

ตารางที่ 11 T_m และสมบัติเชิงแสงของ PNA6–8 และไฮบริดของมันกับดีเอ็นเอ

Entry	System	T_m (°C) ^a	Φ_F ^b	$I_{465}(ds)/I_{465}(ss)$	Note
1	PNA6	-	0.009	-	ss, AU ^{Py} C
2	PNA6+DNA6a	66.3	0.052	6.5	ds, complementary
3	PNA6+DNA6b	54.3	0.018	1.1	ds, C mismatch
4	PNA6+DNA6c	54.2	0.025	1.6	ds, G mismatch
5	PNA6+DNA6d	54.5	0.014	1.0	ds, T mismatch
6	PNA6+DNA6e	46.1	0.029	3.1	ds, indirect mismatched
7	PNA6+DNA6f	40.0	0.011	0.8	ds, double mismatched
8	PNA7	-	0.030	-	ss, AU ^{Py} T
9	PNA7+DNA7	- ^c	0.066	2.7	ds, complementary
10	PNA8	-	0.027	-	ss, TU ^{Py} T
11	PNA8+DNA8	- ^c	0.084	4.0	ds, complementary

^a conditions: 2.5 μ M PNA, 3.0 μ M DNA, 10 mM Sodium phosphate buffer pH 7.0

^b measured using quinine sulfate ($\Phi_F = 0.546$) as standard, $\lambda_{excit} = 350$ nm

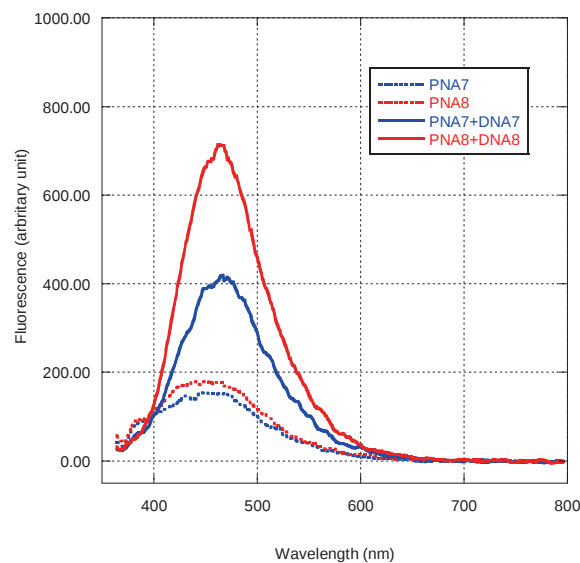
^c non-two-state melting curve

เมื่อพิจารณา absorption spectra ของ PNA6 และไฮบริดของมันกับ DNA6a–6d (รูปที่ 19 และตารางที่ 11) พบว่าสเปกตรัมในบริเวณการดูดกลืนของไพรีนของพีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอไฮบริดจะแตกต่างจากของพีเอ็นเอสายเดี่ยว และสเปกตรัมของไฮบริดที่เป็นคู่สม (DNA6a) จะแตกต่างจากกรณีที่เป็น single mismatched hybrid อย่างชัดเจน โดยในกรณีของไฮบริดที่เป็นคู่สมสเปกตรัมจะมี λ_{max} ที่เคลื่อนไปทางความยาวคลื่นที่เพิ่มขึ้น (bathochromic shift) เพียงเล็กน้อยและพีกมีลักษณะกว้างมากขึ้น ในขณะที่ไฮบริดที่ไม่เป็นคู่สมจะมีการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจนมาก คือจะมี bathochromic shift ที่ชัดเจนกว่า ($\lambda_{max} \sim 355$ nm) และเกิด hypochromism ด้วย ลักษณะการเกิด bathochromic shift และ hypochromism นี้เสนอแนะว่าหน่วยของไพรีนอาจเกิดการซ้อนทับ (stacking) กับคู่เบสที่อยู่ข้างเคียงได้ ซึ่งมีลักษณะใกล้เคียงกับที่พบในดีเอ็นเอที่มีเบส U^{Py} แต่ในกรณีของดีเอ็นเอที่เคยมีผู้ศึกษามาแล้วนั้นพบว่า U^{Py} ไม่แสดงสมบัติการเป็น BDF กล่าวคือไม่ว่าเบสที่อยู่ตรงข้ามกับ U^{Py} จะเป็นอะไรก็จะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ absorption และ fluorescence spectrum ในลักษณะเดียวกัน [Wanninger-Weiss and Wagenknecht, 2008] ซึ่งเสนอแนะว่าเบส U^{Py} ในดีเอ็นเอน่าจะอยู่ในลักษณะที่หันเอาด้านไพรีนเข้าไปซ้อนทับกับคู่เบสในทุกกรณี เนื่องจากพลังงานของระบบที่ลดลงจากการซ้อนทับกันนี้มีค่ามากกว่าพลังงานที่ลดลงจากการเกิดพันธะไฮโดรเจนและการซ้อนทับของส่วน U ในเบส U^{Py} กับคู่เบสอื่นที่อยู่ข้างเคียง (การเกิดพันธะไฮโดรเจนและการซ้อนทับกันของไพรีนกับคู่เบสไม่สามารถเกิดพร้อมกันได้เนื่องจากทั้งสองส่วนอยู่คนละด้านกันของโมเลกุล) แต่เบส U^{Py} ใน acpcPNA จะแสดงพฤติกรรมการซ้อนทับของไพรีนกับคู่เบสเฉพาะเมื่อเบสที่อยู่ตรงข้ามไม่ใช่ A ซึ่งบ่งชี้ว่าความแข็งแรงของคู่เบส U^{Py}-A ในระบบ acpcPNA มีมากกว่าดีเอ็นเอปกติ และทำให้มันสามารถแสดงสมบัติเป็น BDF ได้

เป็นที่น่าสังเกตว่าไฮบริดระหว่าง PNA6 กับดีเอ็นเอเป้าหมายเป็น single mismatched target แต่เบสที่ mismatched นั้นไม่ได้อยู่ตรงกันกับ U^{Py} เช่น DNA6e นั้นจะมีการเรืองแสงเพิ่มขึ้นอย่างมากเมื่อเทียบกับ PNA6 ที่เป็นสายเดี่ยว ทั้งๆ ที่ความเสถียรของ PNA6-DNA6e นั้นน้อยกว่า คู่ mismatched อื่นๆ ที่มีเบสที่ไม่เป็นคู่สม

ตรงกับตำแหน่งของ U^{Py} (พิจารณาจาก T_m) นอกจากนี้ electronic absorption spectrum ของไฮบริด **PNA6-DNA6e** จะมีลักษณะคล้ายคลึงกับของไฮบริด **PNA6-DNA6a** ซึ่งเป็นคู่สมกันมาก แสดงว่าการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงขึ้นกับการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง U^{Py} -A และการซ้อนทับกันของคู่เบส U^{Py} -A กับเบสข้างเคียงโดยไม่เกี่ยวข้องกับความเสถียรของไฮบริดที่เกิดขึ้นโดยรวม และเมื่อดีเอ็นเอเป้าหมายเป็น double mismatched DNA การเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงจะเป็นไปในทิศทางตรงกันข้าม กล่าวคือการเรืองแสงจะลดลงไปอีกเมื่อเทียบกับในสภาพที่เป็นสายเดี่ยว

ในอีกตัวอย่างหนึ่งที่แสดงให้เห็นความสามารถของ U^{Py} ในการเป็น BDF ในระบบของ acpcPNA ได้แก่ **PNA7** และ **PNA8** ซึ่งมีเบส U^{Py} อยู่ระหว่างเบส A/T และ T/T ตามลำดับ พบว่าในทั้งสองกรณีก็สังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงเช่นเดียวกัน (ตารางที่ 11 และรูปที่ 20) แม้ว่าการเพิ่มขึ้นจะไม่ชัดเจนเท่ากับในกรณีที่ผ่านมา เนื่องจากในกรณีนี้พีเอ็นเอในสภาพที่เป็นสายเดี่ยวทั้งสองตัวมีการเรืองแสงค่อนข้างสูง แสดงให้เห็นว่าการเรืองแสงของพีเอ็นเอในสภาพที่เป็นสายเดี่ยวก็น่าจะมีความสัมพันธ์กับลำดับเบสของมัน โดยอาจจะมีการจับคู่เบสที่ผิดปกติมากกว่าเฉพาะคู่เบสที่อยู่ติดกัน เนื่องจากเมื่อเทียบกับระหว่าง **PNA8** กับ **PNA1** ซึ่งมีคู่เบสที่อยู่ติดกับ U^{Py} เป็น T/T เหมือนกันแต่กลับมีการเรืองแสงในสภาพที่เป็นสายเดี่ยวแตกต่างกันมาก ขณะนี้กำลังอยู่ระหว่างการศึกษาค้นคว้าของลำดับเบสที่มีต่อการเรืองแสงทั้งของพีเอ็นเอสายเดี่ยวและเมื่อเป็นไฮบริดกับดีเอ็นเอ ซึ่งจะเป็นแนวทางในการพัฒนาพีเอ็นเอที่สามารถเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงได้อย่างชัดเจนมากยิ่งขึ้น



รูปที่ 20 Fluorescence spectra ของ **PNA7-8** และไฮบริดของมันกับ **DNA7-8** conditions: 2.5 μ M PNA, 3.0 μ M DNA, 10 mM Sodium phosphate buffer pH 7.0, λ_{excit} = 350 nm.

จากข้อมูลที่แสดงในข้างต้นทั้งหมดสามารถได้ข้อสรุปที่ชัดเจนว่าเบส U^{Py} สามารถทำหน้าที่เป็น BDF ในระบบ acpcPNA ได้ โดยที่ U^{Py} กับ A จะทำให้การเรืองแสงเพิ่มขึ้นตั้งแต่ 2.7 – 42 เท่า ขึ้นกับลำดับเบสของพีเอ็นเอ ในขณะที่การเข้าคู่ของ U^{Py} กับเบสอื่นจะมีผลให้มีการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงน้อยมาก จึงสามารถนำมาใช้เป็นโมเลกุลรีพอร์ตที่ ไม่ต้องอาศัยตัวดับการเรืองแสง (quencher) ซึ่งงานส่วนนี้ได้รับการตีพิมพ์แล้ว [Boonlua et al., 2011] งานที่ได้ทำต่อมาคือการศึกษาลำดับเบสของ acpcPNA ที่มี U^{Py} เบสเพิ่มเติมเพื่อที่จะหาความสัมพันธ์ระหว่างลำดับเบสกับการเรืองแสง ซึ่งจะนำไปสู่ความเข้าใจของกลไกของการเกิดการเปลี่ยนแปลง

การเรืองแสง และการพัฒนาพีเอ็นเอโพรบที่มีความแตกต่างของการเรืองแสงในสภาพที่เป็นสายเดี่ยวและเมื่อเกิดไฮบริดกับดีเอ็นเอได้ดียิ่งขึ้น

เมื่อพิจารณาข้อมูลการเรืองแสงของระบบพีเอ็นเอที่มี U^{py} เบสในสภาพที่เป็นสายเดี่ยวเทียบกับที่เป็นไฮบริดกับดีเอ็นเอคู่สมพบว่า ในกรณีที่มีการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงน้อยส่วนใหญ่จะเกิดจากการที่พีเอ็นเอในสภาพที่เป็นสายเดี่ยวมีการเรืองแสงค่อนข้างสูง ตัวอย่างเปรียบเทียบที่น่าสนใจคือ **PNA1** (TTTT U^{py} TTTT) และ **PNA8** (CTAAT U^{py} TCAGA) ซึ่งมีการเรืองแสงของพีเอ็นเอในสภาพที่เป็นสายเดี่ยวแตกต่างกันอย่างมาก (Φ_F (PNA8)/ Φ_F (PNA1) = 14 เท่า) ทั้ง ๆ ที่ เบส U^{py} ในพีเอ็นเอทั้งสองจะมี T เป็นเบสข้างเคียงเหมือนกัน แสดงว่าปัจจัยที่เป็นตัวกำหนดการเรืองแสงของ U^{py} ในพีเอ็นเอสายเดี่ยวอาจจะมีขอบเขตที่จะต้องพิจารณามากกว่าเฉพาะคู่เบสที่อยู่ติดกัน ซึ่งอาจไม่ใช่เรื่องที่น่าประหลาดใจนักเมื่อพิจารณาว่าพีเอ็นเอในสภาพที่เป็นสายเดี่ยวในสภาวะแวดล้อมที่เป็นน้ำน่าจะสามารพบัวเป็นโครงสร้างที่กระชับเพื่อลดอันตรกิริยาระหว่างนิวคลีโอเบสกับน้ำ ทำให้เบส U^{py} สามารถสัมผัสกับเบสตัวอื่นที่ไม่ใช่ nearest neighbour ได้

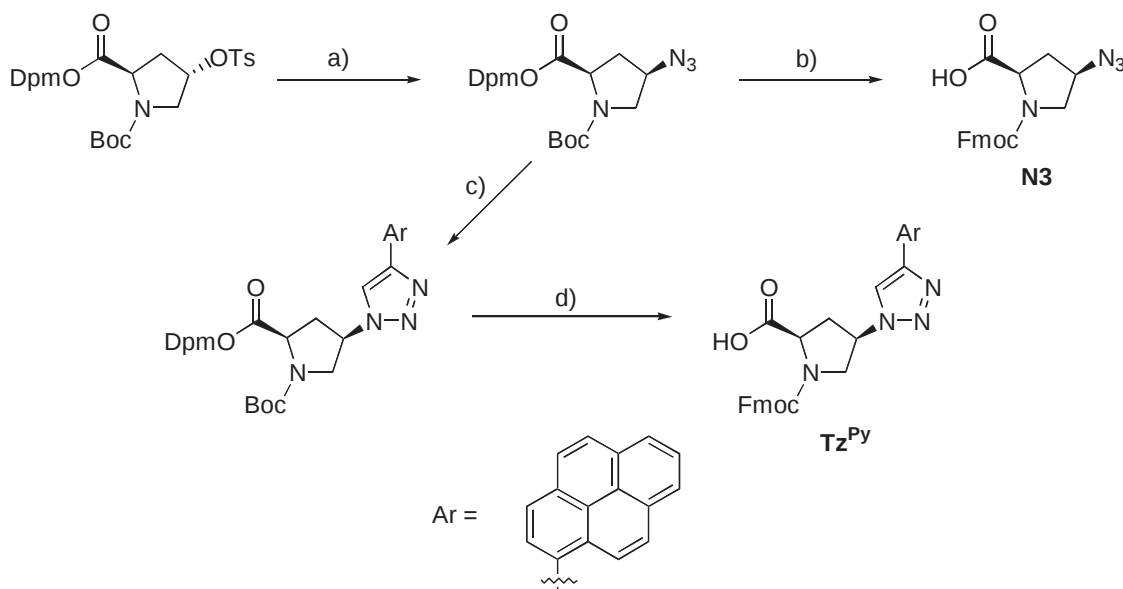
สิ่งที่ต้องทำความเข้าใจคือเบสแต่ละชนิดมีผลต่อการเรืองแสงของเบส U^{py} อย่างไร การที่ **PNA1** ซึ่งเป็น homothymine sequence มีการเรืองแสงที่ต่ำมาก (Φ_F (PNA1) = 0.006) แสดงให้เห็นว่าเบส T น่าจะเป็น quencher ที่สำหรับเบส U^{py} ในพีเอ็นเอสายเดี่ยว การทดลองที่ได้กระทำต่อมาคือการสังเคราะห์ acpcPNA ที่เป็น homo-sequence อื่นๆ ได้แก่ **PNA9** (AAAA U^{py} AAAA), **PNA10** (CCCC U^{py} CCCC) และ **PNA11** (GGGG U^{py} GGGG) อย่างไรก็ตาม พบว่าพีเอ็นเอทุกชนิดที่สังเคราะห์ได้ในสภาพสายเดี่ยวให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ไม่แตกต่างกันนัก โดยลำดับของความสว่าง (เทียบจากค่า Φ_F) จะเป็น $G > A > C > T$ แสดงว่าการที่พีเอ็นเอบางตัวเช่น **PNA7** และ **PNA8** มีความสว่างมากเป็นพิเศษในสภาพที่เป็นสายเดี่ยวไม่ได้ขึ้นกับลำดับเบสเท่านั้น แต่อาจมีปัจจัยอื่นเช่นการเกิด secondary structure มาเกี่ยวข้องด้วย ซึ่งเป็นสิ่งที่ควรจะต้องศึกษาต่อไป

2.4 Synthesis and Hybridization of PNA containing fluorescence universal base

Eric T. Kool ได้รายงานมาก่อนหน้านี้ว่าการแทนที่นิวคลีโอเบสในดีเอ็นเอด้วยอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนที่ไม่สร้างพันธะไฮโดรเจน เช่น ไพรีน จะทำให้ได้ดีเอ็นเอที่สามารถเกิดไฮบริดที่ค่อนข้างเสถียรได้ [Schweitzer and Kool, 1995] แสดงว่าอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนเหล่านี้ สามารถประพติดัวเลียนแบบดีเอ็นเอเบส แต่เนื่องจากการที่มันไม่สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนได้ มันจึงไม่น่าจะสามารถบอกความแตกต่างระหว่างเบสของดีเอ็นเออีกสายหนึ่งที่อยู่ตรงกันข้ามได้ และควรจะประพติดัวเป็นยูนิเวอร์แซลเบส โดยได้มีรายงานมาก่อนหน้านี้ในระบบ aegPNA ของ Nielsen ว่าพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนเช่น ไพรีน แอนทราซีน อะซีแนฟทีน สามารถเป็นยูนิเวอร์แซลเบสได้ [MacKinnon et al., 2007] สิ่งที่น่าสนใจคือพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนส่วนใหญ่สามารถเรืองแสงได้ และเป็นที่ทราบกันดีว่าการเรืองแสงของสารเหล่านี้ขึ้นกับสภาพแวดล้อมของตัวฟลูออโรฟอร์อย่างมาก ฟลูออโรฟอร์ที่อยู่ในดีเอ็นเอในสภาพที่เป็นสายเดี่ยวกับเกลียวคู่ควรจะอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกันและน่าจะแสดงการเรืองแสงที่ต่างกันด้วย แต่กลับไม่ค่อยมีผู้รายงานความสามารถในการเรืองแสงของพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนเหล่านี้เท่าใดนัก ในงานวิจัยนี้จะศึกษาความสามารถในการเป็นยูนิเวอร์แซลเบสของพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในระบบ acpcPNA และเปรียบเทียบการเรืองแสงของ acpcPNA ที่มีพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนอยู่ด้วยในสภาพที่เป็นสายเดี่ยวและเมื่อเกิดไฮบริดกับดีเอ็นเอ

ในการศึกษาระยะเริ่มต้นของงานวิจัยนี้จะเน้นไปที่การใช้ไพรีน ซึ่งมีผู้ศึกษามากพอสมควรในระบบของดีเอ็นเอเพื่อเป็นตัวแทนของพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน การสังเคราะห์ acpcPNA ที่มีไพรีนเป็นนิวคลีโอเบสจะต้องหาวิธีติดไพรีนเข้าไปตรงตำแหน่ง 4' ของวงแหวนฟิโรลิดีนแทนที่จะเป็นนิวคลีโอเบส โดยในที่นี้จะเลือกผ่านวงแหวนไตรอะโซลใช้ปฏิกิริยา Cu-catalyzed 1,3-dipolar cycloaddition (Click chemistry) ระหว่าง

protected 4-azidoproline กับ 1-ethynylpyrene ได้ผลิตภัณฑ์เป็น Tz^{Py} monomer วิธีการสังเคราะห์เป็นดังสรุปในรูปที่ 21



รูปที่ 21 วิธีการสังเคราะห์พีเอ็นเอโมโนเมอร์ Tz^{Py} และ **N3**; reagents and conditions: a) NaN_3 1.1 equiv, anhydrous K_2CO_3 1.2 equiv, dry DMF, 2-3 h, 70 °C under N_2 , 95%; b) i. TFA in anisole, 2 h, rt, ii. FmocOSu 0.9 equiv, NaHCO_3 2.5 equiv, $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O} = 1:1$, overnight, rt, quantitative yield; c) 1-Ethynylpyrene, CuI (15 mol%), DIEA 2 equiv, CH_3CN , 12 h, 80 °C, 57%; d) i. *p*-TsOH 3.2 equiv in CH_3CN , 3 h, rt, ii. FmocCl 1.3 equiv, DIEA 1.3 equiv, rt, 85%, iii. TFA: $\text{CH}_2\text{Cl}_2 = 1:1$ in anisole, 15 min, rt, 68%.

เมื่อได้ Tz^{Py} โมโนเมอร์แล้วจึงนำมาสังเคราะห์เป็น acpcPNA ที่มีลำดับเบสเป็น Bz-GCATT(Tz^{Py})AGATAC-LysNH₂ นอกจากนี้ยังได้สังเคราะห์ acpcPNA ที่มีเบส C แทนที่เบส Tz^{Py} (Bz-GCATTACAGATAC-LysNH₂) เพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบ โครงสร้างของพีเอ็นเอทั้งสองได้รับการยืนยันโดย MALDI-TOF mass spectrometry จากนั้นจึงได้ศึกษาความเสถียรของไฮบริดกับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกัน แต่มีเบสที่อยู่ตำแหน่งที่ตรงกับ Tz^{Py} /C เป็น A, G, C และ T ตามลำดับ ค่า T_m ที่ได้เป็นดังแสดงในตารางที่ 12

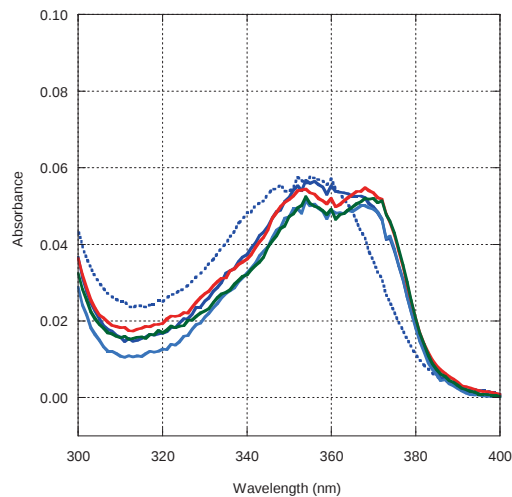
ข้อมูลจากตารางที่ 12 แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า Tz^{Py} สามารถประพติดัวเป็นยูนิเวอร์แซลเบส กล่าวคือไม่มีการเลือกเข้าคู่กับเบสธรรมชาติตัวใดตัวหนึ่ง ดังจะเห็นได้จากค่า T_m ที่ใกล้เคียงกันมากไม่ว่าเบสตรงข้ามจะเป็นเบสอะไร ($\Delta T_m = 1.7$ °C) ในขณะที่พีเอ็นเอที่มีเบส C แทนที่ตำแหน่งของ Tz^{Py} จะแสดงการเลือกจับกับเบส G อย่างชัดเจน ($\Delta T_m = 19.3$ °C) เนื่องจากไพร์มีสมบัติเรืองแสง จึงได้ศึกษาสมบัติเชิงแสงของไฮบริดระหว่าง Tz^{Py} พีเอ็นเอนี้กับดีเอ็นเอโดย absorption และ fluorescence spectroscopy ผลที่ได้เป็นดังแสดงในรูปที่

ตารางที่ 12 ข้อมูล T_m ของ PNA (GCATTAXAGATAC) และไฮบริดของมันกับ DNA (GTATCTYTAA TGC)

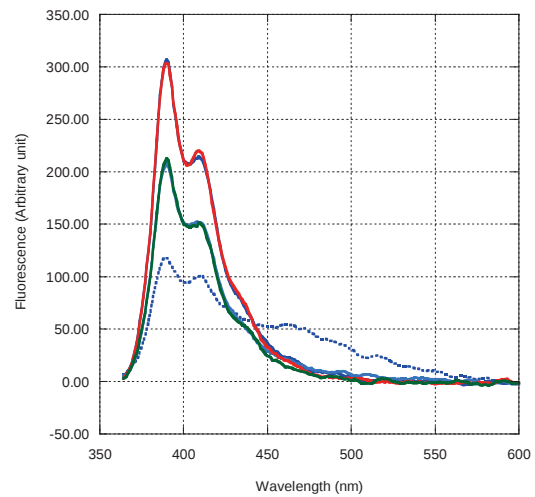
Entry	X in PNA	Y in DNA	T_m (°C) ^a	ΔT_m (°C) ^b
1	Tz^{Py}	A	69.0	1.7
2	Tz^{Py}	G	69.8	
3	Tz^{Py}	C	68.9	
4	Tz^{Py}	T	68.1	
5	C	A	72.0	19.3
6	C	G	85.0	
7	C	C	69.0	
8	C	T	65.7	

^a conditions: 2.5 μ M PNA, 3.0 μ M DNA, 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0

^b $\Delta T_m = T_m(\text{max}) - T_m(\text{min})$

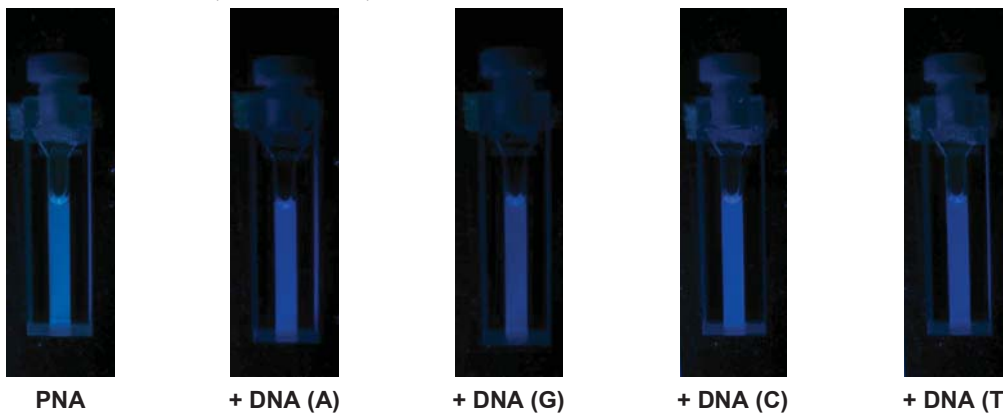


(A)



(B)

รูปที่ 22 Absorption (A) และ fluorescence (B) ของ **Tz^{Py} PNA** (.....) และไฮบริดกับ DNA Y = A (—), G (—), C (—), T (—) conditions: 2.5 μ M PNA, 3.0 μ M DNA, 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, λ_{excit} 350 nm.



PNA

+ DNA (A)

+ DNA (G)

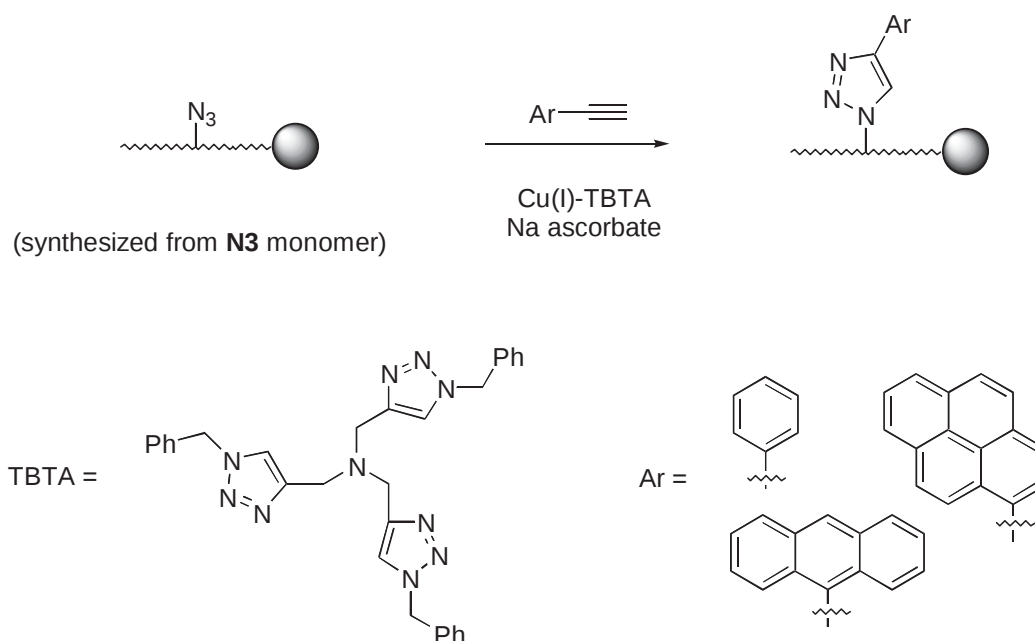
+ DNA (C)

+ DNA (T)

รูปที่ 23 ภาพถ่ายภายใต้ UV light เพื่อเปรียบเทียบการเรืองแสงของ **Tz^{Py} PNA** และไฮบริดของมันกับดีเอ็นเอ conditions: 2.5 μ M PNA, 3.0 μ M DNA, 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0.

เมื่อพิจารณาที่ absorption spectra ของ **Tz^{Py} PNA** จะเห็นแถบการดูดกลืนของไพรีนที่บริเวณ 352 nm ซึ่งมีลักษณะ broad ไม่แสดง fine structure ที่เป็นเอกลักษณ์ของไพรีน แสดงว่ามี electronic coupling ระหว่างไพรีนโครโมฟอร์กับนิวคลีโอเบสหรือกับไตรอะโซลที่ใช้เป็นตัวเชื่อม เมื่อเกิดเป็นไฮบริดกับดีเอ็นเอ ไม่ว่าจะมียุคที่ตรงกับไพรีนเป็นอะไรก็ตามก็จะมีผลเปลี่ยนแปลงของการดูดกลืนของไพรีนในลักษณะเดียวกันกล่าวคือจะเกิดการแยกออกของแถบการดูดกลืนเป็น 2 แถบ พร้อมทั้งมี bathochromic shift ไปที่ 352 และ 372 nm แสดงให้เห็นถึงสิ่งแวดล้อมของไพรีนโครโมฟอร์ที่เปลี่ยนแปลงไป ส่วน fluorescence spectrum ของ **Tz^{Py} PNA** แสดงสัญญาณที่ค่อนข้างอ่อนในช่วง ~390-430 nm โดยมี $\lambda_{\max}$ อยู่ที่ 388, 400 และ 430 nm ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของไพรีนโมโนเมอร์ นอกจากนี้ยังพบสัญญาณที่ค่อนข้าง broad ที่บริเวณ 460 nm ซึ่งน่าจะเกิดจาก exciplex ของไพรีนที่ยังไม่ทราบโครงสร้างแน่ชัด และยังอยู่ระหว่างการศึกษารายละเอียด ทำให้เห็นการเรืองแสงเป็นสีเขียว-ฟ้า (รูปที่ 23) แต่เมื่อเกิดการไฮบริดกับดีเอ็นเอ จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสเปกตรัมอย่างชัดเจน กล่าวคือ emission ในส่วนของไพรีนโมโนเมอร์จะเพิ่มขึ้นราว 2-3 เท่า และ emission ของ exciplex จะหายไป ทำให้การเรืองแสงเปลี่ยนเป็นสีออกน้ำเงินมากขึ้น ปรากฏการณ์นี้เกิดขึ้นกับดีเอ็นเอทุกตัว ซึ่งเป็นการยืนยันว่าไพรีนทำหน้าที่เป็นยูนิเวอร์แซลเบสโดยไม่เลือกจับกับเบสใดเบสหนึ่งเป็นพิเศษ

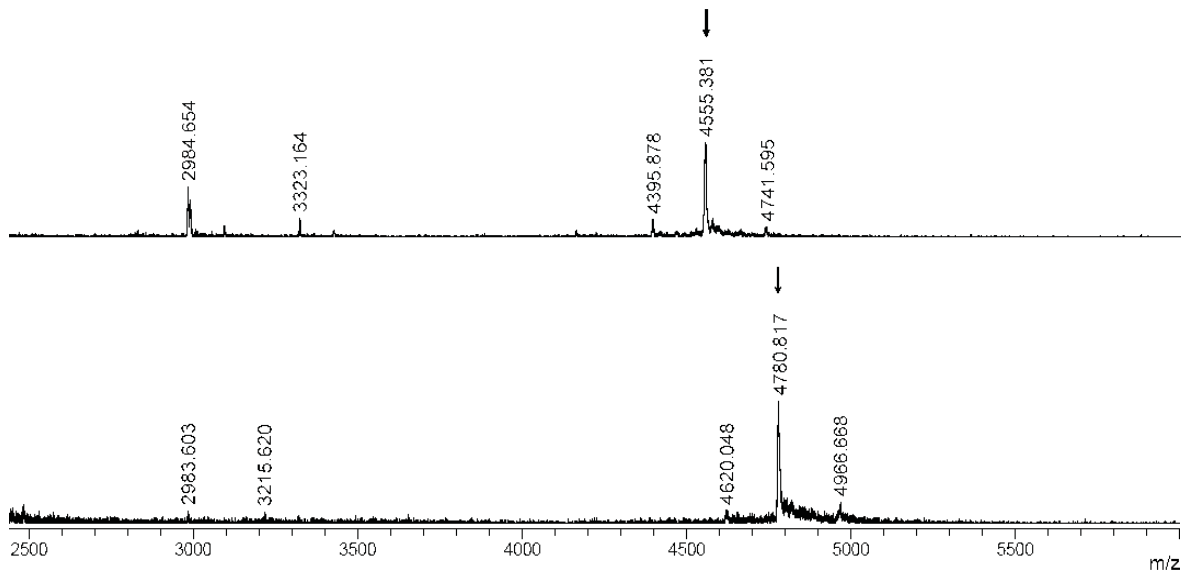
แม้ผลการทดลองเบื้องต้นจะเป็นที่น่าพอใจในแง่ที่ว่าไพรีนสามารถทำหน้าที่เป็นยูนิเวอร์แซลเบสในระบบ acpcPNA โดยค่า T_m ของไฮบริดของพีเอ็นเอที่มีไพรีนอยู่กับดีเอ็นเอคู่สมที่มีเบสตรงข้ามกับไพรีนเป็น A, T, C และ G มีความแตกต่างของค่า T_m น้อยมาก นอกจากนี้พีเอ็นเอที่มีไพรีนยูนิเวอร์แซลเบสยังแสดงความแตกต่างของการเรืองแสงในสภาพที่เป็นสายเดี่ยวและเมื่อเกิดไฮบริดกับดีเอ็นเอ แต่ก็ยังต้องมีการศึกษาต่ออีกมากในแง่ของกลไกของการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสง และอิทธิพลของเบสข้างเคียงที่อาจมีต่อการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสง อย่างไรก็ตาม การศึกษาโดยละเอียดจำเป็นจะต้องใช้พีเอ็นเอในปริมาณมาก ซึ่งต้องอาศัยการพัฒนาวิธีการสังเคราะห์ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นโดยแนวทางคือการการดัดส่วนของไพรีน หรืออะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนชนิดอื่น ลงไปโดยตรงบนพีเอ็นเอที่มีไฮโดรเจนโมโนเมอร์ ผ่าน click reaction (post-synthetic modification) [Bonger et al., 2010]



รูปที่ 24 วิธีการสังเคราะห์ acpcPNA ที่มี modified triazole base โดยผ่าน post-synthetic click reaction

งานวิจัยที่ได้ทำต่อมาจึงเน้นไปที่การพัฒนาวิธีการสังเคราะห์พีเอ็นเอที่มีเบส Tz^{Py} ที่มีประสิทธิภาพมากขึ้นโดยการติดส่วนของไพรีน หรือพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนชนิดอื่นลงไปโดยตรงบนพีเอ็นเอที่มีหมู่เอไซด์อยู่ด้วยผ่าน post-synthetic click reaction (รูปที่ 24) ซึ่งวิธีการดังกล่าวจะทำให้สามารถติดส่วนของเบสเรืองแสงที่หลากหลายเข้าไปที่พีเอ็นเอได้โดยไม่ต้องสังเคราะห์โมโนเมอร์ขึ้นมาก่อน และสามารถทำได้โดยตรงบนนิวคลีโอไทด์ของแข็งซึ่งสะดวกมากในทางปฏิบัติ

เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ของการสังเคราะห์พีเอ็นเอที่มีเบส Tz^{Py} ตามหลักการดังกล่าวข้างต้นจึงได้ทดลองทำปฏิกิริยาลิกของเอไซด์พีเอ็นเอที่มีลำดับเบสผสมและมีความยาว 13 เบส (Bz-GCATTTA(N₃)AGATAC-LysNH₂) กับ 1-ethynylpyrene บนนิวคลีโอไทด์ของแข็ง ผลการติดตามการเกิดปฏิกิริยาโดยเทคนิค MALDI-TOF mass spectroscopy (รูปที่ 25) เสนอแนะว่าปฏิกิริยา click เกิดอย่างสมบูรณ์ให้ผลิตภัณฑ์เป็น Bz-GCATTTA(Tz^{Py})AGATAC-LysNH₂ โดยไม่มีเอไซด์พีเอ็นเอเหลือ และไม่มีการเกิดปฏิกิริยาข้างเคียงอื่น



รูปที่ 25 MALDI-TOF แมสสเปกตรัมของพีเอ็นเอก่อน (บน) และหลังปฏิกิริยาลิกกับ 1-ethynylpyrene (MW 226.3) (ล่าง) บนนิวคลีโอไทด์ของแข็ง พิกของสารที่สนใจแสดงโดยลูกศรชี้

ตารางที่ 13 ลำดับเบส มวลโมเลกุล และปริมาณผลผลิตของพีเอ็นเอที่สังเคราะห์โดยกระบวนการ post-synthetic click reaction

Entry	Sequence ^a	<i>m/z</i> (calcd.) ^b	<i>m/z</i> (found) ^c	isolated yield (%)
GCATTYXYGATAC				
1	X = Tz^{Py} ; Y = A	4779.2	4779.4	4.38
2	X = Tz^{Py} ; Y = T	4761.2	4762.8	5.13
3	X = Tz^{Ph} ; Y = T	4637.0	4638.2	2.12
4	X = Tz^{An} ; Y = T	4737.1	4738.2	2.79

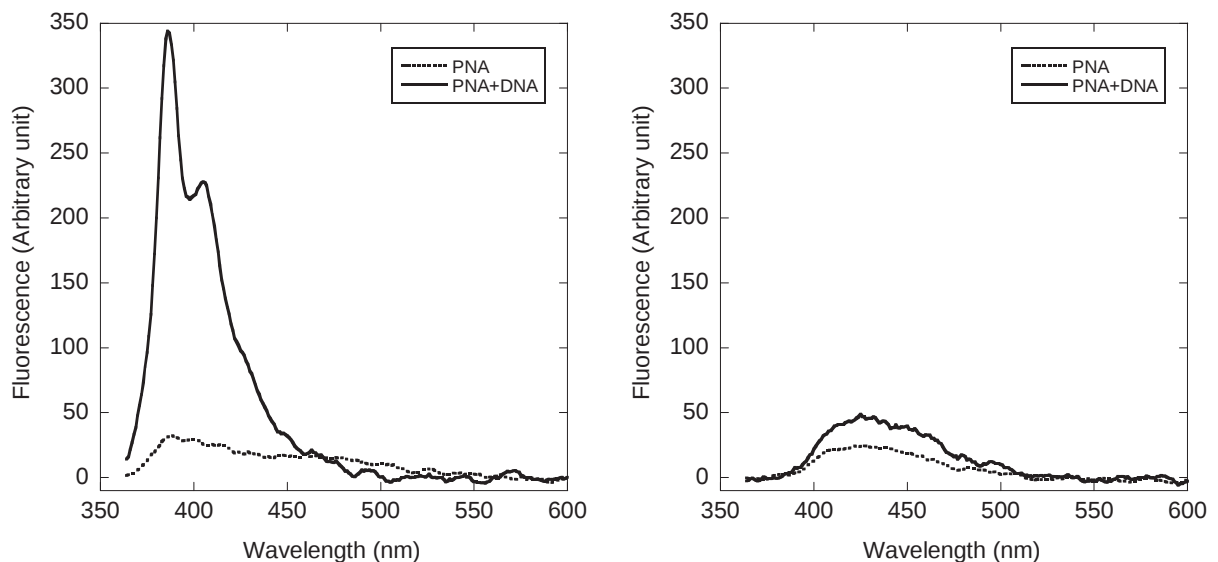
^a All sequences were N-terminal benzoylated, C-terminal L-lysine capped.

^b Average mass calculated for $[M+H]^+$.

^c MALDI-TOF, CCA matrix, linear mode.

จากนั้นจึงได้นำวิธีการนี้ไปสังเคราะห์พีเอ็นเอตัวอื่นๆ โดยพีเอ็นเอที่ได้สังเคราะห์ตามวิธีการ post-synthetic click reaction ดังกล่าวเป็นดังสรุปในตารางที่ 13

PNA ที่มีหมู่ Tz^{Ph} (GCATTTT Tz^{Ph} TGATAC) ไม่แสดงการเรืองแสงทั้งในสภาพที่เป็นสายเดี่ยวและเมื่อมีดีเอ็นเอคู่สมอยู่ด้วย PNA ที่มีหมู่ Tz^{An} (GCATTTT Tz^{An} TGATAC) (Tz^{An}) ในสภาพที่เป็นสายเดี่ยวแสดงการเรืองแสงที่ต่ำ โดยมี emission peak ที่มีลักษณะ broad และ unstructured โดยมี λ_{max} อยู่ที่ 425 nm ซึ่งน่าจะเป็นของ exciplex และพบว่าการเรืองแสงเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย (~ 2 เท่า) เมื่อมีดีเอ็นเอคู่สมอยู่ด้วย โดยไม่เห็นการเรืองแสงเพิ่มเติมที่ความยาวคลื่นอื่น ส่วน PNA ที่มีหมู่ Tz^{Py} (GCATTTT Tz^{Py} TGATAC) ในสภาพสายเดี่ยวมีการเรืองแสงที่ต่ำ และพบทั้ง emission ของ pyrene monomer (388 nm) และ exciplex (~ 460 nm) แต่เมื่อเกิดไฮบริดกับดีเอ็นเอคู่สมจะมีการเพิ่มขึ้นของ monomer emission ถึงเกือบ 11 เท่า และ exciplex emission จะลดลงเล็กน้อย ซึ่งสอดคล้องกับผลของ Tz^{Py} PNA ที่ได้ศึกษามาก่อนหน้านี้ แสดงว่าการเปลี่ยนแปลงของ monomer/exciplex emission ของเบส Tz^{Py} นี้สามารถเกิดได้ทั้งเมื่อเบสข้างเคียงเป็น A/A และ T/T (รูปที่ 26)



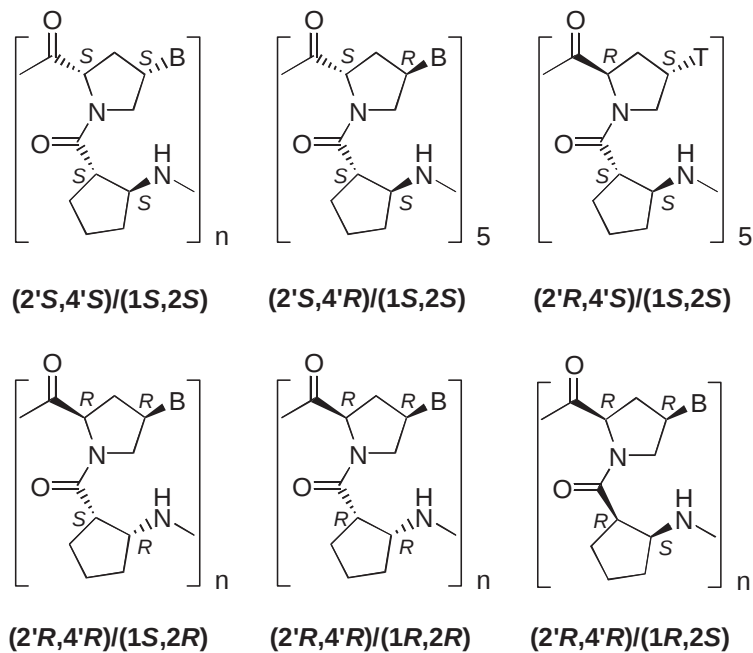
รูปที่ 26 ฟลูออเรสเซนส์สเปกตรัมของ Tz^{Py} PNA (GCATTTT Tz^{Py} TGATAC) (a) และ Tz^{An} PNA (GCATTTT Tz^{An} TGATAC) (b) ในสภาพที่เป็นสายเดี่ยว (—) และเมื่อมีดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สม (---) (5'-GTATCAGAAATGC-3') อยู่ด้วย (conditions: 2.5 μ M PNA, 3.0 μ M DNA in 10 mM sodium phosphate buffer pH=7.0, λ_{excit} = 350 nm).

ผลการทดลองทั้งหมดได้แสดงถึงวิธีการสังเคราะห์และศักยภาพของการประยุกต์ใช้ clicked polycyclic aromatic hydrocarbon เพื่อเป็น fluorescence artificial nucleobase ในระบบ acpcPNA ที่แสดงการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงที่ตอบสนองต่อการเกิดไฮบริดกับดีเอ็นเอ ซึ่งค่อนข้างเสร็จสมบูรณ์แล้ว และได้รับการตีพิมพ์เรียบร้อยแล้ว [Mansawat et al., 2012a]

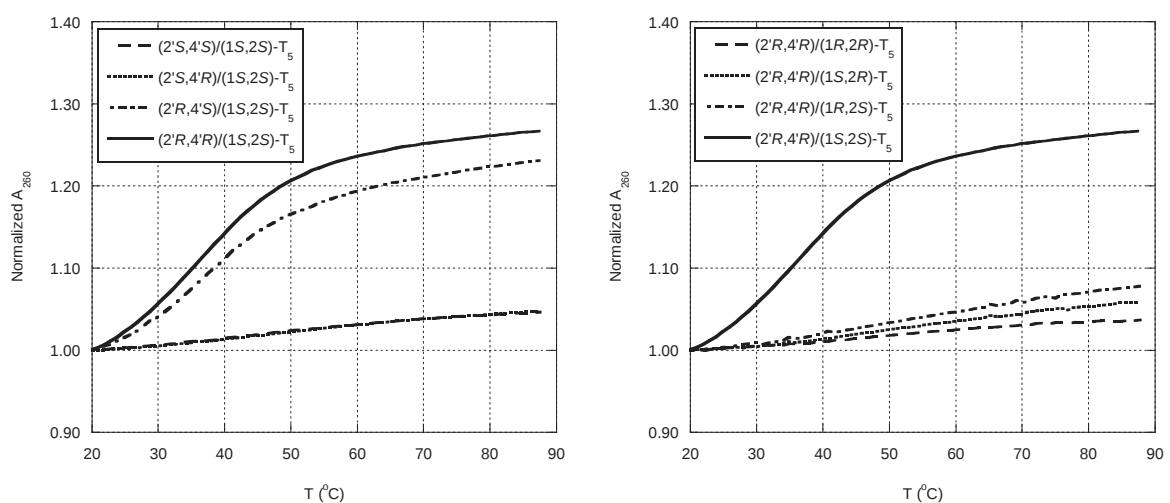
3. การสังเคราะห์และศึกษาสมบัติจับยึดของพีเอ็นเอที่มี modified backbone

3.1 PNA with alternative configuration of the pyrroldine ring

งานวิจัยที่ผ่านมาของกลุ่มได้เน้นการสังเคราะห์และศึกษาสมบัติการจับยัดของ acpcPNA ที่มีคอนฟิกรูเรชันเป็น (2'R,4'R)-prolyl-(1S,2S)-ACPC เป็นหลัก ซึ่งการที่เลือกศึกษาไอโซเมอร์นี้ได้มาจากการสังเคราะห์และเปรียบเทียบสมบัติการจับยัดกับดีเอ็นเอของพีเอ็นเอไดอะสเตอร์ไอโซเมอร์ต่างๆ โดยเลือก optimize โครงสร้างส่วนวงแหวนพิโรลิดีนและส่วน spacer แยกกันทำให้สามารถลดจำนวนสเตอริโอไอโซเมอร์ที่ต้องสังเคราะห์และทดสอบสมบัติการจับยัดจากทั้งสิ้น 16 ไดอะสเตอร์ไอโซเมอร์เหลือเพียง 7 ไดอะสเตอร์ไอโซเมอร์ โดยโครงสร้างของสเตอริโอไอโซเมอร์อื่นที่นอกเหนือจากระบบ (2'R,4'R)-prolyl-(1S,2S)-ACPC ที่ได้ศึกษาโดยละเอียดไปแล้ว เป็นดังแสดงในรูปที่ 27



รูปที่ 27 ไดอะสเตอร์ไอโซเมอร์ของพีเอ็นเอที่ได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมนอกเหนือจาก RR-Pro/SS-ACPC (acpcPNA)



รูปที่ 28 T_m curve ของ PNA T_5 กับ poly(dA), T_m measured at 1 μ M duplex concentration, 10 mM Sodium phosphate buffer pH 7.0, 100 mM NaCl, heating rate 1 $^{\circ}$ C/min.

ในงานวิจัยได้สังเคราะห์พีเอ็นเอที่เหลืออีก 6 ไตอะสเตอร์โอเมอร์ที่มีลำดับเบสเป็น T₅ และนำไปศึกษาสมบัติการจับยัดกับดีเอ็นเอคู่สม ซึ่งในที่นี้ใช้ poly(dA) ซึ่งสามารถเกิดไฮบริดที่เสถียรกว่า dA₅ เนื่องจาก end-stacking effect เป็นตัวแทนของ DNA ผลการวัดค่า T_m พบว่านอกเหนือจาก (2'R,4'R)-prolyl-(1S,2S)-ACPC-PNA (acpcPNA) ที่เป็นระบบที่ได้ศึกษามาอย่างละเอียดแล้ว ก็ยังมีอีกไตอะสเตอร์โอเมอร์หนึ่งคือ (2'R,4'S)-prolyl-(1S,2S)-ACPC PNA (*epi*-acpcPNA) ที่แสดงสมบัติการจับยัดกับดีเอ็นเอเช่นเดียวกัน (รูปที่ 29)

การที่ *epi*-acpcPNA สามารถจับยัดกับดีเอ็นเอได้ไม่ใช่เรื่องที่เกินความคาดหมายนักเมื่อพิจารณาว่าการเปลี่ยนคอนฟิกรูชันของคาร์บอนที่ตำแหน่ง 4 ในวงแหวนพิโรลิดีนไม่ได้เปลี่ยน overall configuration ของ PNA backbone ไปจาก acpcPNA แต่ประการใด เนื่องจากคาร์บอนดังกล่าวไม่ได้เป็นส่วนหนึ่งของ backbone โดยตรง นอกจากนี้ยังได้มีผู้รายงานวาทีเอ็นเอที่ประกอบด้วยแอลฟาอะโนเมอร์ริโนคลีโอไซด์ (α -DNA) ซึ่งมีคอนฟิกรูชันของอะโนเมอร์ริคาร์บอนตรงกันข้ามกับดีเอ็นเอปกติ (β -DNA) ยังสามารถจับยัดกับดีเอ็นเอได้อย่างแข็งแรง และที่น่าสนใจกว่านั้นคือ α -DNA จับกับ β -DNA เกิดเป็น duplex ที่มีทิศทางของดีเอ็นเอทั้งสองสายจัดเรียงตัวในลักษณะ parallel แทนที่จะเป็น antiparallel เหมือน duplex ที่เกิดจาก β -DNA ตามปกติ [Morvan et al., 1987] ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงได้ทดลองสังเคราะห์ และศึกษาสมบัติการจับยัดกับดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ และการเกิด self hybrid ของ *epi*-acpcPNA โดยคาดหวังว่าจะได้ระบบพีเอ็นเอใหม่ที่มีสมบัติการจับยัดที่แตกต่างไปจากระบบเดิม ซึ่งอาจนำไปสู่การประยุกต์ใช้งานในวัตถุประสงค์ที่แตกต่างกัน

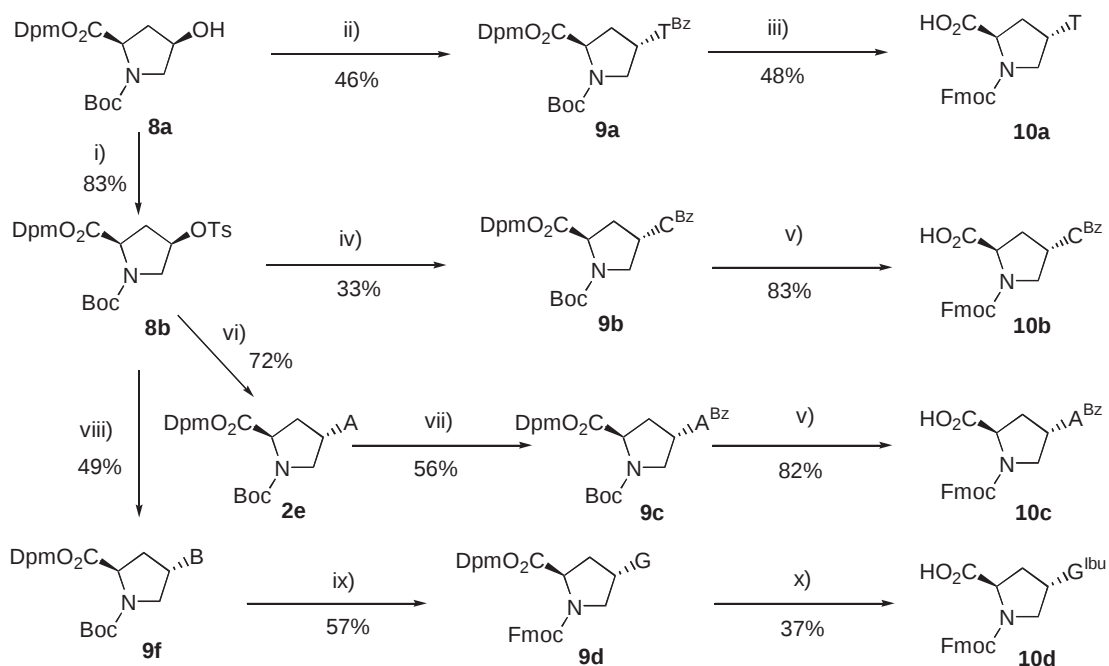
จากผลการทดลองที่เป็นบวกเบื้องต้นนี้ทำให้กลุ่มวิจัยหันมาศึกษาสมบัติการจับยัดดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอของ *epi*-acpcPNA มากขึ้น โดยเริ่มต้นจากการสังเคราะห์พีเอ็นเอโมโนเมอร์ทั้งสี่ชนิด (A, T, C และ G) ที่มีคอนฟิกรูชันของวงแหวนพิโรลิดีนเป็น (2'R,4'S) โดยเริ่มต้นจาก protected *cis*-4-hydroxy-D-proline (**8a**) ตามวิธีการดังที่สรุปในรูปที่ 29 พีเอ็นเอโมโนเมอร์ดังกล่าวสามารถนำไปสังเคราะห์เป็นพีเอ็นเอที่มีคอนฟิกรูชันของวงแหวนพิโรลิดีนเป็น (2'R,4'S) ได้โดยวิธี Fmoc solid phase peptide synthesis มาตรฐานตามที่ได้เคยทำกับ acpcPNA [Vilaivan and Srisuwannaket, 2006] และได้สังเคราะห์พีเอ็นเอใหม่ขึ้นมา 3 ชนิดดังแสดงในตารางที่ 14 นอกจากนี้ยังได้สังเคราะห์ acpcPNA ที่มีลำดับเบสเดียวกันด้วยเพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ

ตารางที่ 14 ข้อมูลลำดับเบสและ *m/z* ของ *epi*-acpcPNA ที่สังเคราะห์ได้

PNA	sequence (N→C)	length (bases)	<i>m/z</i> (calcd.) ^a	<i>m/z</i> (found) ^b
RS-T₉	Lys-TTTTTTTT-LysNH ₂	9	3266.15	3265.58
RS-mix	Bz-GTAGATCACT-LysNH ₂	10	3620.91	3618.85
RS-sc	Ac-CGCGAATTCGCG-LysNH ₂	12	4233.18	4234.54

^a Average mass

^b MALDI-TOF, linear mode, CCA matrix



B = 2-chloro-6-aminopurin-9-yl

- i) TsCl, Et₃N, cat. DMAP, CH₂Cl₂, rt, 4 h
 ii) N³-BzT, Ph₃P, DIAD, THF, 0 °C-rt, O/N
 iii) a) TsOH, MeCN, rt, 3h b) FmocCl, DIEA, rt, 1 h
 c) TFA, anisole, rt, O/N
 iv) N⁴-BzC, K₂CO₃, DMF, 80 °C, 8 h
 v) a) TFA, anisole, rt, 3 h
 b) FmocOSu, NaHCO₃, aq. MeCN, O/N
 vi) adenine, K₂CO₃, DMF, 80 °C, 6 h
 vii) a) BzCl, pyridine, 0 °C, 2h b) aq. NH₃, MeOH, rt
 viii) 2-amino-6-chloropurine, K₂CO₃, DMF, 80 °C, 2 h
 ix) a) TFA, rt, 2 h b) 2M HCl, reflux, 2 h
 c) FmocOSu, NaHCO₃, aq. MeCN, rt, O/N
 d) Ph₂CHN₂, EtOAc-MeOH, rt, 2 h
 x) a) IbuCl, pyridine, 0 °C-rt, O/N b) TFA, 1 h

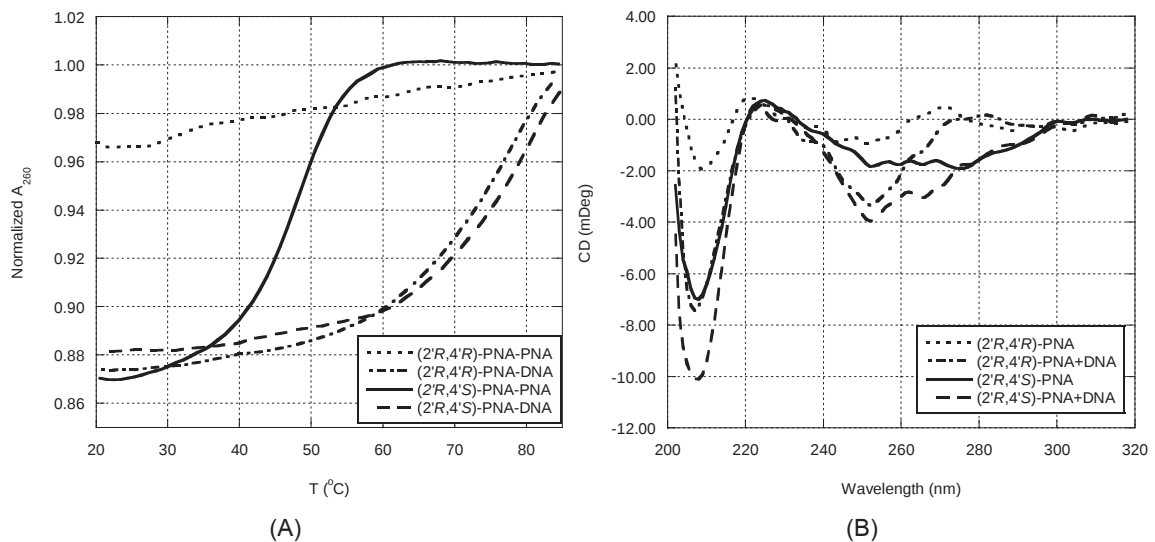
รูปที่ 29 แสดงการสังเคราะห์พีเอ็นเอโมโนเมอร์ทั้ง 4 ชนิดของ RS-Pro/SS-ACPC PNA (*epi-acpcPNA*)

ตารางที่ 15 T_m ของไฮบริดระหว่างพีเอ็นเอ RS-mix และ DNA/RNA

DNA/RNA sequence (5'→3')	T_m (°C) ^a acpcPNA (2'R,4'R)	T_m (°C) ^a <i>epi</i> -acpcPNA (2'R,4'S)	Note
dAGTGATCTAC	53.3	50.8	antiparallel, perfect matched
dAGTG <u>C</u> TCTAC	23.8	26.5	antiparallel, single mismatched
dAGTG <u>T</u> TCTAC	29.4	27.4	antiparallel, single mismatched
dAGTG <u>G</u> TCTAC	23.9	28.1	antiparallel, single mismatched
dCATCTAGTGA	<20	<20	parallel, perfect matched
rAGUGAUCUAC	42.3	40.7	antiparallel, perfect matched
rCAUCUAGUGA	<20	<20	parallel, perfect matched

^a T_m measurements were carried out at 1 μM PNA and 1 μM DNA in 10 mM Sodium phosphate buffer pH 7.0, 100 mM NaCl

การศึกษาการจับยัด กับ DNA ของ acpcPNA (2'R,4'R) และ epi-acpcPNA (2'R,4'S) เปรียบเทียบกัน ด้วยการวัด T_m แสดงให้เห็นว่าพีเอ็นเอทั้งสองระบบแสดงการจับยัดกับดีเอ็นเอที่แข็งแรงใกล้เคียงกัน ตัวอย่างเช่น ไฮบริดระหว่าง epi-acpcPNA **RS-T₉** กับ dA₉ มีค่า T_m เท่ากับ 67.8 °C ซึ่งต่ำกว่าของ acpcPNA ที่มีลำดับเบสเดียวกัน (72.9 °C) เพียงเล็กน้อยเท่านั้น เมื่อศึกษาในระบบที่เป็นเบสผสม (**RS-mix**) (ตารางที่ 15) ก็ให้ผลสอดคล้องกัน โดยจะสังเกตเห็นว่าพีเอ็นเอทั้งสองระบบแสดงความแข็งแรงและความจำเพาะเจาะจงของการจับยัดกับดีเอ็นเอที่สูง โดยระบบ epi-acpcPNA จะมีความแข็งแรงและความจำเพาะเจาะจงต่อดีเอ็นเอที่ต่ำกว่า ระบบ acpcPNA เล็กน้อย เป็นที่น่าสังเกตว่าพีเอ็นเอทั้งสองระบบจดจำเฉพาะดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สมในทิศทาง antiparallel เท่านั้น ซึ่งต่างจาก α -anomeric DNA ที่จะจดจำเฉพาะดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สมในทิศทาง parallel และเมื่อเปรียบเทียบในแง่ของความสามารถในการจดจำ RNA พบว่า epi-acpcPNA มีความจำเพาะในการจดจำ DNA ได้เหนือกว่า RNA เช่นเดียวกับ acpcPNA



รูปที่ 30 (A) T_m curves (B) CD spectra ของ self complementary acpcPNA (2'R,4'R) และ epi-acpcPNA (2'R,4'S) ที่มีลำดับเบสตรงกับ **RS-sc** ในตารางที่ 15 เมื่อไม่มี และมี DNA เป้าหมายอยู่ด้วย; conditions: 1 μ M duplex concentration, 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, 100 mM NaCl.

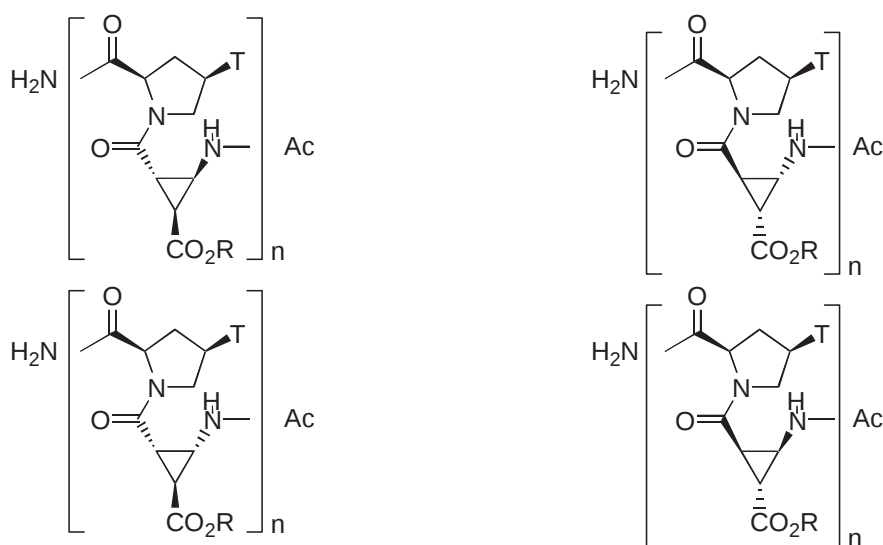
ผลการทดลองทั้งหมดข้างต้นแสดงให้เห็นว่า epi-acpcPNA แสดงการจดจำดีเอ็นเอที่คล้ายคลึงกับ acpcPNA แต่เมื่อพิจารณาถึงสมบัติการเข้าคู่กันเองของพีเอ็นเอทั้งสองระบบพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน กล่าวคือใน acpcPNA นั้นได้เป็นที่ยืนยันจากงานวิจัยก่อนหน้านี้แล้วว่า ไม่สามารถเกิด self hybrid ได้ระหว่างพีเอ็นเอสองสายที่มีลำดับเบสคู่สมกัน แต่ในระบบ epi-acpcPNA กลับพบว่าสามารถเกิด self hybrid ที่ค่อนข้างเสถียรได้ ถ้าพีเอ็นเอทั้งสองสายมีทิศทาง antiparallel ซึ่งกันและกัน โดยพีเอ็นเอ **RS-sc** ซึ่งเป็น self-complementary sequence ของ epi-acpcPNA จะแสดง sigmoidal transition เมื่อนำไปให้ความร้อนและติดตามการเปลี่ยนแปลงของ UV absorbance ที่ 260 nm (T_m ~47.8 °C) ในขณะที่ acpcPNA ที่มีลำดับเบสเดียวกันไม่แสดงพฤติกรรมเช่นนั้น (รูปที่ 30A) จึงแสดงให้เห็นว่าเฉพาะ epi-acpcPNA เท่านั้นที่สามารถเกิดเป็น antiparallel PNA-PNA homoduplex แต่เมื่อเติมดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมลงไป พบว่าในทั้งสองกรณีจะทำให้เกิด PNA-DNA heteroduplex ดังจะเห็นได้จาก sigmoidal curve ที่มี T_m ~ 77.0 (**RR-sc**) และ 78.6 °C (**RS-sc**)

นอกจากนี้ยังสามารถยืนยันการเกิด PNA·PNA homoduplex เฉพาะกรณีระบบของ *epi-acpcPNA* ได้จาก CD spectroscopy (รูปที่ 30B)

แม้สมบัติการจดจำกับดีเอ็นเออย่างแข็งแรงและจำเพาะเจาะจงของ *epi-acpcPNA* อาจไม่ใช่เรื่องสำคัญมากนักเนื่องจากเป็นสมบัติที่ *acpcPNA* มีอยู่แล้ว แต่สิ่งที่น่าสนใจกว่าคือการที่ *epi-acpcPNA* สามารถเกิด self hybrid ได้ ซึ่งแตกต่างจาก *acpcPNA* อย่างชัดเจน และอาจนำไปสู่การประยุกต์ใช้ที่แตกต่างกันของพีเอ็นเอทั้งสองระบบ โดย *acpcPNA* น่าจะเหมาะสำหรับ applications ที่เกี่ยวกับ DNA ที่ไม่ต้องการการเกิด self hybrid เช่น การ target cellular DNA ด้วย double duplex invasion mechanism [Lohse et al., 1999] ในขณะที่ *epi-acpcPNA* น่าจะเหมาะสมกับการนำไปใช้ทางด้านนาโนเทคโนโลยี/เครื่องมือระดับโมเลกุลที่อาศัยการจดจำระหว่างพีเอ็นเอสองสาย [Gothlef et al., 2005] จากข้อมูลที่มีอยู่ในปัจจุบันยังไม่สามารถอธิบายปัจจัยในระดับโมเลกุลที่ส่งผลถึงความแตกต่างของสมบัติการเกิด self hybrid ของพีเอ็นเอทั้งสองระบบได้ แต่อย่างน้อยที่สุดคำอธิบายที่ว่า *acpcPNA* ไม่สามารถเกิด self hybrid ได้ด้วยปัจจัยทางสเตอริกเป็นหลักนั้นไม่น่าจะถูกต้อง ผลงานส่วนนี้ได้รับการตีพิมพ์แล้ว [Taechalerpaisarn et al., 2010]

3.2 PNA incorporating β -amino acids other than ACPC in the backbone

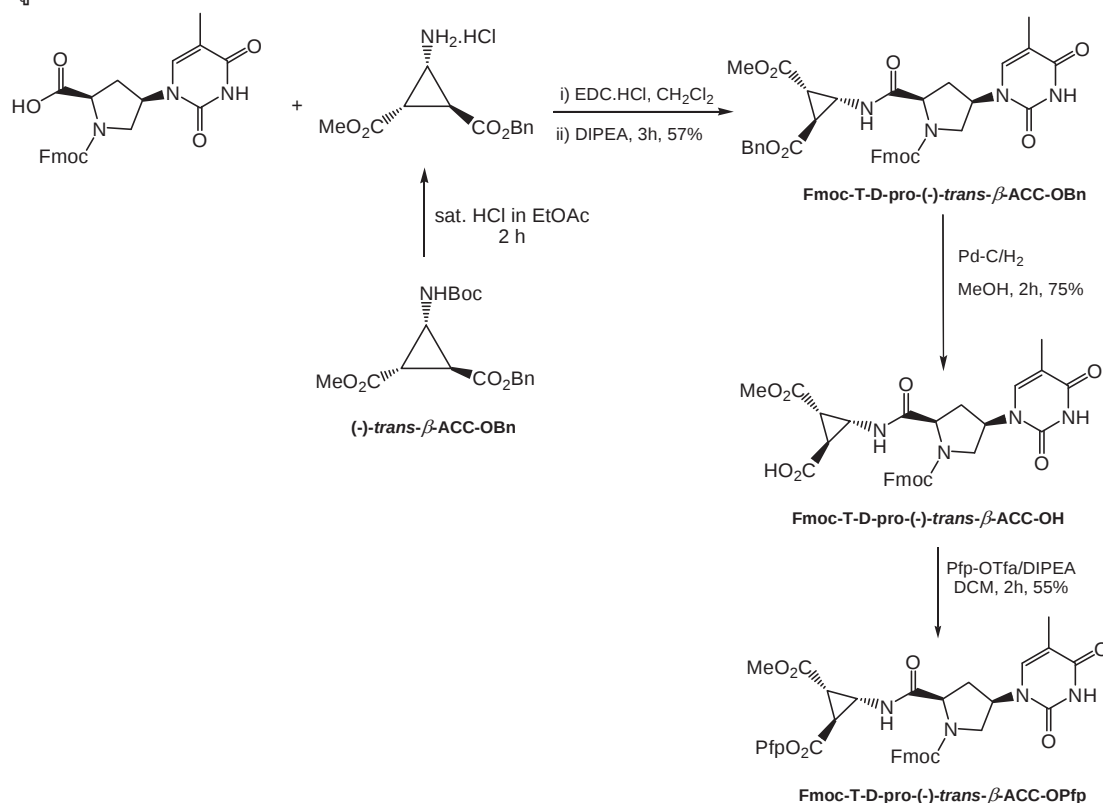
3.2.1 β -2-aminocyclopropanecarboxylic acid (β -ACC)



รูปที่ 31 โครงสร้างของ β -ACC PNA ที่จะสังเคราะห์ในงานวิจัยนี้

งานวิจัยในส่วนนี้เริ่มต้นที่การศึกษาพีเอ็นเอระบบใหม่ที่มี 2-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (β -ACC) เป็นส่วนประกอบของโครงสร้างหลัก (backbone) (รูปที่ 31) แทนที่จะเป็น 2-aminocyclopentane-carboxylic acid (ACPC) โดยมีสมมติฐานว่า β -ACC จะมีคอนฟอร์เมชันที่ถูกจำกัดมากกว่า ACPC ซึ่งอาจนำไปสู่พีเอ็นเอระบบใหม่ที่สามารถจับยึดกับดีเอ็นเอ/อาร์เอ็นเอได้แข็งแรงกว่าระบบพีเอ็นเอดั้งเดิมที่มี ACPC เป็นส่วนประกอบของโครงสร้างหลัก โดยงานวิจัยในส่วนนี้ได้ร่วมมือกับ Professor Oliver Reiser จาก Institute of Organic Chemistry, University of Regensburg ประเทศเยอรมนี ซึ่งมีความเชี่ยวชาญในการสังเคราะห์และศึกษาเพปไทด์ที่มี β -ACC เป็นส่วนประกอบ เนื่องจาก β -ACC จะเกิดปฏิกิริยาแตกวงได้ง่ายในรูปที่เป็นหมู่อะมิ

โนอิสระ จึงไม่เหมาะที่จะคัดลึงโมโนเมอร์ของ β -ACC บนวัฏภาคของแข็งโดยตรง แผนการสังเคราะห์จึงต้อง "ปกป้อง " หมู่อะมิโนของ β -ACC ก่อนโดยการสร้างพันธะเพปไทด์ระหว่างหมู่คาร์บอกซิลของโพรลีนกับหมู่อะมิโนของ β -ACC เกิดเป็นไดเพปไทด์ Fmoc-Pro- β -ACC-OH แล้วจึงคัดลึงไดเพปไทด์นี้บนวัฏภาคของแข็งแทน ซึ่งจะสามารถหลีกเลี่ยงการเปิดเผยหมู่อะมิโนของ β -ACC โดยไม่จำเป็นได้ โดยอาศัยฐานความรู้ที่มีมาก่อนว่าสเตอริโอเคมีของส่วนโพรลีนที่แสดงการจับยึดกับดีเอ็นเอได้ดีที่สุดเมื่อมีตัวเชื่อมในโครงสร้างหลักเป็น ACPC น่าจะเป็น (2'R,4'R) งานวิจัยนี้จึงได้ยิดสเตอริโอไอโซเมอร์นี้ของโพรลีนเป็นหลัก และศึกษาสเตอริโอไอโซเมอร์ของ β -ACC ทั้ง 4 ไอโซเมอร์ โดยจะเริ่มจากไอโซเมอร์ที่มีคอนฟิกรูเรชันเป็น (1S,2S) ซึ่งสอดคล้องกับ SS-ACPC เป็นไอโซเมอร์แรก แผนการสังเคราะห์เป็นดังแสดงในรูปที่ 32 โดยเริ่มจากสารตั้งต้น Boc-(-)-trans-(1S,2S)- β -ACC-OBn สารตั้งต้นที่เลือกใช้มีหมู่คาร์บอกซิลสองหมู่ ซึ่งมีหมู่ปกป้องที่ orthogonal ซึ่งกันและกัน (Me/Bn) หมู่หนึ่งอยู่ในตำแหน่ง trans- อีกหมู่หนึ่งอยู่ในตำแหน่ง cis- กับ หมู่ -NH₂ ซึ่งมีข้อดีเหนือกว่า unsubstituted β -ACC คือสามารถสังเคราะห์ไอโซเมอร์ของ β -ACC ทั้ง 4 ไอโซเมอร์โดยอาศัยสารตั้งต้นเพียงสองชนิด โดยการเลือกกำจัดหมู่ปกป้องที่จำเพาะเจาะจงเท่านั้น

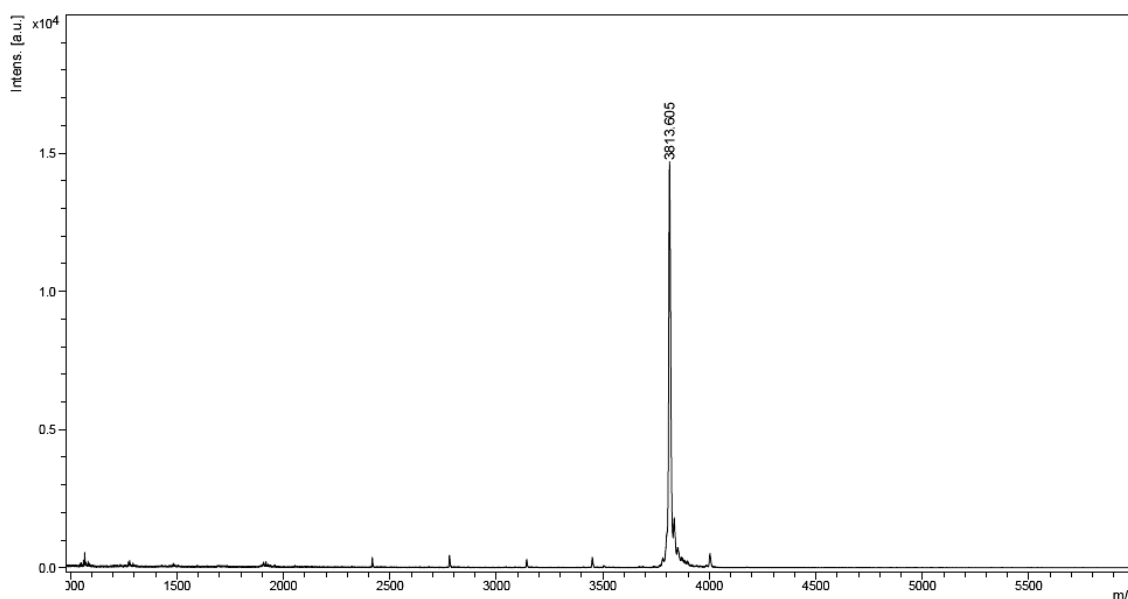


รูปที่ 32 แผนภาพแสดงการสังเคราะห์ β -ACC PNA โมโนเมอร์ Fmoc-(2'R,4'R)-Pro(T)-(1S,2S)- β -ACC-OPfp

การสังเคราะห์เริ่มต้นจากการกำจัดหมู่ Boc ซึ่งเป็นหมู่ปกป้องของหมู่อะมิโนใน β -ACC ออก โดยใช้ HCl ใน EtOAc ซึ่งหมู่อะมิโนนี้จะเสถียรในสภาพที่เป็นเกลือ HCl แต่จะทำให้เกิดการเปิดวงอย่างรวดเร็วในภาวะที่เป็นเบส เพื่อลดการเกิดปฏิกิริยาข้างเคียงดังกล่าวจึงต้องทำเกลือที่ได้ให้เป็นกลางแบบ in situ โดยใช้ DIPEA และทำปฏิกิริยาเพปไทด์คัดลึง กับ (2R,4R)-Fmoc-T-OH ที่ผ่านการกระตุ้นด้วย EDC·HCl ซึ่งปฏิกิริยาดังกล่าว

ให้ปริมาณผลผลิต 57% ในขั้นต่อมาเป็นการกำจัดหมู่เบนซิล ซึ่งเป็นหมู่ปกป้องเอสเทอร์โดยวิธีไฮโดรจิโนไลซิส และตามด้วยการกระตุ้นหมู่คาร์บอกซิลโดยการเปลี่ยนเป็นเพนตะฟลูออโรฟีนิลเอสเทอร์ตามวิธีมาตรฐาน ซึ่งได้ปริมาณผลผลิต 75 และ 55% ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

โมโนเมอร์ดังกล่าวสามารถนำมาต่อกันเป็นพอลิเมอร์ที่มีลำดับเบสเป็น T_{10} โดยเทคนิคการสังเคราะห์เพพไทด์บนวัฏภาคของแข็งมาตรฐาน โดยพอลิเมอร์ที่ได้เมื่อทำให้บริสุทธิ์แสดงค่า $m/z = 3813.60$ ซึ่งสอดคล้องกับค่าที่ได้จากการคำนวณ (m/z calcd. for R = Me, 3810.63) (รูปที่ 33) แสดงว่าสามารถสังเคราะห์พอลิเมอร์ที่มีลำดับเบสตามที่ต้องการได้จริง โดยไม่มีการแตกสลายของวงไซโคลโพรเพนระหว่างการสังเคราะห์บนวัฏภาคของแข็งและหมู่เมทิลเอสเทอร์ซึ่งเป็นหมู่ปกป้องคาร์บอกซิลที่เป็นโซ่ข้างก็เสถียรภายใต้ภาวะดังกล่าว

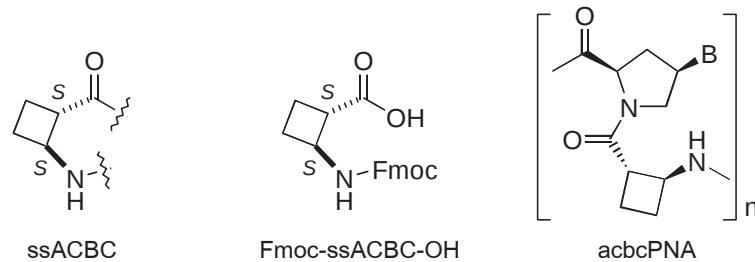


รูปที่ 33 MALDI-TOF analysis ของ T_{10} β -ACC PNA ที่ได้จากโมโนเมอร์ Fmoc-(2'R,4'R)-Pro(T)-(1S,2S)- β -ACC-OPfp

การสังเคราะห์โมโนเมอร์ของ β -ACC พอลิเมอร์อื่นที่เหลืออีก 3 ชนิดได้แก่ Fmoc-(2'R,4'R)-Pro(T)-(1S,2R)- β -ACC-OPfp, Fmoc-(2'R,4'R)-Pro(T)-(1R,2S)- β -ACC-OPfp และ Fmoc-(2'R,4'R)-Pro(T)-(1R,2R)- β -ACC-OPfp สามารถทำได้ในทำนองเดียวกัน และได้นำโมโนเมอร์ดังกล่าวไปสังเคราะห์เป็นพอลิเมอร์ที่มีลำดับเบสเป็น T_{10} ได้สำเร็จครบทุกตัว แต่เป็นที่น่าเสียดายว่าพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้ไม่มีตัวใดแสดงสมบัติการจับยึดกับดีเอ็นเอเป้าหมาย (dA_{10}) เลย คาดว่าการที่ β -ACC PNA ไม่สามารถจับยึดกับดีเอ็นเอเป้าหมายน่าจะเป็นเพราะโครงสร้างของ β -ACC มีความ rigid เกินกว่าที่จะสามารถปรับตัวให้อยู่ในคอนฟอร์เมชันที่จะจับยึดกับ DNA ได้อย่างมีประสิทธิภาพ งานที่จะดำเนินการต่อไปคือการเปลี่ยนขนาดวงแหวนเป็น 6 เหลี่ยม และ/หรือการสังเคราะห์วงแหวนขนาด 4 เหลี่ยม ซึ่งน่าจะมีความ rigid น้อยกว่า β -ACC และน่าจะส่งผลให้การจับยึดกับดีเอ็นเอเป้าหมายดีขึ้น

3.2.2 2-aminocyclobutanecarboxylic acid (ACBC) และ 2-aminocyclohexanecarboxylic acid (ACHC)

ในหัวข้อก่อนหน้านี้ (3.2.1) ได้กล่าวถึงการพัฒนาอนุพันธ์ของ acpcPNA ที่ได้แทนที่ส่วนตัวเชื่อม ACPC ด้วย 2-aminocyclopropanecarboxylic acid (β -ACC) ซึ่งพบว่าพีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ไม่แสดงสมบัติการจับยัดกับดีเอ็นเอ งานวิจัยที่ได้ทำต่อมาคือการแทนที่ส่วนของตัวเชื่อม ACPC ด้วย cyclic beta-amino acid ชนิดอื่น เช่น (1S,2S)-2-aminocyclobutanecarboxylic acid (ssACBC) ทำให้ได้เป็นพีเอ็นเอชนิดใหม่ขึ้น (acbcPNA) (รูปที่ 34) โดยโมโนเมอร์ของตัวเชื่อมที่ต้องการได้แก่ Fmoc-(1S,2S)-2-aminocyclobutanecarboxylic acid (Fmoc-ssACBC-OH) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. David J. Aitken จาก Université Paris-Sud XI ประเทศฝรั่งเศส สารดังกล่าวสังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยา photochemical [Fernandes et al., 2009] ที่กลุ่มวิจัยของ Prof. Aitken เป็นผู้พัฒนาขึ้น



รูปที่ 34 โครงสร้างของตัวเชื่อม (1S,2S)-2-aminocyclobutanecarboxylic acid (ssACBC) โมโนเมอร์ และ acbcPNA

acbcPNA ที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่มีลำดับเบสเป็น T₉ (**acbcPNA-T9**) และ GTAGATCACT (**acbcPNA-mix**) โดยที่ทุกตำแหน่งของ ACPC ถูกแทนที่ด้วย ACBC อย่างสมบูรณ์ acbcPNA ทั้งสองชนิดนี้ได้รับการพิสูจน์เอกลักษณ์โดยเทคนิค MALDI-TOF mass spectrometry เป็นที่น่าสังเกตว่า 2-aminocyclobutanecarboxylic acid ซึ่งหากมีหมู่เอมิโนอิสระจะไม่เสถียรในภาวะที่เป็นเบสเนื่องจากการแตกออกของวงไซโคลบิวเทน [Aitken et al., 2004] อย่างไรก็ตาม ไม่พบว่ามีปัญหาใดๆ เกิดขึ้นในการสังเคราะห์ acbcPNA ทั้งสองชนิด แสดงว่า 2-aminocyclobutanecarboxylic acid ที่ถูก acylate แล้วมีความเสถียรต่อภาวะที่ใช้ในการสังเคราะห์พีเอ็นเอ (ที่ใช้ 20% piperidine เป็น deprotection reagent ซ้ำหลายๆ รอบ) และการกำจัดหมู่ปกป้องของนิวคลีโอเบส (ใช้ สารละลาย 1:1 แอมโมเนีย-ไดออกเซน ที่ 60 °C เป็นเวลา 8–12 ชั่วโมง)

ไฮบริดของ **acbcPNA-T9** กับ DNA กลุ่ม (dA)₉ แสดงค่า T_m ถึง 74 °C ซึ่งสูงใกล้เคียงกับ acpcPNA ที่มีลำดับเบสเป็น T₉ เหมือนกัน (T_m = 73 °C ภายใต้ภาวะเดียวกัน) และการจับยัดมีความจำเพาะเจาะจงสูงดังจะเห็นได้จากการที่ไฮบริดของมันกับ single mismatched DNA มี T_m ที่ลดต่ำลงประมาณ 18–25 °C นอกจากนี้ยังได้ยืนยันการเกิดไฮบริดโดยใช้ CD spectroscopy ซึ่งแสดงการเปลี่ยนแปลงสัญญาณอย่างชัดเจนเมื่อเกิดไฮบริดระหว่างพีเอ็นเอกับดีเอ็นเอคู่สม โดยสัญญาณนี้จะลดต่ำลงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิ แสดงถึงการแยกตัวของสายพีเอ็นเอกับดีเอ็นเอที่อุณหภูมิสูง

ผลการศึกษา T_m ของ **acbcPNA-mix** กับดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอชนิดต่างๆ เปรียบเทียบกับ acpcPNA ซึ่งมีลำดับเบสเดียวกันเป็นดังสรุปในตารางที่ 16 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าไฮบริดระหว่าง acbcPNA กับดีเอ็นเอคู่สมในทิศทางแอนติพาราเรลมีความเสถียรสูงกว่าของ acpcPNA โดยมีความจำเพาะเจาะจงของการเกิดไฮบริดต่ำลงดังจะเห็นได้จากความเสถียรของ single mismatched hybrid ที่เพิ่มขึ้นด้วยเมื่อเทียบกับ acpcPNA เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการเกิดไฮบริดกับอาร์เอ็นเอ พบว่า acbcPNA เกิดไฮบริดที่แข็งแรงกว่า acpcPNA ทั้งในทิศทางแอนติพาราเรลและพาราเรล โดยไฮบริดของแอนติพาราเรลอาร์เอ็นเอจะมีความเสถียรมากกว่าพาราเรลอาร์เอ็นเอ

ตารางที่ 16 เปรียบเทียบค่า T_m ของไฮบริดต่างๆ ของ **acbcPNA-mix** และ **acpcPNA** ที่มีลำดับเบสเดียวกัน (ภาวะ: ความเข้มข้นของ PNA = 1.0 μ M DNA = 1.0 μ M, 10 mM sodium phosphate buffer, 100 mM NaCl)

Entry	Target	T_m (°C) (acbcPNA)	T_m (°C) (acpcPNA) ^a	Note
1	dAGTGATCTAC	66.1	53.3	Antiparallel, perfect matched
2	dAGTGCTCTAC	39.8	23.8	Antiparallel, single mismatched
3	dAGTGTTCTAC	46.6	29.4	Antiparallel, single mismatched
4	dAGTGGTCTAC	36.4	23.9	Antiparallel, single mismatched
5	dCATCTAGTGA	<20	<20	Parallel, perfect matched
6	rAGUGAUCUAC	58.2	42.3	Antiparallel, perfect matched
7	rCAUCUAGUGA	31.7	<20	Parallel, perfect matched

^aData from Taechalertpaisarn et al., 2010

นอกจากนี้ยังได้ศึกษาความสามารถในการเกิดไฮบริดของ **acbcPNA** ที่มีลำดับเบสอื่นกับดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ ผลที่ได้เป็นดังแสดงในตารางที่ 17 (ข้อมูลใน entry 1 ซ้ำกับข้อมูลในตารางที่ 16)

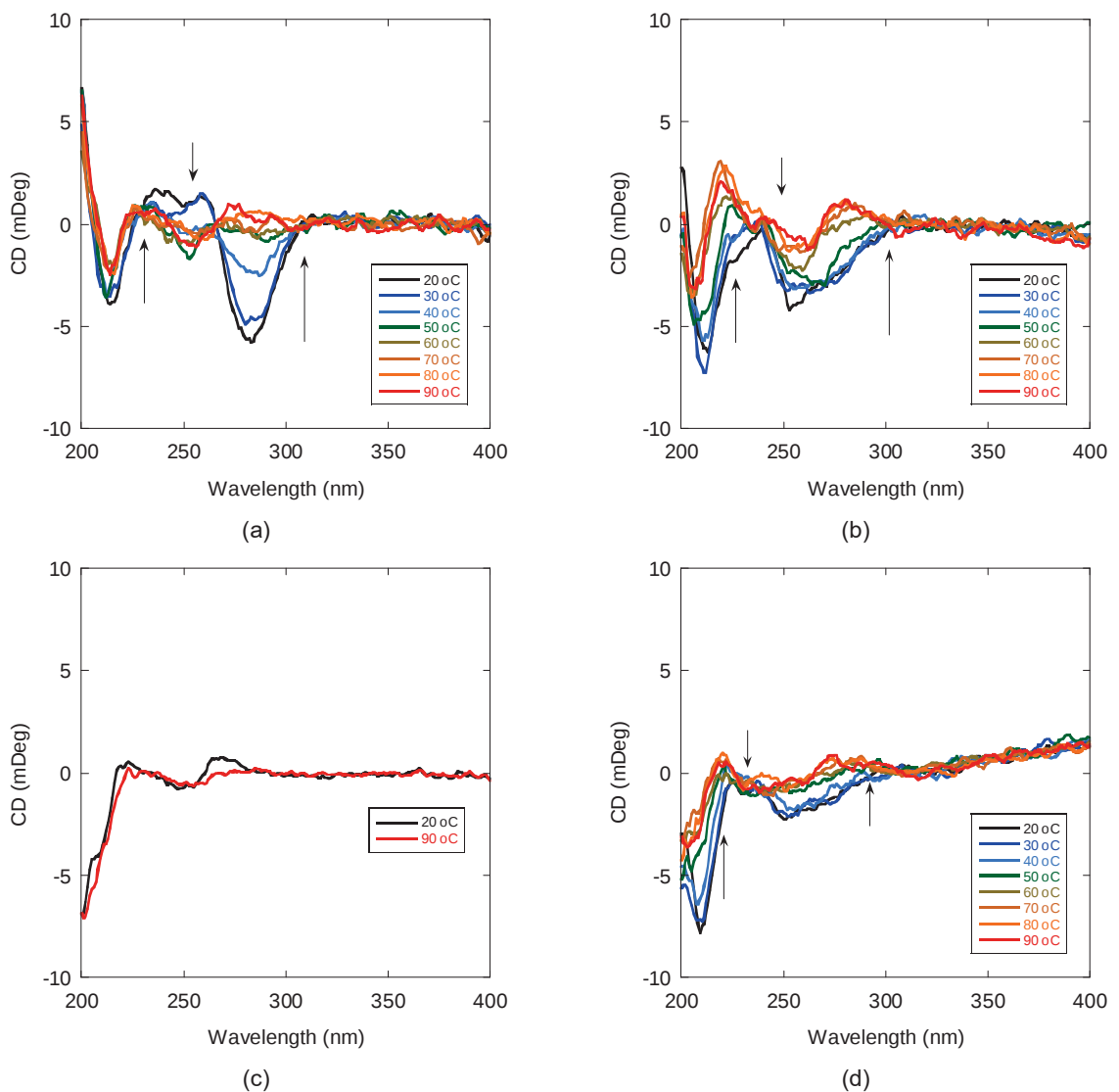
ตารางที่ 17 T_m ของ complementary hybrids ของ **acbcPNA** กับ DNA และ RNA ชนิดต่างๆ ตัวเลขในวงเล็บแสดงค่า T_m **acpcPNA**-DNA hybrids ภายใต้ภาวะเดียวกัน [Vilaivan, 2011] (Conditions: [PNA] = [DNA] = 1 μ M, 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, 100 mM NaCl).

Entry	PNA	Sequence	% G+C	T_m (°C) (apDNA)	T_m (°C) (pDNA)	T_m (°C) (apDNA)	T_m (°C) (pRNA)
1	acbcPNA-mix	GTAGATCACT	40	66.1 (53.3)	<20 (<20)	58.2 (42.3)	31.7 (<20)
2	acbcPNA-mixAT	TATGTACTAT	20	63.2 (54.2)	<20 (<20)	50.8 (32.6)	25.8 (<20)
3	acbcPNA-mixGC	GCTACGTCGC	70	69.8 (54.5)	34.1 (<20)	62.9 (48.0)	48.6 (32.9)

ข้อมูลที่ได้แสดงให้เห็นว่าการแทนที่ตัวเชื่อม ACPC ในพีเอ็นเอด้วย ACBC จะทำให้ความเสถียรของไฮบริดกับดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอเพิ่มขึ้น โดยค่า T_m ที่เพิ่มขึ้นจะอยู่ในช่วง 9–15 °C สำหรับดีเอ็นเอ และ 15–18 °C สำหรับอาร์เอ็นเอ ในขณะที่ยังคงมีความจำเพาะเจาะจงของการจับยัดจับในทิศทางแอนติพาราเรลที่สูงอยู่ ยกเว้นใน RNA ที่มี G/C rich ซึ่งสามารถตรวจพบการจับยัดกับ **acbcPNA** ในทิศทางพาราเรลได้ด้วย ซึ่งสอดคล้องกับสมบัติของ **acpcPNA** การที่ **acbcPNA** สามารถจับยัดกับอาร์เอ็นเอได้แข็งแกร่งกว่า **acpcPNA** มากเสนอแนะว่า **acbcPNA** น่าจะเหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้กับโมเลกุลเป้าหมายที่เป็นอาร์เอ็นเอด้วย

ตารางที่ 18 T_m ของ self complementary และ DNA ไฮบริดของ acbcPNA และ acpcPNA (Conditions: [PNA] = [DNA] = 1 μM or [PNA] = 2 μM for self complementary studies, 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, 100 mM NaCl).

Entry	PNA	Config	T_m self	T_m apDNA
1	acbcPNA-sCom	2'R,4'R	45.7	77.7
2	acpcPNA-sCom	2'R,4'R	<20	66.8
3	epi-acbcPNA-sCom	2'R,4'S	59.3	73.3
4	epi-acpcPNA-sCom	2'R,4'S	32.7	66.8



รูปที่ 35 CD spectra ของ self-complementary PNA **acbcPNA-sCom** (a) **epi-acbcPNA-sCom** (b) **acpcPNA-sCom** (c) and **epi-acpcPNA-sCom** (d) ที่อุณหภูมิต่างๆ (Conditions: 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, 100 mM NaCl, [PNA] = 2 μM).

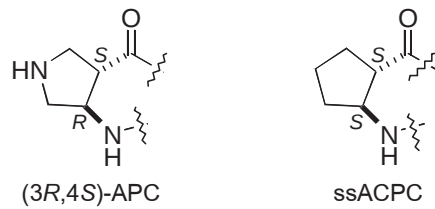
สุดท้ายนี้ยังได้ศึกษาความสามารถในการเกิด self-hybrid ของ acbcPNA ที่มีลำดับเบสเป็น self-complementary sequence (**acbcPNA-sCom**) โดยได้ศึกษาทั้งในกรณีที่เป็น (2'R,4'R) และ (2'R,4'S) (*epi-acbcPNA*) ไอโซเมอร์ เนื่องจากเป็นที่ทราบมาก่อนหน้านี้แล้วว่า (2'R,4'S) ไอโซเมอร์ของ acpcPNA สามารถเกิด self-complementary hybrid ที่เสถียรกว่า (2'R,4'R) ไอโซเมอร์ [Taechalertrpaisarn et al., 2010] และยังสามารถเปรียบเทียบกับ acpcPNA ที่มีลำดับเบสเดียวกัน ผลที่ได้เป็นดังแสดงในตารางที่ 18 และรูปที่ 35

ข้อมูลในตารางที่ 18 แสดงให้เห็นว่า acbcPNA สามารถเกิด self complementary hybrid ที่เสถียรกว่า acpcPNA ซึ่งอาจเนื่องมาจาก steric effect ที่ลดลงของวงแหวนไซโคลบิวเทนเมื่อเทียบกับวงแหวนไซโคลเพนเทน โดยได้ยืนยันการเกิด self complementary hybrid ด้วย variable temperature CD spectroscopy ซึ่งแสดงการเปลี่ยนแปลงสัญญาณ CD ที่อุณหภูมิต่ำกับสูงอย่างชัดเจน โดยในกรณีของ **acpcPNA-sCom** ซึ่งไม่สามารถเกิด self complementary hybrid จะไม่เห็นการเปลี่ยนแปลงสัญญาณ CD ดังกล่าว

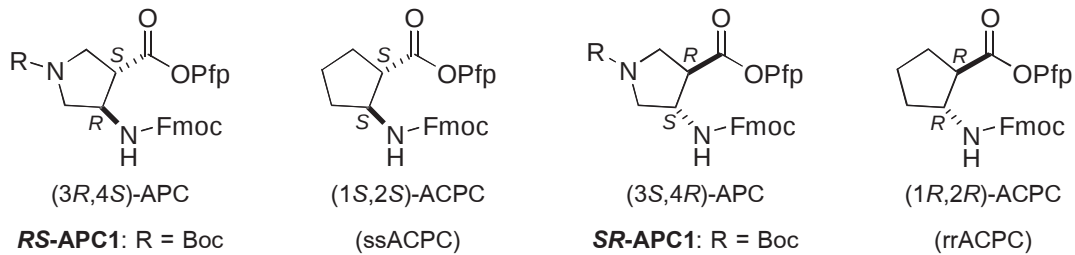
ในขณะที่การแทนที่วงแหวนไซโคลเพนเทนใน acpcPNA ด้วยวงแหวนไซโคลบิวเทนใน acbcPNA ทำให้ได้พีเอ็นเอชนิดใหม่คือ acbcPNA ที่แสดงสมบัติการจับยึดกับดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอได้ดีขึ้น การแทนที่วงแหวนไซโคลเพนเทนด้วยวงแหวนไซโคลเฮกเซนจะได้ achcPNA ที่ไม่แสดงสมบัติการจับยึดกับดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอทั้งในกรณีที่มีลำดับเบสเป็น T₉ (**achcPNA-homoT**) และลำดับเบสผสม (**achcPNA-mix**) เมื่อพิจารณาแบบจำลองโมเลกุลของพีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอที่ได้เคยศึกษาก่อนหน้านี้ [Siriwong et al., 2008] สามารถอธิบายผลของขนาดของวงแหวนได้ว่าเกี่ยวข้องกับค่า torsional angle (θ) ซึ่งมีผลกระทบโดยตรงกับคอนฟอร์เมชันของสายพีเอ็นเอ กล่าวคือ แบบจำลองโมเลกุลแสดงว่าค่า θ ของ dapcPNA และ acpcPNA จะอยู่ที่ $99.2 \pm 6.4^\circ$ และ $99.2 \pm 3.1^\circ$ ตามลำดับ [Siriwong et al., 2008] ในขณะที่ค่า θ ที่ได้จากโครงสร้างผลึกของโอลิโกเมอร์ของ ACBC, ACPC และ AHC คือ $85.9 \pm 12.2^\circ$ [Fernandes et al., 2010], $95.5 \pm 3.7^\circ$ [Appella et al., 1999b] และ $51.5\text{--}61.4^\circ$ [Appella et al., 1999a] ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าค่า θ ของ ACBC ก่อนข้างใกล้เคียงกับค่าที่เหมาะสมมากที่สุด จึงกล่าวได้ว่า acbcPNA น่าจะมีการจัดตัวอยู่ในคอนฟอร์เมชันที่เหมาะสมที่จะเกิดไฮบริดกับดีเอ็นเอได้ดีกว่า acpcPNA ส่วนในกรณีของ achcPNA จะเห็นว่าค่า θ แตกต่างไปจากค่าที่เหมาะสมมาก ประกอบกับวงแหวนไซโคลเฮกเซนไม่สามารถบิดตัวได้อย่างอิสระเท่ากับวงแหวนไซโคลเพนเทนหรือไซโคลบิวเทน จึงทำให้ achcPNA สูญเสียความสามารถในการจับยึดกับดีเอ็นเอไป ข้อมูลเหล่านี้จะเป็นพื้นฐานของการออกแบบพีเอ็นเอที่แสดงสมบัติการจับยึดกับดีเอ็นเอและ/หรืออาร์เอ็นเอได้แข็งแรงและ/หรือมีความจำเพาะเจาะจงที่ดีขึ้น งานในส่วนนี้ได้รับการตีพิมพ์แล้ว [Mansawat et al., 2012b]

3.2.3 3-aminopyrrolidine-4-carboxylic acid (APC)

งานวิจัยส่วนนี้เป็นการขยายผลเพิ่มเติมจากทุนวิจัยหลังปริญญาเอกของ ดร.จตุรงค์ สุภาพพร้อม ที่เกี่ยวข้องกับการนำ 3-aminopyrrolidine-4-carboxylic acid (APC) ซึ่งเป็น aza-analogue ของ 2-aminocyclopentanecarboxylic acid (ACPC) มาเป็นส่วนของตัวเชื่อมแทน ACPC ในระบบ acpcPNA โดยมีสมมติฐานว่าตัวเชื่อม APC น่าจะเพิ่มการละลายของ acpcPNA เนื่องจากมีไนโตรเจนอะตอมที่มีความชอบน้ำในสภาพที่ถูกโปรตอนเต และเป็นตำแหน่งให้ต่อผลต่าง ๆ เช่นไปไอดินหรือสารเรืองแสงได้ที่บริเวณกลางสายของ acpcPNA โดยไม่มีผลกระทบต่อความเสถียรมากนัก งานวิจัยในส่วนแรกจะเป็นการสังเคราะห์พีเอ็นเอที่มีส่วนของตัวเชื่อมถูกแทนที่ด้วย APC สองไอโซเมอร์ได้แก่ (3R,4S) และ (3S,4R) ซึ่งมีคอนฟิกรูชันที่สอดคล้องกับ (1S,2S)- และ (1R,2R)- ACPC ตามลำดับ (รูปที่ 36 และ รูปที่ 37)

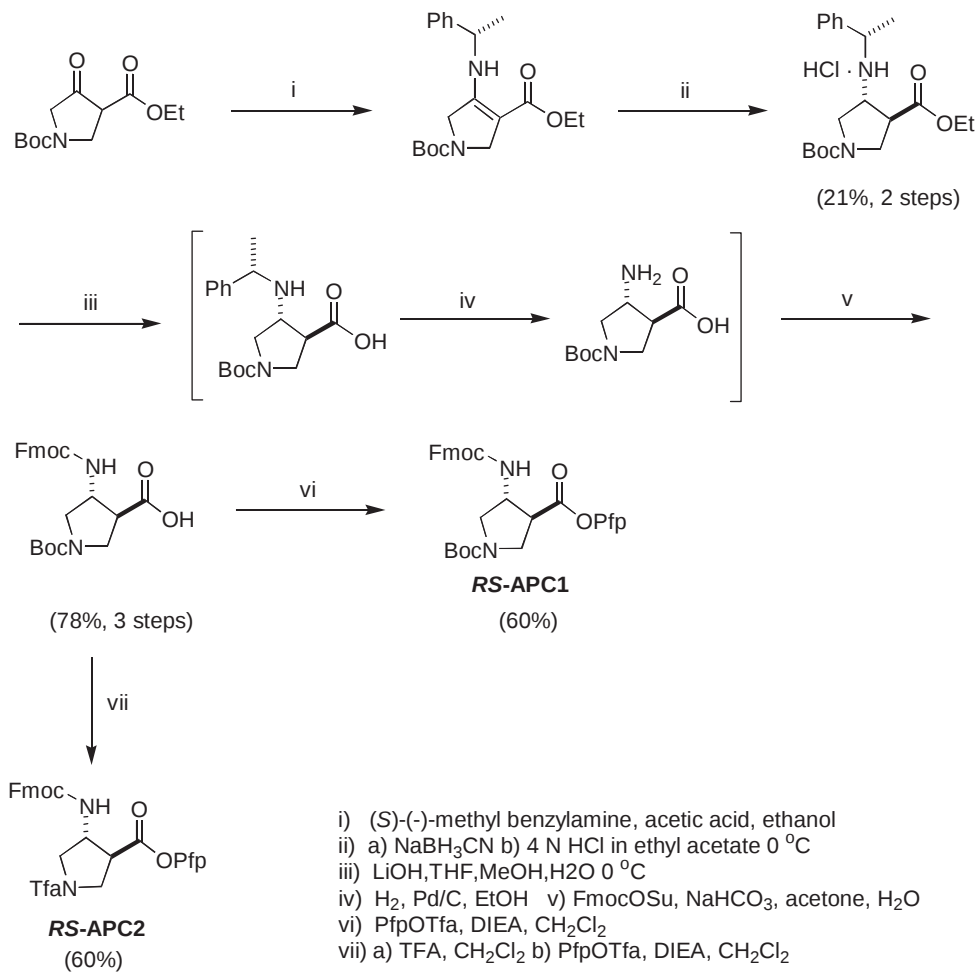


รูปที่ 36 เปรียบเทียบโครงสร้างของตัวเชื่อม (3R,4S)-APC และ ssACPC



RS-APC2: R = Tfa

รูปที่ 37 เปรียบเทียบโครงสร้างของ APC และ ACPC monomer



รูปที่ 38 การสังเคราะห์ APC โมโนเมอร์ **RS-APC1** และ **RS-APC2**

ในเบื้องต้นได้สังเคราะห์ orthogonally-protected APC โมโนเมอร์ **RS-APC1** และ **SR-APC1** ซึ่งใช้หมู่ Boc- และ **RS-APC2** ซึ่งใช้หมู่ Tfa (trifluoroacetyl) เป็นหมู่ปกป้องฟิโรลิดีนไนโตรเจนอะตอม และมีหมู่ Fmoc เป็นหมู่ปกป้อง primary amino group โดยใช้วิธีการตามเอกสารอ้างอิง [Lee et al., 2001] ซึ่งอาศัยการทำปฏิกิริยา diastereoselective reduction ของอินามีนที่ได้จาก (S)-methylbenzylamine เป็น chiral auxiliary และแยกผลิตภัณฑ์ไอโซเมอร์ที่ต้องการโดยใช้การตกผลึกของเกลือไฮโดรคลอไรด์ และเปลี่ยนให้เป็น NH₂-Fmoc-protected acid การแลกเปลี่ยนหมู่ปกป้องจาก Boc เป็น Tfa ทำได้โดยการกำจัดหมู่ Boc ออกตามด้วยการ activate ด้วย pentafluorophenyl acetate (PfpOTfa) ซึ่งจะเป็นการเติมหมู่ปกป้อง Tfa ไปด้วยพร้อมกัน การสังเคราะห์ azaACPC โมโนเมอร์ **RS-APC1** และ **SR-APC1** เป็นดังสรุปในรูปที่ 38 ส่วนการสังเคราะห์โมโนเมอร์ **SR-APC1** ก็ทำได้โดยวิธีเดียวกัน แต่ใช้ (R)-methylbenzylamine เป็น chiral auxiliary แทน โดยได้ปริมาณผลผลิตใกล้เคียงกัน

ตารางที่ 19 ลำดับเบสของ APC-modified acpcPNA (apc/acpcPNA) ที่สังเคราะห์ขึ้นและข้อมูล MALDI-TOF MS และ T_m

Code	Sequence (N→C) ^a	<i>m/z</i> (calcd)	<i>m/z</i> (found)	T_m (°C) ^b
RS-t9	Bz- <u>TTTTTTTTT</u> -LysNH ₂	3250.5	3251.6	55.5 (76.7) ^{c,d}
SR-t9	Bz- <u>TTTTTTTTT</u> -LysNH ₂	3250.5	3250.0	no T_m ^c
RS-T4tT4	Bz-TTTT <u>T</u> TTTT-LysNH ₂	3242.5	3242.4	71.1 ^c
SR-T4tT4	Bz-TTTT <u>T</u> TTTT-LysNH ₂	3242.5	3243.8	28.3 ^c
RS-mix	Bz-GTAGAT <u>C</u> CAC T-LysNH ₂	3621.9	3622.5	50.8 (57.6) ^{c,d}
RS-T4tT4(PyC)	Ac-TTTT(PyC) <u>T</u> TTTT-LysNH ₂	3409.6	3411.4	62.2 ^e
RS-mix(PyC)	Ac-GTAGA(PyC) <u>T</u> CACT-LysNH ₂	3788.5	3789.3	45.2 ^e
RS-T4tT4(PyB)	Ac-TTTT(PyB) <u>T</u> TTTT-LysNH ₂	3451.6	3452.0	60.3 ^e
RS-mix(PyB)	Ac-GTAGA(PyB) <u>T</u> CACT-LysNH ₂	3893.0	3893.7	45.7 ^e

^a T = ssACPC-T; T = (3R,4S)-APC-T; T = (3S,4R)-APC-T; (PyC) = pyrene-1-carbonyl modification; (PyB) = 3-(pyrene-1-yl)butyryl modification

^b with complementary DNA (dA₉ for **RS-t9**, **SR-t9**, **RS-T4tT4**, **SR-T4tT4**, **RS-T4tT4(PyC)** and **RS-T4tT4(PyB)**; 5'-dAGTGATCTAC -3' for **RS-mix**, **RS-mix(PyC)** and **RS-mix(PyB)**)

^c Conditions: 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, 100 mM NaCl, [PNA] = 1 μM and [DNA] = 1 μM

^d Values in parentheses refer to the T_m of unmodified acpcPNA under identical conditions.

^e Conditions: 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, 0 mM NaCl, [PNA] = 2.5 μM and [DNA] = 3 μM

เมื่อได้โมโนเมอร์ของตัวเชื่อม APC มาแล้ว จึงนำไปทำเป็นพีเอ็นเอโอลิโกเมอร์ด้วยวิธีการสังเคราะห์เพปไทด์บนวัฏภาคของแข็งด้วยวิธีการตามเอกสารอ้างอิง โดยได้สังเคราะห์ apc/acpcPNA ทั้งหมด 5 ชนิดที่มีลำดับเบส ชนิด จำนวน และตำแหน่งของตัวเชื่อมแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 19 โดยพีเอ็นเอ **RS-t9**, **SR-t9**, และ **SR-T4tT4** ซึ่งจะได้มีการดัดแปลงเพิ่มเติมสามารถสังเคราะห์ได้โดยอาศัย Boc-protected โมโนเมอร์ **RS-APC1** และ **SR-APC1** ส่วนพีเอ็นเอ **RS-T4tT4** และ **RS-mix** สามารถสังเคราะห์โดยใช้ Tfa-protected โมโนเมอร์ **RS-APC2** การใช้ Tfa โมโนเมอร์ทำให้สามารถกำจัดหมู่ปกป้องฟิโรลิดีนไนโตรเจนออกได้โดยไม่ทำให้สายพีเอ็นเอ

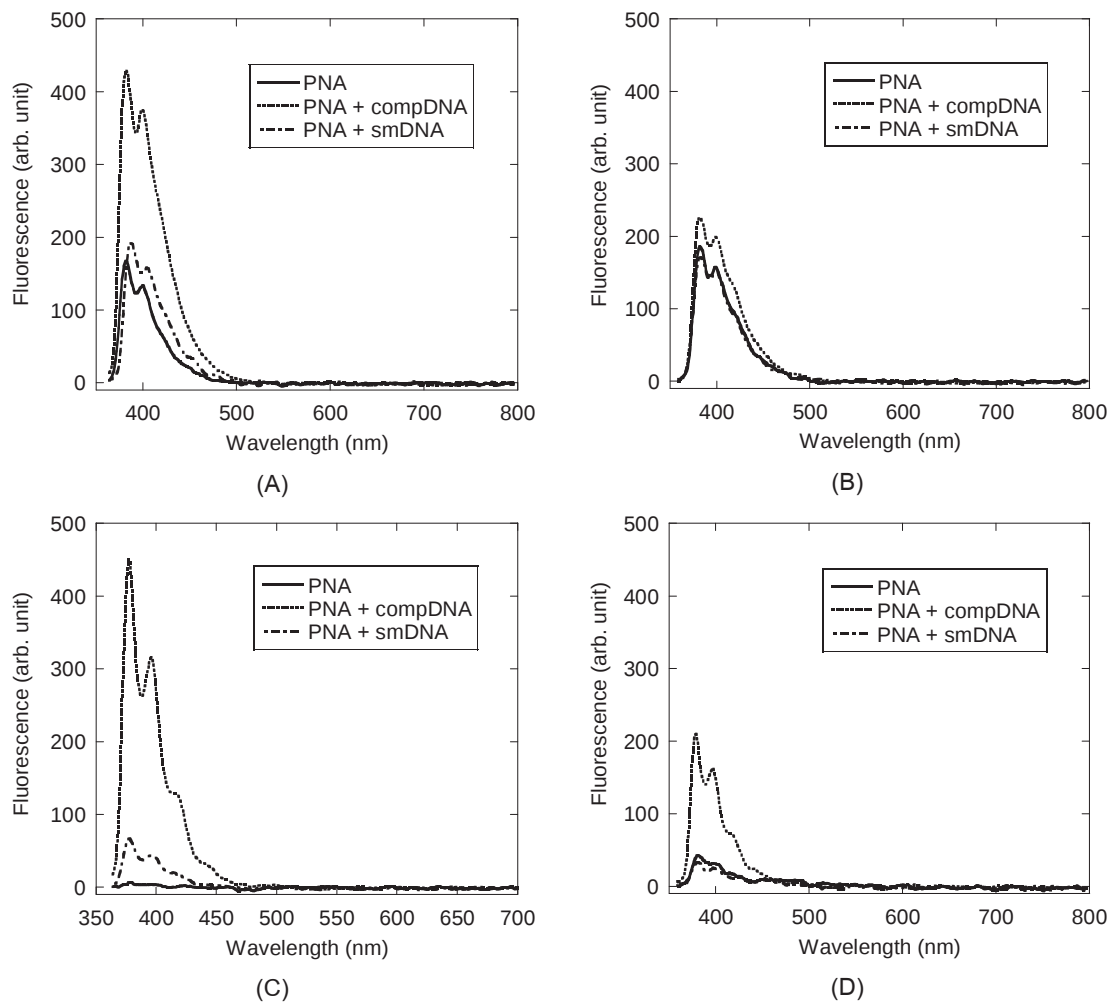
เอหลุดออกจากภูมิภาคของแข็ง จึงสามารถทำการต่อฉลากเรืองแสงเช่น pyrene-1-carboxylic acid หรือ 3-(pyrene-1-yl)butyric acid ซึ่งสามารถเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงได้ตามสภาพแวดล้อม เข้าที่พีเอ็นเอบนภูมิภาคของแข็งได้โดยตรง ได้เป็นพีเอ็นเอ **RS-T4tT4(PC)**, **RS-T4tT4(PB)**, **RS-mix(PC)** และ **RS-mix(PB)** เพื่อพัฒนาเป็นพีเอ็นเอโพรบที่มีการเรืองแสงที่ตอบสนองต่อสถานะของการเกิดไฮบริดกับดีเอ็นเอเป้าหมายได้อย่างจำเพาะเจาะจง

จากการทดลองหาค่า T_m พบว่าการเปลี่ยนตัวเชื่อมจาก ssACPC เป็น (3R,4S)-azaACPC ทั้งสาย (**RS-t9**) จะทำให้ค่า T_m ลดลงจาก 76.7 °C เป็น 55.5 °C หรือเฉลี่ยประมาณ 2.5 °C ต่อการแทนที่ ssACPC ด้วย (3R,4S)-APC หนึ่งครั้ง ส่วนการแทนที่ ssACPC หนึ่งตัวที่ตำแหน่งตรงกลางสายด้วย (3R,4S)-APC ดังในกรณีของ **RS-T4tT4** และ **RS-mix** ซึ่งเป็น homothymine และ mixed base acpcPNA ตามลำดับจะทำให้ค่า T_m นั้นลดลงไปเพียงเล็กน้อย (5.6–6.8 °C) ในขณะที่การแทนที่ ssACPC ด้วย (3S,4R)-APC ทั้งสาย (**SR-t9**) จะทำให้พีเอ็นเอที่ได้สูญเสียความสามารถในการจับกับดีเอ็นเอโดยสิ้นเชิง (ยืนยันโดยเทคนิค CD และ UV titration) แม้แต่ **SR-T4tT4** ซึ่งมีการแทนที่ ssACPC เพียงหน่วยเดียวตรงกลางสายด้วย (3S,4R)-APC ก็แสดงค่า T_m ที่ลดลงอย่างมากถึง 48.4 °C เมื่อเทียบกับ acpcPNA ที่ไม่ได้มีการดัดแปลงใดๆ แสดงให้เห็นว่าโครงสร้างของตัวเชื่อม (3S,4R)-APC ไม่สามารถปรับตัวให้เข้ากับคอนฟอร์เมชันของ acpcPNA ได้ ซึ่งไม่เป็นที่เกินความคาดหมายนักเมื่อพิจารณาจากสเตอริโอเคมีของมันที่ตรงกันข้ามกับ ssACPC ส่วนในกรณีของ (3R,4S)-APC ที่มีโครงสร้างที่สอดคล้องกับ ssACPC จะทำให้ได้พีเอ็นเอที่มีความเสถียรมากกว่ามาก นอกจากนี้เมื่อพิจารณาในแง่ของ specificity การเปรียบเทียบการจับระหว่าง homothymine PNA **RS-t9** กับดีเอ็นเอคู่สม (dA₉) กับดีเอ็นเอที่เป็น single-base mismatch (dA₄TA₄) พบว่า T_m จะลดลงไป 28 °C (จาก 71.1 ไปเป็น 43.1 °C) แสดงว่า acpcPNA ที่ดัดแปลงด้วยตัวเชื่อม APC นี้ยังคงแสดงความจำเพาะเจาะจงในการจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่สูงมากอยู่ งานที่ทำต่อจึงเน้นศึกษา acpcPNA ที่ดัดแปลงด้วย (3R,4S)-APC เป็นหลัก โดยได้เพิ่มหมู่ไพรีนเข้าไปที่ตำแหน่งของ (3R,4S)-APC ซึ่งผลการศึกษา T_m ของ **RS-T4tT4(PyC)**, **RS-T4tT4(PyB)**, **RS-mix(PyC)** และ **RS-mix(PyB)** แสดงให้เห็นว่าการต่อหมู่ไพรีนเข้าไปจะทำให้ความเสถียรของไฮบริดลดลงไปอีกประมาณ 5–10 °C เมื่อเทียบกับพีเอ็นเอที่ยังไม่ได้เติมหมู่ไพรีน ซึ่งความเสถียรที่ลดลงนี้น่าจะเกิดจากความเกะกะของหมู่ไพรีนรวมทั้งพันธะไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นด้วย

สิ่งที่น่าสนใจคืออนุพันธ์ของไพรีนเหล่านี้สามารถเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงได้ตามสถานะการเกิดไฮบริดของพีเอ็นเอ (รูปที่ 39) พีเอ็นเอ **RS-T4tT4(PyC)** ที่ดัดแปลงด้วย pyrene-1-carboxylic acid แสดงแถบการเรืองแสงที่เป็นลักษณะเฉพาะของไพรีนที่ 382 และ 400 nm เมื่อถูกกระตุ้นที่ 340 nm โดยการเรืองแสงมีค่าต่ำในสภาพที่เป็นสายเดี่ยว แต่เมื่อเติมดีเอ็นเอคู่สม (dA₉) เข้าไปจะทำให้การเรืองแสงเพิ่มขึ้น ~2.6 เท่า (ที่ 382 nm) โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงความยาวคลื่นของการเรืองแสง และเมื่อมี single mismatched DNA อยู่ด้วยจะไม่มีเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงเมื่อเทียบกับพีเอ็นเอสายเดี่ยว แต่เมื่อติดฉลากไพรีนเดียวกันนี้ใน **RS-mix(PyC)** ซึ่งมีลำดับเบสผสม พบว่าการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงเกิดขึ้นน้อยกว่ากรณีที่เป็น homothymine sequence มาก โดยค่าการเรืองแสงที่เพิ่มขึ้นเมื่อมีดีเอ็นเอคู่สมอยู่ด้วยคือ 1.3 เท่า และไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อมี single mismatched DNA

ฉลาก 3-(pyrene-1-yl)butyric acid (PB) แสดงการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงที่ชัดเจนกว่า pyrene-1-carboxylic acid กล่าวคือ ในกรณีที่ลำดับเบสเป็น homothymine **RS-T4tT4(PyB)** ในสภาพที่เป็นสายเดี่ยวมีการเรืองแสงที่ต่ำมาก และการเรืองแสงที่ ~380 nm เพิ่มขึ้นถึง 72 และ 10.5 เท่าเมื่อเกิดไฮบริดกับดีเอ็นเอคู่สม และ single mismatched DNA ตามลำดับ แต่สำหรับ **RS-mix(PyB)** ซึ่งมีลำดับเบสผสม จะมีค่าการเรืองแสงที่เพิ่มขึ้น

5.2 เท่าเมื่อเกิดไฮบริดกับดีเอ็นเอคู่สม และไม่มีการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงเมื่อเกิดไฮบริดกับ single mismatched DNA โดยเมื่อเปรียบเทียบเฉพาะค่าการเรืองแสงของพีเอ็นเอสายเดี่ยวที่ติดฉลาก PB พบว่า **RS-mix(PyB)** ซึ่งมีลำดับเบสผสม มีค่าค่อนข้างสูงกว่า **RS-T4tT4(PyB)** ซึ่งเป็น homothymine อยู่ประมาณ 10 เท่า แสดงว่าปัจจัยหนึ่งที่ทำให้การเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงน้อยลงใน **RS-mix(PyB)** เกิดจากการที่มี background fluorescence สูง ผลงานส่วนนี้ได้รับการตีพิมพ์ไปแล้ว [Reenabthue et al., 2011] งานที่จะทำต่อไปคือการศึกษากิจกรรมของเบสแต่ละชนิดที่มีต่อการเรืองแสงของฉลาก 3-(pyrene-1-yl)butyric acid เพื่อพัฒนาพีเอ็นเอโพรบที่มี background fluorescence ต่ำลง



รูปที่ 39 Fluorescence spectra of pyrene-labeled acpc/apcPNA (A) **RS-T4tT4(PyC)** (A), **RS-mix(PyC)** (B), **RS-T4tT4(PyB)** (C), **RS-mix(PyB)** (D) and their hybrids with complementary DNA (dA₉ for **RS-T4tT4(PyC)** and **RS-T4tT4(PyB)**; dAGTGATCTAC for **RS-mix(PyC)** and **RS-mix(PyB)**) and single mismatched DNA (dA₄TA₄ for **RS-T4tT4(PyC)** and **RS-T4tT4(PyB)**; dAGTGACCTAC for **RS-mix(PyC)** and **RS-mix(PyB)**). The spectra were measured in 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0 at 25 °C, [PNA] = 2.5 μM and [DNA] = 3.0 μM, excitation wavelength = 345 nm (**RS-T4tT4(PyC)** and **RS-mix(PyC)**) or 340 nm (**RS-T4tT4(PyB)** and **RS-mix(PyB)**).

เพื่อเป็นการศึกษาผลของการติดฉลากไพรีนบิวทิล (PyB) ที่ตำแหน่งต่างๆ ของพีเอ็นเอที่มีต่อการเรืองแสงของฉลาก PyB ในงานวิจัยได้เปรียบเทียบการเรืองแสงพีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเดียวกันคือ GTAGATCACT แต่มีการติดฉลากด้วย PyB ที่ตำแหน่งภายในของสายพีเอ็นเอ และที่ปลายด้าน N และด้าน C ทั้งในสภาพที่เป็นสายเดี่ยวและเมื่อเข้าคู่กับดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมและไม่เป็นคู่สม โดยการติดฉลากที่ตำแหน่ง internal กระทำผ่านตัวเชื่อม (3R,4S)-APC ที่อยู่ทางด้าน N ของเบสที่แสดงตำแหน่งโดยการขีดเส้นใต้ ส่วนการติดฉลากที่ตำแหน่ง C-terminus และ N-terminus กระทำผ่านโซ่ข้างของ C-terminal lysine และ N-terminal ACPC ตามลำดับ ผลที่ได้เป็นดังแสดงในตารางที่ 20

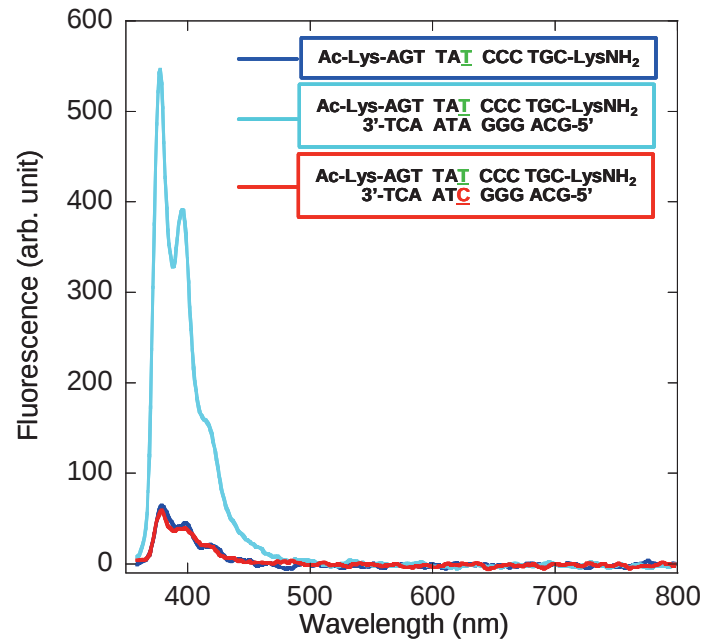
ตารางที่ 20 ข้อมูลการเรืองแสงของพีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วย PyB ในสภาวะที่มีและไม่มีดีเอ็นเอคู่สมอยู่ด้วย (conditions: 2.5 μ M PNA, 3.0 μ M DNA, 10 mM sodium phosphate buffer pH=7.0, λ_{excit} = 345 nm).

Entry	System	$\Phi_F(ss)$	$\Phi_F(ds)$	$\Phi_F(ds/ss)$	$F_{377}(ds/ss)$	Note
1	GTAGATCACT 3' - CATCTAGTGA - 5'	0.0424	0.1873	4.41	5.20	comp.
2	GTAGATCACT 3' - CATCCAGTGA - 5'	0.0444	0.0446	1.00	0.87	internal mismatch
3	GTAGATCACT 3' - CATCTAGTGA - 5'	0.0348	0.1675	4.81	4.65	comp.
4	GTAGATCACT 3' - CATCCAGTGA - 5'	0.0348	0.0659	1.89	1.12	internal mismatch
5	PyB-GTAGATCACT 3' - CATCTAGTGA - 5'	0.0492	0.0105	0.21	0.23	comp.
6	PyB-GTAGATCACT 3' - CATCCAGTGA - 5'	0.0447	0.0116	0.26	0.34	internal mismatch
7	GTAGATCACT-PyB 3' - CATCTAGTGA - 5'	N.D.	N.D.	N.D.	0.46	Comp.
8	GTAGATCACT-PyB 3' - CATCCAGTGA - 5'	N.D.	N.D.	N.D.	0.50	internal mismatch

ข้อมูลจากตารางที่ 20 แสดงให้เห็นว่าในทุกกรณี ฉลาก PyB จะมีการเรืองแสงเมื่อเริ่มต้นไม่แตกต่างกันมากนัก โดยมี $\Phi_F(ss)$ 0.04-0.05 ภายใต้ภาวะเดียวกัน แต่เฉพาะกรณีที่มีการติดฉลาก PyB เข้าที่ตำแหน่งกลางสายของพีเอ็นเอเท่านั้นที่เกิดไฮบริดกับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สมทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของการเรืองแสงถึง 4.4 เท่า เมื่อพิจารณาจาก $\Phi_F(ds/ss)$ หรือ 5.2 เท่า เมื่อพิจารณาจาก $F_{377}(ds/ss)$ ในขณะที่การเกิดไฮบริดกับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสผิดไป 1 ตำแหน่งจะทำให้การเรืองแสงเปลี่ยนแปลงไปโดยลดต่ำกว่าพีเอ็นเอสายเดี่ยวเล็กน้อย และการติด PyB ที่ตำแหน่งปลายสายของพีเอ็นเอไม่ว่าจะเป็นด้าน N หรือ ด้าน C จะทำให้การเรืองแสงลดลงอย่างมากเมื่อเกิดไฮบริดกับดีเอ็นเอทั้งที่เป็นคู่สมและไม่เป็นคู่สม

เพื่อยืนยันว่าการเรืองแสงที่เพิ่มขึ้นเมื่อมีการเข้าคู่ระหว่างพีเอ็นเอที่ติดฉลาก PyB ที่ตำแหน่งกลางสายกับดีเอ็นเอคู่สมเกิดขึ้นกับพีเอ็นเอทุกๆ ไปโดยไม่เจาะจงกับลำดับเบสนี้เท่านั้น จึงได้ทดลองสังเคราะห์พีเอ็นเอที่มีลำดับเบสอื่น และติดฉลาก PyB ไว้ที่ตำแหน่งกลางสายเหมือนกัน โดยให้อยู่ระหว่างเบสที่แตกต่างกันได้แก่ A/T และ T/T (ตารางที่ 21) พบว่าในทั้งสองกรณีมีการเรืองแสงที่เพิ่มขึ้นจริงเมื่อมีการเข้าคู่กับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่

สม และการเข้าคู่กับดีเอ็นเอที่มีเบสผิดไปหนึ่งตำแหน่งจะทำให้การเรืองแสงเปลี่ยนแปลงแตกต่างกันออกไป โดยความแตกต่างนี้ขึ้นกับตำแหน่งของเบสที่ผิดไป หากเบสที่ผิดไปอยู่ใกล้กับตำแหน่งที่ติดฉลากจะทำให้การเรืองแสงมีค่าต่ำ แต่ถ้าอยู่ห่างจากตำแหน่งที่ติดฉลากออกไป การเรืองแสงจะมีค่าสูงขึ้น (ตารางที่ 21 และรูปที่ 40)



รูปที่ 40 ฟลูออเรสเซนส์สเปกตรัมของพีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วย PyB (Ac-Lys-AGTTATCCCTGC-LysNH₂) ในสภาพที่เป็นสายเดี่ยวและเมื่อมี DNA ที่มีลำดับเบสคู่สม (5'-GCAGGGATAACT-3') และ DNA ที่เป็น single mismatched (5'-GCAGGGCTAACT-3') (conditions: 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0 at 25 °C, [PNA] = 2.5 μM and [DNA] = 3.0 μM, excitation wavelength = 345 nm)

ตารางที่ 21 การเรืองแสงของพีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วย PyB ที่ตำแหน่ง internal (ตำแหน่งที่ติดฉลากแสดงโดยการขีดเส้นใต้) ในสภาวะที่มีและไม่มีดีเอ็นเอคู่สมอยู่ด้วย (conditions: 2.5 μM PNA, 3.0 μM DNA, 10 mM sodium phosphate buffer pH=7.0, λ_{excit} = 345 nm).

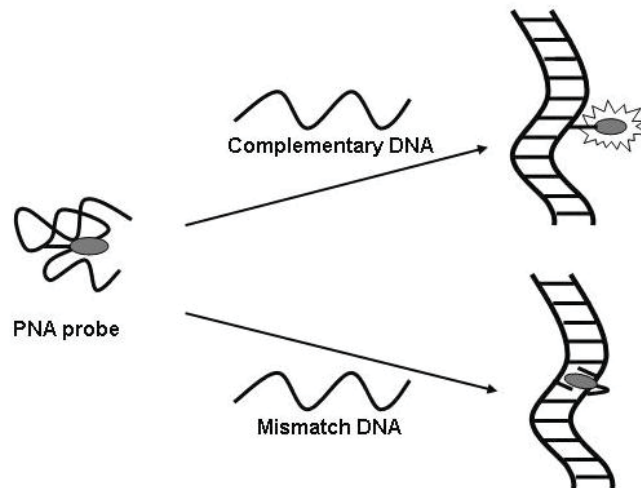
Entry	System	Φ_F	$\Phi_F(ds/ss)$	$F_{377}(ds/ss)$	Note
1	AGTTATCCCTGC	0.0203	-	-	single stranded
2	AGTTATCCCTGC	0.2839	14.0	6.14	comp.
3	3' - TCAATAGGGACG - 5'	0.0347	1.08	0.92	internal mismatch (T·C)
4	3' - TCAATCGGGACG - 5'	0.1695	8.34	5.99	internal mismatch (T·T)
5	3' - TCAATTGGGACG - 5'	0.0132	0.65	0.70	internal mismatch (T·G)
6	CTAAATTCAGA	0.0518	-	-	single stranded
7	CTAAATTCAGA	0.3259	6.36	6.82	comp.
8	3' - GATTTAAGTCT - 5'	0.0412	0.80	0.64	internal mismatch (T·C)

ตารางที่ 21 (ต่อ)

Entry	System	Φ_F	$\Phi_F(\text{ds/ss})$	$F_{377}(\text{ds/ss})$	Note
9	CTAAATTCAGA 3' - GATTTATGTCT - 5'	0.1571	3.07	2.36	internal mismatch (T•T)
10	CTAAATTCAGA 3' - GATTTAGGTCT - 5'	0.0524	1.02	0.67	internal mismatch (T•G)
11	CTAAATTCAGA 3' - GATTTGAGTCT - 5'	0.0805	1.57	1.01	internal mismatch (T•G)
12	CTAAATTCAGA 3' - GATTTTAGTCT - 5'	0.3757	7.33	4.10	internal mismatch (T•T)
13	CTAAATTCAGA 3' - GATTCAAGTCT - 5'	0.2828	5.52	4.36	indirect mismatch (A•C)
14	CTAAATTCAGA 3' - GATTAAAGTCT - 5'	0.3119	6.08	5.98	indirect mismatch (A•A)
15	CTAAATTCAGA 3' - GATTGAAGTCT - 5'	0.2624	5.12	5.02	indirect mismatch (A•G)
16	CTAAATTCAGA 3' - GATTTAACTCT - 5'	0.0849	1.66	1.69	indirect mismatch (C•C)
17	CTAAATTCAGA 3' - GATTTAATTCT - 5'	0.1578	3.08	2.92	indirect mismatch (C•T)
18	CTAAATTCAGA 3' - GATTTAAATCT - 5'	0.1660	3.24	2.72	indirect mismatch (C•A)
19	CTAAATTCAGA	0.1463	-	-	single stranded
20	CTAAATTCAGA 3' - GATTTAAGTCT - 5'	0.3378	2.31	2.91	comp.
21	CTAAATTCAGA 3' - GATTTAAATCT - 5'	0.0795	0.54	0.33	internal mismatch (C•A)
22	CTAAATTCAGA 3' - GATTTAACTCT - 5'	0.0493	0.34	0.23	internal mismatch (C•C)
23	CTAAATTCAGA 3' - GATTTAATTCT - 5'	0.0471	0.32	0.22	internal mismatch (C•T)
24	CTAAATTCAGA 3' - GATTAAAGTCT - 5'	0.2770	1.89	1.55	indirect mismatch (A•A)
25	CTAAATTCAGA 3' - GATTCAAGTCT - 5'	0.2692	1.84	1.50	indirect mismatch (A•C)
26	CTAAATTCAGA 3' - GATTTAAGTCT - 5'	0.1952	1.33	1.04	indirect mismatch (A•T)

จากพฤติกรรมการเรืองแสงของพีเอ็นเอที่ติดฉลาก PyB ตรงกลางสายดังกล่าว ประกอบกับข้อมูลจาก UV spectroscopy ของพีเอ็นเอที่เกิดไฮบริดกับดีเอ็นเอคู่สมที่แสดงการเกิด hypsochromic shift ของ pyrene absorption band จาก 346 nm ในพีเอ็นเอสายเดี่ยวไปเป็น 343 nm ในพีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอไฮบริด และ ของพีเอ็นเอที่เกิดไฮบริดกับดีเอ็นเอที่ไม่เป็นคู่สมที่แสดงการเกิด bathochromic shift ของ pyrene absorption band จาก 346 nm ในพีเอ็นเอสายเดี่ยวไปเป็น 348 nm ในพีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอไฮบริด ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของ λ_{max} ของ pyrene absorption band นี้มีความสัมพันธ์กับการเกิด stacking กล่าวคือการเกิด bathochromic shift แสดงถึงการเกิด stacking ของไพรีน ดังนั้นไพรีนในพีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอไฮบริดที่ไม่เป็นคู่สมจะมีการ stack ของไพรีนมากที่สุด

เนื่องจากคู่เบสไม่แข็งแรงทำให้ไพรีนซึ่งไม่ชอบน้ำสามารถแทรกตัวเข้าไปแทนคู่เบสที่ไม่เป็นคู่สม ตามด้วยพีเอ็นเอสายเดี่ยว และพีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอไฮบริดที่เป็นคู่สม ในกรณีนี้คู่เบสมีความแข็งแรง ไพรีนไม่สามารถแทรกตัวเข้าไปได้ จึงต้องอยู่ในสภาพที่ยื่นออกไปจาก PNA-DNA duplex ซึ่งสอดคล้องกับการเรืองแสงที่วัดได้ (การเกิด stacking จะทำให้การเรืองแสงจะลดลง) การเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงของพีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วยไพรีนจึงสามารถอธิบายได้ดังรูปที่ 41



รูปที่ 41 แบบจำลองเพื่ออธิบายการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงของพีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วย PyB ที่ตำแหน่ง internal

แม้การเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงของ PyB PNA จะเป็นไปในลักษณะที่เพิ่มขึ้นเมื่อมีดีเอ็นเอคู่สมอยู่ด้วย การเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงเมื่อมีดีเอ็นเอที่ไม่เป็นคู่สมจะทำนายผลได้ยากกว่า โดยอาจเพิ่มขึ้น เท่าเดิม หรือลดลง โดยขึ้นอยู่กับตำแหน่ง และชนิดของ mismatch base pair ที่เกี่ยวข้องกับ ข้อสรุปทั่วไปคือหาก mismatched base อยู่ในตำแหน่งใกล้เคียงกับตำแหน่งของ PyB เลเบล จะทำให้การเรืองแสงเท่าเดิมหรือลดลง เมื่อเทียบกับ single stranded PNA และเมื่อ mismatched base อยู่ห่างออกไป การเรืองแสงจะสูงขึ้นตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับแบบจำลองที่เสนอในรูปที่ 41 อย่างไรก็ตาม มีข้อยกเว้นอยู่ในกรณีที่มี mismatch pair เป็น T-T อยู่ใกล้กับตำแหน่งของ PyB เลเบล พบว่าจะให้การเรืองแสงที่เพิ่มขึ้นสูงมากใกล้เคียงกับกรณีที่เป็น complementary ซึ่งยังไม่สามารถอธิบายได้จากผลการทดลองเท่าที่มีอยู่ในขณะนี้

เพื่อศึกษาต่อไปว่าอะไรคือปัจจัยที่ทำให้พีเอ็นเอที่ติดฉลากที่ปลายสายจึงมีการเรืองแสงที่ลดลงเมื่อเข้าคู่กับทั้งดีเอ็นเอคู่สมและไม่เป็นคู่สมจึงได้ทำการทดลองกับพีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเป็น PyB-XGTTATCCCTGC (X = A, C, G, T) และ PyB-CTAAATTCAGA กับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมและไม่เป็นคู่สมต่างๆ กัน ผลที่ได้เป็นดังแสดงในตารางที่ 22

ตารางที่ 22 การเรืองแสงของพีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วย PyB ที่ตำแหน่ง terminal ในสถานะที่มีและไม่มีดีเอ็นเอคู่สมอยู่ด้วย (conditions: 2.5 μ M PNA, 3.0 μ M DNA, 10 mM sodium phosphate buffer pH=7.0, λ_{excit} = 345 nm).

Entry	System	Φ_F	$\Phi_F(ds/ss)$	$F_{377}(ds/ss)$	Note
1	PyB-AGTTATCCCTGC	0.0956	-	-	single stranded
2	PyB-AGTTATCCCTGC 3' -TCAATAGGGACG-5'	0.0221	0.23	0.32	comp. (A·T)
3	PyB-AGTTATCCCTGC 3' - <u>G</u> CAATAGGGACG-5'	0.1522	1.59	2.29	terminal mismatch (A·G)
4	PyB-AGTTATCCCTGC 3' - <u>C</u> CAATAGGGACG-5'	0.1297	1.36	2.50	terminal mismatch (A·C)
5	PyB-AGTTATCCCTGC 3' - <u>A</u> CAATAGGGACG-5'	0.1874	1.96	2.00	terminal mismatch (A·A)
6	PyB-AGTTATCCCTGC 3' -TCAAT <u>C</u> GGGACG-5'	0.0225	0.24	0.20	internal mismatch (T·C)
7	PyB-AGTTATCCCTGC 3' - <u>A</u> TCAATAGGGACG-5'	0.0524	0.55	0.45	N-terminal extended (+A)
8	PyB-AGTTATCCCTGC 3' - <u>T</u> TCAATAGGGACG-5'	0.0104	0.11	0.13	N-terminal extended (+T)
9	PyB-AGTTATCCCTGC 3' - <u>C</u> TCAATAGGGACG-5'	0.0359	0.38	0.14	N-terminal extended (+C)
10	PyB-AGTTATCCCTGC 3' - <u>G</u> TCAATAGGGACG-5'	0.0148	0.15	0.36	N-terminal extended (+G)
11	PyB-AGTTATCCCTGC 3' - <u> </u> CAATAGGGACG-5'	0.1647	1.72	2.11	N-terminal deleted (-T)
12	PyB-AGTTATCCCTGC 3' - <u> </u> <u> </u> AATAGGGACG-5'	0.1634	1.71	2.15	N-terminal deleted (-TC)
13	PyB-CTAAATTCAGA	0.0262	-	-	single stranded
14	PyB-CTAAATTCAGA 3' -GATTTAAGTCT-5'	0.0104	0.40	0.46	comp. (C·G)
15	PyB-CTAAATTCAGA 3' - <u>A</u> ATTTAAGTCT-5'	0.0453	1.73	2.49	terminal mismatch (C·A)
16	PyB-CTAAATTCAGA 3' -GATTT <u>C</u> AGTCT-5'	0.0030	1.73	0.22	internal mismatch (T·C)
17	PyB-CTAAATTCAGA 3' - <u>T</u> GGGATTTAAGTCT-5'	0.0167	0.64	0.62	N-terminal extended (+TGG)

จากผลการทดลองทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่า acpcPNA ที่ติดฉลาก PyB สามารถ sense local environment ของพีเอ็นเอเบสได้ และสามารถใช้เป็น quencher free molecular beacon [Venkatesan, 2008] ได้

โดยหากติดฉลาก PB เข้าที่ตำแหน่งกลางสายของพีเอ็นเอ โดยจะทำให้เกิดการเรืองแสงเพิ่มขึ้นหากมีการเข้าคู่กับ ดีเอ็นเอที่มีเบสคู่สม เนื่องจากหมู่ไพรีนไม่สามารถเกิดการ intercalate เข้าไปในพีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอไฮบริดที่เป็นคู่สม ซึ่งเป็นพฤติกรรมที่แตกต่างจากดีเอ็นเออย่างชัดเจน (เป็นที่ทราบกันดีว่าดีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วยไพรีนตรงตำแหน่ง 2' ของวงแหวนไดออกซีไรโบสจะมีการเรืองแสงลดลงในสภาพที่เป็น duplex เนื่องจากการเกิด intercalation) [Yamana, 1999] ในขณะที่การติดฉลาก PyB ตรงปลายสายของพีเอ็นเอจะทำให้การเรืองแสงลดลงหากมีการเข้าคู่กับดีเอ็นเอที่มีเบสคู่สม เนื่องจากการ stack ของไพรีนกับคู่เบสที่อยู่ตรงปลายของพีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอไฮบริด และการเรืองแสงจะเพิ่มขึ้นถ้าดีเอ็นเอไม่มีเบสตรงปลาย หรือมีเบสที่ไม่เป็นคู่สม เนื่องจากไม่เกิดการ stacking ของไพรีนกับคู่เบส

แม้พีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วย PyB ที่ตำแหน่งกลางสายจะมีการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงในทิศทางที่เพิ่มขึ้น (turn on) เมื่อเกิดไฮบริดกับดีเอ็นเอคู่สม ปัญหาหนึ่งที่พบคือการที่พีเอ็นเอสายเดี่ยวมี background fluorescence สูง ซึ่งจากแบบจำลองที่แสดงในรูปที่ 41 การเรืองแสงของพีเอ็นเอสายเดี่ยวควรจะต่ำเนื่องจากการ quench ด้วยนิวคลีโอเบส แต่นิวคลีโอเบสต่างชนิดกันจะมีความสามารถในการ quench ไพรีนได้ไม่เท่ากัน โดยงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้แสดงว่าความสามารถในการ quench pyrene ของนิวคลีโอเบสในดีเอ็นเอเรียงลำดับได้ดังนี้ T>C>G>A [Wilson, 2008] เพื่อเป็นการยืนยันว่าลำดับดังกล่าวยังคงเป็นจริงในระบบ acpcPNA จึงได้สังเคราะห์ พีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเป็น AA, TT, CC และ GG โดยติดหมู่ PB ที่ระหว่างเบสทั้งสอง และวัดการเรืองแสงในสภาพที่เป็นสายเดี่ยวเปรียบเทียบกัน พบว่าลำดับของความสว่าง (ที่ความเข้มข้นเดียวกัน) คือ AA >> GG > CC > TT ซึ่งสอดคล้องกัน (ตารางที่ 23) และเบส A ให้ความสว่างใกล้เคียงกับเมื่อไม่มีเบสใดๆ (P = abasic PNA) ดังนั้น การออกแบบระบบ quencher free molecular beacon ที่ให้มี background ต่ำควรจะต้องอาศัยลำดับเบสที่เป็น pyrimidine rich และหลีกเลี่ยงการติดฉลาก PyB ในตำแหน่งที่ใกล้กับเบส A อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองที่ได้ทำเพิ่มเติม ซึ่งจะไม่ขอกล่าวรายละเอียดในที่นี้แสดงให้เห็นว่าการ quench ของฉลาก PyB ไม่ได้จำกัดอยู่เฉพาะโดยนิวคลีโอเบสตัวที่อยู่ติดกับฉลาก PyB เท่านั้น

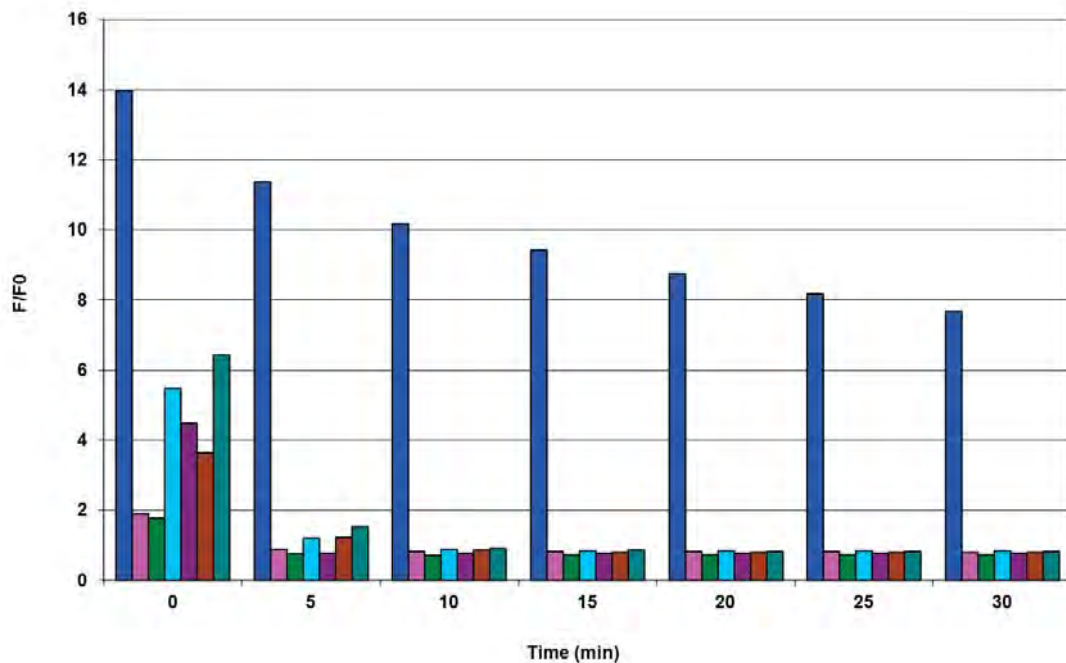
ตารางที่ 23 การเรืองแสงของพีเอ็นเอสายเดี่ยวที่ติดฉลากด้วย PyB ที่ตำแหน่งตรงกลางระหว่างเบส 2 ตัว

(conditions: 2.5 μ M PNA, 3.0 μ M DNA, 10 mM sodium phosphate buffer pH=7.0, λ_{excit} = 345 nm).

Entry	System	Φ_F
1	P(PB)P	0.4096
2	A(PB)A	0.3322
3	C(PB)C	0.0102
4	G(PB)G	0.1240
5	T(PB)T	0.0020
6	A(PB)T	0.0705
7	T(PB)A	0.0533

แม้ว่าการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงของฉลาก PyB จะให้ข้อมูลเกี่ยวกับ local environment ของมันได้ แต่ในบางกรณีก็สามารถแปลผลได้ยาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่มี mismatch base อยู่ห่างจากตำแหน่งที่ติดฉลาก PyB หรือเมื่อมี T-T mismatch เพื่อเป็นการแก้ปัญหาเรื่องนี้จึงได้มีแนวคิดที่จะใช้เอนไซม์ nuclease S1 ที่จำเพาะเจาะจงต่อการย่อย DNA สายเดี่ยวมาช่วยเพิ่มความจำเพาะเจาะจงของการตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอโดย PyB-labeled acpcPNA probes หลักการคือเป็นที่ทราบกันมาก่อนหน้านี้แล้วว่า DNA ที่เป็นส่วนหนึ่งของ

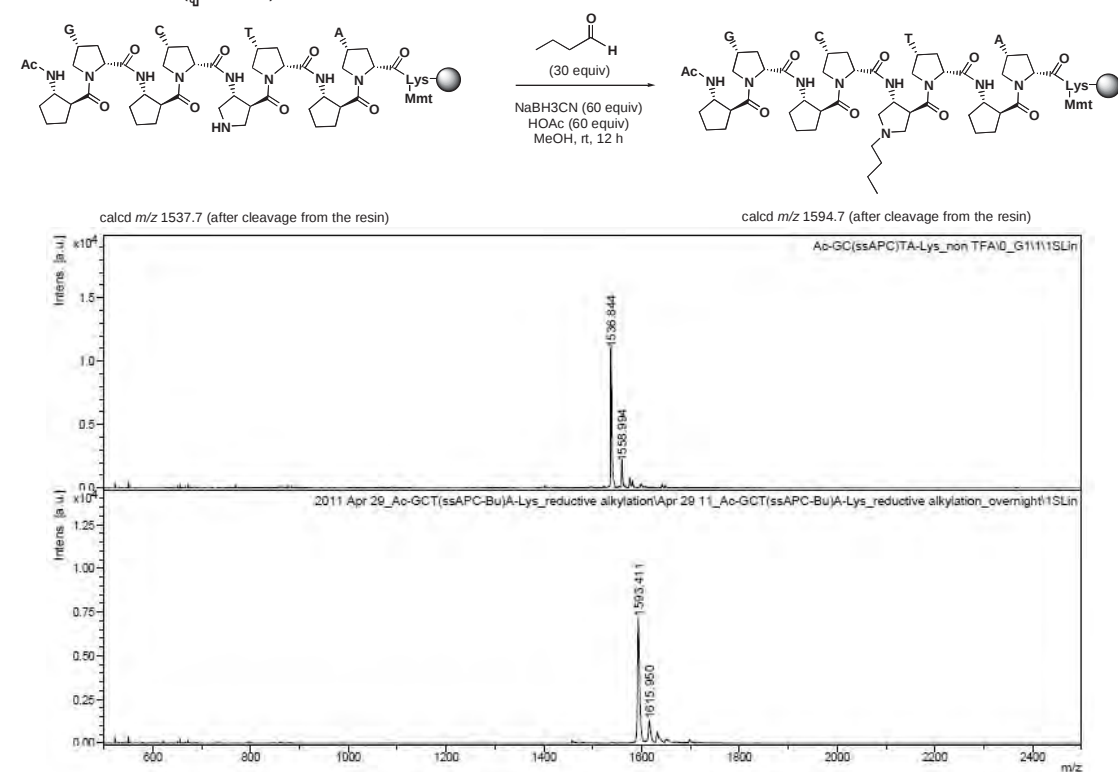
complementary PNA-DNA hybrid จะเสถียรต่อการถูกย่อยโดย nuclease S1 กว่า DNA ที่อยู่ใน mismatched PNA-DNA hybrid มาก [Komiya et al. 2003] ดังนั้นจึงได้ทดลองวัดการเรืองแสงของพีเอ็นเอที่ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมและไม่เป็นคู่สมชนิดต่างๆ จากนั้นจึงเติมเอนไซม์ลงไป และติดตามการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงเมื่อเวลาผ่านไป (รูปที่ 41) พบว่าผลที่ได้เป็นที่น่าพอใจ กล่าวคือเมื่อตอนเริ่มต้น พบว่า single mismatched hybrid ที่มีตำแหน่งของ mismatch ไม่ตรงกับฉลาก PB จะมีการเรืองแสงที่สูงกว่า background อยู่พอสมควร (ตัวเลข F/F_0 อยู่ระหว่าง 2–6 เท่า ซึ่งไม่ตรงกับข้อมูลในตารางที่ 21 เนื่องจากภาวะที่ใช้ในการศึกษาการเรืองแสงต่างกัน กล่าวคือการทดลองนี้ทำใน S1 buffer ซึ่งเป็น 30 mM sodium acetate pH 4.6) หลังให้ทำปฏิกิริยาไป 10 นาที พบว่าสัญญาณที่เกิดจาก mismatched hybrid ลดลงเหลือเท่ากับพีเอ็นเอสายเดี่ยว ($F/F_0 = 1$) ในทุกกรณี ในขณะที่สัญญาณของ complementary hybrid ลดลงไปเพียงเล็กน้อย (F/F_0 จาก 14 เท่า เหลือประมาณ 10 เท่า) แสดงว่าดีเอ็นเอที่เข้าคู่อย่างไม่สมบูรณ์ถูกย่อยได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่เข้าคู่กับพีเอ็นเออย่างสมบูรณ์ ดังนั้นจึงสามารถใช้ nuclease S1 ในการเพิ่มความจำเพาะเจาะจงของการตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอด้วย PyB-labeled PNA ได้



รูปที่ 41 อัตราส่วนของ F_{377} (ds/ss) ของ PyB-labeled acpcPNA CTAAATTCAGA ก่อน (time = 0 min) และหลังการย่อยด้วย S1 nuclease ที่เวลาต่างๆ (5–30 min). Conditions: [PNA] = 1 M; 30 mM sodium acetate buffer pH 4.6, 1 mM Zn(OAc)₂, 5% glycerol, 5 units/mL S1 nuclease, λ_{ex} 345 nm. Complementary DNA: ■ 3'-GATTTAAGTCT-5' (comp); mismatched DNA: ■ 3'-GATTTA^TGTCT-5', ■ 3'-GATTTA^ATCT-5'; ■ 3'-GATTT^TAGTCT-5'; ■ 3'-GATT^AAAGTCT-5'; ■ 3'-GATT^CAAGTCT-5'; ■ 3'-GATT^GAAGTCT-5'

แม้การติดตามการเรืองแสงแก๊พีเอ็นเอโดยผ่านตัวเชื่อม APC โดยวิธีสร้างพันธะเอไมด์ดังที่ได้ศึกษามาทั้งหมดจะให้ผลเป็นที่น่าพอใจระดับหนึ่ง แต่ก็ยังมีปัญหาที่สำคัญได้แก่ 1. การติดตามด้วยพันธะเอไมด์จำเป็นจะต้องผ่านขั้นตอนการกำจัดหมู่ Tfa ออกจากตัวเชื่อม APC ภายใต้ภาวะ aqueous ammonia ที่ 60 °C ดังนั้นจึงทำให้หมู่ปกป้องอะมิโนของนิวคลีโอเบสหลุดออกไปด้วย การทำปฏิกิริยาเอซิลเลชันต่อจึงต้องควบคุมภาวะให้ดี

มีฉะนั้นจะเกิดปฏิกิริยาเอซิลเลชันที่ตำแหน่งของนิวคลีโอเบส โดยเฉพาะเบส C ซึ่งมีหมู่อะมิโนที่นิวคลีโอฟิลิกมากกว่าเบสอื่นเป็นปฏิกิริยาข้างเคียง 2. การติดฉลากผ่านพันธะเอไมด์จะทำให้ความเสถียรของพีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอไฮบริดที่เกิดขึ้นลดลงอย่างมาก (ตารางที่ 19) คาดว่าน่าจะเกี่ยวกับ steric effect ของพันธะเอไมด์ 3. พันธะเอไมด์แบบเทอร์เชียรีที่เกิดขึ้นสามารถอยู่ได้ในสองคอนฟอร์เมชันที่เปลี่ยนกลับไปกลับมาได้ค่อนข้างช้า ดังนั้น พีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จะเป็นของผสมของสองไอโซเมอร์ ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อการศึกษาสมบัติการจับยึดกับดีเอ็นเอ งานที่ได้ทำต่อมาคือการพัฒนาวิธีติดฉลากวิธีใหม่ที่ไม่ต้องอาศัยปฏิกิริยาเอซิลเลชัน โดยจะต่อหมู่แอลคิลเข้าไปโดยตรงที่ตำแหน่ง N ของตัวเชื่อม APC ที่ผ่านการกำจัดหมู่ปกป้องแล้ว เบื้องต้นได้ทดลองปฏิกิริยาแอลคิลเลชันด้วยแอลคิลเฮไลด์ แต่พบปัญหาคือ unactivated alkyl halide เช่น n-butyl bromide หรือ homopropargyl tosylate ไม่สามารถทำปฏิกิริยาได้ ในขณะที่ activated alkyl halide เช่น propargyl bromide ทำปฏิกิริยาได้เป็นของผสมระหว่างสารตั้งต้น และผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากโมโนแอลคิลเลชันที่ต้องการ และผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากไดแอลคิลเลชันได้เป็นหมู่ควอเตอร์นารีแอมโมเนียมในสัดส่วนที่ใกล้เคียงกัน วิธีการที่ได้ลองต่อมาคือการทำรีดิกทีฟแอลคิลเลชัน ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นภายใต้ภาวะที่ไม่รุนแรง และมีประวัติการใช้งานกับการสังเคราะห์บนวิฏภาคของแข็งอยู่พอสมควร [Khan et al., 1996; Tourwé et al., 1993; Coy et al., 1988; Balaji et al., 2006] อย่างไรก็ตาม เนื่องจากพีเอ็นเอจะมีหมู่อะมิโนของนิวคลีโอเบสอยู่ด้วย สิ่งแรกที่ต้องพิจารณาคือความจำเพาะเจาะจงของปฏิกิริยาว่าจะเกิดเฉพาะที่ตำแหน่งของ N-APC ที่ต้องการหรือไม่ จึงได้ทดลองทำปฏิกิริยารีดิกทีฟแอลคิลเลชันของพีเอ็นเอ Ac-GC(APC)TA-Lys ที่อยู่บนวิฏภาคของแข็งและผ่านการกำจัดหมู่ Tfa บน APC ออกไปแล้วด้วยบิวทิลลิทไฮด์ (30 equiv) + กรดอะซิติก (60 equiv) และโซเดียมไฮยาโนโบโรไฮไดรด์ (60 equiv) ในเมทานอล และติดตามผลโดยใช้ MALDI-TOF mass spectrometry พบว่าปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์หลังการทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 12 ชั่วโมง และไม่พบปฏิกิริยาข้างเคียงอื่นเช่นการเกิดเกลือควอเตอร์นารีแอมโมเนียมหรือแอลคิลเลชันของหมู่อะมิโนของนิวคลีโอเบส (รูปที่ 42)



รูปที่ 42 ปฏิกิริยารีดิกทีฟแอลคิลเลชันของ acpcPNA tetramer Ac-GCTA-Lys- บนวิฏภาคของแข็ง

จากผลเบื้องต้นนี้จึงได้ทดลองทำปฏิกิริยารีดักทีฟแอลคิลเลชันกับพีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเป็น GTAGA(APC)TCACT บนวิญญาคของแข็งกับแอลดีไฮด์ชนิดอื่นๆ พบว่าผลที่ได้เป็นที่น่าพอใจ กล่าวคือสามารถสังเคราะห์พีเอ็นเอที่ติดฉลากต่างๆ ได้ตามต้องการได้โดยวิธีนี้ (ตารางที่ 24) และพีเอ็นเอที่ได้มีความเสถียรไม่ลดลงมากนักเมื่อเทียบกับพีเอ็นเอที่ไม่ติดฉลาก โดยฉลากที่มีความกะจะมากจะทำให้ T_m ลดลงมากกว่าตัวอย่างเช่นพีเอ็นเอ **10mer-PyB** มี T_m 49.4 °C ซึ่งแม้จะลดต่ำลงมากเมื่อเทียบกับ unlabeled APC-modified PNA (61.4 °C) แต่ก็ยังสูงกว่าของพีเอ็นเอ **RS-mix(PyB)** ซึ่งมี T_m เพียง 45.7 °C ภายใต้ภาวะเดียวกัน (ตารางที่ 19) ในขณะที่พีเอ็นเอที่ติดฉลากขนาดเล็กเช่น methyl หรือ hydroxyethyl มีค่า T_m ต่ำกว่า unlabeled APC-modified PNA ภายใต้ภาวะเดียวกัน (59.3 °C) เพียงเล็กน้อยเท่านั้น และเนื่องจากฉลากที่มีหมู่แอลดีไฮด์มักไม่ค่อยเสถียร และเตรียมได้ไม่มากนัก อีกทั้งยังไม่ค่อยมีจำหน่ายในเชิงการค้า จึงมีแนวคิดที่จะใช้วิธีรีดักทีฟแอลคิลเลชันในการติดฉลากที่มีหมู่ที่ว่องไวต่อปฏิกิริยาเข้าไป เช่นหมู่อะมิโนใน **10mer-AE** ซึ่งสามารถนำไปเพิ่มหมู่ฟังก์ชันต่อได้โดยปฏิกิริยาเอซิลเลชัน หรือหมู่เอไซด์และแอลไคโนใน **10mer-N3** และ **10mer-alkyne** ซึ่งสามารถนำไปดัดแปลงต่อโดย Click chemistry โดยในทุกกรณีสามารถสังเคราะห์พีเอ็นเอที่มีหมู่ว่องไวเหล่านี้ได้ตามต้องการ และการดัดแปลงด้วยหมู่ที่ว่องไวดังกล่าวไม่มีผลกระทบในทางลบต่อความเสถียรของพีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอไฮบริด (ตารางที่ 24)

ตารางที่ 24 ข้อมูล % yield, mass และ thermal stability ของ 10mer acpcPNA (sequence: GTAGATCACT) ที่ผ่านการติดฉลากโดยวิธี reductive alkylation

PNA	Aldehyde	Label	Yield	m/z (calcd)	m/z (found)	T_m (°C) ^a
10mer-Me	HCHO	methyl	19.3	3574.8	3575.4	58.2 ^b
10mer-HE	HOCH ₂ CHO dimer	hydroxyethyl	1.6	3604.8	3604.0	58.7 ^{b,c}
10mer-AE	FmocNHCH ₂ CHO	H ₂ NCH ₂ CH ₂ -	14.6	3604.7	3603.7	65.4 ^a
10mer-PyB	pyrene-1-ylbutyraldehyde	pyrene-1-ylbutyl	2.9	3816.1	3816.9	49.4 ^d
10mer-PyPm	4-(pyrene-1-yl)benzaldehyde	4-(pyrene-1-yl)phenylmethyl	7.2	3850.1	3852.5	46.4 ^d
10mer-PyPn	(pyrene-1-yl)pentynal	(pyrene-1-yl)pentynyl	2.7	3828.2	3831.6	51.4 ^d
10mer-N3	N ₃ (CH ₂) ₃ CHO	N ₃ (CH ₂) ₃ -	9.7	3657.8	3656.0	57.7 ^b
10mer-alkyne	4-pentyn-1-al	HC≡C(CH ₂) ₃ -	1.1	3626.8	3626.3	59.7 ^b

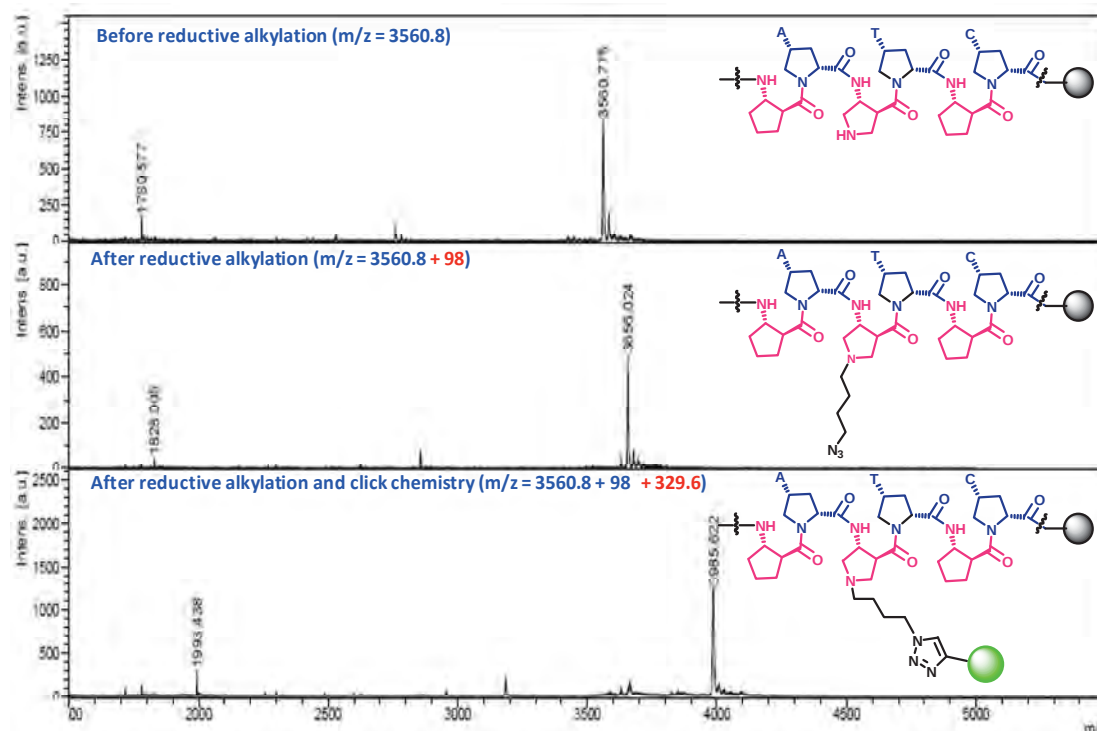
^a With complementary DNA (5'-AGTGATCTAC-3')

^b Condition: 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, [PNA] = 1.0 μM and [DNA] = 1.2 μM

^c T_m with mismatched DNA (T) = 34.0 °C

^d Condition: 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, [PNA] = 2.5 μM and [DNA] = 3.0 μM

จากนั้นจึงได้ทดลองติดตามการเรืองแสงไพรีน (Py) และโทอะโซลลอเรนจ์ (TO) โดยอาศัยปฏิกิริยาคลิก ระหว่างฉลากเรืองแสงที่มีหมู่แอลไคน์หรือเอไซด์ กับพีเอ็นเอ **10mer-N3** หรือ **10mer-alkyne** ที่มี Cu(I)-TBTA complex เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งพบว่าปฏิกิริยาเกิดได้ดีบนนิวคลีโอไทด์ของแชนซ์ โดยผลการวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF mass spectrometry แสดงว่าปฏิกิริยาเกิดได้อย่างสมบูรณ์และไม่พบปฏิกิริยาข้างเคียงอื่น ปฏิกิริยาคลิกนี้สามารถ ทำต่อเนื่องจากปฏิกิริยา reductive alkylation ได้เลยโดยไม่ต้องมีการแยกอินเทอร์มีเดียตออกมาก่อน ตัวอย่างดัง แสดงในรูปที่ 43 ข้อมูลของพีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้เป็นดังแสดงในตารางที่ 25



รูปที่ 43 Reductive alkylation-click chemistry of PNA **10mer-N3** -> **10mer-TzTO**

ตารางที่ 25 ข้อมูล sequence, % yield และ mass ของ 10mer acpcPNA ที่ผ่านการติดตามโดยวิธี sequential reductive alkylation/click

PNA	Sequence	Label	Yield	<i>m/z</i> (calcd)	<i>m/z</i> (found)
10mer-TzPy	GTAGATCACT	PyTz(CH ₂) ₄	4.6	3884.1	3883.3
10mer-TzTO	GTAGATCACT	TOTz(CH ₂) ₄	5.2	3987.4	3984.4
10mer-alkyne	GTAGATCACT	4-pentynyl	1.1	3626.8	3626.3
10mer-NTzPy	GTAGATCACT	N-PyTz(CH ₂) ₃	3.0	3870.1	3870.0
12mer-TzTO	AGTTATCCCTGC	TOTz(CH ₂) ₄	3.1	4613.1	4612.6

จากการศึกษาโดยเทคนิค UV-melting พบว่าพีเอ็นเอที่ติดฉลาก Py หรือ TO ผ่านปฏิกิริยาคลิกยังคง แสดงการจับยัดกับดีเอ็นเอที่แข็งแรงและจำเพาะเจาะจง (ตารางที่ 26) โดยพีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วย TO จะมีความ เสถียรของการจับยัดกับดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างจากพีเอ็นเอที่ไม่ได้ผ่านการติดฉลากมากเท่ากับพีเอ็นเอที่ติดฉลาก ด้วย Py

ตารางที่ 26 ข้อมูล thermal stability ของไฮบริดระหว่าง acpcPNA ที่ผ่านการติดฉลากโดยวิธี sequential reductive alkylation/click กับดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมและไม่เป็นคู่สมต่างๆ

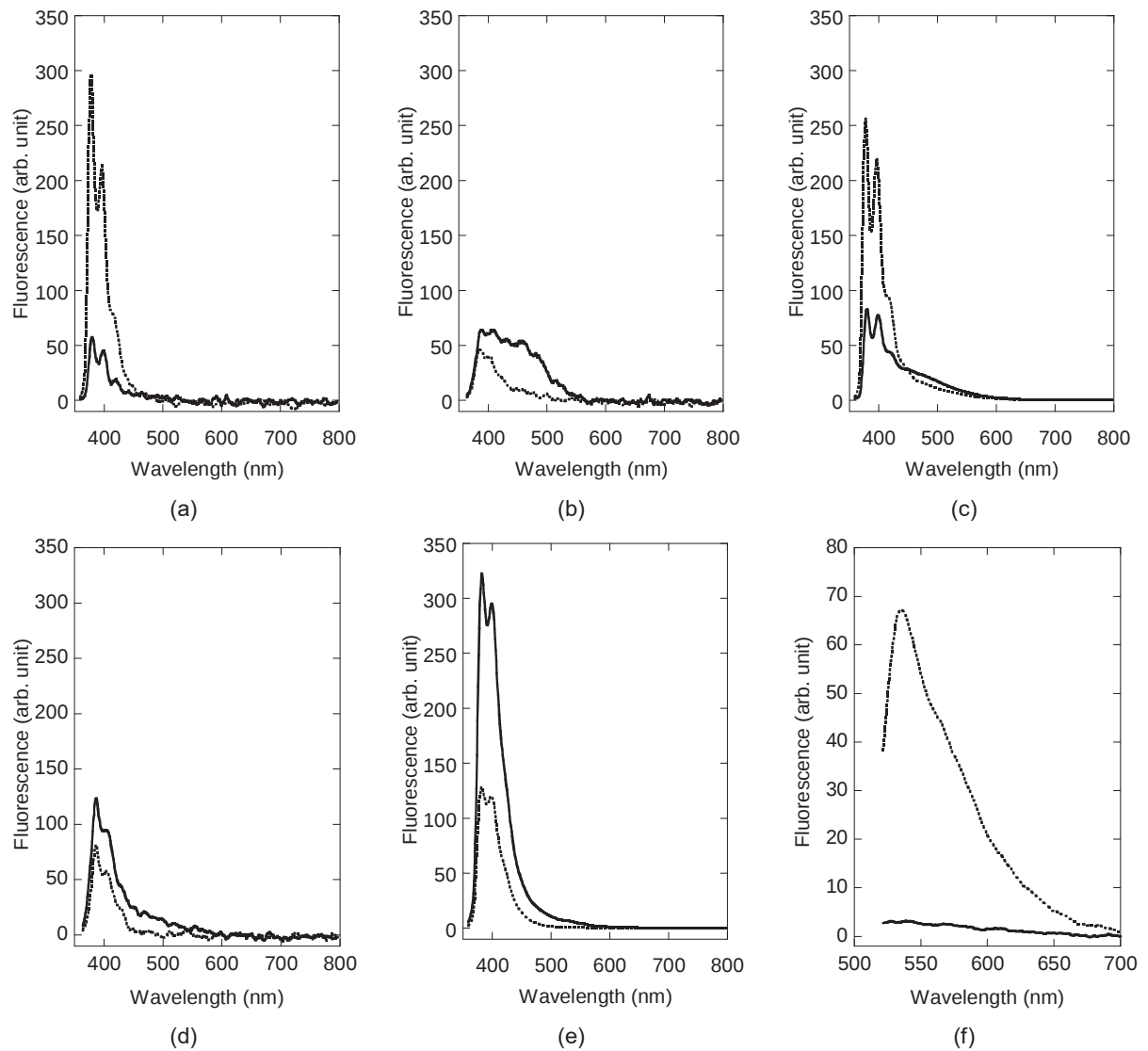
PNA	DNA ^a	T_m (°C) ^b	ΔT_m (°C) ^c	Note
T9-TzPy	D9comp	67.6	-12.4	Complementary
T9-TzTO	D9comp	75.8	-4.2	Complementary
T9-TzTO	D9smT	47.5	-32.5	Single mismatched
10mer-azide	D10comp	57.7	-2.5	Complementary
10mer-TzPy	D10comp	55.6	-3.7	Complementary
10mer-alkyne	D10comp	59.7	-0.5	Complementary
10mer-NTzPy	D10comp	51.1	-9.1	Complementary
10mer-TzTO	D10comp	60.3	+0.1	Complementary
10mer-TzTO	D10smT	38.0	-22.2	Complementary
10mer-TzTO	D10smC	37.2	-23.0	single mismatched
10mer-TzTO	D10smG	26.3	-33.9	single mismatched
12mer-TzTO	D12comp	74.5	-0.3	Complementary
12mer-TzTO	D12smA	58.6	-16.2	single mismatched
12mer-TzTO	D12smC_3'	59.8	-15.0	indirect single mismatched
12mer-TzTO	D12smC_5'	55.7	-19.1	indirect single mismatched

^aDNA sequence (5'→3'): **D9comp** = dAAAAAAAAA; **D9smT** = dAAAAATAAAA; **D10comp** = dAGTGATCTAC; **D10smT** = dAGTGTTCTAC; **D10smC** = dAGTGCTCTAC; **D10smG** = dAGTGGTCTAC; **D12comp** = dGCAGGGATAACT; **D12smA** = GCAGGAATAACT; **D12smC_3'** = GCAGGGCTAACT, **D12smC_5'** = GCAGCGATAACT.

^bCondition: 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, [PNA] = 1.0 μ M and [DNA] = 1.2 μ M

^cRelative to unmodified acpcPNA under similar conditions. T_m of hybrids with complementary DNA; Ac-TTTTTTTTT-Lys (1.0:1.2 μ M = 80.0 °C, 2.5:3.0 μ M = 81.8 °C), Ac-GTAGTCACT-Lys (1.0:1.2 μ M = 60.2 °C, 2.5:3.0 μ M = 62.4 °C), Bz-GTAGTCACT-Lys (1.0:1.2 μ M = 59.3 °C, 2.5:3.0 μ M = 61.4 °C), Ac-AGTTATCCCTGC-Lys (1.0:1.2 μ M = 74.8 °C, 2.5:3.0 μ M = 75.0 °C)

จากนั้นจึงได้ศึกษาสมบัติการเรืองแสงของพีเอ็นเอที่ติดฉลาก Py และ TO ที่สังเคราะห์ได้ทั้งหมด ในสภาพที่เป็นสายเดี่ยว เปรียบเทียบกับเมื่อมีดีเอ็นเอคู่สมอยู่ด้วย (รูปที่ 44) ผลที่ได้แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าพีเอ็นเอที่ติดฉลากเหล่านี้แสดงการเรืองแสงที่ตอบสนองต่อการเกิดไฮบริดกับดีเอ็นเอ โดยบางชนิดก็เป็นการตอบสนองในลักษณะ fluorescence on กล่าวคือการเรืองแสงเพิ่มขึ้นเมื่อมีดีเอ็นเออยู่ด้วย ในขณะที่บางชนิดก็ลดลง โดยระบบที่แสดงการตอบสนองได้ชัดเจนที่สุดคือพีเอ็นเอ **10mer-TzTO** จึงเลือกเฉพาะพีเอ็นเอระบบนี้มาศึกษาต่อถึงความจำเพาะเจาะจงต่อไป ผลการทดลองเบื้องต้นไม่เป็นที่น่าพอใจนักเนื่องจากแม้ว่าการเติมดีเอ็นเอคู่สมจะทำให้การเรืองแสงเพิ่มขึ้นอย่างมาก แต่การเติมดีเอ็นเอที่เป็น single base mismatch หรือแม้แต่ non-complementary ก็ทำให้การเรืองแสงเพิ่มขึ้นค่อนข้างมากเช่นเดียวกัน ซึ่งคาดว่าเกิดจากการจับยี่ตรงระหว่างส่วนของฉลาก TO กับดีเอ็นเอโดยไม่เกี่ยวข้องกับพีเอ็นเอ



รูปที่ 44 Fluorescence spectra of **10mer-PyB** (a), **10mer-PyPm** (b), **10mer-PyPn** (c), **10mer-TzPy** (d), **10mer-NTzPy** (e) and **10mer-TzTO** (f) in the absence (—) and presence (---) of complementary DNA (**D10comp**). Conditions: 2.5 μ M PNA, 3.0 μ M DNA, 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, λ_{excit} 345 nm (**10mer-PyB**, **10mer-PyPm**, **10mer-PyPn**, **10mer-TzPy** and **10mer-NTzPy**) or 508 nm (**10mer-TzTO**).

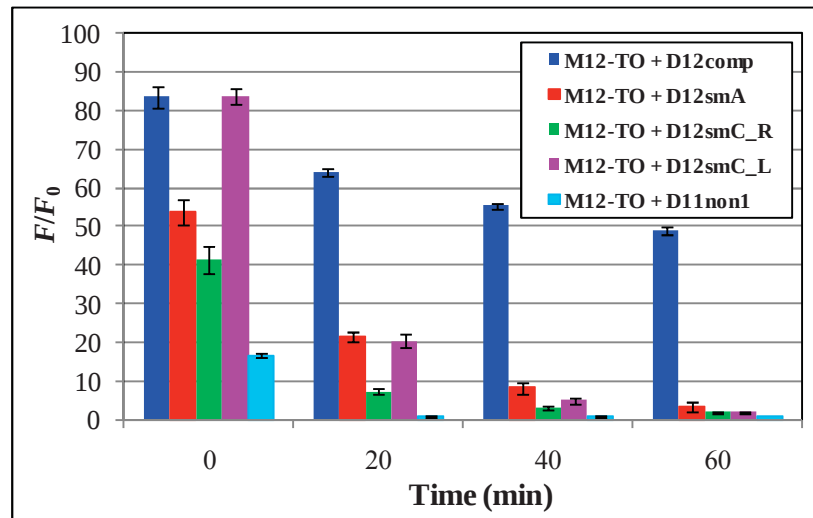
อย่างไรก็ตาม สามารถใช้การย่อยด้วยเอนไซม์ nuclease S1 เพื่อเพิ่มความจำเพาะเจาะจงได้ โดยระยะเวลาของการย่อยจะขึ้นกับความยาวของพีเอ็นเอที่เกี่ยวข้อง ตัวอย่างเช่น ในกรณีของ **12mer-TzTO** ระยะเวลาของการย่อยที่เหมาะสมคือ 60 นาที ซึ่งจะทำให้ได้สัญญาณของ mismatched hybrid ลดลงเหลือใกล้เคียงกับ single stranded PNA ($F/F_0 = 0.7-3.4$) ในขณะที่สัญญาณของ complementary hybrid จะยังคงมีค่าสูงอยู่ ($F/F_0 = 49$) (รูปที่ 45) พีเอ็นเอระบบอื่นจะใช้เวลาในการย่อยที่แตกต่างกัน แต่ในทุกกรณีสามารถบอกความแตกต่างระหว่าง complementary กับ non-complementary (รวมทั้ง single-base mismatched) DNA ได้

อย่างชัดเจน (ตารางที่ 27) ดังนั้นระบบพีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วย TO ผ่านปฏิกิริยารีดักทีฟแอลคิลเลชัน-คลิกร่วมกับเทคนิคการย่อยเอนไซม์ในการตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอได้ โดยให้การเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงที่ชัดเจน

ตารางที่ 27 อัตราส่วนของการเรืองแสงที่ 528 nm ของพีเอ็นเอเมื่อมีดีเอ็นเออยู่ด้วยต่อพีเอ็นเอสายเดี่ยว (F/F_0) ก่อนและหลังการย่อยด้วย nuclease S1 conditions: 30 mM sodium acetate buffer pH 4.6, 1mM zinc acetate, 5% Glycerol, 5 units/mL S1 nuclease [PNA] = 1.0 μ M and [DNA] = 1.0 μ M, Excitation wavelength = 510 nm, PMT gain = high

PNA	DNA	F/F ₀ (at 528 nm) (before digestion)	F/F ₀ (at 528 nm) (after digestion)	Digestion time (min)
T9-TO	D9comp	25.7	20.3	15
	D9smT	34.6	1.6	15
	D9smC	45.5	2.9	15
	D9smG	30.7	1.5	15
10mer-TzTO	D10comp	39.2	10.1	10
	D10smT	22.3	1.6	10
	D10smC	16.1	1.4	10
	D10smG	11.3	1.2	10
	D11non	15.0	1.0	10
12mer-Tz TO	D12comp	83.6	49.0	60
	D12smA	53.6	3.4	60
	D12smC_3'	41.5	1.9	60
	D12smC_5'	83.8	2.0	60
	D11non	16.7	0.7	60

^aDNA sequence (5'→3'): **D9comp** = dAAAAAAAAA; **D9smT** = dAAAAA_TAAAA; **D10comp** = dAGTGATCTAC; **D10smT** = dAGTG_TTCTAC; **D10smC** = dAGTGCTCTAC; **D10smG** = dAGTGGTCTAC; **D11non** = TCTGCATTTAG ; **D12comp** = dGCAGGGATAACT; **D12smA** = GCAGGAATAACT; **D12smC_3'** = GCAGGGCTAACT, **D12smC_5'** = GCAGCGATAACT.



รูปที่ 45 อัตราส่วนของการเรืองแสงที่ 528 nm ของพีเอ็นเอ **12mer-TzTO** เมื่อมีดีเอ็นเออยู่ด้วยต่อพีเอ็นเอสายเดี่ยว (F/F_0) ก่อนและหลังการย่อยด้วย nuclease S1 ที่เวลาต่างๆ conditions: 30 mM sodium acetate buffer pH 4.6, 1mM zinc acetate, 5% Glycerol, 5 units/mL S1 nuclease [PNA] = 1.0 μ M and [DNA] = 1.0 μ M, Excitation wavelength = 510 nm, PMT gain = high

สรุปผลการดำเนินงาน

งานวิจัยที่ได้ดำเนินการภายใต้โครงการย่อยนี้แบ่งออกเป็น 3 ส่วนหลักๆ คือ 1) การสังเคราะห์และศึกษาสมบัติจับยึดของ acpcPNA 2) การสังเคราะห์และศึกษาสมบัติจับยึดของการสังเคราะห์และศึกษาสมบัติจับยึดของ acpcPNA ที่มี modified base และ 3) การสังเคราะห์และศึกษาสมบัติจับยึดของพีเอ็นเอที่มี modified backbone รายละเอียดของงานวิจัยโดยสรุปมีดังนี้

1. การสังเคราะห์และศึกษาสมบัติจับยึดของ acpcPNA

ได้สังเคราะห์ acpcPNA ที่มีความยาวเท่ากันคือ 10 เบส แต่มีสัดส่วนของเบส AT และ CG แตกต่างกันจำนวนทั้งสิ้น 9 ลำดับเบส และศึกษาสมบัติการจับยึดกับดีเอ็นเอ เปรียบเทียบกับอาร์เอ็นเอ และการจับยึดกับตัวเอง ผลการทดลองทั้งหมดยืนยันสมบัติที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัวของ acpcPNA 3 ประการ คือ 1. ความสามารถในการเลือกจับกับดีเอ็นเอได้ดีกว่าอาร์เอ็นเอ 2. ความเสถียรของโมเลกุลผสมระหว่างพีเอ็นเอกับดีเอ็นเอที่ไม่ขึ้นกับสัดส่วนของเบสที่เป็นองค์ประกอบ และ 3. ไม่เกิดโมเลกุลผสมกับตัวเองในทิศทางแอนติพาราเรล สมบัติประการแรกเป็นการบ่งชี้ข้อจำกัดของ acpcPNA ว่าน่าจะเหมาะกับงานที่เกี่ยวข้องกับเป้าหมายของการจับยึดที่เป็นดีเอ็นเอมากกว่าอาร์เอ็นเอ เช่นงานทางด้าน DNA-based diagnostics และ antigene therapeutics ส่วนสมบัติประการที่สองน่าจะเป็นประโยชน์ในการนำไปใช้เป็นโพรบสำหรับตรวจวินิจฉัยแบบ high throughput เช่นในการทำไมโครแอสเรย์ เนื่องจากสามารถออกแบบพีเอ็นเอโพรบหลายๆ ชนิดเพื่อให้จับกับดีเอ็นเอเป้าหมายได้หลายๆ ตำแหน่งพร้อมกัน และสมบัติประการที่สามอาจนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ได้ในการออกแบบพีเอ็นเอสองสายเพื่อให้จับกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่เป็นโมเลกุลแบบเกลียวคู่โดยการเกิด double duplex invasion ซึ่งน่าจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการจับยึดระหว่างพีเอ็นเอกับดีเอ็นเอแบบเกลียวคู่(ซึ่งจะพบในสถานการณ์ของการใช้งานจริง)

2. การสังเคราะห์และศึกษาสมบัติจับยึดของ acpcPNA ที่มี modified base

ได้ศึกษา acpcPNA ที่มี modified base อยู่ 3 กลุ่ม กลุ่มแรกคือเบส hypoxanthine (H) ซึ่งพบว่า เบส H ใน acpcPNA แสดงการจับยึดอย่างจำเพาะเจาะจงกับเบส C ในดีเอ็นเอ การค้นพบนี้ได้เสนอแนะว่าสามารถแทนที่เบส G ใน acpcPNA ด้วยเบส H ได้โดยไม่มีผลกระทบต่อ specificity ในการจดจำเบส C ซึ่งมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการนำ acpcPNA ไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เนื่องจากโมโนเมอร์ของเบส H สามารถสังเคราะห์ได้ง่ายกว่าโมโนเมอร์ของ G นอกจากนี้ยังไม่มีปัญหาเรื่อง oxidation, quenching และการเกิด secondary structure เหมือนเบส G

งานในกลุ่มที่สองเป็นการพัฒนาวิธีการสังเคราะห์และศึกษาสมบัติการจับยึดกับดีเอ็นเอและสมบัติการเรืองแสงของ acpcPNA ที่มีฉลากเรืองแสง pyrene ติดอยู่ที่ตำแหน่ง 5 ของนิวคลีโอเบสยูเรซิล (U^{Py}) โดยพบว่า เบส U^{Py} ใน acpcPNA สามารถจดจำเบส A ในดีเอ็นเอได้อย่างจำเพาะเจาะจง และแสดงสมบัติ base discriminative fluorescence กล่าวคือการเรืองแสงจะเพิ่มขึ้นอย่างมากเมื่อมีการเข้าคู่ระหว่างเบส U^{Py} ใน acpcPNA กับเบส A ใน DNA ทำให้ acpcPNA ที่มีเบส U^{Py} ทำตัวเป็น quencher free molecular beacon ได้ งานในกลุ่มที่ 3 เกี่ยวข้องกับการแทนที่นิวคลีโอเบสใน acpcPNA ด้วย polycyclic aromatic hydrocarbon เช่น pyrene และ anthracene ที่ต่อกับวงแหวนไทรอะโซล (Tz^{Py} และ Tz^{Ant}) โดยอาศัยปฏิกิริยาคลิกกับฟีนอลที่มีหมู่เอไซด์ โดยพบว่าเบส Tz^{Py} ทำหน้าที่เป็น universal base กล่าวคือสามารถเข้าคู่กับเบสธรรมชาติได้ทุกตัวโดยมีความเสถียรไม่แตกต่างกันมากนัก จากนั้นจึงได้ศึกษาสมบัติการเรืองแสงของฟีนอลที่ได้ในสภาพที่เป็นสายเดี่ยว เปรียบเทียบกับเมื่อเข้าคู่กับดีเอ็นเอ พบว่าฟีนอลที่มีเบส Tz^{Py} เมื่อเข้าคู่กับดีเอ็นเอจะมีการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงจากฟีนอลสายเดี่ยวอย่างชัดเจน กล่าวคือการเรืองแสงที่ 460 nm จะลดลง และการเรืองแสงที่ช่วง 390–430 nm จะเพิ่มขึ้น

3. การสังเคราะห์และศึกษาสมบัติจับยึดของฟีนอลที่มี modified backbone

งานวิจัยที่ได้ดำเนินการไปแบ่งเป็น 3 ส่วน คือ 1. การสังเคราะห์และศึกษาสมบัติการจับยึดของฟีนอลที่มีสเตอริโอเคมีของวงแหวนไพโรลีนเป็น ($2'R,4'R$) 2. การสังเคราะห์และศึกษาสมบัติการจับยึดของฟีนอลที่มีกรดเบต้าอะมิโนชนิดอื่นนอกเหนือจาก ACPC เป็นตัวเชื่อม และ 3. การสังเคราะห์ สมบัติการจับยึด และสมบัติการเรืองแสงของฟีนอลที่ติดฉลากเรืองแสงผ่านตัวเชื่อม 3-aminopyrrolidine-4-carboxylic acid (APC)

งานวิจัยส่วนแรกเป็นการสังเคราะห์ acpcPNA ที่มีสเตอริโอเคมีของวงแหวนไพโรลีนและ ACPC ที่ต่างไปจาก RR -Pro/ SS -ACPC โดยแยกศึกษาแต่ละส่วนในฟีนอลที่มีลำดับเบสเป็น T_5 พบว่าจากฟีนอลทั้ง 7 ไดอะสเตอริโอเมอร์นั้น มีเพียงระบบ acpcPNA เดิม [$(2'R,4'R)$ -Pro/(1S,2S)-ACPC] และอีพิเมอร์ของมันที่มีสเตอริโอเคมีของตำแหน่ง 4' บนวงแหวนไพโรลีนเปลี่ยนแปลงไป [$(2'R,4'S)$ -Pro/(1S,2S)-ACPC] เท่านั้นที่แสดงการจับยึดกับดีเอ็นเอได้ จึงได้ศึกษาระบบใหม่ที่เรียกชื่อว่า *epi-acpcPNA* นี้ต่ออย่างละเอียดในฟีนอลที่มีลำดับเบสที่ซับซ้อนขึ้น ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า *epi-acpcPNA* แสดงการจดจำดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอที่คล้ายคลึงกับ acpcPNA แต่ระบบ *epi-acpcPNA* สามารถเกิดไฮบริดที่ค่อนข้างเสถียรกับตัวเองได้ได้ในทิศทางแอนติพาราเรล ซึ่งแตกต่างจาก acpcPNA อย่างชัดเจน และอาจนำไปสู่การประยุกต์ใช้ที่แตกต่างกันของฟีนอลทั้งสองระบบ โดย acpcPNA น่าจะเหมาะสำหรับ applications ที่เกี่ยวกับ DNA ที่ไม่ต้องการการเกิด self hybrid เช่น การ target cellular DNA ด้วย double duplex invasion mechanism ในขณะที่ *epi-acpcPNA* น่าจะเหมาะสมกับการนำไปใช้ทางด้านนาโนเทคโนโลยี/เครื่องมือระดับโมเลกุลที่อาศัยการจดจำระหว่างฟีนอลสองสาย

งานวิจัยในส่วนที่สองเป็นการสังเคราะห์และศึกษาสมบัติการจับยึดของฟีนอลที่มีการแทนที่ตัวเชื่อมที่เป็นกรดเบต้าอะมิโน 2-aminocyclopentanecarboxylic acid (ACPC) ซึ่งเป็น 5-membered ring ใน acpcPNA ด้วยไซคลิกเบต้าอะมิโนแอซิดที่มีวงแหวนขนาดเล็กและใหญ่ขึ้น ได้แก่ aminocyclopropanecarboxylic acid (ACC) (3-membered) /2-aminocyclobutanecarboxylic acid (ACBC) (4-membered) และ 2-

aminocyclohexanecarboxylic acid (ACHC) (5-membered) ทำให้ได้พีเอ็นเอชนิดใหม่คือ accPNA, acbcPNA และ achcPNA ผลการศึกษาการจับยัดของ acbcPNA กับ DNA และ RNA พบว่า acbcPNA เกิดไฮบริดกับ DNA และ RNA เฉพาะในทิศทางแอนติพาราเรล โดยไฮบริดที่เกิดขึ้นมีความเสถียรมากกว่าของ acpcPNA อยู่ประมาณ 9–15 °C สำหรับดีเอ็นเอ และ 15–18 °C สำหรับอาร์เอ็นเอ โดยที่ความจำเพาะเจาะจงของการจับยัดยังสูงอยู่ในขณะที่ accPNA และ achcPNA ไม่แสดงการจับยัดกับดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สม ซึ่งสามารถอธิบายได้จากค่า torsional angle (θ) ของไซคลิกเบต้าอะมิโนแอซิดที่เกี่ยวข้อง (ได้จากการคำนวณทางทฤษฎี และข้อมูลจากเอกสารอ้างอิง) โดย acbcPNA จะมีค่าใกล้เคียงกับค่าที่เหมาะสม (99 °) มากที่สุด ในขณะที่ accPNA และ achcPNA มีค่าต่างออกไปมากที่สุด ข้อมูลที่ได้จะนำไปสู่การออกแบบพีเอ็นเอระบบใหม่ที่มีความสามารถในการจับยัดกับดีเอ็นเอและ/หรืออาร์เอ็นเอที่ดีขึ้น

งานวิจัยในส่วนที่ 3 เป็นการสังเคราะห์ acpcPNA ที่มีการแทนที่ตัวเชื่อม ACPC ด้วย 3-aminopyrrolidine-4-carboxylic acid (APC) เพื่อให้มีหมู่อะมิโนที่สามารถดัดแปลงเพิ่มเติมได้ด้วยฉลากเรืองแสงที่บริเวณใดๆ ตามต้องการบนสายของพีเอ็นเอ โดยอาศัยการสร้างพันธะเอไมด์ ปฏิกิริยารีดักทีฟแอลคิลเลชัน หรือปฏิกิริยารีดักทีฟแอลคิลเลชัน-คลิก ได้ใช้วิธีการใหม่เหล่านี้ในการสังเคราะห์พีเอ็นเอที่ติดฉลากเรืองแสงที่สามารถเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงได้ตามสภาพแวดล้อม ได้แก่ ไพรีน และไทอะโซลลอเรนจ์ และได้แสดงให้เห็นว่าพีเอ็นเอที่ติดฉลากเหล่านี้มีการเรืองแสงเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเข้าคู่กับดีเอ็นเอ โดยพีเอ็นเอที่ติดฉลากไพรีนจะให้การเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงประมาณ 4-14 เท่า ในขณะที่พีเอ็นเอที่ติดฉลากไทอะโซลลอเรนจ์จะให้การเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงที่ชัดเจนกว่า (10–50 เท่า) พีเอ็นเอที่ติดฉลากเหล่านี้แสดงการเรืองแสงที่เพิ่มขึ้นด้วยเมื่อมีดีเอ็นเอที่ไม่เป็นคู่สม อย่างไรก็ตาม สามารถใช้การย่อยด้วยเอนไซม์ nuclease S1 เพื่อช่วยเพิ่มความจำเพาะเจาะจงได้ โดยในทุกกรณีหลังการย่อย สัญญาณของไฮบริดคู่สมจะคงเดิม แต่สัญญาณของไฮบริดที่ไม่เป็นคู่สมจะลดลงเหลือเท่าสัญญาณของพีเอ็นเอสายเดี่ยว พีเอ็นเอที่ติดฉลากเหล่านี้จึงมีศักยภาพสูงในการนำไปใช้เป็น quencher free molecular beacon สำหรับการตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอ

References

- Aitken, D. J.; Gauzy, C.; Pereira, E. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 2359–2361.
- Amann, N.; Wagenknecht, H.-A. *Synlett* **2002**, 687–690.
- Appella, D. H.; Christianson, L. A.; Karle, I. L.; Powell, D. R.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6206–6212.
- 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.
- Baker, B.R. Tanna, P.M. *J. Org. Chem.* **1965**, *30*, 3857–3858.
- Balaji, B.S.; Gallazzi, F.; Jia, F.; Lewis, M.R. *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 551–558.
- Bonger, K.M.; Kapoerchan, V.V.; Grotenberg, G.M.; van Koppen, C.J.; Timmers, C.M.; van der Marel, G.A.; Overkleeft, H.S. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 1881–1884.
- Boonlua, C.; Vilaivan, C.; Wagenknecht, H.-A.; Vilaivan, T. *Chem. Asian. J.* **2011**, *6*, 3251–3259.
- Boontha B.; Nakkuntod, J.; Hirankarn, N.; Chaumpluk, P.; Vilaivan, T. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 8178–8186.
- Case-Green, S.C.; Southern, E.M. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 131–136.
- Coy, D.H.; Hocart, S.J.; Sasaki, Y. *Tetrahedron* **1988**, *44*, 835–841.
- Englund, E.A.; Appella, D.H. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 3465–3467.
- Fernandes, C.; Faure, S.; Pereira, E.; Théry, V.; Declerck, V.; Guillot, R.; Aitken, D. J. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 3606–3609.
- Fernandes, C.; Pereira, E.; Faure, S.; Aitken, D. J. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 3217–3220.
- Gothelf, K. V.; Thomas H. LaBean, T. H. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 4023–4037.
- Kawai, K.; Wata, Y.; Hara, M.; Tojo, S.; Majima, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3586–3590.
- Khan, N.; Arumukam, V.; Balasubramanian, S. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 4819–4822.
- Korkaew, P.; Vilaivan, T. *Nucleic Acids Symposium Series* **2008**, *52*, 251–252.
- Lahoud, G.; Timoshchuk, V.; Lebedev, A.; Arar, K.; Hou, Y.-M.; Gamper, H. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 6999–7008.
- Lee, H.-S.; LePlae, P.R.; Porter, E.A.; Gellman, S.H. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 3597–3599.
- Lohse, J.; Dahl, O.; Nielsen, P.E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 11804–11808.
- Mackinnon, K.F.; Qualley, D.F.; Woski, S.A. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 8074–8077.
- Komiyama, M.; Ye, S.; Liang, X.; Yamamoto, Y.; Tomita, T.; Zhou, J.-M.; Aburatani, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3758–3762.
- Manoharan, M.; Tivel, K.L.; Zhao, M.; Nafisi, K.; Netzel, T.L. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 17461–17472.
- Mansawat, W.; Boonlua, C.; Siriwong, K.; Vilaivan, T. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 3988–3995.
- Mansawat, W.; Vilaivan, C.; Balázs, Á.; Aitken, D.; Vilaivan, T. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 1440–1443.
- Marras, S.A.E. *Mol. Biotechnol.* **2008**, *38*, 247–255.
- Mayer, E.; Valis, L.; Wagner, C.; Rist, M.; Amann, N.; Wagenknecht, H.-A. *Chem. Biochem.* **2004**, *5*, 865–868.

- Morvan, F.; Rayner, B.; Imbach, J. L.; Lee, M.; Hartley, J. A.; Chang, D. K.; Lown, J. W. *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 7027–7044.
- Reenabthue, N.; Boonlua, C.; Vilaivan, C.; Vilaivan, T.; Suparpprom, C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 6465–6469.
- Schweitzer, B.A.; Kool, E.T. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1863–1872.
- Sezi, S.; Varghese, R.; Vilaivan, T.; Wagenknecht, H.-A. *ChemOpen* **2012**, in press.
- Siriwong, K.; Chuichay, P.; Saen-oon, S.; Suparpprom, C.; Vilaivan, T.; Hannongbua, S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *372*, 765–771.
- Sun, X.; Lee, J.K. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 1848–1854.
- Taechalertpaisarn, J.; Sriwarom, P.; Boonlua, C.; Yotapan, N.; Vilaivan, C.; Vilaivan, T. *Tetrahedron Lett* **2010**, *51*, 5822–5826.
- Timár, Z.; Bottka, S.; Kovács, L.; Penke, B. *Nucleosides Nucleotides* **1999**, *18*, 1131–1133.
- Tourwé, D.; Piron, J.; Defreyn, P.; Van Binst, G. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 5499–5502
- Varghese, R.; Wagenknecht, H.-A. *Chem Eur. J.* **2009**, *15*, 9307–9310.
- Venkatesan, N.; Seo, Y. J.; Kim, B. H. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 648–663.
- Vilaivan, T.; Srisuwannaket, C. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1879–1900.
- Vilaivan, C.; Srisuwannaket, C.; Ananthanawat, C.; Suparpprom, C.; Kawakami, J.; Yamaguchi, Y.; Tanaka, Y.; Vilaivan, T. *Artificial DNA: PNA & XNA* **2011**, *2*, 50–59.
- Wang, J.; Cai, X.; Wang, J.Y.; Johnsson, C.; Palecek, E. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 4065–4070.
- Wang, J.; Rivas, G.; Fernandes, J.R.; Paz, J.L.L.; Jiang, M.; Waymire, R. *Anal. Chim. Acta.* **1998**, *375*, 197–203.
- Wanninger-Weiss, C.; Wagenknecht, H.-A. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 64–71.
- Wilson, J. N.; Cho, Y.; Tan, S.; Cuppoletti, A.; Kool, E. T. *ChemBiochem.* **2008**, *9*, 279–285.
- Woo, J.; Meyer, R.B.; Gamper, H.B. *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 2470–2475.
- Yamana, K.; Iwase, R.; Furutani, S.; Tsuchida, H.; Zako, H.; Yamaoka, T.; Murakami, A. *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 2387–2392.

รายงานฉบับสมบูรณ์ของโครงการย่อยที่ 2

ชื่อโครงการ การตรวจวัดดีเอ็นเอด้วยเซนตริติกฟลูออโรสโคปีของโพลีเมอร์เรืองแสงและเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิด
Denctric Fluorophores for Detection of DNA/PNA Hybridization

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยย่อย รศ.ดร.มงคล สุขวัฒนสินธุ์

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 มกราคม 2555 ถึงวันที่ 30 มิถุนายน 2555

1. การดำเนินงาน
- ☒ ได้ดำเนินการตามแผนที่วางไว้
 - ☐ ได้ดำเนินการล่าช้ากว่าแผนที่วางไว้
 - ☐ ได้เปลี่ยนแผนงานที่วางไว้ดังนี้.....

2. รายละเอียดผลการดำเนินงานของโครงการ

2.1 กิจกรรมที่วางแผนไว้

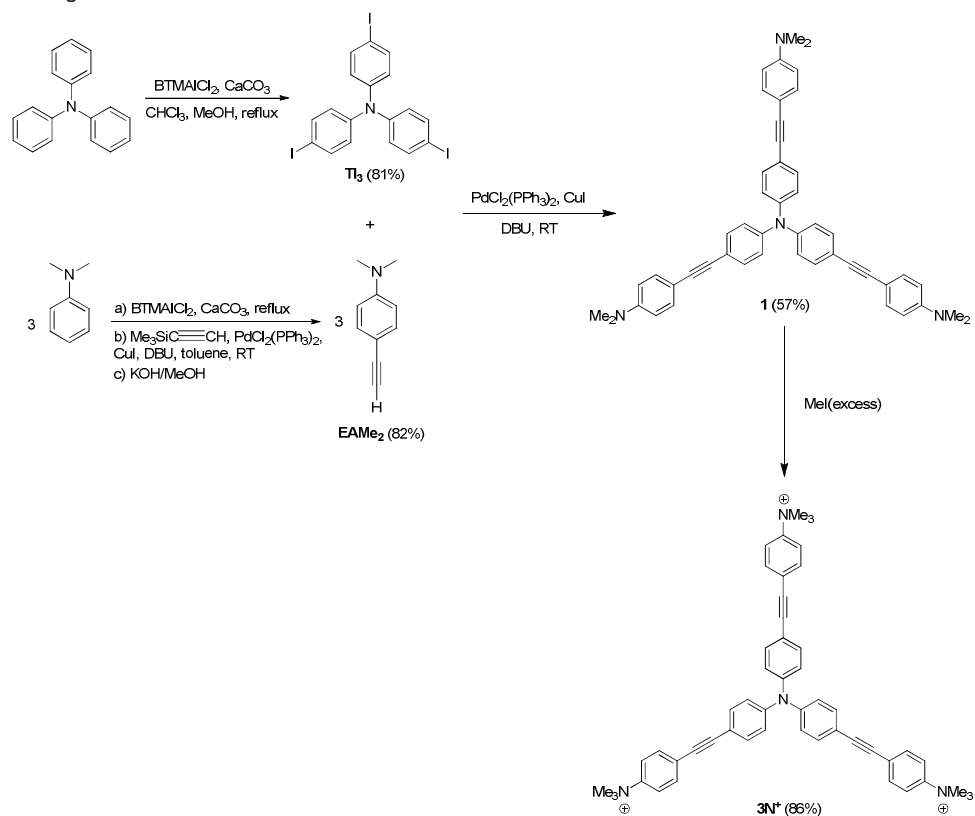
- สังเคราะห์เซนตริติกฟลูออโรสโคปีของโพลีเมอร์ละลายน้ำได้
- พิสูจน์ทราบโครงสร้างของฟลูออโรสโคปีที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิคต่อไปนี้ NMR, IR, MS, EA
- ศึกษาสมบัติเชิงแสงที่สำคัญของฟลูออโรสโคปี เช่นการดูดกลืนแสง ความสามารถในการดูดกลืนแสง (extinction coefficient) การคายแสงประสิทธิภาพการคายแสง(quantum yield)อิทธิพลของสารลดแรงตึงผิว
- ศึกษาการตรวจวัดโดยใช้หลักการเข้าคู่กันของสาย DNA
- ศึกษาการตรวจวัดโดยใช้หลักการเข้าคู่กันระหว่างสายPNAและ DNA

2.2 กิจกรรมที่ได้ทำจริง

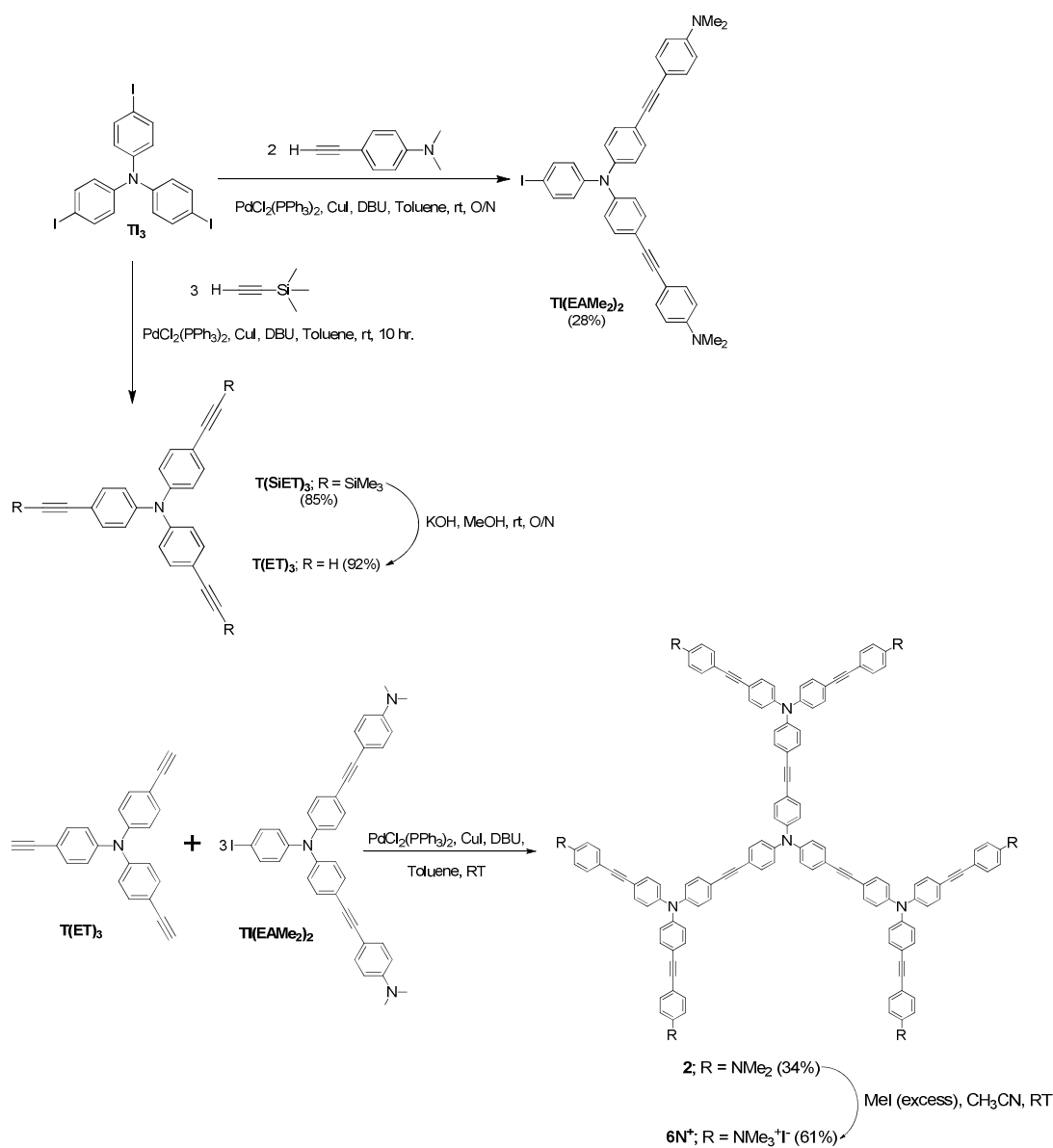
- สังเคราะห์เซนตริติกฟลูออโรสโคปีของโพลีเมอร์ละลายน้ำได้
- พิสูจน์ทราบโครงสร้างของฟลูออโรสโคปีที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิคต่อไปนี้ NMR, IR, MS, EA
- ศึกษาสมบัติเชิงแสงที่สำคัญของฟลูออโรสโคปี เช่นการดูดกลืนแสง ความสามารถในการดูดกลืนแสง (extinction coefficient) การคายแสงประสิทธิภาพการคายแสง (quantum yield) อิทธิพลของสารลดแรงตึงผิว
- ศึกษาการตรวจวัดโพลีเมอร์ไอออนโลหะโพแทสเซียมโดยใช้หลักการจับของ DNA aptamers
- ศึกษาการตรวจวัดลำดับเบสดีเอ็นเอโดยใช้หลักการเข้าคู่กันระหว่างสาย PNA และ DNA

3. ผลการดำเนินงาน

ผู้วิจัยได้สังเคราะห์เดนทรีติกพอลิเล็กโทรไลต์เรืองแสงที่มีประจุบวก หรือเดนทรีเมอร์ลำดับชั้นที่ศูนย์และหนึ่งที่มีโครงสร้างหลักเป็นหมู่ phenylene-ethynylene และมีหมู่ปลายเป็นหมู่ trimethylammonium โดยอาศัยปฏิกิริยาควบคู่แบบ Sonogashira reaction ดังแสดงตามขั้นตอนในกลไกที่ 1 และ 2



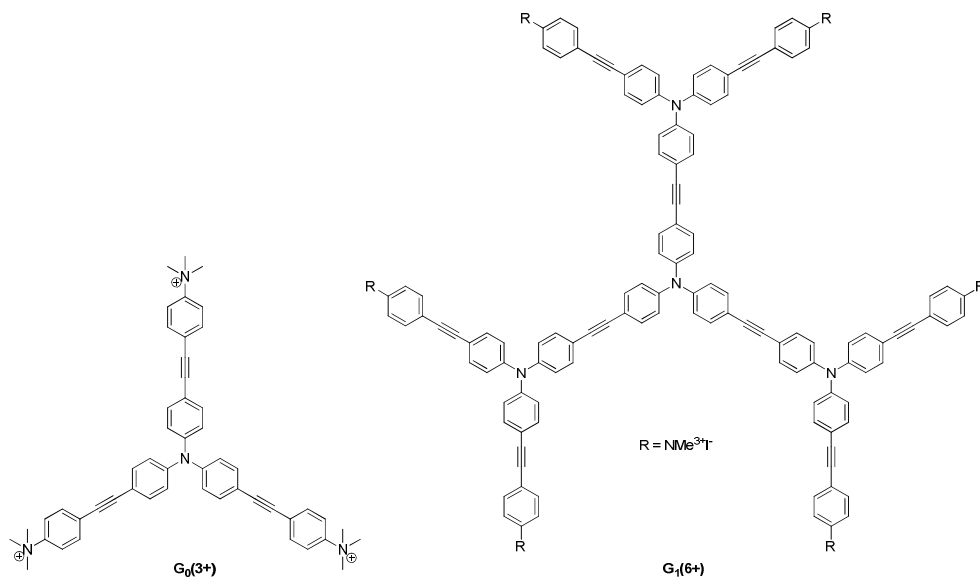
กลไกที่ 1 การสังเคราะห์เดนทรีติกพอลิเล็กโทรไลต์เรืองแสง เดนทรีเมอร์ลำดับชั้นที่ศูนย์ (3N⁺)



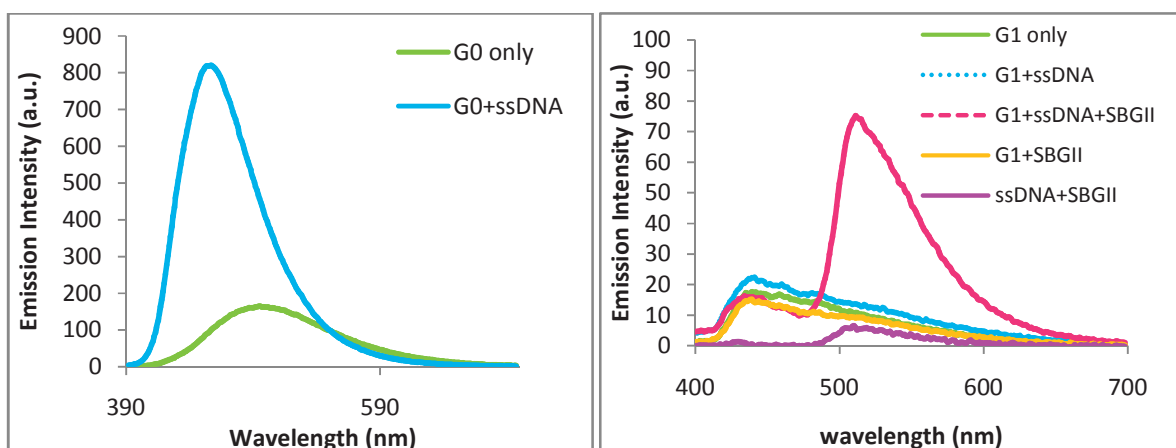
กลไกที่ 2 การสังเคราะห์เดนดริติกพอลิอิเล็กโทรไลต์เรืองแสง เดนดริเมอร์ลำดับชั้นที่หนึ่ง(6N^+)

พบว่าเดนดริติกพอลิอิเล็กโทรไลต์เรืองแสงที่มีประจุบวกโครงสร้างดังรูปที่ 1 สามารถตอบสนองต่อ DNA ได้ โดยเดนดริเมอร์ลำดับชั้นที่ศูนย์ (G_0) ให้การตอบสนองโดยตรงในรูปของการเพิ่มสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์มากถึงสี่เท่าเมื่อในระบบมีสายดีเอ็นเอ (11 เบส)อยู่เป็นอัตราส่วน 1:1

ในขณะที่เดนดริเมอร์ลำดับชั้นที่หนึ่ง (G_1) จะไม่มีการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์แต่อย่างใด เมื่อในระบบมีสายดีเอ็นเออยู่ อย่างไรก็ตามเราพบว่าหากทำการเติมสีย้อมฟลูออเรสเซนซ์ (SyBrGreen II) ที่สามารถรับพลังงานจากเดนดริเมอร์ของเราได้ลงไปในระบบที่มีดีเอ็นเออยู่นั้น จะสังเกตเห็นสัญญาณ FRET ที่เกิดขึ้นได้อย่างชัดเจน ซึ่งในระบบที่ไม่มีดีเอ็นเอเลยนั้น จะไม่เกิดการส่งผ่านพลังงานจากเดนดริเมอร์ไปสู่ SyBrGreen II แต่อย่างใด จากผลดังกล่าวทำให้เราสรุปถึงการมี interaction ต่อกันของเดนดริเมอร์ลำดับที่หนึ่งกับสายดีเอ็นเอ



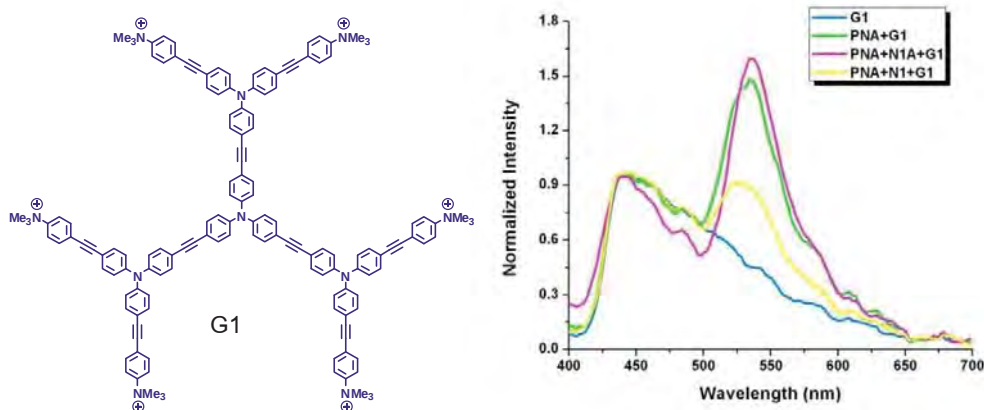
รูปที่ 1 โครงสร้างของเดนทรีเมอร์ลำดับชั้นที่ศูนย์ (G_0) และลำดับชั้นที่หนึ่ง (G_1)



รูปที่ 2 ซ้าย: กราฟฟลูออเรสเซนส์ในระบบที่ไม่มี (เส้นสีเขียว) และมีดีเอ็นเอสายเดี่ยว (5'TAGGCATATG3') (เส้นสีฟ้า) ของเดนทรีเมอร์ลำดับชั้นที่ศูนย์ขวา: กราฟฟลูออเรสเซนส์ในระบบที่ไม่มีดีเอ็นเอ (เส้นสีเขียว) ระบบที่มีดีเอ็นเอสายเดี่ยว (5'CCTATATAGGTGATGCCTTCTCCGGCGACG3') (เส้นสีฟ้า) และระบบที่มีสีย้อมฟลูออเรสเซนส์ (เส้นประสีชมพู) ของเดนทรีเมอร์ลำดับชั้นที่หนึ่ง

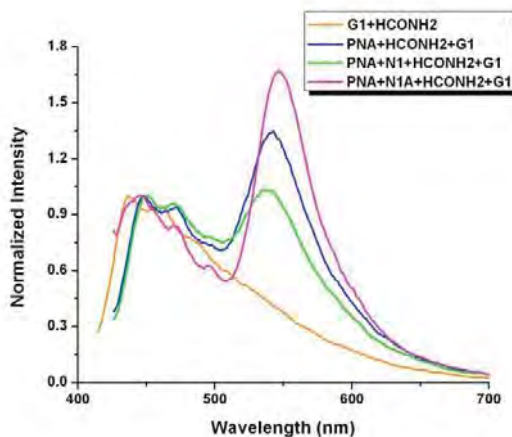
1. จากผลการทดลองในเบื้องต้นโดยใช้ G_1 เป็น fluorescence energy donor (รูปที่ 3) เติมนิวคลีโอไทด์ DNA (N1A) จะเห็นสัญญาณการเรืองแสงของ fluorescein (สัญญาณ FRET) ได้ และเมื่อ mismatched DNA (N1) ก็เกิดสัญญาณ FRET เช่นกันแต่ในระดับที่ต่ำกว่า อย่างไรก็ตามผู้วิจัยยังพบว่าสัญญาณ FRET เกิดขึ้นก่อนการเติม DNA ด้วย ซึ่งจัดเป็น non-specific interaction ระหว่าง G_1 และ PNA-FI โดย lipophilic interaction ระหว่างโครงสร้างชั้นในของ G_1 กับ peptide backbone ของ PNA เมื่อมีการเติม N1A และเกิด DNA/PNA duplex แล้ว อันตรกิริยาแบบ coulombic ระหว่าง duplex กับ G_1 จึงเกิดขึ้น ซึ่งทำให้ไม่เห็นความแตกต่างระหว่างระบบที่มีและไม่มี DNA/PNA duplex แต่ในกรณีที่

เติม N1 ซึ่งไม่ทำให้เกิด DNA/PNA duplex แต่ N1 นั้นสามารถจับกับ G1 ได้ด้วยด้วยแรงระหว่างประจุ และอาจมี G1 ที่เหลือบางส่วนเกิด lipophilic interaction กับ PNA ได้ จึงทำให้เห็นสัญญาณ FRET ที่น้อยลง



รูปที่ 1 ผลการทดลองกับ G₁

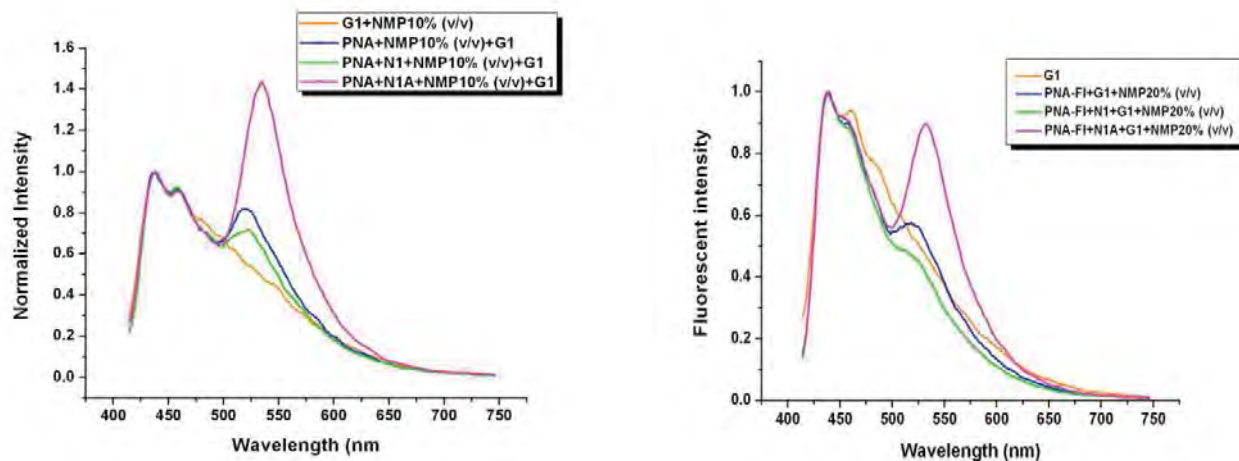
ผลการทดลองข้างต้นบ่งชี้ว่า G1 สามารถถ่ายเทพลังงานให้แก่ fluorescein ได้ แต่โครงสร้างชั้นในของ G1 ที่มีขั้วน้อยอาจเกิดอันตรกิริยากับส่วนที่มีขั้วน้อยใน PNA ได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้พยายามปรับลด non-specific interaction ระหว่าง PNA-FI กับ G1 โดยการเติมสารเติมแต่ง (additive) ต่างๆ เช่น formamide 20%(v/v) ดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 ผลการทดลองเมื่อมีการเติม formamide 20% (v/v)

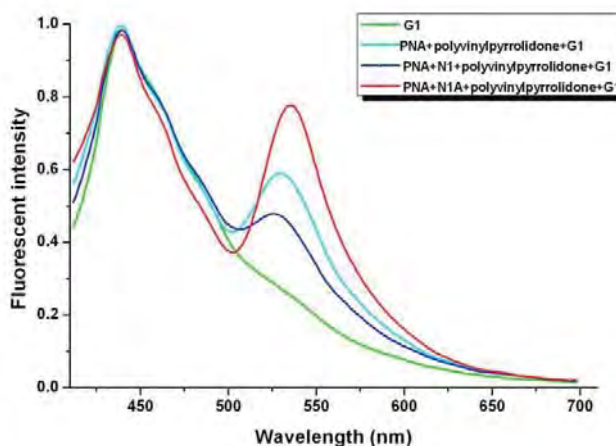
ซึ่งจากการทดลองจะเห็นว่า การเติม formamide ทั้งในปริมาณ 10%(v/v) และ 20% (v/v) นั้นพบว่าสามารถลด non-specific interaction ระหว่าง PNA-FI กับ G₁ ได้บางส่วน สัญญาณ FRET ของระบบที่มี matched DNA(N1A) นั้นยังคงอยู่ในระดับที่สูงที่สุด และที่ 20% (v/v) ให้ FRET ratio ที่สูงกว่า

ต่อมาได้ทำการทดลองเติม N-methyl-pyrrolidone (NMP) 10%(v/v) และ 20% (v/v) เพื่อพยายามปรับลด non-specific interaction ดังกล่าวเช่นเดียวกัน ซึ่งให้ผลการทดลองดังรูปที่ 5 และยังได้ทำการทดลองเติม Polyvinylpyrrolidone เพื่อเปรียบเทียบผลการทดลอง (รูปที่ 6)



รูปที่5 ผลการทดลองกับ G_1 เมื่อมีการเติม NMP 10 % (v/v) และ 20% (v/v) ตามลำดับ

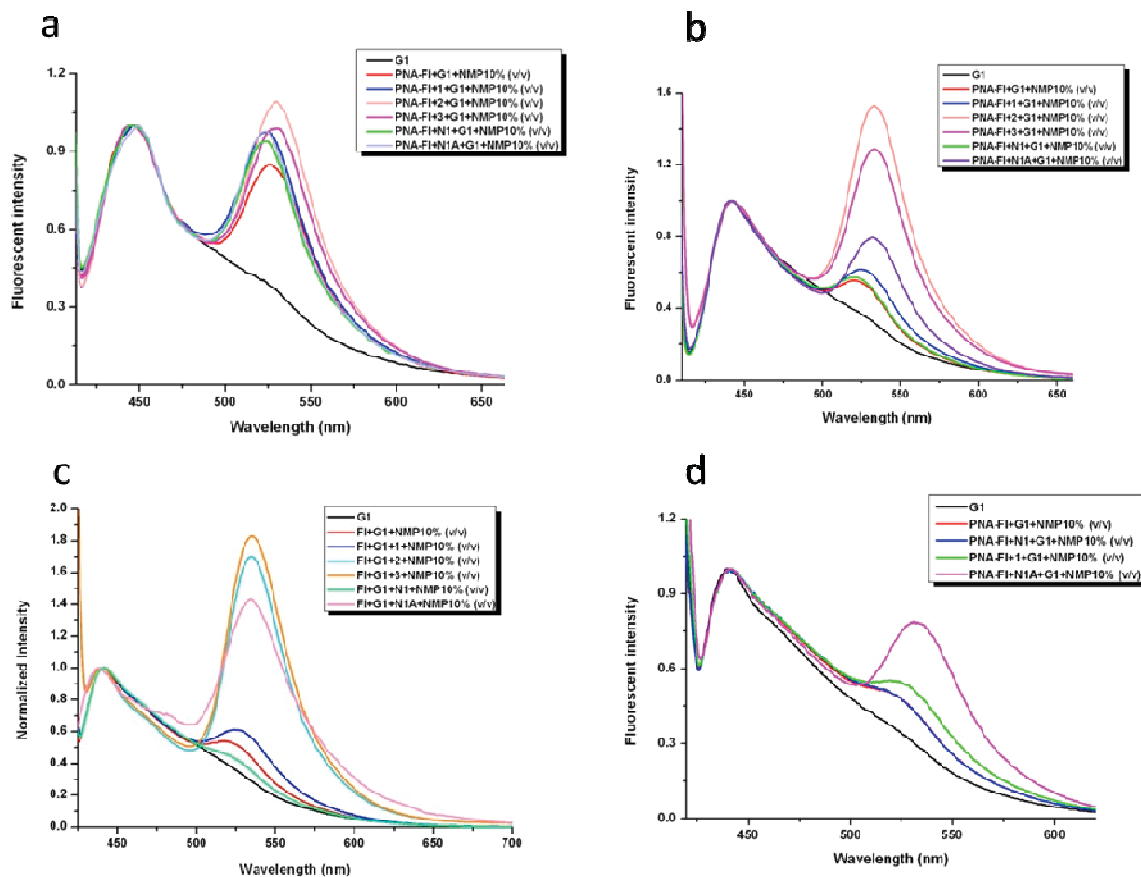
ซึ่งจากการทดลองจะเห็นว่าการเติม NMP ในปริมาณทั้ง 10 %(v/v), 20% (v/v) และ Polyvinylpyrrolidone นั้นพบว่าสามารถลด non-specific interaction ระหว่าง PNA-FI กับ G_1 ได้บางส่วน และที่ปริมาณการเติม NMP 10%(v/v) ให้ FRET ratio ที่สูงที่สุด



รูปที่ 6 ผลการทดลองกับ G_1 เมื่อมีการเติม Polyvinylpyrrolidone

และต่อมาได้ทำการทดลองเปลี่ยนแปลงความเข้มข้น G_1 กับตัวอย่าง ssDNA ใหม่ที่เพิ่มมา 3 สาย คือ single mismatched (1), Complimentary DNA +/- 5 bases (2) และ Complimentary DNA +/- 10 bases (3) และ ตัวอย่าง ssDNA เดิม คือ totally mismatched DNA (N1) กับ Complimentary DNA (N1A) ดังรูปที่ (5a-d) จากการทดลองพบว่า

ความเข้มข้นต่ำสุดของ G₁ ที่สามารถแยกความแตกต่างของสัญญาณที่ได้จาก N1 และ N1A คือ 0.5 uM แต่ประสิทธิภาพในการถ่ายเทพลังงานแบบ FRET จะสูงที่สุดเมื่อความเข้มข้นของ G₁ เท่ากับ 1.0 uM ดังรูปที่ 7

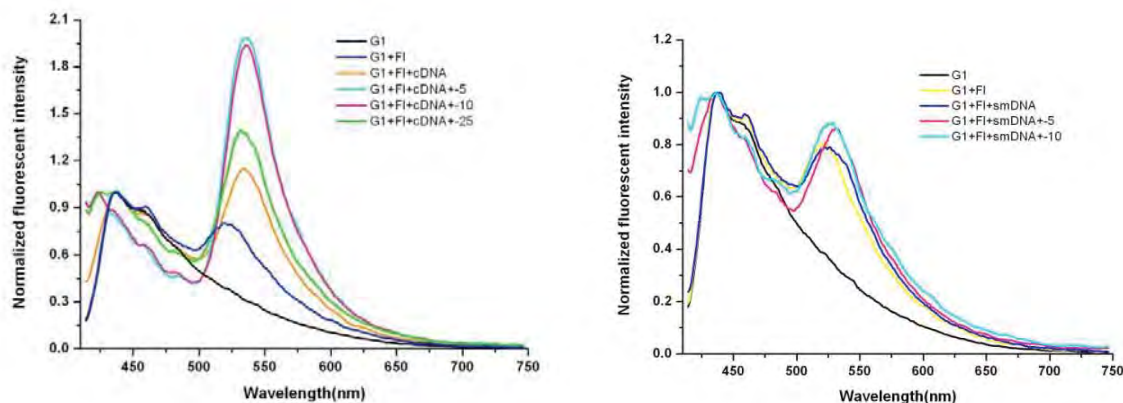


รูปที่ 7 ผลการทดลองกับ G₁ เท่ากับ (a) 0.2 uM, (b) 0.5 uM, (c) 1.0 uM และ (d) 1.5 uM.

จากผลการทดลองข้างต้นเดอนดริติกพอลิเล็กโทไรด์ G₁ สามารถใช้เป็น energy donor ควบคู่กับ fluorescein-labelled PNA (PNA-FI) ในการตรวจหา DNA ที่มีลำดับเบสที่เป็นคู่สมกับ PNA ได้ โดยสัญญาณ FRET ของระบบที่มี complimentary DNA จะสูงกว่า 1.0 โดยผลงานวิจัยที่ผ่านมาได้ทำการทดลองกับ DNA ที่มีความยาวเท่ากับจำนวนเบสในสาย PNA (11 เบส)

ดังนั้นผู้วิจัยได้ทำการทดลองเพิ่มเติมกับตัวอย่าง complementary DNA (cDNA) และ single mismatch DNA (smDNA) ที่มีความยาวจาก 11 เบส เป็น 21, 31 และ 61 เบส เพื่อศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของกระบวนการถ่ายเทพลังงานผลทดลองพบว่า ในกรณีของ cDNA เมื่อความยาวของสายเพิ่มขึ้นจาก 11 เป็น 21 หรือ 31 เบส FRET ratio ที่ได้มีค่าเพิ่มขึ้นซึ่งเป็นผลมาจาก Coulombic interaction ระหว่าง residual base units ที่เพิ่มขึ้น แต่เมื่อเพิ่มความยาวไปเป็น 61 เบส พบว่า FRET ratio ที่ได้กลับมีค่าลดลงเล็กน้อย ซึ่งอาจจะอธิบายได้ว่าความยาวของสาย DNA ที่มากขึ้นนี้อาจไปลดโอกาสที่ G₁ จะเข้ามาอยู่ใกล้กับ fluorescein ในระยะที่เหมาะสมแต่ในกรณีของ smDNA เมื่อเพิ่มความยาวสาย DNA จาก

11 เป็น 21 และ 31 เบส FRET ratio ที่ได้เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยโดยจะไม่เห็นความแตกต่างที่ชัดเจนระหว่าง DNA ที่มี 21 และ 31 เบส ดังรูปที่ 8



รูปที่ 8 Emission spectra ของการทดลองโดยใช้ complimentary (ซ้าย)และ single mismatched DNA (ขวา) ที่มีความยาวของสายแตกต่างกัน

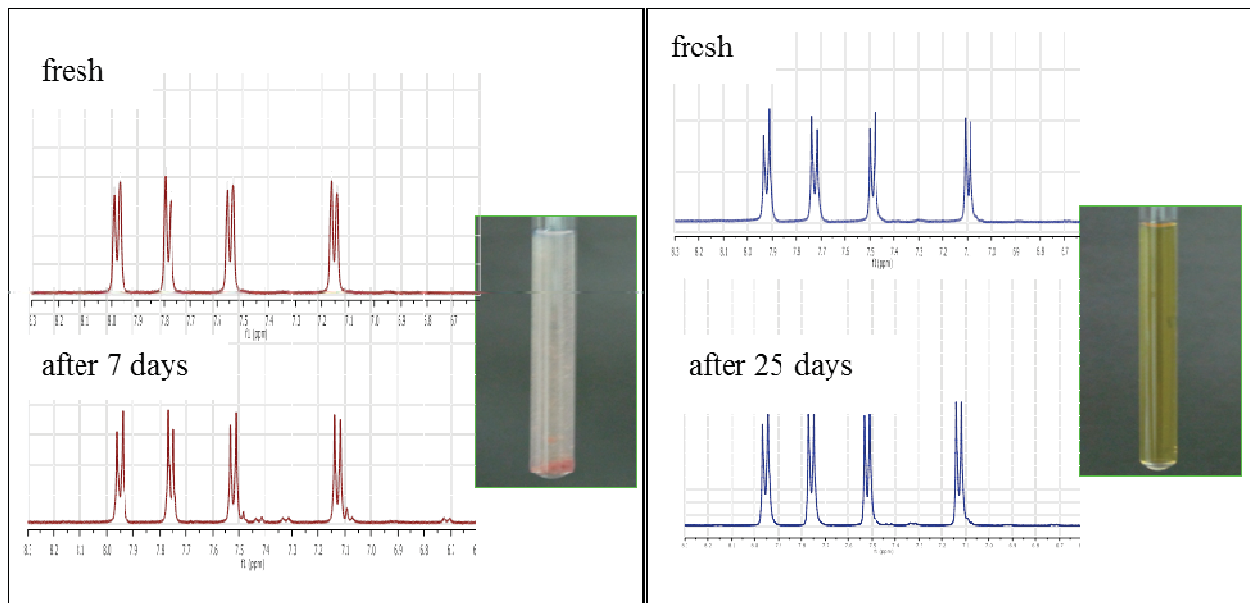
ตารางที่ 1 เปรียบเทียบ FRET ratio ระหว่างผลการทดลองที่ผ่านมา กับผลการทดลองใหม่

	FRET ratio (ผลที่เคยรายงานไว้)	FRET ratio (ผลการทดลองใหม่)
G1+FI-acpcPNA	0.39	0.80
2+FI-acpcPNA+cDNA(11bases)	1.42	1.15
2+FI-acpcPNA+cDNA+/-5 (21bases)	1.72	1.99
2+FI-acpcPNA+cDNA+/-10 (31bases)	1.86	1.94
2+FI-acpcPNA+cDNA+/-25 (61bases)	-	1.40
2+FI-acpcPNA+smDNA (11bases)	0.51	0.79
2+FI-acpcPNA+smDNA+/-5 (21bases)	-	0.87
2+FI-acpcPNA+smDNA+/-10 (31bases)	-	0.88

เนื่องจาก non-specific FRET signal ที่ได้จากการทดลองครั้งนี้มีค่าสูงกว่าผลการทดลองก่อนหน้านี้แม้ว่าจะมีการเติม N-methyl-2-pyrrolidone แล้วก็ตาม จึงอาจเป็นไปได้ว่าความเข้มข้นของ PNA-FI stock solution มีความคลาดเคลื่อน ซึ่งจะต้องตรวจสอบและทำการทดลองซ้ำอีกครั้ง อย่างไรก็ตามผลการทดลองส่วนใหญ่ยังคงเป็นไปในทิศทางเดิม และยังสามารถใช้ออกความแตกต่างระหว่าง cDNA กับ smDNA ได้

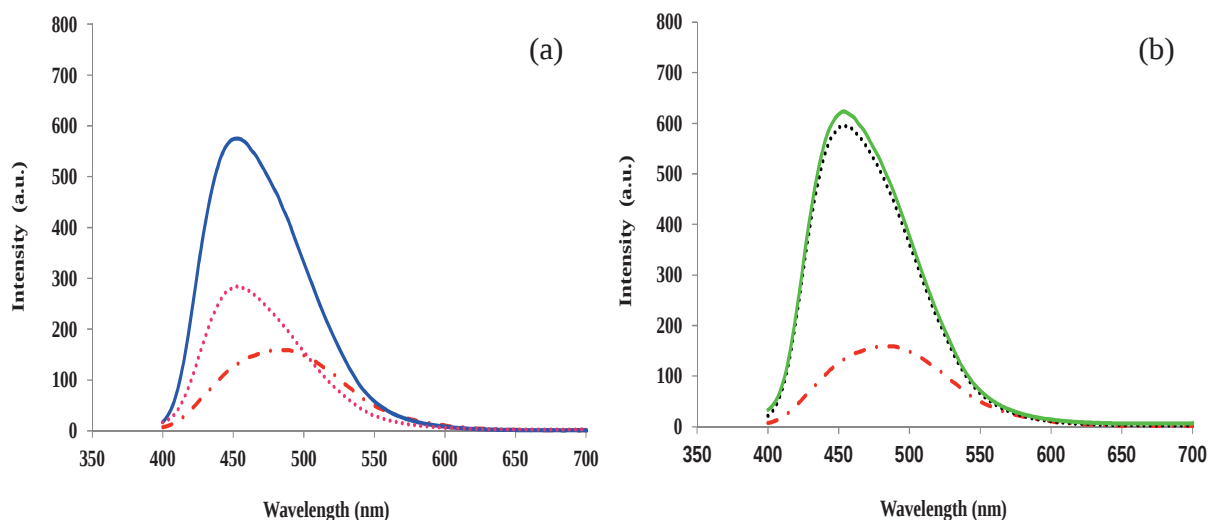
ต่อมาผู้วิจัยได้ทำการทดลองซ้ำเพิ่มเติมโดยสามารถรวบรวมผลการทดลองดังกล่าวไปตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ ดังเอกสารข้อ 4 ซึ่งในสภาวะที่ดีที่สุด cDNA ให้ค่าอัตราส่วน FRET สูงถึง 1.42 เมื่อเปรียบเทียบกับ ncDNA ที่ให้ค่าเพียง 0.26 และ smDNA ที่ให้ค่าเท่ากับ 0.51 เท่านั้น โดยการตอบสนองต่อความเข้มข้นของ DNA ในช่วงการตรวจวัดที่เป็นเส้นตรงให้ค่า detection limit ต่ำกว่า 1 nM ซึ่งงานวิจัยนี้สามารถนำไปสู่การตรวจวัดลำดับเบสของดีเอ็นเอในการประยุกต์ใช้งานจริงได้ในอนาคตต่อไป

2. จากผลการทดลองเบื้องต้นพบว่าสารสังเคราะห์ G_0 ที่มี counter ion เป็นไอโอไดด์ไอออน ($R = NMe_3^+ I^-$) จะมีความสามารถในการละลายน้ำได้ลดลงเมื่อเก็บของแข็งไว้เป็นเวลานานหลายสัปดาห์ เนื่องจากเกิด demethylation ของหมู่ ammonium ผู้วิจัยจึงได้เปลี่ยน counter ion เป็นคลอไรด์ไอออน ($R = NMe_3^+ Cl^-$) ด้วยวิธี anionic ion exchange โดยใช้คอลัมน์เรซิน ซึ่งสารสังเคราะห์ใหม่เรียกว่า (N^{3+}) ที่ได้มีความเสถียรมากขึ้นดังแสดงรูปที่ 9



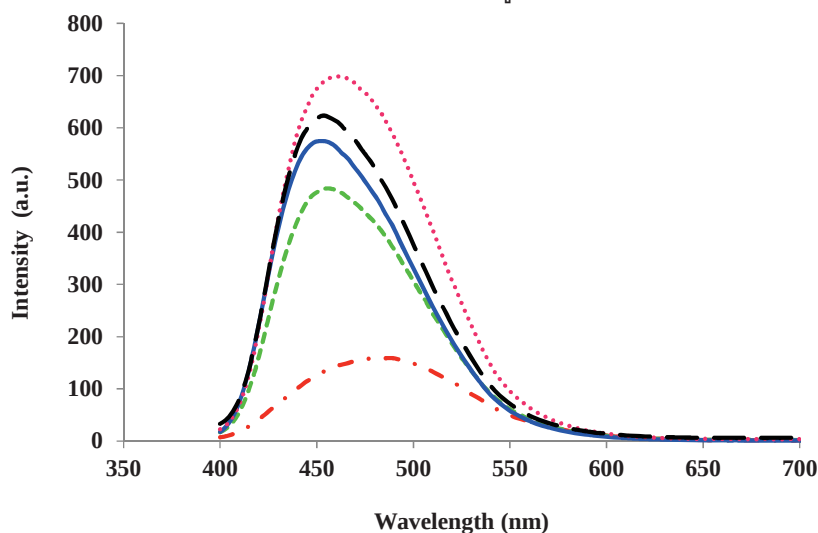
รูปที่ 9 กราฟ 1H NMR ในตัวทำละลาย CD_3OD ของ G_0 (ซ้าย) ที่มี counter ion เป็นไอโอไดด์ไอออน ($R = NMe_3^+ I^-$) ที่เก็บไว้หลังจากสังเคราะห์ใหม่และผ่านไปเจ็ดวัน และ (ขวา) ที่มี counter ion เป็นคลอไรด์ไอออน ($R = NMe_3^+ Cl^-$) ที่เก็บไว้หลังจากสังเคราะห์ใหม่และผ่านไป 25 วันตามลำดับ

เมื่อทดสอบการจับกับดีเอ็นเอสายสั้น (Aptamer) พบว่ามีการขยายสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ไปมากกว่า 5 เท่าและมีการเลื่อนของความยาวคลื่นไปทางสั้นลง (blue shift) และเมื่อในระบบมีโพแทสเซียมไอออนอยู่สามารถทำให้สัญญาณดังกล่าวลดลงได้ ดังแสดงในรูปที่ 10



รูปที่ 10 (a)กราฟฟลูออเรสเซนซ์ของ Aptamerเมื่อ N^{3+} (---), N^{3+} :Apt15, (—) and N^{3+} :Apt15: K^+ , (····) และ (b) กราฟฟลูออเรสเซนซ์ของ Non-ptamerเมื่อ N^{3+} (---), N^{3+} :nApt15, (—) and N^{3+} :nApt15: K^+ , (····) ที่ความเข้มข้น $[N^{3+}] = 0.20 \mu M$; $[Apt15] = [nApt15] = 0.02 \mu M$; $[K^+] = 1 \text{ mM}$

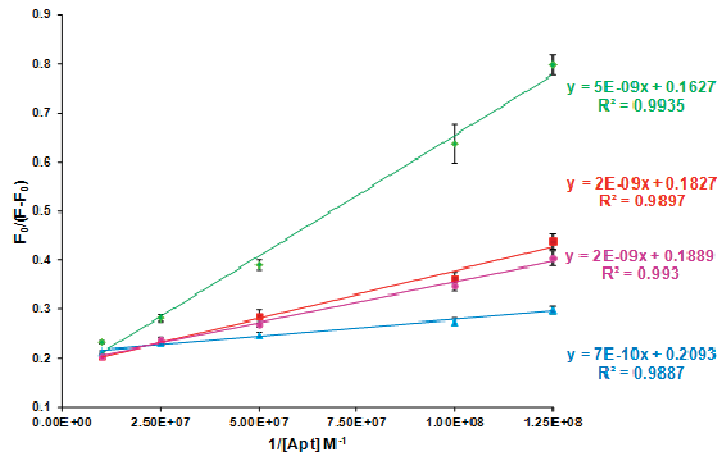
เมื่อทำการทดลองกับสายดีเอ็นเอที่ยาวแตกต่างกันคือ Apt12, Apt15 และ Apt21เปรียบเทียบกับ nApt15 พบว่าที่ความเข้มข้นเดียวกัน จะให้การขยายสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของฟลูออโรฟอร์ที่แตกต่างกันดังรูปที่ 11 ซึ่งผู้วิจัยเสนอว่าความสามารถในการจับกัน (binding affinity) กับฟลูออโรฟอร์ของดีเอ็นเอแต่ละสายมีไม่เท่ากัน



รูปที่ 11กราฟฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลาย N^{3+} (0.20 μM) ในสารละลายบัฟเฟอร์ (---) และในระบบที่มี aptamers (0.020 μM) ที่มีความยาวแตกต่างกันคือ Apt12 (---), Apt15 (—), Apt21 (····)และ nApt15 (—)

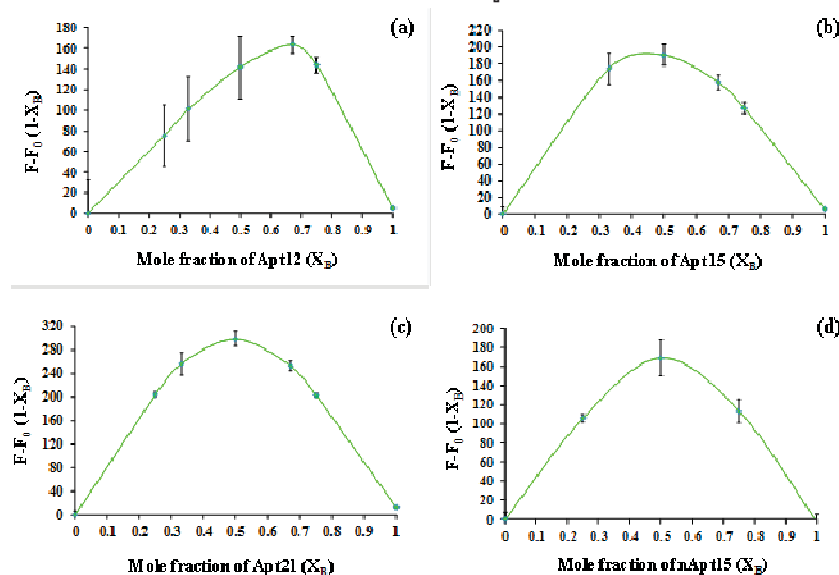
ด้วยการสมมุติว่าการเกิด complexationของฟลูออโรฟอร์ต่อดีเอ็นเอเป็นสัดส่วนแบบ 1:1 ผู้วิจัยสามารถหาค่าคงที่ในการจับกัน (affinity constant, K_a) ด้วยสมการของ Benesi-Hildebrandได้ดังแสดงในกราฟที่ 12 พบว่าค่าคงที่เพิ่มขึ้น

เมื่อสายดีเอ็นเอยาวขึ้น ในขณะที่ Apt15 และ nApt15 ให้ค่าคงที่ที่เท่ากัน แสดงให้เห็นถึงผลของ electrostatic interaction ที่เป็นปัจจัยหลัก



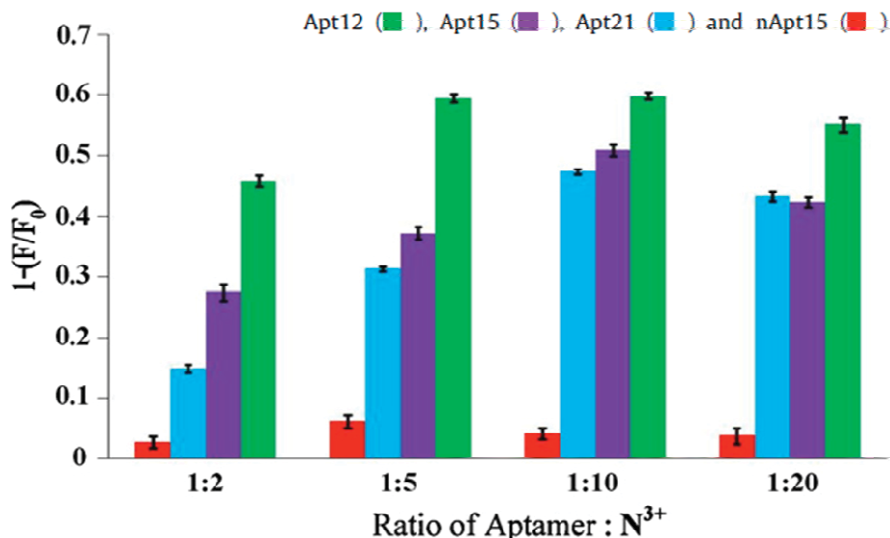
รูปที่ 11 กราฟเส้นตรง Benesi-Hildebrand จากการตอบสนองด้วยฟลูออเรสเซนซ์ของ N^{3+} ($0.2 \mu M$) ที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต่างๆ ($0.1 \mu M$ to $0.004 \mu M$): Apt12 (—), Apt15 (—), nApt (—) and Apt21 (—) ให้ค่า K_a ซึ่งหาได้จาก intercept/slope = 3.25×10^7 , 9.14×10^7 , 2.99×10^8 and $9.45 \times 10^7 M^{-1}$ ตามลำดับ

การวิเคราะห์ด้วย Job's plot พบว่า Apt12 จับกับฟลูออโรฟอร์ด้วยอัตราส่วน 2:1 แต่ดีเอ็นเอที่เหลือให้ค่า 1:1 ดังรูปที่ 12 และเมื่อคำนวณทางโปรแกรมคอมพิวเตอร์ (AM1 geometrical optimization) วัดระยะระหว่างหมู่ ammonium ได้เท่ากับ $21.7 \text{ \AA}$ เมื่อเปรียบเทียบกับความกว้างของเบสหนึ่งตัวเท่ากับ $3.3 \text{ \AA}$ ทำให้ผู้วิจัยเสนอถึงการจับกันของฟลูออโรฟอร์และดีเอ็นเอโดยการโอบล้อมของดีเอ็นเอรอบๆ หมู่ปลาย ammonium ของโครงสร้างฟลูออโรฟอร์



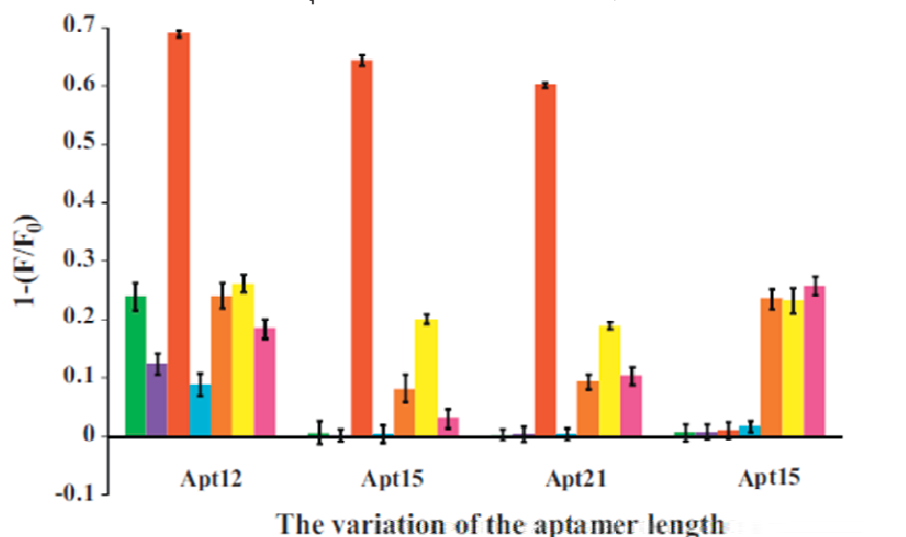
รูปที่ 12 กราฟการตอบสนองของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์แสดง Job's plot ของ N^{3+} ต่อดีเอ็นเอที่มีความยาวต่างๆ (a)Apt12 (b)Apt15 (c)Apt21 และ (d)nApt15

ต่อมาผู้วิจัยได้ทำการทดลองเพิ่มเติมสำหรับการตรวจวัดโพแทสเซียมไอออนเพื่อหาสภาวะที่ดีที่สุด ซึ่งเชื่อว่าถ้าให้ค่าการรับสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence quenching) สูงจะให้การตรวจวัดที่ดีพบว่าอัตราส่วนของ aptamer/fluorophore ที่เหมาะสมคือใช้ปริมาณดีเอ็นเอน้อยและให้ประสิทธิภาพดีคืออัตราส่วนเท่ากับ 1:10 ดังรูปที่ 13



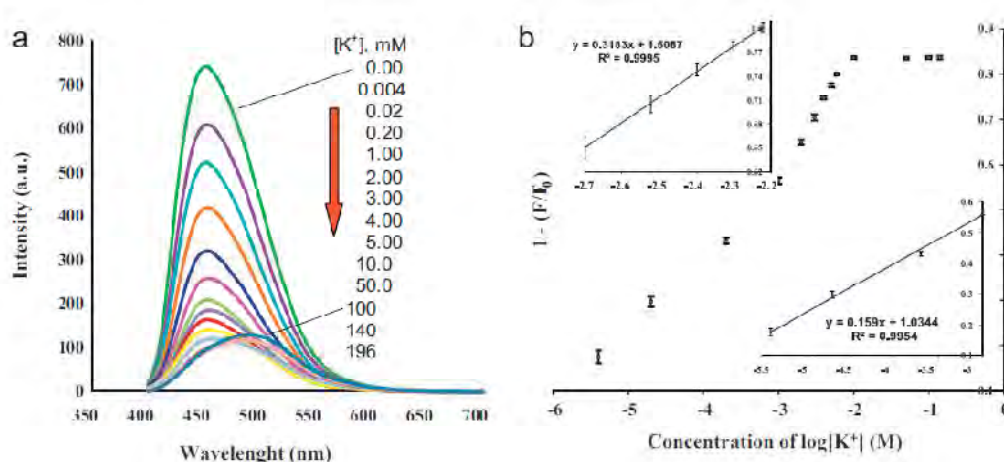
รูปที่ 13 กราฟแท่งแสดงประสิทธิภาพในการรับสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของโพแทสเซียมไอออนในระบบที่ใช้ดีเอ็นเอความยาวต่างๆ

เมื่อทำการศึกษาผลการเลือกจำเพาะเจาะจง (selectivity) ต่อโพแทสเซียมไอออนเทียบกับแคตไอออนชนิดอื่นๆ พบว่าระบบของ aptamer ให้การเลือกจำเพาะที่ดี ในขณะที่ระบบของ non-aptamer ไม่มีการเลือกจำเพาะ ดังรูปที่ 14 นอกจากนี้ Apt12 ยังให้ selectivity ที่ต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับ aptamer ตัวอื่นๆ และพบว่า Apt15 เหมาะสมต่อการทดลองในขั้นต่อไป



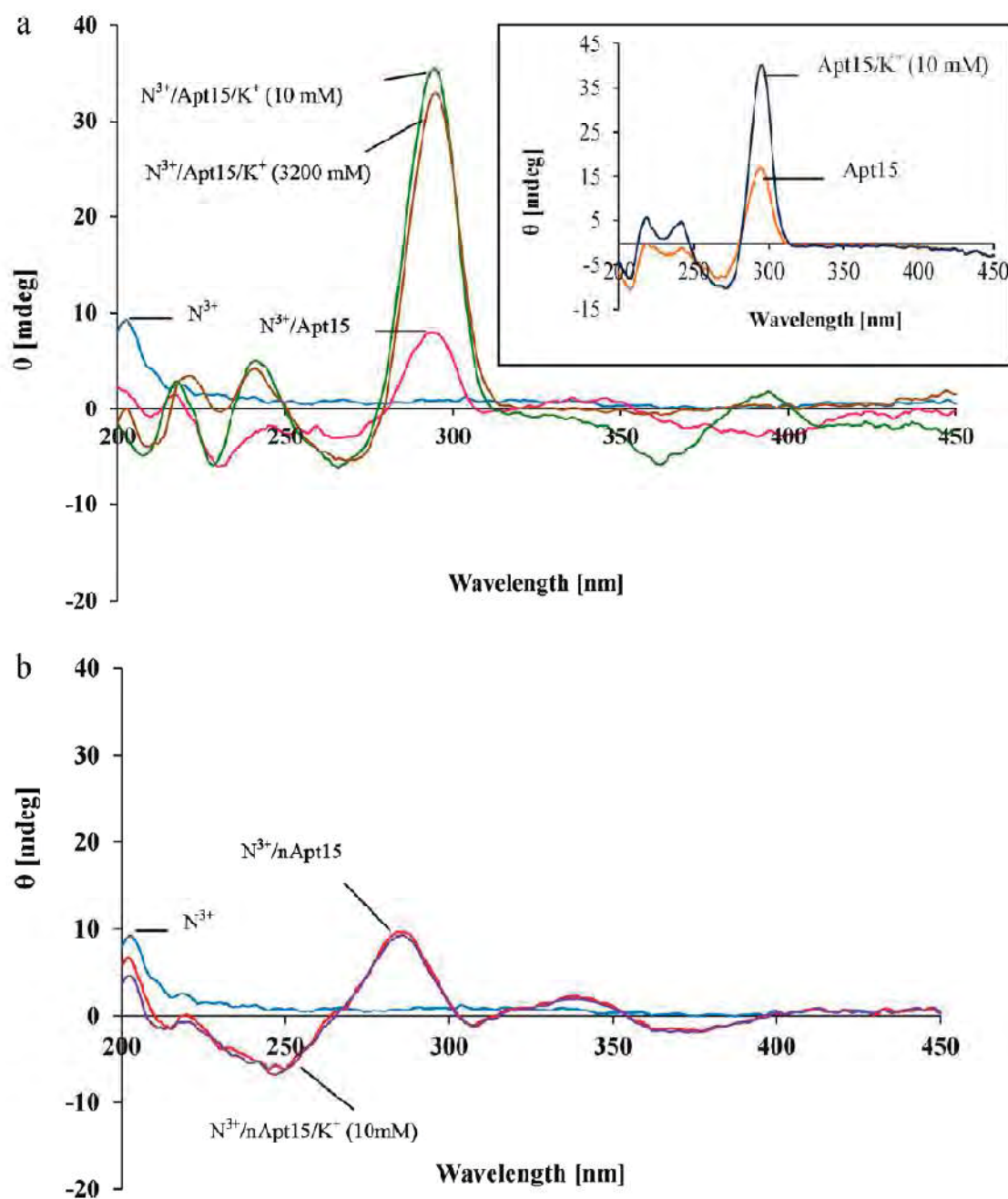
รูปที่ 14 กราฟแท่งแสดงการเลือกจำเพาะต่อแคตไอออนชนิดต่างๆ

หลังจากนั้นผู้วิจัยได้วิเคราะห์โพแทสเซียมไอออนความเข้มข้นต่างๆ พบว่าที่ความเข้มข้นต่ำ คือ ≤ 50 mM สัญญาณฟลูออเรสเซนส์ลดลงแต่ไม่เกิดการเลื่อนของความยาวคลื่น ในขณะที่ความเข้มข้นสูง คือ 100 mM สัญญาณฟลูออเรสเซนส์เกิดการเลื่อนของความยาวคลื่นกลับสู่สัญญาณเดิมเช่นเดียวกับสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ของฟลูออโรฟอร์เริ่มต้น ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับการเกิด complex ของ K^+ /Apt แบบ 1:1 ที่ความเข้มข้นของโพแทสเซียมไอออนสูง และเป็นแบบ 2:1 ที่ความเข้มข้นต่ำ ซึ่งในช่วงความสัมพัทธ์ที่เป็นเส้นตรงได้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (limit of detection) เท่ากับ $0.9 \mu\text{M}$ ดังรูปที่ 15



รูปที่ 15 กราฟแสดงความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนส์เมื่อในระบบมีโพแทสเซียมไอออนที่ความเข้มข้นต่างๆ

ผู้วิจัยยืนยันสมมุติฐานของการจับกันของฟลูออโรฟอร์และดีเอ็นเอด้วย circular dichroism (CD) ซึ่งผลการทดลองดังรูปที่ 16 แสดงให้เห็นชัดเจนว่าโพแทสเซียมไอออนสามารถแยกจับกับ aptamer จาก N^{3+} ได้



รูปที่ 16 กราฟ Circular dichroism (CD) ของ (a) ระบบที่มี Aptamer และ (b) ระบบที่เป็น non-aptamer, Inset เป็นระบบที่ไม่มี N^{3+}

และสุดท้ายผู้วิจัยได้ทำการวิเคราะห์โพแทสเซียมไอออนในตัวอย่างน้ำปัสสาวะจริง 4 ตัวอย่างให้ผลดังตารางที่ 2 ซึ่งแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพการตรวจวัดที่ดีเหมาะสมต่อการนำไปใช้

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์โพแทสเซียมไอออนในตัวอย่างน้ำปัสสาวะจากอาสาสมัคร 4 คน

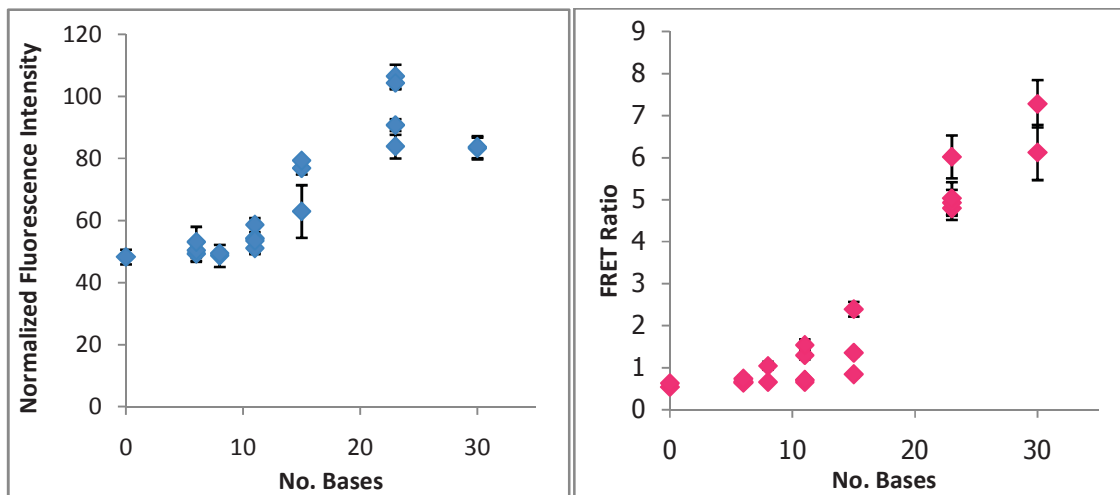
Sample	N ³⁺ -Apt sensor Mean $\pm$ SD/mM (n = 5)	ICP-MS Mean $\pm$ SD/mM (n = 5)	F-Test between two methods ^b	Add K ⁺ (mM)	Found K ⁺ (mM)	Recovery (%)
Urine 1	4.20 $\pm$ 0.006	4.15 $\pm$ 0.033	5	10	9.875	98.8
Urine 2	11.17 $\pm$ 0.004	11.22 $\pm$ 0.152	3.15	10	9.952	99.5
Urine 3	14.58 $\pm$ 0.003	14.59 $\pm$ 0.063	2.30	10	9.753	97.5
Urine 4	23.21 $\pm$ 0.012	23.75 $\pm$ 0.091	3.67	10	9.741	97.4

^a [N³⁺]/[Apt15] = 1/0.1 μ M.

^b The F-test value is 6.39 at a 95% confidence level.

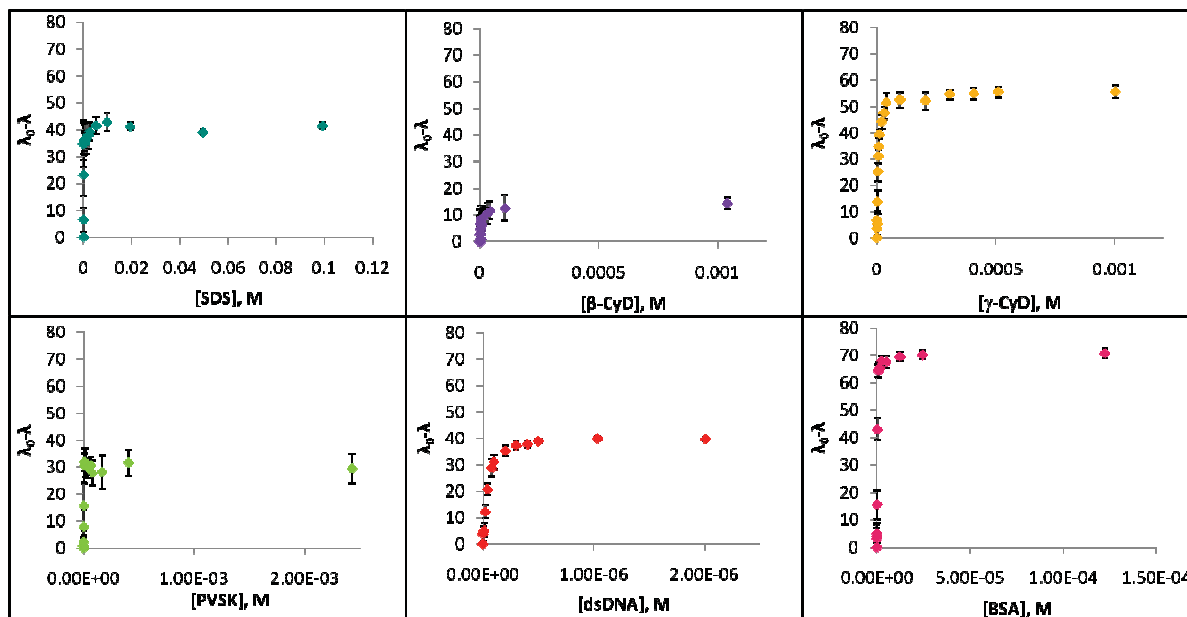
สำหรับงานวิจัยในส่วนนี้ นำไปสู่ผลงานตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติดังข้อ 4

3. เมื่อทำการศึกษาเพิ่มเติมจากผลการทดลองเบื้องต้นในตอนแรกพบว่าสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ตอบสนองต่อ G₀ จะเพิ่มขึ้นเมื่อสายดีเอ็นเอยาวขึ้นจนถึงความยาวเบสประมาณ 20 เบสจึงคงที่ ในขณะที่สัญญาณ FRET ในระบบที่มี SyBrGreen II เป็นตัวรับพลังงาน (Acceptor) จะเพิ่มขึ้นเรื่อย (ทำการทดลองถึงเพียง 30 เบส) เมื่อสายดีเอ็นเอยาวขึ้นดังกล่าวที่แสดงข้างล่าง

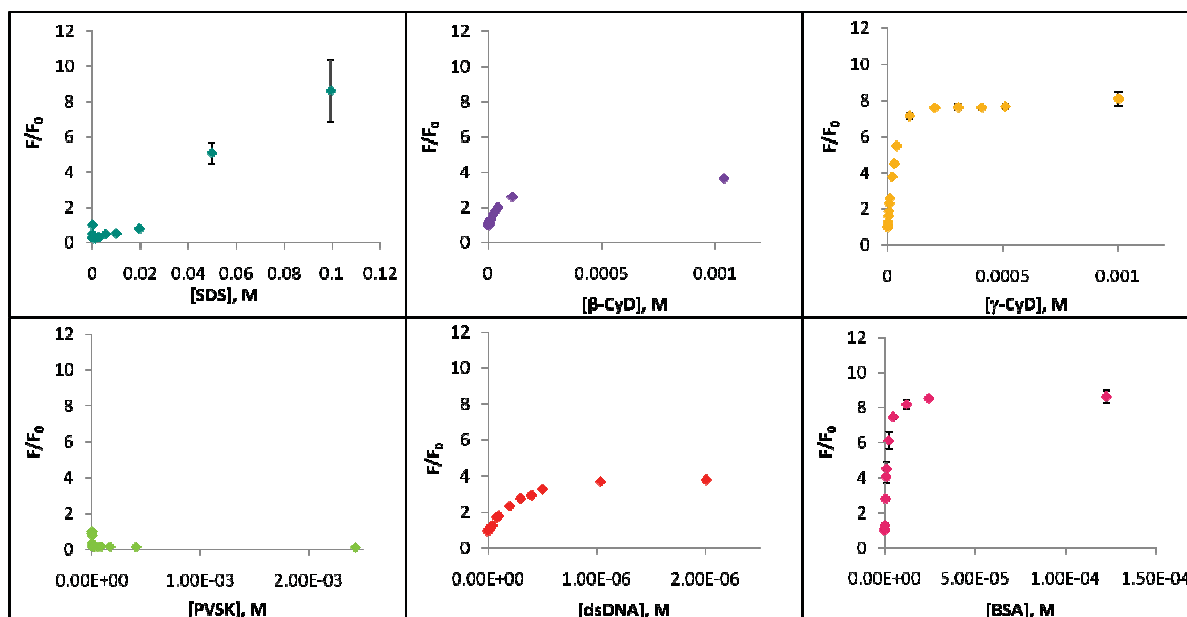


รูปที่ 17 กราฟแสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของ G₀ (ซ้าย) และแสดงสัญญาณ FRET ของ G₁ (ขวา) ในระบบที่มีดีเอ็นเอสายเดี่ยวความยาวตั้งแต่ 0 ถึง 30 เบส (จำกัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอให้มีค่า absorbance ที่ 260nm เท่ากับ 0.05)

และผู้วิจัยได้ศึกษาการจับกันของดีเอ็นเอรวมไปถึงสารชีวโมเลกุลอื่นๆกับเดนทริกพอลิอิลิกโพลีไธร์โธเรอแสงที่มีต่อการเปลี่ยนสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ จึงได้ทำการทดลองเพิ่มเติมในระบบซึ่งจำกัดการเคลื่อนไหวของโมเลกุลขนาดเล็ก (nano-confined environments) ที่มีสารลดแรงตึงผิวชนิดต่างๆ (anionic, cationic, and non-ionic surfactants) cyclodextrins และโปรตีน BSA รวมทั้งพอลิเมอร์ชนิดประจุลบ (PVSK) โดยพบว่าในแต่ละสิ่งแวดล้อม มีผลทำให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของ G₀ แตกต่างกันไป แต่แนวโน้มส่วนใหญ่จะเพิ่มสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence enhancement) ไปทางความยาวคลื่นที่สั้นลง (blue shift) ดังรูปที่ 18 และ 19

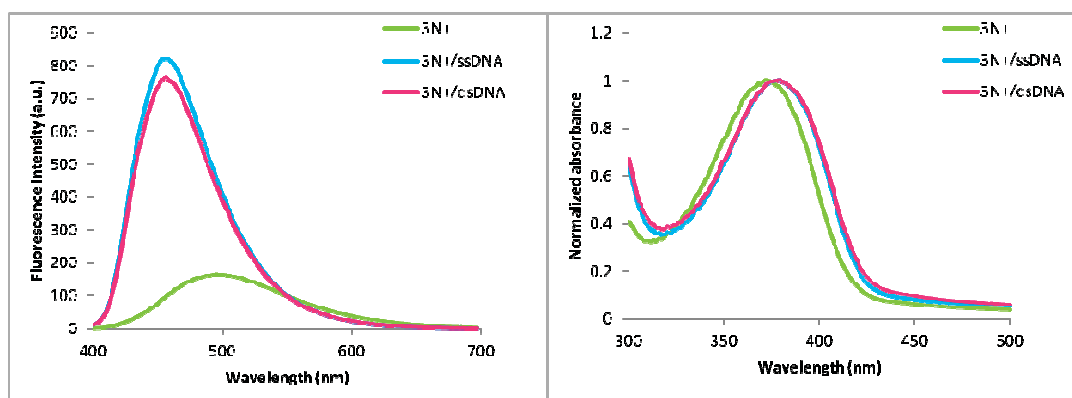


รูปที่ 18 กราฟเปรียบเทียบความยาวคลื่นของ G_0 probes ที่เปลี่ยนแปลงไป เมื่ออยู่ในระบบต่างๆ



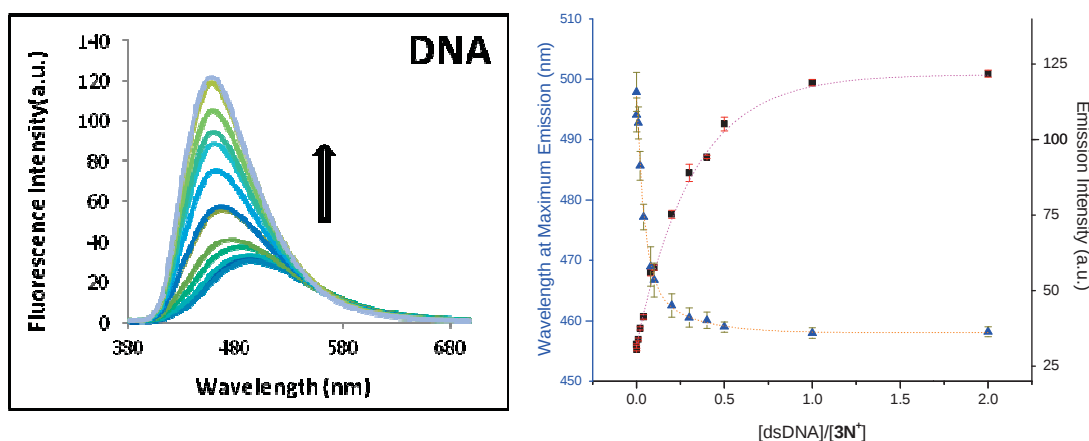
รูปที่ 19 กราฟเปรียบเทียบสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของ G_0 probes ที่เปลี่ยนแปลงไป เมื่ออยู่ในระบบต่างๆ

ผู้วิจัยเลือกดีเอ็นเอสายเดี่ยว (ssDNA) ลำดับเบส 5'GCATATGCCTA3' และสายคู่ซึ่งมีลำดับเบสคู่สม (dsDNA) มาเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของโมเลกุล G_0 หรือเรียกว่า $3N^+$ ระหว่างดีเอ็นเอทั้งสองชนิดโดยควบคุมให้ความเข้มข้นของประจุของสายดีเอ็นเอเท่าๆกัน พบว่าดีเอ็นเอทั้งสองสามารถขยายสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของฟลูออโรฟอร์ขึ้นไปใกล้เคียงกันมาก คือประมาณ 5 เท่า และให้ absorption ที่เหมือนกัน ดังรูปที่ 20



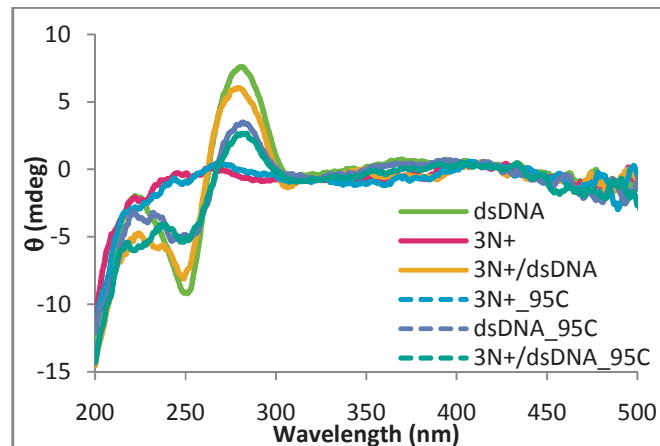
รูปที่ 20 กราฟฟลูออเรสเซนซ์ (ซ้าย) และการดูดกลืนแสง (ขวา) ของ 3N⁺ (5 μ M) ที่มี ssDNA (5'GCATATGCCTA3', 10 μ M) และ dsDNA (5'GCATATGCCTA3' + 5'TAGGCATATGC3', 5 μ M) ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

นอกจากนี้ยังพบว่าการขยายสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ด้วย dsDNA ยังเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสายดีเอ็นเอดังรูปที่ 21 ซึ่งจะเริ่มคงที่ที่อัตราส่วนดีเอ็นเอต่อฟลูออโรฟอร์ที่ 1:1



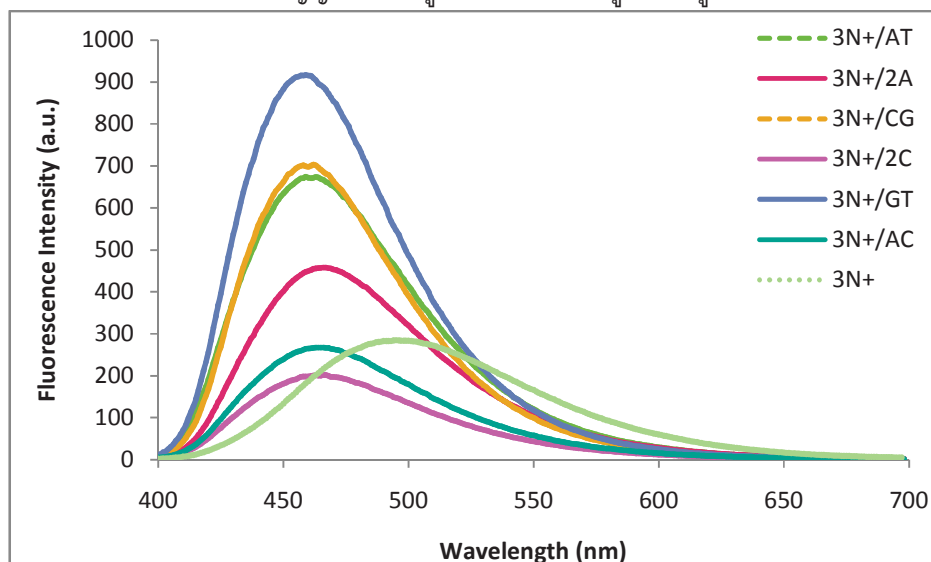
รูปที่ 21 กราฟฟลูออเรสเซนซ์ (ซ้าย) และการเลื่อนของความยาวคลื่นของการคายแสงและความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ (ขวา) ของ 3N⁺ (1 μ M) ที่มี dsDNA (5'GCATATGCCTA3' + 5'TAGGCA TATGC3') ความเข้มข้นต่างๆ (0 – 2 μ M)

จากการศึกษาด้วย Circular Dichroism (CD) พบว่าสัญญาณ CD ของ 3N⁺ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างในระบบที่มีและไม่มีดีเอ็นเอ เช่นเดียวกับระบบที่อุณหภูมิสูง สูงกว่า melting temperature (T_m) ของดีเอ็นเอคู่สม (รูปที่ 22) ทั้งนี้คาดว่า การเกิด interaction ของฟลูออโรฟอร์และดีเอ็นเอมีผลส่วนใหญ่มาจาก electrostatic forces โดยไม่น่าจะเกี่ยวข้องกับ hydrophobic part ของฟลูออโรฟอร์มากนัก



รูปที่ 22 กราฟ CD ของ $3N^+$ ($1 \mu M$) ที่มี dsDNA ($5'GCATATGCCTA3' + 5'TAGGCA TATGC3'$) ณ อุณหภูมิ 20 และ $90^\circ C$

เนื่องจากภายหลังพบว่าลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอที่เราเลือกใช้นั้น สามารถเกิดจับกันได้โดยลำพัง (self-hybridization) บนสายของมันเอง เราจึงเปลี่ยนมาใช้สายดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเป็นเบสเพียงชนิดเดียวกัน 4 แบบ คือ A, C, G, T ซึ่งมีเพียง 15 เบส โดยผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ามีเพียงดีเอ็นเอสายคู่ (duplex) เท่านั้นที่ให้การขยายสัญญาณเท่ากัน ในขณะที่ดีเอ็นเอสายเดี่ยวหรือไม่เข้าคู่กัน (non-complementary dsDNA) จะตอบสนองต่อฟลูออโรฟอร์ได้ไม่เหมือนกันคือมีทั้งระดับสัญญาณ ขยายสัญญาณมากขึ้นอยู่กับชนิดของเบสบนสายดีเอ็นเอ ดังรูปที่ 23 อย่างไรก็ตามการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าเราไม่สามารถนำฟลูออโรฟอร์ดังกล่าวมาใช้ตรวจวัดลำดับเบสของดีเอ็นเอได้โดยตรงเนื่องจากมีดีเอ็นเอสายเดี่ยวบางตัวสามารถขยายสัญญาณขึ้นไปถึงกว่าดีเอ็นเอสายคู่ที่มีเบสคู่สม



รูปที่ 23 กราฟฟลูออเรสเซนซ์ของ $3N^+$ ($5 \mu M$) ที่มี ssDNA (2A และ 2C, $5 \mu M$), dsDNA (AT และ CG, $5 \mu M$) และ ncDNA (AC and GT, $5 \mu M$) ในสารละลายบัฟเฟอร์ (A = $5'AAAAAAAAAAAAAAAAA3'$, C = $5'CCCCCCCCCCCCCCC3'$, T = $5'TTTTTTTTTTTTTTTT3'$ and G = $5'GGGGGGGGGGGGGGG3'$)

จากการสังเกตข้างต้นทำให้เราทราบปัจจัยที่มีผลต่อการตอบสนองด้วยสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของฟลูออโรฟอร์ ได้แก่ ความยาว ชนิดของลำดับเบส ความเข้มข้น และโครงสร้างของดีเอ็นเอ ที่ใช้ในสภาวะที่ใช้ในการศึกษา

4.ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

1. ชื่อเรื่อง: FRET detection of DNA sequence via electrostatic interaction of polycationicphenyleneethynylendendrimer with DNA/PNA hybrid
วารสารที่ส่งไปตีพิมพ์: Talanta
เวลาที่ยื่นเพื่อตีพิมพ์: 23 October 2011
สถานะของบทความ: published 15 January 2012
2. ชื่อเรื่อง: Phenylene-ethynylene trication as an efficient fluorescent signal transducer in an aptasensor for potassium ion
วารสารที่ส่งไปตีพิมพ์: Biosensors and Bioelectronics
เวลาที่ยื่นเพื่อตีพิมพ์: 21 October 2011
สถานะของบทความ: published 15 March 2012

ภาคผนวก1
(ข้อเสนอโครงการย่อย 2)

Proposal for Subproject No. 2: Dencritic Fluorophores for Detection of DNA/PNA Hybridization

Fluorescence-based methodologies have attracted much interest due to their intrinsic sensitivity and selectivity. Water-soluble conjugated polymers exhibiting fluorescence quenching or enhancement in the presence of oppositely charged acceptors are of particular interest as the optical platforms of chemical and biological sensors.¹⁻⁸ Recently, fluorescent biosensors based on water-soluble cationic conjugated polymers (CCPs) to identify DNA and RNA in aqueous media.⁹⁻¹³ DNA or RNA were labeled with fluorophore at the terminus and the distance controlled by the electrostatic interactions between the negatively charged phosphate groups of the DNA or RNA and the CCPs transduce the FRET signal. The enhancement of the FRET to fluorophore-tagged double-stranded DNA by increasing the cationic charge densities on the side-chain of CCPs has been reported.¹⁴⁻¹⁵ Nonionic surfactant was also utilized for sensitivity enhancement of FRET and quenching in DNA sequence detection using CCPs.¹⁶ Methods for strand-specific DNA detection with CCPs based on fluorophore-tagged peptide nucleic acid (PNA) have also been developed for DNA chips and microarray.¹⁷ CCPs have been reported to be used for one-step fluorescent allele-specific PCR for single nucleotide polymorphisms genotyping assays.¹⁸

The CCPs used in the system previously described are all linear polymers. Despite offering the signal amplification due to a large number of fluorophores, the unpredictable secondary and tertiary structures in solution, due to polydispersity and random molecular conformations of linear conjugated polymers, can lead to inconsistent fluorescence quenching or enhancement effects as well as inexplicable behaviors. In comparison with linear polymers, the numbers of fluorophore units in dendrimers can be controlled by a stepwise synthesis. This should reflect in the more predictable fluorescence property and other structure-related behaviors of dendritic molecules. We thus decided to synthesize various cationic dendritic fluorophores (Figure 1) and study their fluorescent sensing for detection of PNA/DNA hybridization in comparison with DNA/DNA hybridization. The dendritic system also allows the ability to fine tune the positive charge on the molecular surface that may affect its selective binding to the PNA/DNA hybrids.

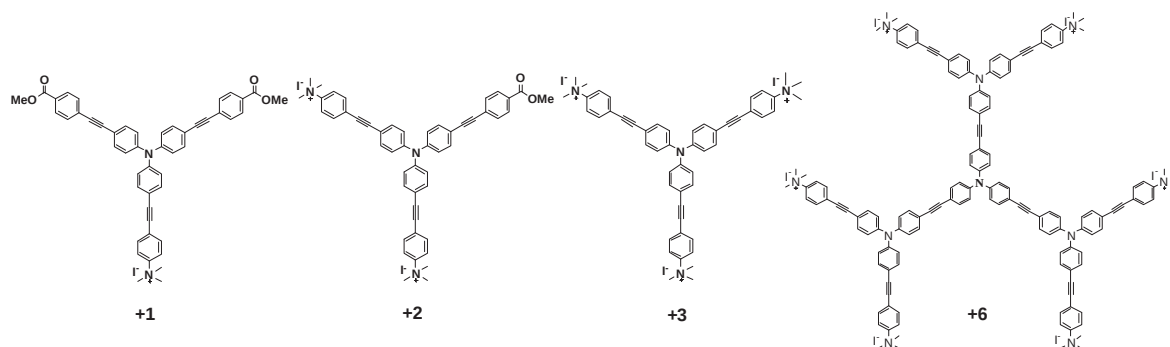


Figure 1. Molecular structures of examples of cationic dendritic fluorophores with +1, +2, +3, and +6 charges.

References

1. McQuade, D. T.; Pullen, A. E.; Swager, T. M. "Conjugated Polymer-Based Chemical Sensors" *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2537-2574.
2. Bunz, U. H. F. "Poly(aryleneethynylene)s: Syntheses, Properties, Structures, and Applications" *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 1605-1644.
3. Fan, C.; Plaxco, K. W.; Heeger, A. J. "High-Efficiency Fluorescence Quenching of Conjugated Polymers by Proteins" *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*(20), 5642-5643.
4. Nilsson, K. P.; Inganäs, R. O. "Chip and solution detection of DNA hybridization using a luminescent zwitterionic polythiophene derivative" *Nat. Mater.* **2003**, *2*, 419-424.
5. Liu, B.; Bazan, G. C. "Homogeneous Fluorescence-Based DNA Detection with Water-Soluble Conjugated Polymers" *Chem. Mater.* **2004**, *16*(23), 4467-4476.
6. Pinto, M. R.; Schanze, K. S. "Amplified fluorescence sensing of protease activity with conjugated polyelectrolytes" *Proc. Natl. Acad. Soc. USA* **2004**, *101*, 7505-7510.
7. Kumaraswamy, S.; Bergstedt, T.; Shi, X.; Rininsland, F.; Kushon, S.; Xia, W.; Ley, K.; Achyuthan, K.; McBranch, D.; Whitten, D. "Fluorescent-conjugated polymer superquenching facilitates highly sensitive detection of proteases" *Proc. Natl. Acad. Soc. USA* **2004**, *101*, 7511-7515.
8. Wosnick, J. H.; Mello, C. M.; Swager, T. M. "Synthesis and Application of Poly(phenylene Ethynylene)s for Bioconjugation: A Conjugated Polymer-Based Fluorogenic Probe for Proteases" *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*(10), 3400-3405.
9. Ho, H. A.; Be'ra-Abérem, M.; Leclerc, M. "Optical sensors based on hybrid DNA/conjugated polymer complexes" *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 1718-1724.

10. Gaylord, B. S.; Heeger, A. J.; Bazan, G. C. "DNA detection using water-soluble conjugated polymers and peptide nucleic acid probes" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA***2002**, *99*, 10954-10957.
11. Gaylord, B. S.; Heeger, A. J.; Bazan, G. C. "DNA Hybridization Detection with Water-Soluble Conjugated Polymers and Chromophore-Labeled Single-Stranded DNA" *J. Am. Chem. Soc.***2003**, *125*(4), 896-900.
12. Wang, S.; Bazan, G. C. "Optically amplified RNA-protein detection methods using light-harvesting conjugated polymers" *Adv. Mater.* **2003**, *15*, 1425-1428.
13. He, F.; Tang, Y.; Wang, S.; Li, Y.; Zhu, D. "Fluorescent Amplifying Recognition for DNA G-Quadruplex Folding with a Cationic Conjugated Polymer: A Platform for Homogeneous Potassium Detection" *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (35), 12343-12346.
14. Stork, M.; Gaylord, B.S.; Heeger, A. J.; Bazan, G. C. "Energy transfer in mixtures of water-soluble oligomers: Effect of charge, aggregation, and surfactant complexation" *Adv. Mater.***2002**, *14*, 361-366.
15. Yu, M.; Tang, Y.; He, F.; Wang, S.; Zheng, D.; Li, Y.; Zhu, D. "Synthesis of Water-Soluble Dendritic Conjugated Polymers for Fluorescent DNA Assays" *Macromol. Rapid Commun.***2006**, *27*, 1739-1745.
16. Al Attar, H. A.; Monkman, A. P. "Effect of Surfactant on FRET and Quenching in DNA Sequence Detection Using Conjugated Polymers" *Adv. Funct. Mater.***2008**, *18*, 2498-2509.
17. Liu, B.; Bazan, G. C. "Methods for strand-specific DNA detection with cationic conjugated polymers suitable for incorporation into DNA chips and microarrays" *Proc. Natl. Acad. Soc. USA***2005**, *102*, 589-593.
18. Duan, X.; Liu, L.; Wang, S. "Homogeneous and one-step fluorescent allele-specific PCR for SNP genotyping assays using conjugated polyelectrolytes" *Biosens. Bioelectron.***2009**, *24*, 2095-2099.

Methodology

- Synthesis of water soluble dendritic polycationic fluorophores (DPFs)
- Characterization of the synthesized DPFs: NMR, IR, MS, EA
- Optical property study of synthesized DPFs: Absorption, Extinction Coefficient, Emission, Quantum Yield, Surfactant Effects
- Study of DNA/DNA hybrid detection
- Study of PNA/DNA hybrid detection

สัญญาเลขที่ RTA5280002

โครงการหลัก: การสังเคราะห์ สมบัติ และการประยุกต์ใช้เบต้าพิโรลิดีนิลเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิด
ที่มีคอนฟอร์เมชันถูกจำกัด

รายงานฉบับสมบูรณ์

ชื่อโครงการย่อย Development of positively charged polymeric support for high throughput DNA
sequence analysis using PNA probes

ระยะเวลาโครงการ 1 สิงหาคม 2552 – 31 กรกฎาคม 2555

ชื่อหัวหน้าโครงการย่อย รศ.ดร.วรวิทย์ โยเว้น

บทนำ

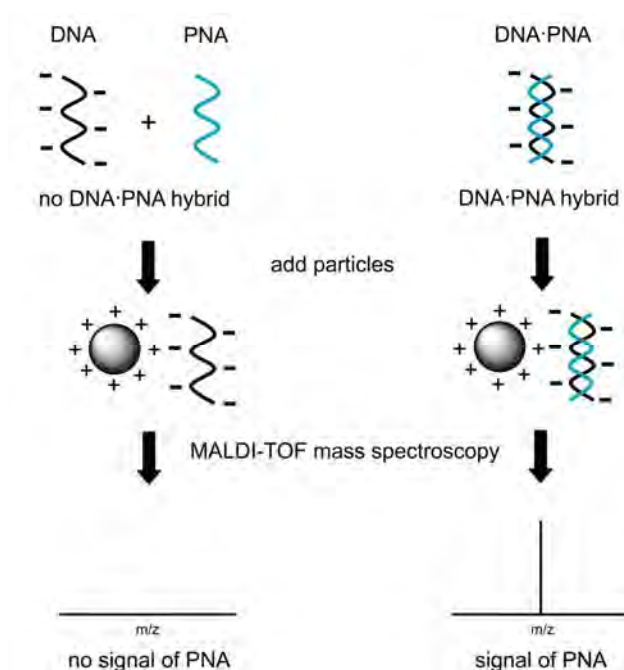
การตรวจสอบลำดับเบสของสารพันธุกรรม (ดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ) มีบทบาทสำคัญต่อการพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพหลายแขนง เช่น ทางการแพทย์ใช้ในการตรวจคัดกรองความเสี่ยงต่อการเกิดโรคทางพันธุกรรม การบ่งชี้ชนิดและสายพันธุ์ของจุลชีพที่ก่อให้เกิดโรค ทางนิติวิทยาศาสตร์ใช้เป็นข้อมูลในการบ่งชี้บุคคลเพื่อเป็นหลักฐานประกอบการสืบสวนสอบสวนคดีต่างๆ ทางด้านอาหารและเกษตรกรรมใช้ในการตรวจสอบส่วนประกอบต้องห้ามในอาหาร สารก่อภูมิแพ้หรือการปนเปื้อนของสารปรับแต่งทางพันธุกรรม เป็นต้น เทคนิคที่ใช้ในการตรวจสอบสารพันธุกรรมถ้าไม่ใช่เป็นการหาลำดับเบสโดยตรง ก็มักจะเป็นการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ หรือการใช้โพรบที่เหมาะสมในการจับยึดกับสารพันธุกรรม วิธีการทดสอบมาตรฐานที่ใช้ในปัจจุบันจะใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน มีค่าใช้จ่ายสูงอันเนื่องมาจากเครื่องมือวิเคราะห์ที่มีราคาแพงและวัสดุสิ้นเปลืองที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ เช่น เอนไซม์ สารเรืองแสง ทำให้ไม่สามารถนำไปใช้งานได้อย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพื้นที่ห่างไกล ความเจริญหรือมีงบประมาณจำกัด ด้วยเหตุนี้คณะผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์ที่นอกจากจะสามารถทำได้สะดวก รวดเร็ว ราคาไม่แพง มีความจำเพาะเจาะจงและความแม่นยำสูงแล้ว ยังสามารถดัดแปลงให้ทำการตรวจวิเคราะห์ในรูปแบบที่มีประสิทธิภาพสูง (high-throughput format) กล่าวคือสามารถตรวจสอบสารตัวอย่างหลายชนิดในเวลาเดียวกันได้อีกด้วย

ตอนที่ 1 การตรวจลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยใช้เพปไทด์นิวคลีอิกแอซิดร่วมกับอนุภาคโคโทซานด้วย มัลติ-ทอพแมสสเปกโตรเมทรี

จากความสำเร็จของ รศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์ และคณะในการตรวจลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยอาศัยตัว แลกเปลี่ยนแอนไอออนทางการค้าคือ Q-sepharose ร่วมกับพิโรลิดีนิลเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิด (pyrrolidinyl peptide nucleic acid) หรือ acpcPNA และทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคมัลติ-ทอพแมสสเปกโตรเมทรี (MALDI-TOF mass spectrometry) เป็นที่มาของงานวิจัยตอนที่ 1 ของโครงการวิจัยย่อยนี้ เนื่องจากทางคณะผู้วิจัยมี ประสบการณ์ในการเตรียมอนุภาคขนาดเล็กที่มีประจุบวกของโคโทซาน ที่สามารถปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันรวมทั้ง ความเป็นประจุของอนุภาคได้ จึงเล็งเห็นถึงศักยภาพในการใช้อนุภากดังกล่าวเป็นตัวแลกเปลี่ยนแอนไอออนแทน การใช้ Q-sepharose ที่เป็นสารทางการค้าซึ่งอยู่ในรูปของอนุภาคที่แขวนลอยในน้ำ ซึ่งเสียสภาพได้หากทำให้แห้ง จึงไม่ทราบน้ำหนักของตัวแลกเปลี่ยนแอนไอออนที่แน่นอนเมื่อนำมาใช้ในงานในแต่ละครั้ง นอกจากนี้ความสามารถในการปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของโคโทซานยังอาจจะทำให้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอซึ่ง ไม่สามารถทำได้ในกรณีของ Q-sepharose และหากสามารถนำอนุภาคโคโทซานมาใช้ประโยชน์ในการตรวจ วิเคราะห์ลำดับเบสของสารพันธุกรรมได้ ก็นับว่าเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับโคโทซาน ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติที่ได้

จากการกำจัดหมู่เอซิทิลของไคติน ที่เป็นสารสกัดได้จากเปลือกกุ้ง กระดองปู แกนหมึก รวมทั้งเห็ด และราบางชนิด งานวิจัยในส่วนนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณในการทำวิจัยเบื้องต้น จากทุนสนับสนุนกลุ่มวิจัย สกว. ที่มี ศ.ดร.สุตา เกียรติกำจรวงศ์ เป็นหัวหน้าโครงการ (RTA5080004) ภายใต้หัวข้อโครงการเรื่อง “การประยุกต์ทางชีวการแพทย์ของอนุภาคไคโทซานที่พื้นผิวมีประจุ”

อาศัยหลักการที่ว่าพีเอ็นเอเป็นโมเลกุลที่เป็นกลางทางประจุ ดังนั้นเมื่อมีการจับยึดกับดีเอ็นเอซึ่งมีประจุลบที่มีลำดับเบสคู่สมกัน จะทำให้เกิดโมเลกุลลูกผสมระหว่างพีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอซึ่งมีประจุเป็นลบ และสามารถถูกจับยึดโดยตัวแลกเปลี่ยนแอนไอออนซึ่งมีประจุเป็นบวกได้ หากทำการแยกตัวแลกเปลี่ยนแอนไอออนซึ่งเป็นของแข็งออกจากสารละลาย และนำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยมวลดี-ทอพแมสสเปกโตรเมทรี จะพบเพียงสัญญาณของพีเอ็นเอโดยไม่พบสัญญาณของดีเอ็นเอ ทั้งนี้เป็นผลเนื่องมาจากพีเอ็นเอถูกไอออไนซ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพกว่าดีเอ็นเอ ภายใต้การวิเคราะห์ด้วย positive ion mode โดยหลักการแล้วการวิเคราะห์ดังกล่าวสามารถทำได้โดยไม่ต้องคำนึงถึงการมีอยู่ของพีเอ็นเอที่ไม่จับยึดกับดีเอ็นเอ (unhybridized PNA) ซึ่งยังคงอยู่ในสารละลาย หรือ ดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสที่ไม่เป็นคู่สมกับพีเอ็นเอ (noncomplementary DNA) เป็นการลดขั้นตอนและความยุ่งยากในการวิเคราะห์ วิธีการตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอแสดงรายละเอียดพอสังเขปในรูปแบบที่ 1.1

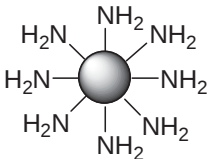
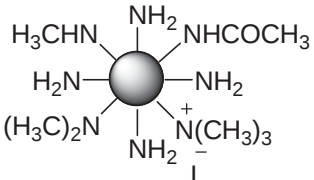
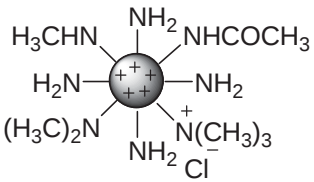
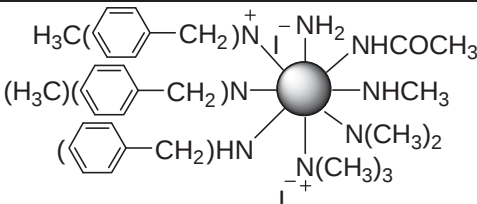
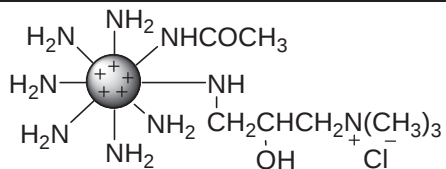


รูปที่ 1.1 แผนภาพแสดงแนวทางการวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยใช้อนุภาคไคโทซานเป็นตัวแลกเปลี่ยนแอนไอออนร่วมกับการใช้พีเอ็นเอโพรบและเทคนิคมวลดี-ทอพแมสสเปกโตรเมทรี

อนุภาคที่นำมาใช้เป็นตัวแลกเปลี่ยนแอนไอออนในงานวิจัยนี้มีทั้งหมด 5 ชนิด ซึ่งมีหมู่ฟังก์ชันแตกต่างกันดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 1.1 อนุภาคไคโทซาน (CS) เตรียมได้จากการตกตะกอนสารละลายไคโทซานด้วยไตรพอลิฟอสเฟต (TPP) ส่วนอนุภาค MC เตรียมได้จากการทำปฏิกิริยาเมทิลเลชันอนุภาค CS ด้วยเมทิลไอโอไดด์แบบต่างวิภาค ในขณะที่อนุภาค MBzC เตรียมจากการทำปฏิกิริยารีดักทีฟแอลคิลเลชันด้วยเบนซาลดีไฮด์ตามด้วยเมทิลเลชันด้วยเมทิลไอโอไดด์แบบต่างวิภาคของอนุภาค CS สำหรับอนุภาค TMC และ HTACC เตรียมได้จากการตกตะกอนสารละลาย *N,N,N*-trimethylchitosan chloride และ *N*-[(2-hydroxyl-3-trimethylammonium)propyl]chitosan chloride ซึ่งเป็นอนุพันธ์ไคโทซานที่มีประจุบวกอยู่แล้วด้วย TPP ตามลำดับ ดังนั้นอนุภาค TMC และ HTACC จึงมีประจุบวกทั้งภายในและที่ผิวของอนุภาค ในขณะที่อนุภาค QAC

และ MBzC จะมีประจุบวกเฉพาะที่ผิวอนุภาคเท่านั้น ทั้งนี้สามารถวิเคราะห์ความเป็นประจุบวกของอนุภาคได้โดยใช้เทคนิค photon correlation spectroscopy (PCS) และจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค transmission electron microscopy (TEM) พบว่าอนุภาคมีลักษณะเป็นทรงกลม มีขนาดอยู่ในช่วง $\sim 0.13-0.40$ ไมโครเมตร

ตารางที่ 1.1 ζ -potential (วิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCS) และขนาดโดยเฉลี่ย (mean size) (วิเคราะห์ด้วยเทคนิค TEM) ของอนุภาคโคโธซานที่ใช้เป็นตัวแลกเปลี่ยนแอนไอออนในการทดลอง

Particles		ζ -potential (mV)	Mean size (μm)
CS		32.17 ± 1.71	0.40 ± 0.12
MC		30.57 ± 1.99	0.20 ± 0.05
TMC		39.77 ± 0.21	0.13 ± 0.09
MBzC		54.93 ± 1.04	0.16 ± 0.05
HTACC		24.27 ± 0.74	0.13 ± 0.04

สำหรับดีเอ็นเอที่นำมาทำการตรวจวิเคราะห์มีลำดับเบสที่สัมพันธ์กับตำแหน่งที่แสดงความผิดปกติของยีนในผู้ป่วยโรคมะเร็ง (K-ras DNA) ดีเอ็นเอดังกล่าวมีความยาว 14 เมอร์ และมีเบสทุกชนิดเป็นองค์ประกอบ (A, T, C, G) โดยดีเอ็นเอที่เลือกใช้มีทั้งที่เป็น mutant (DNA mut) และ wild-type (DNA wt) ดีเอ็นเอและพีเอ็นเอโพรบที่ใช้ในการวิเคราะห์แสดงลำดับเบสในตารางที่ 1.2

ตารางที่ 1.2 ลำดับเบสของดีเอ็นเอและพีเอ็นเอที่ใช้ในการทดลอง

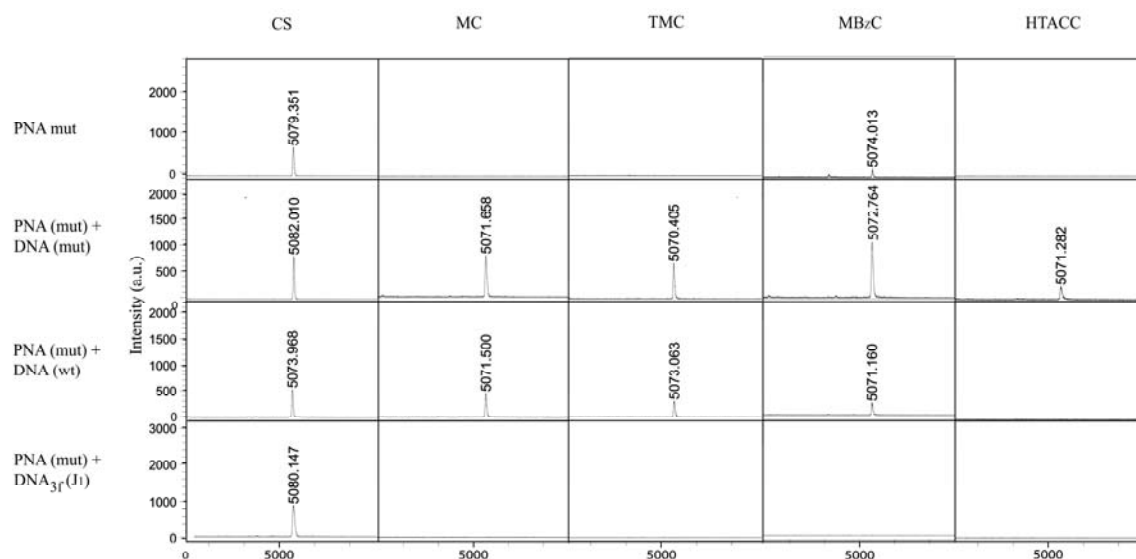
Code	Sequence	Note	m/z
PNA(mut)	Ac-Lys-O-CTACGCCA <u>A</u> CAGCT-SerNH ₂	-	5071.9
PNA(wt)	Ac-Lys-CTACGCCACCAGCT-SerNH ₂	-	4902.8
DNA(mut)	d(5'-AGCTGTTGGCGTAG-3')	complementary to PNA(mut) single mismatch to PNA(wt)	-
DNA(wt)	d(5'-AGCTGGTGGCGTAG-3')	complementary to PNA(wt) single mismatch to PNA(mut)	-
DNA _{3f} (J1)	d(5'-TAGTTGTACGTACA-3')	full mismatch to both PNA(mut) and PNA(wt)	-

O = aminoethoxyethoxyacetyl linker

ผลการทดสอบการใช้อนุภาคโคโทซานทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ CS, MC, TMC, MBzC และ HTACC เป็นตัวแลกเปลี่ยนแอนไอออนในการจับกับโมเลกุลลูกผสมระหว่างพีเอ็นเอและดีเอ็นเอและวิเคราะห์ด้วยมวลดี-ทอปแมสสเปกโทรเมทรีแสดงในรูปที่ 1.2 โดยผลการทดลองแบ่งออกเป็น 4 แถว หากพิจารณาจากบนลงล่าง แถวที่หนึ่งแสดงแมสสเปกตรัมของอนุภาคชนิดต่างๆหลังการสัมผัสกับ PNA (mut) ซึ่งจะเห็นว่าอนุภาค CS และ MBzC เท่านั้นที่แสดงสัญญาณของ PNA (mut) ปรากฏที่ตำแหน่งประมาณ m/z ~ 5,000 แสดงให้เห็นว่าอนุภาคทั้งสองเกิดแรงกระทำอย่างไม่จำเพาะเจาะจงกับ PNA (mut) ทั้งนี้คาดว่าเป็นผลเนื่องมาจากการที่ MBzC เป็นอนุภาคที่มีความชอบน้ำต่ำกว่าอนุภาคอื่นอีก 3 ชนิด เนื่องจากมีวงอะโรมาติกเป็นองค์ประกอบ จึงสามารถเกิด hydrophobic interaction กับ PNA (mut) ได้ง่าย ในขณะที่ CS ซึ่งมีลักษณะเป็นกลางทางประจุ เนื่องจากการทดลองทำในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 7 (สูงกว่า pKa = 6.4 ของโคโทซาน) ดังนั้นจึงสามารถเกิดแรงกระทำกับ PNA (mut) ได้ทั้งผ่าน hydrophobic interaction และพันธะไฮโดรเจน

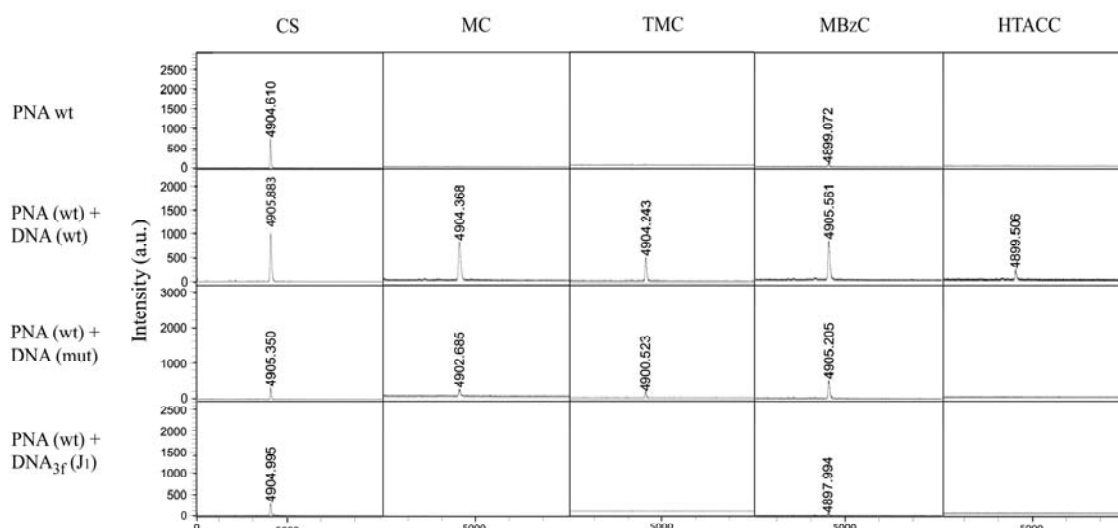
แถวที่สองแสดงแมสสเปกตรัมของอนุภาคชนิดต่างๆหลังการสัมผัสกับโมเลกุลลูกผสมระหว่าง PNA (mut) และ DNA (mut) ซึ่งมีลำดับเบสคู่สมกัน (complementary) จากการที่สามารถสังเกตเห็นสัญญาณของ PNA (mut) ในกรณีของอนุภาค MC, TMC และ HTACC แสดงให้เห็นว่าเกิดการดูดซับด้วยแรงระหว่างประจุบวกของอนุภาคกับประจุลบของโมเลกุลลูกผสม ส่วนในแถวที่สามเป็นแมสสเปกตรัมของอนุภาคชนิดต่างๆหลังการสัมผัสกับโมเลกุลลูกผสมระหว่าง PNA (mut) และ DNA (wt) ซึ่งมีลำดับเบสผิดไป 1 ตำแหน่ง (single mismatch) จากผลการทดลองพบว่ามีเพียงอนุภาค HTACC เท่านั้นที่ไม่ดูดซับโมเลกุลลูกผสมดังกล่าว ทั้งนี้สามารถอธิบายได้จากการที่อนุภาค HTACC มีความเป็นประจุสูงและมีความชอบน้ำสูง จึงไม่เกิดแรงกระทำอย่างไม่จำเพาะเจาะจง ในขณะที่อนุภาคชนิดอื่นซึ่งมีความชอบน้ำไม่มากพอคือ MC, TMC และ MBzC จึงเกิดการดูดซับผ่านแรงกระทำอย่างไม่จำเพาะเจาะจงกับโมเลกุลลูกผสมดังกล่าวได้ ผลในแถวที่สี่ซึ่งเป็นแถวล่างสุดแสดงแมสสเปกตรัมของอนุภาคชนิดต่างๆหลังการสัมผัสกับโมเลกุลลูกผสมระหว่าง PNA (mut) และ DNA_{3f} (J1) ซึ่งมีลำดับเบสไม่เข้าคู่กันทุกตำแหน่ง (full mismatch) โดยพบว่ามีเพียงอนุภาค CS เท่านั้นที่แสดงสัญญาณของ PNA (mut) จากผลการทดลองในส่วนนี้แสดงให้เห็นว่าอนุภาค HTACC เป็นตัวแลกเปลี่ยนแอนไอออนที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดเนื่องจากสามารถบอกความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสที่ผิดไปเพียงตำแหน่งเดียวได้ ส่วนอนุภาค MC และ TMC มีประสิทธิภาพรองลงมาเนื่องจากสามารถบอกความแตกต่างได้เฉพาะดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสผิดไปทุกตำแหน่งเท่านั้น ในขณะที่อนุภาค MBzC ซึ่งถึงแม้จะบอกความแตกต่างในลักษณะเดียวกันได้ แต่ก็เกิดแรงกระทำอย่างไม่จำเพาะเจาะจงกับพีเอ็นเอเองด้วย ส่วนอนุภาค CS นั้นไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการวิเคราะห์เนื่องจากไม่

สามารถบอกความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสผิดไปทุกตำแหน่งและยังเกิดแรงกระทำอย่างไม่จำเพาะเจาะจงกับพีเอ็นเออีกด้วย



รูปที่ 1.2 MALDI-TOF แมสสเปกตรัมของอนุภาคโคโทซานชนิดต่างๆหลังจากที่นำไปจับยึดกับโมเลกุลลูกผสมระหว่างพีเอ็นเอและดีเอ็นเอ ที่อยู่ในสารละลาย 10 mM sodium phosphate buffer pH 7 ปริมาตร 30 μ L (PNA 10 pmol, DNA 10 pmol) โดยใช้ PNA(mut) เป็นโพรบ

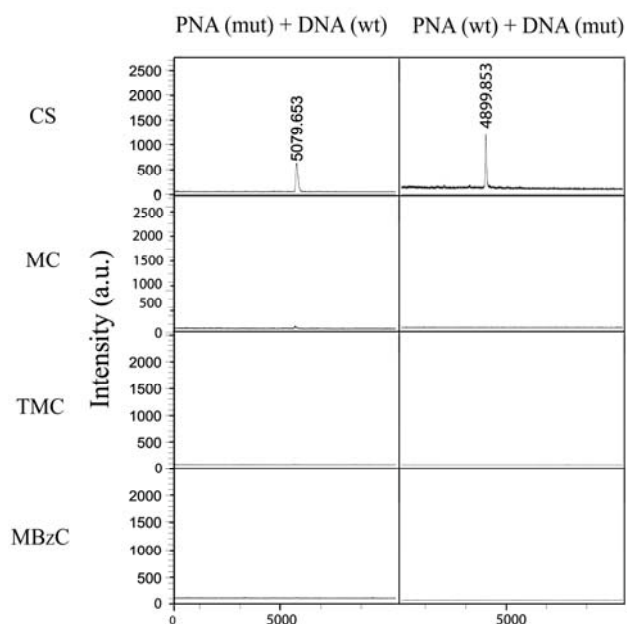
คณะผู้วิจัยได้ทำการทดสอบในลักษณะคล้ายคลึงกันกับอนุภาคโคโทซานทั้ง 5 ชนิดโดยเปลี่ยนพีเอ็นเอโพรบเป็น PNA (wt) ซึ่งมีลำดับเบสคู่สมกับ DNA (wt) และมีลำดับเบสผิดไปหนึ่งตำแหน่งและทุกตำแหน่งเมื่อเปรียบเทียบกับ DNA (mut) และ DNA_{3f} (J1) ตามลำดับ จากผลการทดลองที่แสดงในรูปที่ 1.3 มีแนวโน้มที่คล้ายคลึงกับที่แสดงในรูปที่ 1.2 เมื่อใช้ PNA (mut) เป็นโพรบ กล่าวคืออนุภาค HTACC มีประสิทธิภาพสูงสุด รองลงมาคืออนุภาค MC และ TMC ในขณะที่ทั้งอนุภาค CS และ MBzC ไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการวิเคราะห์ เนื่องจากไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสผิดไปทุกตำแหน่งและยังเกิดแรงกระทำอย่างไม่จำเพาะเจาะจงกับ PNA (wt) อีกด้วย



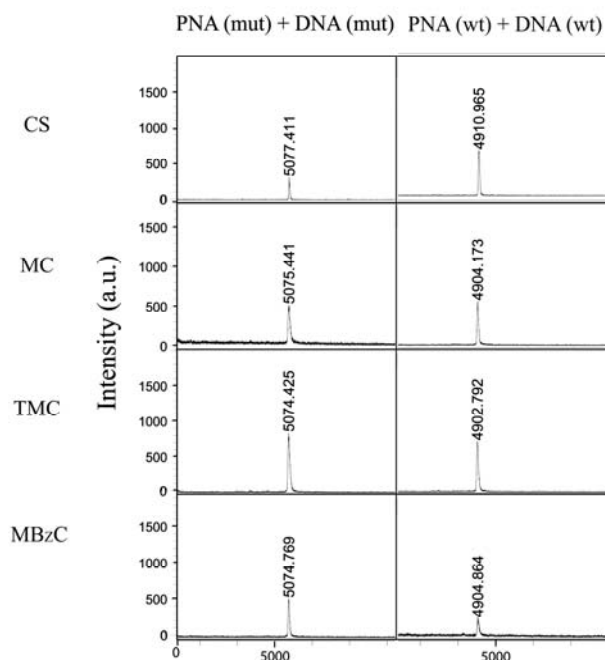
รูปที่ 1.3 MALDI-TOF แมสสเปกตรัมของอนุภาคโคโทซานชนิดต่างๆหลังจากที่นำไปจับยึดกับโมเลกุลลูกผสมระหว่างพีเอ็นเอและดีเอ็นเอ ที่อยู่ในสารละลาย 10 mM sodium phosphate buffer pH 7 ปริมาตร 30 μ L (PNA 10 pmol, DNA 10 pmol) โดยใช้ PNA (wt) เป็นโพรบ

ถึงแม้ว่าอนุภาค HTACC มีสมบัติเหมาะสมในการทำหน้าที่เป็นตัวแลกเปลี่ยนแอนไอออนเนื่องจากสามารถบอกความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสที่ผิดไปเพียงตำแหน่งเดียวได้และไม่เกิดแรงกระทำอย่างไม่จำเพาะเจาะจงกับพีเอ็นเอที่ใช้เป็นโพรบ แต่ก็ยังมีข้อด้อยในเรื่องของสัญญาณที่ต่ำมากในกรณีที่ใช้จับยึดกับโมเลกุลลูกผสมระหว่างพีเอ็นเอและดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สมกัน ทั้งนี้เป็นผลเนื่องมาจากสมบัติความชอบน้ำสูงมากของอนุภาค ซึ่งอาจส่งผลให้ HTACC บางส่วนที่ไม่เกิดการเชื่อมขวางละลายออกจากอนุภาคไปจับกับโมเลกุลลูกผสมในสารละลาย แทนที่จะยึดโมเลกุลลูกผสมไว้บนอนุภาคที่เป็นของแข็ง ด้วยเหตุนี้คณะผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะศึกษาความเป็นไปได้ในการเพิ่มประสิทธิภาพของอนุภาค MC และ TMC ซึ่งให้สัญญาณการจับกับโมเลกุลลูกผสมระหว่างพีเอ็นเอและดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สมกันที่สูงกว่าอนุภาค HTACC โดยการล้างโมเลกุลของพีเอ็นเอโพรบที่ดูดซับอย่างไม่จำเพาะเจาะจงออกโดยใช้สารละลายที่เหมาะสม

รูปที่ 1.4 แสดงแมสสเปกตรัมของอนุภาค CS, MC, TMC และ MBzC หลังจากสัมผัสกับโมเลกุลลูกผสมระหว่าง PNA (mut) และ DNA (wt) และ PNA (wt) และ DNA (mut) ตามลำดับ และล้างอนุภาคด้วย 20% formamide ใน 10 mM sodium phosphate buffer pH 7 ตามด้วยน้ำ MilliQ 3 รอบ ซึ่งทั้งสองกรณีพีเอ็นเอโพรบมีลำดับเบสที่ผิดไปจากดีเอ็นเอเพียงตำแหน่งเดียว ผลปรากฏว่าสารละลายดังกล่าวสามารถกำจัดแรงกระทำอย่างไม่จำเพาะเจาะจงของโมเลกุลลูกผสมทั้ง 2 กรณีบนอนุภาค MC, TMC และ MBzC ได้ เนื่องจากไม่ปรากฏสัญญาณของพีเอ็นเอโพรบบนอนุภาคทั้ง 3 ชนิดหลังจากการล้าง แต่ไม่สามารถกำจัดแรงกระทำดังกล่าวบนอนุภาค CS ได้ เนื่องจากยังพบสัญญาณของ PNA (mut) ที่ $m/z \sim 5,000$ ในรูปที่ 1.4 (คอลัมน์ซ้าย) และสัญญาณของ PNA (wt) ที่ $m/z \sim 4,900$ ในรูปที่ 1.4 (คอลัมน์ขวา) หลังจากการล้างอนุภาค CS เพื่อเป็นการทดสอบว่าสภาวะในการล้างดังกล่าวสามารถใช้ในการวิเคราะห์โดยไม่มีผลกระทบกับโมเลกุลลูกผสมระหว่างพีเอ็นเอและดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สมกัน คณะผู้วิจัยจึงได้ทดลองใช้วิธีการล้างเดียวกันกับอนุภาคชนิดต่างๆหลังจากการจับยึดกับโมเลกุลลูกผสมระหว่าง PNA (mut) และ DNA (mut) และ PNA (wt) และ DNA (wt) แมสสเปกตรัมของอนุภาคหลังจากการล้างแสดงในรูปที่ 1.5 ซึ่งพบว่ายังคงพบสัญญาณของพีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นสูงอยู่บนอนุภาค แสดงว่าการล้างดังกล่าวไม่ทำลายแรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลพีเอ็นเอและดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สมกัน

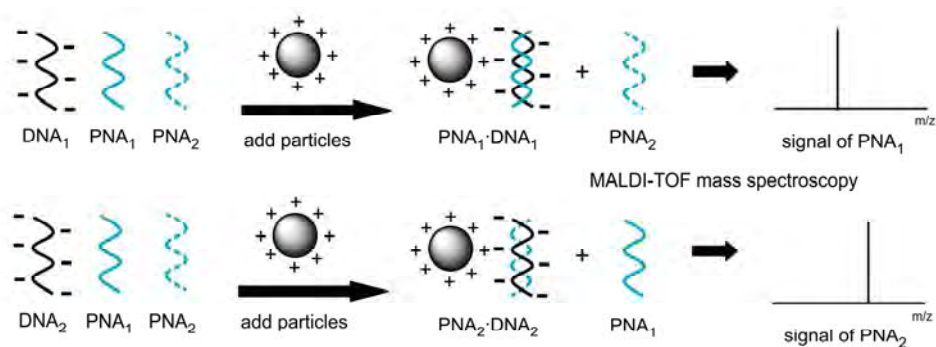


รูปที่ 1.4 MALDI-TOF แมสสเปกตรัมของอนุภาคโคโทซานชนิดต่างๆหลังจากที่นำไปจับยึดกับโมเลกุลลูกผสมระหว่าง PNA (mut) และ DNA (wt) หรือระหว่าง PNA (wt) และ DNA (mut) ที่อยู่ในสารละลาย 10 mM sodium phosphate buffer pH 7 ปริมาตร 30 μ L (PNA 10 pmol, DNA 10 pmol) และล้างอนุภาคด้วย 20% formamide ใน 10 mM sodium phosphate buffer pH 7 และ น้ำ MilliQ 3 รอบ

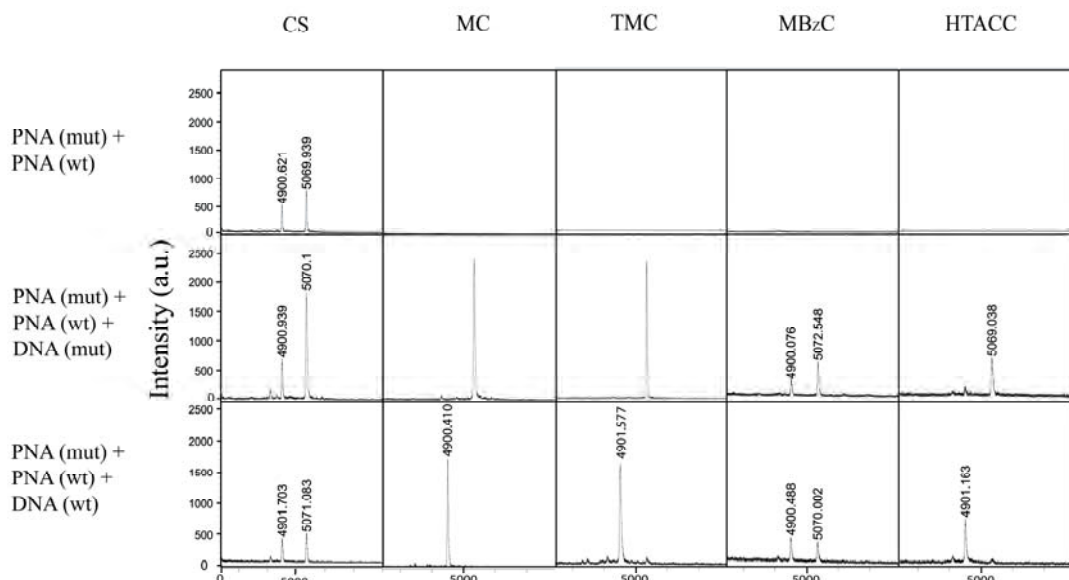


รูปที่ 1.5 MALDI-TOF แมสสเปกตรัมของอนุภาคโคโทซานชนิดต่างๆหลังจากที่นำไปจับยึดกับโมเลกุลลูกผสมระหว่าง PNA (mut) และ DNA (mut) หรือระหว่าง PNA (wt) และ DNA (wt) ที่อยู่ในสารละลาย 10 mM sodium phosphate buffer pH 7 ปริมาตร 30 μ L (PNA 10 pmol, DNA 10 pmol) และล้างอนุภาคด้วย 20% formamide ใน 10 mM sodium phosphate buffer pH 7 และ น้ำ MilliQ 3 รอบ

นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังได้ศึกษาการเลือกจับดีเอ็นเอของอนุภาคชนิดต่างๆในกรณีที่มีพีเอ็นเอโพรบ 2 ชนิดผสมกัน ทั้งที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกันและมีลำดับเบสผิดไปหนึ่งตำแหน่ง (รูปที่ 1.6) จากผลการทดลองในรูปที่ 1.7 แสดงให้เห็นว่าทั้งอนุภาค MC, TMC และ HTACC แสดงความจำเพาะเจาะจงในการเลือกจับเฉพาะกับโมเลกุลลูกผสมระหว่างพีเอ็นเอและดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สมกันเท่านั้น ในกรณีที่ผสม PNA (mut), PNA (wt) และ DNA (mut) จะสังเกตเห็นเฉพาะสัญญาณของ PNA (mut) ที่ $m/z \sim 5,000$ เท่านั้น โดยไม่ปรากฏสัญญาณของ PNA (wt) ที่ $m/z \sim 4,900$ บนอนุภาค ส่วนในกรณีที่ผสม PNA (mut), PNA (wt) และ DNA (wt) จะสังเกตเห็นเฉพาะสัญญาณของ PNA (wt) ที่ $m/z \sim 4,900$ เท่านั้น โดยไม่ปรากฏสัญญาณของ PNA (mut) ที่ $m/z \sim 5,000$ ผลการทดลองในส่วนนี้แสดงให้เห็นว่าอนุภาคดังกล่าวมีความจำเพาะเจาะจงในการเลือกจับสูง มีศักยภาพที่จะพัฒนาไปสู่การประยุกต์ในการวิเคราะห์สารตัวอย่างจริงซึ่งมีความซับซ้อนขององค์ประกอบมากขึ้นได้



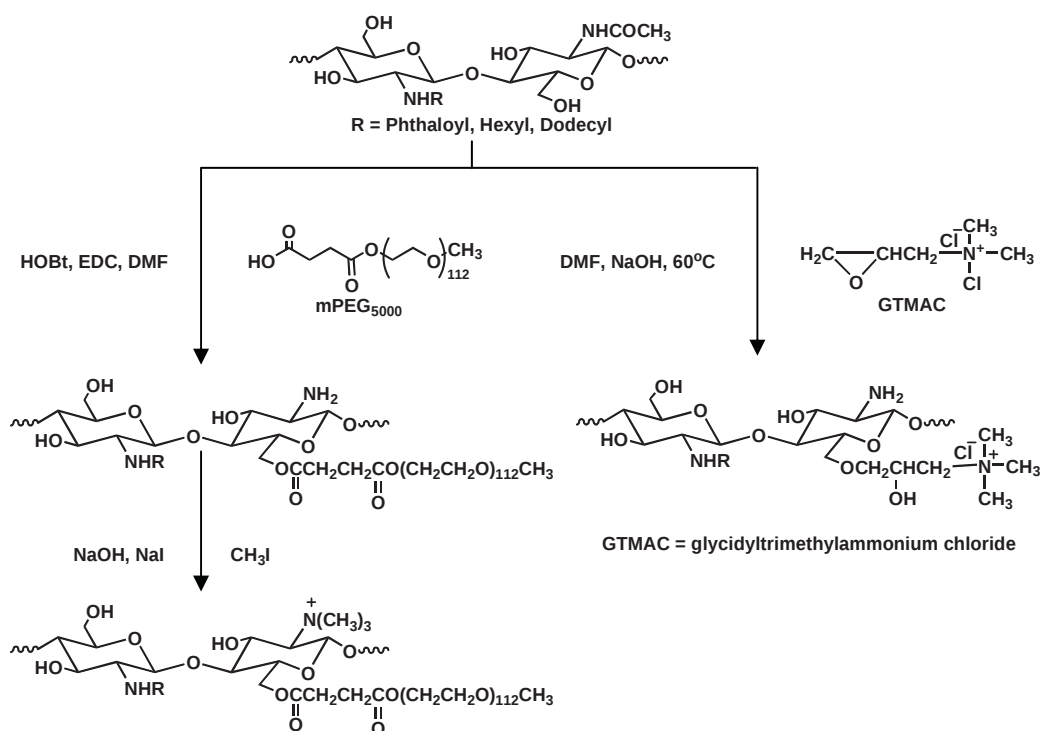
รูปที่ 1.6 แนวทางการตรวจลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยใช้อนุภาคโคโทซานเป็นตัวแลกเปลี่ยนแอนไอออนซึ่งจะเลือกจับเฉพาะโมเลกุลลูกผสมระหว่างดีเอ็นเอและพีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกัน ในสภาวะที่มีการเติมพีเอ็นเอโพรบ 2 ชนิดผสมกัน และวิเคราะห์เทคนิคมัลติ-ทอปแมสสเปกโทรเมทรี



รูปที่ 1.7 MALDI-TOF แมสสเปกตรัมของอนุภาคโคโทซานชนิดต่างๆหลังจากที่นำไปจับยึดกับโมเลกุลลูกผสมที่อยู่ในสารละลายที่มีดีเอ็นเอและพีเอ็นเอโพรบทั้งชนิดที่มีลำดับเบสคู่สมกัน และมีลำดับเบสผิดไป 1 ตำแหน่ง ที่อยู่ในสารละลาย 10 mM sodium phosphate buffer pH 7 ปริมาตร 30 μ L (PNA 10 pmol, DNA 10 pmol) และล้างอนุภาคด้วย 20% formamide ใน 10 mM sodium phosphate buffer pH 7 และ น้ำ MilliQ 3 รอบ

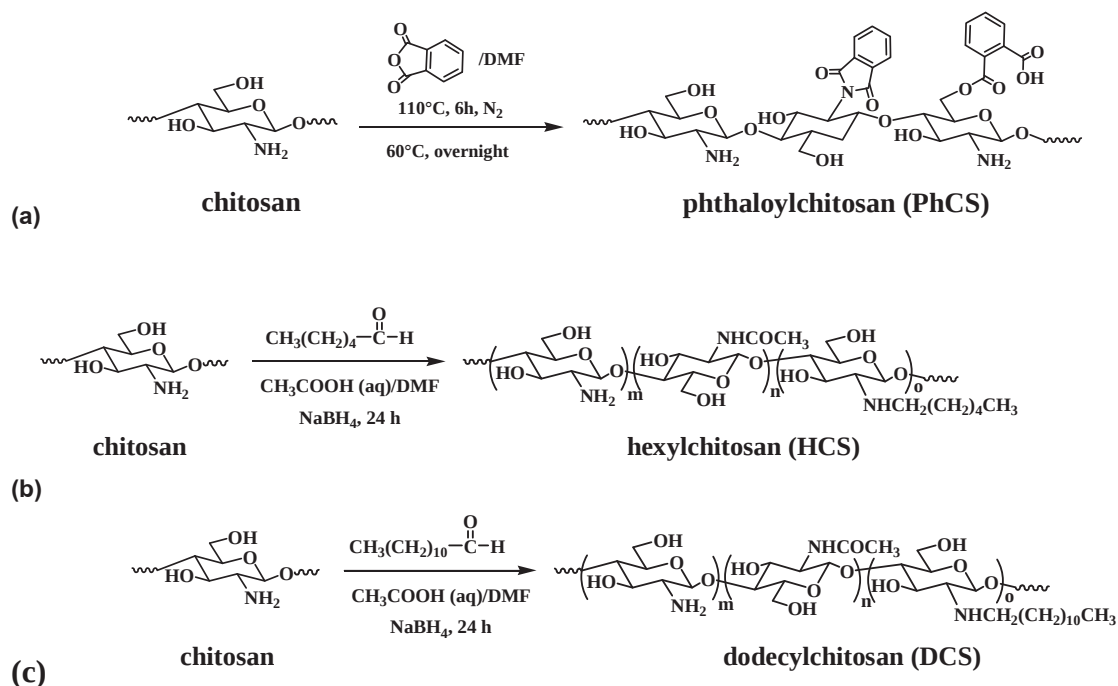
ถึงแม้จะสามารถใช้อนุภาคโคโทซานที่มีประจุบวกของหมู่ควอเตอร์นารีแอมโมเนียมในการวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอได้ แต่ก็ยังมีข้อจำกัดในแง่ของวิธีการเตรียมที่ยังไม่เอื้ออำนวยต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์จริง ทั้งนี้เป็นผลเนื่องมาจากการที่วิธีการเตรียมที่ใช้ในปัจจุบันอาศัยการตกตะกอนอนุภาคด้วยสารเชื่อมขวาง ซึ่งมักจะได้อนุภาคในปริมาณน้อย ดังนั้นเป้าหมายต่อไปของงานวิจัยตอนที่ 1 นี้คือ การพัฒนาวิธีการเตรียมอนุภาคโคโทซานที่ผิวภายนอกมีประจุบวกของหมู่ควอเตอร์นารีแอมโมเนียมที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น แนวทางที่ทางคณะผู้วิจัยสนใจคือ การใช้การประกอบตัวเอง (self assembly) ของพอลิเมอร์ที่มีองค์ประกอบทั้งส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) และไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) หรือที่เรียกว่าแอมฟิฟิลิกพอลิเมอร์ (amphiphilic polymer) อาศัยหลักการที่ว่าพอลิเมอร์จะจัดตัวโดยหันด้านที่ไม่ชอบตัวทำละลายเข้าด้านในและด้านที่ชอบตัวทำละลายไว้ด้านนอก ดังนั้นหากนำไปใส่ในน้ำโมเลกุลของแอมฟิฟิลิกพอลิเมอร์จะเกิดการจัดเรียงตัวเป็นอนุภาคที่มีแกนกลาง (core) เป็นส่วนไม่ชอบน้ำ และมีเปลือกหรือผิวด้านนอก (shell) เป็นส่วนที่ชอบน้ำ ในที่นี้สนใจที่จะให้ผิวด้านนอกเป็นหมู่ควอเตอร์นารีแอมโมเนียมที่มีประจุบวก ซึ่งจะสามารถตอบสนองการใช้งานในการวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอได้ จากการสืบค้นข้อมูลพบว่ามีนักวิจัยประสบความสำเร็จในการนำแนวทางดังกล่าวไปใช้ในการเตรียมอนุภาคเพื่อกักเก็บสารสำคัญชนิดต่างๆ เช่น ยา วิตามิน เพื่อประยุกต์ใช้งานทางด้านการแพทย์ เกษตรกรรม เครื่องสำอาง กันอย่างกว้างขวาง แต่ยังไม่พบการนำมาประยุกต์ใช้ในงานทางด้านการวิเคราะห์ในรูปแบบที่ทางคณะผู้วิจัยสนใจ

คณะผู้วิจัยได้ออกแบบวิธีการสังเคราะห์แอมฟิฟิลิกโคโทซานออกเป็น 2 แนวทาง แสดงรายละเอียดพอสังเขปตามแผนภาพในรูปที่ 1.8 ทั้ง 2 แนวทางใช้อนุพันธ์ของโคโทซานที่มีหมู่ไม่ชอบน้ำ ได้แก่ phthaloyl, hexyl, dodecyl เป็นสารตั้งต้น แนวทางแรกจะเติมหมู่ชอบน้ำของ poly(ethylene glycol) methyl ether (mPEG) น้ำหนักโมเลกุล 5,000 หลังจากการเกิดเป็นอนุภาคผ่านไดอะไลซิสในน้ำแล้ว จึงนำไปทำปฏิกิริยาเมทิลเลชันกับเมทิลไอโอไดด์เพื่อเปลี่ยนหมู่แอมิโนที่เหลือในโครงสร้างของโคโทซานเป็นหมู่ควอเตอร์นารีแอมโมเนียมของ *N,N,N*-trimethyl ในขณะที่แนวทางที่ 2 จะอาศัยการทำปฏิกิริยาเปิดวงของ glycidyltrimethylammonium chloride (GTMAC) โดยหมู่แอมิโนที่เหลือของอนุพันธ์โคโทซานที่มีหมู่ไม่ชอบน้ำ ซึ่งจะทำให้ได้อนุภาคที่มีหมู่ควอเตอร์นารีของ *N*-[(2-hydroxyl-3-trimethylammonium)propyl] (HTAP) เมื่อเตรียมอนุภาคที่มีหมู่ควอเตอร์นารีแอมโมเนียมได้แล้ว จะใช้เทคนิค ^1H NMR ในการตรวจติดตามการเกิดปฏิกิริยา และใช้ข้อมูลที่ได้ในการคำนวณสัดส่วนของหมู่ไม่ชอบน้ำต่อหมู่ชอบน้ำในโครงสร้าง



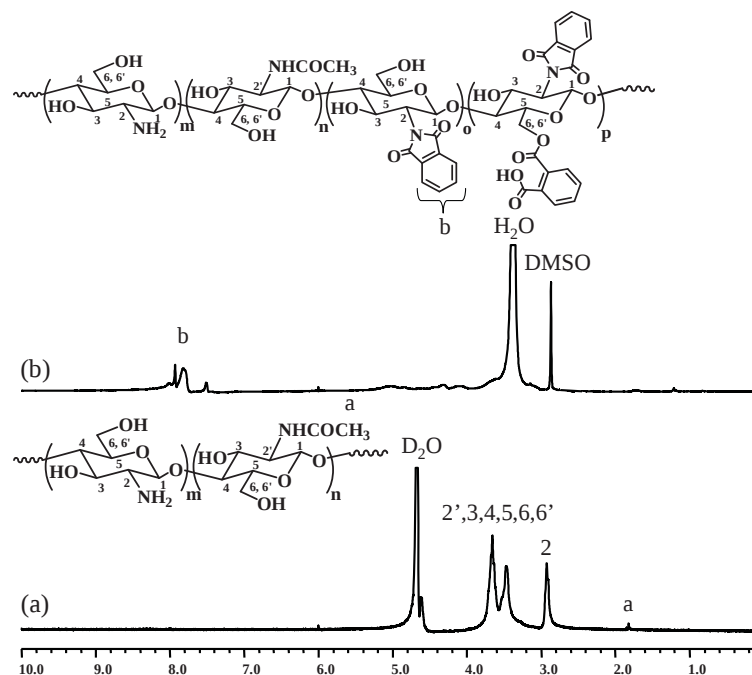
รูปที่ 1.8 แผนภาพแสดงการสังเคราะห์แอมฟิฟิลิกโคโชนา

งานในส่วนแรกจะเป็นการสังเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุพันธ์ไคโทซานที่ผ่านการตรึงด้วยหมู่ฟังก์ชันที่ไม่ชอบน้ำ ทั้งนี้เลือกศึกษาการตรึงหมู่ฟังก์ชันที่ไม่ชอบน้ำ 3 ชนิด ได้แก่ หมู่ทาลอิล (phthaloyl group) หมู่เฮกซิล (hexyl group) และ หมู่โดเดคซิล (dodecyl group) การติดหมู่ทาลอิลทำการทำปฏิกิริยาเปิดวงของ phthalic anhydride ด้วยหมู่เอมีโนและหมู่ไฮดรอกซิลของไคโทซาน ได้ผลิตภัณฑ์เป็น phthaloylchitosan (PhCS) ดังแสดงรายละเอียดในรูปที่ 1.9a ส่วนการติดหมู่เฮกซิลและโดเดคซิลนั้นทำผ่านปฏิกิริยา *N*-reductive alkylation ของ *N*-hexanal (รูปที่ 1.9b) และ *N*-dodecanal (รูปที่ 1.9c) โดยหมู่เอมีโนของไคโทซาน ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็น hexylchitosan (HCS) และ dodecylchitosan (DCS) ตามลำดับ



รูปที่ 1.9 แผนภาพแสดงการสังเคราะห์ (a) PhCS, (b) HCS และ (c) DCS

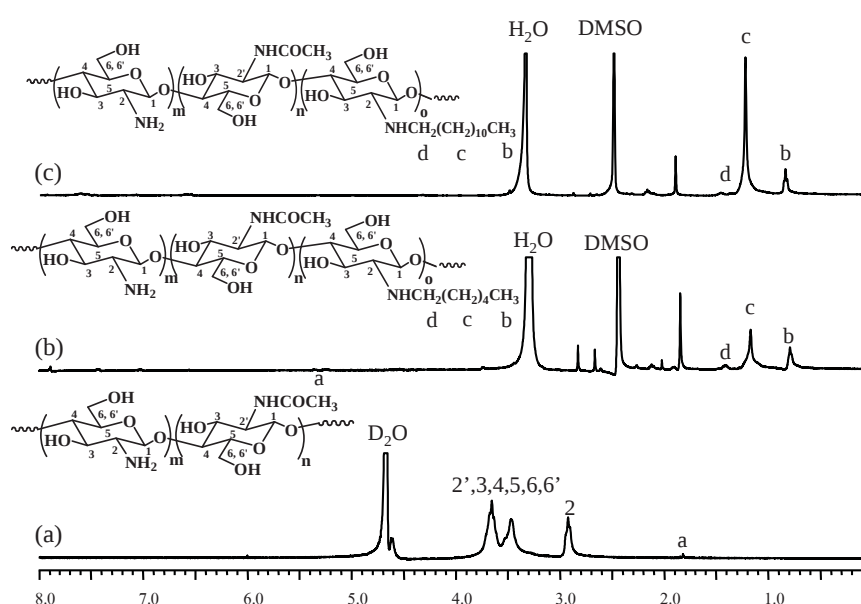
จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ^1H NMR จะพบสัญญาณแอมโพรติกโปรตอนของหมู่ทาลิลที่ chemical shift 7.2-8.2 ppm (ตำแหน่ง b ในรูปที่ 1.10b) ซึ่งไม่พบในสเปกตรัมของไคโทซาน ทั้งนี้สามารถคำนวณหาสัดส่วนการแทนที่ของหมู่ทาลิล (degree of phthaloyl group substitution; %DS_{ph}) ได้จากการนำอินทิเกรชันของโปรตอนตำแหน่งดังกล่าวเทียบกับอินทิเกรชันของโปรตอนที่ต่อกับคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ของไคโทซาน ซึ่งปรากฏที่ chemical shift 2.9 ppm โดยใช้สมการที่ 1



รูปที่ 1.10 ^1H NMR สเปกตรัมของ (a) ไคโทซาน และ (b) PhCS

$$\% DS_{ph} = \left\{ \frac{\text{integral of the } C_6H_4 / 4}{\text{integral of the } H - 2 / 1} \right\} \times 100 \quad (1)$$

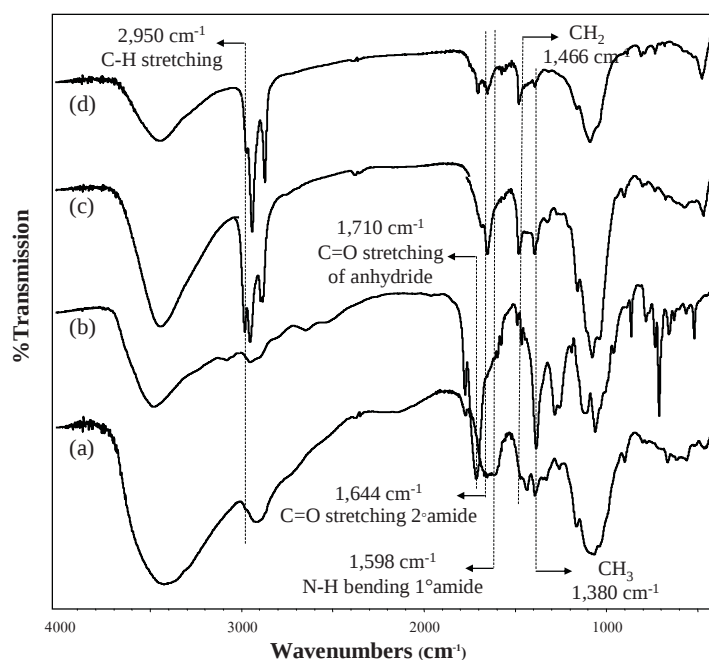
สำหรับ HCS และ DCS (รูปที่ 1.11) นั้นจะพบสัญญาณโปรตอนของหมู่เมทิลและเมทิลีนที่ chemical shift 0.8 (ตำแหน่ง b) และ 1.2 ppm (ตำแหน่ง c) ตามลำดับ ทั้งนี้สามารถคำนวณหาสัดส่วนการแทนที่ของหมู่เฮกซิล (degree of hexyl group substitution; %DS_{He}) และโดเดคซิล (degree of dodecyl group substitution; %DS_{Do}) ได้จากการนำอินทิเกรชันของโปรตอนของหมู่เมทิลเทียบกับอินทิเกรชันของโปรตอนที่ต่อกับคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ของไคโทซาน (2.9 ppm) โดยใช้สมการที่ 2



รูปที่ 1.11 ¹H NMR สเปกตรัมของ (a) ไคโทซาน, (b) HCS และ (c) DCS

$$\% DS_{HCS,DCS} = \left\{ \frac{\text{integral of the } CH_3 / 3}{\text{integral of the } H - 2 / 1} \right\} \times 100 \quad (2)$$

นอกจากนี้ยังสามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุพันธ์ที่ได้โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FT-IR spectroscopy จากรูปที่ 1.12 จะพบพีกที่เลขคลื่น 721 cm⁻¹ ซึ่งเป็นของ -CH deformation out of plane ของวงแอโรมาติกในสเปกตรัมของ PhCS และพีกของ C=O stretching ที่มาจาก cyclic imide ที่เลขคลื่น 1,710 cm⁻¹ และ 1,770 cm⁻¹ ซึ่งไม่ปรากฏในสเปกตรัมของไคโทซาน นอกจากนี้ยังพบการลดลงของพีก N-H bending ของ primary amine ที่เลขคลื่น 1,598 cm⁻¹ แสดงว่าเกิดการแทนที่ที่หมู่เอมิโนของไคโทซาน ในส่วนของ HCS และ DCS นั้น จะพบสัญญาณของ C-H bending ที่มาจากหมู่เมทิลีน ที่เลขคลื่น 1,466 cm⁻¹ และ C-H stretching ที่เลขคลื่น 2,950 cm⁻¹ แสดงถึงการมีอยู่ของสายโซ่แอลคิลในโครงสร้างของทั้งสองอนุพันธ์ ซึ่งไม่พบในไคโทซาน นอกจากนี้ยังพบว่าไม่ปรากฏพีกของ N-H bending ที่เลขคลื่น 1,598 cm⁻¹ แสดงถึงการแทนที่ของหมู่เฮกซิลและโดเดคซิลที่หมู่เอมิโนในโครงสร้างของ HCS และ DCS ตามลำดับ



รูปที่ 1.12 FT-IR สเปกตรัมของ (a) ไคโทซาน, (b) PhCS, (c) HCS และ (d) DCS

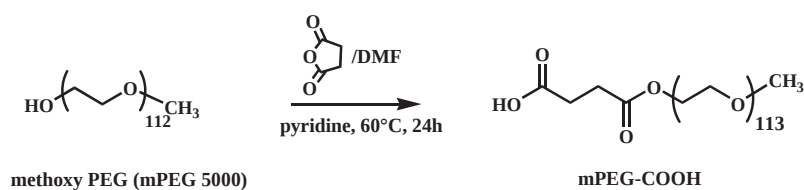
จากตารางที่ 1.3 การใช้ไคโทซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่ 4.5×10^3 Da และ 1.0×10^4 Da ในการทำปฏิกิริยาพบว่าในกรณีของ PhCS ได้ %DS_{Ph} ที่มีค่าสูงที่สุดถึงประมาณ 80 และ 85% ตามลำดับ ทั้งนี้ น่าจะเป็นผลเนื่องมาจาก phthalic anhydride เข้าทำปฏิกิริยาได้ทั้งกับหมู่เอมีโนและหมู่ไฮดรอกซิลของไคโทซาน ทำให้สัดส่วนการแทนที่สูง ในขณะที่ %DS_{He} ของ HCS และ %DS_{Do} ของ DCS มีค่าเพิ่มขึ้นตามสัดส่วนโมลของรีเอเจนต์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา *N*-reductive alkylation คือ *N*-hexanal และ *N*-dodecanal ตามลำดับ เมื่อเทียบกับจำนวนโมลของหมู่เอมีโนของไคโทซาน

ตารางที่ 1.3 เปอร์เซนต์การแทนที่ (%DS) ของหมู่ฟังก์ชันในโครงสร้างของ PhCS, HCS และ DCS คำนวณจากข้อมูลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ^1H NMR

Sample	Mole equivalent of Reagent ^a	%DS _{Ph}	
		4.5×10^3 Da	1.0×10^4 Da
PhCS	1	80.2±8.4	51.8±9.9
	3	73.4±5.0	85.5±4.0
	5	72.8±10.4	85.2±9.6
HCS	1	38.02±3.1	55.8±7.1
	3	46.32±4.5	51.0±5.8
	5	65.32±6.8	66.7±7.5
DCS	1	53.7±5.3	20.3±2.4
	3	72.3±6.8	41.0±3.0
	5	83.3±6.5	55.2±4.9

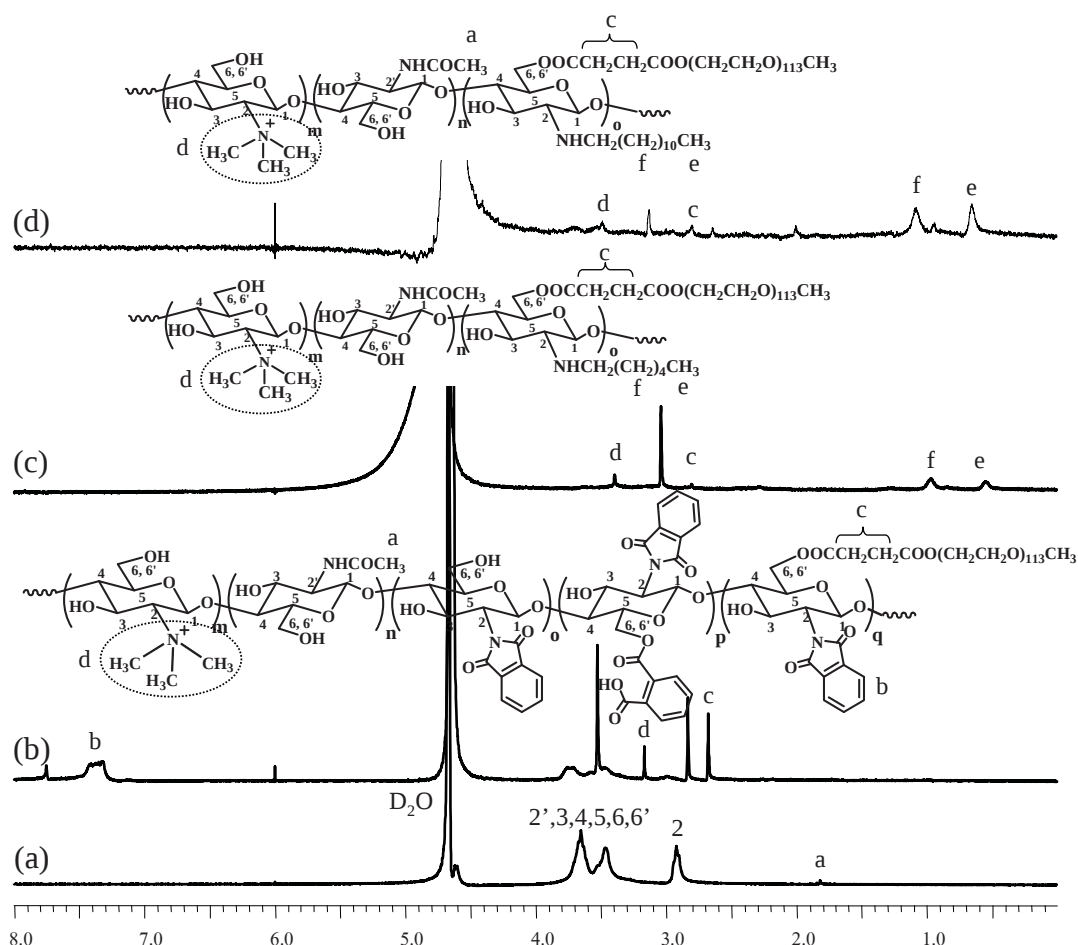
a- รีเอเจนต์ที่ใช้สำหรับสังเคราะห์ PhCS, HCS และ DCS คือ phthalic anhydride, *N*-hexanal และ *N*-dodecanal ตามลำดับ

สำหรับการตรึงหมู่ mPEG นั้น จำเป็นต้องมีการดัดแปรโครงสร้างของ mPEG ให้มีหมู่คาร์บอกซิลด้วยการทำปฏิกิริยากับ succinic anhydride (SA) เพื่อให้ได้ mPEG-COOH ก่อน ดังแสดงแผนภาพการทำปฏิกิริยาในรูปที่ 2 จากนั้นนำอนุพันธ์ที่ติดหมู่ที่ไม่ชอบน้ำทั้งสามชนิด (PhCS, HCS และ DCS) มาทำปฏิกิริยากับ mPEG-COOH โดยใช้ EDC/NHS เป็นรีเอเจนต์คู่ควบ ต่อมาเป็นการเหนี่ยวนำให้เกิดเป็นอนุภาคด้วยการประกอบตัวเองผ่านไดอะไลซิสในน้ำ อนุภาคแอมฟิฟิลิกโคโชนาที่เตรียมจาก PhCS, HCS และ DCS และมีหมู่ที่ชอบน้ำเป็น mPEG จะเรียกว่า PgM, HgM และ DgM ตามลำดับ จากนั้นเมื่อนำอนุภาคข้างต้นดังกล่าวมาทำให้มีประจุบวกด้วยปฏิกิริยาเมทิลเลชันโดยใช้เมทิลไอโอดेट จะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นอนุภาค QPgM, QHgM และ QDgM ตามลำดับ (รูปที่ 1.8)



รูปที่ 1.13 แผนภาพแสดงการสังเคราะห์ mPEG-COOH

รูปที่ 1.14 แสดง ^1H NMR สเปกตรัมของอนุภาค QP_gM, QH_gM และ QD_gM เทียบกับไดโทซาน ทั้งนี้จะพบสัญญาณที่ตำแหน่ง 4.2-3.2 ppm ซึ่งเป็นของโปรตอนตำแหน่งที่ H 2', 3, 4, 5, 6 และ 6' บนโซ่หลักของไดโทซานในทุกสเปกตรัม นอกจากนี้ยังพบสัญญาณของอะโรมาติกโปรตอนของหมู่ฟาลิล ที่ตำแหน่ง 7.2-8.0 ppm ในสเปกตรัมของ QP_gM สัญญาณที่ตำแหน่ง 0.8 และ 1.2 ppm ซึ่งเป็นโปรตอนของหมู่เมทิล ($-\text{CH}_3$) และเมทิลีน ($-\text{CH}_2-$) ของ หมู่เอทิลและโดเดคิล ในสเปกตรัมของ QH_gM และ QD_gM และสัญญาณที่ตำแหน่ง 2.6 ppm ซึ่งเป็นของเมทิลีนโปรตอนส่วนที่เชื่อมกับ mPEG



รูปที่ 1.14 ^1H NMR สเปกตรัมของ (a) chitosan (D_2O) และอนุภาคแอมฟิฟิลิกไคโทซานชนิดที่มีหมู่ mPEG เป็นหมู่ชอบน้ำหลังจากผ่านปฏิกิริยาเมทิลเลชัน ($\text{DMSO}-d_6$): (b) QPpGm, (c) QHgM และ (d) QDgM

ทั้งนี้สามารถคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การแทนที่ของหมู่ mPEG ($\%DS_{\text{mPEG}}$)ได้จากอัตราส่วนอินทิเกรชันของเมทิลีนโปรตอนส่วนที่เชื่อมกับ mPEG เทียบกับอินทิเกรชันของโปรตอนตำแหน่งที่ 2 (H-2) ที่ 2.9 ppm ของไคโทซาน ตามสมการที่ 3

$$\% DS_{\text{mPEG}} = \left\{ \frac{\text{integral of the } \text{OOCCH}_2\text{CH}_2\text{COO} / 4}{\text{integral of the H - 2 / 1}} \right\} \times 100 \quad (3)$$

นอกจากนี้จะพบสัญญาณที่ 3.2-3.4 ppm ซึ่งเป็นโปรตอนของหมู่ไทรเมทิลของหมู่ควอเทอร์นารีแอมโมเนียมในสเปกตรัมของ QPpGm, QHgM และ QDgM ซึ่งสามารถใช้ในการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของหมู่ที่เป็นควอเทอร์นารีแอมโมเนียม ($\%DQ$) ได้จากอัตราส่วนอินทิเกรชันของโปรตอน 9 ตัวของหมู่ไทรเมทิลเทียบกับอินทิเกรชันของโปรตอนตำแหน่งที่ 2 (H-2) ที่ 2.9 ppm ของไคโทซาน ดังแสดงตามสมการที่ 4

$$\% DQ = \left\{ \frac{\text{integral of the } \text{N}^+(\text{CH}_3)_3 / 9}{\text{integral of the H - 2 / 1}} \right\} \times 100 \quad (4)$$

เนื่องจากทาลิกแอนไฮไดรด์ (phthalic anhydride; PhA) ที่ใช้ในการตรึงหมู่ทาลิลของอนุภาค QP_gM สามารถทำปฏิกิริยาได้กับทั้งหมู่แอมิโนและไฮดรอกซิลของไคโทซาน ด้วยเหตุนี้เปอร์เซ็นต์การแทนที่ของหมู่ทาลิล (%DS_{Ph}) จึงมีค่าสูงอยู่ในช่วง 72.8-80.2% และจากตารางที่ 1.4 พบว่าอนุภาคนิวต QP_gM มีเปอร์เซ็นต์การแทนที่ของ mPEG (%DS_{mPEG}) เพิ่มขึ้นตามอัตราส่วนโดยโมลของ mPEG-COOH เมื่อเทียบกับ PhA จาก 1 ไปเป็น 3 แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มอัตราส่วนเป็น 5 โมล จะพบว่ามีการแทนที่ลดลง ทั้งนี้คาดว่าน่าจะเป็นผลจากข้อจำกัดของ mPEG ซึ่งเป็นโมเลกุลใหญ่ในการเข้าถึงหมู่ไฮดรอกซิลของไคโทซานที่ความเข้มข้นสูง เป็นที่น่าสังเกตว่า %DS_{mPEG} จะมีค่าไม่สูงมากนัก โดยอยู่ในช่วง 7.3-38.5% ซึ่งน่าจะสามารถอธิบายได้จากการที่หมู่ไฮดรอกซิลบางส่วนเกิดปฏิกิริยากับ PhA ในขั้นตอนการติดหมู่ไม่ชอบน้ำชนิดทาลิล จึงทำให้มีเหลืออยู่ไม่มากนักที่จะทำปฏิกิริยากับ mPEG-COOH ในขั้นตอนการติดหมู่ชอบน้ำชนิด mPEG และการได้ %DQ ค่อนข้างต่ำ (7.6-13.7%) ก็สามารถอธิบายได้ด้วยเหตุผลคล้ายคลึงกัน กล่าวคือหมู่แอมิโนของไคโทซานส่วนใหญ่เกิดการแทนที่ด้วยหมู่ทาลิล จึงมีจำนวนน้อยเท่านั้นที่จะเกิดปฏิกิริยาเมทิลเลชันกับเมทิลไอโอไดด์ได้เป็นหมู่ควอเตอร์นารีแอมโมเนียม

ตารางที่ 1.4 เปอร์เซ็นต์การแทนที่ของอนุภาค QP_gM ที่อัตราส่วนต่างๆ

Sample	Mole equivalent of PhA:mPEG-COOH	%DS _{Ph}	%DS _{mPEG}	%DQ
QP _g M	1:1	80.2±8.4	7.8±0.4	11.7±1.3
	1:3		38.5±1.7	7.6±2.1
	1:5		18.0±0.9	13.7±1.6
	3:1	73.4±5.0	7.3±0.7	11.4±0.2
	3:3		31.5±0.5	9.0±0.9
	3:5		13.3±0.5	10.6±1.6
	5:1	72.8±10.4	8.70±0.9	8.6±0.4
	5:3		23.3±1.5	9.3±0.9
	5:5		13.4±1.2	10.6±1.0

ในกรณีของอนุภาคนิวต QH_gM (ตารางที่ 1.5) พบว่าเปอร์เซ็นต์การแทนที่ของ %DS_{He} เพิ่มขึ้นตามจำนวนโมลที่เพิ่มขึ้นของ *N*-hexanal (He) และพบว่าการแทนที่สูงสุดเป็น 65% ส่วน %DS_{mPEG} จะมีค่าเพิ่มขึ้นอัตราส่วนโดยโมลที่เพิ่มขึ้นของ mPEG-COOH เมื่อเทียบกับ He ถึงแม้ว่าการแทนที่ของหมู่ไม่ชอบน้ำชนิดเฮกซิล (%DS_{He}) จะมีค่าไม่สูงมากนักหากเทียบกับการแทนที่ของหมู่ทาลิล (%DS_{Ph}) ของอนุภาค QP_gM ประกอบกับการแทนที่ของหมู่เฮกซิลจะเกิดขึ้นเฉพาะที่ตำแหน่งหมู่แอมิโนของไคโทซานเท่านั้น โดยไม่มีผลกับหมู่ไฮดรอกซิลที่จะทำปฏิกิริยาต่อกับ mPEG-COOH แต่ก็ยังพบว่า %DS_{mPEG} มีค่าไม่สูงมากนักหากเทียบกับอนุภาค QP_gM ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นผลของความเกะกะของโมเลกุล mPEG-COOH ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงถึง 5,000 ในการเข้าทำปฏิกิริยากับหมู่ไฮดรอกซิลของไคโทซาน หลังจากผ่านการทำปฏิกิริยาเมทิลเลชันแล้ว พบว่า %DQ มีค่าค่อนข้างต่ำอยู่ในช่วง 7.4-14.6% ดังแสดงในตารางที่ 1.5

ตารางที่ 1.5 เปอร์เซ็นต์การแทนที่ของอนุภาค QHgM ที่อัตราส่วนต่างๆ

Sample	Mole equivalent of He:mPEG-COOH	%DS _{He}	%DS _{mPEG}	%DQ
QHgM	1:1		7.80±0.4	11.33±1.7
	1:3	38.02±3.1	27.5±0.4	12.3±1.9
	1:5		31.5±1.1	13.9±1.6
	3:1		17.0±1.0	12.7±1.3
	3:3	46.32±4.5	19.3±0.3	14.0±2.1
	3:5		23.3±1.0	7.4±1.1
	5:1		13.5±0.4	14.6±2.5
	5:3	65.32±6.8	19.0±1.2	13.1±1.6
	5:5		23.5±1.1	11.6±1.7

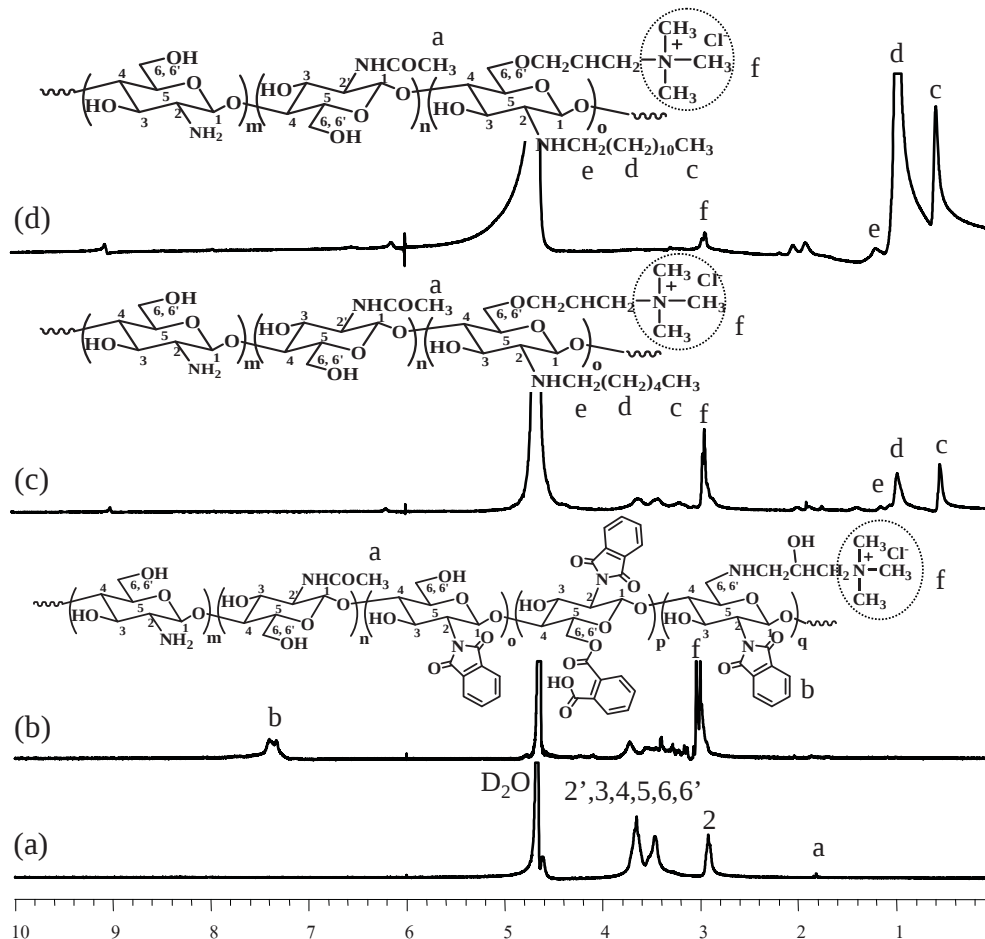
ส่วนอนุภาค QDgM ซึ่งแสดงผลการคำนวณเปอร์เซ็นต์การแทนที่ไว้ในตารางที่ 1.6 พบว่ามีแนวโน้มของการแทนที่ของทั้งหมู่ไม่ชอบน้ำชนิดโตนเตคซิล (%DS_{Do}) และหมู่ชอบน้ำชนิด mPEG (%DS_{mPEG}) เช่นเดียวกับของอนุภาค QHgM กล่าวคือ สามารถปรับเปลี่ยน %DS_{Do} ได้ตามจำนวนโมลที่เพิ่มขึ้นของรีเอเจนต์ที่ใช้คือ *N*-dodecanal (Do) ส่วน %DS_{mPEG} และ %DQ มีค่าไม่สูงมากนัก

ตารางที่ 1.6 เปอร์เซ็นต์การแทนที่ของอนุภาค QDgM ที่อัตราส่วนต่างๆ

Sample	Mole equivalent of Do:mPEG-COOH	%DS _{Do}	%DS _{mPEG}	%DQ
QDgM	1:1		12.3±0.7	8.1±3.2
	1:3	53.7±5.3	17.0±0.7	13.2±1.6
	1:5		18.3±1.2	9.3±2.7
	3:1		11.3±1.2	11.5±0.8
	3:3	72.3±6.8	13.0±0.4	8.3±1.3
	3:5		23.0±0.5	7.1±1.4
	5:1		28.0±1.2	8.3±0.5
	5:3	83.3±6.5	30.5±2.3	12.8±1.6
	5:5		22.3±0.5	10.7±2.0

สำหรับเส้นทางที่ 2 ซึ่งอาศัยการทำปฏิกิริยาเปิดวง GTMAC ของหมู่เอมีโนของโคโทซาน ซึ่งเป็นการติดหมู่ HTAP เข้าไปนั้น สามารถคำนวณสัดส่วนเปอร์เซ็นต์การแทนที่ของ HTAP (degree of HTAP group substitution; %DS_{HTAP}) ได้จากการอินทิเกรชันของฟีกที่เป็นโปรตอนของหมู่เมทิล 3 หมู่ ปรากฏที่ chemical shift 3.05-3.10 ppm ที่ตำแหน่ง f ในสเปกตรัมของ HgH และ DgH (รูปที่ 1.15) เทียบกับอินทิเกรชันของฟีกที่ตำแหน่งที่ 2 (2.9 ppm) ของโคโทซาน ตามสมการที่ 5

$$\%DS_{HTAP} = \left(\frac{\int \frac{H - N^+(CH_3)_3}{9}}{\int \frac{H - 2}{1}} \right) \times 100 \quad (5)$$



รูปที่ 1.15 ^1H NMR สเปกตรัมของ (a) chitosan (D_2O) และอนุภาคแอมฟิฟิลิกไคโทซานชนิดที่มีหมู่ HTAP เป็นหมู่ชอบน้ำ: (b) PgH, (c) HgH, and (d) DgH

จากการใช้ HCS และ DCS ที่มีหมู่เฮกซิลและโดเดคซิลเป็นหมู่ไม่ชอบน้ำไปทำปฏิกิริยากับ GTMAC เพื่อติดหมู่ชอบน้ำประเภท HTAP ได้เป็น HgH และ DgH ตามลำดับ พบว่า $\%DS_{HTAP}$ มีค่าเพิ่มขึ้นตามสัดส่วนโดยโมลของ GTMAC ที่เพิ่มขึ้น ในเกือบทุกสัดส่วนการแทนที่ของหมู่เฮกซิลและโดเดคซิล ดังแสดงผลการทดลองในตารางที่ 1.7 และ 1.8 ทั้งนี้จะสังเกตเห็นได้ว่า $\%DS_{HTAP}$ ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงการมีหมู่ควอเตอร์นารีแอมโมเนียม ที่เทียบเท่ากับ $\%DQ$ ในกรณีของแอมฟิฟิลิกไคโทซานที่เตรียมผ่านปฏิกิริยาตามเส้นทางที่แรกนั้น มีค่าสูงได้ถึงเกือบ 45% ซึ่งเป็นค่าที่สูงกว่า $\%DQ$ เป็นอย่างมาก ทั้งนี้จะสามารถอธิบายได้จากการเปิดวงของ GTMAC นั้นเกิดได้ทั้งจากหมู่เอมีโนและหมู่ไฮดรอกซิลของไคโทซาน ในขณะที่ในกรณีของแอมฟิฟิลิกไคโทซานที่เตรียมผ่านปฏิกิริยาตามเส้นทางแรกนั้น การเกิดเป็นหมู่ควอเตอร์นารีแอมโมเนียมจะต้องผ่านปฏิกิริยาเมทิลเลชันของหมู่เอมีโนของไคโทซานเท่านั้น

ตารางที่ 1.7 สัดส่วนการแทนที่ของหมู่ฟังก์ชันต่างๆในโครงสร้างของแอมฟิฟิลิกโคโพลิซานที่มีหมู่เฮกซิลเป็นหมู่ไม่ชอบน้ำและ HTAP เป็นหมู่ชอบน้ำ ซึ่งคำนวณได้จากผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ^1H NMR

ชนิดของอนุพันธ์	hexanal : GTMAC by mol	%DS _{He}	%DS _{HTAP}
HgH _{45,000}	1:1	38.0	44.3
	1:3		30.8
	1:5		33.6
	3:1	46.3	7.1
	3:3		9.0
	3:5		13.6
	5:1	65.3	6.3
	5:3		7.8
	5:5		10.8
HgH _{100,000}	1:1	55.7	14.3
	1:3		31.8
	1:5		36.7
	3:1	51.0	17.7
	3:3		19.0
	3:5		26.9
	5:1	66.7	24.8
	5:3		29.6
	5:5		36.3

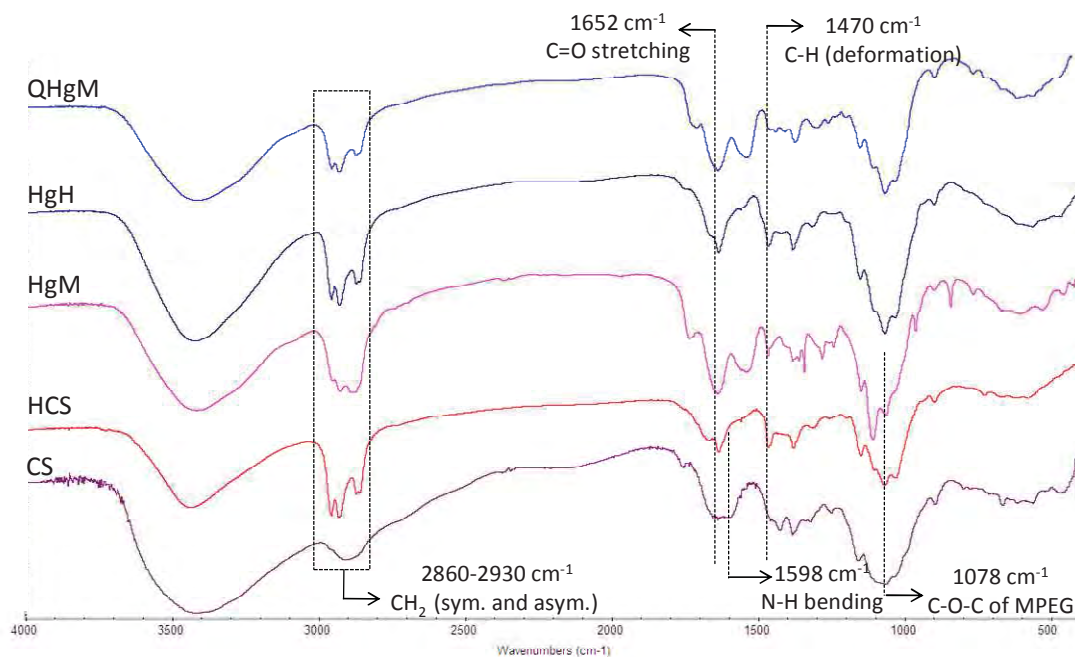
หมายเหตุ: ตัวเลขที่ปรากฏเป็นตัวห้อยในคอลัมน์แรกคือ 45,000 และ 100,000 เป็นน้ำหนักโมเลกุลของโคโพลิซานที่ใช้ในการสังเคราะห์

ตารางที่ 1.8 สัดส่วนการแทนที่ของหมู่ฟังก์ชันต่างๆในโครงสร้างของแอมฟิฟิลิกโคโทซานที่มีหมู่โดเดคซิลเป็นหมู่ไม่ชอบน้ำและ HTAP เป็นหมู่ชอบน้ำ ซึ่งคำนวณได้จากผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ^1H NMR

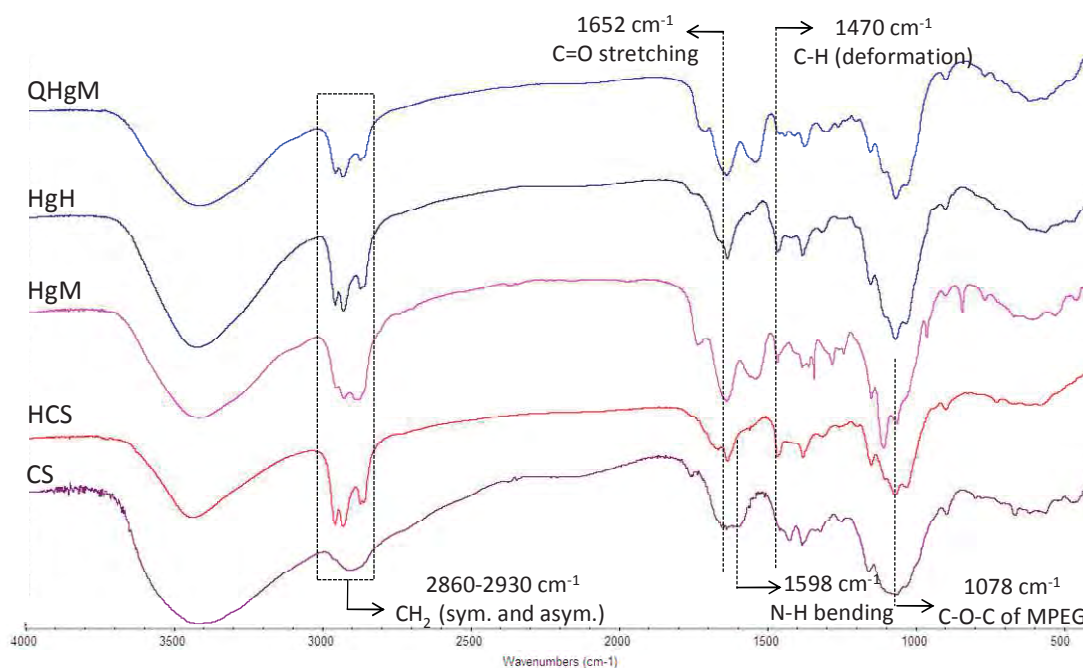
ชนิดของอนุพันธ์	hexanal : GTMAC by mol	%DS _{He}	%DS _{HTAP}
DgH _{45,000}	1:1	53.7	6.8
	1:3		9.2
	1:5		10.1
	3:1	72.3	11.9
	3:3		29.6
	3:5		22.9
	5:1	83.3	16.8
	5:3		21.4
	5:5		35.8
DgH _{100,000}	1:1	20.3	12.3
	1:3		20.1
	1:5		23.8
	3:1	41.0	8.6
	3:3		24.5
	3:5		23.1
	5:1	55.2	16.8
	5:3		21.4
	5:5		24.8

หมายเหตุ: ตัวเลขที่ปรากฏเป็นตัวห้อยในคอลัมน์แรกคือ 45,000 และ 100,000 เป็นน้ำหนักโมเลกุลของโคโทซานที่ใช้ในการสังเคราะห์

นอกจากนี้สามารถยืนยันความสำเร็จของการสังเคราะห์แอมฟิฟิลิกโคโทซานได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FT-IR (รูปที่ 1.16-1.17) โดยจะพบสัญญาณที่เด่นชัดของ C-H stretching ทั้งที่เป็นของหมู่เมทิลและเมทิลีน ในช่วง $2860\text{--}2930\text{ cm}^{-1}$, การลดลงของสัญญาณที่แสดง N-H bending บริเวณ 1598 cm^{-1} และการปรากฏของสัญญาณ C-H deformation ที่ 1470 cm^{-1} เนื่องจากเกิดการแทนที่ของหมู่แอลคิลไปที่หมู่แอมิโนของโคโทซาน



รูปที่ 1.16 FT-IR สเปกตรัมของ chitosan (CS), hexylchitosan (HCS), HCS ที่ติดหมู่ mPEG (HgM), HCS ที่ติดหมู่ HTAP (HgH) และ HgM หลังการทำปฏิกิริยาเมทิลเลชัน (QHgM) ที่เตรียมจากโคโทซานน้ำหนักโมเลกุล 45,000 Dalton, 85%DD



รูปที่ 1.17 FT-IR สเปกตรัมของ chitosan (CS), dodecyl chitosan (DCS), DCS ที่ติดหมู่ mPEG (DgM), DCS ที่ติดหมู่ HTAP (DgH) และ DgM หลังการทำปฏิกิริยาเมทิลเลชัน (QDgM) ที่เตรียมจากโคโทซานน้ำหนักโมเลกุล 45,000 Dalton, 85%DD

เพื่อเป็นการเพิ่มสัดส่วนการแทนที่ของหมู่ควอเตอร์นารีแอมโมเนียมหรือ %DQ ของอนุภาคที่มีหมู่ HTAP เป็นหมู่ชอบน้ำ ในงานวิจัยนี้ได้ทดลองเพิ่มความเป็นกรดของสารละลาย DMF ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาเปิดวงของ GTMAC โดยการเติมสารละลายกรดแอซิดิก (1.0% (v/v)) เพื่อลด pH จาก 9 เป็น 5 ทั้งนี้คาดหวังว่าการเพิ่มความเป็นกรดเพียงเล็กน้อยจะลดโอกาสของการมีไอออนไฮดรอกไซด์ในระบบที่จะเข้าแข่งขันกับหมู่แอมิโนของโคโธซานในการเข้าทำปฏิกิริยาเปิดวงกับ GTMAC ข้อมูลในตารางที่ 1.9 แสดงให้เห็นว่าแนวทางดังกล่าวประสบความสำเร็จในการช่วยเพิ่ม %DQ ของทุกอนุพันธ์เกือบทุกชนิดให้มีค่าสูงกว่า 50%

ตารางที่ 1.9 สัดส่วนการแทนที่ของหมู่ฟังก์ชันต่างๆในโครงสร้างของแอมฟิฟิลิกโคโธซานที่มีหมู่ HTAP เป็นหมู่ชอบน้ำ สังเคราะห์จากโคโธซานน้ำหนักโมเลกุล 45 kDa และมีการเติมสารละลายกรดแอซิดิก (1.0% (v/v)) ซึ่งคำนวณได้จากผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ^1H NMR

Sample ^a	Mole equivalent of hydrophobic reagent: GTMAC ^b	%DS _{hydrophobic}	%DQ _{HTAP}
PgH	1:5	80.2	58.2
	3:5	73.4	52.6
	5:5	72.8	42.4
HgH	1:5	38.0	55.0
	3:5	46.3	59.1
	5:5	65.3	68.1
DgH	1:5	53.7	59.4
	3:5	72.3	65.4
	5:5	83.3	51.7

a- PgH, HgH และ DgH คืออนุภาคแอมฟิฟิลิกโคโธซานที่มีหมู่ชอบน้ำเป็น HTAP และหมู่ไม่ชอบน้ำเป็นทาลอิล เฮกซิล และโดเดคซิล ตามลำดับ

b- Hydrophobic reagent คือ ทาลิกแอนไฮไดรด์, เฮกซานาล และ โดเดคคานาล สำหรับการสังเคราะห์แอมฟิฟิลิกโคโธซานชนิด PgH, HgH และ DgH ตามลำดับ

ในงานวิจัยนี้วิเคราะห์ค่าความเป็นประจุของอนุภาคด้วยเทคนิค PCS จากผลการทดลองที่แสดงในตารางที่ 1.10 จะเห็นว่าอนุภาคแอมฟิฟิลิกโคโธซานที่เตรียมผ่านเส้นทางที่ 1 ซึ่งมี mPEG₅₀₀₀ เป็นหมู่ชอบน้ำแสดงประจุเป็นลบ โดยมีอนุภาคชนิด QPpGM ซึ่งมีหมู่ทาลอิลเป็นหมู่ไม่ชอบน้ำแสดงความเป็นลบมากที่สุด คณะผู้วิจัยคาดว่าเป็นผลมาจากหลายปัจจัยดังนี้ ปัจจัยแรกเป็นผลจากการที่ %DQ ของทุกอนุภาคมีค่าต่ำกว่า 20% จึงส่งผลให้ค่าศักย์เซต้า (ζ -potential) มีค่าเป็นลบ ปัจจัยต่อมาเป็นผลมาจากการที่ mPEG₅₀₀₀ ที่ประกอบด้วยหน่วยซ้ำของเอทิลีนไกลคอลซึ่งมีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวเป็นจำนวนมากบนอะตอมของออกซิเจนลักษณะดังกล่าวส่งผลให้อนุภาคมีประจุเป็นบวก ปัจจัยที่สามส่งผลโดยตรงต่ออนุภาคชนิด QPpGM and PgH ที่มีหมู่ทาลอิลเป็นหมู่ไม่ชอบน้ำ ซึ่งในการทำปฏิกิริยานอกจากจะมีการแทนที่ของหมู่ดังกล่าวที่ตำแหน่งของหมู่แอมิโนได้ผลิตภัณฑ์เป็นอิมิดแบบวงแล้ว จะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีการแทนที่ที่ตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซิลทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นแอนไฮไดรด์แบบวงซึ่งไม่เสถียรและแตกออกเป็นหมู่คาร์บอกซิล (pKa 4.4) ที่สามารถแตกตัวเป็น

คาร์บอกซิเลตที่มีประจุเป็นลบ ผลของปัจจัยสุดท้ายนี้จะเห็นได้ชัดกับอนุภาค QP_gM ที่มี %DS_{ph} สูง และ %DQ ต่ำ ประจุบวกที่ให้กับอนุภาคผ่านปฏิกิริยาเมทิลเลชันมีไม่มากพอที่จะไปหักล้างความเป็นลบของหมู่คาร์บอกซิเลตด้วยเหตุนี้อนุภาคชนิด QP_gM จึงมีค่าศักย์เซตต่ำสุดถึง -44 mV

การเพิ่มสัดส่วนการแทนที่ของหมู่ควอเตอร์นารีแอมโมเนียมในอนุภาคชนิดที่มี HTAP เป็นหมู่ชอบน้ำที่สังเคราะห์ผ่านเส้นทางที่ 2 ให้สูงกว่า 50% ช่วยทำให้อนุภาคชนิด PgH ซึ่งมีหมู่ไม่ชอบน้ำเป็นหมู่ทาโลอิลเช่นเดียวกับ QP_gM มีความเป็นประจุลบน้อยลง แสดงให้เห็นว่าประจุบวกเนื่องจากหมู่ควอเตอร์นารีแอมโมเนียมสามารถหักล้างความเป็นลบของหมู่คาร์บอกซิเลตได้ แต่ก็ยังไม่เพียงพอที่จะทำให้อนุภาค PgH มีประจุเป็นบวกถึงแม้ว่าจะเป็นอนุภาคที่เตรียมโดยการเติมสารละลายกรดแอซิติก (1.0% (v/v)) ทำให้ได้ %DQ_{HTAP} สูงถึง 58.2% ก็ตาม การเติมกรดดังกล่าวส่งผลอย่างชัดเจนต่อการเพิ่มความเป็นประจุบวกให้กับอนุภาคชนิด HgH และ DgH ค่าพลังงานเซตต่ำมีค่าเพิ่มขึ้นจาก +22.5 เป็น +35.3 mV และจาก +15.5 เป็น +48.5 mV สำหรับอนุภาคชนิด HgH และ DgH ตามลำดับ หลังการเติมกรด ในที่นี้ไม่สามารถเปรียบเทียบค่าศักย์เซตของอนุภาคโคโทซานกับอนุภาคแอมฟิฟิลิกโคโทซานได้ เนื่องจากอนุภาคโคโทซานเตรียมจากการตกตะกอนด้วยไตรพอลิไทรฟอสเฟส ไม่ได้เตรียมจากการประกอบตัวเองซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในการเตรียมอนุภาคแอมฟิฟิลิกโคโทซาน

ตารางที่ 1.10 ค่าความเป็นประจุบวกซึ่งแสดงในรูปของศักย์เซตต่ำของอนุภาคแอมฟิฟิลิกโคโทซานซึ่งวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCS

Sample ^a	%DS of Hydrophobic:Hydrophilic ^b	%DQ	ζ-potential (mV) ^c	ζ-potential (mV) ^d
Chitosan	-	-	+27.1	+27.1
QP _g M	73:13 ^c	9	-44.3	-
QH _g M	46:19 ^c	14	-10.6	-
QD _g M	72:13 ^c	8	-6.5	-
PgH	73:46 ^c / 73:53 ^d	-	-13.2	-10.4
HgH	46:31 ^c / 46:59 ^d	-	+22.5	+35.3
DgH	72:29 ^c / 72:65 ^d	-	+15.5	+48.5

a- QP_gM, QH_gM และ QD_gM คือ อนุภาคแอมฟิฟิลิกโคโทซานที่มีหมู่ชอบน้ำเป็น mPEG₅₀₀₀ และหมู่ไม่ชอบน้ำเป็นทาโลอิล เฮกซิล และโดเดคซิล ตามลำดับ ส่วน PgH, HgH และ DgH คืออนุภาคแอมฟิฟิลิกโคโทซานที่มีหมู่ชอบน้ำเป็น HTAP และหมู่ไม่ชอบน้ำเป็นทาโลอิล เฮกซิล และโดเดคซิล ตามลำดับ

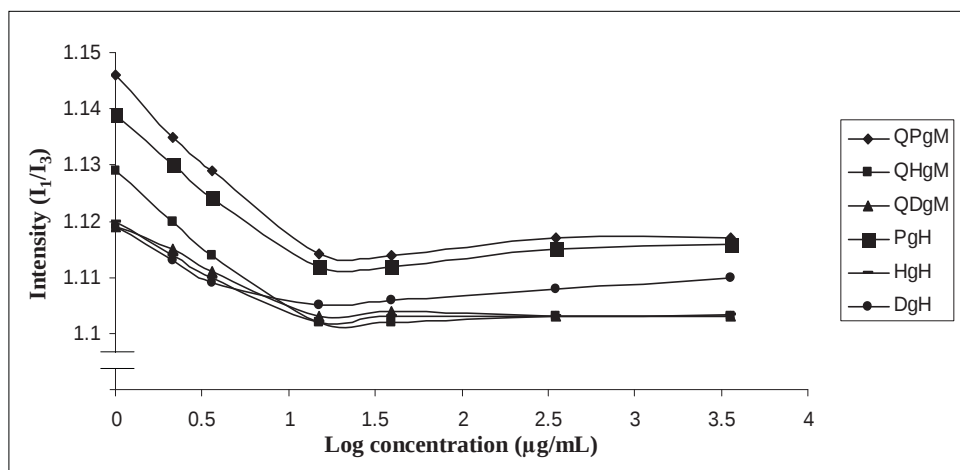
b- หมู่ไม่ชอบน้ำมี 3 ชนิด ได้แก่ ทาโลอิล เฮกซิล และโดเดคซิล ส่วนหมู่ชอบน้ำมี 2 ชนิด ได้แก่ mPEG₅₀₀₀ และ HTAP

c- อนุภาคเตรียมในสารละลาย DMF

d- อนุภาคเตรียมในสารละลาย DMF+ 1.0% (v/v) acetic acid

Critical micelle concentration (CMC) เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้เกิดเป็นไมเซลล์. ในงานวิจัยนี้หาค่า CMC ของแอมฟิฟิลิกโคโทซานที่เตรียมได้โดยใช้เทคนิคฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรสโกปีและไฟรินเป็นสีย้อม ทั้งนี้สามารถหาได้จากการเปลี่ยนแปลงของสัดส่วนระหว่าง vibrational peak ที่ 1 เปรียบเทียบกับ vibrational peak ที่ 3 ในสเปกตรัมเปล่งแสงฟลูออเรสเซนส์ (fluorescence emission spectrum) ของไฟริน (I_1/I_3) เมื่อความเข้มข้นต่ำกว่าค่า CMC จะยังไม่เกิดเป็นอนุภาค อัตราส่วน I_{373}/I_{384} จึงยังมีค่าสูงเนื่องจากไฟรินซึ่งเป็นสีย้อมที่มีสมบัติไม่

ชอบน้ำจะยังไม่สามารถกระจายตัวในน้ำที่เป็นตัวทำละลายได้ แต่เมื่อความเข้มข้นสูงเกินค่า CMC เกิดการประกอบเป็นอนุภาค ไพรินจะถูกกักเก็บอยู่ภายในอนุภาค ส่งผลให้ อัตราส่วน I_{373}/I_{384} มีค่าลดลง กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง I_{373}/I_{384} ของไพรินและ log ความเข้มข้นของแอมฟิฟิลิกโคโทซาน (คัดเลือกเฉพาะที่มีค่าพลังงานเซตสูงสุดของอนุพันธ์แต่ละชนิด) แสดงไว้ในรูปที่ 1.18 เมื่อนำผลจากกราฟดังกล่าวไปคำนวณจะพบค่า CMC ของแอมฟิฟิลิกโคโทซานอยู่ในช่วง 7-17 $\mu\text{g/mL}$ ดังแสดงผลไว้ในตารางที่ 3 และเป็นที่น่าสนใจว่าอนุภาคที่มีหมู่ชอบน้ำเป็น HTAP จะมีค่า CMC ต่ำกว่าอนุภาคที่มีหมู่ชอบน้ำเป็น mPEG₅₀₀₀ ในกรณีที่มีหมู่ไม่ชอบน้ำชนิดเดียวกัน แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการเกิดเป็นอนุภาคที่ดีกว่า



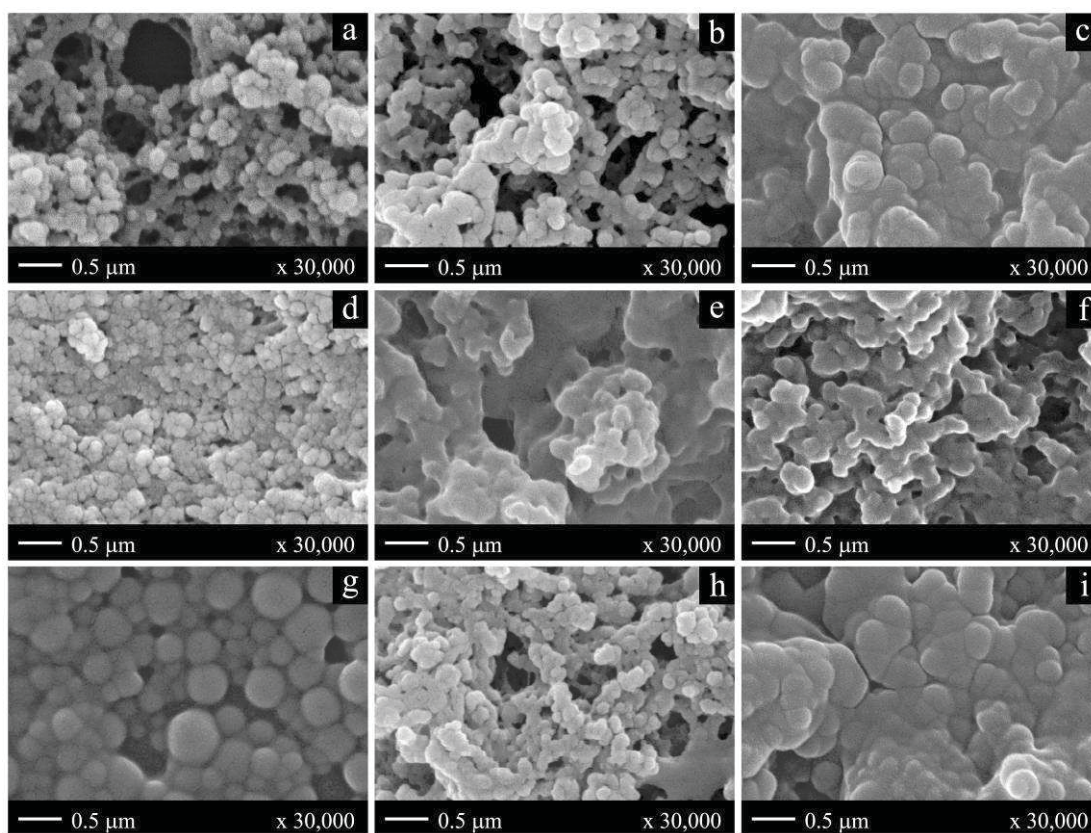
รูปที่ 1.18 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง I_{373}/I_{384} ของไพริน และ log ความเข้มข้นของสารละลายแอมฟิฟิลิกโคโทซานชนิดต่างๆ

ตารางที่ 1.11 CMC ของแอมฟิฟิลิกโคโทซานชนิดต่างๆ

Sample	CMC (μg/mL)
QPgM	15.9
QHgM	16.9
QDgM	12.6
PgH	13.6
HgH	10.0
DgH	7.10

จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SEM พบว่าอนุภาคแอมฟิฟิลิกโคโทซานทุกชนิดมีลักษณะเป็นทรงกลม (รูปที่ 1.19) มีเส้นผ่าศูนย์กลางอยู่ในช่วง 0.11 ถึง 0.29 ไมโครเมตร (ตารางที่ 1.12) ซึ่งเป็นขนาดเล็กกว่าที่วิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค PCS ซึ่งอยู่ในช่วง 1.29 ถึง 3.10 ไมโครเมตร ทั้งนี้จะเป็นสาเหตุจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCS เป็นการวัด hydrodynamic size ที่วิเคราะห์ในสารละลายซึ่งมีผลของการบวมตัวเข้ามาเกี่ยวข้อง จึงทำให้ได้ขนาดของอนุภาคใหญ่กว่าที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SEM ซึ่งทำในสภาวะแห้งภายใต้บรรยากาศลดความดัน นอกจากนี้ยังเป็นที่น่าสนใจที่สังเกตเห็นได้ว่าอนุภาคที่มีหมู่ชอบน้ำเป็น mPEG₅₀₀₀ มีขนาดเล็กกว่า

อนุภาคที่มีหมู่ชอบน้ำเป็น HTAP ทั้งนี้สันนิษฐานว่าน่าจะเป็นผลเนื่องมาจากพันธะไฮโดรเจนระหว่างโซ่ยาวของ mPEG₅₀₀₀ ทำให้หมู่ไม่ชอบน้ำจัดตัวในแกนกลางได้มีประสิทธิภาพและแน่นกว่าหมู่ HTAP



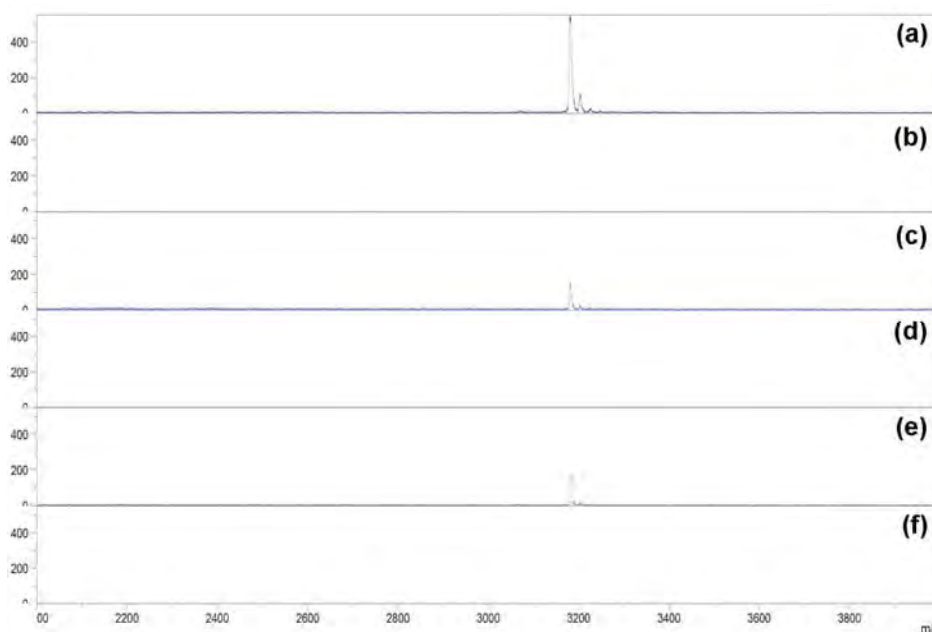
รูปที่ 1.19 เอสอีเอ็มไมโครกราฟของอนุภาคแอมฟิฟิลิกโคโพลิเมอร์ชนิดต่างๆ: (a) PgM, (b) HgM, (c) DgM, (d) QPgM, (e) QHgM, (f) QDgM, (g) PgH, (h) HgH และ (i) DgH

ตารางที่ 1.12 ขนาดของอนุภาคแอมฟิฟิลิกโคโพลิเมอร์ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค SEM และ PCS

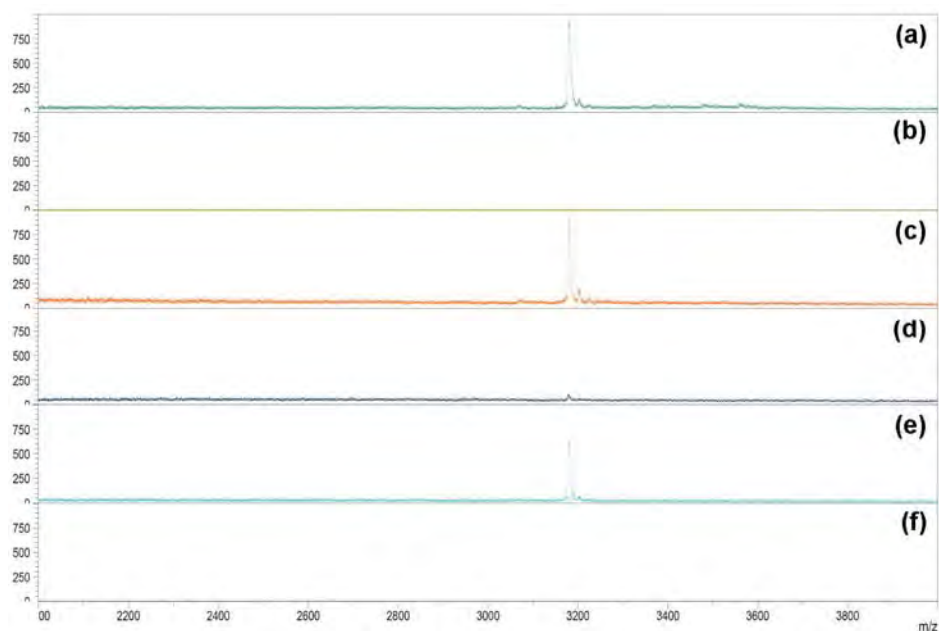
Particles	Size (μm)	
	SEM	PCS
PgM	0.11±0.03	2.24
HgM	0.14±0.03	2.67
DgM	0.25±0.05	2.89
QPgM	0.13±0.03	1.29
QHgM	0.17±0.05	1.78
QDgM	0.19±0.04	1.85
PgH	0.29±0.04	3.10
HgH	0.21±0.02	2.10
DgH	0.26±0.02	2.95

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ามีเพียงอนุภาคชนิดที่มีหมู่ชอบน้ำเป็น *N*-[(2-hydroxyl-3-trimethylammonium)propyl] (HTAP) และหมู่ไม่ชอบน้ำเป็นเฮกซิลและโดเดคซิลเท่านั้นที่แสดงประจุเป็นบวก โดยแทนด้วยสัญลักษณ์ของอนุภาคเป็น HgH และ DgH ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกทดสอบการใช้อนุภาค HgH เป็นตัวแลกเปลี่ยนไอออนในการวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอควบคู่กับพีเอ็นเอโพรบซึ่งในที่นี้เลือกศึกษากับระบบที่มีลำดับเบสไม่ซับซ้อนก่อนคือ พีเอ็นเอชนิด T9 และดีเอ็นเอชนิด A9 ทั้งนี้จะทำเปรียบเทียบกับอนุภาค PgH ซึ่งแสดงประจุเป็นลบ โดยอนุภาคชนิดนี้มีหมู่ชอบน้ำเป็น HTAP และหมู่ไม่ชอบน้ำชนิดทาโลลิล

จากการทดสอบพบว่าอนุภาคทั้งสองไม่เกิดการจับอย่างไม่จำเพาะเจาะจงกับพีเอ็นเอชนิด T9 จึงไม่ปรากฏสัญญาณของพีเอ็นเอชนิด T9 หลังจากวิเคราะห์ด้วยเทคนิคมัลติทอพแมสสเปกโตรเมทรี (รูปที่ 1.20b และ 1.21b) จากนั้นเมื่อทำการเติมดีเอ็นเอที่มีลำดับเบส A9 ซึ่งเป็นดีเอ็นเอคู่สมกับพีเอ็นเอชนิด T9 ซึ่งจากสมมติฐานที่ว่าเมื่อพีเอ็นเอและดีเอ็นเอมีลำดับเบสที่เป็นคู่สมเกิดการเข้าคู่อย่างสมบูรณ์แล้วนั้น อนุภาคควอเตอร์ไนซ์ไคโทซานซึ่งมีประจุบวกที่พื้นผิวจะสามารถจับกับประจุลบบนสายดีเอ็นเอคู่สมได้ และจะปรากฏสัญญาณของพีเอ็นเอชนิด T9 แต่จากการทดลองพบว่าไม่ปรากฏสัญญาณของพีเอ็นเอชนิด T9 บนอนุภาคชนิด PgH แต่จะพบสัญญาณต่ำมากในกรณีของอนุภาค HgH (รูปที่ 1.20d และ 1.21d) ในขณะที่ยังสามารถตรวจพบสัญญาณของพีเอ็นเอชนิด T9 ในสารละลายล้างอนุภาคทั้งในกรณีที่มีดีเอ็นเอคู่สม (รูปที่ 1.20c และ 1.21c) และดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสผิดไป 1 ตำแหน่ง แสดงว่ายังคงมีพีเอ็นเอในสารละลาย (รูปที่ 1.20e และ 1.21e) ข้อมูลในส่วนนี้แสดงให้เห็นว่าอนุภาคควอเตอร์ไนซ์ไคโทซานไม่สามารถจับกับดีเอ็นเอได้ จึงไม่สามารถทำหน้าที่เป็นตัวแลกเปลี่ยนแอนไอออนในการวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอได้ ทั้งนี้คาดว่าอาจเกิดจากการที่อนุภาคชนิด PgH มีส่วนไม่ชอบน้ำเป็นหมู่ทาโลลิลซึ่งจากผลการทดลองที่กล่าวมาข้างต้นพบว่าอนุภาคชนิดนี้มีประจุเป็นลบเนื่องจากการแทนที่ที่ตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซิลของไคโทซานทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นแอนไฮไดรด์แบบวงซึ่งไม่เสถียรและแตกออกเป็นหมู่คาร์บอกซิล (pK_a 4.4) ที่สามารถแตกตัวเป็นหมู่คาร์บอกซิเลตที่มีประจุเป็นลบ ส่งผลให้เกิดการผลักรันกับดีเอ็นเอที่มีประจุลบนั่นเอง ในขณะที่อนุภาคควอเตอร์ไนซ์ไคโทซานชนิด HgH ปรากฏสัญญาณเพียงเล็กน้อย คาดว่าอาจเป็นผลจากการที่อนุภาคดังกล่าวตกตะกอนกับเมทริกซ์คือ (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CCA) ใน 0.1% TFA ในสารละลาย acetonitrile/water (1:1)) ได้ไม่สมบูรณ์ จึงส่งผลให้ได้ประสิทธิภาพของการวิเคราะห์ต่ำนั่นเอง

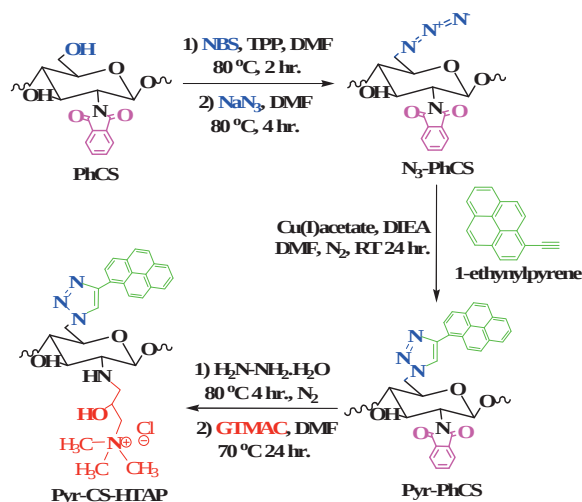


รูปที่ 1.20 แมสสเปกตรัมที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิคลิตโทฟแมสสเปกโตรเมทรีของอนุภาค PgH, PNA_T9, DNA_A9 (ดีเอ็นเอคู่สม) และ DNA_A4CA4 (ดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสผิดไป 1 ตำแหน่ง): (a) สารละลายล้างอนุภาคที่มีพีเอ็นเอแต่ปราศจากดีเอ็นเอคู่สม (control solution), (b) อนุภาคที่มีพีเอ็นเอแต่ปราศจากดีเอ็นเอคู่สม (control solid), (c) สารละลายล้างอนุภาคที่มีพีเอ็นเอและดีเอ็นเอคู่สม (PNA_T9+DNA_A9 solution), (d) อนุภาคที่มีพีเอ็นเอและดีเอ็นเอคู่สม (PNA_T9+DNA_A9 solid), (e) สารละลายล้างอนุภาคที่มีพีเอ็นเอและดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสผิดไป 1 ตำแหน่ง (PNA_T9+DNA_A4CA4 solution), (f) อนุภาคที่มีพีเอ็นเอและดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสผิดไป 1 ตำแหน่ง (PNA_T9+DNA_A4CA4 solid)



รูปที่ 1.21 แมสสเปกตรัมที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิคลิตโทฟแมสสเปกโตรเมทรีของอนุภาค HgH, PNA_T9, DNA_A9 (ดีเอ็นเอคู่สม) และ DNA_A4CA4 (ดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสผิดไป 1 ตำแหน่ง): (a) สารละลายล้างอนุภาคที่มีพีเอ็นเอแต่ปราศจากดีเอ็นเอคู่สม (control solution), (b) อนุภาคที่มีพีเอ็นเอแต่ปราศจากดีเอ็นเอคู่สม (control solid), (c) สารละลายล้างอนุภาคที่มีพีเอ็นเอและดีเอ็นเอคู่สม (PNA_T9+DNA_A9 solution), (d) อนุภาคที่มีพีเอ็นเอและดีเอ็นเอคู่สม (PNA_T9+DNA_A9 solid), (e) สารละลายล้างอนุภาคที่มีพีเอ็นเอและดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสผิดไป 1 ตำแหน่ง (PNA_T9+DNA_A4CA4 solution), (f) อนุภาคที่มีพีเอ็นเอและดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสผิดไป 1 ตำแหน่ง (PNA_T9+DNA_A4CA4 solid)

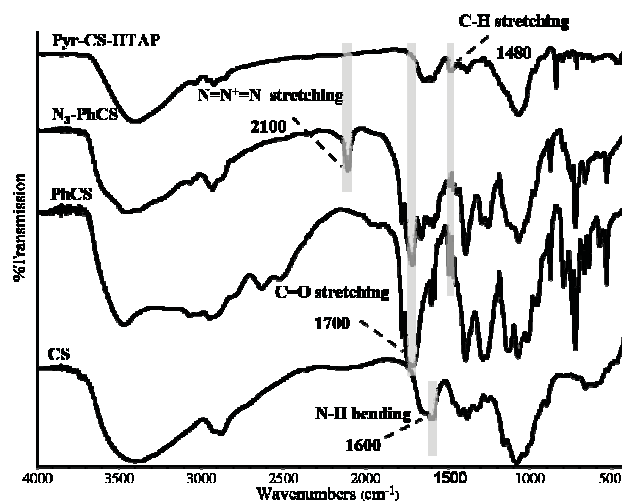
จากผลการทดลองข้างต้นพบว่าอนุภาคแอมฟิฟิลิกโคโทซานที่เตรียมได้ไม่มีประสิทธิภาพในการนำไปประยุกต์ใช้เป็นตัวแลกเปลี่ยนแอนไอออนสำหรับการตรวจลำดับเบสของดีเอ็นเอควบคู่กับพีเอ็นเอโพรบด้วยเทคนิคอัลติเพอแฟสสเปกโทรเมทรี แต่เพื่อเป็นการใช้ประโยชน์จากองค์ความรู้ที่ได้จากการศึกษาการเตรียมอนุภาคแอมฟิฟิลิกโคโทซานชนิดต่างๆ ที่กล่าวมาแล้ว คณะผู้วิจัยจึงเกิดแนวคิดที่จะนำอนุภาคที่เตรียมได้ไปประยุกต์ใช้กับงานวิจัยด้านอื่น เนื่องจากอนุภาคที่เตรียมได้โดยเฉพาะอย่างยิ่งชนิดที่มีหมู่ชอบน้ำเป็น HTAP มีประจุเป็นบวกและการที่แกนกลาง (core) ของอนุภาคเป็นหมู่ไม่ชอบน้ำ จึงอาจนำไปใช้เป็นวัสดุห่อหุ้มสารว่องไวทางชีวภาพ (bioactive compound) และนำส่งสารดังกล่าวเข้าสู่เซลล์เป้าหมายได้ ทั้งนี้คณะผู้วิจัยได้มีแนวคิดในการติดหมู่ฟังก์ชันที่เป็นสารเรืองแสงเพิ่มเติมเข้าไปที่อนุภาคแอมฟิฟิลิกโคโทซานที่มี HTAP เป็นหมู่ชอบน้ำเพื่อใช้ในการตรวจติดตามการนำเข้าสู่เซลล์เป้าหมาย ทั้งนี้ได้ออกแบบวิธีการเตรียมอนุภาคควอเตอร์ไนซ์โคโทซานที่ติดฉลากเรืองแสงแสดงรายละเอียดตามแผนภาพในรูปที่ 1.22 โดยอาศัยโครงสร้างโมเลกุลของสารเรืองแสงชนิดไพรีน (pyrene) เป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำ ซึ่งตรึงบนโซ่หลักของโคโทซานผ่านปฏิกิริยาคลิก (click reaction) โดยปฏิกิริยาคลิกที่สนใจนำมาใช้คือ ปฏิกิริยาการปิดวงของฮุสเกินที่ใช้โลหะคอปเปอร์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (copper-catalyzed Huisgen's 1,3-dipolar cycloaddition) ซึ่งในที่นี้จะเป็นการทำปฏิกิริยาระหว่างหมู่ไฮโดรอนโคโทซานและแอลไคโนที่ปลายของไพรีน ในที่นี้จะใช้อนุพันธ์ของโคโทซานที่มีหมู่ไม่ชอบน้ำ คือ phthaloyl เป็นสารตั้งต้นแล้วทำการดัดแปรหมู่ไฮดรอกซิลบนคาร์บอนตำแหน่งที่ 6 ของโคโทซานให้เป็นเอไซด์ ผ่านปฏิกิริยาโบรมิเนชัน (bromination) และ เอซิเดชัน (azidation) ตามลำดับ ซึ่งมีความเหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาคลิกกับสารเรืองแสงชนิดเอไคโนไพรีน (1-ethynylpyrene) หลังจากนั้นจะทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเพื่อกำจัดหมู่ phthaloyl และได้หมู่แอมิโนกลับคืนมาพร้อมที่จะทำปฏิกิริยาปิดวงของ GTMAC เพื่อให้ได้หมู่ควอเตอร์ไนซ์ชนิด HTAP ที่ผิวของอนุภาคหลังจากไดอะไลซิสในน้ำแล้ว



รูปที่ 1.22 สมการแสดงขั้นตอนการสังเคราะห์แอมฟิฟิลิกโคโทซานที่ติดฉลากเรืองแสง

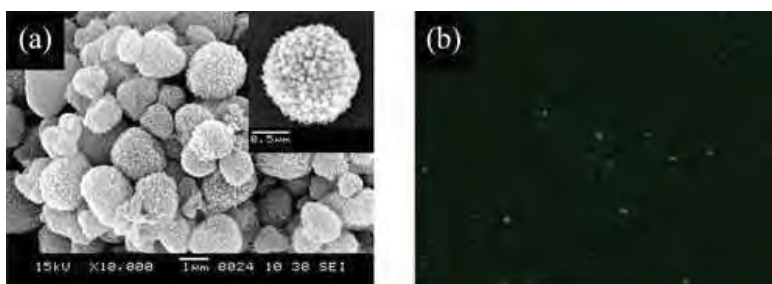
จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FT-IR ดังแสดงผลในรูปที่ 1.23 พบสัญญาณที่เป็นลักษณะเฉพาะของหมู่เอไซด์ในโครงสร้างของโคโทซานที่ติดหมู่ทาลอิลและดัดแปรให้มีหมู่เอไซด์ (N₃-PhCS) ที่เลขคลื่น 2100 cm⁻¹ โดยสัญญาณดังกล่าวจะหายไปหลังจากการทำปฏิกิริยาคลิกกับเอไคโนไพรีน ทำให้ได้อนุพันธ์ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงคือ Pyr-CS-HTAP การปรากฏของสัญญาณจาก C-H stretching ของหมู่ -N(CH₃)₃ ที่ 1480 cm⁻¹ และการหายไปของ C=O stretching ที่ตำแหน่ง 1700 cm⁻¹ ซึ่งพบในโคโทซานที่ติดหมู่ทาลอิล (PhCS) ในสเปกตรัม

ของ Pyr-CS-HTAP ช่วยยืนยันความสำเร็จของการติดหมู่ HTAP และความสมบูรณ์ของการกำจัดหมู่ทาลอิลตามลำดับ



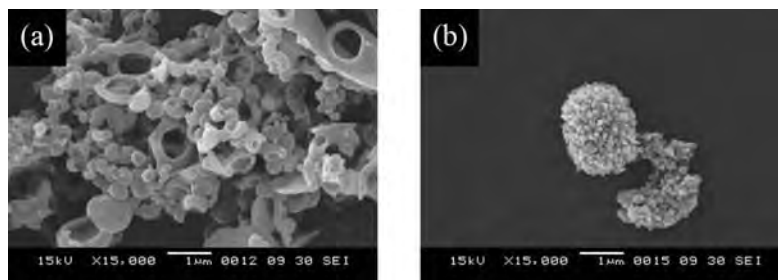
รูปที่ 1.23 เอฟทีไออาร์สเปกตรัมของ chitosan (CS), PhCS, N₃-PhCS และ Pyr-CS-HTAP

จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SEM พบว่าอนุภาคควอเทอร์ไนซ์ไคโทซานชนิด Pyr-CS-HTAP มีลักษณะคล้ายลูกแบล็คเบอร์รี่ (blackberry-like) มีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 1.17 ± 0.46 ไมโครเมตร (รูปที่ 1.24a) จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค photon correlation spectroscopy พบว่าอนุภาคมีประจุเป็นบวก มีค่า zeta-potential เท่ากับ +49.6 mV และพบการเรืองแสงสีเขียวเมื่อส่องผ่านกล้องฟลูออเรสเซนซ์ไมโครสโคป (รูปที่ 1.24b) แสดงว่ามีสารเรืองแสงอยู่ในอนุภาคจริง



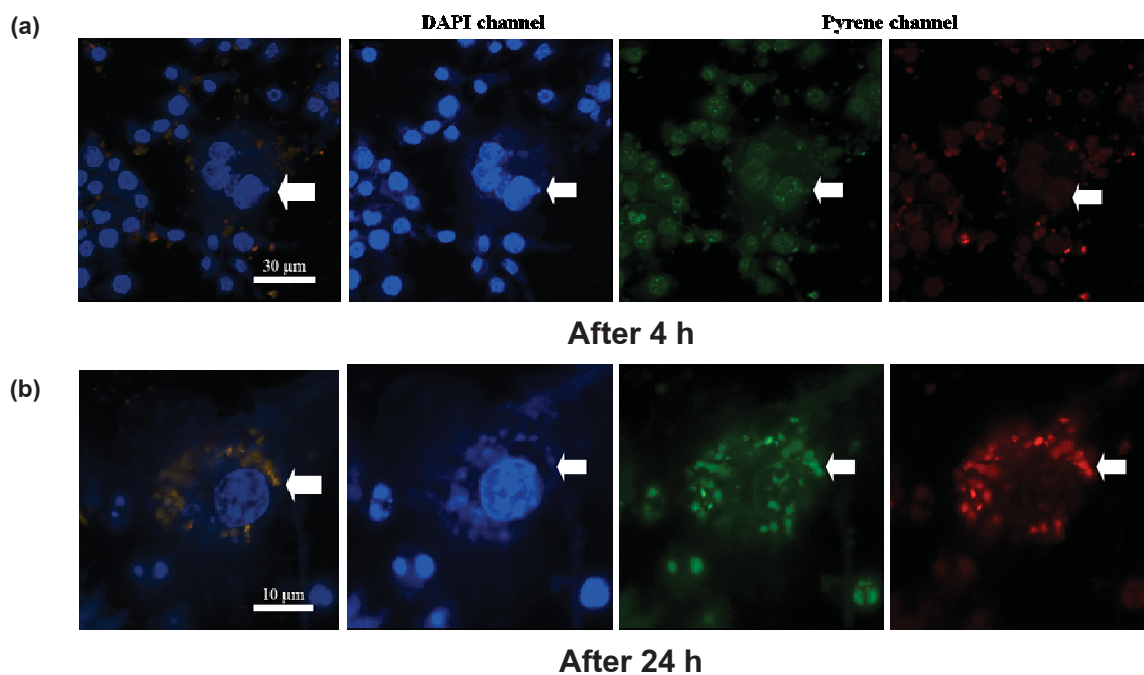
รูปที่ 1.24 เอสอีเอ็ม (a) และฟลูออเรสเซนซ์ (b) ไมโครกราฟของอนุภาค Pyr-CS-HTAP

นอกจากนี้ยังพบว่าอนุภาค Pyr-CS-HTAP มีเสถียรภาพดี ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาภายใต้การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในช่วง 0 ถึง 100°C และการเปลี่ยนแปลงพีเอชจาก 1 เป็น 4, 10 และ 12 จะเกิดการแตกออกของอนุภาคเมื่ออยู่ในตัวทำละลายไม่มีขั้ว เช่น เฮกเซน แต่ก็จะได้อนุภาคที่มีลักษณะคล้ายลูกแบล็คเบอร์รี่กลับคืนมาเมื่อกำจัดเฮกเซนและเติมน้ำแสดงให้เห็นว่าการประกอบตัวเองเป็นกระบวนการที่ผันกลับได้ ดังแสดงผลในรูปที่ 1.25

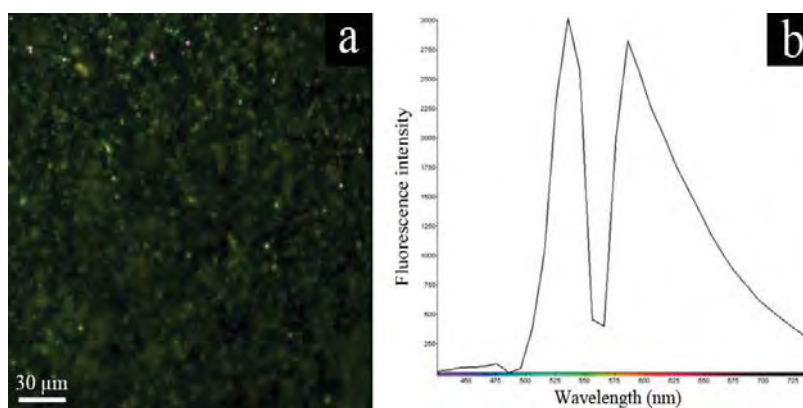


รูปที่ 1.25 เอสอีเอ็มไมโครกราฟของอนุภาค Pyr-CS-HTAP (a) หลังการเติมเฮกเซน และ (b) หลังการกำจัดเฮกเซน และเติมน้ำ

จากการทดสอบด้วย MTT assay พบว่าอนุภาค Pyr-CS-HTAP ไม่เป็นพิษต่อ mouse leukaemic monocyte macrophage cell line (RAW 264.7 cells) เซลล์ยังคงมีการเจริญเติบโตเป็นปกติในสภาวะที่มีความเข้มข้นสูงถึงประมาณ 10 $\mu\text{g/mL}$ จากนั้นจึงตรวจติดตามการเข้าสู่เซลล์ชนิดเดียวกันของอนุภาคด้วยเทคนิค confocal laser scanning microscopy (CLSM) ทั้งนี้จะทำการย้อมนิวเคลียสของเซลล์ด้วย DAPI ซึ่งมีสีน้ำเงินจากภาพในคอลัมน์แรกในรูปที่ 1.26a ซึ่งเป็นภาพถ่ายรวมหลังจากเติมอนุภาคเข้าไปในเซลล์เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จะสังเกตเห็นสีน้ำเงินเป็นหลักซึ่งแสดงขอบเขตที่เป็นนิวเคลียสของแต่ละเซลล์ เมื่อนำภาพดังกล่าวมาแยกเป็น DAPI channel และ pyrene channel จะเห็นการปรากฏสีเขียวซึ่งเป็นของไฟรีนบริเวณเดียวกันกับที่ปรากฏสีน้ำเงิน แสดงให้เห็นว่าอนุภาคสามารถเข้าไปอยู่ภายในนิวเคลียสของเซลล์ได้ อย่างไรก็ตามจะปรากฏจุดสีแดงซึ่งเป็นของไฟรีนเช่นกันอยู่ภายนอกนิวเคลียส ผลการทดลองปรากฏชัดมากขึ้นจากการใช้กำลังขยายสูงขึ้นหลังจากเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง (รูปที่ 1.26b) การปรากฏทั้งสีเขียวและแดงของไฟรีนดังแสดง emission spectrum ในรูปที่ 1.27 คาดว่าเป็นผลจากการรวมกลุ่มของอนุภาคซึ่งจะทำให้เกิดปรากฏการณ์ red shift ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยสันนิษฐานว่ามีเพียงอนุภาคที่มีขนาดเล็กซึ่งแสดงสีเขียวเท่านั้นที่สามารถเข้าสู่นิวเคลียสได้ ส่วนอนุภาคที่เกิดการรวมกลุ่มและมีขนาดใหญ่กว่าซึ่งปรากฏเป็นสีแดงจะไม่สามารถเข้าสู่นิวเคลียสได้ แต่จะอยู่ในบริเวณไซโตพลาสซึมของเซลล์ได้เท่านั้น



รูปที่ 1.26 Confocal fluorescence images ของอนุภาค Pyr-CS-HTAP และ RAW 264.7 cells หลังจากการผสมกันเป็นเวลา (a) 4 h และ (b) 8 h



รูปที่ 1.27 Confocal fluorescence image (a) และ emission spectrum (b) ของอนุภาค Pyr-CS-HTAP ที่เป็นของแข็ง Scale bar = 30 μm at magnification 100x.

สรุปผลการดำเนินงานวิจัย

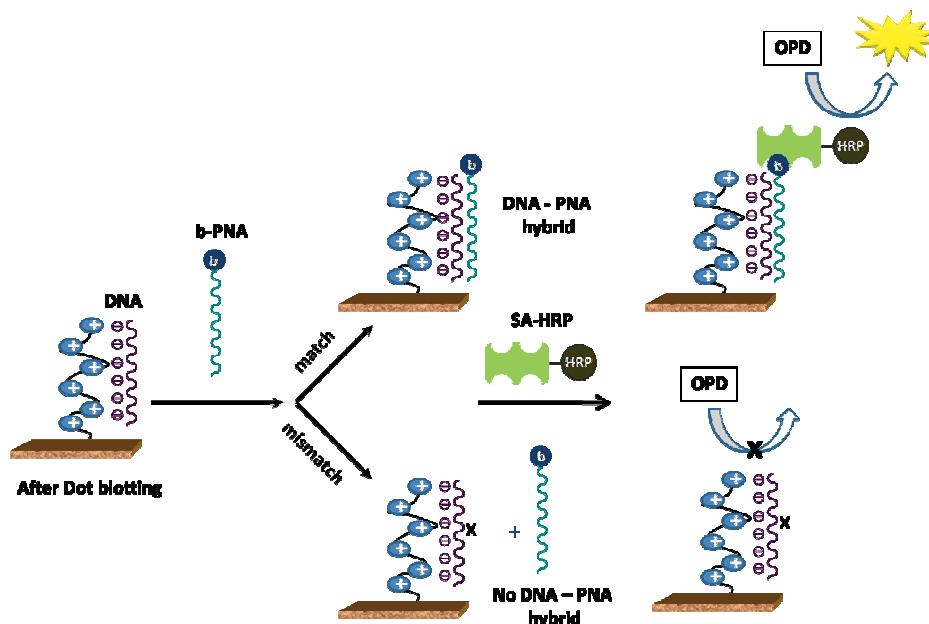
งานวิจัยที่ได้ดำเนินการศึกษาวิจัยในตอนต้นที่ 1 นี้แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้อนุภาคโคโพลิเมอร์ MC, TMC และ HTACC ร่วมกับโพรบที่เป็น acpc PNA ในการตรวจลำดับเบสของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสที่สัมพันธ์กับตำแหน่งที่แสดงความผิดปกติของยีนในผู้ป่วยโรคมะเร็ง ซึ่งมีความยาว 14 เมอร์ และมีเบสผสมได้ โดยอนุภาค MC และ TMC ให้ประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ที่ดีกล่าวคือ ให้สัญญาณของพีเอ็นเอที่สูงในกรณีที่เป็นโมเลกุลลูกผสมที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกัน และสามารถกำจัดแรงกระทำอย่างไม่จำเพาะเจาะจงของโมเลกุลลูกผสมที่มีลำดับเบสผิดไปหนึ่งตำแหน่งได้ หลังจากการล้างด้วยสารละลาย 20% formamide ใน 10 mM sodium phosphate buffer pH 7 และ น้ำ MilliQ

นอกจากนี้ยังสามารถเตรียมอนุภาคโคโทซานโดยการประกอบตัวเองของแอมฟิฟิลิกโคโทซานที่มีหมู่ไม่ชอบน้ำชนิดทาโลลิล เฮกซิล และโดเดคซิล และมีหมู่ชอบน้ำเป็น mPEG₅₀₀₀ และ HTAP ได้จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค ¹H NMR และ IR โดยสัดส่วนการแทนที่ของหมู่ทั้งสองประเภทแปรเปลี่ยนได้ตามอัตราส่วนโดยโมลของรีเอเจนต์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาแต่ละขั้นตอน ทั้งนี้พบว่าอนุภาคที่มี HTAP เป็นหมู่ชอบน้ำมีสัดส่วนของหมู่ควอเตอร์นารีแอมโมเนียมที่สูงกว่าอนุภาคที่มีหมู่ mPEG₅₀₀₀ เป็นหมู่ชอบน้ำ แอมฟิฟิลิกโคโทซานที่เตรียมได้มีค่า CMC อยู่ในช่วง 7.1-16.9 µg/mL และอนุภาคที่มี HTAP เป็นหมู่ชอบน้ำจะมีค่า CMC ต่ำกว่าอนุภาคที่มีหมู่ชอบน้ำเป็น mPEG₅₀₀₀ ในกรณีที่มีหมู่ไม่ชอบน้ำชนิดเดียวกัน จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SEM พบว่าอนุภาคแอมฟิฟิลิกโคโทซานทุกชนิดมีลักษณะเป็นทรงกลม มีเส้นผ่าศูนย์กลางอยู่ในช่วง 0.11 ถึง 0.29 และพบว่ามีเพียงอนุภาคชนิดที่มีหมู่ชอบน้ำเป็น HTAP และหมู่ไม่ชอบน้ำเป็นเฮกซิลและโดเดคซิลเท่านั้นที่แสดงประจุเป็นบวก จากการนำอนุภาคที่มีประจุบวกไปทดสอบพบว่าไม่มีประสิทธิภาพในการนำไปประยุกต์ใช้เป็นตัวแลกเปลี่ยนแอนไอออนสำหรับการตรวจลำดับเบสของดีเอ็นเอควบคู่กับพีเอ็นเอโพรบด้วยเทคนิคมัลติทอพแมสสเปกโตรเมทรี อย่างไรก็ตามคณะผู้วิจัยได้ต่อยอดองค์ความรู้ที่ได้จากการศึกษาที่ผ่านมาไปใช้ในการเตรียมอนุภาคแอมฟิฟิลิกโคโทซานที่ติดฉลากเรืองแสงของไฟรีน ซึ่งให้ผลการทดลองที่น่าสนใจกล่าวคือ อนุภาคที่เตรียมได้มีลักษณะคล้ายลูกแบล็คเบอร์รี่ สามารถเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ มีประจุเป็นบวก และมีเสถียรภาพดี จากการศึกษาสมบัติการตอบสนองทางชีวภาพเบื้องต้นกับ mouse leukemic monocyte macrophage cell line (RAW 264.7 cells) พบว่าอนุภาคไม่เป็นพิษต่อเซลล์ และสามารถนำเข้าสู่นิวเคลียสของเซลล์ แสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการนำไปประยุกต์ใช้เป็นพาหะในการนำส่งสารสำคัญทางชีวภาพ (bioactive carrier) เข้าสู่เซลล์หรือใช้ติดตามกระบวนการที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ (bioimaging) ได้ต่อไป

ตอนที่ 2 การตรวจลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยใช้กระดาษกรองที่ตรึงด้วยพอลิเมอร์รีซที่มีประจุบวก ร่วมกับเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิดอาศัยหลักการของ “Dot Blotting”

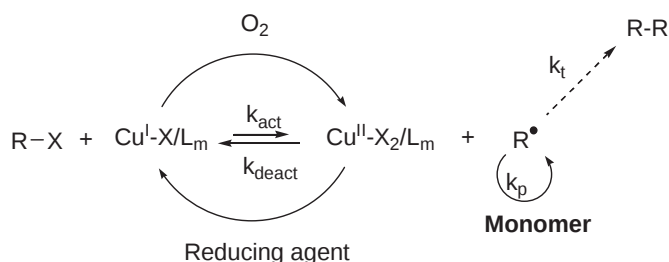
สำหรับงานวิจัยในตอนที 2 ได้รับแนวคิดมาจากวิธีการวิเคราะห์สารชีวโมเลกุลที่นิยมใช้ทางชีวเคมีและพันธุศาสตร์ที่เรียกว่า “Dot Blot” ซึ่งอาศัยการหยด (blotting) ดีเอ็นเอที่ต้องการวิเคราะห์ในลักษณะที่เป็นจุด (dot) ลงบนแผ่นเมมเบรนที่มีประจุเป็นบวกซึ่งทำจากแผ่นกระดาษหรือไนลอน จากนั้นจึงนำไปจับยึดกับดีเอ็นเอโพรบ (ในงานวิจัยนี้ใช้ acpc PNA เป็นโพรบ) ซึ่งส่วนใหญ่จะมีการติดฉลากด้วยสารที่สามารถให้สัญญาณในการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคต่าง ๆ ได้ เนื่องจากสามารถหยดสารตัวอย่างหลายชนิดเป็นจุดลงบนแผ่นเมมเบรนเดียวกันได้ ทำให้กระบวนการ “Dot Blot” นี้สามารถพัฒนาไปสู่การตรวจวิเคราะห์ในรูปแบบที่มีประสิทธิภาพสูงได้โดยง่ายจากการที่ทางคณะผู้วิจัยมีประสบการณ์ในการจัดเตรียมพื้นผิววัสดุด้วยการตรึงพอลิเมอร์รีซผ่านการริเริ่มปฏิกิริยาพอลิเมไรเซชันจากพื้นผิว จึงมีแนวคิดที่จะใช้วิธีการดังกล่าวในการเตรียมแผ่นกระดาษสำหรับการทำ “Dot Blot” โดยการเลือกพอลิเมอร์ที่มีประจุบวก คือ ควอเทอไรซ์พอลิ(2-ไดเมทิลอะมีโน)เอทิลเมทาคริเลต หรือ quaternized poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate) (QPDMAEMA) ซึ่งสามารถจับยึดกับดีเอ็นเอผ่านแรงกระทำระหว่างประจุได้ การนำเอาปฏิกิริยาพอลิเมไรเซชันแบบอมตะมาใช้ในการเตรียมพอลิเมอร์รีซทำให้สามารถควบคุมความหนาแน่นของประจุบวกที่ขึ้นกับความยาวของโซ่พอลิเมอร์ที่ตรึงบนพื้นผิวรวมทั้งความชอบน้ำ (hydrophilicity) ของแผ่นกระดาษ ที่เป็นปัจจัยสำคัญในการกำหนดประสิทธิภาพในการจับยึดกับดีเอ็นเอ รวมทั้งความสามารถในการป้องกันการดูดซับอย่างไม่จำเพาะเจาะจง (nonspecific adsorption) ขององค์ประกอบอื่นที่อาจปนมากับดีเอ็นเอโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่สกัดมาจากสารตัวอย่างจริง ที่อาจจะไม่ได้ผ่านขั้นตอนการแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีหรืออิเล็กโตรโฟรีซิสก่อนนำมาวิเคราะห์

ปฏิกิริยาพอลิเมไรเซชันที่เลือกนำมาใช้ในงานวิจัยนี้คือ Activator Regenerated by Electron Transfer-Atom Transfer Radical Polymerization (ARGET ATRP) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาพอลิเมไรเซชันที่มีกลไกเป็นแบบอมตะ สามารถเกิดขึ้นได้ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน โดยมีการเติมตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นสารประกอบประเภทคอปเปอร์ซึ่งมีราคาไม่แพง ทำให้การสังเคราะห์ทำได้สะดวกและไม่ยุ่งยาก สำหรับการวิเคราะห์นั้นคณะผู้วิจัยเลือกใช้การตรวจวัดการจับยึดระหว่างดีเอ็นเอและพีเอ็นเอโพรบจากการสังเกตสีด้วยตาเปล่าที่ทำให้เกิดได้โดยอาศัยเอนไซม์ ซึ่งในที่นี้จะใช้ สเตรปาวิดินที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์เฮกซามาร์เฟส (HRP-labeled streptavidin) หรือ SA-HRP ร่วมกับพีเอ็นเอโพรบที่มีไบโอติน (biotinylated PNA probe) หรือ b-PNA และสับสเตรท o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) และ Urea hydrogen peroxide (Urea-H₂O₂) หลักการในการวิเคราะห์แสดงดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 แผนภาพแสดงแนวทางในการวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอด้วย acpc PNA และการทำให้เกิดสีด้วย เอนไซม์

จากแนวทางการวิเคราะห์ที่แสดงในรูปที่ 2.1 ขั้นตอนแรกที่ต้องดำเนินการคือ การตรึงพอลิเมอร์รัซที่มีประจุบวกคือ ควอเทอร์ไนซ์พอลิ(2-ไดเมทิลอะมิโน)เอทิลเมทาคริเลต หรือ quarternized poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate) (PQDMAEMA) ลงบนกระดาษกรอง โดยก่อนที่จะทำการตรึงพอลิเมอร์ดังกล่าวจำเป็นต้องศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันของมอนอเมอร์คือ -dimethylamino) ethyl methacrylate (DMAEMA) ในสารละลายก่อน ปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันที่ใช้ในงานวิจัยคือ Activator Regenerated by Electron Transfer-Atom Transfer Radical Polymerization (ARGET ATRP) ซึ่งมีกลไกแสดงดังรูปที่ 2.2 ปฏิกิริยา ARGET ATRP ได้รับการพัฒนามาจากปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันแบบ ATRP ซึ่งระบบริเริ่มปฏิกิริยาประกอบด้วยสารประกอบเฮไลต์และโลหะแทรนซิชันทำหน้าที่เป็นพาหะให้กับอะตอมของธาตุแฮโลเจนในปฏิกิริยารีดอกซ์ กลไกดังกล่าวทำให้ปลายโซ่พอลิเมอร์ที่เกิดขึ้นเสถียรในรูปของสารประกอบแอลคิลเฮไลต์ แต่ว่องไวพอที่จะเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์กับโลหะแทรนซิชัน โดยโลหะแทรนซิชันที่นิยมใช้มากที่สุดคือ คอปเปอร์ ในปฏิกิริยาแบบ ARGET ATRP จะมีการเติมตัวรีดิวซ์ เช่น tin(II) 2-ethylhexanoate ($\text{Sn}(\text{EH})_2$) กลูโคส หรือกรดแอสคอบิก เพื่อทำหน้าที่เปลี่ยนตัวเร่งปฏิกิริยาที่ไม่ว่องไวคือ $\text{Cu}(\text{II})$ ให้กลายเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่ว่องไวคือ $\text{Cu}(\text{I})$ ซึ่งจะก่อให้เกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากสามารถนำ $\text{Cu}(\text{II})$ มาใช้ได้ใหม่ ทำให้ไม่จำเป็นต้องใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาในปริมาณมาก นอกจากนี้ยังไม่จำเป็นต้องทำปฏิกิริยาในระบบที่ปราศจากออกซิเจน เนื่องจากตัวรีดิวซ์ที่เติมลงไปนอกจากจะทำหน้าที่เปลี่ยน $\text{Cu}(\text{II})$ เป็น $\text{Cu}(\text{I})$ แล้ว ยังสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับออกซิเจนในอากาศ จึงเป็นการกำจัดออกซิเจนที่มีอยู่ในระบบได้ ทำให้ปฏิกิริยาทำได้ง่ายและสะดวกมากยิ่งขึ้น



รูปที่ 2.2 กลไกการเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันแบบ ARGET ATRP

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันจำเป็นต้องศึกษาผลของตัวแปรสำคัญที่มีต่อการควบคุมน้ำหนักโมเลกุลและการกระจายน้ำหนักโมเลกุล (polydispersity; PDI) ของพอลิเมอร์ ได้แก่ เวลาในการทำปฏิกิริยา ปริมาณของตัวรีดิวซ์ ซึ่งในที่นี้ใช้ $\text{Sn}(\text{EH})_2$ และ อัตราส่วนระหว่างมอนอเมอร์ต่อตัวรีดิวซ์เริ่มปฏิกิริยาที่เป็นสารประกอบแอลคิลเฮไลต์ ซึ่งในที่นี้คือ DMAEMA:ethyl 2-bromoisobutyrate (EBIB) ลิแกนด์ที่ใช้ในปฏิกิริยาคือ $\text{tris}[2\text{-(dimethylamino)ethyl}]\text{amine}$ (Me_6TREN)

ตารางที่ 2.1 แสดงน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์จาก DMAEMA โดยใช้แอซีโตนเป็นตัวทำละลาย จากการทดลองพบว่าอัตราส่วน $\text{Sn}(\text{EH})_2\text{:CuBr}_2\text{:EBIB:Me}_6\text{TREN} = 2.4\text{:0.006:1:0.25}$ ใน entry ที่ 3 ให้น้ำหนักโมเลกุลที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค gel permeation chromatography (GPC) ที่ใกล้เคียงค่าน้ำหนักโมเลกุลเป้าหมายทางทฤษฎี (M_n , theo) มากที่สุด และให้การกระจายน้ำหนักโมเลกุลหรือ PDI ($\text{PDI} = M_w/M_n$) ที่แคบและมีค่าเข้าใกล้ 1 แสดงให้เห็นถึงความเป็นอมตะของปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชัน

ตารางที่ 2.1 M_n , %conversion และ PDI ของพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้โดยการปรับเปลี่ยนปริมาณตัวรีดิวซ์

entry	Mole ratio					% conv.	M_n , theo	M_n , GPC	PDI
	DMAEMA	EBIB	CuBr_2	Me_6TREN	$\text{Sn}(\text{EH})_2$				
1	200	1	0.006	0.25	1.5	72	22,608	21,670	1.38
2	200	1	0.006	0.25	2.0	99	31,086	28,295	1.27
3	200	1	0.006	0.25	2.4	90	28,260	28,495	1.28
4	200	1	0.006	0.25	4.0	90	28,260	23,983	1.35

หมายเหตุ: %conversion คำนวณได้จากการวิเคราะห์ปริมาณ DMAEMA ที่เหลือหลังจากหยุดปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันด้วยเทคนิค ^1H NMR

จากการศึกษาผลของเวลาในการทำปฏิกิริยาพบว่า การทำปฏิกิริยา 20 ชั่วโมงจะให้ผลการทดลองที่ดีที่สุดสำหรับอัตราส่วน DMAEMA:EBIB เป็น 200:1 ซึ่งได้ %conversion = 90% ปฏิกิริยายังเกิดไม่สมบูรณ์หากใช้เวลาสั้นกว่า 20 ชั่วโมง สังเกตได้จากการที่น้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ยังมีค่าสูงไม่ถึงน้ำหนักโมเลกุลเป้าหมายตามทฤษฎี ในขณะที่การทำปฏิกิริยานานกว่า 20 ชั่วโมง จะส่งผลให้ค่า PDI มีค่าสูงขึ้นแสดงถึงการกระจายน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ที่กว้างขึ้น นอกจากนี้คณะผู้วิจัยได้ลองปรับเปลี่ยนชนิดของตัวรีดิวซ์เป็นกรดแอสคอบิกด้วย แต่ผลปรากฏว่าปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันเกิดเร็วเกินไป จึงสูญเสียความเป็นอมตะและ

ความสามารถในการควบคุมน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ ส่งผลให้น้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ที่ได้สูงกว่าน้ำหนักโมเลกุลเป้าหมายตามทฤษฎีมาก และได้ค่า PDI ที่สูงตามไปด้วย

เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการควบคุมน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ คณะผู้วิจัยได้ทดลองปรับเปลี่ยนอัตราส่วน DMAEMA:EBIB ให้เป็น 100:1, 200:1 และ 400:1 ซึ่งจะได้จำนวนหน่วยซ้ำของมอนอเมอร์เป้าหมาย (targeted degree of polymerization; DP_{Target}) เป็น 100, 200 และ 400 จากผลการทดลองที่แสดงในตารางที่ 2.2 พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ที่วิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค GPC มีค่าสอดคล้องกับน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ที่คาดว่าจะได้ตามทฤษฎี นอกจากนี้ยังได้ค่า PDI ที่แคบ แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการควบคุมน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ให้มีความยาวตามต้องการได้ เป็นที่สังเกตเห็นได้ว่าการทำปฏิกิริยาแบบ ARGET ATRP นี้ จำเป็นต้องควบคุมไม่ให้ปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันมี %conversion สูงจนเกินไป โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อมีการใช้ DMAEMA:EBIB ในอัตราส่วนที่สูง เนื่องจากจะมีผลในการลดความเป็นอมตะของปฏิกิริยา ทั้งนี้สามารถควบคุม %conversion ได้จากการควบคุมเวลาในการทำปฏิกิริยา

ตารางที่ 2.2 M_n , %conversion และ PDI ของพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้โดยการปรับเปลี่ยน DMAEMA:EBIB

Entry	DP_{Target}	% conversion	M_n , theo	M_n , GPC	PDI
1	100	85	13,345	21,010	1.24
2	200	90	28,260	28,495	1.28
3	400	69	43,332	42,650	1.18

ในการตรึงพอลิเมอร์บนพื้นผิวของ quaternized poly(2-(dimethylaminoethyl) methacrylate) (QPDMAEMA) บนพื้นผิวกระดาษกรองประกอบด้วยขั้นตอนสำคัญ 3 ขั้นตอน แสดงดังรูปที่ 2.3 ในขั้นแรกเป็นการตรึงหมู่รีเริ่มปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันบนกระดาษกรอง Whatman 1 ที่ตัดให้มีขนาด $3.5 \times 8 \text{ cm}^2$ ผ่านการทำปฏิกิริยากับสารประกอบ 2-bromoisobutryl bromide โดยมีไดคลอโรมีเทนเป็นตัวทำละลาย และ triethylamine, DMAP เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จากการติดตามการเกิดปฏิกิริยาด้วยการวัดมุมสัมผัสของน้ำพบว่า พื้นผิวของกระดาษกรองมีมุมสัมผัสน้ำสูงสุดคือ $130.21 \pm 1.37^\circ$ และเท่ากันทั่วทั้งแผ่น เมื่อใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 16 ชั่วโมง แสดงว่าปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์แล้ว โดยค่ามุมสัมผัสของน้ำที่มากกว่า 90° แสดงให้เห็นว่าสามารถตรึงหมู่ 2-bromoisobutryl ซึ่งเป็นหมู่ไม่ชอบน้ำบนพื้นผิวกระดาษกรองได้