สารบัญ

บทที่ หน้า

1 บทนำ 1
ความเป็นมาของปัญหา 1
จุดมุ่งหมายของการวิจัย 1
ความสำคัญของการวิจัย 4
ขอบเขตของการวิจัย 5
สรุปแนวทางการสังเคราะห์ 5

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 7
ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับดีเอ็นเอ (Deoxyribonucleic acid, DNA) 7
ยูนิเวอร์ซอลเบส (Universal base) 9
การสังเคราะห์และศึกษาคุณสมบัติของยูนิเวอร์ซอลเบส 14
งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ในกลุ่มคาร์บาโซล 18
ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับกรดเป็ปไทด์นิวคลีอิก (Peptide Nucleic Acid, PNA) 21

3 วิธีดำเนินงานวิจัย 25
อุปกรณ์และสารเคมี 25
วิธีการทดลอง 26
การศึกษาคุณสมบัติการเป็นยูนิเวอร์ซอลเบสของ PNA oligomer ที่ประกอบด้วย
อนุพันธ์ของ carbazole 42

4 ผลการทดลองและการอภิปรายผล 46
การสังเคราะห์ *tert*-Butyl *N*-[2-(*N*-9-fluorenylmethoxycarbonyl)
amino ethyl] glyeinate hydrochloride, PNA backbone 46
การเตรียม universal base candidate ให้อยู่ในรูปอนุพันธ์ของ acetic acid 49
การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ PNA monomer 57
ผลการศึกษาคุณสมบัติการเป็นยูนิเวอร์ซอลเบสของ PNA โอลิโกเมอร์
ที่ประกอบด้วยอนุพันธ์ของคาร์บาโซล 61

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ **หน้า**

5 บทสรุป 64

บรรณานุกรม 67

ภาคผนวก 74

ภาคผนวก ก คุณสมบัติทางเทอร์โมไดนามิกส์ของ Peptide Nucleic Acid 75

ภาคผนวก ข ^{13}C-NMR และ HRMS สเปกตราของสารผลิตภัณฑ์ 80

ภาคผนวก ค การคำนวณหาค่า extinction coefficient 91

ภาคผนวก ง กลไกการสังเคราะห์แบบ solid phase synthesis 93

ประวัติผู้วิจัย 96

บัญชีตาราง

ตาราง **หน้า**

1 ผลการสังเคราะห์ของ 3-Nitrocarbazole 19

2 ผลการสังเคราะห์ของ 3,6-Dinitrocarbazole 19

3 ผลการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ Nitrocarbazole 21

4 เปรียบเทียบค่า melting temperature (T_m) ของ DNA:DNA, PNA:DNA และ PNA:RNA 24

5 สรุปสภาวะที่ใช้ในการศึกษาการสังเคราะห์ 3,6-Dinitrocarbazole-9-yl-acetic acid ... 32

6 ผลการศึกษาคุณสมบัติการเป็นยูนิเวอร์ซอลเบสของ PNA โอลิโกเมอร์ที่ประกอบด้วยอนุพันธ์ของคาร์บาโซล 62

บัญชีภาพ

ภาพ **หน้า**

1 กระบวนเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR 2
2 เปรียบเทียบกระบวนการสังเคราะห์ด้วย PCR เมื่อพบ ambiguous base 3
3 ค่าไดโพลโมเมนต์ของสารอนุพันธ์คาร์บาโซล 4
4 การสังเคราะห์ Carbazole-9-yl-acetic acid 5
5 การสังเคราะห์ 3,6-Dinitrocarbazole-9-yl-acetic acid 5
6 การสังเคราะห์ 3-Nitrocabazole-9-yl-acetic acid 5
7 การสังเคราะห์ PNA โมโนเมอร์ 6
8 โครงสร้างทางเคมีของ DNA 8
9 พันธะไฮโดรเจนระหว่าง A:T และ G:C 8
10 ยูนิเวอร์ซอลเบสแบบการเกิดพันธะไฮโดรเจน 10
11 อะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนยูนิเวอร์ซอลเบส 11
12 อะโรมาติกเฮเทอโรไซเคิลยูนิเวอร์ซอลเบส 12
13 อันตรกิริยาทางประจุไฟฟ้าใน face-to-face stacking geometry, offset stacking geometry หรือ edge to-face stacking geometry. 13
14 stacking free energy (kcal/mol) ของเบสในธรรมชาติ และสารอะโรมาติก ใน DNA Duplex สายสั้น ที่มี C-G base pair ที่ตำแหน่งปลาย 14
15 อนุพันธ์ของ 2'-deoxyinosine 15
16 3-Nitropyrrole และ 5-Nitroindole DNA monomer 16
17 3-Nitropyrrole และ 5-Nitroindole PNA monomer 16
18 4-Fluorophenyl (4-FPh) ,Pentafluorophenyl (PFP) และ β-Heptafluoronaphthalene (β - HFN) residue 17
19 ผลของไดโพลโมเมนต์ที่มีต่อความเสถียรของ modified base 18
20 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ Nitrocarbazole 19
21 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ Carbazole-9-yl-acetic acid 20
22 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ Mononitrocarbazole 20

บัญชีภาพ (ต่อ)

ภาพ **หน้า**

23 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ 3,6-Dinitro-*9H*-carbazole 21
24 เปรียบเทียบโครงสร้างทางเคมีของ DNA และ PNA 23
25 ความเสถียรของ PNA และ DNA โครงสร้างแบบดูเพล็กซ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของเกลือ 23
26 การสังเคราะห์ Peptide nucleic acid backbone 26
27 universal base candidates 28
28 การสังเคราะห์ Carbazole-9-yl-acetic acid และ Carbazole-9-yl-acetic acid ethyl ester 29
29 แนวทางที่ 1 Retrosynthesis ของ 3,6-Dinitrocarbazole-9-yl-acetic acid 30
30 การสังเคราะห์ 3,6-Dinitro-9H-carbazole 31
31 แนวทางที่ 2 Retrosynthesis ของ 3,6-Dinitrocarbazole-9-yl-acetic acid 31
32 วิธีที่ 1 การสังเคราะห์ 3,6-Dinitrocarbazole-9-yl-acetic acid 32
33 วิธีที่ 2 การสังเคราะห์ 3,6-Dinitrocarbazole-9-yl-acetic acid 33
34 วิธีที่ 3 การสังเคราะห์ 3,6-Dinitrocarbazole-9-yl-acetic acid 34
35 วิธีที่ 4 การสังเคราะห์ 3,6-Dinitrocarbazole-9-yl-acetic acid 34
36 แนวทางที่ 3 Retrosynthesis ของ 3,6-Dinitrocarbazole-9-yl-acetic acid 35
37 การสังเคราะห์ 3,6-Dinitrocarbazole-9-yl-acetic acid 35
38 การสังเคราะห์ 3-Nitrocarbazole-9-yl-acetic acid 36
39 การสังเคราะห์ *tert*-Butyl *N*-[2-(*N*'-9-fluorenylmethyoxycarbonyl) aminoethyl]-*N*-[(carbazole)acetyl] glycinate 38
40 การสังเคราะห์ *tert*-Butyl *N*-[2-(*N*'-9-fluorenylmethyoxycarbonyl) aminoethyl]-*N*-[(3-nitrocarbazole)acetyl] glycinate 39
41 การสังเคราะห์ *tert*-Butyl *N*-[2-(*N*'-9-fluorenylmethyoxycarbonyl) aminoethyl]-*N*-[(3,6-dinitrocarbazole)acetyl] glycinate 41
42 กระบวนการสังเคราะห์ PNA ด้วย PE Biosystems Expedite 8909 Systems 43

บัญชีภาพ (ต่อ)

ภาพ **หน้า**

43 ลำดับของ PNA โอลิโกเมอร์ และอนุพันธ์ของ carbazole ที่ใช้ในการศึกษาคุณสมบัติของยูนิเวอร์ซอลเบส 44

44 กราฟ melting temperature (T_m) ของโครงสร้างแบบดูเพล็กซของ DNA 45

45 โครงสร้างทางเคมีของสารผลิตภัณฑ์ monoalkylation และ dialkylation 47

46 *N*-alkylation ของ Diamine 47

47 ^{1}H-NMR สเปกตรัมของ *tert*-Butyl *N*-(2-aminoethyl) glycinate ใน $CDCl_3$ 47

48 ^{1}H-NMR สเปกตรัมของ *tert*-Butyl *N*-[2-(*N*'-9-fluorenylmethyoxycarbonyl) amino ethyl] glycinate hydrochloride (43) ใน DMSO-d_6 48

49 ^{1}H-NMR สเปกตรัมของ Carbazole-9-yl-acetic acid ใน DMSO-d_6 50

50 ^{1}H-NMR สเปกตรัมของ Carbazole-9-yl-acetic acid ethyl ester ใน $CDCl_3$ 50

51 Major และ Minor ของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไนเตรชัน 51

52 FTIR สเปกตรัมของการสังเคราะห์ 3,6-Dinitrocarbazole-9-yl-acetic acid แนวทางที่ 2 วิธีที่ 1 52

53 ^{1}H-NMR สเปกตรัมของการสังเคราะห์ 3,6-Dinitrocarbazole-9-yl-acetic acid แนวทางที่ 2 วิธีที่ 1 53

54 ^{1}H-NMR สเปกตรัมของการสังเคราะห์ 3,6-Dinitrocarbazole-9-yl-acetic acid แนวทางที่ 2 วิธีที่ 2 54

55 ^{1}H-NMR สเปกตรัมของการสังเคราะห์ 3,6-Dinitrocarbazole-9-yl-acetic acid แนวทางที่ 2 วิธีที่ 3 และ 4 55

56 ^{1}H-NMR สเปกตรัมของ 3,6-Dinitrocarbazole-9-yl-acetic acid ใน DMSO-d_6 56

57 ^{1}H-NMR สเปกตรัมของ 3-Nitrocarbazole-9-yl-acetic acid ใน DMSO-d_6 57

58 ^{1}H-NMR สเปกตรัมของ *tert*-Butyl *N*-[2-(*N*'-9-fluorenylmethyoxycarbonyl) aminoethyl]-*N*-[(carbazole)acetyl] glycinate ใน $CDCl_3$ 58

59 ^{1}H-NMR สเปกตรัมของ *tert*-Butyl *N*-[2-(*N*'-9-fluorenylmethyoxycarbonyl) aminoethyl]-*N*-[(3-nitrocarbazole)acetyl] glycinate ใน $CDCl_3$ 59

บัญชีภาพ (ต่อ)

ภาพ **หน้า**

60 ^{1}H-NMR สเปกตรัมของ *tert*-Butyl *N*-[2-(*N*'-9-fluorenylmethyoxycarbonyl) aminoethyl]-*N*-[(3,6-dinitrocarbazole)acetyl] glycinate ใน DMSO-d_6..... 60

61 ความสัมพันธ์ระหว่าง T_m และ PNA:DNA duplex ที่ประกอบด้วยอนุพันธ์ของ 3-Nitrocarbazole และ 3,6-Dinitrocarbazole เปรียบเทียบกับโครงสร้างแบบดูเพล็กซของ PNA:DNA ที่ประกอบด้วยอนุพันธ์ของ carbazole..... 63

62 การหมุนของหมู่ไนโตรรอบพันธะ C-N..... 64

63 ค่าไดโพลโมเมนต์ของ 3,6-Dinitrocarbazole และ 3,6-Dicyanocarbazole..... 65

64 การขยายพันธะของ dinitrocarbazole..... 65

65 melting curve ของโครงสร้างแบบดูเพล็กซของ DNA..... 77

66 ^{13}C-NMR สเปกตรัมของ *tert*-Butyl *N*-[2-(*N*'-9-fluorenylmethoxycarbonyl) aminoethyl] glycinate hydrochloride ใน DMSO-d_6..... 81

67 ^{13}C-NMR สเปกตรัมของ Carbazole-9-yl-acetic acid ใน DMSO-d_6..... 82

68 ^{13}C-NMR สเปกตรัมของ 3-Nitrocarbazole-9-yl-acetic acid ใน DMSO-d_6..... 83

69 ^{13}C-NMR สเปกตรัมของ 3,6-Dinitrocarbazole-9-yl-acetic acid ใน DMSO-d_6..... 84

70 ^{13}C-NMR spectrum ของ *tert*-Butyl *N*-[2-(*N*'-9-fluorenylmethyoxycarbonyl) aminoethyl]-*N*-[(carbazole)acetyl]glycinate ใน $CDCl_3$..... 85

71 HRMS ของ *tert*-Butyl *N*-[2-(*N*'-9-fluorenylmethyoxycarbonyl) aminoethyl]-*N*-[(carbazole)acetyl]glycinate..... 86

72 ^{13}C-NMR สเปกตรัม *tert*-Butyl *N*-[2-(*N*'-9-fluorenylmethyoxycarbonyl) aminoethyl]-*N*-[(3-nitrocarbazole)acetyl] glycinate ใน $CDCl_3$..... 87

73 HRMS ของ *tert*-Butyl *N*-[2-(*N*'-9-fluorenylmethyoxycarbonyl) aminoethyl]-*N*-[(3-nitrocarbazole)acetyl] glycinate..... 88

74 ^{13}C-NMR สเปกตรัมของ *tert*-Butyl *N*-[2-(*N*'-9-fluorenylmethyoxycarbonyl) aminoethyl]-*N*-[(3,6-dinitrocarbazole)acetyl] glycinate ใน DMSO-d_6..... 89

บัญชีภาพ (ต่อ)

ภาพ **หน้า**

75 HRMS ของ *tert*-Butyl *N'*-[2-(*N'*-9-fluorenylmethyoxycarbonyl) aminoethyl]-*N*-[(3,6-dinitrocarbazole)acetyl] glycinate ใน DMSO-d_6 90

76 สาร coupling reagent 94

77 การ deprotection กลุ่มของ Fmoc ด้วย piperidine 94

78 ปฏิกิริยา coupling reaction 95

79 การ cleavage ของกลุ่ม tertiary butyl 95

อักษรย่อ

BTEAC	=	Benzyltriethylammonium chloride
°C	=	Degree Celcius
^{13}C NMR	=	Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance
d	=	doublet (for NMR spectra)
dd	=	double of doublets
DIEA	=	Diisopropylethylamine
DMF	=	N,N-dimethylformamide
DMSO-d_6	=	Deuterated dimethyl sulfoxide
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
EDTA	=	Ethylenediamine tetraacetic acid
eq.	=	equivalence
Et	=	Ethyl
Fmoc	=	9-fluorenylmethoxycarbonyl
Fmoc-Osu	=	*N*-(9-fluorenylmethoxycarbonyloxy)-*N*-hydroxysuccinimide
g	=	gram
G	=	Guanine, guanosine
HATU	=	2-(1H-7-azabenzenetriazole-1-yl)-oxy-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate
^{1}H NMR	=	proton Nuclear Magnetic Resonance
HOBt	=	1-hydroxybenzotriazole
HRMS	=	High-resolution mass spectrum
Hz	=	Hertz
J	=	coupling constant
K	=	Kelvin
Kcal	=	Kilocalorie(s)
m	=	meta
M	=	Molar

อักษรย่อ (ต่อ)

m	=	multiplet
MALDI-TOF	=	Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight (mass spectrometry)
Me	=	Methyl
mM	=	millimolar
m/z	=	mass-to-charge ratio
N	=	Normal
NMR	=	Nuclear Magnetic Resonance
p	=	para
PCR	=	Polymerase Chain Reaction
PNA	=	Peptide Nucleic Acid
ppm	=	part per million
q	=	quartet (for NMR spectra)
R_f	=	Retention factor
RNA	=	ribonucleic acid
rt	=	room temperature
s	=	singlet (for NMR spectra)
t	=	triplet (for NMR spectra)
T	=	Thymine
t-Bu	=	*tertiary*-butyl
tert	=	*tertiary*
TBTU	=	2-(1-H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium Tetrafluoroborate
TFA	=	Trifluoroacetic acid
T_m	=	melting Temperature
TLC	=	Thin Layer Chromatography
TMS	=	Trimethylsilyl

อักษรย่อ (ต่อ)

ΔH	=	change in enthalpy
ΔG	=	change in Gibb's free energy
$\Delta\Delta G$	=	the difference in change in Gibb's free energy
ΔS	=	change in entropy
ΔT_m	=	change in melting temperature
$\mathring{A}$	=	angstrom
δ	=	Chemical Shift

มหาวิทยาลัยนเรศวร