhydrous MeCN (10 mL). The reaction was stirred under N_2 at 0 °C and was allowed to warm up to room temperature and left for 5 days. After the reaction was completed as indicated by TLC (hexanes/EtOAc = 1:1, R_f 0.46), water was added and the mixture was extracted with EtOAc (3×20 mL) and evaporated to dryness. The crude reaction product was subjected to column chromatography on silica gel to afford compound **4** as a yellow oil (0.5830 g, 1.49 mmol, 62%). $[\alpha]_D^{22} = +24^\circ$ ($c = 1.0$ in $CHCl_3$); ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7.74$ (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.32–7.21 (m, 7H), 4.47 (s, 2H), 4.34 (dd, $J = 10.6$, 2.8 Hz, 1H), 4.06 (dd, $J = 10.6$, 7.4 Hz, 1H), 3.65 (ddd, $J = 7.7$, 7.5, 2.7 Hz, 1H), 3.61–3.54 (m, 1H), 3.53–3.50 (m, 2H), 2.37 ppm (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 145.1$, 137.3, 132. 7, 130.0, 128.6, 128.1, 128.0, 127.9, 73.6, 70.2, 69.6, 69.5, 61.6, 21.7 ppm; IR (thin film): $\tilde{\nu} = 3520$, 2924, 2860, 2099, 1453, 1361, 1173 cm^{-1}; HRMS (ESI+): *m/z* calcd for $C_{18}H_{21}N_3O_5S$+Na^+ 414.1100 [*M*+Na^+]; found, 414.1091.

(2*S*,3*S*)-3-Azido-2-(benzyloxymethyl)oxetane (5). A solution of **4** (1.3543 g, 3.46 mmol) in toluene (35 mL) was added dropwise to

© 2017 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

a mixture of NaOH (5.6721 g, 141 mmol), TBAHS (0.1258 g, 0.37 mmol) and water (300 μL). The reaction was stirred at room temperature for 20 min and monitored by TLC (hexanes/EtOAc 1:3, R_f 0.40). After completion of the reaction, the organic phase was separated, washed three times with water, and evaporated to dryness. The crude product was subjected to column chromatography on silica gel to afford compound **5** as a yellow oil (0.5198 g, 2.37 mmol, 69%). $[\alpha]_D^{22} = +49^\circ$ ($c = 1.0$ in $CHCl_3$); ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7.43–7.30$ (m, 5H), 4.82 (m, 1H), 4.77–4.66 (m, 2H), 4.64–4.60 (m, 1H), 4.58–4.51 (m, 2H), 3.69 ppm (dd, $J = 3.5$, 0.9 Hz, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 137.8$, 128.5, 127.8, 127.7, 86.8, 73.8, 73.5, 70.4, 55.5 ppm; IR (thin film): $\tilde{\nu} = 3062$, 3025, 2954, 2929, 2855, 2846, 2102, 1259 cm^{-1}; HRMS (ESI+): *m/z* calcd for $C_{11}H_{13}N_3O_2$+Na$^+$ 242.0905 [*M*+Na$^+$]; found, 242.0901.

***tert*-Butyl (2*S*,3*S*)-2-(hydroxymethyl)oxetan-3-ylcarbamate (6)**. To a solution of **5** (0.4998 g, 2.28 mmol) in MeOH (3 mL), 10% $Pd(OH)_2$/C (0.1008 g) and Boc_2O (0.5451 g, 2.50 mmol) were added. The mixture was stirred vigorously under H_2 at room temperature. After the reaction was complete (TLC, EtOAc, R_f 0.44), the catalyst was filtered off and the filtrate evaporated to afford compound **6** as a yellow oil (0.3751 g, 1.85 mmol, 81%). $[\alpha]_D^{22} = -5^\circ$ ($c = 0.5$ in $CHCl_3$) {$[\alpha]_D^{25} = -5^\circ$ ($c = 1.0$ in CH_2Cl_2)[14c]}; ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 5.20$ (br m, 1H), 4.73–4.57 (m, 3H), 4.44 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H), 3.86–3.70 (m, 2H), 1.46 ppm (s, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 155.1$, 89.8, 80.5, 74.2, 63.6, 47.3, 28.3 ppm; IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3328$, 2973, 2929, 1688, 1530, 1166 cm^{-1}; HRMS (ESI+): *m/z* calcd for $C_9H_{17}NO_4$+Na$^+$ 226.1055 [*M*+Na$^+$]; found, 226.1051.

(2*S*,3*S*)-3-(*tert*-Butoxycarbonylamino)oxetane-2-carboxylic acid (7). 2,2,6,6-Tetramethylpiperidine *N*-oxide (TEMPO, 0.0320 g, 0.20 mmol) was added to a solution of **6** (0.1537 g, 0.76 mmol) and (diacetoxyiodo)benzene (DAIB, 0.5453 g, 1.69 mmol) in MeCN/water (1:1, 4 mL). The reaction was stirred at room temperature and monitored by TLC (hexanes/EtOAc = 1:3, R_f 0.29). After completion, saturated aqueous $NaHCO_3$ was added to adjust the pH of the solution to ≈9 and the reaction mixture was extracted with Et_2O (3×5 mL). The aqueous phase was acidified with $NaHSO_4$ and re-extracted with EtOAc (3×5 mL). The combined organic phases were evaporated to afford compound **7** as a yellow oil (0.1422 g, 0.65 mmol, 87%). $[\alpha]_D^{22} = -18^\circ$ ($c = 1.0$ in $CHCl_3$) {$[\alpha]_D^{26} = -36^\circ$ ($c = 0.5$ in $CHCl_3$)[14d]}; ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 5.60$ (br s, 1H), 5.09 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H), 4.84–4.78 (m, 1H), 4.78–4.70 (m, 1H), 4.59 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 1.48 ppm (s, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 171.5$, 156.1, 84.0, 82.1, 73.8, 49.2, 28.2 ppm; IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3325$, 2978, 2926, 1713, 1688, 1524, 1158 cm^{-1}; HRMS (ESI+): *m/z* calcd for $C_9H_{15}NO_5$+Na$^+$ 240.0848 [*M*+Na$^+$]; found, 240.0843.

(2*S*,3*S*)-3-(((9*H*-Fluoren-9-yl)methoxy)carbonylamino)oxetane-2-carboxylic acid (8). Compound **7** (0.1322 g, 0.52 mmol) was dissolved in TFA/CH_2Cl_2 (1:1, 2 mL) and stirred for 15 min followed by evaporation to dryness to give the TFA salt of (2*S*,3*S*)-*epi*-oxetin (**10**). The residue was dissolved in MeCN/H_2O (1:1, 4 mL) containing $NaHCO_3$ (0.1255 g, 1.49 mmol), followed by addition of Fmoc *N*-hydroxysuccinimide (FmocOSu, 0.1748 g, 0.52 mmol). After stirring at ambient temperature for 20 h, saturated aqueous $NaHCO_3$ was added and the solution was washed with diethyl ether. The white solid precipitated in the aqueous phase was isolated by filtration and washed with 2 M HCl followed by water, affording compound **7** (0.1131 g, 0.33 mmol, 64%) after drying. m.p. 142–144 °C; $[\alpha]_D^{22} = +20^\circ$ ($c = 0.5$ in DMSO); ^{1}H NMR (400 MHz, [D$_6$]DMSO): $\delta = 8.25$ (d, $J = 6.9$ Hz, 1H), 7.90 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.75–7.65 (m, 2H), 7.43 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.34 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 4.93 (d, $J = 5.3$ Hz, 1H), 4.65–4.55 (m, 2H), 4.45–4.28 (m, 3H), 4.24 ppm (t, $J = 6.3$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, [D$_6$]DMSO): $\delta = 171.5$, 155.1, 143.8, 140.8, 127.6, 127.1, 125.0, 120.1, 83.4, 74.5, 65.6, 49.1, 46.6 ppm; IR (ATR): $\tilde{\nu} =$ 3325, 3065, 3016, 2953, 2888, 1693, 1530, 1262 cm^{-1}; HRMS (ESI+): *m/z* calcd for $C_{19}H_{17}NO_5$+Na$^+$ 362.1004 [*M*+Na$^+$]; found, 362.1008.

Methyl (2*S*,3*S*)-3-(((9*H*-fluoren-9-yl)methoxy)carbonylamino)oxetane-2-carboxylate (9). A solution of compound **8** (0.0150 g, 0.044 mmol) in EtOAc (0.5 mL) was treated with diazomethane (generated by treatment of Diazald® (0.0287 g, 0.13 mmol) and 5 M NaOH (0.5 mL)). After 30 min, the reaction was complete as monitored by TLC (hexanes/EtOAc = 1:1, R_f 0.34). After flushing off the excess diazomethane with a N_2 stream, the solvent was removed to obtain compound **9** as a white solid (0.0154 g, 0.43 mmol, 99%). The enantiomeric excess was determined to be 94% by chiral HPLC (column: OJ-H chiral column, mobile phase:70% *i*PrOH in *n*-hexane, flow rate: 1.0 mL min^{-1}, 270 nm, t_R minor: 23.1 min, t_R major: 26.8 min). m.p. 157–159 °C; $[\alpha]_D^{23} = +11^\circ$ ($c = 0.5$ in $CHCl_3$); ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7.69$ (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.49 (d, $J = 6.5$ Hz, 2H), 7.33 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.24 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 5.34 (s, 1H), 4.95 (s, 1H), 4.75 (s, 2H), 4.35–4.50 (m, 3H), 4.13 (t, $J = 6.3$ Hz, 1H), 3.73 ppm (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 170.3$, 155.1, 143.6, 141.4, 127.8, 127.1, 124.9, 120.1, 84.4, 76.1, 67.0, 52.5, 49.7, 47.2 ppm; IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3303$, 3063, 2954, 2891, 1737, 1695, 1540, 1264 cm^{-1}; HRMS (ESI+): *m/z* calcd for $C_{19}H_{17}NO_5$+Na$^+$ 376.1161 [*M*+Na$^+$]; found, 376.1176.

***tert*-Butyl-2-(Hydroxymethyl)oxetan-3-ylcarbamate (*rac*-6)**. Following the same protocol for the synthesis of (2*S*,3*S*)-**6** using *rac*-**2** as the starting material, compound *rac*-**6** was obtained as a yellow oil (0.5226 g, 34% over four steps). ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta =$ 5.25 (br s, 1H), 4.73–4.57 (m, 3H), 4.44 (t, $J = 6.3$ Hz, 1H), 3.83–3.65 (m, 2H), 1.45 ppm (s, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 155.1$, 89.8, 80.5, 74.3, 63.5, 47.2, 28.3 ppm; IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3310$, 2973, 2927, 1681, 1529, 1168 cm^{-1}.

Methyl *trans*-3-(((9*H*-fluoren-9-yl)methoxy)carbonylamino)oxetane-2-carboxylate (*rac*-9). Following the same protocol for the synthesis of (2*S*,3*S*)-**9** starting from *rac*-**6**, compound *rac*-**9** was obtained as a white solid (0.0480 g, 28% over three steps). m.p. 127–129 °C; ^{1}H NMR (400 MHz,$CDCl_3$): $\delta = 7.68$ (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.49 (d, $J = 6.5$ Hz, 2H), 7.32 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.23 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 5.44 (d, $J = 6.1$ Hz, 1H), 4.94 (s, 1H), 4.74 (s, 2H), 4.52–4.27 (m, 3H), 4.12 (t, $J = 6.3$ Hz, 1H), 3.72 ppm (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 170.3$, 155.1, 143.7, 141.4, 127.8, 127.1, 124.9, 120.1, 84.4, 76.1, 67.0, 52.5, 49.7, 47.2 ppm; IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3302.4$, 3066.9, 2951.8, 2886.0, 1734.9, 1697.0, 1541.7, 1262.1 cm^{-1}; HRMS (ESI+): *m/z* calcd for $C_{19}H_{17}NO_5$+Na$^+$ 376.1161 [*M*+Na$^+$]; found, 376.1167.

***trans*-N-(2-(Hydroxymethyl)oxetan-3-yl)benzamide (*rac*-11)**. Compound *rac*-**6** (0.1002 g, 0.49 mmol) was dissolved in TFA/CH_2Cl_2 (1:1, 1 mL) and stirred for 15 min. After removing the solvent, the crude reaction product was dissolved in CH_2Cl_2 (5 mL) followed by addition of triethylamine (70 μL, 0.49 mmol) and Bz_2O (0.1115 g, 0.49 mmol). The reaction was stirred at ambient temperature for 2 h. The reaction mixture was evaporated to dryness and the residue was purified by column chromatography on silica gel to obtain compound *rac*-**11** as a colorless oil (0.0636 g, 45%). ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7.82$ (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.54 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.44 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.20 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H), 5.05–4.89 (m, 1H), 4.88–4.71 (m, 2H), 4.64 (t, $J = 6.5$ Hz, 1H), 3.85 ppm (qd, $J = 12.1$, 3.9 Hz, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 167.8$, 133.3, 132.1, 128.7, 127.1, 89.6, 73.7, 63.8, 47.4 ppm; IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3378$, 3307, 3066, 2908, 1632, 1531, 1027, 953 cm^{-1}; HRMS (ESI+): *m/z* calcd for $C_{11}H_{13}NO_3$+H$^+$ 208.0974 [*M*+H$^+$]; found, 208.0998.

***trans*-3-Benzamidooxetane-2-carboxylic acid (*rac*-12)**. A mixture of TEMPO (0.0125 g, 0.35 mmol), *rac*-**11** (0.0470 g, 0.23 mmol) and DAIB (0.1778 g, 0.55 mmol) was dissolved in MeCN/water (1:1, 1 mL). The reaction was stirred at room temperature for 72 h. After completion, saturated aqueous $NaHCO_3$ was added to adjust the

© 2017 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

pH of the solution to ≈9 and the reaction mixture was extracted with EtOAc (3×5 mL). The aqueous phase was acidified with $NaHSO_4$ and re-extracted with EtOAc (3×5 mL). The combined organic phases were evaporated to give *rac*-**12** as a colorless oil (0.0160 g, 44%). ^{1}H NMR (400 MHz, [D_6]DMSO): δ=9.31 (d, J=7.3 Hz, 1H), 7.90 (d, J=7.4 Hz, 2H), 7.58 (t, J=7.2 Hz, 1H), 7.51 (t, J=7.4 Hz, 2H), 5.12 (d, J=6.5 Hz, 1H), 5.08–4.99 (m, 1H), 4.69 (dd, J=7.6, 6.2 Hz, 1H), 4.57 ppm (dd, J=6.5, 6.1 Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, [D_6]DMSO): δ=171.5, 165.9, 133.5, 131.6, 128.4, 127.3, 83.1, 74.5, 47.8 ppm; IR (ATR): $\tilde{\nu}$=3321, 3071, 2935, 2851, 1777, 1645, 1536, 970 cm^{-1}; HRMS (ESI+): *m/z* calcd for $C_{11}H_{11}NO_4$+H^+ 222.0766 [*M*+H^+]; found, 222.0782.

Synthesis of aocPNA

A representative mixed-sequence 10mer aocPNA was synthesized manually via Fmoc-solid-phase peptide synthesis (Fmoc-SPSS) on TentaGel® S RAM resin on a 1.5 μmol scale from the four Fmoc-protected pyrrolidinyl PNA monomers (A^{Bz}, T, C^{Bz} and G^{Ibu})[5a] and the Pfp-activated *epi*-oxetin **8** following the previously reported protocols for other pyrrolidinyl PNAs.[4] After completion, the *N*-terminal Fmoc was removed and the PNA was optionally capped by acetylation. Then, the aocPNA was treated with *tert*-butylamine/MeOH/H_2O (1:1:2) at 60 °C for 2 h whilst still attached to the solid support in order to remove the nucleobase protecting groups (Bz and Ibu). Cleavage from the solid support was carried out by a series of 2 min treatments with TFA/CH_2Cl_2 (1:1). The combined cleavage solutions were evaporated to dryness under a stream of nitrogen followed by precipitation with diethyl ether. The crude PNA was purified by reverse phase HPLC (C18 column, 4.6×150 mm, 5 μ, gradient 0.1% TFA in H_2O/MeOH, 90:10, for 5 min, then a linear gradient to 10:90 over 60 min, flow rate: 0.5 mL min^{-1}, 270 nm). Fractions with the correct *m/z* according to MALDI-TOF analyses were neutralized with ammonium bicarbonate in order to minimize decomposition of aocPNA. Lastly, the combined fractions were freeze dried. The purity of the purified PNA was ascertained by reverse phase HPLC analysis (C18 column, 4.6×50 mm, 3 μ, gradient 0.1% TFA in H_2O/MeOH, 90:10, for 5 min, then a linear gradient to 10:90 over 30 min, flow rate 0.5 mL min^{-1}).

Computational details

(1*S*,2*S*)-*N*-methoxycarbonyl-2-aminocyclobutanecarboxylic acid dimethylamide and (2*S*,3*S*)-*N*-methoxycarbonyl-2-aminooxetanecarboxylic acid dimethylamide were selected as model compounds. The effect of cyclobutane and oxetane on the binding affinity was investigated by ab initio calculations. The energy profiles for each structure were computed by using the optimized geometry with constraint of the torsional angle (the angle between the carbon and the nitrogen atoms bonding to the 4-membered ring) from 80 to 140 degrees, with 1-degree steps. All calculations were performed using the Gaussian 09 program package[32] using a Pople basis set with a diffuse and polarization function on the heavy atoms (6-31+G(d)) at a density functional theory level with a Becke three-parameter hybrid exchange functional and Lee–Yang–Parr correlation functional (B3LYP). The implicit solvent model of conductor-like polarizable continuum model (CPCM) was also included, accounting for the effect of water molecules surrounding these structures.

Acknowledgements

This research is supported financially by The Thailand Research Fund and Chulalongkorn University (DPG5780002, for TV and PP), National Science and Technology Development Agency (NSTDA) (JSTP-06-57-06E, Junior Science Talent Project research grant, for PS) and Graduate School, Chulalongkorn University (Overseas Research Experience Scholarship for Graduate Student, for PS).

Keywords: amino acids · DNA recognition · foldamers · oxygen heterocycles · peptide nucleic acids

[1] P. E. Nielsen, G. Haaima, *Chem. Soc. Rev.* **1997**, *26*, 73–78.
[2] M. Egholm, O. Buchardt, L. Christensen, C. Behrens, S. M. Freier, D. A. Driver, R. H. Berg, S. K. Kim, B. Nordén, P. E. Nielsen, *Nature* **1993**, *365*, 566–568.
[3] a) V. V. Demidov, V. N. Potaman, M. D. Frank-Kamenetskii, M. Egholm, O. Buchardt, S. H. Sönnichsen, P. E. Nielsen, *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *48*, 1310–1313; b) P. E. Nielsen, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2001**, *12*, 16–20.
[4] T. Vilaivan, *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 1645–1656.
[5] a) T. Vilaivan, C. Srisuwannaket, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1897–1900; b) C. Ananthanawat, T. Vilaivan, V. P. Hoven, X. Su, *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25*, 1064–1069; c) C. Vilaivan, C. Srisuwannaket, C. Ananthanawat, C. Suparpprom, J. Kawakami, Y. Yamaguchi, Y. Tanaka, T. Vilaivan, *Artificial DNA PNA XNA* **2011**, *2*, 50–59.
[6] W. Mansawat, C. Vilaivan, A. Balázs, D. J. Aitken, T. Vilaivan, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 1440–1443.
[7] B. Sahu, I. Sacui, S. Rapireddy, K. J. Zanotti, R. Bahal, B. A. Armitage, D. H. Ly, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 5614–5627.
[8] P. Sriwarom, P. Padungros, T. Vilaivan, *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 7058–7065.
[9] J. A. Bull, R. A. Croft, O. A. Davis, R. Doran, K. F. Morgan, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 12150–12233.
[10] G. Wuitschik, E. M. Carreira, B. Wagner, H. Fischer, I. Parrilla, F. Schuler, M. Rogers-Evans, K. Müller, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 3227–3446.
[11] C. A. Malapit, A. R. Howell, *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 8489–5495.
[12] S. Omura, M. Murata, N. Imamura, Y. Iwai, H. Tanaka, *J. Antibiot.* **1984**, *37*, 1324–1332.
[13] a) S. F. Barker, D. Angus, C. Taillefumier, M. R. Probert, D. J. Watkin, M. P. Watterson, T. D. W. Claridge, N. L. Hungerford, G. W. J. Fleet, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 4247–4250; b) T. D. W. Claridge, J. M. Goodman, A. Moreno, D. Angus, S. F. Barker, C. Taillefumier, M. P. Watterson, G. W. J. Fleet, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 4251–4255.
[14] a) Y. Kawahata, S. Takaysuto, N. Ikekawa, M. Murata, S. Omura, *Chem. Pharm. Bull.* **1986**, *34*, 3102–3110; b) T. Bach, J. Schröder, *Liebigs Ann.* **1997**, 2265–2267; c) M. L. Blauvelt, A. R. Howell, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 517–521; d) A. F. Kassir, S. S. Ragab, T. A. M. Nguyen, F. Charnay-Pouget, R. Guillot, M. Scherrmann, T. Boddaert, D. J. Aitken, *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 9983–9991.
[15] a) M. P. Hayes, P. J. Hatala, B. A. Sherer, X. Tong, N. Zanatta, P. N. Borer, J. Kallmerten, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 1515–1524; b) K. C. Nicolaou, R. A. Daines, J. Uenishi, W. S. Li, D. P. Papahatjis, T. K. Chakraborty, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 4672–4685; c) J. M. Schomaker, V. R. Pulgam, B. Borhan, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13600–13601; d) G. V. Reddy, R. S. C. Kumar, B. Siva, K. S. Babu, J. M. Rao, *Synlett* **2012**, *23*, 2677–2681; e) M. Marigo, J. Franzen, T. B. Poulsen, W. Zhuang, K. A. Jorgensen, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6964–6965.
[16] J. Fournier, S. Mathieu, A. B. Charette, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13140–13141.
[17] M. Sasaki, K. Tanino, A. Hirai, M. Miyashita, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 1789–1791.
[18] J. J. Miller, S. Rajaram, C. Pfaffenroth, M. S. Sigman, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 3110–3119.
[19] D. Lee, C. L. Williamson, L. Chan, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 8260–8267.

© 2017 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

[20] H. S. P. Rao, S. P. Senthilkumar, *Proc. Indian Acad. Sci. Chem. Sci.* **2001**, *113*, 191 – 196.
[21] J. B. Epp, T. S. Widlanski, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 293 – 295.
[22] S. A. Thomson, J. A. Josey, R. Cadilla, M. D. Gaul, C. F. Hassman, M. J. Luzzio, A. J. Pipe, K. L. Reed, D. J. Ricca, R. W. Wiethe, S. A. Noble, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 6179 – 6194.
[23] G. Lowe, T. Vilaivan, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1997**, 555 – 560.
[24] R. S. Vinayak, L. G. Lee, K. B. Mullah, B. Rosenblum (Applera Corporation, Foster City, CA), US6835827B2, **2004**.
[25] D. A. Pearson, M. Blanchette, M. L. Baker, C. A. Guindon, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 2739 – 2742.
[26] a) J. G. Pritchard, F. A. Long, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 4162 – 4165; b) H. Xianming, R. M. Kellogg, *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6*, 1399 – 1408.
[27] a) T. Bach, K. Kather, O. Krämer, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 1910 – 1918; b) J. S. Yadav, V. K. Singh, P. Srihari, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 836 – 839.
[28] a) S. Kanoh, T. Nishimura, K. Ando, H. Senda, H. Ogawa, M. Motoi, *Macromolecules* **1998**, *31*, 7988 – 7991; b) T. Bach, J. Schröder, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 3707 – 3710.
[29] C. Fernandes, S. Faure, E. Pereira, V. Thery, V. Declerck, R. Guillot, D. J. Aitken, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 3606 – 3609.
[30] W. Mansawat, C. Boonlua, K. Siriwong, T. Vilaivan, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 3988 – 3995.
[31] The torsional angle of *trans*-oxetin derivative obtained from a recent X-ray structure (ref. 14d) was 123.5°, which confirmed that the conformation of the oxetane β-amino acid is very far from the optimal torsional angle required in acpcPNA·DNA and acbcPNA·DNA duplexes.
[32] Gaussian 09, Revision C.01, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2009**.

Manuscript received: December 2, 2016
Revised: January 24, 2017
Accepted Article published: January 24, 2017
Final Article published: February 16, 2017

© 2017 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Antiviral Research 142 (2017) 169–177

Contents lists available at ScienceDirect

Antiviral Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/antiviral

miR-21 promotes dengue virus serotype 2 replication in HepG2 cells

Sitthichai Kanokudom [a], Tirayut Vilaivan [b], Nitwara Wikan [c], Chutima Thepparit [c], Duncan R. Smith [c], Wanchai Assavalapsakul [a, *]

[a] Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand
[b] Organic Synthesis Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330 Thailand
[c] Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University, Nakornpathom, 73170, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:
Received 7 September 2016
Received in revised form
9 February 2017
Accepted 27 March 2017
Available online 30 March 2017

Keywords:
Dengue virus serotype 2 (DENV 2)
HepG2
MicroRNA (miRNA)
miRNA-21 (miR-21)
Anti-miRNA-21 oligonucleotide (AMO-21)
Peptide nucleic acid-21 (PNA-21)

ABSTRACT

Infection with the mosquito transmitted dengue virus (DENV) remains a significant worldwide public health problem. While the majority of infections are asymptomatic, infection can result in a range of symptoms. MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs that regulate gene expression through repression or degradation of mRNAs. To understand the contribution of miRNAs to DENV 2 replication, we screened a number of candidate miRNAs for variations in expression levels during DENV 2 infection of HepG2 (liver) cells. Seven miRNAs were identified as differentially expressed, and one, miR-21, was differentially expressed at all time points examined. Interestingly, miR-21 was also differentially regulated in DENV 2 infection under conditions of antibody dependent enhancement of infection, and in direct Zika virus infection, but not in DENV 4 infection. The role of miR-21 during DENV infection was further examined by treating HepG2 cells with an anti-miR-21 (AMO-21) before DENV infection. The results showed a significant reduction in DENV 2 production, clearly suggesting that miR-21 plays a key role in DENV 2 replication. To further confirm the role of miR-21 in DENV infection, a peptide nucleic acid-21 (PNA-21) construct with a nucleotide sequence complementary to AMO-21, was co-administered with AMO-21 as an AMO-21/PNA-21 complex followed by DENV 2 infection. The results showed that AMO-21 significantly reduced DENV 2 titer, PNA-21 significantly increased DENV 2 titer and the combined AMO-21/PNA-21 showed no difference from non-treated infection controls. Taken together, the results show that miR-21 promotes DENV 2 replication, and this mechanism could serve as a possible therapeutic intervention point.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Despite the recent introduction of a vaccine to protect against dengue virus (DENV) infection in selected countries (WHO, 2016), there remains no specific treatment for DENV infection. While the majority of DENV infections are asymptomatic (Runge-Ranzinger et al., 2014), the infection can lead to a range of symptoms from a mild fever to the more severe forms of the disease, dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome (WHO, 2009). During infection, DENV manipulates the host cell machinery to facilitate its own replication (Walsh and Mohr, 2011) and as such targeting these processes offer the potential for the development of therapeutic agents.

RNA interference (RNAi) is a process by which small, non coding RNA molecules regulate gene expression through either attenuation of mRNA transcription or by targeting mRNAs for degradation (Felekkis and Deltas, 2006). Currently, three classes of small RNAs associated with silencing pathways have been described in mammals, namely endogenous small interfering RNAs (endo-siRNAs), piwi-associated RNAs (piRNAs) and microRNAs (miRNAs). The first two classes of small RNAs are primarily involved in the repression of transposons as well as the nucleic acid of viruses (Carmell et al., 2007; Farazi et al., 2008), while the last class of small RNAs in particular regulates cellular gene expression (Felekkis et al., 2010). miRNAs are generated through transcription to generate a primary miRNAs (pri-miRNA) that is composed of exonic and intronic regions (Borchert et al., 2006; Lee et al., 2004). The stem loop region of the pri-miRNA is processed by a complex of proteins to yield 70–80 nucleotide stem loop precursor miRNAs (pre-miRNA) (Han et al., 2004; Landthaler et al., 2004; Lee et al., 2003), which are

* Corresponding author. Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, 254 Phayathai, Pathumwan, Bangkok, 10330, Thailand.
E-mail address: wanchai.a@chula.ac.th (W. Assavalapsakul).

http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.03.020
0166-3542/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

further cleaved by DICER-1 and subsequently recognized by Argonaute protein to form miRNA-RNA Induced Silencing Complexes (miR-RISCs) (Lee et al., 2006; MacRae et al., 2008). The miR-RISC complex subsequently interacts with target sequences such as mRNA transcripts or DNA sequences in gene promoters, in order to modulate gene expression. miRNAs have been shown to modulate processes including cellular development, proliferation, apoptosis, the immune system and host-pathogen interactions (Bartel, 2004; Felekkis and Deltas, 2006; Harfe, 2005).

Studies have increasingly shown that miRNAs have functional roles during viral infection. For example, Hepatitis C virus (HCV) infection leads to the induction and extracellular release of miR-122 and miR-885-5p without altering intracellular levels, whereas miR-494 accumulates intracellularly (El-Diwany et al., 2015). Moreover, miR-373 was shown to be significantly upregulated in HCV-infected primary human hepatocytes and HCV-infected liver biopsy specimens, which induces the negative regulation of the type I IFN signaling pathway by suppressing JAK1 and IRF9 (Mukherjee et al., 2015). Interestingly, the knockdown of miR-373 could inhibit HCV replication by up-regulating interferon-stimulated gene expression (Mukherjee et al., 2015). In addition, the up-regulation of miR-146a by Japanese encephalitis virus (JEV) infection in human brain microglial cells contributes to the suppression of NF-κB activity and disruption of anti-viral JAK-STAT signaling which helps the virus to evade the cellular immune response (Sharma et al., 2015).

Although much attention has been paid to studying the interplay between miRNAs and viral infection, understanding the interaction of human miRNAs and dengue virus infection remains incomplete (Escalera-Cueto et al., 2015; Qi et al., 2013; Wu et al., 2013). Therefore, this work has investigated the differential expression of miRNAs during DENV 2 infection of HepG2 (liver) cells, with the candidate miRNAs being evaluated by RT-qPCR. While several miRNAs showed evidence of regulation during DENV infection, one miRNA, miR-21, showed differential expression at all time points examined. We further evaluated the role of miR-21 during DENV infection and established that miR-21 is a positive regulator of DENV 2 replication.

2. Materials and methods

2.1. Cells and culture conditions

The human liver cancer cell line HepG2 (ATCC® HB-8065™) was cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium-DMEM (HyClone™ Thermo Scientific, USA) with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; GibcoTM Invitrogen), at 37 °C, 5%CO_2. The human lung carcinoma epithelial cell line A549 (ATCC® CCL-185™) was cultured in MEM (HyClone™ Thermo Scientific, USA) with 5% FBS at 37 °C. The human monocytic cell line U937 (ATCC CRL-1593.2) was cultured in RPMI 1640 medium (RPMI; GibcoTM Invitrogen) supplemented with 10% FBS. The mosquito cell C6/36 (ATCC® CRL-1660™) was cultured in MEM (HyClone™ Thermo Scientific, USA) with 10%FBS at 28 °C. The monkey kidney cell LLC-MK2 (ATCC® CCL-7™) was cultured in DMEM with 5% FBS at 37 °C, 5%CO_2. All media were supplemented with 100 units/ml of penicillin and 100 μg/ml of streptomycin (HyClone™ Thermo Scientific, USA).

2.2. Viruses

Dengue virus serotype 2 (DENV 2) strain 16681 and dengue virus serotype 4 (DENV 4) strain 1036 were propagated in C6/36 at a multiplicity of infection (MOI) of 1 at 28 °C for 6 days (Sakoonwatanyoo et al., 2006) after which the culture medium was centrifuged to remove cell debris and the supernatants were stored as stock virus at −80 °C. The viral titer was determined by plaque assay on LLC-MK2 cells as previously described (Panyasrivanit et al., 2011; Sithisarn et al., 2003). Zika virus (ZIKV) strain SV0010/15 used in this study was obtained from the Armed Forces Research Institute of Medical Sciences (AFRIMS) and The Department of Disease Control, Ministry of Public Health, Thailand. It was passaged 7 times through C6/36 cells.

2.3. Oligonucleotides

The anti-miRNA-21 oligonucleotide (AMO-21) employed in this study was modified at the 2′-OH position to generate 2′O-methylation in the ribose residue of RNA (Supplementary Table S1, Integrated DNA technologies, Coralville, IA). AMO-21 was resuspended in nuclease-free water to obtain a 10 μM final concentration stock which was stored at −80 °C until required.

Peptide nucleic acid-21 (PNA-21, Supplementary Table S1) was synthesized as previously described (Vilaivan et al., 2011; Vilaivan, 2015) to obtain 15 nucleotides in length of which all the sequence was identical to the first 15 nucleotides of *hsa*-miR-21-5p (MIMAT0000076). It was further modified at the N-terminus with a fluorescent label (FAM) to assist detection by fluorescence microscopy. HPLC-purified PNA-21 was subsequently resuspended in nuclease-free water to obtain a 10 μM final concentration stock which was stored at −80 °C until required.

2.4. miR expression profile during DENV 2 replication

To investigate miR expression profiles, HepG2 cell were cultured and infected with DENV 2 as previously described (Suksanpaisan et al., 2009; Thepparit et al., 2004). Briefly, HepG2 cells were seeded into 6-well plates at a density of 10^6 cells/well and then cultured at 37 °C, 5%CO_2 overnight. Cells were mock infected or infected with DENV 2 at MOI of 10 for 2 h. Then, the culture medium was replaced with fresh medium and cells cultured for 6, 12, 24 and 48 h post infection (h.p.i.). At appropriate time points, all cells were harvested and total RNA extracted using the RiboZol™ RNA Extraction Reagent (AMRESCO, LCC., USA). RNA was quantified using a Nanodrop 2000 (Thermo Scientific™, USA) or a Quantity One (BIORAD Laboratory Inc., USA).

To determine miR expression, 150 ng of total RNA was used as the template for synthesizing cDNA with specific primers (Table S1) using RevertAid™ Premium Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific inc., USA) as described by others (Varkonyi-Gasic et al., 2007). miRNAs were amplified with specific primers (Table S1) by quantitative PCR (qPCR) using IQ™ SYBR Green Supermix (BIORAD Laboratory Inc., USA). The C_T values obtained from RT-qPCR were used to determine relative gene expression using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak and Schmittgen, 2001). All data was normalized against U_6 small RNA. All nucleotide sequences of miRNAs are given in the supplementary information (Table S1).

To test the whether the miR-21 expression is specifically induced by DENV 2, two other viruses, DENV 4 and ZIKV were used to infect HepG2 cells at MOI of 20 and A549 cells at MOI of 2, respectively for 24 h following which total RNA was collected and analyzed for miR-21 using RT-qPCR as described above.

To determine whether miR-21 expression was specifically induced by DENV 2 under antibody-dependent enhancement (ADE) of infection, infection of U937 cells was undertaken as previously described (Klomporn et al., 2011). Briefly DENV 2 (16681) at MOI 20 or DENV 4 at MOI 1 was mixed with a 1:200 final dilution of a pan-specific anti-dengue E protein monoclonal antibody (HB114) in RPMI medium and incubated at 4 °C for 1 h with constant agitation. Then, the virus-antibody complexes were added to

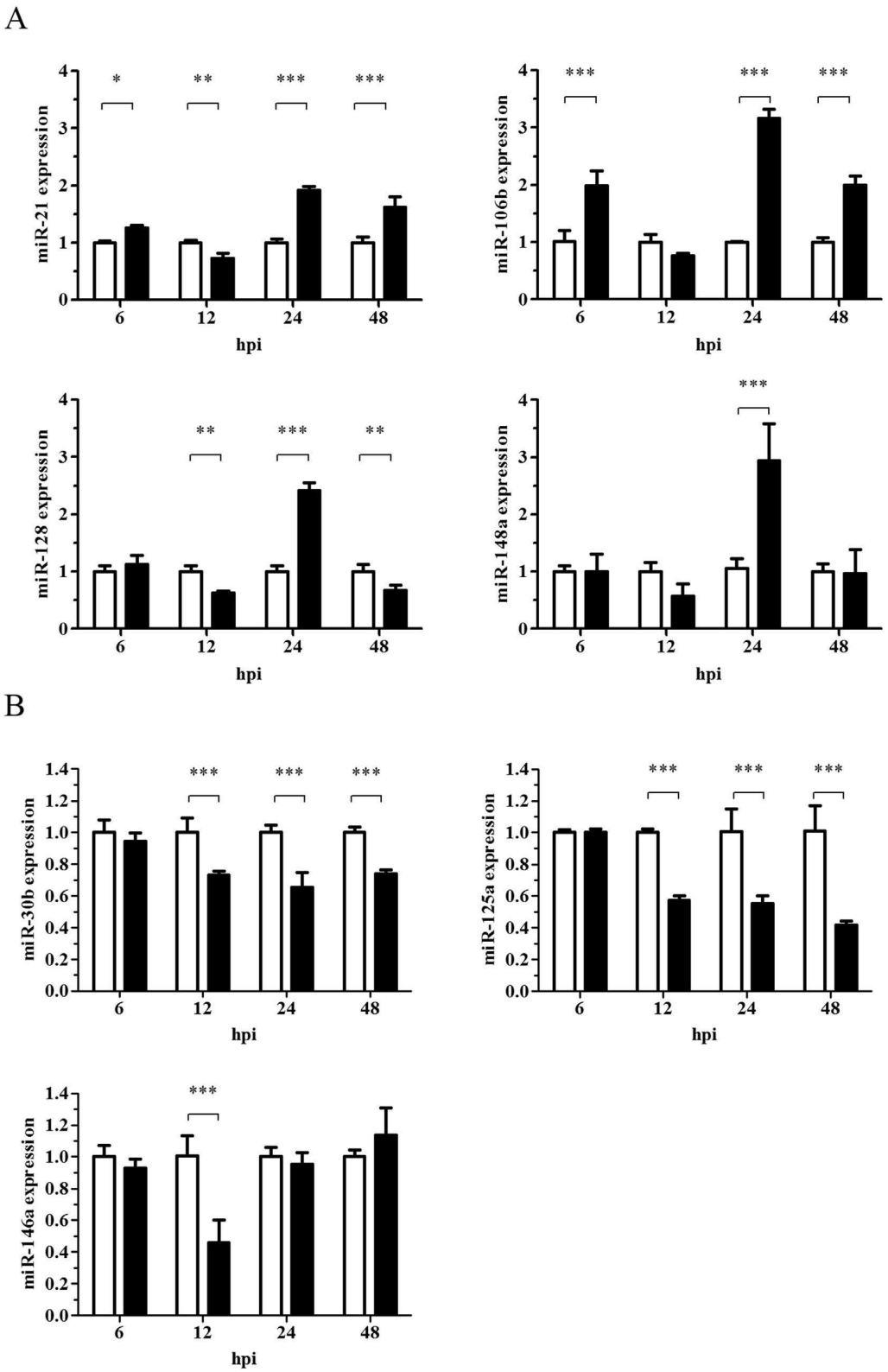


Fig. 1. miRNA expression profile upon DENV 2 infection. HepG2 cells were infected with DENV 2 at MOI of 10 for 6, 12, 24 and 48 h, respectively. miRNA expression was quantitated by RT-qPCR. (A) miRNAs (miR-21, miR-106b, miR-128 and miR-148a) showing up regulation at 24 h.p.i and (B) miRNAs (miR-30b, miR-125a and miR-146a) showing down-regulation at 12 h.p.i. Experiments were undertaken independently in triplicate. Data are shown as means with SD. The p-value < 0.05 (*); p-value < 0.01 (**); p-value < 0.001 (***) were considered to be statistically significant.

2×10^6 U937 cells in RPMI-1640 without FBS and incubated at 37 °C for 2 h with constant agitation. After incubation, the cells were resuspended to a final concentration of 3×10^5 cells/ml in RPMI-1640 supplemented with 10% FBS and further incubated at 37 °C 5% CO_2 until required. At 2 days post-infection, expression of miR-21 was determined by RT-qPCR as described above.

2.5. Nucleic acid binding properties of PNA-21

To ensure the complementary binding of nucleic acid between PNA-21 and AMO-21, AMO-21 alone (A), PNA-21 alone (P) and AMO-21 mixed with PNA-21 (AP) were prepared in culture medium and were analyzed by a gel mobility shift assay using 10% polyacrylamide gel electrophoresis (Das et al., 2012) After electrophoresis, the gel was stained with ethidium bromide.

2.6. Repression of miR-21 expression by AMO-21

To suppress miR-21 in HepG2 cells, reverse transfections were undertaken using the DharmaFECT4 reagent (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) according to the manufacturer's protocol. Briefly, the requisite oligonucleotides and 1 μl of DharmaFECT4 were prepared in 100 μl of DMEM. All transfections were undertaken in a final volume of 500 μl with either 100 nM of AMO-21(A), 200 nM of PNA-21(P) or mixture of AMO-21 and PNA-21 (AP). After a 40-min incubation at room temperature, transfection mixtures were added to a suspension of 1×10^5 HepG2 cells, and then the cell-complex mixtures were seeded to single wells of a 24 well-plate and cultured under standard conditions for 24 h. At 24 h post transfection, transfected HepG2 cells were harvested to extract total RNA and to determine the amount of miR-21 using qPCR as described above. In a parallel experiment cytotoxicity of the synthetic oligonucleotides was investigated by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assays.

2.7. Expression of MYD88 and IRAK1 transcripts after miR-21 repression

To investigate whether miR-21 promotes DENV replication directly or indirectly by suppressing the type I interferon response, the expression of myeloid differentiation primary response 88 (MYD88) and Interleukin-1 receptor-associated kinase 1 (IRAK1) was investigated by RT-qPCR. Briefly, 150 ng of total RNA from transfected HepG2 cell was converted to cDNA by using ReverseAid™ Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific inc., USA). One microliter of cDNA was used as template to quantitate by qPCR using gene-specific primers (Table S1). The C_T values were normalized with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GADPH) and determined as previously described.

2.8. Influence of AMO-21 on DENV 2 replication

Approximately 10^5 HepG2 cells were reverse-transfected with appropriate concentrations of transfection mixtures as described above. At 24 h post transfections, the transfected cells were infected with DENV 2 at MOI of 10 for 2 h. At 24 h.p.i., the supernatants were harvested for determination of the DENV titers by standard plaque assay as previously described (Panyasrivanit et al., 2011).

2.9. Fluorescent microscopy

HepG2 cells were either transfected or non-transfected with oligonucleotides as described above (Method 2.7). At 24 h post-transfection, cells were washed twice with PBS. Transfected HepG2 cells were fixed with 4% formaldehyde for 10 min and then washed twice with PBS. Cells were mounted with anti-fade Mowiol reagent (EMD Chemical Inc, Germany) and observed under a fluorescent microscope.

2.10. Statistical analysis

All analyses were performed using the GraphPad Prism program version 5.03 (GraphPadSoftware Inc., CA). Data were compared by Student's t-test or One-way ANOVA. The p-value < 0.05 (*); p-value < 0.01 (**); p-value < 0.001 (***) were considered to be statistically significant. Results are expressed as means ± SD from at least three independent replicates.

3. Results

3.1. Regulation of miRNAs in DENV 2 infected HepG2 cells

To identify miRNAs with a possible role in DENV infection, a panel of miRNAs selected based on prior knowledge (miRbase and literature search) were evaluated for amplification from HepG2 cells. A number of candidate miRNAs failed optimization for reasons including multiple bands (e.g. miR-30a, miR-122, miR-155, miR-149, miR-218, and miR-375a) and failure to amplify (e.g. miR-23b and miR-221). However, seven miRNAs, namely miR-21, miR-106b, miR-128, miR-148a, miR-30b, miR-125a and miR-146a all gave optimized amplification profiles. To investigate the expression profile of these miRNAs during DENV infection, HepG2 cells were infected with DENV 2 or mock infected and at 6, 12, 24 and 48 h.p.i. the expression levels of 7 miRNAs assessed by RT-

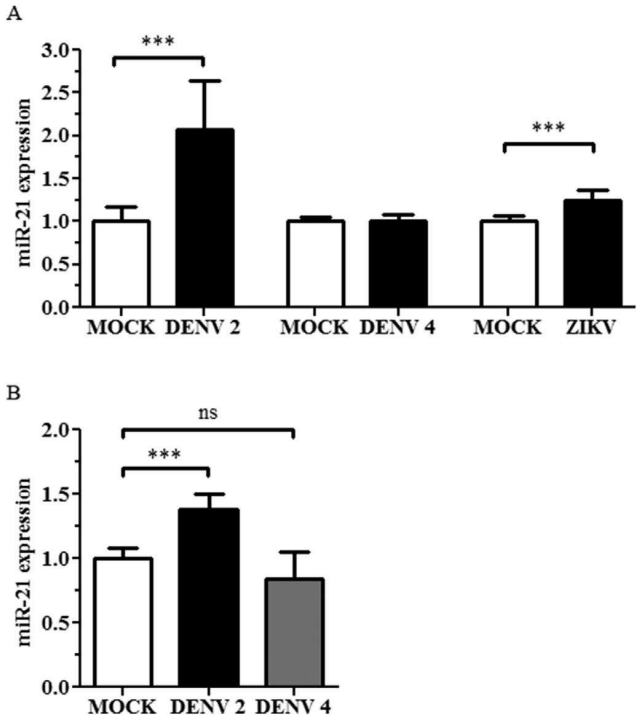


Fig. 2. miR-21 expression profile in different viral infected cells. (A) HepG2 cells were infected with DENV 2 (MOI of 10) or DENV4 (MOI of 20) for 24 h, whereas A549 cells were infected ZIKV (MOI of 2) for 24 h. (B) U937 cells were infected with DENV 2 (MOI of 20) or DENV 4 (MOI of 1) under conditions of ADE of infection for 48 h. miR-21 expression was quantitated by RT-qPCR. Experiments were undertaken independently in triplicate. Data are shown as means with SD. The p-value < 0.05 (*); p-value < 0.01 (**); p-value < 0.001 (***) were considered to be statistically significant.

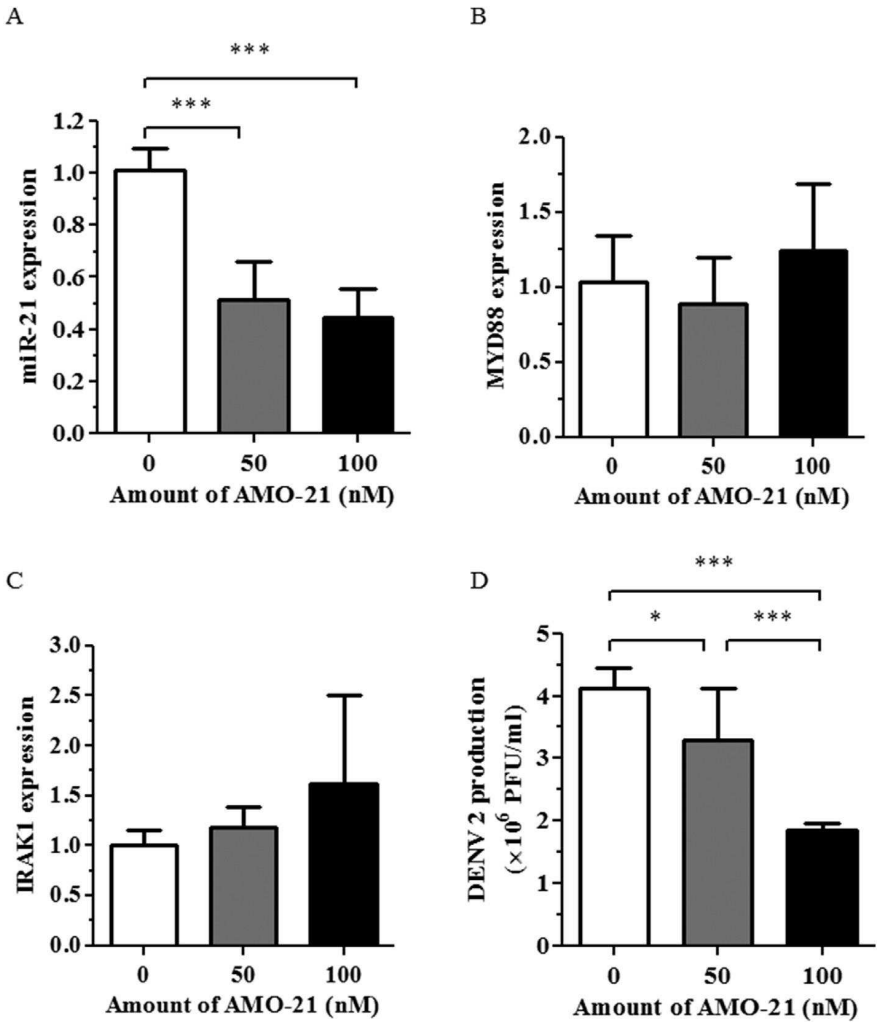


Fig. 3. Inhibition of DENV 2 replication by AMO-21. HepG2 cells were reverse-transfected with AMO-21 (0, 50 and 100 nM) for 24 h before DENV 2 infection. (A) miR-21 expression, (B) MYD88 expression and (C) IRAK1 expression of transfected HepG2 cells were assessed by RT-qPCR. (D) DENV 2 production was assessed by plaque assay. Experiments were undertaken independently in triplicate with duplicate plaque assay. Data are shown as mean with SD. The p-value < 0.05 (*); p-value < 0.01 (**); p-value < 0.001 (***) were considered to be statistically significant.

qPCR. The result revealed that all seven miRNAs were differentially expressed during infection (Fig. 1). The first four miRNAs (miR-21, miR-106b, miR-128 and miR-148a) generally showed up-regulation at 24 h.p.i. (Fig. 1A), while the three remaining miRNA (miR-30b, miR-125a, and miR-146a) were generally down-regulated at 12 h.p.i. (Fig. 1B). Surprisingly, only one miRNA, miR-21, exhibited significant changes in terms of gene expression level at every time point examined (Fig. 1A). Therefore, miR-21 was selected for further investigation into its function during DENV 2 infection.

3.2. Specificity of miR-21 up-regulation by DENV 2

To determine the specificity of the up-regulation of miR-21, total RNA of HepG2 cells infected with DENV 2, DENV 4 and ZIKV was isolated and used as a template for monitoring expression of miR-21. qPCR analysis showed that miR-21 was significantly up-regulated during DENV 2 infection (Fig. 2), consistent with the previous results (Fig. 1A). In ZIKV infection miR-21 was significantly up-regulated, albeit it to a lower extent than DENV 2, while no significant regulation of niR-21 was seen in DENV 4 infection (Fig. 2A).

To determine whether the specific up-regulation of miR-21 also occur under conditions of ADE infection, U937 cells were infected with DENV 2 and DENV 4 separately under a previously established protocol (Klomporn et al., 2011). Results showed that consistent with direct infection of HepG2 cells, miR-21 was significantly up-regulated in ADE mediated infection of U937 cells during DENV 2 infection, but not in DENV 4 infection (Fig. 2B).

3.3. miR-21 promotes DENV 2 replication

To determine the role of miR-21 during DENV infection, we first established whether an anti-miR-21 oligonucleotide (AMO-21) with a nucleotide sequence complementary to the mature *hsa*-miR21-5p was able to reduce expression of miR-21. HepG2 cells were therefore transfected with 50 and 100 nM of AMO-21, and the expression of miR-21 quantified at 24 h post-transfection by RT-qPCR. The results showed that transfection with AMO-21 significantly reduced expression of miR-21 by approximately half (Fig. 3A), showing that AMO-21 can suppress miR-21 expression. To

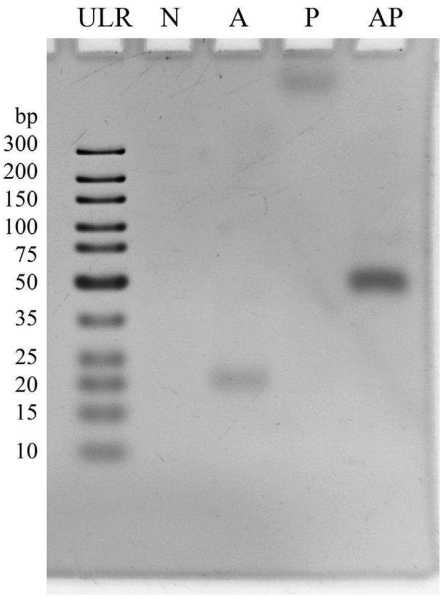


Fig. 4. Nucleic acid binding property of PNA-21. Oligonucleotide medium which used for transfection in HepG2 cells was analyzed by PAGE, lane N is no oligonucleotide control, lane A is 100 nM of AMO-21, lane P is 200 nM of PNA-21 and lane AP is a mixture of AMO-21 and PNA-21.

analyze the expression of possible miR-21 target genes, MYD88 and IRAK1, the relative expression of MYD88 and IRAK1 was measured by using RT-qPCR. Although AMO-21 could suppress miR-21 (Fig. 3A), the MYD88 and IRAK1 transcripts were not significantly changed after transfection in HepG2 cells (Fig. 3B and C, respectively). These results indicated that the MYD88 and IRAK1 are not directly affected as a result of miR-21 repression.

In order to determine if miR-21 is functionally involved in DENV 2 replication, AMO-21-transfected HepG2 cell was infected with DENV 2 in parallel with mock transfected cells, and at 24 h.p.i., the culture media were collected to determine DENV 2 titer by standard plaque assay. As shown in Fig. 3D, viral titers showed a significant and dose-dependent decrease in response to infection in the presence of AMO-21 (Fig. 3D).

3.4. Transfection of AMO-21, PNA-21, and AMO-21/PNA-21 in HepG2

Peptide nucleic acids (PNAs) are polynucleotides where the sugar-phosphate backbone has been substituted with electrostatically neutral peptide backbones (Nielsen, 2010). Many variants of PNA exists, and the PNA used in this work is the conformationally constrained pyrrolidinyl PNA with (2*R*,4*R*)-proline-2-amino-cyclopentanecarboxylic acid backbone (acpcPNA) that reportedly shows stronger and more specific nucleic acid binding than the original PNA (Vilaivan and Srisuwannaket, 2006; Vilaivan, 2015). The peptide nucleic acid-21 (PNA-21) was synthesized to have a sequence complementary to AMO-21. To confirm that PNA-21 could hybridize with AMO-21, polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) was used to determine the mobility shift of the AMO-21/PNA-21 hybrid. As shown in Fig. 4, PNA-21 could specifically anneal to AMO-21 as shown by the mobility shift of the band (AP lane) at the position close to 50 bp. We next determined that the AMO-21/PNA-21 complex and PNA-21 *per se* can enter into HepG2 cell after transfection. As shown by fluorescent microscopy, specific internalization of AMO-21/PNA-21 and PNA-21 into HepG2 cells was observed, while no internalization of AMO-21 alone was seen (Fig. 5A). Additionally, there is no signal observed with either PNA-21 and AMO-21/PNA-21 in the absence of the transfection reagent (Fig. 5B). These results indicated that synthetic PNA-21 can bind to AMO-21 and that the resultant complex can enter into HepG2 cells after transfection.

3.5. Specific inhibition of AMO-21 by PNA-21 in the DENV 2 infected HepG2 cell

To rule out any possibility that the oligonucleotide and the peptide nucleic acids were deleterious to cells, AMO-21 (A), PNA-21 (P), and AMO-21/PNA-21 (AP) were transfected into HepG2 cells, which were then and assayed for cell cytotoxicity. The results showed that AMO-21, PNA-21, and AMO-21/PNA-21 did not exert significant cytotoxicity towards HepG2 cells (Fig. 6A). To determine if PNA-21 can specifically inhibit AMO-21, HepG2 cells were transfected with AMO-21, PNA-21, and AMO-21/PNA-21 separately. At 24 h post-transfection, cells were collected and levels of miR-21 quantitated by RT-qPCR. As shown in Fig. 6B, miR-21 expression in AMO-21 treated cells was significantly reduced, whereas miR-21 expression in PNA-21 treated cells was significantly increased. AMO-21/PNA-21 treated cells showed a slight, but non-significant increase in levels of miR-21 (Fig. 6B).

Finally, HepG2 cells transfected either with AMO-21, PNA-21 or AMO-21/PNA-21 were subsequently infected with DENV 2 at MOI 10. At 24 h.p.i., the culture media were collected and virus titer measured by standard plaque assay. Results (Fig. 6C) showed that AMO-21 treatment significantly reduced DENV titer to about 50%, consistent with the reduction in miR-21 expression (Fig. 6B), while PNA-21 significantly increased DENV titer, again consistent with the expression of miR-21. AMO-21/PNA-21 treatment had no significant effect on DENV titer, again consistent with the expression of miR-21 (Fig. 6).

4. Discussion

Since their discovery in *C. elegans* in 1993 (Lee et al., 1993), miRNAs have been shown to regulate a number of biological processes, and more than 2000 human miRNAs have been identified (Friedlander et al., 2014). miRNAs are known to exert their effects through regulation of mRNA translation (Felekkis et al., 2010) as well as by interacting with mRNA binding proteins (Ciafrè and Galardi, 2013) resulting in the modulation of numerous biological processes (Felekkis et al., 2010; Harfe, 2005).

The role of miRNAs in DENV infection remains poorly described. Previous studies have shown contradictory mechanisms, with specific miRNAs either enhancing (Wu et al., 2013) or suppressing (Zhu et al., 2014) DENV replication, and expression of specific miRNAs may be either increased (Qi et al., 2013; Wu et al., 2013; Zhu et al., 2014) or decreased (Castillo et al., 2016; Qi et al., 2013) during DENV infection. miRNAs that have been shown to suppress DENV replication include Let-7c (Escalera-Cueto et al., 2015) and miR-30e* (Zhu et al., 2014) which are both up-regulated during DENV infection whereas miR-133a (Castillo et al., 2016) and miR-233 (Wu et al., 2014) are decreased during DENV infection. miR-146a has been shown to be increased in DENV infection and expression facilitates DENV replication (Wu et al., 2013).

In this study we have shown that miR-21 is significantly increased upon DENV 2 infection and that expression of this miRNA promotes DENV replication, similar to the effect of miR-146a (Wu et al., 2013). Despite the limited number of studies of the role of miR-21 in terms of viral infection, our results are in congruence with the results of others as miR-21 was found to be up-regulated in serum from patient infected with DENV 1 (Ouyang et al., 2016).

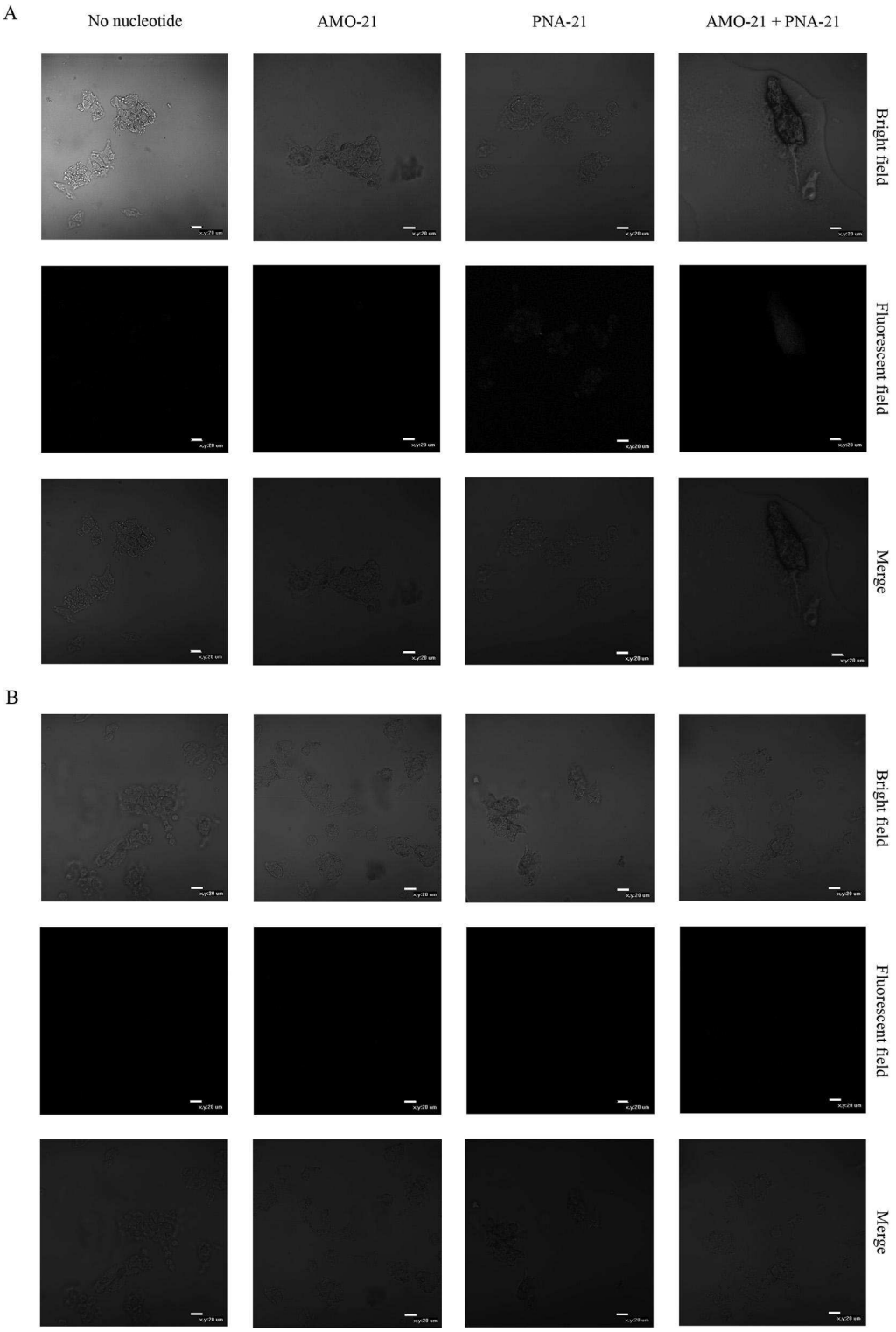


Fig. 5. Fluorescence microscopy of transfected HepG2 cells. HepG2 cells were either transfected (A) or non-transfected (B) with no nucleotide, AMO-21, PNA-21 and AMO-21/PNA-21 complex and were subsequently observed under a fluorescence microscope. Representative images are shown.

Interestingly, miR-21 was shown to be significantly increased in ZIKV infection, but not in DENV 4 infection. Moreover, miR-21 was also shown to be significantly up-regulated in ADE mediated infection of monocytic U937 cells by DENV 2, but not by DENV 4. This would suggest that miR-21 has a broad involvement in flaviviral infections, but that this can be modulated by virus and strain

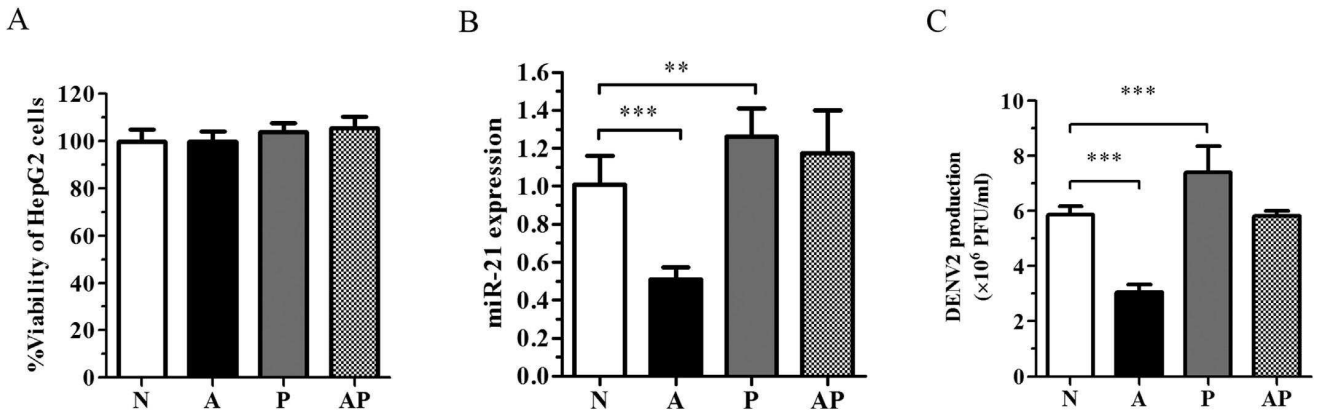


Fig. 6. Influence of miR-21 and AMO-21 on DENV 2 production in HepG2 cells. HepG2 cells were mock transfected (test N), or transfected with 100 nM of AMO-21 (test A), 200 nM of PNA-21 (test P) and a mixture of AMO-21/PNA-21 (test AP), respectively. The percentage viability after treatment (A), miR-21 expression (B) and DENV 2 production (C) were determined. Experiments were undertaken independently in triplicate with duplicate plaque assay. Data are shown as mean with SD. The p-value < 0.05 (*); p-value < 0.01 (**); p-value < 0.001 (***) were considered to be statistically significant.

type factors. Particularly for DENV the specific up-regulation of miR-21 in both primary and secondary DENV 2 infection, but not for DENV 4 under any conditions, may help explain the observed variations in pathogenicity seen between different DENVs (Rico-Hesse et al., 1997).

Recent studies have also shown that higher expression of miR-21 helped HCV mute the innate immune response by modulating IFN-α through inhibition of MYD88 and IRAK1, resulting in increased levels of the virus in the human hepatoma cell line Huh7 (Chen et al., 2013). In contrast, in our study, MYD88 and IRAK1 were not regulated by the repression of miR-21 via transfected AMO-21 in HepG2 cells, suggesting that this pathway is not the primary way in which miR-21 regulates DENV 2 replication in HepG2 cells. In addition to a role in HCV infection, miR-21 levels were significantly increased after infection by EBV, and miR-21 was responsible for facilitating EBV replication through enhancing pAKT expression (Anastasiadou et al., 2015; Rosato et al., 2012).

Previous studies have shown that miRNAs may modulate DENV infection through either directly targeting the DENV genome (Escalera-Cueto et al., 2015) or by targeting innate immune response genes (Chen et al., 2014; Wu et al., 2013; Zhu et al., 2014). While the mechanism of how miR-21 enhances DENV replication remain unknown, it is possible that miR-21 may directly target NS1 sequences in the DENV 2 genome (Miranda et al., 2006) and Table S2. Interestingly, this particular region of the DENV 2 genome showed 100% conservation in more than 100 DENV 2 isolates when subjected to a BLAST search as of August 2016, reflecting the strong conservation of these sequences. The importance of miRNAs binding to the viral genome and enhancing replication has been described for other viruses. For example, the binding of miR-122 to the 5′ region of the HCV genome promotes HCV genome stability and replication (Israelow et al., 2014; Mortimer and Doudna, 2013). In addition, miR-485 binds to the genomic IAV-PB1 of influenza virus in order to promote viral replication (Ingle et al., 2015). Interestingly, we observed that the miR-21 expression level was not affected by a 2 fold increase in the dose of AMO-21 (Fig. 3A), although there was a 50% decrease in the titer of DENV 2 (Fig. 3D), suggesting that AMO-21 could directly affect DENV 2 replication, and additionally given that there is an increase of miR-21 in response to transfection with PNA-21, it is possible that there is an endogenous inhibitor, such as an anti-miR-21 mediating some of the effect.

In summary, we have shown that miR-21 mediates DENV 2 infection by enhancing DENV replication. Knock down of miR-21 with AMO-21 reduced virus replication, suggesting that AMO-21 is a promising antiviral therapeutic agent against DENV infection.

Acknowledgement

This work was financially supported by the Royal Golden Jubilee Ph.D. Program (PHD/0239/2553 to S.K.), the Thailand Research Fund (RSA5580052) to W.A. and (DPG5780002 to T.V.), The Asahi Glass Foundation, Chulalongkorn University Centenary Academic Development Project to W.A.; The 90th Anniversary of Chulalongkorn University, Rachadapisek Sompote Fund and the Office of Higher Education Commission, Ministry of Education. We would like to thank Armed Forces Research Institute of Medical Sciences (AFRIMS) and the Department of Disease Control, Ministry of Public Health, Thailand for providing the Zika virus isolate used in this study.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.03.020.

References

Anastasiadou, E., Garg, N., Bigi, R., Yadav, S., Campese, A.F., Lapenta, C., Spada, M., Cuomo, L., Botta, A., Belardelli, F., Frati, L., Ferretti, E., Faggioni, A., Trivedi, P., 2015. Epstein-Barr virus infection induces miR-21 in terminally differentiated malignant B cells. Int. J. Cancer 137 (6), 1491–1497.

Bartel, D.P., 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell 116, 281–297.

Borchert, G.M., Lanier, W., Davidson, B.L., 2006. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. Nat. Struct. Mol. Biol. 13 (12), 1097–1101.

Carmell, M.A., Girard, A., van de Kant, H.J., Bourc'his, D., Bestor, T.H., de Rooij, D.G., Hannon, G.J., 2007. MIWI2 is essential for spermatogenesis and repression of transposons in the mouse male germline. Dev. Cell 12, 503–514.

Castillo, J.A., Castrillón, J.C., Diosa-Toro, M., Betancur, J.G., St Laurent, G., Smit, J.M., Urcuqui-Inchima, S., 2016. Complex interaction between dengue virus replication and expression of miRNA-133a. BMC Infect. Dis. 16, 29.

Chen, R.F., Yang, K.D., Lee, I.K., Liu, J.W., Huang, C.H., Lin, C.Y., Chen, Y.H., Chen, C.L., Wang, L., 2014. Augmented miR-150 expression associated with depressed SOCS1 expression involved in dengue haemorrhagic fever. J. Infect. 69 (4), 366–374.

Chen, Y., Chen, J., Wang, H., Shi, J., Wu, K., Liu, S., Liu, Y., Wu, J., 2013. HCV-induced miR-21 contributes to evasion of host immune system by targeting MyD88 and IRAK1. PLoS Pathog. 9 (4), e1003248.

Ciafrè, S.A., Galardi, S., 2013. microRNAs and RNA-binding proteins: a complex network of interactions and reciprocal regulations in cancer. RNA Biol. 10 (6), 934–942.

Das, I., Desire, J., Manvar, D., Baussanne, I., Pandey, V.N., Decout, J.L., 2012. A peptide nucleic acid-aminosugar conjugate targeting transactivation response element of HIV-1 RNA genome shows a high bioavailability in human cells and strongly inhibits tat-mediated transactivation of HIV-1 transcription. J. Med. Chem. 55 (13), 6021–6032.
El-Diwany, R., Wasilewski, L., Witwer, K.W., Bailey, J.R., Page, K., Ray, S.C., Cox, A.L., Thomas, D.L., Balagopal, A., 2015. Acute hepatitis C virus infection induces consistent changes in circulating miRNAs that are associated with non-lytic hepatocyte release. J. Virol. 89 (18), 9454–9464.
Escalera-Cueto, M., Medina-Martinez, I., del Angel, R.M., Berumen-Campos, J., Gutierrez-Escolano, A.L., Yocupicio-Monroy, M., 2015. Let-7c overexpression inhibits dengue virus replication in human hepatoma Huh-7 cells. Virus Res. 196, 105–112.
Farazi, T.A., Juranek, S.A., Tuschl, T., 2008. The growing catalog of small RNAs and their association with distinct Argonaute/Piwi family members. Development 135 (7), 1201–1214.
Felekkis, K., Deltas, C., 2006. RNA interference: a powerful laboratory tool and its therapeutic implications. Hippokratia 10 (3), 112–115.
Felekkis, K., Touvana, E., Stefanou, Ch, Deltas, C., 2010. microRNAs: a newly described class of encoded molecules that play a role in health and disease. Hippokratia 14 (4), 236–240.
Friedlander, M.R., Lizano, E., Houben, A.J., Bezdan, D., Banez-Coronel, M., Kudla, G., Mateu-Huertas, E., Kagerbauer, B., Gonzalez, J., Chen, K.C., LeProust, E.M., Marti, E., Estivill, X., 2014. Evidence for the biogenesis of more than 1,000 novel human microRNAs. Genome Biol. 15 (4), R57.
Han, J., Lee, Y., Yeom, K.H., Kim, Y.K., Jin, H., Kim, V.N., 2004. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. Gene. Dev. 18, 3016–3027.
Harfe, B.D., 2005. MicroRNAs in vertebrate development. Curr. Opin. Genet. Dev. 15, 410–415.
Ingle, H., Kumar, S., Raut, A.A., Mishra, A., Kulkarni, D.D., Kameyama, T., Takaoka, A., Akira, S., Kumar, H., 2015. The microRNA miR-485 targets host and influenza virus transcripts to regulate antiviral immunity and restrict viral replication. Sci. Signal 8 (406) ra126.
Israelow, B., Mullokandov, G., Agudo, J., Sourisseau, M., Bashir, A., Maldonado, A.Y., Dar, A.C., Brown, B.D., Evans, M.J., 2014. Hepatitis C virus genetics affects miR-122 requirements and response to miR-122 inhibitors. Nat. Commun. 5, 5408.
Klomporn, P., Panyasrivanit, M., Wikan, N., Smith, D.R., 2011. Dengue infection of monocytic cells activates ER stress pathways, but apoptosis is induced through both extrinsic and intrinsic pathways. Virology 409, 189–197.
Landthaler, M., Yalcin, A., Tuschl, T., 2004. The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and its *D. melanogaster* homolog are required for miRNA biogenesis. Curr. Biol. 14 (23), 2162–2167.
Lee, R.C., Feinbaum, R.L., Ambros, V., 1993. The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell 75, 843–854.
Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S., Kim, V.N., 2003. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. Nature 425 (6956), 415–419.
Lee, Y., Hur, I., Park, S.Y., Kim, Y.K., Suh, M.R., Kim, V.N., 2006. The role of PACT in the RNA silencing pathway. EMBO. J. 25 (3), 522–532.
Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.H., Lee, S., Baek, S.H., Kim, V.N., 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. EMBO J. 23 (20), 4051–4060.
Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. Methods 25 (4), 402–408.
MacRae, I.J., Ma, E., Zhou, M., Robinson, C.V., Doudna, J.A., 2008. In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105 (2), 512–517.
Miranda, K.C., Huynh, T., Tay, Y., Ang, Y.S., Tam, W.L., Thomson, A.M., Lim, B., Rigoutsos, I., 2006. A pattern-based method for the identification of microRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes. Cell 126 (6), 1203–1217.
Mortimer, S.A., Doudna, J.A., 2013. Unconventional miR-122 binding stabilizes the HCV genome by forming a trimolecular RNA structure. Nucleic Acids Res. 41 (7), 4230–4240.
Mukherjee, A., Di-Bisceglie, A.M., Ray, R.B., 2015. Hepatitis C virus-mediated enhancement of microRNA miR-373 impairs the JAK/STAT signaling pathway. J. Virol. 89 (6), 3356–3365.
Nielsen, P.E., 2010. Peptide nucleic acids (PNA) in chemical biology and drug discovery. Chem. Biodivers. 7 (4), 786–804.
Ouyang, X., Jiang, X., Gu, D., Zhang, Y., Kong, S.K., Jiang, C., Xie, W., 2016. Dysregulated serum miRNA profile and promising biomarkers in dengue-infected patients. Int. J. Med. Sci. 13 (3), 195–205.
Panyasrivanit, M., Greenwood, M.P., Murphy, D., Isidoro, C., Auewarakul, P., Smith, D.R., 2011. Induced autophagy reduces virus output in dengue infected monocytic cells. Virology 418 (1), 74–84.
Qi, Y., Li, Y., Zhang, L., Huang, J., 2013. microRNA expression profiling and bioinformatic analysis of dengue virus infected peripheral blood mononuclear cells. Mol. Med. Rep. 7 (3), 791–798.
Rico-Hesse, R., Harrison, L.M., Salas, R.A., Tovar, D., Nisalak, A., Ramos, C., Boshell, J., de Mesa, M.T., Nogueira, R.M., da Rosa, A.T., 1997. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. Virology 230, 244–251.
Rosato, P., Anastasiadou, E., Garg, N., Lenze, D., Boccellato, F., Vincenti, S., Severa, M., Coccia, E.M., Bigi, R., Cirone, M., Ferretti, E., Campese, A.F., Hummel, M., Frati, L., Presutti, C., Faggioni, A., Trivedi, P., 2012. Differential regulation of miR-21 and miR-146a by Epstein-Barr virus-encoded EBNA2. Leukemia 26 (11), 2343–2352.
Runge-Ranzinger, S., McCall, P.J., Kroeger, A., Horstick, O., 2014. Dengue disease surveillance: an updated systematic literature review. Trop. Med. Int. Health 19 (9), 1116–1160.
Sakoonwatanyoo, P., Boonsanay, V., Smith, D.R., 2006. Growth and production of the dengue virus in C6/36 cells and identification of a laminin-binding protein as a candidate serotype 3 and 4 receptor protein. Intervirology 49 (3), 161–172.
Sharma, N., Verma, R., Kumawat, K.L., Basu, A., Singh, S.K., 2015. miR-146a suppresses cellular immune response during Japanese encephalitis virus JaOArS982 strain infection in human microglial cells. J. Neuroinflamm. 12, 30.
Sithisarn, P., Suksanpaisan, L., Thepparit, C., Smith, D.R., 2003. Behavior of the dengue virus in solution. J. Med. Virol. 71 (4), 532–539.
Suksanpaisan, L., Susantad, T., Smith, D.R., 2009. Characterization of dengue virus entry into HepG2 cells. J. Biomed. Sci. 16, 17.
Thepparit, C., Phoolcharoen, W., Suksanpaisan, L., Smith, D.R., 2004. Internalization and propagation of the dengue virus in human hepatoma (HepG2) cells. Intervirology 47 (2), 78–86.
Varkonyi-Gasic, E., Wu, R., Wood, M., Walton, E.F., Hellens, R.P., 2007. Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. Plant Methods 3, 12.
Vilaivan, C., Srisuwannaket, C., Ananthanawat, C., Suparpprom, C., Kawakami, J., Yamaguchi, Y., Tanaka, Y., Vilaivan, T., 2011. Pyrrolidinyl peptide nucleic acid with alpha/beta-peptide backbone: a conformationally constrained PNA with unusual hybridization properties. Artif. DNA. PNA. XNA 2 (2), 50–59.
Vilaivan, T., 2015. Pyrrolidinyl PNA with alpha/beta-dipeptide backbone: From development to applications. Acc. Chem. Res. 48 (6), 1645–1656.
Vilaivan, T., Srisuwannaket, C., 2006. Hybridization of pyrrolidinyl peptide nucleic acids and DNA: selectivity, base-pairing specificity, and direction of binding. Org. Lett. 8 (9), 1897–1900.
Walsh, D., Mohr, I., 2011. Viral subversion of the host protein synthesis machinery. Nat. Rev. Microbiol. 9 (12), 860–875.
World Health Organization, 2009. Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control: New Edition. WHO/HTM/NTD/DEN/2009.1.
World Health Organization, 2016. Dengue vaccine: WHO position paper-July 2016. Wkly. Epidemiol. Rec. 91 (30), 349–364.
Wu, N., Gao, N., Fan, D., Wei, J., Zhang, J., An, J., 2014. miR-223 inhibits dengue virus replication by negatively regulating the microtubule-destabilizing protein STMN1 in EAhy926 cells. Microbes Infect. 16 (11), 911–922.
Wu, S., He, L., Li, Y., Wang, T., Feng, L., Jiang, L., Zhang, P., Huang, X., 2013. miR-146a facilitates replication of dengue virus by dampening interferon induction by targeting TRAF6. J. Infect. 67 (4), 329–341.
Zhu, X., He, Z., Hu, Y., Wen, W., Lin, C., Yu, J., Pan, J., Li, R., Deng, H., Liao, S., Yuan, J., Wu, J., Li, J., Li, M., 2014. MicroRNA-30e* suppresses dengue virus replication by promoting NF-κB–dependent IFN production. PLoS Negl. Trop. Dis. 8 (8), e3088.

analytical chemistry

Article

pubs.acs.org/ac

Multiplex Paper-Based Colorimetric DNA Sensor Using Pyrrolidinyl Peptide Nucleic Acid-Induced AgNPs Aggregation for Detecting MERS-CoV, MTB, and HPV Oligonucleotides

Prinjaporn Teengam,[†] Weena Siangproh,[‡] Adisorn Tuantranont,[§] Tirayut Vilaivan,[∥] Orawon Chailapakul,[*,⊥,#] and Charles S. Henry[*,○]

[†]Program in Petrochemistry, Faculty of Science, [∥]Organic Synthesis Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, [⊥]Electrochemistry and Optical Spectroscopy Research Unit, Department of Chemistry, and [#]National Center of Excellence for Petroleum, Petrochemicals, and Advanced Materials, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok, 10330, Thailand

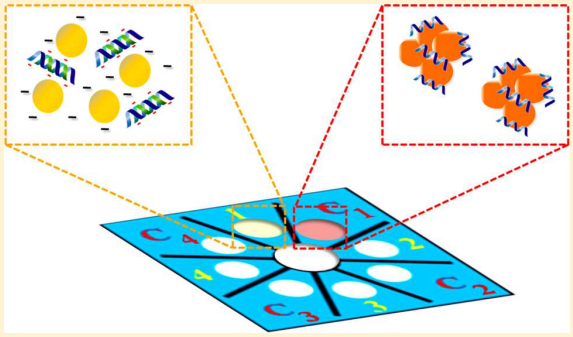
[‡]Department of Chemistry, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, Bangkok, 10110, Thailand

[§]Nanoelectronics and MEMS Laboratory, National Electronics and Computer Technology Center, Pathumthani 12120, Thailand

[○]Departments of Chemistry and Chemical and Biological Engineering, Colorado State University, Fort Collins, Colorado 80523, United States

S *Supporting Information*

ABSTRACT: The development of simple fluorescent and colorimetric assays that enable point-of-care DNA and RNA detection has been a topic of significant research because of the utility of such assays in resource limited settings. The most common motifs utilize hybridization to a complementary detection strand coupled with a sensitive reporter molecule. Here, a paper-based colorimetric assay for DNA detection based on pyrrolidinyl peptide nucleic acid (acpcPNA)-induced nanoparticle aggregation is reported as an alternative to traditional colorimetric approaches. PNA probes are an attractive alternative to DNA and RNA probes because they are chemically and biologically stable, easily synthesized, and hybridize efficiently with the complementary DNA strands. The acpcPNA probe contains a single positive charge from the lysine at C-terminus and causes aggregation of citrate anion-stabilized silver nanoparticles (AgNPs) in the absence of complementary DNA. In the presence of target DNA, formation of the anionic DNA-acpcPNA duplex results in dispersion of the AgNPs as a result of electrostatic repulsion, giving rise to a detectable color change. Factors affecting the sensitivity and selectivity of this assay were investigated, including ionic strength, AgNP concentration, PNA concentration, and DNA strand mismatches. The method was used for screening of synthetic Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV), *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), and human papillomavirus (HPV) DNA based on a colorimetric paper-based analytical device developed using the aforementioned principle. The oligonucleotide targets were detected by measuring the color change of AgNPs, giving detection limits of 1.53 (MERS-CoV), 1.27 (MTB), and 1.03 nM (HPV). The acpcPNA probe exhibited high selectivity for the complementary oligonucleotides over single-base-mismatch, two-base-mismatch, and noncomplementary DNA targets. The proposed paper-based colorimetric DNA sensor has potential to be an alternative approach for simple, rapid, sensitive, and selective DNA detection.



Infectious diseases represent a major threat to human health in developed and developing countries alike. DNA alterations contribute to different types of diseases; therefore, the detection of specific DNA sequences plays a crucial role in the development method for early stage treatment and monitoring of genetic-related diseases. DNA diagnostics can provide sequence-specific detection, especially for single-nucleotide polymorphisms (SNPs),[1] which critical for a range of applications including the diagnosis of human diseases and bacterial/viral infections.

Middle East respiratory syndrome (MERS), tuberculosis (TB), and cervical cancers related to human papilloma virus (HPV) are examples of infectious diseases caused by bacterial and viral infections that benefit greatly from DNA detection. TB is an infectious disease caused by mycobacteria, usually *M. tuberculosis* (MTB) in humans.[2] HPV has been shown to be a major cause of cervical cancer.[3] Middle East Respiratory Syndrome coronavirus (MERS-CoV) has recently emerged as an infectious disease with a high fatality rate in humans.[4]

Received: January 20, 2017
Accepted: April 10, 2017
Published: April 10, 2017

ACS Publications © 2017 American Chemical Society

DOI: 10.1021/acs.analchem.7b00255
Anal. Chem. 2017, 89, 5428−5435

Diagnostic methods developed for these infectious diseases include reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) for MERS-CoV,[5] sputum smear microscopy, culture of bacilli, and molecular species diagnostics for MTB[6−11] and Digene Hybrid Capture assay (HC2) and Pap smear test for HPV.[12,13] While these techniques have been used for successful detection, they are difficult to implement in point-of-care clinical diagnostics particularly in developing countries lacking specialized medical facilities and skilled personnel. Therefore, simple, rapid, low-cost, and highly accurate on-site diagnostic platforms amenable to nucleic acid detection remain a challenge for early detection of infectious diseases for better patient management and infection control. Although DNA amplification is still needed with the current method to provide high sensitivity, we seek to further improve selectivity and assay simplicity to give immediate and quantitative responses in resource limited settings.

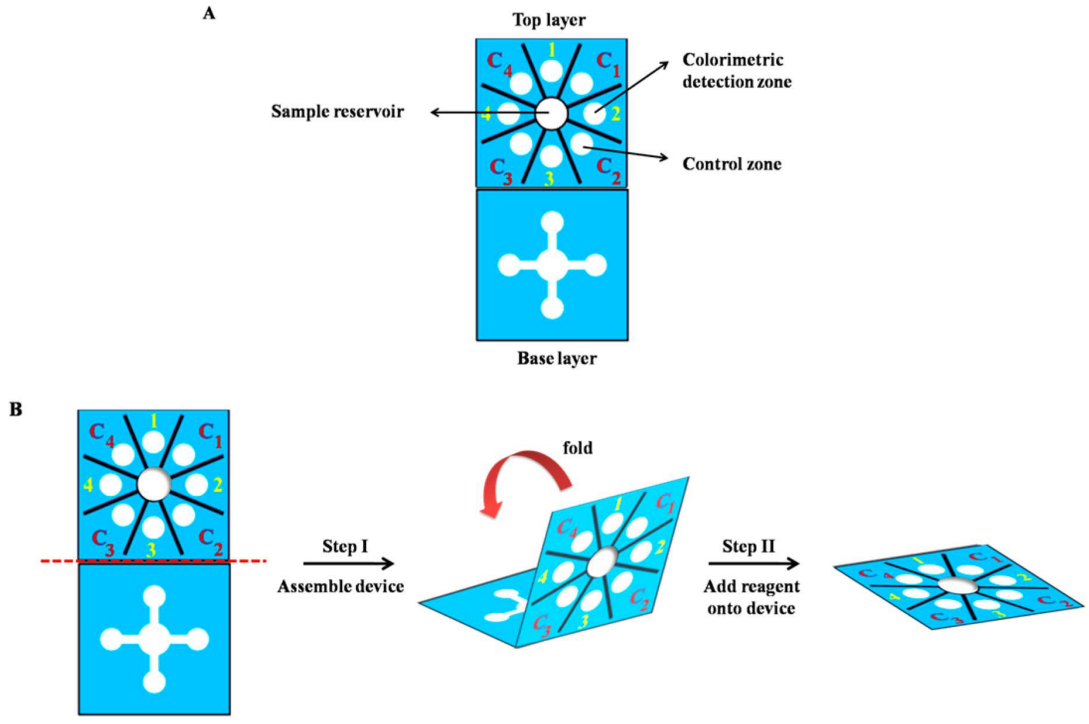
Paper-based analytical devices (PADs) are a point-of-use technology that recently received renewed interest because they are simple, inexpensive, portable, and disposable.[14−16] To date, PADs have been extensively used for applications ranging from environmental analysis to clinical diagnostic assays.[15,17,18] Colorimetric assays are particularly attractive when coupled with PADs due to their ease-of-use, lack of complicated external equipment and ability to provide semiquantitative results.[19−21] Moreover, quantitative analysis of colorimetric assays can be accomplished using simple optical technologies such as digital cameras[22−24] and office scanners[20,25] combined with image processing software to carry out color, hue, and intensity measurements. In the field of clinical diagnostics, the advantages of simplicity, sensitivity, and low-cost are key reasons that make PADs coupled with colorimetric detection an effective diagnostic tool relative to traditional methods.

Colorimetric assays based on the aggregation of silver (AgNPs) and gold nanoparticles (AuNPs) have attracted increasing attention in biomedical applications. The optical properties of these nanomaterials depend on their size and shape.[26−31] AgNPs are known to have a higher extinction coefficient compared to AuNPs,[32−34] leading to improved optical sensitivity. Chemical reduction of silver salts is frequently used to synthesize AgNPs; while specific control of shape and size distribution is achieved by varying the reducing agents and stabilizers.[35−37] Among stabilizing agents, negatively charged citrate has been widely used.[38,39] Recently, colorimetric assays based on AgNPs aggregation for DNA detection has been reported.[34] Colorimetric DNA detection using AgNPs usually involves modifying the particles with a DNA probe and mixing them with the DNA target containing the complementary

Table 1. List of Oligonucleotide Used in This Study

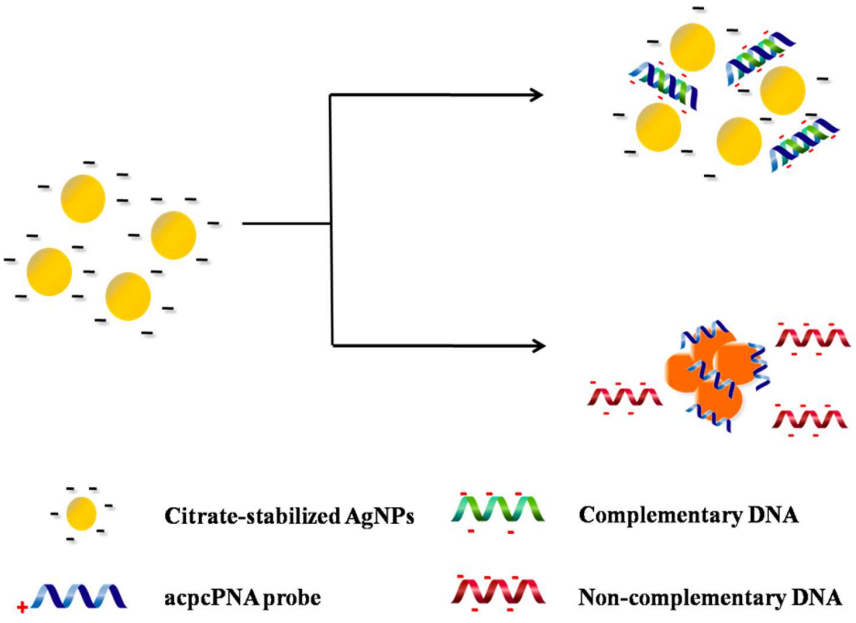
oligonucleotide	sequence (5′-3′)
MERS-CoV	
complementary DNA	5′-CGATTATGTGAAGAG-3′
two-base-mismatch	5′-CGATTATCTGAGGAG-3′
noncomplementary DNA	5′-TTCGCACAGTGGTCA-3′
MTB	
complementary DNA	5′-ATAACGTGTTTCTTG-3′
single-base-mismatch	5′-ATAACGTCTTTCTTG-3′
noncomplementary DNA 1	5′-TGGCTAGCCGCTCCT-3′
noncomplementary DNA 2	5′-CACTTGCCTACACCA-3′
HPV	
complementary DNA (HPV type 16)	5′-GCTGGAGGTGTATG-3′
noncomplementary DNA 1 (HPV type 18)	5′-GGATGCTGCACCGG-3′
noncomplementary DNA 2 (HPV type 31)	5′-CCAAAAGCCCAAGG-3′
noncomplementary DNA 3 (HPV type 33)	5′-CACATCCACCCGCA-3′

Scheme 1. (A) Design and (B) Operation of Multiplex Paper-Based Colorimetric Device



DOI: 10.1021/acs.analchem.7b00255
Anal. Chem. 2017, 89, 5428−5435

Scheme 2. Process of acpcPNA-Induced AgNP Aggregation in the Presence of DNA_{com} and DNA_{nc}



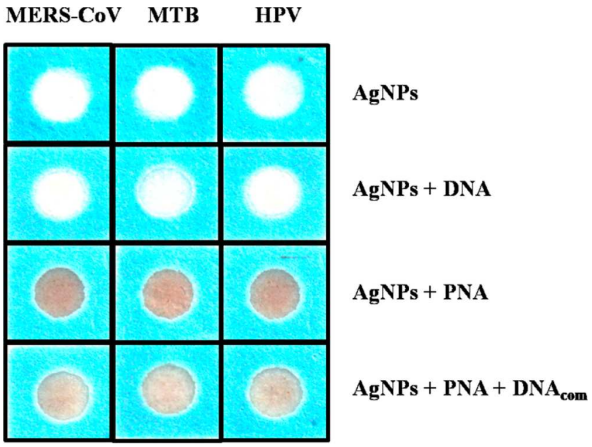


Figure 1. Photograph of visual color changes obtained from detection of MERS-CoV, MTB, and HPV in the presence of DNA_{com}.

sequence. When the hybridization of probe and target DNA occurs, the AgNPs aggregate and change color.[33,34] The assay principal has been further adopted using charge-neutral peptide nucleic acids (PNA)[40,41] as the hybridization agent. PNA causes aggregation of metal nanoparticles in solution without immobilization, thus, simplifying the assay.[42,43] Finally, PNA-based nanoparticle aggregation assays also provide a high hybridization efficiency of PNA-DNA duplexes leading to a rapid color change.[43]

Recently, Vilaivan's group proposed a new conformationally constrained pyrrolidinyl PNA system which possesses an α,β-peptide backbone derived from D-proline/2-aminocyclopentanecarboxylic acid (known as acpcPNA).[44,45] Compared to Nielsen's PNA,[40] acpcPNA exhibits a stronger affinity and higher sequence specificity binding to DNA. acpcPNA exhibits the characteristic selectivity of antiparallel binding to the target DNA and low tendency to self-hybridize. Moreover, the nucleobases and backbone of acpcPNA can be modified to increase molecular functionality. These combined properties make acpcPNA an attractive candidate as a probe for biological applications.[46−48]

Here, the multiplex colorimetric PAD for DNA detection based on the aggregation of AgNPs induced by acpcPNA is reported. acpcPNA bearing a positively charged lysine modification at C-terminus was designed as the probe. The cationic PNA probe can interact with the negatively charged AgNPs leading to nanoparticle aggregation and a significant color change. This proposed sensor was used for simultaneous detection of MERS-CoV, MTB, and HPV. The developed paper-based DNA sensor has potential as an alternative diagnostic device for simple, rapid, sensitive, and selective DNA/RNA detection.

EXPERIMENTAL SECTION

Chemicals and Materials. Analytical grade reagents, including $AgNO_3$, $NaBH_4$, and sodium citrate from Sigma-Aldrich, KH_2PO_4 and KCl from Fisher Scientific, Na_2HPO_4 from Mallinckrodt, and NaCl from Macron, were used without further purification. A total of 18 M $\Omega \cdot cm^{-1}$ resistance water was obtained from a Millipore Milli-Q water system. Synthetic DNA oligonucleotides were obtained from Biosearch Technologies. The sequences of DNA oligonucleotides are shown in Table 1.

Synthesis of AgNPs. The AgNPs were synthesized using the citrate-stabilization method.[49] Briefly, 4 mL of 12.6 mM sodium citrate and 50 mL of 0.3 mM $AgNO_3$ were mixed together. Then, 1 mL of 37 mM $NaBH_4$ was added to the mixture under vigorous stirring and the solution turned yellow. The formation of AgNPs and their size distribution were verified by dynamic light scattering measurement, and the average size of AgNPs was found to be 19 nm (Figure S1).

Synthesis of acpcPNA Probes. The acpcPNA probes were designed to detect the synthetic oligonucleotide targets

DOI: 10.1021/acs.analchem.7b00255
Anal. Chem. 2017, 89, 5428−5435

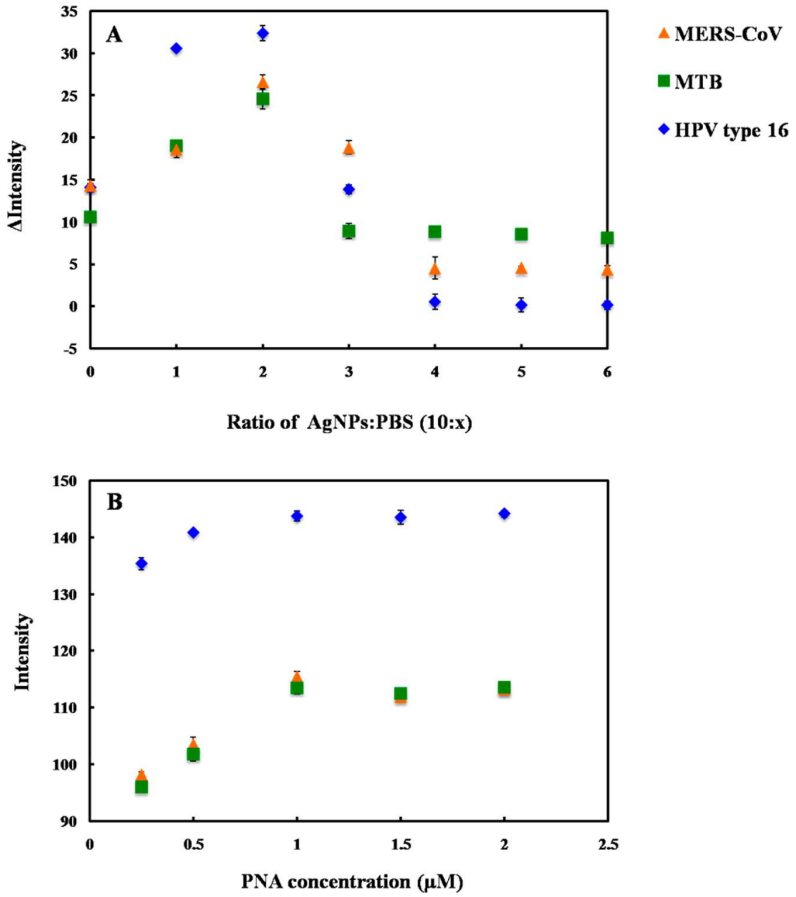


Figure 2. Influence of (A) AgNPs/PBS ratio and (B) acpcPNA probe concentration on color intensity for MERS-CoV, MTB, and HPV detection. The error bars represent one standard deviation (SD) obtained from three independent measurements (n = 3).

with sequences corresponding to MERS-CoV, MTB, and HPV type 16. The sequences of acpcPNA probes are as follows:

MERS-CoV: CTCTTCACATAATCG-LysNH_2

MTB: CAAGAAACACGTTAT-LysNH_2

HPV type 16: CATACACCTCCAGC-LysNH_2

*(written in the N → C direction)

The acpcPNA probe was synthesized by solid-phase peptide synthesis using Fmoc chemistry, as previously described.[44] At the C-terminus, lysinamide was included as a positively charged group that could induce nanoparticle aggregation. All PNA were purified by reverse-phase HPLC (C18 column, 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA) in H_2O−MeOH gradient). The identity of the acpcPNA was verified by MALDI-TOF MS analysis (Figure S2), and the purity was confirmed to be >90% by reverse-phase HPLC.

Design and Operation of Paper-Based Multiplex DNA Sensor. A wax-printing technique was used to create PADs.[50] The sensor was designed using Adobe Illustrator. The wax colors were selected to be complementary to the colorimetric reactions to enhance visualization. For paper-based device fabrication, the wax design was printed onto Whatman grade 1 filter paper (VWR) using a wax printer (Xerox Phaser 8860). The wax pattern was subsequently melted at 175 °C for 50 s to generate the hydrophobic barriers and hydrophilic channels. The sensor was based on Origami concept consisting of two layers.[51,52] As shown in Scheme 1A, the base layer contains four wax-defined channels extending outward from the sample reservoir (6 mm i.d.) and the top layer contains four detection and control zones (4 mm i.d.). Scheme 1B illustrates operation of the multiplex sensor. First, the sample reservoir of the top layer was punched to provide a solution connection directly from the top to the bottom layer, and then the device was assembled by folding the top layer over the base layer to create the three-dimension origami paper-based device. A polydimethylsiloxane (PDMS) lid was used for holding the two layers together. The lid consisting of one 6 mm diameter hole over the sample reservoir and eight 4 mm diameter holes over the colorimetric detection and control zones was aligned over the device to provide consistent pressure across the surface of the device. Next, the acpcPNA probe and AgNPs solution were added onto the detection and control zones. Finally, the sample solution was added onto the sample reservoir and flow through the channels to wet the colorimetric detection zones.

Colorimetric Detection of MERS-CoV, MTB, and HPV DNA Target. According to the concept of PNA-induced AgNPs aggregation,[42,43] acpcPNA was designed as a specific probe for quantitative detection of synthetic MERS-CoV, MTB, and HPV DNA targets. For colorimetric detection, the detection zone was prepared by adding 10 μL of AgNPs in 0.1 M phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 in a ratio of 5:1 (AgNPs: PBS), followed by 1 μL of specific acpcPNA probe. Control zones were prepared using the same conditions as the colorimetric

DOI: 10.1021/acs.analchem.7b00255
Anal. Chem. 2017, 89, 5428−5435

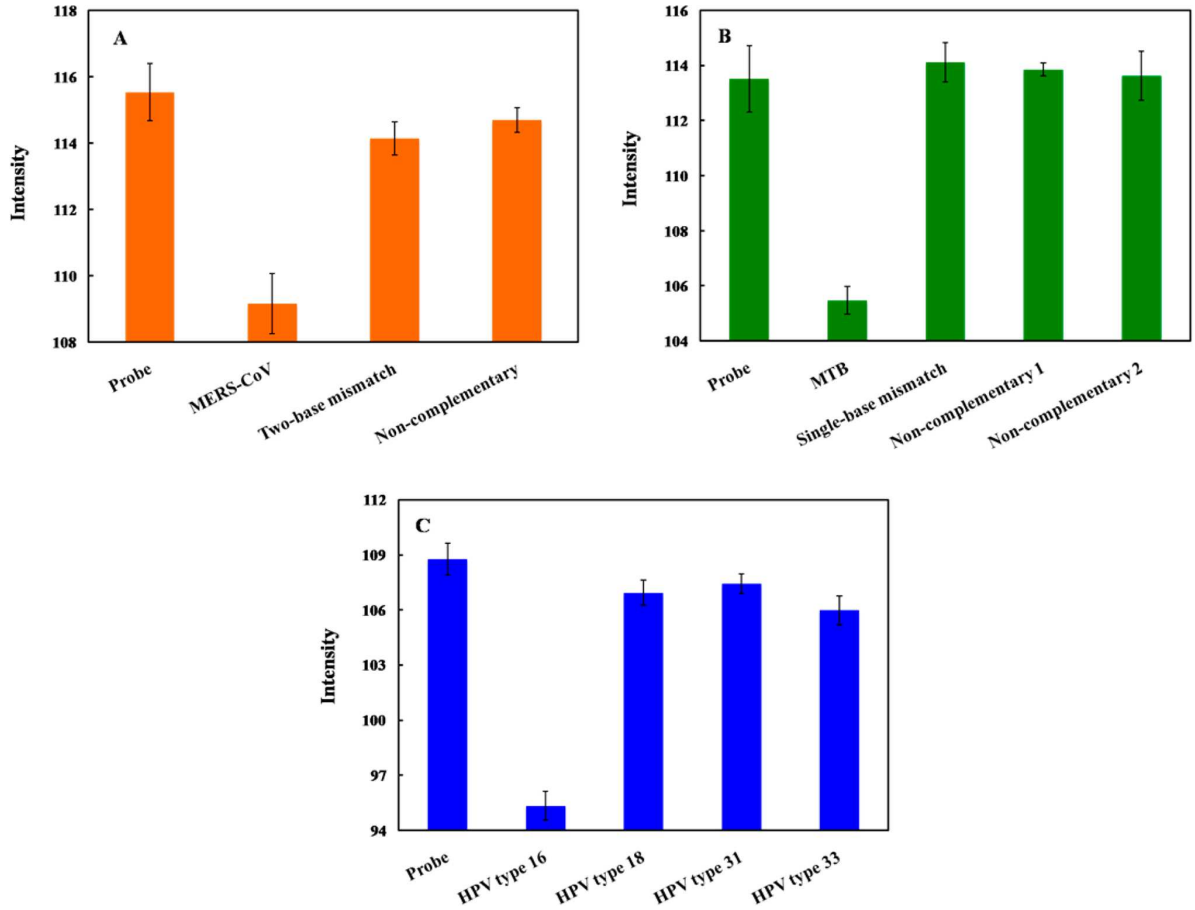


Figure 3. Color intensity of (A) MERS-CoV, (B) MTB, and (C) HPV detection after hybridization of DNA_{m1}, DNA_{m2}, and DNA_{nc}. The error bars represent one standard deviation (SD) obtained from three independent measurements (n = 3).

detection zones. Next, 25 μL of DNA target was added to the open sample reservoir. Upon sample addition, solution moved outward through the channels to wet the colorimetric detection zone of the top layer. Finally, the AgNPs aggregation occurred and the color intensity was measured.

Image Processing. The detection images were recorded using a scanner (XEROX DocuMate 3220) and saved in JPEG format at 600 dpi. ImageJ software (National Institutes of Health) was used to analyze the mean intensity of the color for each colorimetric reaction zone by applying a color threshold window for removing the blue background. Images were then inverted, and the mean intensity was measured.[20,53]

RESULTS AND DISCUSSION

acpcPNA-Induced AgNPs Aggregation. The process of acpcPNA-induced AgNPs aggregation is shown in Scheme 2. The anionic AgNPs are initially well dispersed due to electrostatic repulsion. On addition of the cationic acpcPNA, the electrostatic repulsion is shielded, resulting in nanoparticle aggregation. When complementary DNA (DNA_{com}) is present, the specific PNA–DNA interaction outcompetes the less specific PNA–AgNPs interaction, resulting in a negatively charged PNA–DNA_{com} duplex and deaggregation of the anionic nanoparticles. Upon addition of noncomplementary DNA (DNA_{nc}), the acpcPNA should remain bound to the AgNPs and no color change occurs. To prove the concept, we designed and synthesized acpcPNA probes to detect synthetic oligonucleotide targets with sequences corresponding to MERS-CoV, MTB, and HPV type 16. The photographs of the results are shown in Figure 1. The yellow AgNPs turned red when the acpcPNA was added. When the solution contained of the acpcPNA and DNA_{nc}, the color also changed to red due to aggregation of the AgNPs. On the other hand, the color changed from red (aggregated) to yellow (nonaggregated) in the presence of DNA_{com}, with the intensity dependent on the DNA concentration. Next, the sequence of adding the PNA probe and DNA target was investigated. As shown in Figure S3, when equimolar DNA_{com} was added either before or after the addition of acpcPNA probe into the AgNPs, the same color intensities were obtained indicating that the sequence of adding acpcPNA and DNA_{com} did not impact the final signal.

Critical Coagulation Concentration (CCC). The influence of electrolyte solution on the aggregation behavior of citrate-stabilized AgNPs was investigated based on the CCC.[54] The CCC represents the electrolyte concentration required to cause aggregation of the nanoparticles in the absence of acpcPNA. In Figure S4, the color intensity of citrate-stabilized AgNPs in the absence of acpcPNA probe is shown as a function of NaCl concentration. The intensity and, therefore, the degree of aggregation, increased with the concentration of NaCl,

DOI: 10.1021/acs.analchem.7b00255
Anal. Chem. 2017, 89, 5428–5435

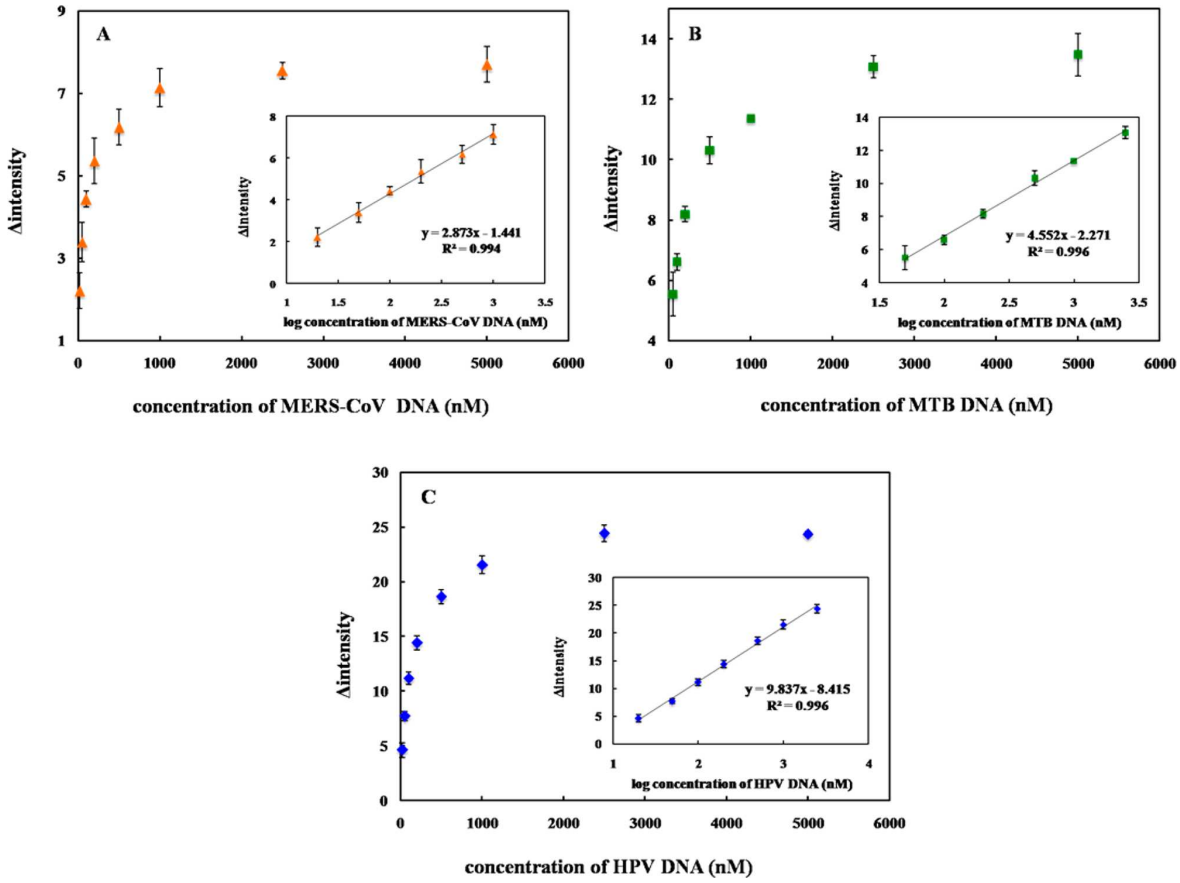


Figure 4. Change of probe color intensity vs DNA target concentration (ΔI) and calibration graph between ΔI and log DNA target concentration (inset) for (A) MERS-CoV, (B) MTB, and (C) HPV detection. The error bars represent standard deviation (SD) obtained from three independent measurement (n = 3).

Table 2. Summarized Analytical Performance of the Multiplexed 3DPAD for Colorimetric DNA Assay

DNA target	linearity (nM)	LOD (nM)	%RSD (n = 3)
MERS-CoV	20−1000	1.53	0.17−0.50
MTB	50−2500	1.27	0.12−0.67
HPV	20−2500	1.03	0.43−0.93

indicating that increasing ionic strength led to enhanced aggregation.[55] We believe that the ionic strength can decrease the electrostatic repulsion of citrate-stabilized AgNPs as a result of shielding, accelerating the AgNPs aggregation. The CCC was obtained when the degree of aggregation reached a maximum and became independent of NaCl concentration. In this experiment, the CCC of citrate-stabilized AgNPs was found to be 30 mM. Above this concentration, PNA-induced aggregation was not observed.

Optimization of Assay Parameters. For a colorimetric assay based on acpcPNA-induced AgNPs aggregation, assay parameters including 0.1 M PBS (pH 7.4) ratio and acpcPNA concentration were optimized using a simple paper-based design. The degree of AgNPs aggregation was determined by measuring the color intensity of the resulting solution in the presence of acpcPNA without target DNA. First, the impact of the PBS concentration on AgNPs aggregation was measured. The differential color intensity (Δ intensity, ΔI) obtained before and after addition of acpcPNA as a function of AgNPs to PBS ratio is shown in Figure 2A. ΔI increased until the ratio of AgNPs/PBS reached 5:1 and then decreased until it plateaued at 5:2. Thus, the ratio of 5:1 AgNPs/PBS was selected as the optimal condition because it gave the largest ΔI. Another important aspect for the DNA assay is probe concentration. The influence of acpcPNA probe concentration on absolute intensity was studied. As shown in Figure 2B, the acpcPNA concentration was varied within a range of 0−2.5 μM, and the highest aggregation was obtained at the concentration of 1.0 μM. At this concentration, the aggregation became independent of acpcPNA concentration, which was desirable for simplifying the assay. Higher concentrations of AgNPs were not tested in order to minimize reagent consumption. As a result, the optimal conditions consisting of AgNPs/PBS ratio of 5:1 and acpcPNA concentration of 1.0 μM were selected for further experiments.

Selectivity of MERS-CoV, MTB, and HPV Detection. To investigate the selectivity of this system, the color intensity obtained from the DNA_{com} of MERS-CoV, MTB, and HPV was compared to that of single-base mismatch (DNA_{m1}), two-base mismatch (DNA_{m2}), and DNA_{nc} sequences. The color intensity decreased significantly in the presence of DNA_{com}; whereas, the intensity did not change for the mismatched and noncomplementary targets (Figure 3). We believe the affinity of PNA−DNA hybridization was reduced due to the contribution of one- and two-base mismatches, leaving free PNA to aggregate

DOI: 10.1021/acs.analchem.7b00255
Anal. Chem. 2017, 89, 5428−5435

the nanoparticles. PNA−DNA_{com} complex can retard the ability of PNA to induce AgNPs aggregation as discussed above and result in different color intensities. These results suggest that the fully complementary DNA selectively hybridized the acpcPNA probe and yielded measurable signals. In addition, bovine serum albumin (BSA), which is commonly used in cell culture protocols, was used to investigate the protein interference of the proposed system. The DNA target was prepared in the presence of 3% BSA solution. It was observed that the color intensities of the DNA targets for MERS-CoV, MTB, and HPV in 3% BSA solution were statistically identical to the ones without BSA (Figure S5). Hence, common proteins should not negatively affect the analysis of this system.

Analytical Performance. To assess the sensitivity of the proposed method for DNA quantification, the intensity as a function of the target DNA concentration was determined. The color intensity decreases with the target DNA concentration. The calibration curves for each species are shown in Figure 4A, B, and C for MERS-CoV, MTB, and HPV, respectively. The linear range for each DNA target using a logarithmic DNA concentration and color intensity (Figure 4, inset) was also obtained. The analytical performances for all three DNA targets are summarized in Table 2. It can be seen that a sufficiently low detection limit could be obtained for MERS-CoV, MTB, and HPV detection without the need for multiple PCR cycles. Moreover, this multiplex system can provide sensitive and selective detection for simultaneous analysis of multiple DNA targets in a single device, which simplifies the analysis compared to traditional diagnostics.[9,56−59]

Device Design. Next, a multiplex device (Scheme 1) was designed for simultaneous detection of MERS-CoV, MTB, and HPV. The top layer contained four detection zones and four control zones. Each zone contained AgNPs with a single acpcPNA probe to provide selectivity for DNA. The base layer contained four wax-defined channels extending outward from a sample inlet. After the device was folded and stacked together, the channels of the base layer were connected to four detection zones of the top layer. Upon sample addition, the solution moved outward through the channels of the base layer to wet the colorimetric detection zones of the top layer and lead to color change. Figure 5 illustrates the ability of the proposed sensor for detection of 100 nM MERS-CoV, MTB, and HPV. Only the colorimetric detection zones that contained the selective probes changed color compared to their control zones. This result indicated that the multiplex paper-based colorimetric sensor is promising for simultaneous determination of MERS-CoV, MTB, and HPV.

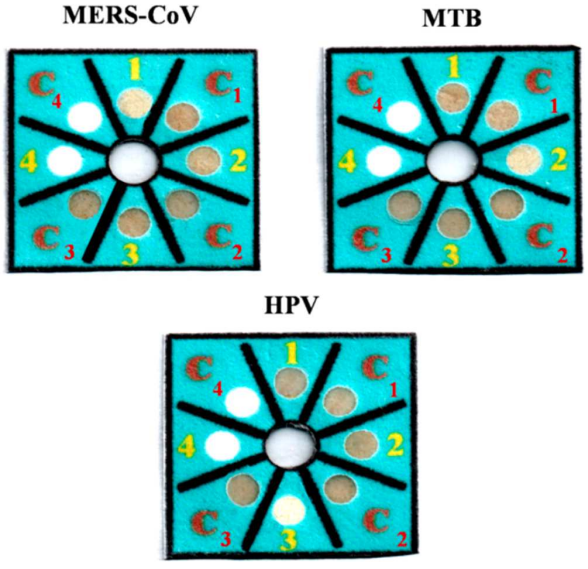


Figure 5. Selectivity of 100 nM MERS-CoV, MTB, and HPV detection using multiplex colorimetric PAD (1, C_1= AgNPs + MERS-CoV acpcPNA probe; 2, C_2 = AgNPs + MTB acpcPNA probe; 3, C_3 = AgNPs + HPV acpcPNA probe).

CONCLUSIONS

A multiplex colorimetric PAD was developed for simultaneous detection of DNA associated with viral and bacterial infectious diseases, including Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV), *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), and human papillomavirus (HPV). AgNPs were used as a colorimetric reagent for DNA detection based on acpcPNA-induced nanoparticle aggregation. This colorimetric DNA sensor exhibited high selectivity against single-base mismatch, two-base mismatch and noncomplementary target DNA. Under the optimized condition, the limit of detection for MERS-CoV, MTB, and HPV were found to be 1.53, 1.27, and 1.03 nM, respectively. As a result, this developed multiplex colorimetric PAD could be a low-cost and disposable alternative tool for rapid screening and detecting in infectious diagnostics.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.analchem.7b00255.

Supporting Figures S1−S5 (PDF).

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*E-mail: chuck.henry@colostate.edu.
*E-mail: corawon@chula.ac.th.

ORCID

Charles S. Henry: 0000-0002-8671-7728

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

P.T. gratefully appreciates the financial supports from Thailand Graduate Institute of Science and Technology (TGIST 01-55-014) and The Thailand Research Fund (RTA5780005). C.S.H. acknowledges financial support from Colorado State University and the United States Department of Agriculture through the National Wildlife Research Center (1574000859CA). T.V. acknowledges technical assistance of Ms. Chotima Vilaivan (Organic Synthesis Research Unit, Chulalongkorn University) and the financial support from Thailand Research Fund (DPG5780002, to T.V.) for the PNA synthesis. The authors thank Dr. Yuanyuan Yang for assistance with manuscript editing. The authors also acknowledge important discussions with Dr. Christopher Ackerson surrounding the critical coagulation concentration.

DOI: 10.1021/acs.analchem.7b00255
Anal. Chem. 2017, 89, 5428−5435

REFERENCES

(1) Wei, F.; Lillehoj, P. B.; Ho, C.-M. *Pediatr. Res.* **2010**, *67*, 458−468.
(2) Smith, I. *Clin. Microbiol. Rev.* **2003**, *16*, 463−496.
(3) Burd, E. M. *Clin. Microbiol. Rev.* **2003**, *16*, 1−17.
(4) de Wit, E.; Rasmussen, A. L.; Falzarano, D.; Bushmaker, T.; Feldmann, F.; Brining, D. L.; Fischer, E. R.; Martellaro, C.; Okumura, A.; Chang, J.; Scott, D.; Benecke, A. G.; Katze, M. G.; Feldmann, H.; Munster, V. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110*, 16598−16603.
(5) Bhadra, S.; Jiang, Y. S.; Kumar, M. R.; Johnson, R. F.; Hensley, L. E.; Ellington, A. D. *PLoS One* **2015**, *10*, e0123126.
(6) Davies, P. D. O.; Pai, M. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* **2008**, *12*, 1226−1234.
(7) Steingart, K. R.; Ng, V.; Henry, M.; Hopewell, P. C.; Ramsay, A.; Cunningham, J.; Urbanczik, R.; Perkins, M. D.; Aziz, M. A.; Pai, M. *Lancet Infect. Dis.* **2006**, *6*, 664−674.
(8) Lee, J. J.; Suo, J.; Lin, C. B.; Wang, J. D.; Lin, T. Y.; Tsai, Y. C. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* **2003**, *7*, 569−574.
(9) Al-Zamel, F. A. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* **2009**, *7*, 1099−1108.
(10) Noordhoek, G. T.; Kolk, A. H.; Bjune, G.; Catty, D.; Dale, J. W.; Fine, P. E.; Godfrey-Faussett, P.; Cho, S. N.; Shinnick, T.; Svenson, S. B. *Journal of Clinical Microbiology* **1994**, *32*, 277−284.
(11) Yang, Y.-C.; Lu, P.-L.; Huang, S. C.; Jenh, Y.-S.; Jou, R.; Chang, T. C. *Journal of Clinical Microbiology* **2011**, *49*, 797−801.
(12) Lörincz, A.; Anthony, J. *Papillomavirus Report* **2001**, *12*, 145−154.
(13) Gravitt, P. E.; Jamshidi, R. *Infectious Disease Clinics of North America* **2005**, *19*, 439−458.
(14) Martinez, A. W.; Phillips, S. T.; Butte, M. J.; Whitesides, G. M. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 1318−1320.
(15) Cate, D. M.; Adkins, J. A.; Mettakoonpitak, J.; Henry, C. S. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 19−41.
(16) Yetisen, A. K.; Akram, M. S.; Lowe, C. R. *Lab Chip* **2013**, *13*, 2210−2251.
(17) Adkins, J.; Boehle, K.; Henry, C. *Electrophoresis* **2015**, *36*, 1811−1824.
(18) Mettakoonpitak, J.; Boehle, K.; Nantaphol, S.; Teengam, P.; Adkins, J. A.; Srisa-Art, M.; Henry, C. S. *Electroanalysis* **2016**, *28*, 1420−1436.
(19) Nery, E. W.; Kubota, L. T. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405*, 7573−7595.
(20) Rattanarat, P.; Dungchai, W.; Cate, D.; Volckens, J.; Chailapakul, O.; Henry, C. S. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 3555−3562.
(21) Liana, D. D.; Raguse, B.; Gooding, J. J.; Chow, E. *Sensors* **2012**, *12*, 11505.
(22) Apilux, A.; Siangproh, W.; Praphairaksit, N.; Chailapakul, O. *Talanta* **2012**, *97*, 388−394.
(23) Apilux, A.; Dungchai, W.; Siangproh, W.; Praphairaksit, N.; Henry, C. S.; Chailapakul, O. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 1727−1732.
(24) Chaiyo, S.; Siangproh, W.; Apilux, A.; Chailapakul, O. *Anal. Chim. Acta* **2015**, *866*, 75−83.
(25) Cate, D. M.; Nanthasurasak, P.; Riwkulkajorn, P.; L'Orange, C.; Henry, C. S.; Volckens, J. *Ann. Occup. Hyg.* **2014**, *58*, 413−423.
(26) Shim, S.-Y.; Lim, D.-K.; Nam, J.-M. *Nanomedicine* **2008**, *3*, 215−232.
(27) Baptista, P.; Pereira, E.; Eaton, P.; Doria, G.; Miranda, A.; Gomes, I.; Quaresma, P.; Franco, R. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 943−950.
(28) Zhao, W.; Brook, M. A.; Li, Y. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2363−2371.
(29) Thaxton, C. S.; Georganopoulou, D. G.; Mirkin, C. A. *Clin. Chim. Acta* **2006**, *363*, 120−126.
(30) Li, H.; Cui, Z.; Han, C. *Sens. Actuators, B* **2009**, *143*, 87−92.
(31) Vilela, D.; González, M. C.; Escarpa, A. *Anal. Chim. Acta* **2012**, *751*, 24−43.
(32) Wei, H.; Chen, C.; Han, B.; Wang, E. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 7051−7055.
(33) Lee, J.-S.; Lytton-Jean, A. K. R.; Hurst, S. J.; Mirkin, C. A. *Nano Lett.* **2007**, *7*, 2112−2115.
(34) Thompson, D. G.; Enright, A.; Faulds, K.; Smith, W. E.; Graham, D. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 2805−2810.
(35) Yeo, S. Y.; Lee, H. J.; Jeong, S. H. *J. Mater. Sci.* **2003**, *38*, 2143−2147.
(36) Chimentao, R. J.; Kirm, I.; Medina, F.; Rodriguez, X.; Cesteros, Y.; Salagre, P.; Sueiras, J. E. *Chem. Commun.* **2004**, 846−847.
(37) He, B.; Tan, J. J.; Liew, K. Y.; Liu, H. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2004**, *221*, 121−126.
(38) Abou El-Nour, K. M. M.; Eftaiha, A. a.; Al-Warthan, A.; Ammar, R. A. A. *Arabian J. Chem.* **2010**, *3*, 135−140.
(39) Iravani, S.; Korbekandi, H.; Mirmohammadi, S. V.; Zolfaghari, B. *Research in Pharmaceutical Sciences* **2014**, *9*, 385−406.
(40) Nielsen, P.; Egholm, M.; Berg, R.; Buchardt, O. *Science (Washington, DC, U. S.)* **1991**, *254*, 1497−1500.
(41) Egholm, M.; Buchardt, O.; Christensen, L.; Behrens, C.; Freier, S. M.; Driver, D. A.; Berg, R. H.; Kim, S. K.; Norden, B.; Nielsen, P. E. *Nature* **1993**, *365*, 566−568.
(42) Su, X.; Kanjanawarut, R. *ACS Nano* **2009**, *3*, 2751−2759.
(43) Kanjanawarut, R.; Su, X. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 6122−6129.
(44) Vilaivan, T.; Srisuwannaket, C. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1897−1900.
(45) Vilaivan, T. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 1645−1656.
(46) Jampasa, S.; Wonsawat, W.; Rodthongkum, N.; Siangproh, W.; Yanatatsaneejit, P.; Vilaivan, T.; Chailapakul, O. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *54*, 428−434.
(47) Kongpeth, J.; Jampasa, S.; Chaumpluk, P.; Chailapakul, O.; Vilaivan, T. *Talanta* **2016**, *146*, 318−325.
(48) Jirakittiwut, N.; Panyain, N.; Nuanyai, T.; Vilaivan, T.; Praneenararat, T. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 24110−24114.
(49) Laliwala, S. K.; Mehta, V. N.; Rohit, J. V.; Kailasa, S. K. *Sens. Actuators, B* **2014**, *197*, 254−263.
(50) Carrilho, E.; Martinez, A. W.; Whitesides, G. M. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 7091−7095.
(51) Liu, H.; Crooks, R. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 17564−17566.
(52) Liu, H.; Xiang, Y.; Lu, Y.; Crooks, R. M. *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 7031−7034.
(53) Mentele, M. M.; Cunningham, J.; Koehler, K.; Volckens, J.; Henry, C. S. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 4474−4480.
(54) Huynh, K. A.; Chen, K. L. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, *45*, 5564−5571.
(55) Li, X.; Lenhart, J. J.; Walker, H. W. *Langmuir* **2010**, *26*, 16690−16698.
(56) Shirato, K.; Yano, T.; Senba, S.; Akachi, S.; Kobayashi, T.; Nishinaka, T.; Notomi, T.; Matsuyama, S. *Virol. J.* **2014**, *11*, 139−139.
(57) Azhar, E. I.; Hashem, A. M.; El-Kafrawy, S. A.; Sohrab, S. S.; Aburizaiza, A. S.; Farraj, S. A.; Hassan, A. M.; Al-Saeed, M. S.; Jamjoom, G. A.; Madani, T. A. *mBio* **2014**, *5*, e01450.
(58) Abreu, A. L. P.; Souza, R. P.; Gimenes, F.; Consolaro, M. E. L. *Virol. J.* **2012**, *9*, 262−262.
(59) Villa, L. L.; Denny, L. *Int. J. Gynecol. Obstet.* **2006**, *94*, S71−S80.

DOI: 10.1021/acs.analchem.7b00255
Anal. Chem. 2017, 89, 5428−5435

Bioconjugate Chemistry

Article

pubs.acs.org/bc

Hydrophilic and Cell-Penetrable Pyrrolidinyl Peptide Nucleic Acid via Post-synthetic Modification with Hydrophilic Side Chains

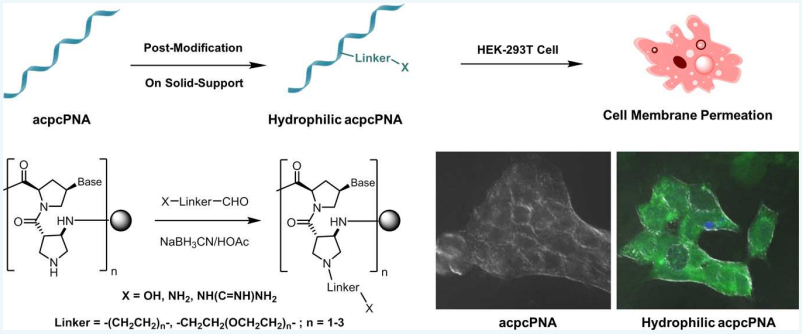
Haruthai Pansuwan,[†] Boonsong Ditmangklo,[‡] Chotima Vilaivan,[‡] Banphot Jiangchareon,[§] Porntip Pan-In,[∥] Supason Wanichwecharungruang,[∥] Tanapat Palaga,[⊥] Thanesuan Nuanyai,[*,#] Chaturong Suparpprom,[*,†] and Tirayut Vilaivan[‡]

[†]Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Naresuan University, Ta-Po District, Muang, Phitsanulok 65000, Thailand

[‡]Organic Synthesis Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, [§]Program in Biotechnology, Faculty of Science, [∥]Department of Chemistry, Faculty of Science, and [⊥]Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand

[#]Rajamankala University of Technology Rattanakosin, Wang Klai Kangwon Campus, Huahin, Prachuap Khiri Khan 77110, Thailand

Supporting Information



ABSTRACT: Peptide nucleic acid (PNA) is a nucleic acid mimic in which the deoxyribose−phosphate was replaced by a peptide-like backbone. The absence of negative charge in the PNA backbone leads to several unique behaviors including a stronger binding and salt independency of the PNA−DNA duplex stability. However, PNA possesses poor aqueous solubility and cannot directly penetrate cell membranes. These are major obstacles that limit in vivo applications of PNA. In previous strategies, the PNA can be conjugated to macromolecular carriers or modified with positively charged side chains such as guanidinium groups to improve the aqueous solubility and cell permeability. In general, a preformed modified PNA monomer was required. In this study, a new approach for post-synthetic modification of PNA backbone with one or more hydrophilic groups was proposed. The PNA used in this study was the conformationally constrained pyrrolidinyl PNA with prolyl-2-amino-cyclopentanecarboxylic acid dipeptide backbone (acpcPNA) that shows several advantages over the conventional PNA. The aldehyde modifiers carrying different linkers (alkylene and oligo(ethylene glycol)) and end groups (−OH, $-NH_2$, and guanidinium) were synthesized and attached to the backbone of modified acpcPNA by reductive alkylation. The hybrids between the modified acpcPNAs and DNA exhibited comparable or superior thermal stability with base-pairing specificity similar to those of unmodified acpcPNA. Moreover, the modified apcPNAs also showed the improvement of aqueous solubility (10−20 folds compared to unmodified PNA) and readily penetrate cell membranes without requiring any special delivery agents. This study not only demonstrates the practicality of the proposed post-synthetic modification approach for PNA modification, which could be readily applied to other systems, but also opens up opportunities for using pyrrolidinyl PNA in various applications such as intracellular RNA sensing, specific gene detection, and antisense and antigene therapy.

INTRODUCTION

Peptide nucleic acid (PNA) is an interesting DNA mimic that shows very strong and sequence-specific hybridization to complementary single-stranded DNA and RNA as well as to double-stranded DNA by triplex formation or duplex invasion.[1] These properties, together with excellent resistance to nucleases and proteases, make PNA useful for antigene and antisense therapy, as tool for molecular biology, and as probe for DNA- or RNA-based diagnosis.[2,3] The structure of PNA is chemically very different from DNA, whereby the deoxyribose phosphodiester

Received: June 3, 2017
Revised: July 7, 2017
Published: July 13, 2017

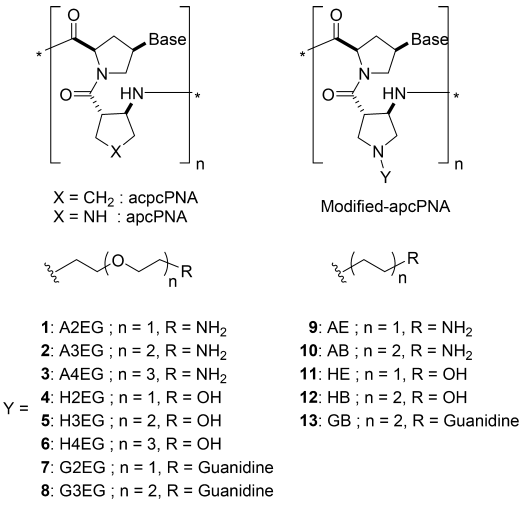
ACS Publications © XXXX American Chemical Society

DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00308
Bioconjugate Chem. XXXX, XXX, XXX−XXX

backbone of DNA was replaced by a peptide-like backbone. Following the original design of *N*-2-aminoethylglycine (aeg) PNA backbone,[4] several other PNA structures have been proposed such as cyclopentyl,[5] cyclohexyl,[6] γ-position,[7] pyrrolidinyloxy-,[8] pyrrolidine−amide oligonucleotide mimics,[9] and pyrrolidinyl PNA with alternating proline and cyclic β-amino acids.[10−12] These new PNAs displayed varying DNA binding affinities and selectivities, but only a few of them outperformed the original aegPNA, with γ-PNA[7] and certain pyrrolidinyl PNA (acpcPNA[13] and acbcPNA)[14] as the most-notable examples. Although several applications of PNA have been demonstrated, one practical limitation that prevents widespread acceptance of PNA in various applications is its poor aqueous solubility relative to DNA as well as the tendency to exhibit nonspecific interactions with nonpolar molecules such as proteins and organic dyes.[15] In addition, unmodified PNAs are not readily cell-penetrable,[16] although lipophilic PNA can be delivered into cells using cationic lipids[17,18] or amphipathic peptides[19] as carriers. Alternatively PNA has been also conjugated to macromolecules such cell-penetrating peptides (CPP),[20,21] polyethylene glycol (PEG),[22] or DNA[23−26] to improve the solubility along with the cellular membrane penetration. Other approaches to improving aqueous solubility and cellular uptake of PNA oligomers include terminal or internal modification with charged or hydrophilic moieties such as lysine or arginine.[27,28] For example, γPNA bearing a diethylene glycol side chain ($^{R\text{-}MP}$γPNA)[15] showed improved DNA and RNA hybridization and water solubility compared to the original PNA. Modification of γPNA with cationic guanidinium group enables the PNA to traverse cell membrane[28] and has been used for targeting epidermal growth factor receptor (EGFR) in preclinical models.[29] Modified aegPNA carrying aminomethylene[30] or aminopropylene groups[31] at α- or γ-positions have been recently reported. These amino-modified PNA showed enhanced DNA affinity due to the combination of electrostatic interaction and stereopreferred conformational preorganization and could also penetrate cells such as HeLa or MCF-7. Although displaying several favorable properties,[10] the hydrophobic nature of acpcPNA contributes to its poor aqueous solubility (at least one order of magnitude less soluble than aegPNA,[15] even with the inclusion of C-terminal lysine as a solubility enhancer). In addition, similar to other PNAs, unmodified acpcPNA is non-cell-permeable, and therefore, an external carrier such as carbon nanospheres[32] or a commercial transfecting agent[33] is required to deliver acpcPNA for cellular applications. Accordingly, a reliable modification that can increase both water solubility and cellular uptake of acpcPNA is highly desirable. Recently, we reported the synthesis and the DNA- and RNA-binding properties of pyrrolidinyl PNA-carrying polar backbone by the replacement of the cyclopentane ring in the backbone of acpcPNA with tetrahydrofuran (atfcPNA),[34] oxetane (aocPNA),[35] or pyrrolidine (apcPNA) moieties.[36,37] Among these modifications, the apcPNA bearing a pyrrolidine ring in place of the cyclopentane ring in acpcPNA is the most promising in terms of DNA-binding affinity. Importantly, the nitrogen atom of the pyrrolidine ring in the apc spacer provide a convenient handle for attaching label or other functional groups to the PNA backbone via acylation, reductive alkylation, or click chemistry.[38]

In this study, we report the synthesis and DNA-binding properties of novel hydrophilic backbone-modified pyrrolidine PNA. The hydrophilic modifiers with different end groups (−OH, $-NH_2$, and guanidine) were attached to the backbone of pyrrolidinyl PNA via an alkylene or oligo(ethylene glycol) linker by reductive alkylation of the apc backbone, as shown in Scheme 1. Furthermore, water solubility and in vitro cellular uptake of modified PNA were also investigated.

Scheme 1. Structures of acpcPNA, apcPNA, and Hydrophilic Modified Pyrrolidinyl PNA



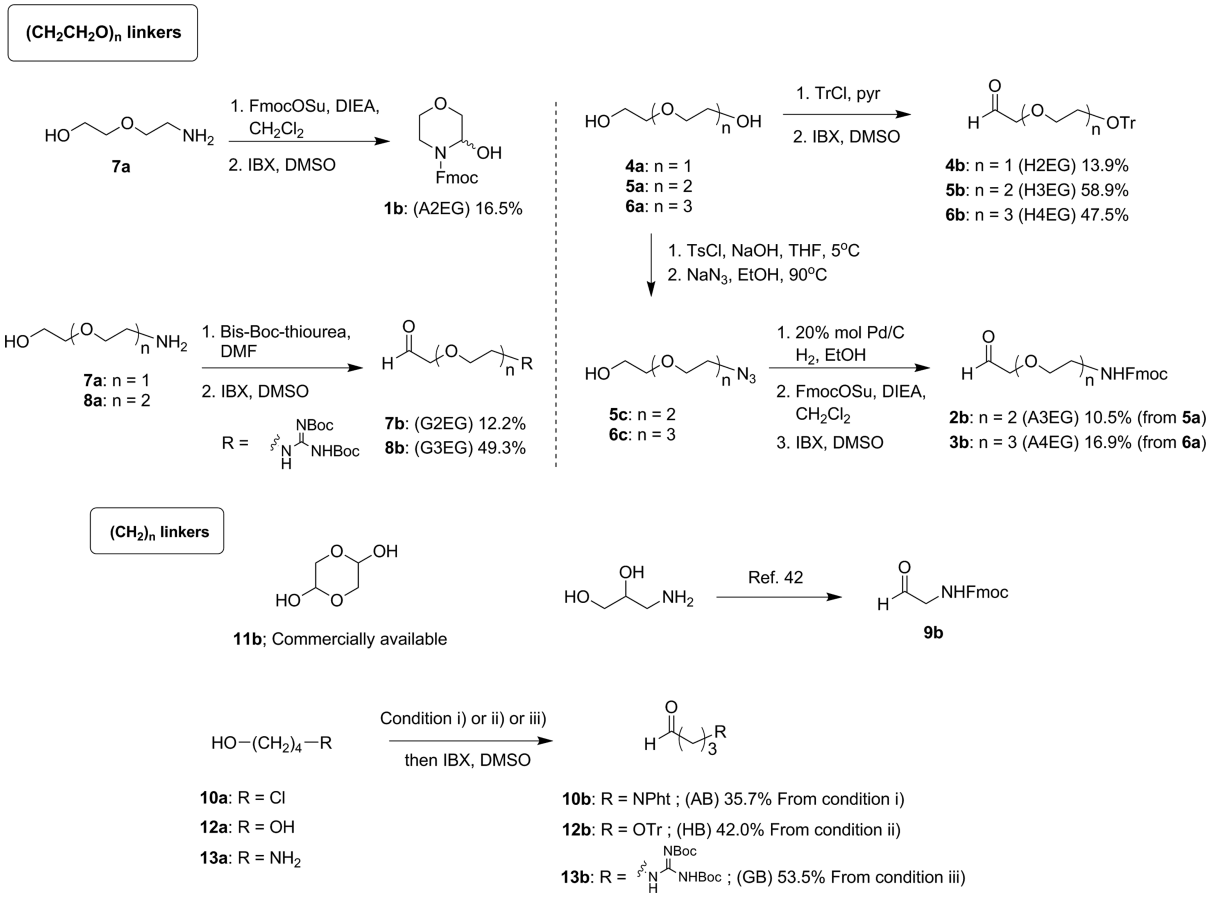
RESULTS AND DISCUSSION

Synthesis of Hydrophilic Modifiers and Modification of PNA. The preparation of all hydrophilic modifiers started form commercially available α,ω-alkanediols (ethylene glycol and 1,4-butanediol) or oligo(ethylene glycol) (n = 2−4) (Scheme 2). Monoamino derivatives of oligo(ethylene glycol) were prepared by treatment of the parent diols with limited amounts of *p*-toluenesulfonyl chloride (TsCl), and the monotosylate was subsequently reacted with NaN_3 to afford the corresponding azido-alcohol derivatives (**5c** and **6c**) following a modified literature protocol.[39] Hydrogenation over Pd/C catalyst followed by protection with Fmoc−OSu gave the corresponding *N*-Fmoc−amino alcohols. These were subsequently oxidized with 2-iodoxybenzoic acid (IBX) to get the desired novel Fmoc-protected amino aldehydes (**2b** and **3b**). Compound **1b** was synthesized starting from the commercially available 2-aminoethoxyethanol (**7a**) via Fmoc protection and oxidation.[40] ^{1}H nuclear magnetic resonance (NMR) suggested that this is a cyclized product, but this compound underwent subsequent reductive alkylation without problems, presumably due to the presence of acetic acid in the reaction condition. However, Fmoc- or Boc-protected amino-C4 aldehyde could not be cleanly obtained by this procedure. The problem was solved by employing the phthalimido group, which completely blocked the nitrogen atom from the subsequent cyclization reaction. According to this method, 4-chloro-1-butanol was first reacted with phthalimide to give the known phthalimido alcohol[41] and then subsequently oxidized to phthalimido aldehyde (**10b**)[41] with IBX. The Fmoc-protected amino-C2 modifier (Fmoc−aminoacetaldehyde; **9b**) was prepared from 3-amino-1,2-propanediol according to a literature procedure.[42]

The guanidine derivatives (**7b**, **8b**, and **13b**)[43] were synthesized by the reaction of amino alcohol and bis-Boc−thiourea[44] followed by IBX oxidation. For the hydroxyl derivatives, alkanediol or poly(ethylene glycol) were protected with trityl chloride (TrCl) in pyridine under N_2 atmosphere to get the

DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00308
Bioconjugate Chem. XXXX, XXX, XXX−XXX

Scheme 2. Synthesis of Hydrophilic Modifiers[a]



[a]Reagents and conditions: (i) phthalimide, K_2CO_3, DMF; (ii) TrCl, pyridine, CH_2Cl_2; (iii) Bis-Boc−thiourea, DMF.

monoprotected diols by employing large excess of the diols.[45,46] Oxidation of the alcohols in DMSO afforded the novel trityloxy-aldehyde derivatives (**4b**, **5b**, and **12b**)[45] ready for attachment to the backbone of acpcPNA. Due to the instabilities of the aldehydes, some needed to be freshly prepared and used directly without further purification. The details of synthesis are reported in the Supporting Information. For the hydroxy-C2 modifier, the commercially available glycolaldehyde dimer (**11b**) was directly used as a masked aldehyde.

All PNAs were synthesized manually by Fmoc solid-phase peptide synthesis, as described previously.[12] To provide a handle for site-specific modification with the hydrophilic groups, the acpc spacer of the acpcPNA was site-specifically replaced with a Tfa-protected apc spacer.[36] The PNA sequence was end-capped by acetylation or benzoylation or with a fluorescence dye [5(6)-carboxyfluorescein]. Deprotection of the nucleobase side chain by ammonia treatment resulted in simultaneous deprotection of the Tfa group. This was followed by post-synthetic modification with the aldehyde-containing hydrophilic modifier via the reductive alkylation strategy previously reported by our group[38] then by an appropriate treatment for the removal of the protecting group of the modifier (none for Boc, piperidine in DMF for Fmoc, and 40% aqueous methylamine solution for Pht). Analyses of crude products suggest that the reductive alkylation step was practically quantitative. Subsequent cleavage from the solid support by treatment with trifluoroacetic acid (TFA) afforded 30 modified apcPNAs. The base sequences were either homothymine (T_9) or a mixed-base 10-mer sequence (GTAGATCACT). The number of modifier attached on the PNA sequence was varied between one and three per PNA sequence. The number and positions of the modification are arbitrarily chosen on the basis of the fact that multiple modifications are usually required to achieve cell permeability in other PNA systems[27,47] to preliminarily explore whether the same strategy can increase the cellular uptaking of acpcPNA. A total of three PNA sequences with the apc spacer but without hydrophilic modification were also prepared as controls. These modified apcPNAs were purified by reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC). All unlabeled PNA sequences gave a single peak in their analytical HPLC chromatograms (estimated purity of >90%). Fluorescein-labeled **PNA29**−**PNA33** carried two isomeric fluorescein labels, which should give the maximum of two peaks in the chromatogram. This is generally true except for **PNA29** and **PNA32**, whereby additional minor peaks were observed in the HPLC chromatograms. The identities of all PNA sequences were confirmed by matrix-assisted laser desorption−ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry, which showed the molecular ion peak that were in a good agreement with the expected values. The fact that MALDI-TOF analyses showed the correct mass for

DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00308
Bioconjugate Chem. XXXX, XXX, XXX−XXX

Table 1. Base Sequence, MALDI-TOF Spectrometric, and Thermal Melting Data of the Modified apcPNA

PNA	sequence (N → C)	modifier (X)	t_R min[a]	m/z (calcd)[b]	m/z (found)[c]	T_m[e,f] (°C)	ΔT_m[f,g] (°C)	T_m[e,h] (°C)	ΔT_m[g,h] (°C)
PNA1	Ac–TTTT$^{(NX)}$TTTTT–LysNH$_2$	none	36.2	3180.4	3180.3	77.7	–	71.9	–
PNA2	Ac–TTTT$^{(NX)}$TTTTT–LysNH$_2$	**A2EG**	34.6	3267.5	3268.3	79.7	+2.0	71.9	0.0
PNA3	Ac–TTTT$^{(NX)}$TTTTT–LysNH$_2$	**A3EG**	35.2	3311.5	3309.5	78.7	+1.0	72.9	+1.0
PNA4	Ac–TTTT$^{(NX)}$TTTTT–LysNH$_2$	**A4EG**	28.9	3355.5	3356.0	78.7	+1.0	70.9	−1.0
PNA5	Ac–TTTT$^{(NX)}$TTTTT–LysNH$_2$	**AE**	31.1	3224.4	3228.0	81.9	+4.2	73.8	+1.9
PNA6	Ac–TTTT$^{(NX)}$TTTTT–LysNH$_2$	**AB**	31.8	3251.5	3250.3	79.7	+2.0	71.9	0.0
PNA7	Ac–TTTT$^{(NX)}$TTTTT–LysNH$_2$	**H2EG**	34.8	3268.4	3266.4	71.9	−5.8	68.0	−3.9
PNA8	Ac–TTTT$^{(NX)}$TTTTT–LysNH$_2$	**H3EG**	30.7	3312.5	3314.5	70.9	−6.8	67.1	−4.8
PNA9	Ac–TTTT$^{(NX)}$TTTTT–LysNH$_2$	**H4EG**	36.5	3356.5	3355.5	70.9	−6.8	67.1	−4.8
PNA10	Ac–TTTT$^{(NX)}$TTTTT–LysNH$_2$	**HE**	32.9	3225.4	3228.5	71.5	−6.2	67.0	−4.9
PNA11	Ac–TTTT$^{(NX)}$TTTTT–LysNH$_2$	**HB**	31.9	3252.4	3253.5	71.9	−5.8	67.1	−4.8
PNA12	Ac–TTTT$^{(NX)}$TTTTT–LysNH$_2$	**G2EG**	29.8	3309.5	3313.4	79.7	+2.0	68.0	−3.9
PNA13	Ac–TTTT$^{(NX)}$TTTTT–LysNH$_2$	**G3EG**	28.6	3353.5	3351.6	79.7	+2.0	70.9	−1.0
PNA14	Ac–TTTT$^{(NX)}$TTTTT–LysNH$_2$	**GB**	33.2	3293.5	3293.6	80.6	+2.9	72.9	+1.0
PNA15	Bz–GTAGA$^{(NX)}$TCACT–LysNH$_2$	none	29.9	3621.9	3619.5	57.4	–	51.5	–
PNA16	Ac–GTAGA$^{(NX)}$TCACT–LysNH$_2$	**A3EG**	29.2	3690.9	3691.3	63.2	+5.8	55.4	+3.9
PNA17	Ac–GTAGA$^{(NX)}$TCACT–LysNH$_2$	**AE**	29.6	3603.8	3604.7	65.4	+8.0	58.4	+6.9
PNA18	Ac–GTAGA$^{(NX)}$TCACT–LysNH$_2$	**AB**	25.2	3630.9	3628.1	66.1	+8.7	58.3	+6.8
PNA19	Ac–GTAGA$^{(NX)}$TCACT–LysNH$_2$	**H3EG**	29.4	3691.9	3690.8	56.4	−1.0	53.5	+2.0
PNA20	Ac–GTAGA$^{(NX)}$TCACT–LysNH$_2$	**HE**	29.8	3604.8	3605.4	58.7	+1.3	54.2	+2.7
PNA21	Ac–GTAGA$^{(NX)}$TCACT–LysNH$_2$	**HB**	29.1	3631.9	3629.9	59.3	+1.9	53.5	+2.0
PNA22	Ac–GTAGA$^{(NX)}$TCACT–LysNH$_2$	**GB**	29.7	3672.9	3671.0	67.1	+9.7	58.3	+6.8
PNA23	Bz–GT$^{(NX)}$AGA$^{(NX)}$TCA$^{(NX)}$CT–LysNH$_2$	none	28.5	3623.9	3617.2	60.3	–	52.5	–
PNA24	Ac–GT$^{(NX)}$AGA$^{(NX)}$TCA$^{(NX)}$CT–LysNH$_2$	**A3EG**	27.0	3954.7	3955.9	74.8	+14.5	63.2	+10.7
PNA25	Ac–GT$^{(NX)}$AGA$^{(NX)}$TCA$^{(NX)}$CT–LysNH$_2$	**AB**	29.9	3775.2	3776.9	78.7	+18.4	65.1	+12.6
PNA26	Ac–GT$^{(NX)}$AGA$^{(NX)}$TCA$^{(NX)}$CT–LysNH$_2$	**H3EG**	28.5	3958.0	3958.4	58.3	−2.0	53.5	+1.0
PNA27	Ac–GT$^{(NX)}$AGA$^{(NX)}$TCA$^{(NX)}$CT–LysNH$_2$	**HB**	27.4	3778.0	3779.2	61.2	+0.9	54.4	+1.9
PNA28	Ac–GT$^{(NX)}$AGA$^{(NX)}$TCA$^{(NX)}$CT–LysNH$_2$	**GB**	26.9	3901.1	3898.6	78.7	+18.4	66.8	+14.3
PNA29	Flu–GT$^{(NX)}$AGA$^{(NX)}$TCA$^{(NX)}$CT–LysNH$_2$	**H3EG**	30.9	4274.3	4274.9	50.0	−10.3	46.7	−5.8
PNA30	Flu–GT$^{(NX)}$AGA$^{(NX)}$TCA$^{(NX)}$CT–LysNH$_2$	**A3EG**	30.7	4271.3	4271.8	67.1	+6.8	56.4	+3.9
PNA31	Flu–GT$^{(NX)}$AGA$^{(NX)}$TCA$^{(NX)}$CT–LysNH$_2$	**HB**	30.3	4094.2	4095.9	53.5	−6.8	48.6	−3.9
PNA32	Flu–GT$^{(NX)}$AGA$^{(NX)}$TCA$^{(NX)}$CT–LysNH$_2$	**AB**	30.6	4091.3	4089.5	70.0	+9.7	57.4	+4.9
PNA33	Flu–GT$^{(NX)}$AGA$^{(NX)}$TCA$^{(NX)}$CT–LysNH$_2$	**GB**	29.6	4217.3	4217.3	68.0	+7.7	56.4	+3.9

[a]HPLC conditions: C18 column, 4.6 × 150 mm, 3 μ, gradient 0.1% TFA in H_2O/MeOH 90:10 for 5 min then linear gradient to 10:90 over 30 min, flow rate 0.5 mL/min, 260 nm. [b]Average mass of M + H$^+$. [c]MALDI-TOF. [d]Isolated yield after HPLC purification, spectrophotometrically determined. [e]With complementary DNA (dA$_9$ for **PNA1**–**PNA14**; dAGTGATCTAC for **PNA15**–**PNA33**). [f]Conditions: 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.00, 0 mM NaCl, [PNA] = 1.0 μM, and [DNA] = 1.2 μM. [g]ΔT_m = T_m(modified PNA) − T_m(unmodified PNA). Unmodified PNA refers to apc-modified acpcPNA (X: none). [h]Conditions: 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.00, 100 mM NaCl, [PNA] = 1.0 μM, and [DNA] = 1.2 μM.

PNA29 and **PNA32** without other high-molecular-weight peaks suggests that the impurities are non-PNA related and should not interfere with the results. The sequences and characterization data of all modified acpcPNA successfully synthesized are summarized in Table 1.

Thermal Stability of Modified acpcPNA. Melting temperatures of the modified apcPNAs (**PNA1**–**PNA33**) are reported in Table 1. The simplest homothymine sequence (T$_9$) was chosen as a model sequence for initial studies. It should be noted that homothymine acpcPNA binds to DNA to form only duplexes, and not as triplexes as observed in aegPNA.[10] Thermal stability (T_m) of hybrids between the homothymine PNA singly modified with hydroxyl modifiers attached to various linkers (**PNA7**–**PNA11**) and their complementary DNA sequence (dA$_9$) were in the range of 70.9–71.9 °C at a low salt concentration (0 mM NaCl) and 67.0–68.0 °C at a high salt concentration (100 mM NaCl), which were approximately 4–7 °C lower than that of unmodified apc/acpcPNA (**PNA1**, 77.7 and 71.9 °C at 0 and 100 mM NaCl, respectively), irrespective of the nature of the linker. This could be explained by the steric effect of the modifiers that interferes with the DNA binding. However, amino-modified PNA (**PNA2**–**PNA6**) and guanidine-modified PNA (**PNA12**–**PNA14**) showed comparable or even slightly increased T_m values compared to the unmodified PNA. This suggests that the amino and guanidino groups, which are likely to be fully protonated at neutral pH, can electrostatically interact with the negatively charged phosphate groups in the DNA backbone as previously observed in the case of similar cationic PNAs.[27,30,31,47,48] This was confirmed by the salt dependence of T_m values. The amino and guanidino-modified PNAs showed much larger ΔT_m at low-salt than high-salt conditions (ΔT_m = +1.0 to +4.2 °C at low salt and −3.9 to +1.9 °C at high salt). Much smaller difference was observed in the case of hydroxy-modified PNAs (ΔT_m = −6.8 to −5.8 °C at low salt and −4.9 to −3.9 °C at high salt). At a high salt concentration, electrostatic interactions between the protonated amino and phosphate groups are expected to be diminished, which is fully consistent with the results. In view of a similar steric effect between the amino and hydroxyl modifiers, it is interesting to note that this electrostatic stabilization even dominated the steric effect, resulting in net stabilization of the PNA–DNA duplexes. The number of repeating units (2EG, 3EG, or 4EG) and type of linker (–CH$_2$CH$_2$– or –OCH$_2$CH$_2$–) in the modifiers do not seem to have significant

DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00308
Bioconjugate Chem. XXXX, XXX, XXX–XXX

effects to the thermal stability of PNA−DNA hybrids. In addition, CD spectra of complementary DNA hybrids of **PNA6**, **PNA8**, and **PNA11** (Figure S56−S58) are similar to the CD spectra of unmodified PNA·DNA hybrids, suggesting that different modifiers did not significantly change the structures of the hybrids.

T_m data of singly modified mixed sequence PNA (GTAGA$^{(NX)}$TCACT, **PNA15−PNA22**) with complementary DNA (Table 1) showed the same trend observed in homothymine PNAs (**PNA1−PNA14**), i.e., hydroxyl modifiers destabilize, whereas amino and guanidino modifiers stabilize the PNA·DNA duplexes. The data suggest the positively charged modifiers generally increase the binding affinity of the PNA to its complementary DNA regardless of sequence context. Importantly, the stabilizing effect is additive. As shown in a series of triply modified apcPNAs (**PNA23−PNA28**), increasing the number of amino or guanidino modifiers on the acpcPNA backbone significantly increased the thermal stability of its DNA hybrids in comparison to singly modified PNA. For example, the DNA hybrids of triply amino-modified **PNA25** (3 × AB) is thermally more stable than that of singly modified **PNA18** (1 × AB) at both low- and high-salt conditions (ΔT_m = +12.6 and +6.8 °C, respectively). Similarly, the DNA hybrid of **PNA28** carrying three guanidino groups (3 × GB) is more thermally stable than that of **PNA22** with only one guanidino group (1 × GB) (ΔT_m = +11.6 and +8.5 °C, respectively). It could be noted that this additive effect is more clearly observed at low salt concentrations. However, triply and singly modified PNAs with hydroxy modifiers showed similar T_m values (Table 2).

Table 2. Thermal Melting Temperature (T_m) of Selected Singly and Triply-Modified Mixed-Sequence PNAs

		0 mM NaCl		100 mM NaCl	
PNA[a]	modifiers (X)	T_m (°C)[b]	ΔT_m (°C)[c]	T_m (°C)[b]	ΔT_m (°C)[c]
PNA21	HB	59.3	+1.9	53.5	+0.9
PNA27	3 × HB	61.2		54.4	
PNA19	H3EG	56.4	+1.9	53.5	0.0
PNA26	3 × H3EG	58.3		53.5	
PNA18	AB	66.1	+12.6	58.3	+6.8
PNA25	3 × AB	78.7		65.1	
PNA16	A3EG	63.2	+11.6	55.4	+7.8
PNA24	3 × A3EG	74.8		63.2	
PNA22	GB	67.1	+11.6	58.3	+8.5
PNA28	3 × GB	78.7		66.8	

[a]PNA sequence = Ac−GTAGA$^{(NX)}$TCACT−LysNH$_2$ or Ac−GT$^{(NX)}$AGA$^{(NX)}$TCA$^{(NX)}$CT−LysNH$_2$. [b]Conditions: 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.00, 0, or 100 mM NaCl, [PNA] = 1.0 μM, and [DNA] = 1.2 μM. [c]ΔT_m = T_m(triply modified PNA) − T_m(singly modified PNA).

Because the additional stabilization from electrostatic interaction in the cases of amino or guanidino-modified PNAs is nonspecific in nature, it was important to determine whether this may have negative impacts on the DNA binding specificity of the modified PNA. T_m values of hybrids between cationic PNAs with single mismatched DNA were also determined and compared with those of complementary DNA. From Figure 1, T_m of hybrids between the singly modified mixed sequence PNA with various linkers (butyl or ethylene glycol) and modification (hydroxy-, amino-, or guanidino-) (**PNA16**, **PNA18**, **PNA19**, **PNA21**, and **PNA22**) and single-mismatched DNA showed the same trend, whereby very low T_m values were observed (the maximum T_m was 32.1 °C for some sequences). For triply modified PNA, the hydroxyl-modified **PNA26** (H3EG) and **PNA27** (HB) showed T_m of single mismatched hybrids of <30 °C, similar to singly modified **PNA23**. However, amino-modified **PNA24** (A3EG), **PNA25** (AB), and guanidino-modified **PNA28** (GB) showed higher T_m values for single-mismatched hybrids (up to 46.8 °C). These results revealed that while amino- and guanidino-modified PNAs showed higher DNA affinity due to the electrostatic attraction, the same interaction can also stabilize the mismatched hybrids as well as the complementary hybrids. Nevertheless, when ΔT_m values were considered, it can be concluded that the modified PNA can still distinguish between full complementary and single mismatched in any cases with high specificity. This phenomenon was also observed in both low and high salt concentration (for the 0 mM NaCl result, see the Supporting Information). As shown in Figure 1, the presence of one mismatched base in the DNA strand resulted in substantial decrease in T_m values (ΔT_m range: −18.3 to −35.6 °C), indicating the high specificity of the DNA recognition by the modified PNA similar to unmodified PNA (ΔT_m range: −25.2 to −29.1 °C).

Solubility Measurement. The solubility of representative modified PNAs were evaluated by dissolving the PNA to a saturating concentration in water, and the concentration was determined by UV−vis spectrophotometry after centrifugation to remove excess PNA and appropriate dilution.[15] Table 3 showed the saturating concentrations of representative modified PNAs compared to unmodified PNA. In general, all modified apcPNAs showed improved water solubility by more than 10-fold compared to unmodified acpcPNA, although in some cases, the amount of PNA obtained was too small to obtain a saturating concentration; thus, only the lower limit of solubility was reported. To compare the influence of modifier to hydrophilicity, selected PNA with various modifiers were tested. Modified PNAs with poly(ethylene glycol) side chains (**PNA3** and **PNA8**) were about 2-fold more soluble than the modified PNAs with alkyl side chains (**PNA6**, **PNA11**, and **PNA14**) regardless of end groups (amino or alcohol). It can therefore be concluded that the oligo(ethylene glycol) linker can enhance the water solubility more effectively than simple alkyl linkers. Thus, the modifier A3EG seems to be a good combination in terms of water solubility and DNA binding properties. This is in contrast to the case of atfcPNA,[34] whereby the complete replacement of the cyclopentane ring in acpcPNA by tetrahydrofuran ring in atfcPNA did not provide significant improvement in the water solubility.

In Vitro Cellular Uptake of Modified acpcPNA. The cellular uptake of various modified PNAs carrying an *N*-terminal fluorescein label by HEK293T cells, a human embryonic kidney cell line, were observed by confocal laser scanning microscope (CLSM) and further quantified using flow cytometry. As shown in Figure 2, **PNA33** with guanidinobutyl (GB) side chain showed the highest cellular uptake followed by **PNA32** with aminobutyl (AB) modification. The CLSM image of the cells incubated with **PNA33** in Figure 3 also showed an obvious green fluorescence signal of the fluorescein label in the cells, whereas the control cells (no PNA added) showed no detectable signal. The signal of the unmodified PNA sample was very weak, indicating a very low uptake level. Thus, the fluorescence images conformed well to the flow cytometry results.

■ CONCLUSIONS

In summary, we demonstrated a facile and general reductive alkylation strategy for post-synthetic modification of pyrrolidinyl

DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00308
Bioconjugate Chem. XXXX, XXX, XXX−XXX

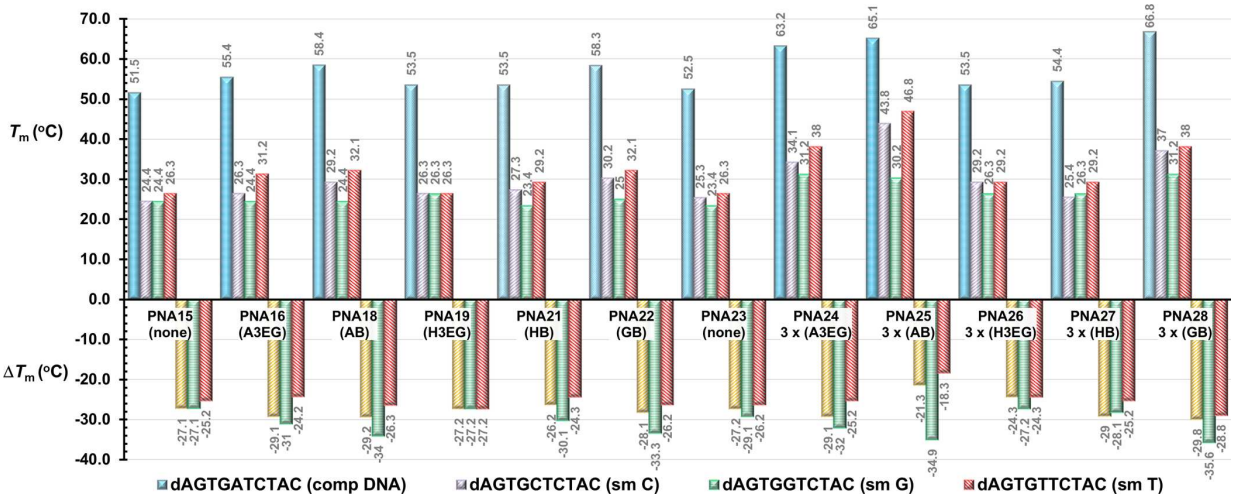


Figure 1. Thermal melting temperature (T_m) of modified acpcPNA (**PNA15**–**PNA28**) with complementary DNA (comp DNA) and single mismatched DNA (smC, smG, and smT). Conditions: 10 mM sodium phosphate buffer. pH 7.00, 100 mM NaCl, [PNA] = 1.0 μM, [DNA] = 1.2 μM, heating rate 1 °C/min; and $\Delta T_m = T_m - T_m$(complementary hybrid). Mismatch positions in the DNA sequences are indicated by underlining.

Table 3. Aqueous Solubility of Modified acpcPNAs

PNA	modifier (X)	saturated concentration (mM)	saturated concentration (mg/mL)
unmodified[a]	–	3.3 ± 0.2	10.5 ± 0.6
PNA3	**A3EG**	59.6 ± 2.4	197.4 ± 7.9
PNA6	**AB**	>12.0 ± 0.2	>39.0 ± 0.7
PNA8	**H3EG**	64.1 ± 0.5	212.3 ± 1.7
PNA11	**HB**	31.8 ± 0.9	103.4 ± 2.9
PNA14	**GB**	>13.3 ± 0.4	>43.8 ± 1.3

[a]Unmodified acpcPNA; Ac–TTTTTTTTT–LysNH$_2$.

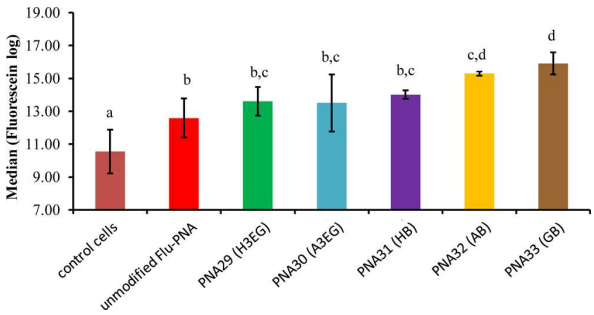


Figure 2. Cellular uptake levels of various PNA samples into the HEK293T cells after 6 h of incubation at the PNA concentration of 500 nM. In control cells, water was used in place of an aqueous PNA solution. PNA fluorescence intensity was obtained from flow cytometry analysis. Data represented means ± SD (n = 3, from three independent experiments). Bar graphs with different superscript are significantly different ($p < 0.05$), per analysis by one-way analysis of variance with a Duncan test.

PNA backbone with hydrophilic modifiers consisting of a polar end group (hydroxy-, amino-, or guanidino-) and a linker (alkylene or oligo(ethylene glycol)) to provide a new class of hydrophilic pyrrolidinyl PNA. The advantage of this post-synthetic approach is that there is no need to separately synthesize new PNA building blocks, as generally required in other related reports,[27,28,30,31] and various modifications can be easily made without having to resynthesize the whole PNA sequence. The DNA binding affinities of these hydrophilic PNA were investigated by T_m measurement and compared with the unmodified PNA. The amino- and guanidino-modified PNAs bind more strongly to DNA than unmodified and hydroxyl-modified PNA, regardless of the linker type. This could be explained by electrostatic interaction between the positively charged protonated amino or guanidino groups and phosphate groups in the DNA, which was supported by the negative effect of salt concentration to the thermal stability of the PNA·DNA hybrids. The electrostatic interaction could also partly stabilize the mismatched hybrids, but the specificity of the DNA recognition by these modified PNAs is still retained as confirmed by the large decrease in T_m of mismatched compared to complementary hybrids in all cases. In addition, water solubility was increased by at least 10-fold in comparison to unmodified PNA. Furthermore, in vitro cellular uptake experiment demonstrated the cell permeable ability of these modified PNA. Triply modified PNA with positively charged guanidinobutyl (GB) and amino-butyl (AB) side chains showed enhanced cellular uptake relative to unmodified PNA or other triply modified PNAs. It can be further envisioned that a similar strategy can be used to add other functionalities to PNA and other related biomolecules. The ability to make small PNA that is intrinsically cell-penetrable without having to rely on other cell-permeable carrier would open up opportunities for pyrrolidinyl PNA to be used in cellular applications such as intracellular RNA sensing, specific gene detection, or antisense and antigene therapy.

■ EXPERIMENTAL SECTION

General Procedures. All reagent-grade chemicals and solvents were purchased from standard suppliers and were used without further purification. ^{1}H and ^{13}C NMR spectra were recorded on Bruker Avance 400 NMR spectrometer operating at 400 MHz for ^{1}H and 100 MHz for ^{13}C. RP-HPLC experiments were performed on a Waters Delta 600 HPLC system. Oligonucleotides were obtained from Pacific Science (Thailand) or BioDesign (Thailand).

Synthesis, Purification, and Characterization of Modified apcPNA. The apc/acpcPNAs, Ac–TTTT$^{(apc)}$TTTTT–LysNH$_2$,

DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00308
Bioconjugate Chem. XXXX, XXX, XXX–XXX

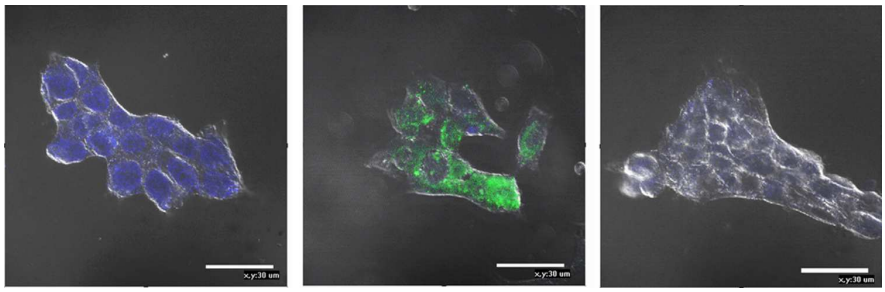


Figure 3. Confocal fluorescence images of HEK293T cells after being incubated with water (left), **PNA33** (middle), and unmodified Flu-PNA (right) and then being fixed and stained with 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Fluorescence detection was carried out with excitation and emission wavelengths of 405/450 (DAPI, shown in blue) and 488/525 nm (fluorescein-labeled PNA, shown in green); images shown are the merge of the bright field and the other two channels. Identical adjustments were applied to all images to allow a fair comparison. It should be noted that the DAPI staining was ineffective in the presence of a high concentration of PNA.

Bz−GTAGA$^{(apc)}$TCACT−LysNH$_2$, and Bz−GT$^{(apc)}$AGA$^{(apc)}$-TCA$^{(apc)}$CT−LysNH$_2$ were synthesized via solid-phase peptide synthesis on Tentagel S RAM resin according to the previously published protocol[36] (apc denotes substitution of acpc with apc spacer). Lysinamide was also included at the C-terminus to allow a fair comparison with previous unmodified PNA. After the reaction was completed as monitored by MALDI-TOF mass spectrometry, the *N*-terminal Fmoc group was removed and the PNA was end-capped with acetyl or benzoyl group. In case of fluorescence-labeled PNA, the *N*-terminus of the PNA was coupled with 5(6)-carboxy-fluorescein *N*-hydroxysuccinimidyl ester on the solid-support. The nucleobase protecting groups (Bz, Ibu) for A, C, and G, and apc spacer protection (Tfa) were removed by heating with 1:1 aqueous ammonia−dioxane at 60 °C overnight. The apc/acpcPNA was then reductively alkylated on the solid support with the aldehyde derivatives of modifier (X) in the presence of $NaBH_3CN$ (2 equiv) and HOAc (2 equiv) in MeOH solution at rt for 4 h. The trityl- and Boc-protecting groups were deprotected in a cleavage step from solid support. The phthalimide protecting group was subsequently deprotected by 40% aqueous methylamine solution at rt for 3 h. The modified PNA was cleaved from the resin by treatment with trifluoroacetic acid (TFA) in dichloromethane and 10% triisopropylsilane (TIS) (500 μL × 30 min ×3). The cleavage solution was combined and dried under nitrogen gas, and the crude PNA was precipitated by addition of diethyl ether. The crude PNA was purified by RP-HPLC with linear gradient conditions using 9:1 of mobile phase A/B (A is 0.1% TFA in H_2O and B is 0.1% TFA in MeOH) for 5 min and gradient to 1:9 for 60 min. The combined purified PNA fractions were characterized by MALDI-TOF mass spectrometry (Microflex, BrukerDaltonics) using α-cyano-4-hydroxy-cinnamic acid (CCA) as a matrix.

UV Melting Experiments. The thermal stability (T_m) of all PNA·DNA hybrids was studied under the following conditions: [PNA], 1.0 μM and [DNA], 1.2 μM in 10 mM sodium phosphate buffer at pH 7.0 in the absence or presence of 100 mM NaCl. The A_{260} was measured on a CARY 100 Bio UV−vis spectrophotometer in steps from 20 to 90 °C with a temperature increment of 1.0 °C/min. The melting temperatures were obtained from first derivative plots between absorbance at 260 nm as a function of temperature.

Solubility Determination. The procedure for solubility determination was adapted from the literature.[15] The aqueous solubility was measured by adding a minimum amount of water into a microcentrifuge tube containing the lyophilized PNA at 20 °C, making sure that the solution is saturated with the PNA (some remaining insoluble solid was observed) and left until the dissolution reached equilibrium (the absorbance at 260 nm was no longer changed). Then, the sample was centrifuged at 14 000 rpm for 10 min to remove the excess insoluble PNA. The concentration of the supernatant was determined by measuring the UV absorption at 260 nm using a Nanodrop 2000 Spectrophotometer, and the solubility was calculated from the concentration and the initial volume of water added.

In Vitro Cellular Uptake of PNA. The cellular uptake of PNA into HEK293T cells was investigated using flow cytometry. HEK293T cells were seeded onto 24 well plates at a density of 7.5×10^4 cells per well and left to adhere overnight at 37 °C under 5% of CO_2 in the incubator. Then, the tested sample was added into the cells at final concentration of 500 nM and incubated at 37 °C for 6 h. After incubation, the old media was removed, and the cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS). The cells were then harvested and resuspended in 500 μL of PBS. The suspension of cells was centrifuged at 3000*g* for 5 min at 4 °C. The supernatant was removed, and the cell pellet was resuspended with 100 μL of PBS. Finally, the obtained cell suspension was subjected to flow cytometry. The intracellular fluorescence signal of PNA was detected by flow cytometer (Cytomics FC500MPL, Beckman Coulter Inc., NY) using $\lambda_{exite}/\lambda_{emit}$ values of 488/525 nm, of which 10 000 cells were being measured. The data were analyzed by FlowJo software (Tree Star, Inc.). Standard deviations were calculated from three replicates. Statistical analysis of data was performed by one-way analysis of variance with Duncan test (SPSS Inc., Chicago, IL) Differences were considered to be statistically significant at a level of $p < 0.05$.

To confirm the cellular uptake of PNA, the intracellular PNA was monitored using a CLSM. The HEK293T cells were seeded on an 8 well cell culture chamber slide at a density of 7.5×10^4 cells per well and left to adhere overnight. After that, the PNA sample was added into the cells at the final concentration of 500 nM and incubated at 37 °C for 6 h in the incubator. The cells were then washed twice with DMEM media containing 10% fetal bovine serum and fixed with 4% w/v paraformaldehyde for 10 min followed by washing with PBS. After that, 4′,6-diamidino-2-phenylindole solution was added, and washing was carried out twice with PBS. Finally, intracellular PNA was imaged by CLSM (Nikon, Tokyo, Japan).

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00308.

DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00308
Bioconjugate Chem. XXXX, XXX, XXX−XXX

A table showing the sequence of modified PNA. Figures showing HPLC chromatograms, MALDI-TOF-MS analysis, UV-melting and first derivative plots, CD spectra, melting temperatures, and ^{1}H and ^{13}C NMR spectra. (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*E-mail: chaturongs@nu.ac.th. Phone: +66-55-963462. Fax: +66-55-963401.

*E-mail: thanesuan.nua@rmutr.ac.th. Phone: +66-81-4449908.

ORCID

Chaturong Suparpprom: 0000-0002-8885-3889

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge financial supports from the Thailand Research Fund (DPG5780002 to T.V.), Research Fund for DPST Graduate with First Placement (grant no. 02/2555 to C.S.), and Ratchadapiseksompoj Endowment, Chulalongkorn University (postdoctoral fellowship to T.N.).

ABBREVIATIONS

peptide nucleic acid, PNA; aegPNA, *N*-2-aminoethylglycine PNA; acpcPNA, 2-amino cyclopentane carboxylic acid PNA; apcPNA, 3-aminopyrrolidine-4-carboxylic acid PNA; acbcPNA, 2-amino cyclobutane carboxylic acid PNA; atfcPNA, 2-amino tetrahydrofuran carboxylic acid PNA; aocPNA, 3-amino-oxetane-2-carboxylic acid PNA; $^{R\text{-}MP}\gamma$PNA, (*R*)-diethylene glycol ('mini-PEG') γ PNA; CPP, cell-penetrating peptides; EGFR, epidermal growth factor receptor; MCF-7, human breast adenocarcinoma cell line; Fmoc−OSu, *N*-(9-fluorenylmethoxycarbonyloxy) succinimide; IBX, 2-iodoxybenzoic acid; TrCl, trityl chloride; DMF, *N*,*N*-dimethylmethanamide; Pht, phthalimide group; Tfa, trifluoroacetyl group; Ibu, isobutyryl group; Bz, benzoyl group; DAPI, 4′,6-diamidino-2-phenylindole; PBS, phosphate-buffered saline; TIS, triisopropylsilane; CCA, α-cyano-4-hydroxy-cinnamic acid; DMEM, Dulbecco's modified Eagle medium; CLSM, confocal laser scanning microscope; CD, circular dichroism; T_m, melting temperature; A260, absorbance at 260 nm

REFERENCES

(1) Nielsen, P. E. (1999) Peptide nucleic acid. A molecule with two identities. *Acc. Chem. Res. 32*, 624−630.

(2) Good, L., Sandberg, R., Larsson, O., Nielsen, P. E., and Wahlestedt, C. (2000) Antisense PNA effects in *Escherichia coli* are limited by the outer-membrane LPS layer. *Microbiology 146*, 2665−2670.

(3) Gaglione, M., Milano, G., Chambery, A., Moggio, L., Romanelli, A., and Messere, A. (2011) PNA-based artificial nucleases as antisense and anti-miRNA oligonucleotide agents. *Mol. BioSyst. 7*, 2490−2409.

(4) Egholm, M., Buchardt, O., Nielsen, P. E., and Berg, R. H. (1992) Peptide nucleic acids (PNA). Oligonucleotide analogs with an achiral peptide backbone. *J. Am. Chem. Soc. 114*, 1895−1897.

(5) Pokorski, J. K., Witschi, M. A., Purnell, B. L., and Appella, D. H. (2004) *S,S*)-*trans*-Cyclopentane-constrained peptide nucleic acids. A general backbone modification that improves binding affinity and sequence specificity. *J. Am. Chem. Soc. 126*, 15067−15073.

(6) Govindaraju, T., Kumar, V. A., and Ganesh, K. N. (2005) (*SR/RS*)-Cyclohexanyl PNAs: Conformationally preorganized PNA analogues with unprecedented preference for duplex formation with RNA. *J. Am. Chem. Soc. 127*, 4144−4145.

(7) Dragulescu-Andrasi, A., Rapireddy, S., Frezza, B. M., Gayathri, C., Gil, R. R., and Ly, D. H. (2006) A simple γ-backbone modification preorganizes peptide nucleic acid into a helical structure. *J. Am. Chem. Soc. 128*, 10258−10267.

(8) Kitamatsu, M., Takahashi, A., Ohtsuki, T., and Sisido, M. (2010) Synthesis of pyrrolidine-based oxy-peptide nucleic acids carrying four types of nucleobases and their transport into cytoplasm. *Tetrahedron 66*, 9659−9666.

(9) Worthington, R. J., and Micklefield, J. (2011) Biophysical and cellular-uptake properties of mixed-sequence pyrrolidine-amide oligonucleotide mimics. *Chem. - Eur. J. 17*, 14429−14441.

(10) Vilaivan, T., Suparpprom, C., Harnyuttanakorn, P., and Lowe, G. (2001) Synthesis and properties of novel pyrrolidinyl PNA carrying-amino acid spacers. *Tetrahedron Lett. 42*, 5533−5536.

(11) Vilaivan, C., Srisuwannaket, C., Ananthanawat, C., Suparpprom, C., Kawakami, J., Yamaguchi, Y., Tanaka, Y., and Vilaivan, T. (2011) Pyrrolidinyl peptide nucleic acid with α/β-peptide backbone: A conformationally constrained PNA with unusual hybridization properties. *Artif. DNA PNA XNA 2*, 50−59.

(12) Vilaivan, T., and Srisuwannaket, C. (2006) Hybridization of pyrrolidinyl peptide nucleic acids and DNA: Selectivity, base-pairing specificity, and direction of binding. *Org. Lett. 8*, 1897−1900.

(13) Vilaivan, T. (2015) Pyrrolidinyl PNA with α/β-dipeptide backbone: From development to applications. *Acc. Chem. Res. 48*, 1645−1656.

(14) Mansawat, W., Vilaivan, C., Balázs, A., Aitken, D. J., and Vilaivan, T. (2012) Pyrrolidinyl peptide nucleic acid homologues: Effect of ring size on hybridization properties. *Org. Lett. 14*, 1440−1443.

(15) Sahu, B., Sacui, I., Rapireddy, S., Zanotti, K. J., Bahal, R., Armitage, B. A., and Ly, D. H. (2011) Synthesis and characterization of conformationally preorganized, (*R*)-diethylene glycol-containing γ-peptide nucleic acids with superior hybridization properties and water solubility. *J. Org. Chem. 76*, 5614−5627.

(16) Koppelhus, U., and Nielsen, P. E. (2003) Cellular delivery of peptide nucleic acid (PNA). *Adv. Drug Delivery Rev. 55*, 267−280.

(17) Shiraishi, T., and Nielsen, P. E. (2012) Nanomolar cellular antisense activity of peptide nucleic acid (PNA) cholic acid ("umbrella") and cholesterol conjugates delivered by cationic lipids. *Bioconjugate Chem. 23*, 196−202.

(18) Shiraishi, T., Bendifallah, N., and Nielsen, P. E. (2006) Cellular delivery of polyhetero aromate-peptide nucleic acid conjugates mediated by cationic lipids. *Bioconjugate Chem. 17*, 189−194.

(19) Morris, M. C., Gros, E., Aldrian-Herrada, G., Choob, M., Archdeacon, J., Heitz, F., and Divita, G. (2007) A non-covalent peptide-based carrier for in vivo delivery of DNA mimics. *Nucleic Acids Res. 35*, e49.

(20) Shiraishi, T., and Nielsen, P. E. (2011) Peptide nucleic acid (PNA) cell penetrating peptide (CPP) conjugates as carriers for cellular delivery of antisense oligomers. *Artif. DNA PNA XNA 2*, 90−99.

(21) Kilk, K., and Langel, U. (2005) Cellular delivery of peptide nucleic acid by cell-penetrating peptides. *Methods Mol. Biol. 298*, 131−141.

(22) Bonora, G. M., Drioli, S., Ballico, M., Faccini, A., Corradini, R., Cogoi, S., and Xodo, L. (2007) PNA conjugated to high-molecular weight poly(ethylene glycol): Synthesis and properties. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids 26*, 661−664.

(23) Bergmann, F., Bannwarth, W., and Tam, S. (1995) Solid phase synthesis of directly linked PNA-DNA-hybrids. *Tetrahedron Lett. 36*, 6823−6826.

(24) Uhlmann, E., Will, D. W., Breipohl, G., Langner, D., and Ryte, A. (1996) Synthesis and properties of PNA/DNA chimeras. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl. 35*, 2632−2635.

(25) Finn, P. J., Gibson, N. J., Fallon, R., Hamilton, A., and Brown, T. (1996) Synthesis and properties of DNA-PNA chimeric oligomers. *Nucleic Acids Res. 24*, 3357−3363.

(26) Van der Laan, A. C., Brill, R., Kuimelis, R. G., Kuyl-Yeheskiely, E., van Boom, J. H., Andrus, A., and Vinayak, R. (1997) A convenient automated solid-phase synthesis of PNA-(5′)-DNA-(3′)-PNA chimera. *Tetrahedron Lett. 38*, 2249−2252.

DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00308
Bioconjugate Chem. XXXX, XXX, XXX−XXX

(27) Zhou, P., Dragulescu-Andrasi, B., Bhattacharya, B., O'Keefe, H., Vatta, P., Hyldig-Nielsen, J., and Ly, D. H. (2006) Synthesis of cell-permeable peptide nucleic acids and characterization of their hybridization and uptake properties. *Bioorg. Med. Chem. Lett. 16*, 4931−4935.
(28) Dragulescu-Andrasi, A., Zhou, P., He, G., and Ly, D. H. (2005) Cell-permeable GPNA with appropriate backbone stereochemistry and spacing binds sequence-specifically to RNA. *Chem. Commun. 2*, 244−246.
(29) Thomas, S. M., Sahu, B., Rapireddy, S., Bahal, R., Wheeler, S. E., Procopio, E. M., Kim, J., Joyce, S. C., Contrucci, S., Wang, Y., et al. (2013) Antitumor effects of EGFR antisense guanidine-based peptide nucleic acids in cancer models. *ACS Chem. Biol. 8*, 345−352.
(30) Mitra, R., and Ganesh, K. N. (2012) Aminomethylene peptide nucleic acid (am-PNA): Synthesis, regio-/stereospecific DNA binding, and differential cell uptake of (α/γ,R/S)am-PNA analogues. *J. Org. Chem. 77*, 5696−5704.
(31) Kumar, P., and Jain, D. R. (2015) Cγ-Aminopropylene peptide nucleic acid (amp-PNA): chiral cationic PNAs with superior PNA:DNA/RNA duplex stability and cellular uptake. *Tetrahedron 71*, 3378−3384.
(32) Arayachukiat, S., Seemork, J., Pan-In, P., Amornwachirabodee, K., Sangphech, N., Sansureerungsikul, T., Sathornsantikun, K., Vilaivan, C., Shigyou, K., Pienpinijtham, P., et al. (2015) Bringing macromolecules into cells and evading endosomes by oxidized carbon nanoparticles. *Nano Lett. 15*, 3370−3376.
(33) Kanokudom, S., Vilaivan, T., Wikan, N., Thepparit, C., Smith, D. R., and Assavalapsakul, W. (2017) miR-21 promotes dengue virus serotype 2 replication in HepG2 cells. *Antiviral Res. 142*, 169−177.
(34) Sriwarom, P., Padungros, P., and Vilaivan, T. (2015) Synthesis and DNA/RNA binding properties of conformationally constrained pyrrolidinyl PNA with a tetrahydrofuran backbone deriving from deoxyribose. *J. Org. Chem. 80*, 7058−7065.
(35) Seankongsuk, P., Vchirawongkwin, V., Bates, R. W., Padungros, P., and Vilaivan, T. (2017) Enantioselective synthesis of (2*S*,3*S*)-epi-oxetin and its incorporation into conformationally constrained pyrrolidinyl PNA with an oxetane backbone. *Asian J. Org. Chem. 6*, 551−560.
(36) Reenabthue, N., Boonlua, C., Vilaivan, C., Vilaivan, T., and Suparpprom, C. (2011) 3-Amino pyrrolidine-4-carboxylic acid as versatile handle for internal labeling of pyrrolidinyl PNA. *Bioorg. Med. Chem. Lett. 21*, 6465−6469.
(37) Dangsopon, A., Poomsuk, N., Siriwong, K., Vilaivan, T., and Suparpprom, C. (2016) Synthesis and fluorescence properties of 3,6-diaminocarbazole-modified pyrrolidinyl peptide nucleic acid. *RSC Adv. 6*, 74314−74322.
(38) Ditmangklo, B., Boonlua, C., Suparpprom, C., and Vilaivan, T. (2013) Reductive alkylation and sequential reductive alkylation-click chemistry for on-solid-support modification of pyrrolidinyl peptide nucleic acid. *Bioconjugate Chem. 24*, 614−625.
(39) Strulson, M. K., Johnson, D. M., and Maurer, J. A. (2012) Increased stability of glycol-terminated self-assembled monolayers for long-term patterned cell culture. *Langmuir 28*, 4318−4324.
(40) Nasopoulou, M., Georgiadis, D., Matziari, M., Dive, V., and Yiotakis, A. (2007) A versatile annulation protocol toward novel constrained phosphinic peptidomimetics. *J. Org. Chem. 72*, 7222−7228.
(41) Eriks, J. C., van der Goot, H., Sterk, G. J., and Timmerman, H. (1992) Histamine H2-receptor agonists. Synthesis, in vitro pharmacology, and qualitative structure-activity relationships of substituted 4- and 5-(2-aminoethyl)thiazoles. *J. Med. Chem. 35*, 3239−3246.
(42) Ngamwiriyawong, P., and Vilaivan, T. (2011) Synthesis and nucleic acids binding properties of diastereomeric aminoethylprolyl peptide nucleic acids (aepPNA). *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids 30*, 97−112.
(43) Shymanska, N. V., An, H. I., and Pierce, J. G. (2014) A rapid synthesis of 4-oxazolidinones: Total synthesis of synoxazolidinones A and B. *Angew. Chem., Int. Ed. 53* (21), 5401−5404.
(44) Expósito, A., Fernández-Suárez, M., Iglesias, T., Muñoz, L., and Riguera, R. (2001) Total synthesis and absolute configuration of minalemine A, a guanidine peptide from the marine tunicate *Didemnum rodriguesi*. *J. Org. Chem. 66*, 4206−4213.
(45) Taura, Y., Tanaka, M., Wu, X.-M., Funakoshi, K., and Sakai, K. (1991) Asymmetric cyclization reactions. Cyclization of substituted 4-pentenals into cyclopentanone derivatives by rhodium(I) with chiral ligands. *Tetrahedron 47*, 4879−4888.
(46) Menger, F. M., Lu, H., and Lundberg, D. (2007) A-B-A-B-A Block amphiphiles. Balance between hydrophilic and hydrophobic segmentation. *J. Am. Chem. Soc. 129*, 272−273.
(47) Jain, D. R., Anandi V, L., Lahiri, M., and Ganesh, K. N. (2014) Influence of pendant chiral Cγ-(alkylideneamino/guanidino) cationic side-chains of PNA backbone on hybridization with complementary DNA/RNA and cell permeability. *J. Org. Chem. 79*, 9567−9577.
(48) Shrestha, A. R., Kotobuki, Y., Hari, Y., and Obika, S. (2014) Guanidine bridged nucleic acid (GuNA): An effect of a cationic bridged nucleic acid on DNA binding affinity. *Chem. Commun. 50*, 575−577.

DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00308
Bioconjugate Chem. XXXX, XXX, XXX−XXX

ภาคผนวก 5

ข้อมูลการใช้ประโยชน์จากงานวิจัย

บันทึกข้อความ

สถาบันทรัพย์สินทางปัญญาแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทร.0-2160-5340-2

ที่ ศธ 0512.302/130 /2557 วันที่ 16 พฤษภาคม 2557

เรื่อง ขออนุมัติเบิกเงินจัดสรรผลประโยชน์ค่าตอบแทนการถ่ายทอดเทคโนโลยี

เรียน รักษาการผู้อำนวยการ สถาบันทรัพย์สินทางปัญญาแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตามที่สถาบันทรัพย์สินทางปัญญาแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้รับมอบหมายให้เป็นผู้ดำเนินการบริหารจัดการเทคโนโลยีเรื่อง Pyrrolidinyl Project 1175 และ Aminoethy PNAs Project 1332 นั้น

บัดนี้สถาบันฯ ได้รับเงินจาก Isis Innovation Ltd and University of Oxford เป็นค่าตอบแทนการถ่ายทอดเทคโนโลยี เรื่อง Pyrrolidinyl Project 1175 เป็นจำนวนเงิน 183,392.37 บาท (3,413.38 GBP) และเรื่อง Aminoethy PNAs Project 1332 เป็นจำนวนเงิน 101,342.95 บาท (1,886.24 GBP) รวมเป็นเงินทั้งสิ้น 284,735.32 บาท แล้ว ในการนี้จึงขอเบิกเงินเพื่อนำส่งโดยมีรายละเอียดดังนี้

Pyrrolidinyl Project 1175	ค่าใช้จ่ายในการดำเนินการ	ส่วนแบ่งสิทธิประโยชน์(Royalty)
1.สถาบันทรัพย์สินฯ (183,392.37x15%)	27,508.86	
(183,392.37-27,508.86=155,883.51)	-	
2.สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (155,883.51x50%)	-	77,941.75
3.ศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์ (155,883.51-77,941.75=77,941.76x50%)	-	38,970.88
4.คณะวิทยาศาสตร์ (77,941.76x12.50%)	-	9,742.72
5.ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ (77,941.76x12.50%)		9,742.72
6.จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (77,941.76x25%)	-	19,485.44
รวม	**27,508.86**	**155,883.51**

Aminoethy PNAs Project 1332	ค่าใช้จ่ายในการดำเนินการ	ส่วนแบ่งสิทธิประโยชน์(Royalty)
1.สถาบันทรัพย์สินฯ (101,342.95x10%)	10,134.30	
(101,342.95-10,134.30=91,208.65)	-	
2.ศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์ (91,208.65x50%)	-	45,604.33
3.คณะวิทยาศาสตร์ (91,208.65x12.50%)	-	11,401.08
4.ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ (91,208.65x12.50%)		11,401.08
5.จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (91,208.65x25%)	-	22,802.16
รวม	**10,134.30**	**91,208.65**

บันทึกข้อความ

สถาบันทรัพย์สินทางปัญญาแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทร.0-2160-5340-2

ที่ ศธ 0512.302/395 /2557 วันที่ 6 พฤศจิกายน 2557

เรื่อง ขออนุมัติเบิกเงินจัดสรรผลประโยชน์ค่าตอบแทนการถ่ายทอดเทคโนโลยี

เรียน ผู้อำนวยการสถาบันทรัพย์สินทางปัญญาแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตามที่สถาบันทรัพย์สินทางปัญญาแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้รับมอบหมายให้เป็นผู้ดำเนินการบริหารจัดการเทคโนโลยีเรื่อง Pyrrolidinyl Project 1175 และ Aminoethyl PNAs Project 1332 นั้น

บัดนี้สถาบันฯ ได้รับเงินจาก Isis Innovation Ltd and University of Oxford เป็นค่าตอบแทนการถ่ายทอดเทคโนโลยี เรื่อง Pyrrolidinyl Project 1175 เป็นจำนวนเงิน 81,637.21 บาท (1,578.98 GBP) และเรื่อง Aminoethyl PNAs Project 1332 เป็นจำนวนเงิน 40,818.61 บาท (789.49 GBP) รวมเป็นเงินทั้งสิ้น 122,455.82 บาท แล้ว ในการนี้จึงขอเบิกเงินเพื่อนำส่งโดยมีรายละเอียดดังนี้

Pyrrolidinyl Project 1175	ค่าใช้จ่ายในการดำเนินการ	ส่วนแบ่งสิทธประโยชน์(Royalty)
1.สถาบันทรัพย์สินฯ (81,637.21x15%)	12,245.58	
(81,637.21-12,245.58=69,391.63)	-	
2.สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (69,391.63x50%)	-	34,695.82
3.ศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์ (69,391.63-34,695.82=34,695.81x50%)	-	17,347.90
4.คณะวิทยาศาสตร์ (34,695.81x12.50%)	-	4,336.98
5.ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ (34,695.81x12.50%)		4,336.98
6.จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (34,695.81x25%)	-	8,673.95
รวม	**12,245.58**	**69,391.63**

Aminoethyl PNAs Project 1332	ค่าใช้จ่ายในการดำเนินการ	ส่วนแบ่งสิทธประโยชน์(Royalty)
1.สถาบันทรัพย์สินฯ (40,818.61x10%)	4,081.86	
(40,818.61-4,081.86=36,736.75)	-	
2.ศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์ (36,736.75x50%)	-	18,368.38
3.คณะวิทยาศาสตร์ (36,736.75x12.50%)	-	4,592.09
4.ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ (36,736.75x12.50%)		4,592.09
5.จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (36,736.75x25%)	-	9,184.19
รวม	**4,081.86**	**36,736.75**

บันทึกข้อความ

สถาบันทรัพย์สินทางปัญญาแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทร.0-2218-4195-7

ที่ ศธ 0512.302/ /2558 วันที่ ธันวาคม 2558

เรื่อง ขออนุมัติเบิกเงินจัดสรรผลประโยชน์ค่าตอบแทนการถ่ายทอดเทคโนโลยี

เรียน รักษาการผู้อำนวยการสถาบันทรัพย์สินทางปัญญาแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตามที่สถาบันทรัพย์สินทางปัญญาแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้รับมอบหมายให้เป็นผู้ดำเนินการบริหารจัดการเทคโนโลยีเรื่อง Pyrrolidinyl Project 1175 และ Aminoethyl PNAs Project 1332 นั้น

บัดนี้สถาบันฯ ได้รับเงินจาก Isis Innovation Ltd and University of Oxford เป็นค่าตอบแทนการถ่ายทอดเทคโนโลยี เรื่อง Pyrrolidinyl Project 1175 เป็นจำนวนเงิน 85,511.58 บาท (1,594.51 GBP) และเรื่อง Aminoethyl PNAs Project 1332 เป็นจำนวนเงิน 42,755.52 บาท (797.25 GBP) รวมเป็นเงินทั้งสิ้น 128,267.10 บาท แล้ว ในการนี้จึงขอเบิกเงินเพื่อนำส่งโดยมีรายละเอียดดังนี้

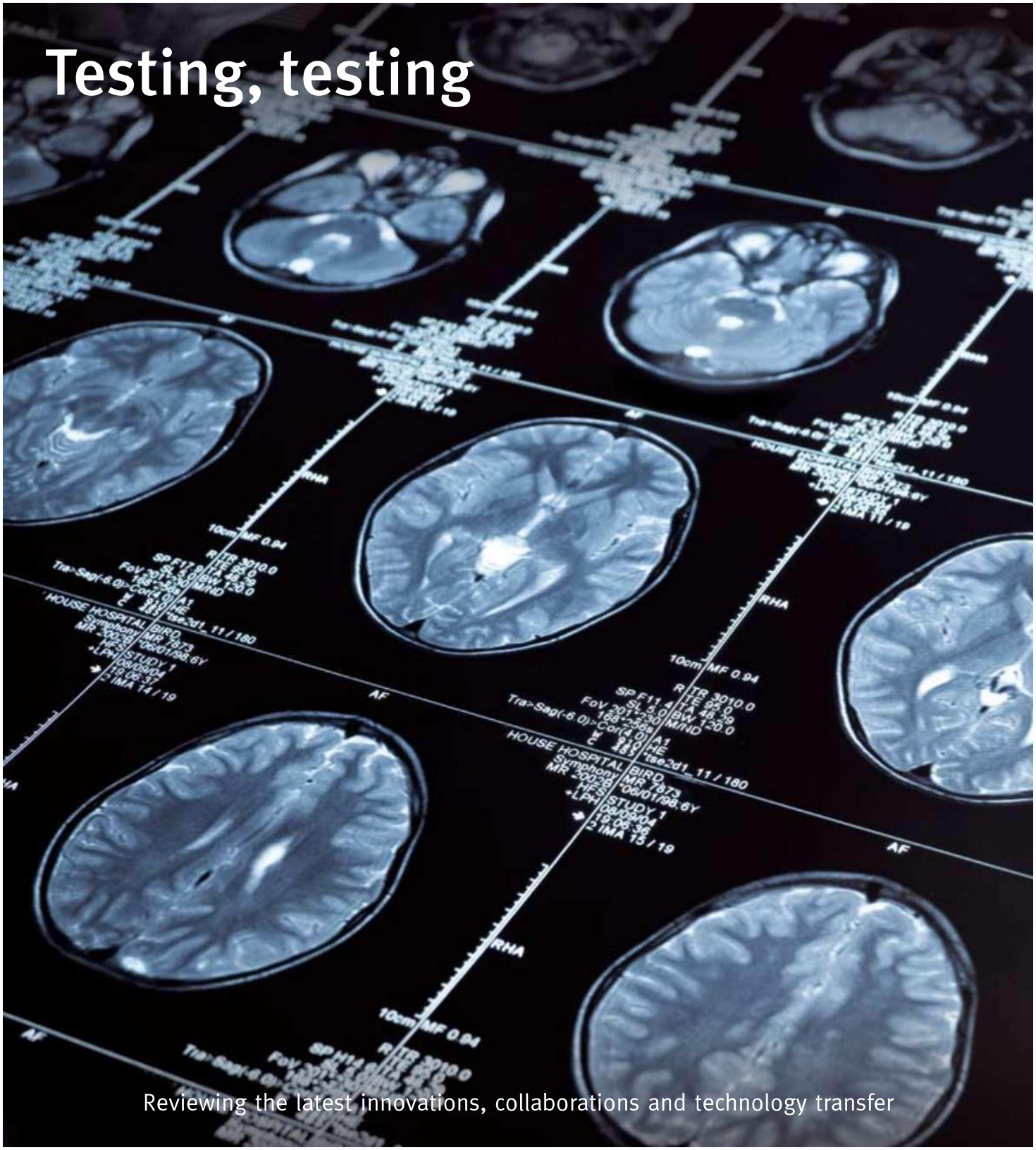
Pyrrolidinyl Project 1175	**ค่าใช้จ่ายในการดำเนินการ**	**ส่วนแบ่งสิทธประโยชน์(Royalty)**
1.สถาบันทรัพย์สินฯ (85,511.58x15%)	12,826.74	
(85,511.58-12,826.74=72,684.84)	-	
2.สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (72,684.84x50%)	-	36,342.42
3.ศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์ (72,684.84-36,342.42=36,342.42x50%)	-	18,171.21
4.คณะวิทยาศาสตร์ (36,342.42x12.50%)	-	4,542.80
5.ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ (36,342.42x12.50%)		4,542.80
6.จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (36,342.42x25%)	-	9,085.61
รวม	**12,826.74**	**72,684.84**

Aminoethyl PNAs Project 1332	**ค่าใช้จ่ายในการดำเนินการ**	**ส่วนแบ่งสิทธประโยชน์(Royalty)**
1.สถาบันทรัพย์สินฯ (42,755.52x10%)	4,275.55	
(42,755.52-4,275.55=38,479.97)	-	
2.ศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์ (38,479.97x50%)	-	19,239.98
3.คณะวิทยาศาสตร์ (38,479.97x12.50%)	-	4,810.00
4.ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ (38,479.97x12.50%)		4,810.00
5.จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (38,479.97x25%)	-	9,619.99
รวม	**4,275.55**	**38,479.97**

ISIS NEWS

The latest from Isis Innovation Ltd
The University of Oxford's Technology Transfer company

Edition 57 Autumn 2009



Testing, testing

Reviewing the latest innovations, collaborations and technology transfer

New generation peptide nucleic acids

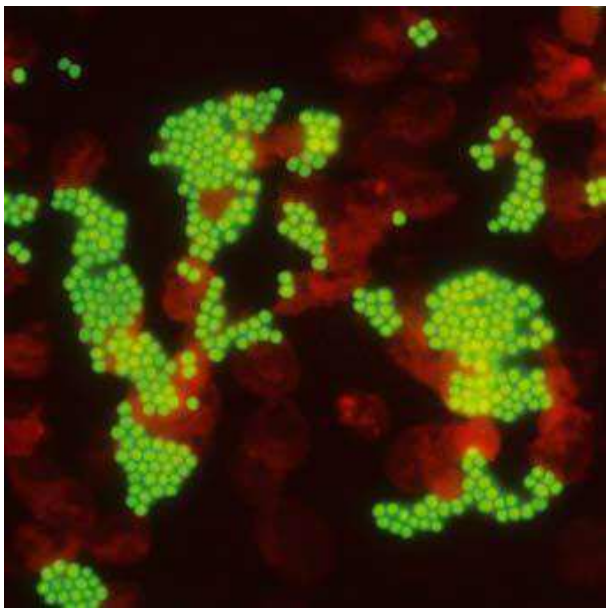
Isis Innovation recently signed a development and marketing licence deal with diagnostics company AdvanDx, for a technology which could cut the time needed to diagnose critical infections such as sepsis and bloodstream infections from days to hours.

Boston, Massachusetts based AdvanDx have signed a development agreement to take new generation peptide nucleic acids from Oxford and Chulalongkorn Universities, and use the unique properties of these molecules to develop new tests for the clinical diagnostic and hospital testing market places.

The company has also committed to exploring the novel peptide nucleic acid technology for use in medical therapeutics using antisense or RNAi approaches. Their specialist chemical expertise will greatly facilitate development in this context, and the deal allows sublicensing in this potentially highly lucrative area.

AdvanDx is a venture capital backed, private company with R&D facilities in the United States and Denmark, and sales and marketing operations covering the United States, Canada and Europe. The company develops and markets molecular-based, *in vitro* diagnostic tests, utilising the properties of modified nucleic acids to devise novel, more powerful and faster tests which aid in the diagnosis and prevention of infectious diseases. Many of their current products are peptide nucleic acid (PNA) probe based fluorescence *in-situ* hybridisation (FISH) assays. The rapid nature of these tests allow healthcare providers to make more informed therapy decisions early and improve the quality of both patient care and overall hospital operations. Clinical studies have shown that implementing the tests saved patient lives, reduced unnecessary antibiotic use, reduced patient length of stay and reduced overall hospital costs. Two additional AdvanDx PNA FISH tests based on current generation PNAs have recently received FDA 510(k) regulatory approval in the United States.

The Oxford technology is a modified backbone nucleic acid analogue, with an amino component, a novel peptide nucleic acid (PNA) chemistry. The new PNA consists of an alternate proline-aminocyclopentanecarboxylic acid oligomer. It is further modified with nucleobases to recognize specific sequence of DNA or RNA. DNA – newPNA hybrid duplexes are considerably more stable than the corresponding natural duplex, and have considerably greater specificity.



PNA probes are used by AdvanDx to make particularly effective probes and detection systems for pathogenic microbes. The tests are more rapid and effective than competitor probes. Here they show the presence of Staphylococcus aureus in a clinical sample. Image courtesy of AdvanDx.

The technology allows probe hybridisation, with high specificity and at low salt concentrations, with the affinity tailored to the specific application in question, no matter whether DNA or RNA is the preferred target. Fourteen granted patents cover this distinct and discrete technology in ten countries, giving broad and strong protection and making this a truly international deal.

The rapid nature of these tests allow healthcare providers to make more informed therapy decisions early and improve the quality of both patient care and overall hospital operations

CONTACT Dr David Phillips Project Manager T +44 (0)1865 280921 E david.phillips@isis.ox.ac.uk W www.isis-innovation.com

ASSIGNMENT AGREEMENT

FOR ASSIGNMENT TO RESEARCHERS

(OUI project 1175)

THIS AGREEMENT dated 19th April 2017 is made

BETWEEN:

(1) **Oxford University Innovation Limited**, a company registered in England under number 2199542 and whose registered office address is at the University Offices, Wellington Square, Oxford OX1 2JD, England (**"OUI"**); and

(2) **Dr Tirayut Vilaivan** whose residential address is 186 Soi Nakniwas 21, Ladprao Road, Bangkok 10330, Thailand (the **"Assignee"**).

AGREEMENT:

1 Interpretation

1.1 Words and expressions used in this agreement have the meaning set out in the schedule.

1.2 Any phrase introduced by the term "including", "including ", "in particular" or any similar expression will be construed as illustrative and will not limit the sense of the words preceding that term.

2 Assignment

In consideration of the covenant in clause 3 and subject to the conditions described in clause 4, OUI assigns to the Assignee with effect on and from the Effective Date, all its right, title and interest in and to:

2.1 the Technology and the Application;

2.2 such rights as OUI may have to sue for and obtain injunctive relief, damages and other relief in respect of any infringement or misuse of the Technology and the Application;

2.3 all copyright, design right and other intellectual and industrial property rights in the Technology and the Application to which OUI is now entitled under the laws in force in any part of the world, whether vested, future, contingent and including, any extensions, renewals, reversions and accrued rights of action; and

2.4 the right to apply for prosecute, defend, maintain and renew patent or other similar protection in any territory or group of territories in respect of the Technology, and the right to claim priority under the International Convention for the Protection of Industrial Property and under any other relevant international convention or treaty for each country of the union constituted by the relevant convention in which application may be made by the Assignees.

3 Patent Costs

3.1 The Assignee shall pay the Past Patent Costs to OUI. However, the Assignee is not obliged to pay these other than from any capital or income that may be earned from commercialising the Technology or Application ("revenue"). Acting in good faith at all times, for so long as any Past Patent Costs remain outstanding to OUI, the Assignee shall declare such revenue to OUI within one month of becoming entitled to it and pay 50% of the gross amount of the revenue in reimbursement of the Past Patent Costs. The Assignee shall not assign the Technology or Application in whole or part without making the assignment subject to this clause and any purported assignment made in breach of this obligation shall be invalid.

3.2 The Assignees shall, with effect on and from the Effective Date, be solely responsible for any costs incurred on and from the Effective Date in maintaining prosecuting, defending or renewing the Application and shall

indemnify OUI against these costs.

4 Licence Back to the University

The Assignees grant to OUI an irrevocable right in perpetuity for (i) the University and those persons who at any time work or have worked on the Technology to use the Technology for Academic and Research Purposes; and (ii) for those persons who at any time work or have worked on the Technology to use the same for the purpose of Clinical Patient Care. The right granted at (i) includes the right for the University to license the Technology to any of its collaborators in connection with and solely for the purposes of the University's Academic and Research Purposes; but it does not include the right to grant any licence to commercially exploit the Technology. For the purposes of this clause, "Academic and Research Purposes" means research, teaching or other scholarly use which is undertaken for the purposes of education and research and "Clinical Patient Care" means diagnosing, treating and/or managing the health of persons under the care of an individual having the right to use the Technology in the event that such Technology is capable of application in a healthcare setting without further development.

5 Undertakings by Assignee

5.1 The Assignee hereby irrevocably undertakes to OUI and to the University :

5.1.1 not to trade under or incorporate any company that is registered with or trades under any name which includes the word "Oxford";

5.1.2 to notify OUI if the Assignee trades or incorporates any company as a business to commercially exploit the Technology.

5.2 The Assignee acknowledges and agrees that the Technology is intellectual property generated within the University in which ownership has been claimed by the University in accordance with section 5(1) Statute XVI Part B of the University Statutes and Regulations and the University is entitled to a shareholding in any company incorporated for the commercial exploitation of the Technology. The Assignee undertakes that following notification of the incorporation of a company in accordance with 5.1.2 he/she will:

(a) enter into good faith negotiations with OUI to agree the percentage shareholding to be granted to the University in accordance with section 6(2) of Council Regulation 7 of 2002 of the University Statutes and Regulations in any such company incorporated to exploit the Technology; and

(b) do all things necessary to ensure that that company allots any percentage shareholding agreed to the University, issues a share certificate to the University and registers the University as the holder of those shares.

5.3 The Assignee agrees that if the shareholding to be allotted to the University in any company incorporated to exploit the Technology cannot be agreed with OUI in accordance with clause 5.2 the matter will be referred to an independent expert jointly appointed by the parties ("the Expert") who shall determine the percentage share of equity to be allotted to the University. The Expert will be appointed as an expert and not as an arbitrator and the Expert's decision shall be binding on the parties without right of appeal.

6 General

6.1 The parties to this agreement intend that by virtue of the Contract (Rights of Third Parties) Act 1999 the University and the people referred to in clause 4 will be able to enforce the terms of this agreement intended by the parties to be for their benefit as if the University and the people referred to in clause 4

were party to this agreement. Save as provided in this clause, the Contract (Rights of Third Parties) Act 1999 shall not give any third party any rights in respect of this agreement.

6.2 This agreement, is governed by English Law and the parties submit to the exclusive jurisdiction of the English Courts for the resolution of any dispute which may arise out of or in connection with this agreement save for injunctive relief which may be sought in any court of competent jurisdiction.

SCHEDULE

DEFINITIONS

Application	means International Patent application No PCT/GB2003/000465 which was filed on 4th February 2003 and entitled Pyrrolidinyl peptide nucleic acids
Effective Date	means the date of last signature of this agreement
Past Patent Costs	means the sum of £ 4891.30
Technology	means the invention described in the Application.
University	means the Chancellor, Masters and Scholars of the University of Oxford.

AS WITNESS the hands of the parties or their authorised signatories on the date first mentioned above.

SIGNED by **Dr TIRAYUT VILAIVAN**

Signature: Tirayut Vilai

Date: 7 June 2017

SIGNED for and on behalf of
OXFORD UNIVERSITY INNOVATION LIMITED:

Signature:

Name: Adam Stoten

Position: Chief Operating Officer

Date: 24 APRIL 2017

บันทึกข้อความ

ส่วนงาน สถาบันทรัพย์สินทางปัญญาแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทรศัพท์ 84195-6 โทรสาร 84181
ที่ ศธ 0512.302 / 251 / 2560 วันที่ 21 กรกฎาคม 2560
เรื่อง การพิจารณาของรับโอนสิทธิในสิทธิบัตร

เรียน ศาสตราจารย์ ดร. ธีรยุทธ วิไลวัลย์

ตามที่ Oxford University Innovation Limited มีความประสงค์โอนสิทธิความเป็นเจ้าของในสิทธิบัตรเลขที่ EP 1513871 B1 เรื่อง Pyrrolidinyl Peptide Nucleic Acids ซึ่งได้รับการจดทะเบียนในยุโรปทั้งหมด 10 ประเทศ กลับมาให้ท่านนั้น สถาบันฯ ได้ตรวจสอบและสืบค้นข้อมูลต่างๆที่เกี่ยวข้องทั้งในด้านค่าใช้จ่ายและความเป็นไปได้ในเชิงพาณิชย์ของเทคโนโลยี ทำให้สามารถสรุปประเด็นเพื่อใช้ประกอบการพิจารณารับโอนสิทธิ ดังต่อไปนี้

1. ผู้ทรงสิทธิจะต้องรับผิดชอบค่าใช้จ่ายในการต่ออายุสิทธิบัตรปีที่ 14 ซึ่งมีอัตราค่าธรรมเนียมรวมทั้ง 10 ประเทศ อยู่ที่ประมาณ 4,900 ปอนด์ หรือคิดเป็น 210,000 บาทโดยประมาณ โดยที่ค่าธรรมเนียมดังกล่าวยังไม่รวมถึงค่าปรับในการชำระเงินช้ากว่ากำหนด (ร้อยละ 50 ของค่าธรรมเนียมในแต่ละประเทศ) และค่าวิชาชีพในการดำเนินการ
2. การชำระค่าธรรมเนียมข้างต้นจะมีผลจนถึงวันที่ 4 กุมภาพันธ์ 2561 จากนั้นจะต้องชำระค่าธรรมเนียมเพิ่มเติมในปีถัดไป
3. ก่อนหน้านี้ Oxford University Innovation Limited ได้มีการติดต่อบริษัทชั้นนำด้านการวินิจฉัยด้วยโมเลกุลจำนวนกว่า 30 รายทั้งในประเทศที่มีการจดสิทธิบัตร โดยที่กว่า 10 ราย เป็นบริษัทชั้นนำในการสังเคราะห์ PNA จำนวนมากกว่า 30 ราย แต่พบว่า มีบริษัทเพียง 1 รายที่มีความสนใจ แต่ไม่มีความชำนาญในการผลิต PNA อีกทั้งส่วนใหญ่ประสบปัญหาในการควบคุมคุณภาพการผลิต

จากการพิจารณาตามประเด็นข้างต้นทางสถาบันฯ เห็นว่า การเป็นผู้ทรงสิทธิในสิทธิบัตรนี้อาจไม่คุ้มค่ากับผลประโยชน์ที่จะได้รับภายหลัง เนื่องจากมีค่าใช้จ่ายสูงและมีโอกาสนำไปใช้ประโยชน์ได้น้อย

จึงเรียนมาเพื่อทราบ

ขอแสดงความนับถือ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ดวงหทัย เพ็ญตระกูล)
ผู้อำนวยการ