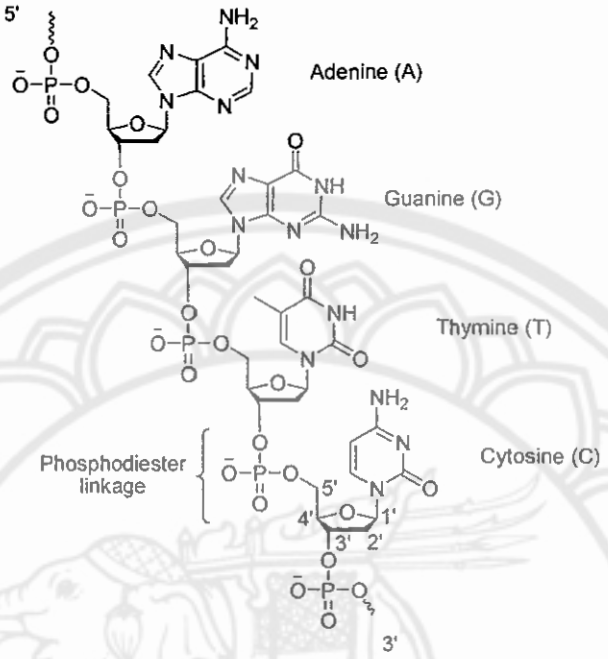
บทที่ 2

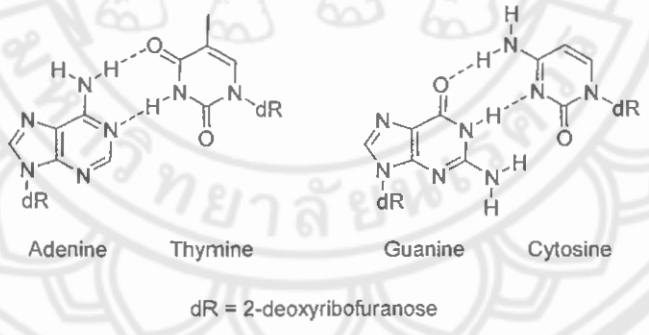
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับดีเอ็นเอ (Deoxyribonucleic acid, DNA)

ดีเอ็นเอ (DNA) หรือกรดดีออกซิไรโบนิวคลีอิก (Deoxyribonucleic acid) เป็นสารพันธุกรรมทำหน้าที่เป็นพิมพ์เขียวสำหรับการสังเคราะห์ mRNA และโปรตีน [10] ประกอบด้วยหน่วยที่ซ้ำ ๆ กันของนิวคลีโอไทด์ ซึ่งแต่ละหน่วยประกอบด้วย หน่วยน้ำตาล เบส และหมู่ฟอสเฟต (ซึ่งประกอบด้วย ฟอสฟอรัส และ ออกซิเจน) ในสัดส่วนเท่า ๆ กัน (1:1:1) โดยเบสบนดีเอ็นเอจะต่ออยู่กับน้ำตาลดีออกซีไรโบสที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1' (C – 1') โดยมีหมู่ฟอสเฟตเป็นตัวเชื่อมระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 3' (C – 3') ของน้ำตาลโมเลกุลหนึ่งกับคาร์บอนตำแหน่งที่ 5' (C – 5') ของน้ำตาลโมเลกุลที่อยู่ถัดไปด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ (Phosphodiester linkage) [11] สายโพลีนิวคลีโอไทด์ที่เกิดขึ้นมีทิศทางปลายข้างหนึ่งเป็น 5' ปลายอีกข้างหนึ่งเป็นปลาย 3' แสดงในภาพ 8 โดยที่ข้อมูลทางพันธุกรรมจะขึ้นอยู่กับลำดับของเบสที่เชื่อมต่อด้วยพันธะ *N*-glycosidic ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ของน้ำตาลดีออกซีไรโบส ซึ่งเบสใน ดีเอ็นเอมีอยู่ 2 กลุ่มคือ พิวรีน ที่ประกอบด้วยเบสอะดีนีน กับกัวนีน และพิริมิดีน เบสคือ ไซโทซีน กับไทมีน โครงสร้างของดีเอ็นเอประกอบขึ้นจากสายชุดโพลีนิวคลีโอไทด์สองสายที่มาเข้าคู่กันเป็นเกลียวคล้ายขดลวดเรียกว่า ฮีลิกซ์ (Helix) มีลักษณะเป็นเกลียวคู่เวียนขวา และมีทิศทางสวนทางกัน (Antiparallel) โดยมีหน่วยน้ำตาลและหมู่ฟอสเฟตเป็นแกนของเกลียว (DNA backbone) และมีเบสอยู่ภายในเกลียว โดยมีระนาบของเบสทำมุมตั้งฉากกับแกนของเกลียวมีลักษณะเหมือนราวบันไดวนกับขั้นบันได แต่ละรอบเกลียวจะประกอบด้วยเบส 10 คู่ ยาว 34 อังสตรอม (A^{o}) เกลียวคู่ของดีเอ็นเอถูกยึดด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างเบสคู่สม (Complementary base) โดยเบสอะดีนีนจับคู่กับไทมีน (A:T) ด้วยพันธะไฮโดรเจน 2 พันธะ และเบสไซโทซีนจับคู่กับกัวนีนด้วยพันธะไฮโดรเจน 3 พันธะ แสดงในภาพ 9 นอกจากนี้ยังมีแรงที่เกิดขึ้นจากแรงไฮโดรโฟบิก (Hydrophobic interaction) ระหว่างเบสที่ซ้อนอยู่ในสายเดียวกัน (Stacking bases) ช่วยยึดโครงสร้างเกลียวคู่ให้มีความเสถียร การเรียงตัวของเบส 4 ชนิด ในรูปแบบต่าง ๆ กัน ทำให้ดีเอ็นเอเป็นแหล่งเก็บข้อมูลที่แตกต่างกันได้เป็นจำนวนมาก ตัวอย่างเช่น สายดีเอ็นเอที่ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ 1,000 หน่วย จะมีการเรียงตัวให้ข้อมูลที่แตกต่างกันได้ถึง 4^{1000} แบบ ข้อมูลที่แตกต่างกันและบรรจุอยู่ในโมเลกุลดีเอ็นเอเป็นตัวกำหนดคุณสมบัติที่สำคัญของสิ่งมีชีวิต ในการที่จะควบคุมกิจกรรมต่าง ๆ ของเซลล์ และควบคุมลักษณะของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ



ภาพ 8 โครงสร้างทางเคมีของ DNA



ภาพ 9 พันธะไฮโดรเจนระหว่าง A:T และ G:C

พันธะไฮโดรเจนของนิวคลีโอไทด์เป็นอันตรกิริยาที่มีความสำคัญต่อความเสถียรของโครงสร้างแบบดูเพล็กซ (Duplex structure) และการจับคู่เบสที่เฉพาะเจาะจง โดยพลังงานของพันธะไฮโดรเจนอยู่ในช่วงจาก 0.5-1.8 kcal/mol ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสิ่งแวดล้อมของโมเลกุล [12] และยังมีกลุ่มนักวิจัยศึกษาเกี่ยวกับอิทธิพลของพันธะไฮโดรเจนที่มีแรงอ่อนมีผลอย่างไรต่อการสนับสนุนการเกิดความเสถียรของโครงสร้างแบบดูเพล็กซ [13], [14], [15] อย่างไรก็ตาม การเกิดของพันธะไฮโดรเจนเพียงอย่างเดียวไม่สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงค่าพลังงานอิสระ (ΔG) ของ

การเกิดไฮบริไดเซชันและความเสถียรของโครงสร้างแบบดูเพล็กซได้ โดยพบว่า DNA สายเดียว (Single strand) สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับโมเลกุลของน้ำและในการเปลี่ยนเป็นโครงสร้างแบบดูเพล็กซ เบสของ DNA สายเดียวจะเกิดการสลายพันธะไฮโดรเจนกับโมเลกุลของน้ำก่อนและเกิดพันธะไฮโดรเจนกับเบสคู่สม ดังนั้นผลต่างของค่าเอนทาลปีที่เป็นลบในการเกิดโครงสร้างแบบดูเพล็กซ ซึ่งเป็นโครงสร้างที่เสถียรกว่าน่าจะมีผลมาจากการเกิด stacking ของเบส มากกว่าอิทธิพลของการเกิดพันธะไฮโดรเจน

การ stacking เป็นการเกิดอันตรกิริยาระหว่าง เบส-เบส ในดีเอ็นเอซึ่งเกิดขึ้นในแนวตั้งฉากกับแกนที่เกิดเป็นเกลียวของสายดีเอ็นเอ แต่ไม่เหมือนกับพันธะไฮโดรเจนที่อันตรกิริยาของการเกิด stacking มีความซับซ้อนและเข้าใจยาก ดั้งนั้น อันตรกิริยาอย่างน้อย 4 ชนิดที่สนับสนุนต่อการเกิด stacking ซึ่งประกอบด้วย อันตรกิริยาทางประจุไฟฟ้า (Dipole-dipole และ dipole-induced dipole) อิทธิพลการกระจายแรง (Van der Waals) การเคลื่อนย้ายประจุ (Charge transfer) และอิทธิพลของโซลโวโฟบิค (Solvophobic effect)

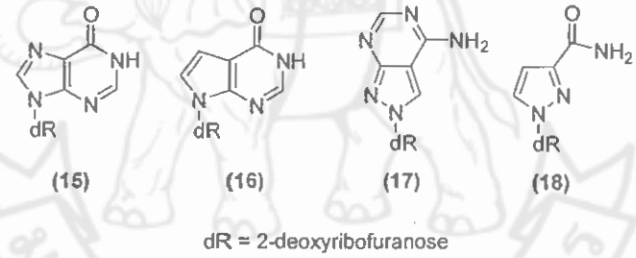
ยูนิเวอร์ซอลเบส (Universal base)

ยูนิเวอร์ซอลเบส เป็นสารที่สังเคราะห์ขึ้นเลียนแบบโครงสร้างโมเลกุลของเบสในดีเอ็นเอที่แสดงคุณสมบัติที่แสดงความไม่เฉพาะเจาะจงในการเข้าคู่กับเบสในธรรมชาติทั้ง 4 ชนิด [16], [17], [18] (A, G, C และ T) เนื่องจากยูนิเวอร์ซอลเบสแสดงให้เห็นถึงความผิดปกติการเรียงลำดับเบสของดีเอ็นเอได้ จึงสามารถนำมาใช้กับตำแหน่งที่ไม่แน่ชัดของเบสได้ในการใช้เป็นไพรเมอร์ (Primer) ในเทคนิค PCR และตัวตรวจวัดไฮบริดเซชัน (Hybridization probes) [19], [20], [21], [22], [23], [24] ยูนิเวอร์ซอลเบสที่ดีควรจะไม่ทำให้เกิดการเสียสภาพของ โครงสร้างแบบดูเพล็กซ หรือเกิดการเสียสภาพน้อยที่สุด เมื่อนำมาเข้าคู่ตรงข้ามกับไนโตรเจนเบสทั้ง 4 ชนิด การแสดงลักษณะเฉพาะของการเป็นยูนิเวอร์ซอลเบสสามารถทำได้โดยการศึกษา thermal denaturation ของ โครงสร้างแบบดูเพล็กซ ระหว่างสายโอลิโกเมอร์ของดีเอ็นเอ หรือ PNA ที่ประกอบด้วยยูนิเวอร์ซอลเบสกับสายที่ประกอบด้วยไนโตรเจนเบสในธรรมชาติทั้ง 4 ชนิด จะทำให้ทราบค่า melting temperature ของ โครงสร้างแบบดูเพล็กซ และนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่า T_m สูงสุด และค่าต่ำสุดของ โครงสร้างแบบดูเพล็กซ ทั้ง 4 ชนิด (ΔT_m) ค่า ΔT_m ที่ได้สามารถบอกความไม่เฉพาะเจาะจงในการเกิดการเข้าคู่ของเบสของยูนิเวอร์ซอลเบสได้ โดยที่ค่า ΔT_m น้อยแสดงถึงคุณสมบัติของการเป็นยูนิเวอร์ซอลเบสที่ดี

1. **ชนิดของการออกแบบยูนิเวอร์ซอลเบส**

1.1 แบบการเกิดพันธะไฮโดรเจน (Hydrogen bonding)

การออกแบบยูนิเวอร์ซอลเบสในกลุ่มนี้เป็นการปรับปรุงและเลียนแบบโครงสร้างของไนโตรเจนเบสในธรรมชาติ ให้ยังคงมีรูปแบบของตำแหน่งที่สามารถการเกิดพันธะไฮโดรเจนอยู่ ในโมเลกุล ตัวอย่างของยูนิเวอร์ซอลเบสกลุ่มนี้ แสดงในภาพ 10 เช่น 2'-Deoxyinosine (Hypoxanthine) (15) [25] ซึ่งออกแบบโครงสร้างโมเลกุลแตกต่างจากเบสกัวนีนตรงที่ไม่มีกลุ่มของเอมีนที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ส่วน 7-Deaza-2'-deoxyinosine (16) ขาดกลุ่มเอมีนซึ่งเป็นเฮเทอโรอะตอมในส่วนอะโรมาติก [26] 8-Aza-7-deaza-inosine (17) เป็นเบสที่มีความคล้ายกับเบสอะดีนีน และ Pyrazole-3-carboxamide (18) ซึ่งมีการออกแบบโครงสร้างที่แตกต่างจากไนโตรเจนเบสตรงที่มีตำแหน่งที่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนได้หลายตำแหน่งของพันธะ glycosidic ที่ทำหน้าที่ให้ และรับไฮโดรเจนในการเกิดพันธะไฮโดรเจน [27]



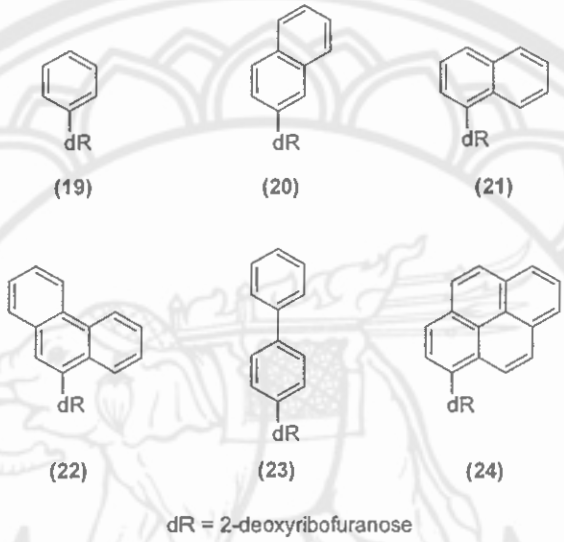
ภาพ 10 ยูนิเวอร์ซอลเบสแบบการเกิดพันธะไฮโดรเจน

1.2 แบบไม่เกิดพันธะไฮโดรเจน (Non-hydrogen bonding)

1.2.2 กลุ่มอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Aromatic hydrocarbon)

ยูนิเวอร์ซอลเบสประเภทนี้จะเป็นการแทนที่ตำแหน่งไนโตรเจนเบสด้วยหมู่ที่ขาดตำแหน่งการเกิดพันธะไฮโดรเจน โดยแทนที่ไนโตรเจนเบสด้วยกลุ่มอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนอย่างง่าย แสดงในภาพ 11 ตัวอย่างเช่น การใช้สารกลุ่มฟีนิล (19) ซึ่งได้รับการยอมรับในการใช้ใน 2 ทศวรรษที่ผ่านมา [28] สารประกอบกลุ่มฟีนิลนี้จะเป็นการออกแบบให้มีความไม่จำเพาะในการเข้าคู่กับเบส แต่อย่างไรก็ดีเมื่อนำโครงสร้างดังกล่าวมารวมกับ DNA โอลิโกเมอร์ พบว่ามักทำให้เกิดความไม่เสถียรอย่างมากในการเกิดโครงสร้างแบบดูเพล็กซ ซึ่งอาจเนื่องมาจากโครงสร้างดังกล่าวมีความสามารถในการ stacking ค่อนข้างต่ำ สารไฮโดรคาร์บอนชนิดอื่น ๆ ที่เพิ่มพื้นที่ในการเกิดการ stacking จึงถูกนำมาใช้เป็นยูนิเวอร์ซอลเบส เช่น Biphenyl

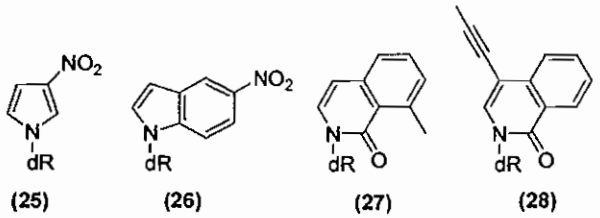
(23) [29] , α/β-Naphthalene (20, 21), Phenanthrene (22) หรือ Pyrene (24) นำมาใช้ร่วมกับดีเอ็นเอ [30], [31] โดยที่สารอะโรมาติกเหล่านี้ถูกนำมาศึกษาการเกิดเบส stacking พร้อมกับศึกษาภาวะที่ให้แตกเฉพาะที่ของ DNA base stacking โดยใช้เอนไซม์ DNA-methyltranferase, DNA-glycosylases และ Endonucleases [29]



ภาพ 11 อะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนยูนิเวอร์ซอลเบส

1.2.3 เฮเทอโรไซเคิล (Heterocycle)

ยูนิเวอร์ซอลเบสกลุ่มนี้เป็นการนำสารเฮเทอโรไซเคิลมาแทนที่ไนโตรเจนเบส เพื่อจุดประสงค์ของการหาโมเลกุลที่สามารถเข้าคู่กับไนโตรเจนเบสทั้ง 4 ชนิดอย่างไม่จำเพาะเจาะจง ตัวอย่างการทดลองในกลุ่มนี้ประกอบด้วย 3-Nitropyrrole (25) [32], [33], [34] 5-Nitroindole (26) [34], [35], C_3-Methylisocarbostril (MICS) (27) และ Propynyl-isocarbosylril (PICS) (28) [36] แสดงในภาพ 12 จากการศึกษา 3-Nitropyrrole พบว่าค่าความไม่เสถียรในการเข้าคู่เบสที่ผิดพลาดในการเกิดโครงสร้างแบบดูเพล็กซอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ของ และมีความไม่เสถียรเพิ่มมากขึ้นเมื่อเกิดแบบไตรเพล็กซ (Triplex) [37] จากการศึกษาของ 5-Nitroindole พบว่ามีความเสถียรมากกว่าของ 3-Nitropyrrole เมื่อนำมาวางในตำแหน่งที่ตรงข้ามกับไนโตรเจนเบสทั้ง 4 ชนิด ส่วนเบส C_3-Methylisocarbostyril และ Propynyl-isocarbostyril [38] นำมาทดสอบความเป็นยูนิเวอร์ซอลเบสแต่ไม่มีชนิดใดที่ส่งผลต่อความเสถียร แต่สามารถนำไปร่วมกับ Tag polymerase ได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง และมีความจำเพาะเจาะจงกับไนโตรเจนเบส



dR = 2-deoxyribofuranose

ภาพ 12 อะโรมาติกเฮเทอโรไซเคิลยูนิเวอร์ซอลเบส

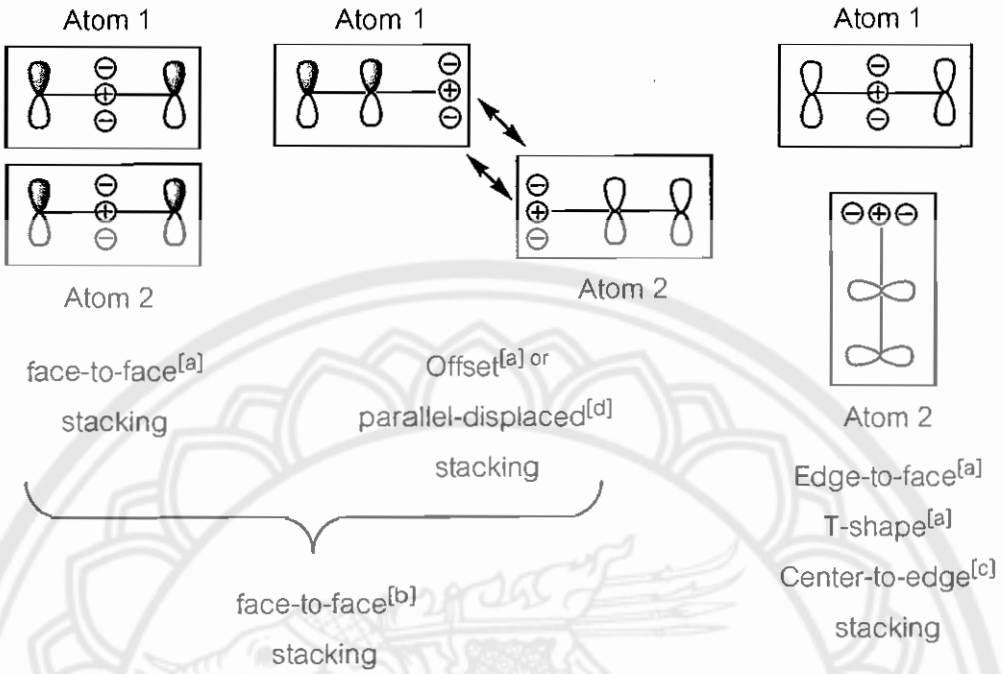
2. **ปัจจัยที่ส่งผลต่อการเป็นยูนิเวอร์ซอลเบส**

ปัจจัยที่สนับสนุนต่อความเสถียรของ DNA โครงสร้างแบบดูเพล็กซ มีอยู่ 2 ปัจจัย คือ การเกิดการเข้าคู่ด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างเบสคู่สม และการเกิด stacking [39] โดยการพัฒนายูนิเวอร์ซอลเบสให้ความสนใจเกี่ยวกับการเกิดเบส stacking [40] มากกว่าการเกิดพันธะไฮโดรเจน เนื่องจากยูนิเวอร์ซอลเบสแบบการเกิดพันธะไฮโดรเจนจะต้องออกแบบให้มีตำแหน่งที่เป็นผู้ให้และรับอะตอมของไฮโดรเจน [40] ซึ่งยากต่อการออกแบบและการหาโมเลกุลที่เป็นยูนิเวอร์ซอลเบสที่ดี

เบส stacking เป็นการวางตัวแบบที่ซิดกันแบบ face-to-face ของสองโมเลกุลของสารอะโรมาติก อิทธิพลที่สนับสนุนการเกิด stacking ของเบสในดีเอ็นเอ จึงประกอบด้วย

การกระจายแรงของแรง Van der Waals (แบบ Dipole-induced dipole และ Induced-dipole-induced dipole attraction) ช่วยให้เกิด stacking มีความเสถียรขึ้น โดยอาศัยคุณสมบัติความมีขั้วของโครงสร้างเบส ขนาด รูปร่าง และการมีพื้นที่ผิวที่แบนขนาดใหญ่ในดีเอ็นเอ ทำให้มีพื้นที่สัมผัสในการเกิดอันตรกิริยาระหว่างเบสได้ดี [41]

อิทธิพลของประจุทางไฟฟ้า (Electrostatic effect) เป็นการเกิดอันตรกิริยาระหว่างคู่ไดโพลของเบส แสดงในภาพ 13 โดยมีลักษณะการอันตรกิริยาของความหนาแน่นของไพอิเล็คตรอน (π-electron) ของวงอะโรมาติกด้านบนและด้านล่างของระนาบของสารอะโรมาติก [42] โดยวงของอะโรมาติกจะวางตัวเป็นแบบแซนวิชระหว่างความหนาแน่นของประจุลบของไพอิเล็คตรอน ของทั้งสองโมเลกุล ซึ่งจะส่งผลต่อความเสถียรในการเกิด stacking



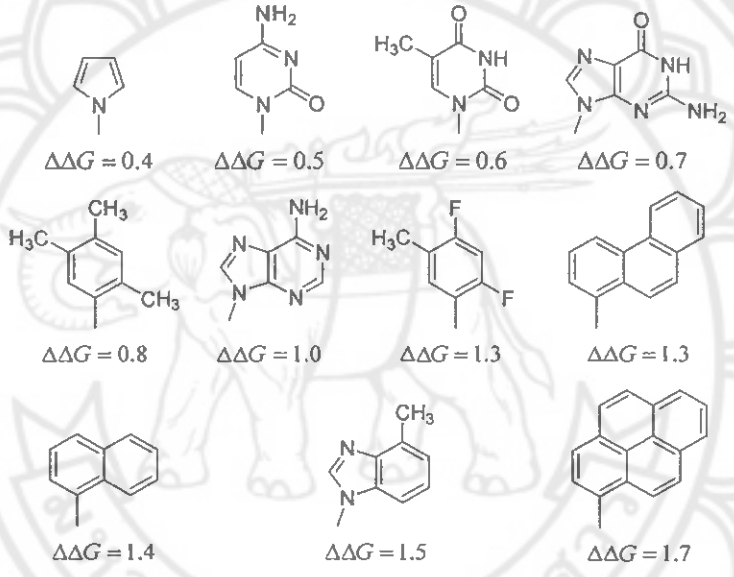
ภาพ 13 อันตรกิริยาทางประจุไฟฟ้าใน face-to-face stacking geometry, offset stacking geometry หรือ edge to-face stacking geometry. [a] ตั้งชื่อโดย Hunter [b] ตั้งชื่อโดย Kool [c] ตั้งชื่อโดย Siegel [d] ตั้งชื่อโดย Diederich

อิทธิพลของ solvation เป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเกิด stacking ของเบสอีกปัจจัยหนึ่ง โดยอาศัยพื้นที่ของ pi-surface ของโมเลกุลของอะโรมาติก ซึ่งเป็นสารไม่มีขั้วสามารถเกิดการ stacking ด้วยสารละลายที่มีขั้ว เช่น น้ำ หรือสารที่ทำให้เบสเกิด pi-surface

การศึกษาอิทธิพลของประจุทางไฟฟ้า ต่อการเกิด stacking ได้ถูกยอมรับว่าเป็นแนวทางที่ดีสำหรับการค้นคว้าวิจัย ที่เป็นเช่นนี้เพราะว่าการศึกษาอิทธิพลของประจุทางไฟฟ้าสามารถพิจารณาได้โดยการออกแบบทางคอมพิวเตอร์ [41] จากค่าเฉลี่ยของประจุทางไฟฟ้าที่ได้เป็นค่าประจุไฟฟ้าที่ถาวรซึ่งจะมีอิทธิพลต่อความเสถียรในการเกิดเข้าคู่เบสและโครงสร้างของเบส **อย่างมีนัยสำคัญ โดยผลที่ได้นี้สามารถนำไปใช้อธิบายได้ว่าทำไมประสิทธิภาพในการเกิด stacking ของดีเอ็นเอเบสจึงขึ้นอยู่กับตำแหน่งของเบสข้างเคียง อย่างไรก็ตาม ค่าเฉลี่ยของอิทธิพลของประจุทางไฟฟ้าที่ได้นั้นมีผลต่อการช่วยเหลือน้อยมากใน** random DNA **ดั้งนั้นอาจกล่าวได้ว่าอิทธิพลทางประจุไฟฟ้าทำให้เกิดความเสถียรหรือความเสื่อมเฉพาะส่วนของการเกิดอันตรกิริยาของการเกิด stacking อย่างไรก็ตาม ในงานวิจัยส่วนมากต้องการที่จะหาค่าอิทธิพลประจุทางไฟฟ้า**

ของการเปลี่ยนแปลงค่า dipole magnitudes ที่เปรียบเทียบกันและการจัดเรียงตัวของอะตอมโมเลกุลของดีเอ็นเอเบส และ non natural base

ในปัจจุบันได้มีการศึกษาดีเอ็นเอเบสและ non natural base analogs 14 ชนิด ซึ่งเป็นการศึกษาความสัมพันธ์ของการเกิด stacking (stacking free energy) กับลักษณะของโมเลกุล [43] แสดงในภาพ 14 จากการศึกษาในสภาวะตัวทำละลาย เพื่อเปรียบเทียบการเกิด stacking ของดีเอ็นเอเบสกับสารประกอบอะโรมาติกที่ไม่มีขั้ว พบว่า สารประกอบอะโรมาติกที่ไม่มีขั้วที่มีขนาดใหญ่เกิดการ stacking ดีกว่าดีเอ็นเอเบส



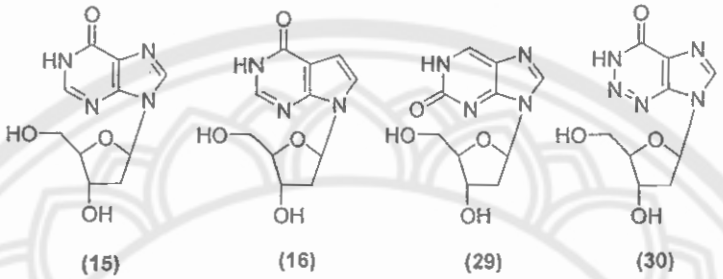
ภาพ 14 stacking free energy, ΔΔG (kcal/mol) ของเบสในธรรมชาติ และสารอะโรมาติกใน DNA โครงสร้างแบบดูเพล็กซสายสั้น ที่มี C-G base pair ที่ตำแหน่งปลาย

การสังเคราะห์และศึกษาคุณสมบัติของยูนิเวอร์ซอลเบส

การศึกษายูนิเวอร์ซอลเบสเริ่มทำการศึกษาในโครงสร้าง DNA โอลิโกเมอร์ (DNA oligomer) โดยออกแบบให้มีโครงสร้างที่สามารถเกิดการเข้าคู่กับเบสพิริมิดีน (T กับ C) หรือ พิวรีน (A กับ G) แต่การศึกษาและออกแบบที่แสดงสมบัติการเป็นยูนิเวอร์ซอลเบสมีเพียง 2-3 การศึกษาเท่านั้น

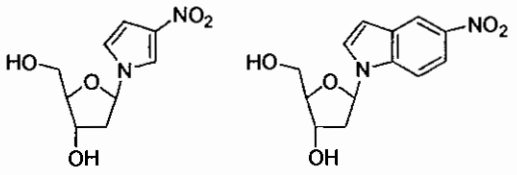
ในปี ค.ศ. 1985 Ohtsuka และคณะ [25] ได้ทำการสังเคราะห์และศึกษาคุณสมบัติการเป็นยูนิเวอร์ซอลเบสของอนุพันธ์ของ Hypoxanthine แสดงในภาพ 15 ซึ่งสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับไนโตรเจนเบสทั้ง 4 ชนิดได้ โดยที่เมื่อนำ 2'-Deoxyinosine มาสังเคราะห์ร่วมใน

โครงสร้างแบบดูเพล็กซที่มีจำนวนเบส 12 เมอร์ ในตำแหน่งตรงข้ามกับไนโตรเจนเบสทั้ง 4 ชนิด พบว่าค่า ΔT_m เท่ากับ 15 °C จากผลที่ได้ทำให้ Hypoxanthine ยังมีการเลือกเข้าคู่กับไนโตรเจนเบสในธรรมชาติทั้ง 4 ชนิด



ภาพ 15 อนุพันธ์ของ 2'-Deoxyinosine [25]

ปี ค.ศ. 1993 Bergstrom และคณะ [44] ได้ทำการออกแบบและสังเคราะห์ 3-Nitropyrrole (25) แสดงในภาพ 16 ซึ่งมีคุณสมบัติที่ดีในการเกิด base stacking จากการที่มีหมู่ไนโตรอยู่สามารถเพิ่มค่าการเกิด stacking โดยอาศัยการเกิด polarization ของระบบไพอะโรมาติกของวง Pyrrole และได้ทำการศึกษาคุณสมบัติการเป็นยูนิเวอร์ซอลเบสดังกล่าว โดยนำมาศึกษาใน โครงสร้างแบบดูเพล็กซที่มีจำนวนเบส 15 เมอร์ ในตำแหน่งตรงข้ามกับไนโตรเจนเบสทั้ง 4 ชนิด โดย 3-Nitropyrrole แสดงความสามารถในการเกิดเข้าคู่กับเบสในธรรมชาติทั้ง 4 ชนิดได้เกือบไม่มีความเฉพาะเจาะจง โดยมีค่า ΔT_m เท่ากับ 3 °C แต่ค่า binding affinity ยังต่ำอยู่ โดยที่ค่าความเสื่อมของโครงสร้างแบบดูเพล็กซมีค่าลดลงจาก DNA โครงสร้างแบบดูเพล็กซ ที่ไม่มีการปรับปรุง (T_m = 57 °C) ประมาณ 11-14 °C นอกจาก 3-Nitropyrrole แล้ว ในปี ค.ศ. 1994 Loakes และคณะ [35] ได้ออกแบบและสังเคราะห์ 5-Nitroindole (26) แสดงในภาพ 16 โดยขนาดของวงอะโรมาติกของ 5-Nitroindole จะมีขนาดใหญ่กว่า 3-Nitropyrrole ผลจากการศึกษาพบว่า 5-Nitroindole มีความสามารถในการเกิดการเข้าคู่กับเบสในธรรมชาติทั้ง 4 ชนิด ได้เกือบไม่มีความเฉพาะเจาะจงได้ใกล้เคียงกับ 3-Nitropyrrole โดยค่า ΔT_m เท่ากับ 3 °C แต่ค่าความเสื่อมของโครงสร้างแบบดูเพล็กซมีค่าน้อยกว่า 3-Nitropyrrole โดยลดลงจาก DNA โครงสร้างแบบดูเพล็กซที่ไม่มีการปรับปรุง (T_m = 72 °C) เพียง 5 °C

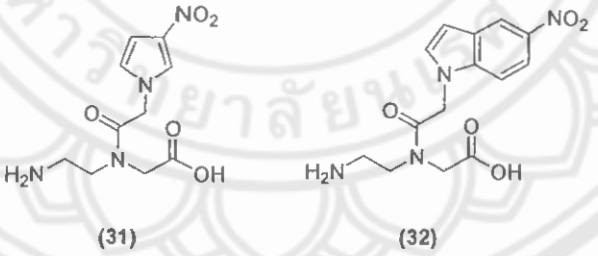


(25) (26)

ภาพ 16 3-Nitropyrrole (25) และ 5-Nitroindole DNA โมโนเมอร์ (26) [44], [35]

ในปัจจุบัน PNA ถูกนำมาใช้ในการศึกษายูนิเวอร์ซอลเบส โดยที่ PNA มีคุณสมบัติที่ดีกว่าดีเอ็นเอหลายประการ เช่น ความทนต่อเอนไซม์ และความง่ายในการสังเคราะห์ PNA universal base monomer [45], [46] ในการศึกษาทั่วไปมักจะนำเอายูนิเวอร์ซอลเบสที่มีการศึกษาใน DNA โอลิโกเมอร์ มาทำการศึกษาต่อใน PNA โอลิโกเมอร์

โดยในปี ค.ศ. 1999 Challa และคณะ [47] ได้นำ 3-Nitropyrrole (31) และ 5-Nitroindole (32) ซึ่งเป็นยูนิเวอร์ซอลเบสที่ศึกษาใน DNA โอลิโกเมอร์ มาศึกษาใน PNA โอลิโกเมอร์ แสดงในภาพ 17 โดยความสามารถในการเกิดเข้าคู่เบสของสารทั้งสองชนิดให้ค่าที่ใกล้เคียงกัน (ΔT_m ของ 5-Nitroindole =1.3 °C และ ΔT_m ของ 3-Nitropyrrole = 1.5 °C) แต่พบว่า 5-Nitroindole จะมีความเสถียรมากกว่า 3-Nitropyrrole

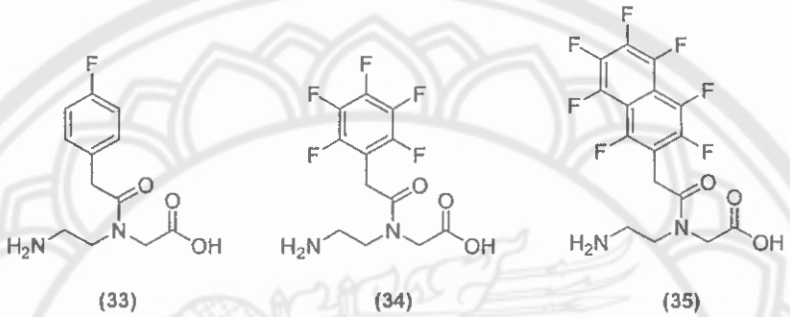


(31) (32)

ภาพ 17 3-Nitropyrrole (31) และ 5-Nitroindole PNA โมโนเมอร์ (32) [47]

ในปี ค.ศ. 2002 Woski และ คณะ [48] ทำการศึกษาคุณสมบัติการเป็นยูนิเวอร์ซอลเบสของกลุ่ม fluroaromatic residue ประกอบด้วย 4-Fluorophenyl (4-FPh) (33), pentafluoro-phenyl (PFP) (34) และ β-Heptafluoronaphthalene (β-HFN) (35) แสดงในภาพ 18 มาศึกษาใน PNA โอลิโกเมอร์ ซึ่งสารกลุ่มนี้มีโครงสร้างที่เกิดการ stacking แบบ face-to-face ได้ดี จากการศึกษาการเป็นยูนิเวอร์ซอลเบสของ 4-Fluorophenyl และ Pentafluorophenyl พบว่ามี

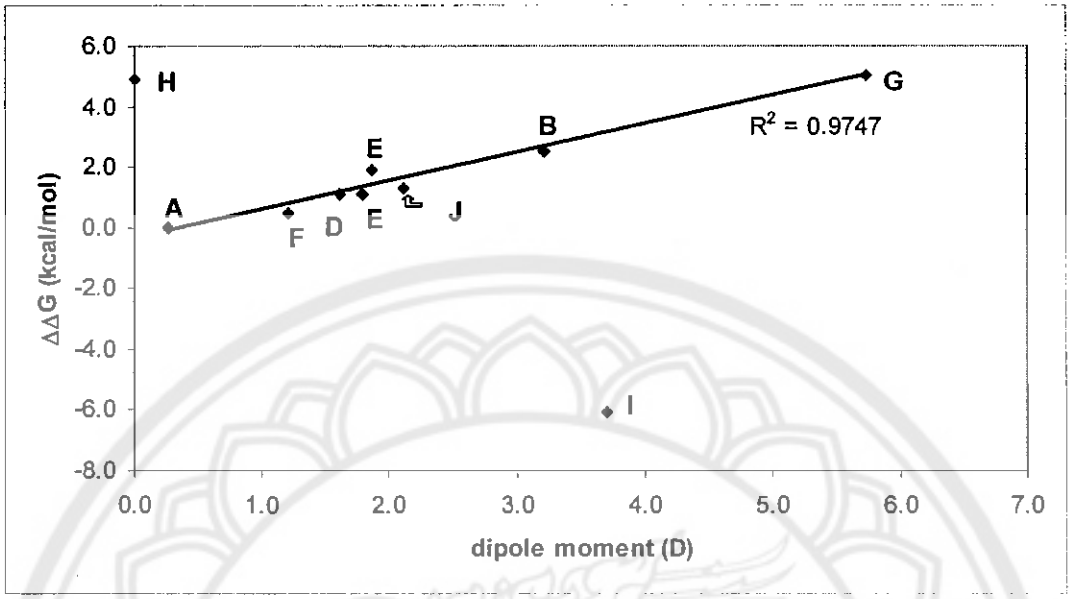
คุณสมบัติที่ใกล้เคียงกัน (ΔT_m = 1.8 °C) และ β-Heptafluoronaphthalene มีโครงสร้างที่ขนาดใหญ่ขึ้นมีความเป็นยูนิเวอร์ซอลเบสที่ดีกว่าทั้งสองชนิด (ΔT_m = 1.3 °C) จากการศึกษา fluroaromatic residue มีความเฉพาะเจาะจงในการเข้าคู่กับเบสทั้ง 4 ชนิดอยู่ แต่ β-Heptafluoronaphthalene มีแนวโน้มที่สามารถศึกษาและพัฒนาการเป็นยูนิเวอร์ซอลเบสที่ดีได้



(33) (34) (35)

ภาพ 18 4-Fluorophenyl (4-FPh) (33), Pentafluorophenyl (PFP) (34) และ β-Heptafluoronaphthalene (β-HFN) residue (35) [48]

นอกจากนี้ในปี ค.ศ. 2003 Wichai [49] ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ของค่าไดโพลโมเมนต์ของอนุพันธ์ phenyl กับค่าการ stacking energy จากการศึกษาพบว่าสารประกอบอะโรมาติกที่มีค่าไดโพลโมเมนต์มีผลต่อค่าการ stacking ของสาร โดยสารประกอบที่มีค่าไดโพลโมเมนต์สูงจะส่งผลให้ค่าการ stacking สูงตามไปด้วย แสดงในภาพ 19 เช่น สารประกอบ 4-Nitrophenyl มีค่าไดโพลโมเมนต์สูง (5.73 D) แสดงค่า $\Delta\Delta G$ ที่สูง และในขณะที่สารประกอบ phenyl ที่มีค่าไดโพลโมเมนต์ต่ำ (0.263 D) แสดงค่า $\Delta\Delta G$ ที่ต่ำลงตามไปด้วย ดังนั้นสารอะโรมาติกที่มีค่าไดโพลโมเมนต์สูงจะส่งผลให้ความสามารถในการเกิดโครงสร้างแบบดูเพล็กซของ DNA:PNA ที่มีความเสถียรมากขึ้นถึงแม้ว่าโครงสร้างจะเป็นไม่เป็นเบสคู่สม (Non-complementary base) ก็ตาม

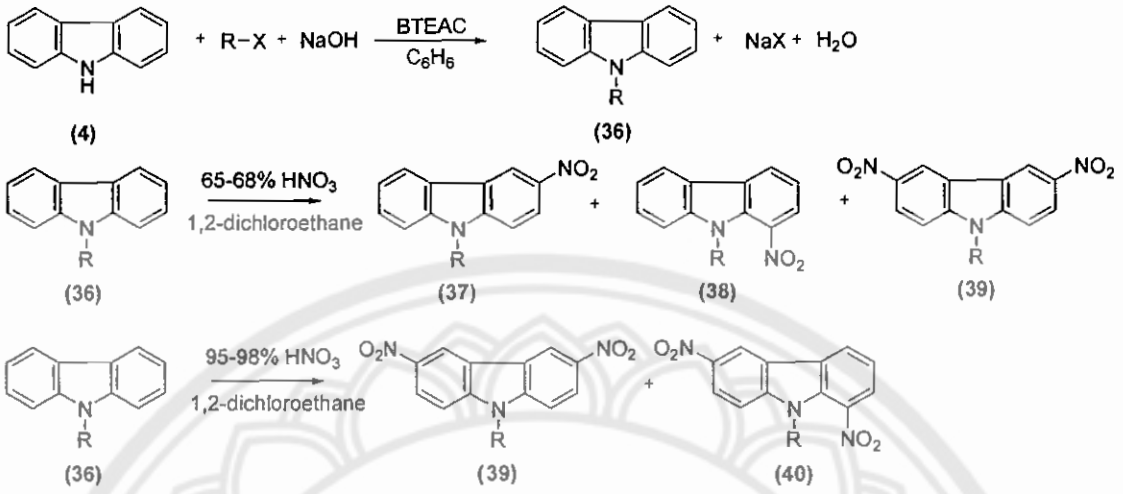


ภาพ 19 ผลของไดโพลโมเมนต์ที่มีต่อความเสถียรของการ modified base (A = Phenyl, B = 4-Acetophenone, C = 4-Bromophenyl, D = 4-Chlorophenyl, E = 4-Fluorophenyl, F = 4-Methoxyphenyl, G = 4-Nitrophenyl, H = 4-Tolyl, I = 4-Trifluoromethyl phenyl, J = Pentafluorophenyl [49]

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ในกลุ่มคาร์บาโซล

คาร์บาโซลเป็นสารประกอบอะโรมาติกที่เป็นส่วนประกอบสำคัญของน้ำมันที่สกัดได้จากถ่านหิน และได้มีการนำมาศึกษาอย่างแพร่หลายในด้านต่าง ๆ เช่น สีสังเคราะห์ สารเคมีทางการเกษตร เภสัชกรรม สารลดแรงตึงผิว และพอลิเมอร์ชนิดต่าง ๆ [50]

ในปี 1995 Shufen และคณะ [50] ทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ Nitrocarbazole เพื่อศึกษาอิทธิพลของรีเอเจนต์ และสภาวะของปฏิกิริยาว่ามีผลอย่างไรต่ออัตราส่วนของไอโซเมอร์และปริมาณของผลิตภัณฑ์ โดยทำปฏิกิริยาอัลคิลเลชันของคาร์บาโซลภายใต้สภาวะของ phase transfer ได้ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่สูงในระยะเวลาอันสั้น จากนั้นทำปฏิกิริยาไนเตรชันในสารละลาย 1,2-Dichloroethane ด้วย 65-68% HNO_3 และ 95-98% HNO_3 ได้ผลิตภัณฑ์ของอนุพันธ์ 3-Nitrocarbazole และ 3,6-Nitrocarbazole แสดงในภาพ 20 โดยปริมาณของผลผลิตขึ้นอยู่กับหมู่แทนที่ที่ตำแหน่งไนโตรเจนอะตอมของคาร์บาโซลขึ้นอยู่กับอุณหภูมิในการเติมกรด 95-98% HNO_3 ที่ใช้เป็นรีเอเจนต์ แสดงในตารางที่ 1 และ 2



ภาพ 20 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ Nitrocarbazole [50]

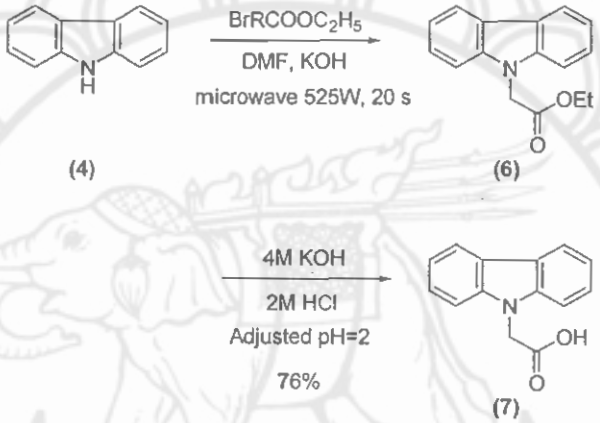
ตาราง 1 ผลการสังเคราะห์ของ 3-Nitrocarbazole (37)

R	T (°C)	t (h)	Yield (%)	Content (%)		
				(37)	(38)	(39)
CH_3	10	1.0	92.4	85.9	5.1	9.0
C_2H_5	10	1.5	92.6	90.0	3.6	6.4
n-C_4H_9	10	2.0	96.7	94.4	3.1	2.5
$CH_2C_6H_5$	10	2.5	97.4	97.4	2.3	0.3

ตาราง 2 ผลการสังเคราะห์ของ 3,6-Dinitrocarbazole (39)

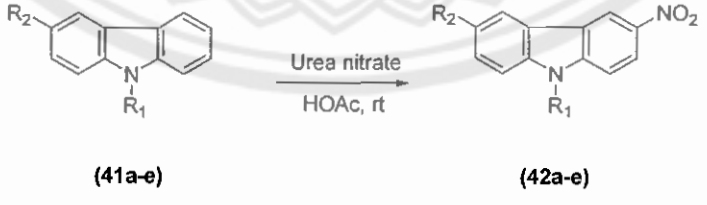
R	T (°C)	t (h)	Yield (%)	Content (%)	
				(39)	(40)
H	40	3.0	85.6	70.2	29.8
CH_3	40	3.5	90.0	83.3	16.7
C_2H_5	40-50	3.5	98.0	86.4	13.6
n-C_4H_9	40-50	4.0	85.4	92.0	8.0
$CH_2C_6H_5$	40-50	5.0	92.6	100.0	0

ในปี 1998 Fan และคณะ [51] ได้ทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ Carbazole-9-yl-acetic acid เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารฟลูออเรสเซนต์สำหรับใช้ในเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี แสดงในภาพ 21 โดยการสังเคราะห์เริ่มจากการทำปฏิกิริยาอัลคิลเลชันของคาร์บาโซล ด้วย Ethyl bromoacetate และโซเดียมไฮดรอกไซด์ในสารละลาย DMF และกระตุ้นปฏิกิริยาด้วยคลื่นไมโครเวฟ แล้วทำการไฮโดรลิซิสด้วยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์และกรดไฮโดรคลอริก ได้ผลผลิตร้อยละ 76



ภาพ 21 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ Carbazole-9-yl-acetic acid (7) [51]

ในปี 2004 Nagarajan และคณะ [52] ได้ทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ Nitrocarbazole แสดงในภาพ 22 โดยทำปฏิกิริยาไนเตรชันด้วย urea nitrate ในสารละลายกรดอะซิติก เพื่อการสังเคราะห์ mononitrocarbazole ได้ผลการทดลองแสดงในตาราง 3



ภาพ 22 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ mononitrocarbazole [52]

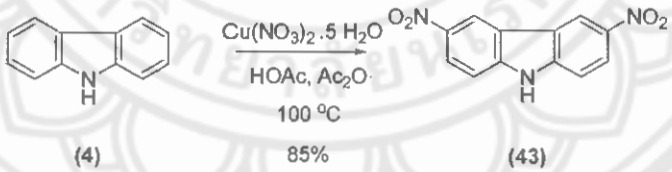
ตาราง 3 ผลการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ Nitrocarbazole

Carbazole	Substituents		Time	Yield
	R_1	R_2	(min)	(%)
41a	H	H	10[a]	86
41b	CH_3	H	20	83
41c	C_2H_5	H	20	81
41d	C_2H_5	CH_3	10[b]	92
41e	C_2H_5	CHO	15[b]	85

[a]Carbazole ไม่ละลายที่อุณหภูมิห้อง จึงทำปฏิกิริยาที่ 70 °C

[b]การแทนที่ 3 หมู่ ของ Carbazole เติม 1-2 หยด (0.4 mL) ของ 10% H_2SO_4 ในกรด acetic acid

ในปี 2005 Maity และคณะ [53] ได้ทำการสังเคราะห์ 3,6-Dinitro-*9H*-carbazole เพื่อใช้ในการศึกษาค่าอุณหภูมิการหลอมเหลว แสดงในภาพ 23 โดยทำการสังเคราะห์เริ่มจากคาร์บาโซล ทำปฏิกิริยาไนเตชันด้วย Copper (II) nitrate, hemipentahydrate ในสารละลาย acetic anhydride และกรดอะซิติก ได้ผลิตภัณฑ์จากการสังเคราะห์ 85 เปอร์เซ็นต์



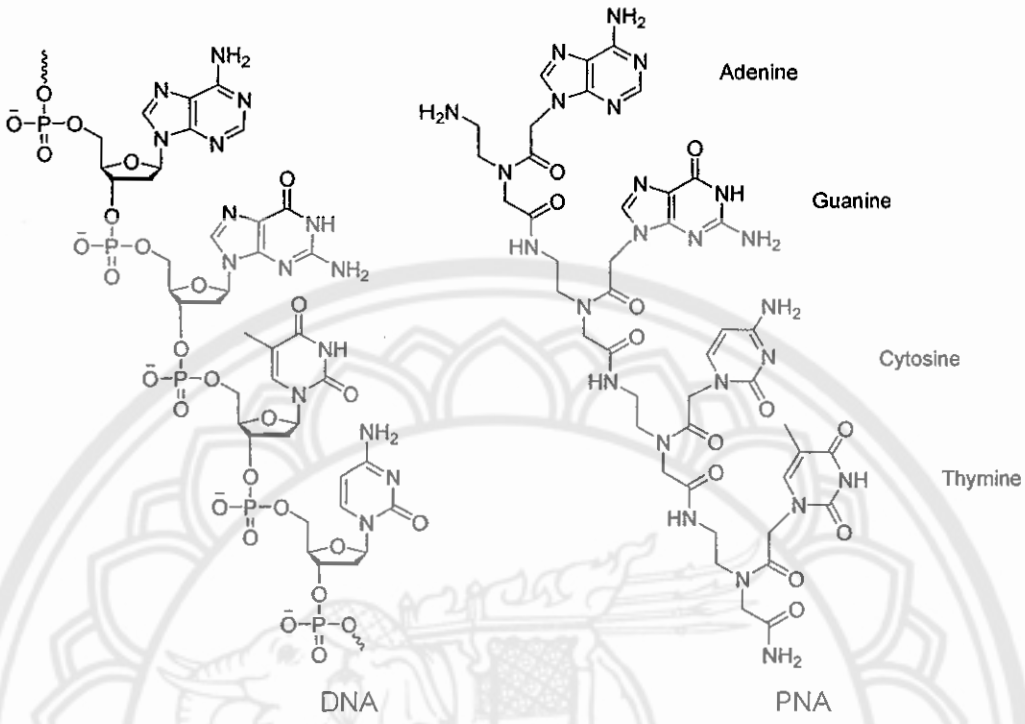
ภาพ 23 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ 3,6-Dinitro-*9H*-carbazole [53]

ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับกรดเป็ปไทด์นิวคลีอิก (PNA)

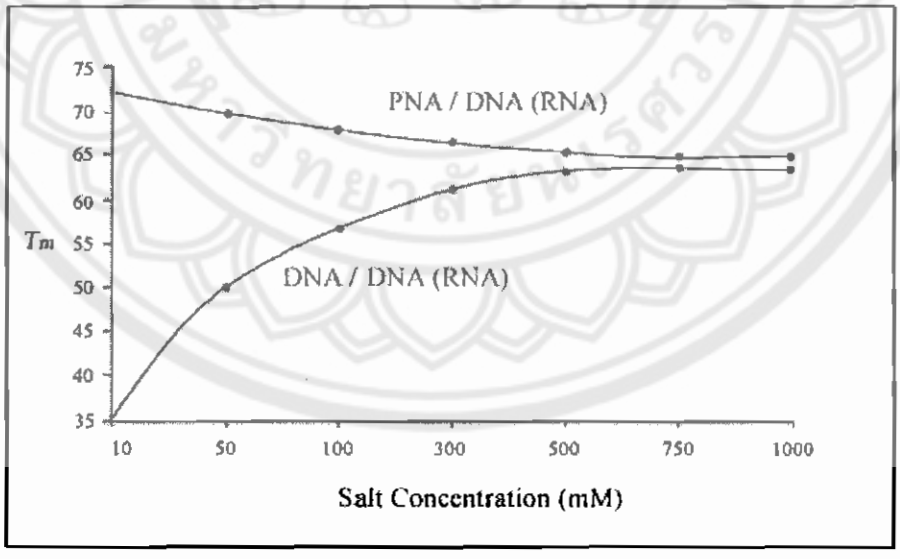
พีเอ็นเอ หรือ Peptide Nucleic Acid (PNA) เป็นสารที่สังเคราะห์ขึ้นเลียนแบบโมเลกุลของดีเอ็นเอ โดย Nielsen และคณะ [54] การสังเคราะห์จะเป็นการแทนที่หมู่ฟอสเฟตและน้ำตาลในดีเอ็นเอด้วยหมู่ที่ไม่มีประจุ และเป็นสารโมเลกุลอะไครัลในโครงสร้างโมเลกุลของ PNA จะประกอบ ด้วยหมู่ที่ซ้ำ ๆ กันของ *N*-(2-aminoethyl) glycine ที่มีหมู่ของเบสพิวรีน และพิริมิดีนเชื่อมต่อที่ตำแหน่ง methylene carbon แสดงในภาพ 24 โดยที่รูปแบบการสร้างนี้จำนวนอะตอม

ระหว่างเบสกับสายโซ่หลักใน PNA จะเหมือนกับสายของดีเอ็นเอ โดยที่ PNA คล้ายกับดีเอ็นเอในความสามารถในการเข้าคู่กับดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอ ด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างเบสในรูปแบบของ Watson-Crick แต่ PNA จะจับกับคู่สายดีเอ็นเอ และ อาร์เอ็นเอ ที่เหมาะสมด้วยพันธะที่แน่นหนากว่าดีเอ็นเอ [55] ดังตัวอย่างเช่น การเกิดโครงสร้างแบบดูเพล็กซของสายที่เป็นคู่สมกันของ pentadecamer DNA:DNA มีค่า T_m เท่ากับ 53.3 °C แต่ในการศึกษาของ pentadecamer PNA:DNA มีค่า T_m เท่ากับ 69.5 °C ซึ่งเป็นค่า T_m ของโครงสร้างแบบดูเพล็กซของ PNA:DNA ในสารละลาย 100 mM จะมีค่าสูงกว่า 1 °C ต่อจำนวนเบสที่เข้าคู่กันของความยาว เมื่อเปรียบเทียบกับโครงสร้างแบบดูเพล็กซของ DNA:DNA ในการเกิดโครงสร้างแบบดูเพล็กซของ PNA สามารถเกิดได้ทั้งแบบ parallel และ antiparallel แต่ในรูปแบบของ parallel จะมีความเสถียรต่ำ

ในสายของดีเอ็นเอ จะมีส่วนที่มีประจุลบซึ่งสร้างจากหมู่ฟอตเฟสในสายโซ่ แต่ใน PNA backbone จะเป็นโครงสร้างที่ไม่มีประจุทำให้มีคุณสมบัติที่ดีในการทดลองหลาย ๆ ทาง เช่น ในการเกิดโครงสร้างแบบดูเพล็กซของสายดีเอ็นเอกับสายดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอ ที่เหมาะสมกันจะเกิดแรงผลักกันทางไฟฟ้าสถิตของประจุลบบนหมู่ฟอสเฟตในสายโซ่ ทำให้การเกิดนี้จึงไม่เสถียร แต่การเกิดโครงสร้างแบบดูเพล็กซของ PNA:DNA และ PNA:RNA มีความเสถียรมากกว่าเนื่องจากการไม่มีประจุของหมู่ *N*-(2-aminoethyl) glycine ในสายโซ่ [56] , [57] ค่าความเสถียรของโครงสร้างแบบดูเพล็กซนี้เป็นการวัดได้จากจากค่า T_m โดยเปรียบเทียบกับโครงสร้างแบบดูเพล็กซ์ของ DNA:DNA และ DNA:RNA แสดงในตารางที่ 4 และการเกิดสารประกอบ PNA จะไม่ขึ้นกับต่อความเข้มข้นของสารละลายเกลือ [56], [57], [13] ไม่ว่าจะมีการเพิ่มหรือลดความเข้มข้นของสารละลายเกลือก็จะไม่มีผลต่อการเกิด hybridization ของ PNA ในขณะที่การเกิดสารประกอบของดีเอ็นเอ จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารละลายเกลือเป็นอย่างมาก แสดงในภาพ 25 นอกจากนี้ PNA ไม่เหมือนดีเอ็นเอในด้านความสามารถทนต่อการย่อยสลายเอนไซม์ เพราะว่าโมเลกุลของ PNA ไม่เป็นโมเลกุลที่เฉพาะเจาะจงเหมาะสมกับการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ Nuclease และ Peptidases [57] ด้วยคุณสมบัติที่ดีเหล่านี้ทำให้มีการทำการศึกษาและค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับ PNA เพื่อประยุกต์ใช้ทางชีวโมเลกุลเป็นอย่างมาก



ภาพ 24 เปรียบเทียบโครงสร้างทางเคมีของ DNA และ PNA



ภาพ 25 ความเสถียรของ PNA และ DNA โครงสร้างแบบดูเพล็กซ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของเกลือ [56], [57], [13]

ตาราง 4 เปรียบเทียบค่า T_m ของ DNA:DNA, PNA:DNA และ PNA:RNA [58]

Duplex structure	T_m
DNA:DNA (antiparallel)	53.3 °C
PNA:DNA (parallel)	56.1 °C
PNA:DNA (antiparallel)	69.5 °C
DNA:RNA (antiparallel)	50.6 °C
PNA:RNA (parallel)	51.2 °C
PNA:RNA (antiparallel)	72.3 °C

วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm ในสารละลาย 100 mM NaCl, 10 mM Sodium phosphate และ 0.1 M EDTA ที่ pH 7.0