

ศึกษาการจับของสารกลุ่มเพอริลีน ไดอิมิดกับจิวควอครุเพลิกส์
ในบริเวณ โพร โมเตอร์ของยีนเอสอาร์เอฟ

นายปิยะณัฐ สวัสดิ์	5136609833
น.ส. เปรมสุดา โคผดุง	5136611033

โครงการปริญญาโทนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
เภสัชศาสตรบัณฑิต
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2555

Binding study of Perylene Diimide on
G-quadruplex motif in the SRF promoter region

Mr. Piyanut	Sawasdee	5136609833
Miss Premsuda	Kopadung	5136611033

A Senior Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement

For the Bachelor of Science Program in Pharmacy

Chulalongkorn University

2012

หัวข้อโครงการปริญญาโท	ศึกษาการจับของสารกลุ่มเพอร์ลีน ไดอิมิดกับจีควอดรู เพล็กซ์ในบริเวณ โปรโมเตอร์ของยีนส์เอสอาร์เอฟ
นิสิตผู้ดำเนินโครงการ	นายปิยะณัฐ สวัสดิ์ นางสาวเปรมสุดา โศผดุง
สาขาวิชา	เกษตรกรรมผลิตภัณฑ์ แขนงการคั้นพบบยา (อาหารและเกษตรเคมี)
อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาโท	อาจารย์ เกษักร ดร.บดินทร์ ติวสุวรรณ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เกษักร ดร.มิตร ปทีปวัฒน์ อาจารย์ เกษักร ดร.วรสิทธิ์ วงศ์สุทธิเลิศ

คณะเกษตรศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้โครงการปริญญาโทฉบับนี้
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเกษตรศาสตรบัณฑิต

.....คณบดี

(รองศาสตราจารย์ เกษักรหญิง ดร.พิณทิพย์ พงษ์เพชร)

.....ประธานแขนงการคั้นพบบยา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เกษักรหญิง ดร.บุญศรี องค์กร์พัฒนากุล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาโท

(อาจารย์ เกษักร ดร.บดินทร์ ติวสุวรรณ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เกษักร ดร.มิตร ปทีปวัฒน์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(อาจารย์ เกษักร ดร.วรสิทธิ์ วงศ์สุทธิเลิศ)

บทคัดย่อปริญาานิพนธ์

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) : ศึกษาการจับของสารกลุ่มเพอริลีน ไดอิมิดกับจิกวอครูเพลิกซ์ในบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนส์เอสอาร์เอฟ

ชื่อโครงการ (ภาษาอังกฤษ) : Binding study of Perylene Diimide on G-quadruplex motif in the SRF promoter region

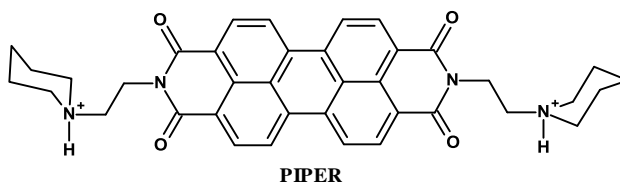
หัวหน้าโครงการ : นายปิยะณัฐ สวัสดิ์ 5136609833

ผู้ร่วมโครงการ : นางสาวเปรมสุดา โคผดุง 5136611033

อาจารย์ที่ปรึกษา : อ.ภก.ดร.บดินทร์ ติวสุวรรณ, ผศ.ภก.ดร.มิตร ปทีปวัฒน์, อ.ภก.ดร.วรสิทธิ์ วงศ์สุทธิเลิศ

ภาควิชา : อาหารและเภสัชเคมี

เอสอาร์เอฟ (SRF) เป็นหนึ่งในสมาชิกของ MADS box family ทำหน้าที่เป็นทรานสคริปชันแฟกเตอร์ โดยจับกับ serum response element (SRE) บนยีนหลายชนิด เช่น *c-fos*, *fosB* และ *junB* ซึ่งเป็น proto-oncogene โดยเอสอาร์เอฟ มีหน้าที่สำคัญในการควบคุมการเจริญเติบโตและเปลี่ยนแปลงเซลล์ จากการศึกษาวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าโปรโมเตอร์ของยีนเอสอาร์เอฟมีลำดับเบสกวานีนซ้ำกันหลายตำแหน่ง (5'-GGGAAAGGGGAAGGAAGTTGGGGTAGGGG-3') สามารถเกิดโครงสร้างจิกวอครูเพลิกซ์ได้ ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาผลของ PIPER ซึ่งเป็นสารกลุ่ม perylene diimides ต่อการเกิดโครงสร้างจิกวอครูเพลิกซ์ โดยใช้เทคนิค circular dichroism (CD) และ ultraviolet-visible spectroscopy จากผลการศึกษาพบว่า PIPER สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดโครงสร้างจิกวอครูเพลิกซ์แบบ parallel ได้ แต่ในสภาวะที่มีโพแทสเซียมหรือโซเดียมไอออน PIPER จะเหนี่ยวนำให้เกิดรูปแบบของจิกวอครูเพลิกซ์แบบ parallel และ mixed parallel/antiparallel ตามลำดับ เมื่อทำการศึกษาหาค่า melting temperature (T_m) พบว่า PIPER ช่วยให้จิกวอครูเพลิกซ์มีความคงตัวทางอุณหพลศาสตร์เพิ่มขึ้น ($T_m > 75^\circ\text{C}$) นอกจากนี้ผลการทดลองด้วยวิธี UV absorption titration พบสเปกตรัมของ PIPER ที่ได้หลังการไทเทรตเกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจน ซึ่งเป็นหลักฐานสนับสนุนการเกิดอันตรกิริยาระหว่าง PIPER และจิกวอครูเพลิกซ์ จากผลการวิจัยสรุปได้ว่า PIPER เป็นลิแกนด์หนึ่งที่สามารถจับและเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจิกวอครูเพลิกซ์ได้ พร้อมทั้งช่วยให้เกิดความคงตัวทางอุณหพลศาสตร์มากขึ้นด้วย



ฝ่ายวิชาการ คณะเภสัชศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

.....
อาจารย์ที่ปรึกษา

โครงการลำดับที่ 3.2
วันที่ 7 มกราคม 2556

บทคัดย่อปริญญาานิพนธ์

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) : ศึกษาการจับของสารกลุ่มเพอริลีน ไดอิมิดกับจิกวอครูเพลิกซ์ในบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนส์เอสอาร์เอฟ

ชื่อโครงการ (ภาษาอังกฤษ) : Binding study of Perylene Diimide on G-quadruplex motif in the SRF promoter region

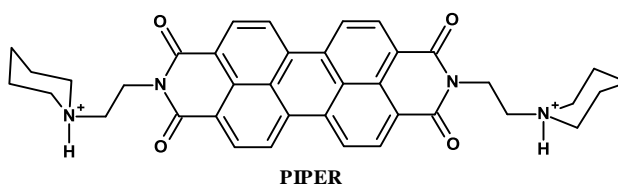
หัวหน้าโครงการ : นายปิยะณัฐ สวัสดิ์ 5136609833

ผู้ร่วมโครงการ : นางสาวเปรมสุดา โคผดุง 5136611033

อาจารย์ที่ปรึกษา : อ.ภก.ดร.บดินทร์ ติวสุวรรณ, ผศ.ภก.ดร.มิตร ปทีปวัฒน์, อ.ภก.ดร.วรสิทธิ์ วงศ์สุทธิเลิศ

ภาควิชา : อาหารและเภสัชเคมี

Serum Response Factor (SRF) is a member of the MADS box family of transcription factor that is a key regulator of several proto-oncogenes such as *c-fos*, *fos-B* and *junB*. SRF is believed to be involved in cell growth and differentiation. As in previous report, guanine-rich sequences (5'-GGGAAAGGGAAGGGAAGTTGGGG TAGGGG-3') within the promoter region of SRF gene is capable of forming four-stranded structures called G-quadruplex. In this study, we investigate the effects of PIPER (perylene diimide) to G-quadruplex forming by circular dichroism (CD) and ultraviolet-spectroscopy. PIPER without monovalent cation can induce SRF promoter sequence to form G-quadruplex motif. Furthermore, SRF promoter can form parallel and mixed parallel/antiparallel in the present of K^+ and Na^+ , respectively. According to melting temperature (T_m) study, indicates that PIPER has the ability to stabilize G-quadruplex by largely increase T_m value ($T_m > 75^\circ C$). In addition, to confirm interaction between PIPER and G-quadruplex, we have seen clearly changed spectrum by using UV absorption titration.



ฝ่ายวิชาการ คณะเภสัชศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

.....
อาจารย์ที่ปรึกษา

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาโครงการปริญญาโทฉบับนี้ ผู้ศึกษาขอกราบขอบพระคุณ ภก. ดร.บดินทร์ ติวสุวรรณ อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภก.ดร.มิตร ปทีปวิช และ ภก.ดร.วรสิทธิ์ วงศ์สุทธิเลิศ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำและช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของโครงการนี้ ตลอดจนให้ความรู้และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อโครงการนี้

ขอขอบคุณ ภญ.ดร. มณฑกานต์ จิตดีแจ้ง และ คุณปรีชาดิ เกตุคำ จากสถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำและความร่วมมือในการทำโครงการนี้

ขอขอบพระคุณภาควิชาอาหารและเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และสถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ที่อำนวยความสะดวกด้านเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้

คำนำ

โครงการปริญญาโทฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรเกสตรศาสตร์บัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยได้ทำการศึกษาการเกิดอันตรกิริยาระหว่างสารกลุ่มเพอร์ลีน ไดอิมิด (Perylene Diimide) และวิตามินบีสอง (Riboflavin) กับโครงสร้างจิวอครูเพลิกส์ในบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนเอสอาร์เอฟ ในการทำวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ในการเข้าใจการเกิดโครงสร้างจิวอครูเพลิกส์ ซึ่งอาจเป็นแนวทางหนึ่งในการค้นคว้าและพัฒนาเป้าหมายใหม่สำหรับการรักษาโรคมะเร็งในอนาคต

คณะผู้ศึกษาหวังเป็นอย่างยิ่งว่า โครงการปริญญาโทฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจ และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาอื่นๆต่อไป

ปิยะณัฐ สวัสดิ์
เปรมสุดา โคผดุง

คณะผู้จัดทำ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
คำนำ	ช
สารบัญ	ซ
สารบัญตาราง	ญ
สารบัญภาพ	ฎ
บทที่	
1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย	3
2 ปรีทัศน์วรรณกรรม	4
2.1 จีควอดรูเพล็กซ์	4
2.2 รูปแบบสเปกตรัมของ โครงสร้างดีเอ็นเอแบบต่างๆ	6
2.3 ลิแกนด์ที่ใช้ในการศึกษา	8
2.3.1 TMPyP4	8
2.3.2 Riboflavin	9
2.3.3 PIPER	10
2.4 ผลของไอออนบวกและ TMPyP4	11
2.5 การศึกษาความคงตัวทางอุณหพลศาสตร์ของ โครงสร้างควอดรูเพล็กซ์	13
2.6 การศึกษาอันตรกิริยาของลิแกนด์และ โครงสร้างควอดรูเพล็กซ์	13
3 เครื่องมือที่ใช้และวิธีการดำเนินการวิจัย	14
3.1 สารเคมี	14
3.2 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือ	15
3.3 การเตรียมสารเคมีและตัวอย่างที่จะนำมาวิเคราะห์	15
3.4 ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย	23
4 ผลและอภิปรายผลการวิจัย	25
5 สรุปผลการวิจัย	44

รายการอ้างอิง..... 45

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ผลของไอออนบวกและ TMPyP4 ต่อการเกิดโครงสร้างควอดรูเพล็กซ์ จากปริญญานิพนธ์ ของนางสาวศิษญา แสงเป่า และคณะ.....	11
ตารางที่ 2 ผลของไอออนบวกและ TMPyP4 ต่อการเกิดโครงสร้างควอดรูเพล็กซ์ ของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่มีลำดับเบสต่างๆในหลายสภาวะ จากการทบทวนวรรณกรรมต่างๆ.....	12
ตารางที่ 3 ลำดับเบสของ Synthetic oligodeoxynucleotide ที่ใช้ในการวิจัย.....	14
ตารางที่ 4 การเตรียม SRF promoter 01 ความเข้มข้น 10 μ M ที่มี NaCl 100 mM, KCl 100 mM และอัตราส่วนระหว่าง NaCl : KCl = 1:1 ใน 1X TE buffer pH 7.4 ปริมาตร 400 μ L.....	17
ตารางที่ 5 การเตรียม SRF promoter 01 ความเข้มข้น 10 μ M ที่มี TMPyP4 ใน 1X TE buffer pH 7.4 ปริมาตร 400 μ L.....	17
ตารางที่ 6 การเตรียม SRF promoter 01 ความเข้มข้น 10 μ M ที่มี TMPyP4 และ NaCl 100 mM หรือ KCl 100 mM ใน 1X TE buffer pH 7.4 ปริมาตร 400 μ L	18
ตารางที่ 7 การเตรียม SRF promoter 01 ความเข้มข้น 10 μ M ที่มี Riboflavin ใน 1X TE buffer pH 7.4 ปริมาตร 400 μ L.....	18
ตารางที่ 8 การเตรียม SRF promoter 01 ความเข้มข้น 10 μ M ที่มี Riboflavin และ NaCl 100 mM หรือ KCl 100 mM ใน 1X TE buffer pH 7.4 ปริมาตร 400 μ L	19
ตารางที่ 9 การเตรียม SRF promoter 01 ความเข้มข้น 10 μ M ที่มี PIPER ใน 1X TE buffer pH 7.4 ปริมาตร 400 μ L.....	20
ตารางที่ 10 การเตรียม SRF promoter 01 ความเข้มข้น 10 μ M ที่มี PIPER และ NaCl 100 mM หรือ KCl 100 mM ใน 1X TE buffer pH 7.4 ปริมาตร 400 μ L	20
ตารางที่ 11 การเตรียม TMPyP4 ความเข้มข้น 3.5 μ M ที่มี NaCl 100 mM หรือ KCl 100 mM ใน 1X TE buffer pH 7.4 ปริมาตร 300 μ L.....	21
ตารางที่ 12 การเตรียม Riboflavin ความเข้มข้น 35 μ M ที่มี 100 mM NaCl หรือ 100 mM KCl ใน 1X TE buffer pH 7.4 ปริมาตร 300 μ L.....	22
ตารางที่ 13 การเตรียม PIPER ความเข้มข้น 30 μ M ที่มี 100 mM NaCl หรือ 100 mM KCl ใน 1X TE buffer pH 7.4 ปริมาตร 300 μ L.....	22
ตารางที่ 14 ค่า melting temperature ของโครงสร้างควอดรูเพล็กซ์ในสภาวะต่างๆ	43

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	การจัดเรียงตัวของเบสกวานีนและไออนบวกใน G-quartet และ โครงสร้างจี้ควอครูเพลิกส์.....	4
ภาพที่ 2 ก	ลักษณะของ tetramolecular.....	5
ภาพที่ 2 ข	ลักษณะของ bimolecular.....	5
ภาพที่ 2 ค	ลักษณะของ monomolecular หรือ intramolecular.....	5
ภาพที่ 3 ก	ลักษณะของ parallel.....	5
ภาพที่ 3 ข-ง	ลักษณะของ antiparallel.....	5
ภาพที่ 4 ก	ลักษณะของ lateral loop.....	5
ภาพที่ 4 ข	ลักษณะของ propeller loop หรือ chain-reversal หรือ external loop.....	5
ภาพที่ 4 ค	ลักษณะของ diagonal loop.....	5
ภาพที่ 5 ก	สเปกตรัมของโครงสร้างควอครูเพลิกส์แบบ parallel.....	6
ภาพที่ 5 ข	สเปกตรัมของโครงสร้างควอครูเพลิกส์แบบ antiparallel.....	6
ภาพที่ 5 ค	สเปกตรัมของโครงสร้างควอครูเพลิกส์แบบ parallel ที่มี external loop.....	6
ภาพที่ 6 ก	โครงสร้างควอครูเพลิกส์แบบ mixed parallel/antiparallel.....	7
ภาพที่ 6 ข	สเปกตรัมของโครงสร้างควอครูเพลิกส์แบบ mixed parallel/antiparallel.....	7
ภาพที่ 7	สเปกตรัมของโครงสร้างแบบ unstructured DNA.....	7
ภาพที่ 8	โครงสร้างของ TMPyP4.....	8
ภาพที่ 9	โครงสร้างของ riboflavin.....	9
ภาพที่ 10	โครงสร้างของ PIPER.....	10
ภาพที่ 11	ตัวอย่าง melting curve โดยใช้ CD spectroscopy.....	13
ภาพที่ 12	สเปกตรัมของ SRF promoter 01 10 μ M ที่มีเกลือ NaCl และ KCl อัตราส่วนต่างๆ ในบัฟเฟอร์ 1XTE pH 7.4 วัดด้วยเครื่อง CD ที่ 200-320 nm ที่ 25°C.....	25
ภาพที่ 13	สเปกตรัมของ SRF promoter 10 μ M ที่มีลิแกนด์ TMPyP4 อัตราส่วน 1:5 ในบัฟเฟอร์ 1XTE pH 7.4 วัดด้วยเครื่อง CD ที่ 200-450 nm ที่ 25°C.....	26
ภาพที่ 14	สเปกตรัมของ SRF promoter 10 μ M ที่มีลิแกนด์ TMPyP4 อัตราส่วน 1:5 ในสภาวะที่มีเกลือ KCl 100 mM ในบัฟเฟอร์ 1XTE pH 7.4 วัดด้วยเครื่อง CD ที่ 200-450 nm ที่ 25°C.....	27

สารบัญภาพ (ต่อ)

		หน้า
ภาพที่ 15	สเปกตรัมของ SRF promoter 10 μ M ที่มีลิแกนด์ TMPyP4 อัตราส่วน 1:5 ในสภาวะที่มีเกลือ NaCl 100 mM ในบัฟเฟอร์ 1XTE pH 7.4 วัดด้วยเครื่อง CD ที่ 200-450 nm ที่ 25 $^{\circ}$ C.....	28
ภาพที่ 16	สเปกตรัมของ SRF promoter 10 μ M ที่มีลิแกนด์ Riboflavin อัตราส่วน 1:1 และ 1:5 ในบัฟเฟอร์ 1XTE pH 7.4 วัดด้วยเครื่อง CD ที่ 200-320 nm ที่ 25 $^{\circ}$ C	29
ภาพที่ 17	สเปกตรัมของ SRF promoter 10 μ M ที่มีลิแกนด์ Riboflavin อัตราส่วน 1:1 และ 1:5 ในสภาวะที่มีเกลือ KCl 100 mM ในบัฟเฟอร์ 1XTE pH 7.4 วัดด้วยเครื่อง CD ที่ 200-320 nm ที่ 25 $^{\circ}$ C.....	30
ภาพที่ 18	สเปกตรัมของ SRF promoter 10 μ M ที่มีลิแกนด์ Riboflavin อัตราส่วน 1:1 และ 1:5 ในสภาวะที่มีเกลือ NaCl 100 mM ในบัฟเฟอร์ 1XTE pH 7.4 วัดด้วยเครื่อง CD ที่ 200-320 nm ที่ 25 $^{\circ}$ C.....	31
ภาพที่ 19	สเปกตรัมของ SRF promoter 10 μ M ที่มีลิแกนด์ PIPER อัตราส่วน 1:1 และ 1:5 ในบัฟเฟอร์ 1XTE pH 7.4 วัดด้วยเครื่อง CD ที่ 200-400 nm ที่ 25 $^{\circ}$ C	32
ภาพที่ 20	สเปกตรัมของ SRF promoter 10 μ M ที่มีลิแกนด์ PIPER อัตราส่วน 1:1 และ 1:5 ในสภาวะที่มีเกลือ KCl 100 mM ในบัฟเฟอร์ 1XTE pH 7.4 วัดด้วยเครื่อง CD ที่ 200-400 nm ที่ 25 $^{\circ}$ C.....	33
ภาพที่ 21	สเปกตรัมของ SRF promoter 10 μ M ที่มีลิแกนด์ PIPER อัตราส่วน 1:1 และ 1:5 ในสภาวะที่มีเกลือ NaCl 100 mM ในบัฟเฟอร์ 1XTE pH 7.4 วัดด้วยเครื่อง CD ที่ 200-320 nm ที่ 25 $^{\circ}$ C.....	34
ภาพที่ 22	สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ TMPyP4 7 μ M.....	35
ภาพที่ 23	สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ Riboflavin 35 μ M.....	36
ภาพที่ 24	สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ PIPER 60 μ M.....	37
ภาพที่ 25	Melting Curve ของ SRF promoter 01 10 μ M ที่มีเกลือ KCl 100 mM ในบัฟเฟอร์ 1XTE pH 7.4 วัดด้วยเครื่อง CD ที่ 260 nm ที่ 5-95 $^{\circ}$ C.....	38
ภาพที่ 26	Melting Curve ของ SRF promoter 01 10 μ M ที่มีเกลือ NaCl 100 mM ในบัฟเฟอร์ 1XTE pH 7.4 วัดด้วยเครื่อง CD ที่ 290 nm ที่ 5-95 $^{\circ}$ C.....	38
ภาพที่ 27	Melting Curve ของ SRF promoter 01 10 μ M ที่มีลิแกนด์ TMPyP4 อัตราส่วน 1:5 ในบัฟเฟอร์ 1XTE pH 7.4 วัดด้วยเครื่อง CD ที่ 260 nm ที่ 5-95 $^{\circ}$ C.....	39

สารบัญภาพ (ต่อ)

		หน้า
ภาพที่ 28	Melting Curve ของ SRF promoter 01 10 μ M ที่มีลิแกนด์ TMPyP4 อัตราส่วน 1:5 ในสภาวะที่มีเกลือ KCl 100 mM ในบัฟเฟอร์ 1XTE pH 7.4 วัดด้วยเครื่อง CD ที่ 260 nm ที่ 5-95 $^{\circ}$ C.....	39
ภาพที่ 29	Melting Curve ของ SRF promoter 01 10 μ M ที่มีลิแกนด์ TMPyP4 อัตราส่วน 1:5 ในสภาวะที่มีเกลือ NaCl 100 mM ในบัฟเฟอร์ 1XTE pH 7.4 วัดด้วยเครื่อง CD ที่ 260 nm ที่ 5-95 $^{\circ}$ C.....	40
ภาพที่ 30	Melting Curve ของ SRF promoter 01 10 μ M ที่มีลิแกนด์ Riboflavin อัตราส่วน 1:5 ในสภาวะที่มีเกลือ KCl 100 mM ในบัฟเฟอร์ 1XTE pH 7.4 วัดด้วยเครื่อง CD ที่ 260 nm ที่ 5-95 $^{\circ}$ C.....	40
ภาพที่ 31	Melting Curve ของ SRF promoter 01 10 μ M ที่มีลิแกนด์ Riboflavin อัตราส่วน 1:5 ในสภาวะที่มีเกลือ NaCl 100 mM ในบัฟเฟอร์ 1XTE pH 7.4 วัดด้วยเครื่อง CD ที่ 290 nm ที่ 5-95 $^{\circ}$ C.....	41
ภาพที่ 32	Melting Curve ของ SRF promoter 01 10 μ M ที่มีลิแกนด์ PIPER อัตราส่วน 1:5 ในสภาวะที่มีเกลือ KCl 100 mM ในบัฟเฟอร์ 1XTE pH 7.4 วัดด้วยเครื่อง CD ที่ 260 nm ที่ 5-95 $^{\circ}$ C.....	41
ภาพที่ 33	Melting Curve ของ SRF promoter 01 10 μ M ที่มีลิแกนด์ PIPER อัตราส่วน 1:5 ในสภาวะที่มีเกลือ NaCl 100 mM ในบัฟเฟอร์ 1XTE pH 7.4 วัดด้วยเครื่อง CD ที่ 260 nm ที่ 5-95 $^{\circ}$ C.....	42
ภาพที่ 34	Melting Curve ของ SRF promoter 01 10 μ M ที่มีลิแกนด์ PIPER อัตราส่วน 1:5 ในบัฟเฟอร์ 1XTE pH 7.4 วัดด้วยเครื่อง CD ที่ 260 nm ที่ 5-95 $^{\circ}$ C.....	42

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย

ในปัจจุบันโครงสร้าง DNA ที่รู้จักกันโดยทั่วไปมีหลายรูปแบบ ได้แก่ DNA สายคู่ตามแบบ Watson และ Crick , Hairpin, Triplex, I-motif, G-quadruplex เป็นต้น (1) สำหรับโครงสร้าง DNA แบบจิวอครูเพิลิกซ์ (G-quadruplex) เกิดจากเบสกวานีน (guanine) 4 เบสในสาย DNA เชื่อมกันด้วยพันธะไฮโดรเจน Hoogsteen เรียกโครงสร้างนี้ว่า G-quartet ซึ่งคงตัวด้วยไอออนบวกที่มีวาเลนซ์อิเล็กทรอนิกส์เท่ากับหนึ่ง ธรรมชาติของ G-quartet จะซ้อนกันตั้งแต่ 2 ชั้นขึ้นไปด้วย π - π stacking ได้เป็นโครงสร้าง G-quadruplex โดยในปัจจุบันเมื่อวิทยาการก้าวหน้ามากขึ้นทำให้โครงสร้าง G-quadruplex เป็นที่น่าสนใจ เนื่องจากสายนิวคลีโอไทด์บริเวณนี้มีลำดับเบสกวานีนติดกันหลายโมเลกุลจึงมีโอกาสเกิดโครงสร้างนี้ได้ โดยมักจะพบ G-quadruplex ในบริเวณ telomere และ promoter ของยีนดีเอ็นเอ เช่น บริเวณ SRF gene (2)

SRF (serum response factor) เป็นหนึ่งใน transcription factor ซึ่งจัดอยู่ใน MADS box family มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์หลายชนิด การศึกษาพบว่า SRF gene สามารถกระตุ้นการทำงานของ c-fos ซึ่งเป็น proto-oncogene (3) นอกจากนี้ในโครงการปริญญาโทพนธ์ชื่อ Study of Gquadruplex-forming Motif in the SRF Promoter Region ของศิษยา แสงเป่า และคณะในปี พ.ศ. 2553 ได้แสดงให้เห็นว่าบริเวณ promoter ของ SRF gene ที่มีเบส guanine ติดกันหลายโมเลกุลสามารถเกิด G-quadruplex ได้ โดยการถูกเหนี่ยวนำด้วยโซเดียมไอออน โพแทสเซียมไอออน และลิแกนด์ TMPyP4 งานวิจัยดังกล่าวจึงถือได้ว่าเป็นงานวิจัยชิ้นแรกที่รายงานถึงการเกิดโครงสร้าง G-quadruplex บริเวณ promoter ของ SRF gene ภายนอกร่างกาย (4)

การศึกษาวิจัยที่ผ่านมามีแนวโน้มเพื่อการสังเคราะห์หรือหาลิแกนด์ (Ligand) ที่สามารถจับกับโครงสร้าง G-quadruplex ได้อย่างเฉพาะเจาะจงมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามมีเพียงบางลิแกนด์เท่านั้นที่มีคุณสมบัตินี้ ยกตัวอย่างเช่น Quarfloxin ซึ่งเป็นยาเคมีบำบัดตัวเดียวในขณะนี้ที่สามารถจับกับ G-quadruplex และกำลังเข้าสู่ phase 2 clinical trial ใช้สำหรับรักษา chronic lymphocytic leukaemia (5, 6) ดังนั้นการศึกษาวิจัยเพื่อหาลิแกนด์ที่มีคุณสมบัติในการจับกับโครงสร้าง G-quadruplex อย่างเฉพาะเจาะจงจึงมีความสำคัญ ซึ่งสามารถนำความรู้ที่ได้ไปใช้เป็นพื้นฐานในการพัฒนาต่อยอดในการศึกษาโครงสร้าง G-quadruplex และประยุกต์ใช้ในการพัฒนายาต้านมะเร็งใหม่ต่อไป

สำหรับสารตัวแรกที่มีรายงานการนำมาศึกษาการเกิดอตรรกิริยากับโครงสร้างจิวคอรูเพลิกซ์ คือ PIPER (N,N'-bis-(2-(1-piperidino)ethyl)-3,4,9,10-perylene tetracarboxylic acid diimide) โดยสารดังกล่าวสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดโครงสร้างจิวคอรูเพลิกซ์จากสายดีเอ็นเอสายคู่ หรือสายเดี่ยวได้ (7) PIPER มีการจับโครงสร้างจิวคอรูเพลิกซ์ด้วย electrostatic interaction ระหว่าง side chain ของ perylene diimide และบริเวณ groove ของโครงสร้างดังกล่าว (8) PIPER มีการจับที่จำเพาะกับจิวคอรูเพลิกซ์มากกว่าดูเพล็กซ์ (Duplex DNA) จึงมีการคิดค้นและพัฒนาเพื่อตัดแปลงหมู่แทนที่ที่มีความเหมาะสม และได้อนุพันธ์ต่าง ๆ มากมาย เช่น Tel01 (PIPER 5), Tel03, Tel04, Tel08 (PIPER 3), PIPER 6 และ PIPER 7 เป็นต้น (9) ดังนั้นทางกลุ่มจึงเลือกศึกษาสาร PIPER เป็นลิแกนด์ตัวหนึ่ง ในการจับกับจิวคอรูเพลิกซ์ของ SRF gene ซึ่งยังไม่มีเคยมีผู้ศึกษาการจับระหว่างลิแกนด์ และสายดีเอ็นเอดังกล่าว รวมถึงดูผลการเหนี่ยวนำจาก PIPER และความคงตัวของอณูทฤษฎีศาสตร์หลังจากเกิดโครงสร้างจิวคอรูเพลิกซ์

ปัจจุบันอนุพันธ์ของวิตามินกำลังมีบทบาทสำคัญในการนำมาใช้เพื่อต้านมะเร็ง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง haematological cancer เช่น การนำวิตามินเอ (Vitamin A, Retinoic acid) มาใช้รักษา myeloid leukaemia อย่างกว้างขวาง รวมถึงวิตามินดี (Vitamin D) ที่กำลังอยู่ในระหว่างการทดลองทางคลินิก เพื่อใช้รักษา myeloid leukaemia เช่นเดียวกัน งานวิจัยในปี ค.ศ. 1995 ได้ทำการศึกษาการนำวิตามินบีสอง (Riboflavin) มาจับกับโครงสร้าง G-quadruplex ที่เกิดขึ้นภายใน RNA molecule พบว่าสามารถเกิดการจับกันได้แน่นพอสมควร ($K_d = 1-5 \mu\text{M}$) (10) ซึ่งนับตั้งแต่งานวิจัยดังกล่าวจนถึงปัจจุบันยังไม่พบงานวิจัยเกี่ยวกับการจับกันระหว่างวิตามินบีสองและ G-quadruplex อีก นอกจากนี้ยังพบงานวิจัยเกี่ยวกับการนำ photoderivatives ของวิตามินบีสองมาศึกษาถึงบทบาทต่อการรักษา haematological malignancy (11) ซึ่งจากการพิจารณาโครงสร้างทางเคมีของวิตามินบีสองพบว่าเป็นสารกลุ่ม isoalloxazine ที่มีไนโตรเจนอะตอม (N) ภายในวงแหวน (ring) โดยโครงสร้างมีความเป็น planar extended aromatic (12) ทำให้มีความเป็นไปได้ในการจับกับ G-quartet ด้วย $\pi-\pi$ stacking ได้

จากเหตุผลดังกล่าวจึงทำให้ทางกลุ่มผู้ศึกษามีความสนใจในการนำ PIPER และ วิตามินบีสอง มาทดสอบการจับกับโครงสร้างจิวคอรูเพลิกซ์ในบริเวณ promoter ของ SRF gene รวมถึงศึกษาความคงตัวของอณูทฤษฎีศาสตร์ในการจับกันระหว่างลิแกนด์และโครงสร้างจิวคอรูเพลิกซ์ โดยหาก

แสดงผลการจับระหว่างกันขึ้น สารที่นำมาศึกษาอาจมีบทบาทช่วยยับยั้งการ transcription ของ proto-oncogene ได้ และเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการพัฒนาากลุ่มใหม่ๆในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1) เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ของสารกลุ่มเพอริลีน ไดอิมิด (Perylene Diimide) และวิตามินบีสอง (Riboflavin) ในการจับกับจีควอดรูเพลิกส์ในบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนเอสอาร์เอฟ

2) เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของสารกลุ่มเพอริลีน ไดอิมิด (Perylene Diimide) และวิตามินบีสอง (Riboflavin) ต่อการเกิดโครงสร้างจีควอดรูเพลิกส์ในบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนเอสอาร์เอฟ

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

สามารถศึกษาและเข้าใจถึงโครงสร้างลิแกนด์และสภาวะที่เหมาะสมในการจับกับโครงสร้าง G-quadruplex อย่างจำเพาะเจาะจง ซึ่งอาจนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นหนึ่งในการศึกษาโครงสร้าง G-quadruplex ในบริเวณต่าง ๆ ของสาย DNA และอาจนำไปพัฒนาเพื่อเป็นเป้าหมายใหม่สำหรับการรักษามะเร็งต่อไปในอนาคต

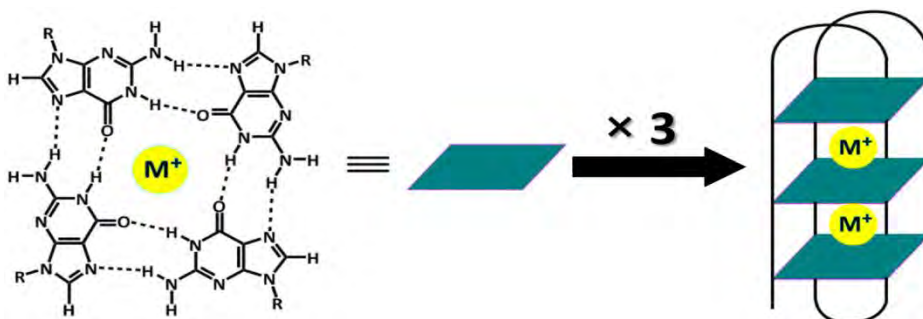
บทที่ 2

ปรีทัศน์วรรณกรรม

2.1 จีควอดรูเพลิกส์

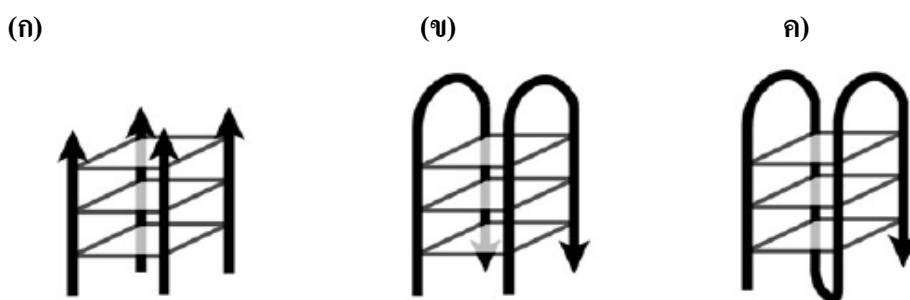
จีควอดรูเพลิกส์เป็นดีเอ็นเอที่มีโครงสร้าง 4 สาย ประกอบด้วยเบสกวานีน (guanine) 4 เบส จัดเรียงตัวเป็นวงอยู่ในแนวระนาบ (13) ซึ่งแต่ละเบสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจน Hoogsteen จำนวนแปดพันธะ ได้แก่ ไนโตเจนตำแหน่งที่ 1 กับ ออกซิเจนตำแหน่งที่ 6 (N1-O6) และไนโตเจนตำแหน่งที่ 2 กับ ไนโตเจนตำแหน่งที่ 7 (N2-N7) เรียกโครงสร้างนี้ว่า “G-quartet หรือ G-tetrad” (14) โดย G-quartet ตั้งแต่จำนวนสองชั้นขึ้นไปจะมาซ้อนกันด้วยพันธะ $\pi - \pi$ stacking กลายเป็นโครงสร้างควอดรูเพลิกส์

ไอออนบวกที่มีวาเลนซ์อิเล็กตรอนเท่ากับหนึ่ง เช่น Na^+ และ K^+ จะมีผลต่อการเกิดโครงสร้างในรูปร่างต่างๆ และความคงตัวของควอดรูเพลิกส์ ไอออนบวกนี้จะอยู่ภายในช่องว่างตรงกลางของแต่ละชั้น G-quartet และเชื่อมกับออกซิเจนตำแหน่งที่ 6 ของเบสกวานีน (13) (ภาพที่ 1)

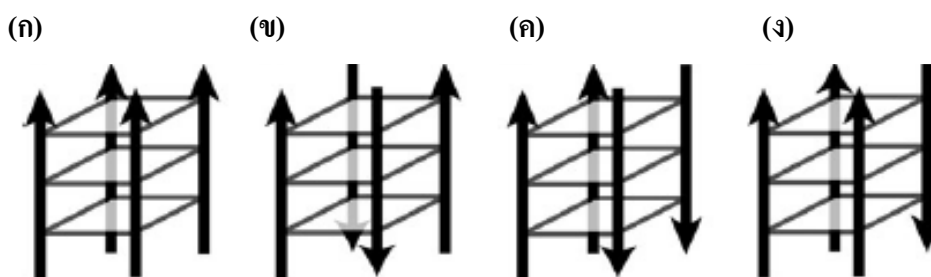


ภาพที่ 1 การจัดเรียงตัวของเบสกวานีนและไอออนบวกใน G-quartet และ โครงสร้างจีควอดรูเพลิกส์ที่มีไอออนบวกอยู่ระหว่างชั้นของ G-quartet

โครงสร้างจีควอดรูเพลิกส์สามารถจัดเรียงตัวได้ 3 แบบ คือ Tetramolecular เกิดจากการจับกันระหว่างโมเลกุลของดีเอ็นเอ 4 สาย Bimolecular เกิดจากการจับกันระหว่างโมเลกุลของดีเอ็นเอ 2 สาย และ Monomolecular (intramolecular) เกิดจากการจับกันภายในโมเลกุลของดีเอ็นเอเพียงเส้นเดียว (13, 15, 16) (ภาพที่ 2) นอกจากนี้โครงสร้างจีควอดรูเพลิกส์แบ่งออกได้เป็น 2 แบบ คือ parallel และ antiparallel โดยแบบ parallel จะมีการจัดเรียงตัวของแต่ละ G-strand จาก 5' ไป 3' ในทิศทางเดียวกัน ส่วนแบบ antiparallel จะมีอย่างน้อยหนึ่งสาย G-strand ที่จัดเรียงตัวในทิศทางตรงกันข้ามกับ G-strand ที่เหลือ (2, 16) (ภาพที่ 3)

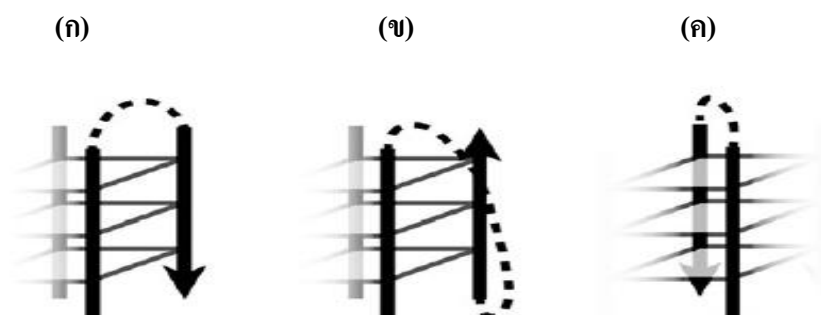


ภาพที่ 2 (ก) tetramolecular (ข) bimolecular (ค) monomolecular หรือ intramolecular



ภาพที่ 3 (ก) parallel (ข-ง) antiparallel

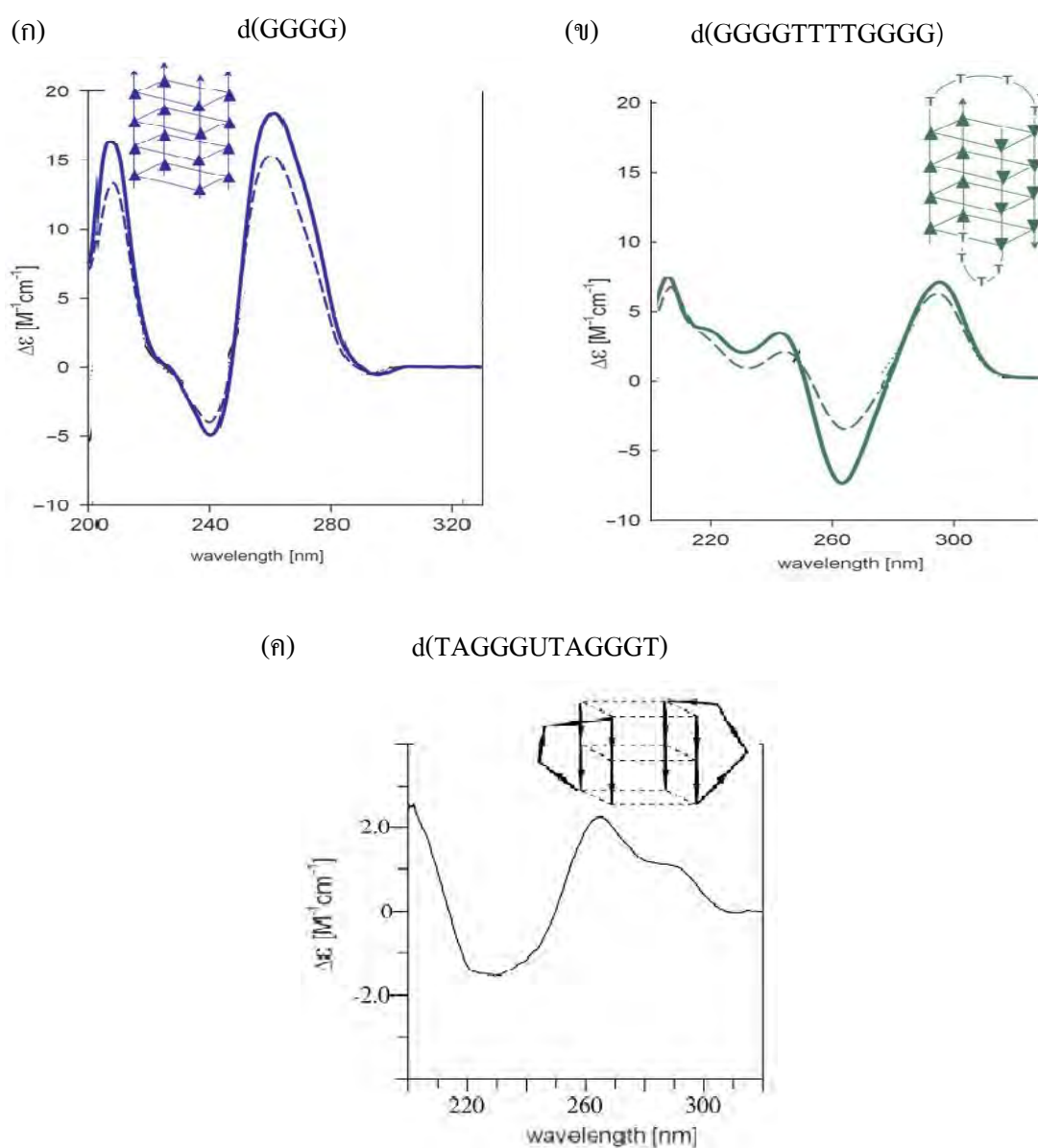
ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เชื่อมแต่ละ G-strand จะทำให้โครงสร้างจิวอดรูเพลิกซ์มี loop แบบต่างๆ เช่น โครงสร้างจิวอดรูเพลิกซ์แบบ parallel จะมี propeller loop หรือ chain-reversal หรือ external loop ซึ่งเชื่อมระหว่าง G-quartet ตำแหน่งบนสุดและ G-quartet ตำแหน่งล่างสุดที่อยู่ด้านเดียวกัน ส่วนโครงสร้างจิวอดรูเพลิกซ์แบบ antiparallel จะมี 2 loop คือ lateral loop และ diagonal loop โดย lateral loop จะเชื่อมระหว่าง G-quartet ที่อยู่ติดกัน ส่วน diagonal loop จะเชื่อมระหว่าง G-quartet ที่อยู่ตรงข้ามกัน (13, 16) (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 (ก) lateral loop (ข) propeller loop หรือ chain-reversal หรือ external loop (ค) diagonal loop

2.2 รูปแบบสเปกตรัมของโครงสร้างดีเอ็นเอแบบต่างๆ

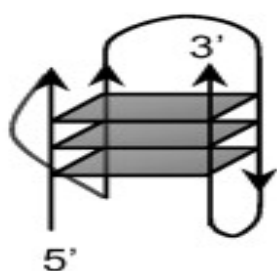
โครงสร้างควอดรูเพล็กซ์มีหลายรูปแบบ ซึ่งแต่ละรูปแบบสามารถแยกจากกันโดยการวัดสเปกตรัมด้วยวิธี Circular Dichroism (CD) โดยโครงสร้างแบบ parallel จะมี positive band อยู่ในช่วง 260-265 nm และ negative band อยู่ในช่วง 240-245 nm และหากมี external loop อยู่ในโครงสร้างจะมี shoulder ที่ประมาณ 290 nm เพิ่มขึ้นมา ส่วนโครงสร้างแบบ antiparallel จะมี positive band ที่ประมาณ 290-295 nm และ negative band ที่ประมาณ 260-265 nm ถึงแม้ว่าสเปกตรัมของ โครงสร้างแบบ parallel จะคล้ายคลึงกับ โครงสร้างดีเอ็นเอแบบ A-form แต่สามารถแยกจากความแตกต่างได้โดย โครงสร้างควอดรูเพล็กซ์ทุกรูปแบบจะมี positive band ที่ประมาณ 210 nm ซึ่งเป็นลักษณะพิเศษขึ้นมา ขณะที่โครงสร้างดีเอ็นเอแบบ A-form จะมี negative band ที่ประมาณ 210 nm (17-21) (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 สเปกตรัมของโครงสร้างควอดรูเพล็กซ์ (ก) แบบ parallel (ข) แบบ antiparallel (ค) แบบ parallel ที่มี external loop

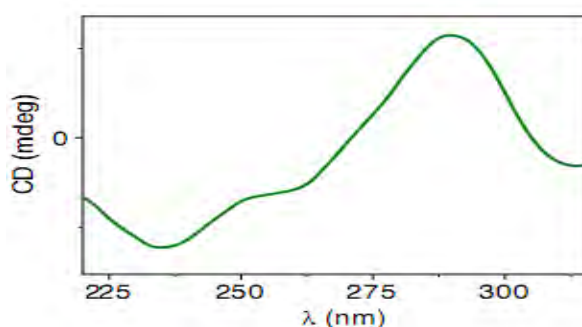
นอกจากนี้ยังมีโครงสร้างควอดรูเพล็กซ์แบบ mixed parallel/antiparallel ซึ่งให้ positive band อยู่ที่ประมาณ 290 nm negative band อยู่ที่ประมาณ 240 nm และมี shoulder อยู่ที่ประมาณ 270 nm (21-25) (ภาพที่ 6)

(ก)



(ข)

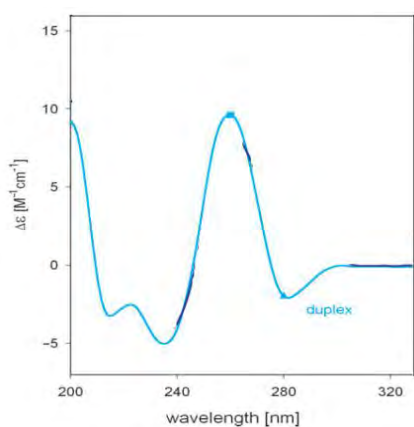
GGG TTA GGG TTA GGG TTA GGG



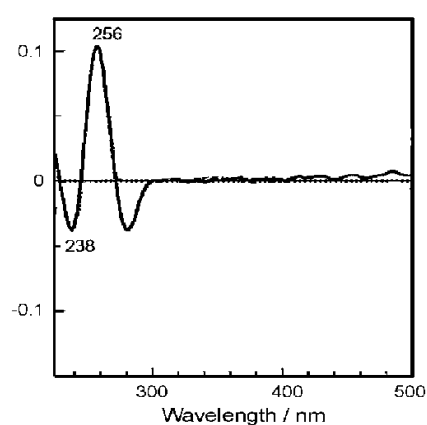
ภาพที่ 6 (ก) โครงสร้างควอดรูเพล็กซ์แบบ mixed parallel/antiparallel (ข) สเปกตรัมของโครงสร้างควอดรูเพล็กซ์แบบ mixed parallel/antiparallel

สำหรับโครงสร้างแบบ unstructured DNA จะให้ positive band อยู่ที่ประมาณ 256 nm และ negative band อยู่ที่ประมาณ 238 nm (17, 21) (ภาพที่ 7)

d(CCCCCGGGGG)



d(TTAGGG)₂



ภาพที่ 7 สเปกตรัมของโครงสร้างแบบ unstructured DNA

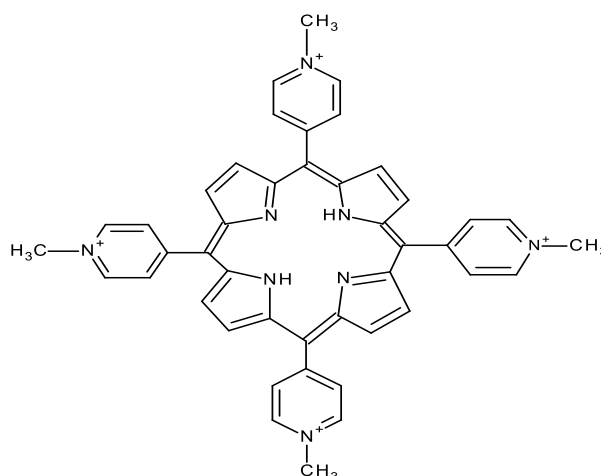
2.3 ลิแกนด์ที่ใช้ในการศึกษา

2.3.1 TMPyP4

TMPyP4 เป็นอนุพันธ์ของพอร์ไฟรินที่มีประจุบวก (cationic porphyrin) ที่นิยมใช้เป็นลิแกนด์เพื่อศึกษาแนวทางในการรักษาโรคมะเร็ง เนื่องจากมีโครงสร้างของพอร์ไฟรินที่เป็น aromatic rings จัดเรียงตัวในแนวระนาบ จึงสามารถเข้าไปจับกับโครงสร้างควอดรูเพล็กซ์และทำให้โครงสร้างนั้นมีความเสถียร (8)

จากการทดลองของ Zhang H และคณะพบว่า ในสถานะที่ไม่มีไอออนบวก โมเลกุล TMPyP4 สามารถเหนี่ยวนำให้โครงสร้างดีเอ็นเอสายเดี่ยวเปลี่ยนแปลงเป็นโครงสร้างควอดรูเพล็กซ์แบบ antiparallel ได้ และในสถานะที่มีไอออนบวก เช่น K^+ โมเลกุล TMPyP4 สามารถเปลี่ยนโครงสร้างควอดรูเพล็กซ์แบบ parallel ให้เป็นแบบ mixed parallel/antiparallel ได้อีกด้วย (21)

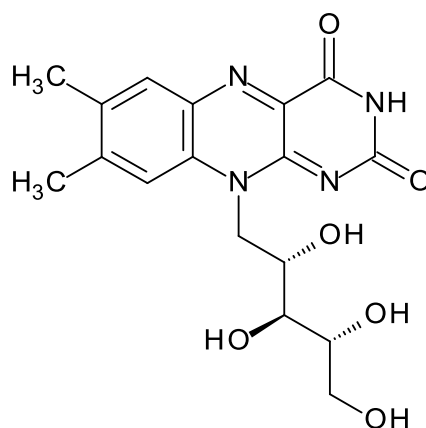
จากปริญญานิพนธ์ของนางสาวศิศญา แสงเป่า และคณะ (2010) ซึ่งศึกษาการเกิดโครงสร้างควอดรูเพล็กซ์บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน SRF พบว่า ในสถานะที่มี K^+ โมเลกุล TMPyP4 สามารถเหนี่ยวนำให้โครงสร้างดีเอ็นเอสายเดี่ยวเปลี่ยนแปลงเป็นโครงสร้างควอดรูเพล็กซ์แบบ parallel ที่มี external loop ได้ ส่วนในสถานะที่มี Na^+ โมเลกุล TMPyP4 สามารถเปลี่ยนโครงสร้างควอดรูเพล็กซ์แบบ antiparallel ให้เป็นแบบ parallel ที่มี external loop ได้ (4) อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า TMPyP4 จับกับ ดีเอ็นเอสายเดี่ยว ดีเอ็นเอสายคู่ ดีเอ็นเอสามสาย และ โครงสร้างควอดรูเพล็กซ์ ด้วยความสามารถในการจับใกล้เคียงกัน ($K_d \cong 200$ nM) ดังนั้น TMPyP4 จึงเป็นลิแกนด์ที่จับกับโครงสร้างของสายนิวคลีโอไทด์ได้อย่างไม่จำเพาะ (1) สามารถใช้เป็น positive control เพื่อยืนยันผลการเกิดโครงสร้างควอดรูเพล็กซ์ได้ แต่หากต้องการให้โครงสร้างนั้นมีความเสถียรมากขึ้นจะต้องอาศัยลิแกนด์ตัวอื่นที่สามารถจับได้อย่างจำเพาะ



ภาพที่ 8 โครงสร้างของ meso 5,10,15,20-tetrakis-(N-methyl-4-pyridyl) porphyrin (TMPyP4)

2.3.2 Riboflavin (Vitamin B2)

Riboflavin เป็นสารในกลุ่ม flavin หรือ Isoalloxazines การออกแบบ Isoalloxazines เพื่อใช้เป็นลิแกนด์สำหรับจับกับโครงสร้างควอครูเพลิกซ์ เริ่มต้นมาจากรายงานของ Lauhon และคณะ ซึ่งพบว่า oxidized riboflavin สามารถจับกับโครงสร้างควอครูเพลิกซ์ ที่เป็น intramolecular ภายในอาร์เอ็นเอ (RNA) แบบจำเพาะปานกลาง ($K_d = 1-5 \mu\text{M}$) (10) นอกจากนี้จากรายงานของ Malleshram Bejugam และคณะ ซึ่งออกแบบและสังเคราะห์อนุพันธ์ของ 3,8,10-trisubstituted isoalloxazines พบว่าลิแกนด์ดังกล่าวจับกับโครงสร้างควอครูเพลิกซ์บริเวณ โพร โมเตอร์ของยีน c-kit แบบจำเพาะเมื่อเทียบกับดีเอ็นเอ (Quadruplex $K_d = 3 - 30 \mu\text{M}$ และ Duplex $K_d > 200 \mu\text{M}$) แต่ยังไม่มียารละเอียดยกเกี่ยวกับลักษณะของการจับกันระหว่าง isoalloxazines และ โครงสร้างควอครูเพลิกซ์ แต่เชื่อว่าการมีโครงสร้างที่เป็น Isoalloxazine ซึ่งจัดเรียงในแนวระนาบทำให้สามารถจับกับโครงสร้างควอครูเพลิกซ์ได้ดีกว่าดีเอ็นเอสายคู่ (1, 26, 27)



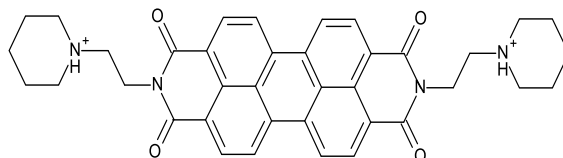
ภาพที่ 9 โครงสร้างของ riboflavin (3,10-dihydro-7,8-dimethyl-10-[(2S,3S,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl]benzopteridine-2,4-dione)

2.3.3 PIPER (N,N'-bis-[2-(1-piperidino)ethyl]-3,4,9,10-perylene tetracarboxylic acid diimide)

ในปี 1966 Irwin Kuntz ได้ค้นพบว่าลิแกนด์กลุ่ม Perylene มีอันตรกิริยากับโครงสร้างควอดรูเพลิกส์โดยใช้โปรแกรม DOCK หลังจากนั้น Fedoroff และคณะได้ออกแบบและสังเคราะห์ *N,N'*-bis[2-(1-piperidino)-ethyl]-3,4,9,10-perylenetetracarboxylic diimide (PIPER) (8) (ภาพที่ 10) โดยมีประจุบวกจำนวนสองประจุที่ปลายของโมเลกุล ซึ่งเชื่อว่าจะเกิด electrostatic interaction กับ groove ของโครงสร้างควอดรูเพลิกส์ และจากโครงสร้าง NMR พบว่า PIPER มีรูปแบบการจับกับโครงสร้างควอดรูเพลิกส์คล้ายกับอนุพันธ์ porphyrins (external stacking กับ G-tetrads) เกิดเป็น 2:1 quadruplex/PIPER complex โดย PIPER หนึ่งโมเลกุลอยู่ระหว่างโครงสร้างควอดรูเพลิกส์สองโมเลกุล (28, 29)

โมเลกุล PIPER จับกับโครงสร้างควอดรูเพลิกส์แบบจำเพาะและจับกับดีเอ็นเอสายคู่ได้เล็กน้อยภายในสถานะเป็นค่า PIPER จะรวมตัวกันและจับกับโครงสร้างควอดรูเพลิกส์ได้มากกว่าดีเอ็นเอสายคู่ประมาณ 10^3 เท่า อย่างไรก็ตามที่ pH 7 จะจับโครงสร้างควอดรูเพลิกส์ได้มากกว่าดีเอ็นเอสายคู่แค่ประมาณ 10 เท่า (28)

นอกจากโมเลกุล PIPER จะสามารถจับกับโครงสร้างควอดรูเพลิกส์และทำให้โครงสร้างนั้นเสถียรแล้วยังสามารถเหนี่ยวนำโครงสร้างดีเอ็นเอสายเดี่ยวหรือสายคู่ให้เกิดโครงสร้างควอดรูเพลิกส์ได้อีกด้วย (8, 29-31)



ภาพที่ 10 โครงสร้างของ *N,N'*-bis-[2-(1-piperidino)ethyl]-3,4,9,10-perylene tetracarboxylic acid diimide (PIPER)

2.4 ผลของไอออนบวกและ TMPyP4

ตารางที่ 1 ผลของไอออนบวกและ TMPyP4 ต่อการเกิดโครงสร้างควอดรูเพิลิกซ์จาก
ปริญญานิพนธ์ของนางสาวศิศญา แสงเป่า และคณะ (4)

ลำดับเบส	วิธีที่ใช้ในการศึกษา	ไอออนบวก	DNA:TMPyP4	ความร้อน	รูปแบบโครงสร้าง	T _m (°C)
GGGAAA GGGAAG GGAAGTT GGGGTA GGGG	CD spectroscopy	100 mM Na ⁺	-	ไม่ให้	mixed parallel/ antiparallel	-
		100 mM Na ⁺	-	ให้	antiparallel	47.45
		100 mM K ⁺	-	ไม่ให้/ให้	parallel ที่มี external loop	73.77
		Na ⁺ : K ⁺ = 1:1	-	ไม่ให้/ให้	parallel ที่มี external loop	-
		Na ⁺ : K ⁺ = 2:3	-	ไม่ให้/ให้	parallel ที่มี external loop	-
		Na ⁺ : K ⁺ = 3:2	-	ไม่ให้/ให้	parallel ที่มี external loop	-
		-	1:1	ไม่ให้/ให้	undefined	-
		-	1:2	ไม่ให้/ให้	parallel ที่มี external loop	-
		-	1:5	ไม่ให้/ให้	undefined	38.62
		100 mM K ⁺	1:2	ไม่ให้/ให้	parallel ที่มี external loop	-
100 mM K ⁺	1:5	ไม่ให้/ให้	parallel ที่มี external loop	79.66		

ลำดับเบส	วิธีที่ใช้ในการศึกษา	ไอออนบวก	DNA:TMPyP4	ความร้อน	รูปแบบโครงสร้าง	T _m (°C)
GGGAAAG	CD spectroscopy	100 mM Na ⁺	1:2	ไม่ให้/ให้	undefined	-
GGAAGGG		100 mM Na ⁺	1:5	ไม่ให้/ให้	parallel ที่มี external loop	46.33
AAGTTGG						
GGGTAGG						
GG						

ตารางที่ 2 ผลของไอออนบวกและ TMPyP4 ต่อการเกิดโครงสร้างควอดรูเพิล็กซ์ของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่มีลำดับเบสต่างๆในหลายสภาวะ จากการทบทวนวรรณกรรมต่างๆ

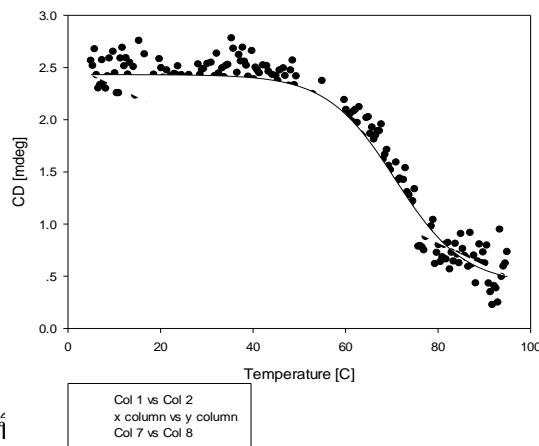
ลำดับเบส	ไอออนบวก	DNA:TMPyP4	โครงสร้าง	วิธีที่ใช้ในการศึกษา	อ้างอิง
d(GGGGTTTTGGGG)	1 mM Na ⁺	-	antiparallel	CD spectroscopy	(32)
	100 mM Na ⁺	-	antiparallel	CD spectroscopy	(33)
d(TTAGGGTTAGGG)	10 mM K ⁺	-	parallel ที่มี external loop	CD spectroscopy และ NMR spectroscopy	(34)
	100 mM K ⁺	-	parallel ที่มี external loop		
	-	1:9.2	antiparallel	CD spectroscopy และ NMR spectroscopy	(35)
	10 mM K ⁺	1:5	mixed parallel/antiparallel		
d(TTAGGG)	10 mM K ⁺	1:10 2:10 4:10	parallel	CD spectroscopy	(20)

2.5 การศึกษาความคงตัวของทางอุณหพลศาสตร์ของโครงสร้างควอคูรูเพลิกซ์

ความคงตัวของทางอุณหพลศาสตร์ของโครงสร้างควอคูรูเพลิกซ์สามารถหาได้จากค่า melting temperature (T_m) โดยค่า T_m คืออุณหภูมิที่ทำให้สัดส่วนครึ่งหนึ่งของโครงสร้างควอคูรูเพลิกซ์ แยกจากกันกลายเป็นดีเอ็นเอสายคู่หรือสายเดี่ยว ค่า T_m สามารถหาได้จากเครื่องมือ Circular Dichroism (CD) หรือ UV-visible Spectroscopy โดยพล็อตกราฟระหว่าง CD signal หรือ UV absorbance ที่ 260 หรือ 295 นาโนเมตร และอุณหภูมิต่างๆ จากนั้นใช้สมการ non-linear least-squares เพื่อหาค่า T_m ซึ่งมีความสำคัญมากในการเปรียบเทียบ

T_m curve 10 uM SRF 100 mM K⁺ 1XTE pH 7.4 ับโครงสร้าง
 $f = y_0 + a / (1 + \exp(-(x-x_0)/b))$

ควอคูรูเพลิกซ์ (36)



ภาพ

opy

2.6 การศึกษาอันตรกิริยาของลิแกนด์และโครงสร้างควอคูรูเพลิกซ์

วิธีที่ใช้ในการศึกษาอันตรกิริยาระหว่างลิแกนด์และโครงสร้างควอคูรูเพลิกซ์ ได้แก่ UV-Visible absorption titration โดยเติมสารละลายดีเอ็นเอลงไปในสารละลายลิแกนด์ที่กำหนดความเข้มข้น แล้วไทเทรตไปเรื่อยๆ จะเห็นว่าสเปกตรัมมีการเปลี่ยนแปลงคือ สเปกตรัมเลื่อนไปทางความยาวคลื่นมากขึ้น (bathochromic shift) และ ค่าการดูดกลืนแสงลดลง (hypochromic effect) แสดงว่ามีการเกิด complex ระหว่างลิแกนด์และโครงสร้างควอคูรูเพลิกซ์ (37) นอกจากนี้ยังสามารถหาอัตราส่วนของการจับ (binding stoichiometry) และทำนายรูปแบบของการจับได้ เช่น intercalation, groove binding และ external stacking แต่ต้องอาศัยวิธีอื่นในการยืนยันผลด้วย เช่น gel electrophoresis (38)

บทที่ 3

เครื่องมือที่ใช้และวิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมี

- 1) Dimethylsulfoxide (DMSO) (C_2H_6OS ; MW 78.13 g/mole)
- 2) Ethanol (CH_3CH_2OH ; MW 46.07 g/mole)
- 3) Hydrochloric acid (HCl; MW 36.46 g/mole)
- 4) meso-tetrakis-(N-methyl-4-pyridyl)-porphyrin (TMPyP4) (MW 1363.60 g/mole)
- 5) Methanol (CH_3OH ; MW 32.04 g/mole)
- 6) Milli Q water
- 7) Nitrogen gas
- 8) N,N,N',N'-ethylenediaminetetraacetic acid, disodium salt, dehydrate (Disodium EDTA; MW 372.24 g/mole)
- 9) N,N'-bis-(2-(1-piperidino)ethyl)-3,4,9,10-perylene tetracarboxylic acid diimide (PIPER; MW 612.7 g/mole)
- 10) Potassium Chloride (KCl; MW 74.55 g/mole)
- 11) Riboflavin ($C_{17}H_{20}N_4O_6$; MW 376.36 g/mole)
- 12) Sodium Chloride (NaCl; MW 58.44 g/mole)
- 13) Sodium Hydroxide (NaOH; MW 40.00 g/mole)
- 14) Synthetic oligodeoxynucleotide (Pacific science) โดยมีลำดับเบส ดังตารางที่ 3
ตารางที่ 3 ลำดับเบสของ Synthetic oligodeoxynucleotide ที่ใช้ในการวิจัย

Name	Sequence (5'-3')	MW (g/mole)	OD per μ mole	%GC	T_m ($^{\circ}C$)
SRF promoter 01	GGGAAAGGGAAGGGA AGTTGGGGGTAGGGG	9,611.30	334.4	63.33	71.60

- 15) Tris (hydroxymethyl)aminomethane (Tris) (MW 121.14 g/mole)

3.2 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือ

- 1) Jasco J-815 CD Spectrometer
- 2) Jasco PTC-423S/15 Temperature controller
- 3) Nanodrop spectrophotometer
- 4) Vortex-2 Genie (Scientific Industries)
- 5) Microcentrifuge (Daiham Labtech)
- 6) เครื่องชั่ง Sartorius BT 224S
- 7) pH meter Mettler Toledo
- 8) Heidolph MR3001 Hotplate
- 9) Micropipette ขนาด 2, 10, 20, 100, 200 และ 1000 μ L
- 10) Quartz cuvette ขนาด 0.2, 0.5 cm
- 11) Centrifuge tube ขนาด 10, 50 mL
- 12) Microcentrifuge tube 1.5 mL (Axygen Scientific)
- 13) Micropipette tip (Axygen Scientific)
- 14) Rubber glove
- 15) UV Spectrophotometer (Evolution 600 PC Thermo Scientific)

3.3 การเตรียมสารเคมีและตัวอย่างที่จะนำมาวิเคราะห์

- 1) การเตรียม 500 mM Disodium EDTA stock solution pH 8.0
ชั่ง Disodium EDTA 18.612 g ละลายด้วย milli Q water ปรับ pH ด้วย 6 M NaOH
ปรับปริมาตรจนครบ 100 mL นำไป autoclave
- 2) การเตรียม 500 mM Tris stock solution pH 7.4
ชั่ง Tris 6.057 g ละลายด้วย milli Q water ปรับ pH ด้วย 6M HCl ปรับปริมาตรจนครบ
100 mL นำไป autoclave
- 3) การเตรียม 10 X TE buffer Stock solution pH 7.4
ตวงสารละลาย Tris ปริมาตร 20 mL และสารละลาย Disodium EDTA 2 mL เจือจางด้วย
milli Q water ปรับ pH ปรับปริมาตรจนครบ 100 mL

- 4) การเตรียม 1XTE buffer solution pH 7.4
ดวงสารละลาย 10 X TE buffer pH 7.4 ปริมาตร 1 ส่วน เจือจางด้วย milli Q water ปรับ
ปริมาตรจนครบ 10 ส่วน
- 5) การเตรียม 2M Sodium chloride solution
ชั่ง Sodium chloride 11.688 g ละลายด้วย milli Q water ปรับปริมาตรจนครบ 100 mL
นำไป autoclave
- 6) การเตรียม 2M Potassium chloride solution
ชั่ง Potassium chloride 14.910 g ละลายด้วย milli Q water ปรับปริมาตรจนครบ 100 mL
นำไป autoclave
- 7) การเตรียม 10 mM TMPyP4
ชั่ง TMPyP4 13.64 mg ละลายด้วย milli Q water 1 mL
- 8) การเตรียม 10 mM PIPER
ชั่ง PIPER 2.75 mg ละลายด้วย 0.2% TFA ใน DMSO 450 μ L
- 9) การเตรียม 5 mM Riboflavin
ชั่ง Riboflavin 37.636 mg ละลายด้วย DMSO 20 mL และนำไป sonicate 30 นาที
- 10) การเตรียม 0.2 %TFA ใน DMSO
ปิเปต TFA 20 μ L ละลายด้วย DMSO จนได้ 10 mL
- 11) การเตรียม SRF promoter 01 stock solution 200 μ L
ปิเปต 1X TE buffer pH 7.4 ปริมาตร 200 μ L ลงในขวด lyophilized SRF promoter 01 ทำ
ให้ละลายด้วยเครื่อง vortex mixer และปั่นตกด้วยเครื่อง centrifuge จากนั้นนำตัวอย่างไป
วัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง Nanodrop spectrophotometer
- 12) การเตรียมตัวอย่าง SRF promoter 10 μ M ที่มี NaCl 100 mM, KCl 100 mM และอัตราส่วน
ระหว่าง NaCl : KCl = 1:1 ใน 1X TE buffer pH 7.4 ปริมาตร 400 μ L
ปิเปต SRF promoter, NaCl, KCl และ 1X TE buffer pH 7.4 ลงใน eppendorf ตามปริมาตร
ที่กำหนด ดังแสดงในตารางที่ 4 ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer

ตารางที่ 4 การเตรียมตัวอย่าง SRF promoter 01 ความเข้มข้น 10 μM ที่มี NaCl 100 mM, KCl 100 mM และอัตราส่วนระหว่าง NaCl : KCl = 1:1 ใน 1X TE buffer pH 7.4 ปริมาตร 400 μL

	SRF promoter 01 390.25 μM (μL)	2M NaCl (μL)	2M KCl (μL)	1X TE buffer pH 7.4 (μL)	Final Volume (μL)
No salt	10.25	-	-	389.75	400
100 mM Na ⁺	10.25	20	-	369.75	400
Na ⁺ :K ⁺ = 1:1	10.25	10	10	369.75	400
100 mM K ⁺	10.25	-	20	369.75	400

13) การเตรียมตัวอย่าง SRF promoter 01 10 μM ที่มี TMPyP4 ใน 1X TE buffer pH 7.4 ปริมาตร 400 μL

ปิเปต SRF promoter, TMPyP4 และ 1X TE buffer pH 7.4 ลงใน eppendorf ตามปริมาตรที่กำหนด ดังแสดงในตารางที่ 5 ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer

ตารางที่ 5 การเตรียมตัวอย่าง SRF promoter 01 ความเข้มข้น 10 μM ที่มี TMPyP4 ใน 1X TE buffer pH 7.4 ปริมาตร 400 μL

DNA:TMPyP4	SRF promoter 01 390.25 μM (μL)	TMPyP4 10 mM (μL)	1X TE buffer pH 7.4 (μL)	Final Volume (μL)
1:5	10.25	2	387.75	400

14) การเตรียมตัวอย่าง SRF promoter 01 10 μM ที่มี TMPyP4 และ NaCl หรือ KCl ใน 1X TE buffer pH 7.4 ปริมาตร 400 μL

ปิเปต SRF promoter 01, TMPyP4, NaCl, KCl และ 1XTE buffer pH 7.4 ลงใน eppendorf ตามปริมาณที่กำหนด ดังแสดงในตารางที่ 6 ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer

ตารางที่ 6 การเตรียมตัวอย่าง SRF promoter 01 ความเข้มข้น 10 μM ที่มี TMPyP4 และ NaCl 100 mM หรือ KCl 100 mM ใน 1X TE buffer pH 7.4 ปริมาตร 400 μL

DNA:TMPyP4	SRF promoter 01 390.25 μM (μL)	TMPyP4 10 mM (μL)	2M NaCl (μL)	2M KCl (μL)	1X TE buffer pH 7.4 (μL)	Final Volume (μL)
1:5	10.25	2	20	-	367.75	400
1:5	10.25	2	-	20	367.75	400

15) การเตรียมตัวอย่าง SRF promoter 01 10 μM ที่มี Riboflavin ใน 1X TE buffer pH 7.4 ปริมาตร 400 μL

ปิเปต SRF promoter, Riboflavin และ 1X TE buffer pH 7.4 ลงใน eppendorf ตามปริมาณที่กำหนด ดังแสดงในตารางที่ 7 ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer

ตารางที่ 7 การเตรียมตัวอย่าง SRF promoter 01 ความเข้มข้น 10 μM ที่มี Riboflavin ใน 1X TE buffer pH 7.4 ปริมาตร 400 μL

DNA:Riboflavin	SRF promoter 01 390.25 μM (μL)	Riboflavin 5 mM (μL)	1X TE buffer pH 7.4 (μL)	Final Volume (μL)
1:1	10.25	0.8	388.95	400
1:5	10.25	4	385.75	400

16) การเตรียมตัวอย่าง SRF promoter 01 10 μM ที่มี Riboflavin และ NaCl หรือ KCl ใน 1X TE buffer pH 7.4 ปริมาตร 400 μL

ปีเปิด SRF promoter 01, Riboflavin, NaCl, KCl และ 1XTE buffer pH 7.4 ลงใน eppendorf ตามปริมาณที่กำหนด ดังแสดงในตารางที่ 8 ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer

ตารางที่ 8 การเตรียมตัวอย่าง SRF promoter 01 ความเข้มข้น 10 μM ที่มี Riboflavin และ NaCl 100 mM หรือ KCl 100 mM ใน 1X TE buffer pH 7.4 ปริมาตร 400 μL

DNA:Riboflavin	SRF promoter 01 390.25 μM (μL)	Riboflavin 5 mM (μL)	2M NaCl (μL)	2M KCl (μL)	1X TE buffer pH 7.4 (μL)	Final Volume (μL)
1:1	10.25	0.8	20	-	368.95	400
1:1	10.25	0.8	-	20	368.95	400
1:5	10.25	4	20	-	367.75	400
1:5	10.25	4	-	20	367.75	400

17) การเตรียมตัวอย่าง SRF promoter 01 10 μM ที่มี PIPER ใน 1X TE buffer pH 7.4 ปริมาตร 400 μL

ปีเปิด SRF promoter, PIPER และ 1X TE buffer pH 7.4 ลงใน eppendorf ตามปริมาณที่กำหนด ดังแสดงในตารางที่ 9 ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer

ตารางที่ 9 การเตรียมตัวอย่าง SRF promoter 01 ความเข้มข้น 10 μM ที่มี PIPER ใน 1X TE buffer pH 7.4 ปริมาตร 400 μL

DNA:PIPER	SRF promoter 01 390.25 μM (μL)	PIPER 10 mM (μL)	1X TE buffer pH 7.4 (μL)	Final Volume (μL)
1:1	10.25	0.4	389.35	400
1:5	10.25	2	387.75	400

18) การเตรียมตัวอย่าง SRF promoter 01 10 μM ที่มี PIPER และ NaCl หรือ KCl ใน 1XTE buffer pH 7.4 ปริมาตร 400 μL

เปิด SRF promoter 01, PIPER, NaCl, KCl และ 1XTE buffer pH 7.4 ลงใน eppendorf ตามปริมาณที่กำหนด ดังแสดงในตารางที่ 10 ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer

ตารางที่ 10 การเตรียมตัวอย่าง SRF promoter 01 ความเข้มข้น 10 μM ที่มี PIPER และ NaCl 100 mM หรือ KCl 100 mM ใน 1X TE buffer pH 7.4 ปริมาตร 400 μL

DNA:PIPER	SRF promoter 01 390.25 μM (μL)	PIPER 10 mM (μL)	2M NaCl (μL)	2M KCl (μL)	1X TE buffer pH 7.4 (μL)	Final Volume (μL)
1:1	10.25	0.4	20	-	369.35	400
1:1	10.25	0.4	-	20	369.35	400
1:5	10.25	2	20	-	367.75	400
1:5	10.25	2	-	20	367.75	400

19) การเตรียม 1 mM TMPyP4 จาก 10 mM TMPyP4 stock เพื่อใช้ในการไทเทรตปริมาตร 50 μL
 ปิเปิด 10 mM TMPyP4 มา 5 μL ลงใน eppendorf เจือจางด้วย milli Q water 45 μL ผสม
 ให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer

20) การเตรียมตัวอย่าง TMPyP4 ความเข้มข้น 3.5 μM ที่มี 100 mM NaCl หรือ 100 mM KCl ใน
 1X TE buffer pH 7.4 ปริมาตร 300 μL

ปิเปิด TMPyP4, NaCl, KCl และ 1X TE buffer pH 7.4 ลงใน eppendorf ตามปริมาตรที่
 กำหนด ดังแสดงในตารางที่ 11 ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer

ตารางที่ 11 การเตรียมตัวอย่าง TMPyP4 ความเข้มข้น 3.5 μM ที่มี NaCl 100 mM หรือ KCl 100 mM
 ใน 1X TE buffer pH 7.4 ปริมาตร 300 μL

TMPyP4 3.5 μM	TMPyP4 1 mM (μL)	2M NaCl (μL)	2M KCl (μL)	1X TE buffer pH 7.4 (μL)	Final Volume (μL)
100 mM Na ⁺	1.05	15	-	283.95	300
100 mM K ⁺	1.05	-	15	283.95	300

21) การเตรียมตัวอย่าง Riboflavin ความเข้มข้น 35 μM ที่มี 100 mM NaCl หรือ 100 mM KCl ใน
 1X TE buffer pH 7.4 ปริมาตร 300 μL

ปิเปิด Riboflavin, NaCl, KCl และ 1X TE buffer pH 7.4 ลงใน eppendorf ตามปริมาตรที่
 กำหนด ดังแสดงในตารางที่ 12 ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer

ตารางที่ 12 การเตรียมตัวอย่าง Riboflavin ความเข้มข้น 35 μM ที่มี 100 mM NaCl หรือ 100 mM KCl ใน 1X TE buffer pH 7.4 ปริมาตร 300 μL

Riboflavin 35 μM	Riboflavin 5 mM (μL)	2M NaCl (μL)	2M KCl (μL)	1X TE buffer pH 7.4 (μL)	Final Volume (μL)
100 mM Na ⁺	2.1	15	-	382.9	300
100 mM K ⁺	2.1	-	15	382.9	300

22) การเตรียมตัวอย่าง PIPER ความเข้มข้น 30 μM ที่มี 100 mM NaCl หรือ 100 mM KCl ใน 1X TE buffer pH 7.4 ปริมาตร 300 μL

ปีเปต PIPER, NaCl, KCl และ 1X TE buffer pH 7.4 ลงใน eppendorf ตามปริมาตรที่กำหนด ดังแสดงในตารางที่ 13 ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer

ตารางที่ 13 การเตรียมตัวอย่าง PIPER ความเข้มข้น 30 μM ที่มี 100 mM NaCl หรือ 100 mM KCl ใน 1X TE buffer pH 7.4 ปริมาตร 300 μL

PIPER 30 μM	PIPER 10 mM (μL)	2M NaCl (μL)	2M KCl (μL)	1X TE buffer pH 7.4 (μL)	Final Volume (μL)
100 mM Na ⁺	0.9	15	-	284.1	300
100 mM K ⁺	0.9	-	15	284.1	300

3.4 ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

1) การศึกษาโครงสร้างของ quadruplex โดยวัดสเปกตรัมของตัวอย่าง

แต่ละตัวอย่างจะถูกเตรียมก่อนนำไปวัดสเปกตรัมใน 3 สภาวะ คือ

- ไม่ให้ความร้อน
- ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำให้เย็นลงอย่างช้า ๆ

นำไปวัดด้วยเครื่อง Jasco J-815 CD Spectrometer โดยใช้ quartz cuvette ที่มี ความกว้าง 0.2 cm แต่ละตัวอย่างจะถูกวัดซ้ำ 3 ครั้ง จาก 200-320 nm (ยกเว้นตัวอย่าง ที่มี TMPyP4, Riboflavin, PIPER จะวัดจาก 200-500 nm) ที่อุณหภูมิ 25 °C อัตราเร็ว ในการวัดจะอยู่ที่ 50 nm/min

2) การหาค่า melting temperature (T_m)

ตัวอย่างที่จะวัดคือ

- SRF promoter 01 ที่มี KCl 100 mM
- SRF promoter 01 ที่มี NaCl 100 mM
- SRF promoter 01 ที่มี TMPyP4 (อัตราส่วนระหว่าง DNA กับ TMPyP4 = 1 : 5)
- SRF promoter 01 ที่มี KCl 100 mM และ TMPyP4 (อัตราส่วนระหว่าง DNA กับ TMPyP4 = 1 : 5)
- SRF promoter 01 ที่มี NaCl 100 mM และ TMPyP4 (อัตราส่วนระหว่าง DNA กับ TMPyP4 = 1 : 5)
- SRF promoter 01 ที่มี KCl 100 mM และ Riboflavin (อัตราส่วนระหว่าง DNA กับ Riboflavin = 1 : 5)
- SRF promoter 01 ที่มี NaCl 100 mM และ Riboflavin (อัตราส่วนระหว่าง DNA กับ Riboflavin = 1 : 5)
- SRF promoter 01 ที่มี PIPER (อัตราส่วนระหว่าง DNA กับ PIPER = 1 : 5)
- SRF promoter 01 ที่มี KCl 100 mM และ PIPER (อัตราส่วนระหว่าง DNA กับ PIPER = 1 : 5)

- SRF promoter 01 ที่มี NaCl 100 mM และ PIPER (อัตราส่วนระหว่าง DNA กับ PIPER = 1 : 5)

นำไปวัดด้วยเครื่อง Jasco J-815 CD Spectrometer โดยใช้ quartz cuvette ที่มีความกว้าง 0.2 cm แต่ละตัวอย่างจะถูกวัดซ้ำ 3 ครั้ง จาก 200-320 nm (ยกเว้นตัวอย่างที่มี TMPyP4, Riboflavin, PIPER จะวัดจาก 200-500 nm) วัดที่อุณหภูมิ 5-95 °C โดยเพิ่มทีละ 5 °C อัตราเร็วในการวัดอยู่ที่ 50 nm/min

จากนั้นนำค่าที่ได้ไปพล็อตกราฟในโปรแกรม SigmaPlot และคำนวณค่า T_m จากสมการ Sigmoid

3) การทำ Uv-vis absorption titration

ตัวอย่างที่จะวัดคือ

- TMPyP4 ความเข้มข้น 3.5 μ M ที่มี 100 mM NaCl
- TMPyP4 ความเข้มข้น 3.5 μ M ที่มี 100 mM KCl
- Riboflavin ความเข้มข้น 35 μ M ที่มี 100 mM NaCl
- Riboflavin ความเข้มข้น 35 μ M ที่มี 100 mM KCl
- PIPER ความเข้มข้น 30 μ M ที่มี 100 mM NaCl
- PIPER ความเข้มข้น 30 μ M ที่มี 100 mM KCl

นำไปวัด Absorbance ด้วยเครื่อง Spectrophotometer รุ่น EVOLUTION 600 PC โดยใช้ quartz cuvette ที่มีความกว้าง 0.5 cm แต่ละตัวอย่างจะถูกวัดซ้ำ 3 ครั้ง จาก 200-500 nm (ยกเว้นตัวอย่างที่มี PIPER จะวัดจาก 200-600 nm) โดยการไทเทรตด้วย SRF promoter 01 ด้วยความเข้มข้นที่เหมาะสมเพื่อให้ได้จำนวนจุดที่เข้าสู่สมดุล 15-25 จุด ซึ่งสังเกตจากการวัด absorbance ที่ได้ไม่เปลี่ยนแปลงค่าและไม่เกิดการ shift อย่างน้อย 3 ค่าติดต่อกัน

จากนั้นนำค่าที่ได้ไปพล็อตกราฟในโปรแกรม SigmaPlot

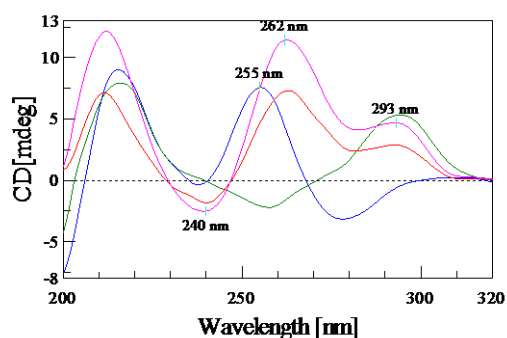
บทที่ 4

ผลและอภิปรายผลการวิจัย

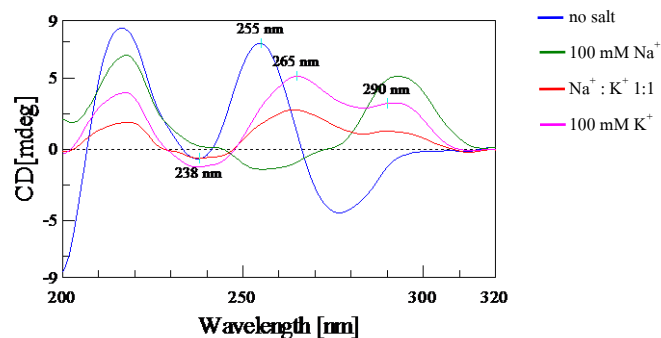
1. การศึกษาโครงสร้างของ quadruplex โดยวัดสเปกตรัมของตัวอย่าง

1.1. ผลของเกลือที่มีต่อการเกิดโครงสร้าง quadruplex ของ SRF promoter 01

(ก)



(ข)



ภาพที่ 12 สเปกตรัมของ SRF promoter 01 10 μM ที่มีเกลือ NaCl และ KCl อัตราส่วนต่างๆ ในบัฟเฟอร์ 1XTE pH 7.4 วัดด้วยเครื่อง CD ที่ 200-320 nm ที่ 25°C (ก) ไม่ให้ความร้อน (ข) ให้ความร้อนที่ 95°C 5 นาที แล้วทำให้เย็นลงอย่างช้าๆ

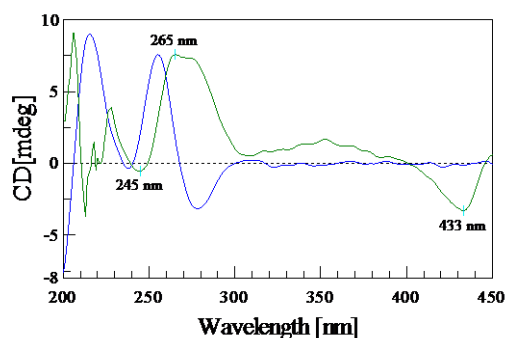
ในทั้งสองสถานะที่ให้และไม่ให้ความร้อน ตัวอย่างที่ไม่มี Na^+ และ K^+ พบว่าสเปกตรัมมี positive peak ที่ประมาณ 255 nm และ negative peak ที่ประมาณ 238 nm ซึ่งเป็นลักษณะของ unstructured DNA

ตัวอย่างที่มี Na^+ 100 mM ในทั้งสองสถานะ พบว่าสเปกตรัมเหมือนกันคือมี positive peak ที่ประมาณ 290 nm และ negative peak ที่ประมาณ 260 nm ซึ่งเป็นลักษณะของ quadruplex แบบ anti-parallel

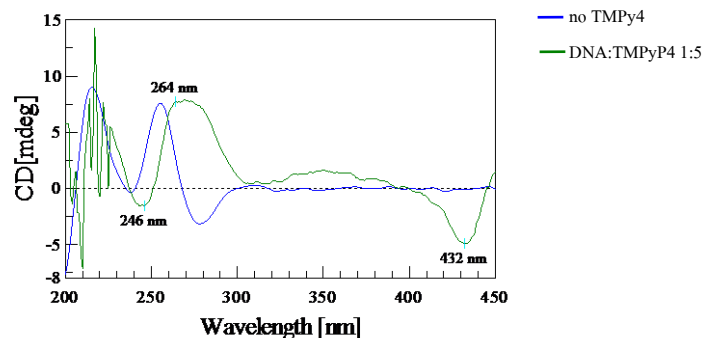
ตัวอย่างที่มี K^+ 100 mM และ $\text{Na}^+ : \text{K}^+$ ในอัตราส่วน 1:1 ในทั้งสองสถานะ ให้สเปกตรัมที่เหมือนกันคือ positive peak ที่ประมาณ 260 nm negative peak ที่ประมาณ 240 nm และมี shoulder ที่ประมาณ 290 nm ซึ่งเป็นลักษณะ quadruplex แบบ parallel ที่มี external loop

1.2. ผลของลิแกนด์ TMPyP4 ที่มีต่อการเกิดโครงสร้าง quadruplex ของ SRF promoter 01

(ก)



(ข)

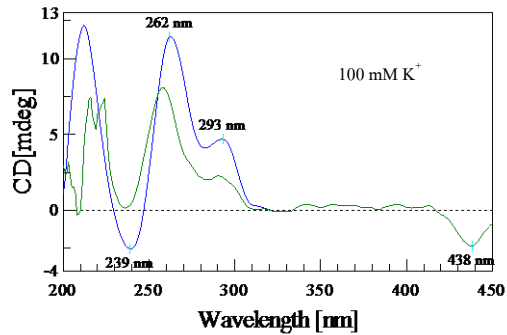


ภาพที่ 13 สเปกตรัมของ SRF promoter 10 μM ที่มีลิแกนด์ TMPyP4 อัตราส่วน 1:5 ในบัฟเฟอร์ 1XTE pH 7.4 วัดด้วยเครื่อง CD ที่ 200-450 nm ที่ 25°C (ก) ไม่ให้ความร้อน (ข) ให้ความร้อนที่ 95°C 5 นาที แล้วทำให้เย็นลงอย่างช้าๆ

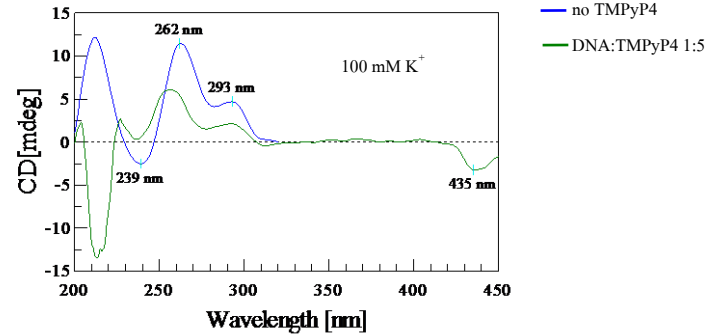
ในทั้งสองภาวะที่ให้และไม่ให้ความร้อน ตัวอย่างที่ไม่มีลิแกนด์ TMPyP4 พบว่าสเปกตรัมมี positive peak ที่ประมาณ 255 nm และ negative peak ที่ประมาณ 238 nm ซึ่งเป็นลักษณะของ unstructured DNA เมื่อใส่ลิแกนด์ TMPyP4 ในอัตราส่วนของ DNA:TMPyP4 เป็น 1:5 ก่อนให้ความร้อน พบว่าสเปกตรัมมีลักษณะเป็น broad peak ประมาณ 260-270 nm และหลังจากให้ความร้อนพบว่า ลักษณะสเปกตรัมที่เป็น broad peak เริ่มหายไป แต่ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็น โครงสร้างแบบใด นอกจากนี้ยังพบ negative peak ที่ประมาณ 433 nm ซึ่งแสดงถึงการจับกันระหว่างลิแกนด์ TMPyP4 และ DNA

1.3. ผลของเกลือ KCl และลิแกนด์ TMPyP4 ที่มีผลต่อการเกิด โครงสร้าง quadruplex ของ SRF promoter 01

(ก)



(ข)

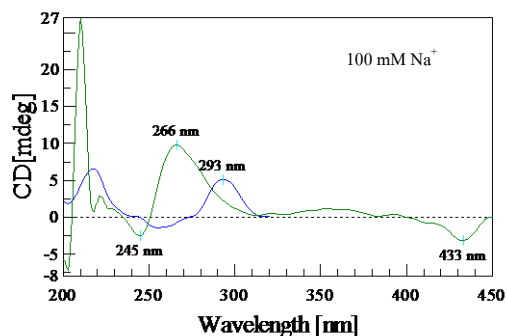


ภาพที่ 14 สเปกตรัมของ SRF promoter 10 μM ที่มีลิแกนด์ TMPyP4 อัตราส่วน 1:5 ในสถานะที่มีเกลือ KCl 100 mM ในบัฟเฟอร์ 1XTE pH 7.4 วัดด้วยเครื่อง CD ที่ 200-450 nm ที่ 25°C (ก) ไม่ให้ความร้อน (ข) ให้ความร้อนที่ 95°C 5 นาที แล้วทำให้เย็นลงอย่างช้าๆ

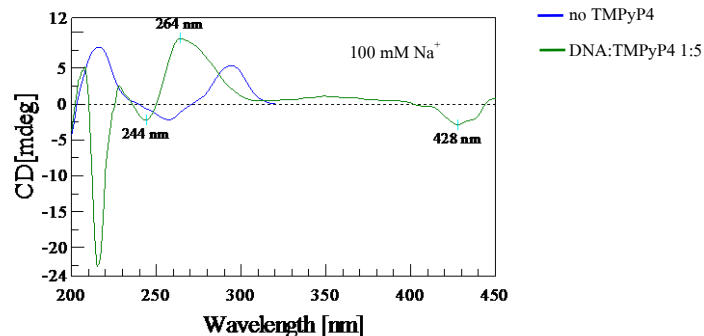
ในสถานะที่มี K^+ 100 mM ตัวอย่างที่ไม่มีลิแกนด์ TMPyP4 พบว่าสเปกตรัมมี positive peak ที่ประมาณ 260 nm negative peak ที่ประมาณ 240 nm และมี shoulder ที่ประมาณ 290 nm ซึ่งเป็นรูปแบบ quadruplex แบบ parallel ที่มี external loop เมื่อใส่ลิแกนด์ TMPyP4 อัตราส่วนของ DNA:TMPyP4 เป็น 1:5 พบว่ามี negative peak ที่ประมาณ 435 nm เพิ่มขึ้นแสดงว่ามีการจับกันระหว่างลิแกนด์ TMPyP4 กับ DNA ในสถานะที่ไม่ให้ความร้อน โครงสร้างที่ได้ยังคงเป็น quadruplex แบบ parallel ที่มี external loop และเมื่อให้ความร้อนแล้ว สเปกตรัมเปลี่ยนไปเล็กน้อยแต่ยังคงมีรูปแบบเช่นเดียวกัน

1.4. ผลของเกลือ NaCl และลิแกนด์ TMPyP4 ที่มีผลต่อการเกิดโครงสร้าง quadruplex ของ SRF promoter 01

(ก)



(ข)



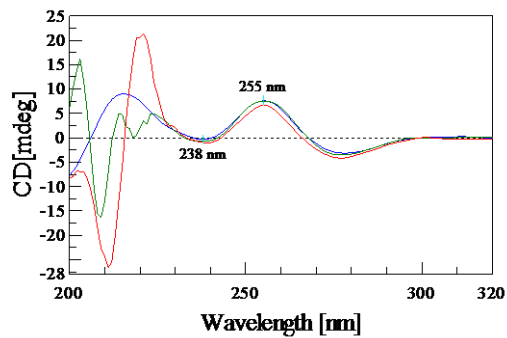
ภาพที่ 15 สเปกตรัมของ SRF promoter 10 μM ที่มีลิแกนด์ TMPyP4 อัตราส่วน 1:5 ในสภาวะที่มีเกลือ NaCl 100 mM ในบัฟเฟอร์ 1XTE pH 7.4 วัดด้วยเครื่อง CD ที่ 200-450 nm ที่ 25°C (ก) ไม่ให้ความร้อน (ข) ให้ความร้อนที่ 95°C 5 นาที แล้วทำให้เย็นลงอย่างช้าๆ

ในสภาวะที่มี Na^+ 100 mM ทั้งสภาวะที่ให้และไม่ให้ความร้อน ตัวอย่างที่ไม่มีลิแกนด์ TMPyP4 พบว่ามี positive peak ที่ประมาณ 290 nm และ negative peak ที่ประมาณ 260 nm ซึ่งเป็นลักษณะของ quadruplex แบบ anti-parallel เมื่อใส่ลิแกนด์ TMPyP4 ในทั้งสองสภาวะ พบว่ามี negative peak ที่ประมาณ 435 nm เพิ่มขึ้น แสดงว่ามีการจับกันระหว่างลิแกนด์ TMPyP4 กับ DNA ที่อัตราส่วน 1:5 พบว่ารูปแบบสเปกตรัมเปลี่ยนไปคือมี positive peak ที่ประมาณ 260 nm และ negative peak ที่ประมาณ 240 nm แสดงว่าเป็นโครงสร้าง quadruplex แบบ parallel

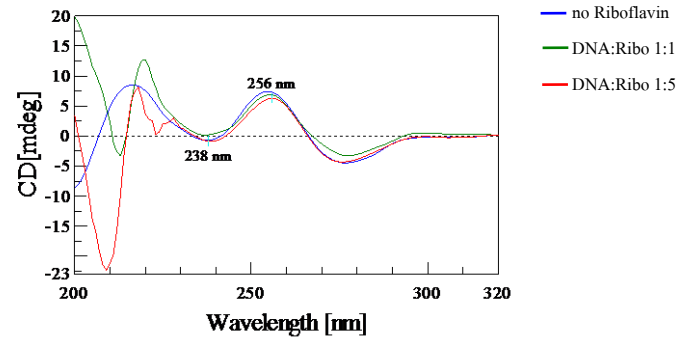
อาจสรุปได้ว่าลิแกนด์ TMPyP4 ทำให้โครงสร้างเปลี่ยนจาก quadruplex แบบ anti-parallel ไปเป็น แบบ parallel ในสภาวะที่มี Na^+ 100 mM

1.5. ผลของลิแกนด์ Riboflavin ที่มีต่อการเกิดโครงสร้าง quadruplex ของ SRF promoter 01

(ก)



(ข)



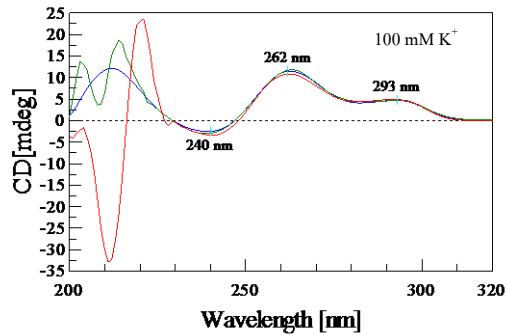
ภาพที่ 16 สเปกตรัมของ SRF promoter 10 μM ที่มีลิแกนด์ Riboflavin อัตราส่วน 1:1 และ 1:5 ในบัฟเฟอร์ 1XTE pH 7.4 วัดด้วยเครื่อง CD ที่ 200-320 nm ที่ 25°C (ก) ไม่ให้ความร้อน (ข) ให้ความร้อนที่ 95°C 5 นาที แล้วทำให้เย็นลงอย่างช้าๆ

ในทั้งสองสถานะที่ให้และไม่ให้ความร้อน ตัวอย่างที่ไม่มีลิแกนด์ Riboflavin พบว่าสเปกตรัมมี positive peak ที่ประมาณ 255 nm และ negative peak ที่ประมาณ 238 nm ซึ่งเป็นลักษณะของ unstructured DNA เมื่อใส่ลิแกนด์ Riboflavin ทั้งในอัตราส่วน 1:1 และ 1:5 พบว่าสเปกตรัมยังคงมีรูปแบบที่เป็น unstructured DNA เหมือนเดิม

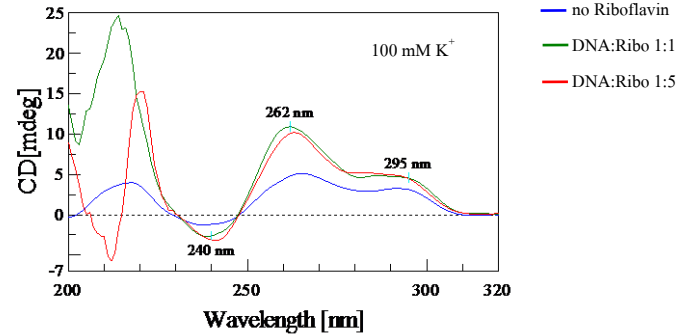
อาจสรุปได้ว่าลิแกนด์ Riboflavin ไม่สามารถเหนี่ยวนำ SRF promoter 01 ให้เกิดโครงสร้าง quadruplex ได้

1.6. ผลของเกลือ KCl และลิแกนด์ Riboflavin ที่มีผลต่อการเกิดโครงสร้าง quadruplex ของ SRF promoter 01

(ก)



(ข)

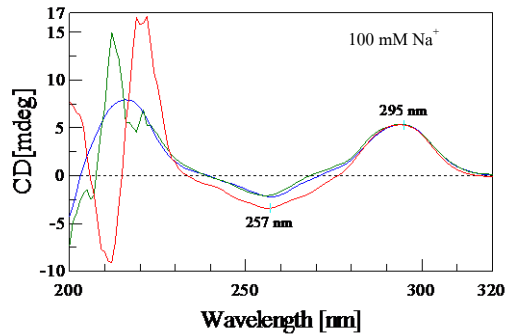


ภาพที่ 17 สเปกตรัมของ SRF promoter 10 μM ที่มีลิแกนด์ Riboflavin อัตราส่วน 1:1 และ 1:5 ในสภาวะที่มีเกลือ KCl 100 mM ในบัฟเฟอร์ 1XTE pH 7.4 วัดด้วยเครื่อง CD ที่ 200-320 nm ที่ 25°C (ก) ไม่ให้ความร้อน (ข) ให้ความร้อนที่ 95°C 5 นาที แล้วทำให้เย็นลงอย่างช้าๆ

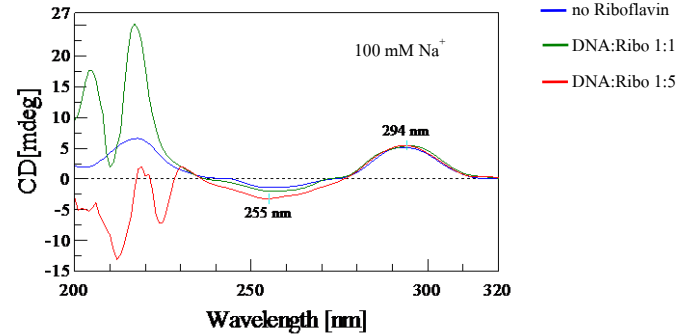
ในสภาวะที่มี K^+ 100 mM ทั้งสภาวะที่ให้และไม่ให้ความร้อน ตัวอย่างที่ไม่มีลิแกนด์ Riboflavin พบว่าสเปกตรัมมี positive peak ที่ประมาณ 260 nm negative peak ที่ประมาณ 240 nm และมี shoulder ที่ประมาณ 290 nm ซึ่งเป็นรูปแบบ quadruplex แบบ parallel ที่มี external loop เมื่อใส่ลิแกนด์ Riboflavin ในอัตราส่วนของ DNA: Riboflavin เป็น 1:1 และ 1:5 ในทั้งสองสภาวะ โครงสร้างที่ได้ยังคงเป็น quadruplex แบบ parallel ที่มี external loop เช่นเดิม

1.7. ผลของเกลือ NaCl และลิแกนด์ Riboflavin ที่มีผลต่อการเกิดโครงสร้าง quadruplex ของ SRF promoter 01

(ก)



(ข)

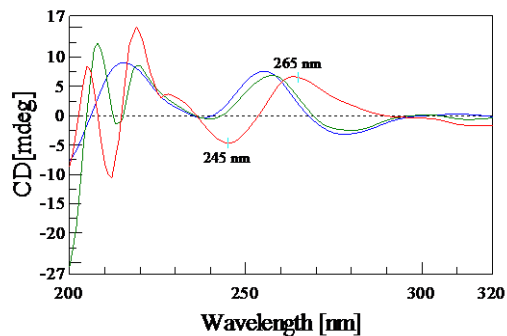


ภาพที่ 18 สเปกตรัมของ SRF promoter 10 μM ที่มีลิแกนด์ Riboflavin อัตราส่วน 1:1 และ 1:5 ในสภาวะที่มีเกลือ NaCl 100 mM ในบัฟเฟอร์ 1XTE pH 7.4 วัดด้วยเครื่อง CD ที่ 200-320 nm ที่ 25°C (ก) ไม่ให้ความร้อน (ข) ให้ความร้อนที่ 95°C 5 นาที แล้วทำให้เย็นลงอย่างช้าๆ

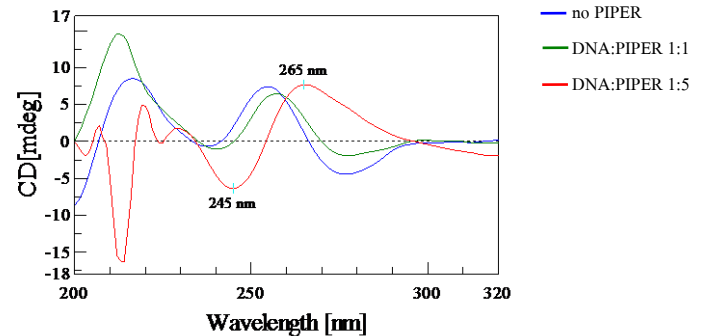
ในสภาวะที่มี Na^+ 100 mM ทั้งสภาวะที่ให้และไม่ให้ความร้อน ตัวอย่างที่ไม่มีลิแกนด์ Riboflavin พบว่ามี positive peak ที่ประมาณ 290 nm และ negative peak ที่ประมาณ 260 nm ซึ่งเป็นลักษณะของ quadruplex แบบ anti-parallel เมื่อใส่ลิแกนด์ Riboflavin ทั้งในอัตราส่วนของ DNA:Riboflavin เป็น 1:1 และ 1:5 ในทั้งสองสภาวะ พบว่าโครงสร้างที่ได้ยังคงเป็น quadruplex แบบ anti-parallel เช่นเดิม

1.8. ผลของลิแกนด์ PIPER ที่มีต่อการเกิดโครงสร้าง quadruplex ของ SRF promoter 01

(ก)



(ข)

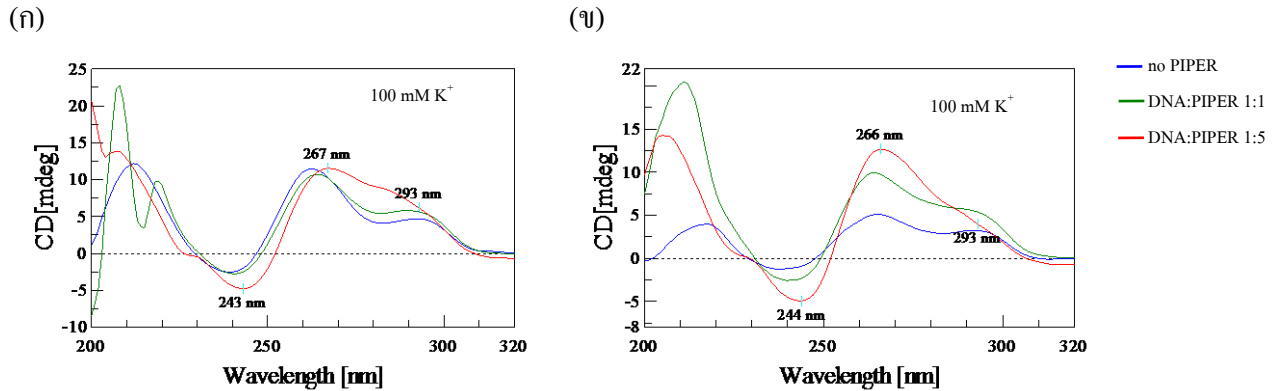


ภาพที่ 19 สเปกตรัมของ SRF promoter 10 μM ที่มีลิแกนด์ PIPER อัตราส่วน 1:1 และ 1:5 ในบัฟเฟอร์ 1XTE pH 7.4 วัดด้วยเครื่อง CD ที่ 200-400 nm ที่ 25°C (ก) ไม่ให้ความร้อน (ข) ให้ความร้อนที่ 95°C 5 นาที แล้วทำให้เย็นลงอย่างช้าๆ

ในทั้งสองสถานะที่ให้และไม่ให้ความร้อน ตัวอย่างที่ไม่มีลิแกนด์ PIPER พบว่าสเปกตรัมมี positive peak ที่ประมาณ 255 nm และ negative peak ที่ประมาณ 238 nm ซึ่งเป็นลักษณะของ unstructured DNA เมื่อใส่ลิแกนด์ PIPER ที่อัตราส่วนของ DNA:PIPER เป็น 1:1 ในทั้งสองสถานะ พบว่าสเปกตรัมยังคงเป็น unstructured DNA เช่นเดิม เมื่อเพิ่มอัตราส่วนของ DNA:PIPER เป็น 1:5 ในทั้งสองสถานะ พบว่ามี positive peak ที่ประมาณ 260 nm และ negative peak ที่ประมาณ 240 nm แสดงว่าเป็นโครงสร้าง quadruplex แบบ parallel

แสดงว่าลิแกนด์ PIPER ที่อัตราส่วน 1:5 สามารถเหนี่ยวนำให้ unstructured DNA เปลี่ยนเป็นโครงสร้าง quadruplex แบบ parallel ได้

1.9. ผลของเกลือ KCl และลิแกนด์ PIPER ที่มีผลต่อการเกิดโครงสร้าง quadruplex ของ SRF promoter 01



ภาพที่ 20 สเปกตรัมของ SRF promoter 10 μM ที่มีลิแกนด์ PIPER อัตราส่วน 1:1 และ 1:5 ในสภาวะที่มีเกลือ KCl 100 mM ในบัฟเฟอร์ 1XTE pH 7.4 วัดด้วยเครื่อง CD ที่ 200-400 nm ที่ 25°C (ก) ไม่ให้ความร้อน (ข) ให้ความร้อนที่ 95°C 5 นาที แล้วทำให้เย็นลงอย่างช้าๆ

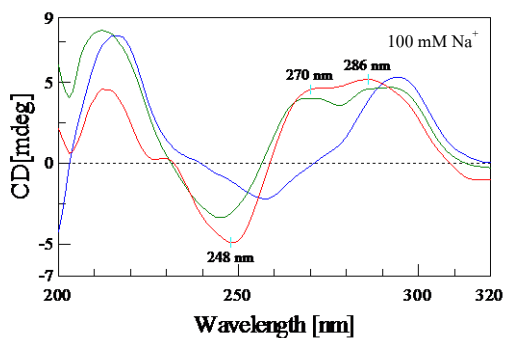
ในสภาวะที่มี K^+ 100 mM ทั้งสภาวะที่ให้และไม่ให้ความร้อน ตัวอย่างที่ไม่มีลิแกนด์ PIPER พบว่าสเปกตรัมมี positive peak ที่ประมาณ 260 nm negative peak ที่ประมาณ 240 nm และมี shoulder ที่ประมาณ 290 nm ซึ่งเป็นรูปแบบ quadruplex แบบ parallel ที่มี external loop เมื่อใส่ลิแกนด์ PIPER ที่อัตราส่วนของ DNA:PIPER เป็น 1:1 ในทั้งสองสภาวะ พบว่าโครงสร้างที่ได้ยังคงเป็น quadruplex แบบ parallel ที่มี external loop เช่นเดิม แต่เมื่อเพิ่มอัตราส่วนของ DNA:PIPER เป็น 1:5 ในทั้งสองสภาวะ พบว่าสเปกตรัมมี positive peak ที่ประมาณ 260 nm และ negative peak ที่ประมาณ 240 nm ซึ่งเป็นโครงสร้าง quadruplex แบบ parallel

อาจสรุปได้ว่าลิแกนด์ PIPER ทำให้โครงสร้างเปลี่ยนแปลงจาก quadruplex แบบ parallel ที่มี external loop ที่อัตราส่วนของ DNA:PIPER เป็น 1:1 ไปเป็น quadruplex แบบ parallel ที่อัตราส่วนของ DNA:PIPER เป็น 1:5 ได้ในสภาวะที่มี K^+ 100 mM

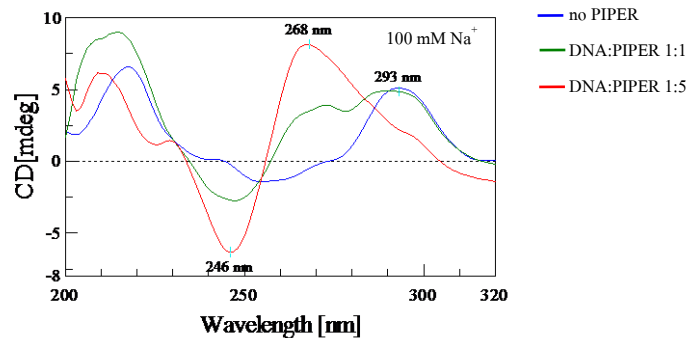
1.10. ผลของเกลือ NaCl และลิแกนด์ PIPER ที่มีผลต่อการเกิดโครงสร้าง quadruplex ของ SRF

promoter 01

(ก)



(ข)



ภาพที่ 21 สเปกตรัมของ SRF promoter 10 μM ที่มีลิแกนด์ PIPER อัตราส่วน 1:1 และ 1:5 ในสภาวะที่มีเกลือ NaCl 100 mM ในบัฟเฟอร์ 1XTE pH 7.4 วัดด้วยเครื่อง CD ที่ 200-320 nm ที่ 25°C (ก) ไม่ให้ความร้อน (ข) ให้ความร้อนที่ 95°C 5 นาที แล้วทำให้เย็นลงอย่างช้าๆ

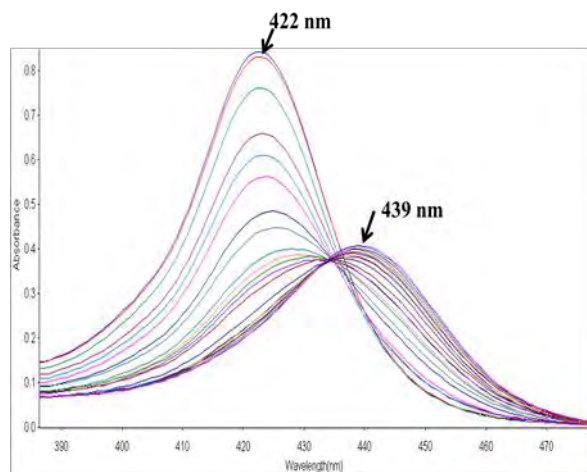
ในสภาวะที่มี Na^+ 100 mM ทั้งสภาวะที่ให้และไม่ให้ความร้อน ตัวอย่างที่ไม่มีลิแกนด์ PIPER พบว่ามี positive peak ที่ประมาณ 290 nm และ negative peak ที่ประมาณ 260 nm ซึ่งเป็นลักษณะของ quadruplex แบบ anti-parallel เมื่อใส่ลิแกนด์ PIPER ที่อัตราส่วนของ DNA:PIPER เป็น 1:1 ในทั้งสองสภาวะ พบว่าสเปกตรัมเปลี่ยนไปคือ มี positive peak ที่ประมาณ 290 nm shoulder ที่ประมาณ 270 nm และ negative peak ที่ประมาณ 240 nm ซึ่งเป็นโครงสร้าง quadruplex แบบ mixed parallel/anti-parallel เมื่อเพิ่มอัตราส่วนของ DNA:PIPER เป็น 1:5 ในสภาวะที่ไม่ให้ความร้อน พบว่ายังคงได้โครงสร้าง quadruplex แบบ mixed parallel/anti-parallel เช่นเดิม แต่เมื่อให้ความร้อนแล้วพบว่า สเปกตรัมเปลี่ยนไปคือมี positive peak ที่ประมาณ 260 nm และ negative peak ที่ประมาณ 240 nm ซึ่งเป็นโครงสร้าง quadruplex แบบ parallel

อาจสรุปได้ว่าลิแกนด์ PIPER ทำให้โครงสร้างเปลี่ยนแปลงจาก quadruplex แบบ anti-parallel ในสภาวะที่มีแต่ Na^+ 100 mM ไปเป็นแบบ mixed parallel/anti-parallel ที่อัตราส่วนของ DNA:PIPER เป็น 1:1 และแบบ parallel ในสภาวะที่ให้ความร้อนที่อัตราส่วนของ DNA:PIPER เป็น 1:5

2. การศึกษาโครงสร้างของ quadruplex โดยวิธี UV-vis absorption titration

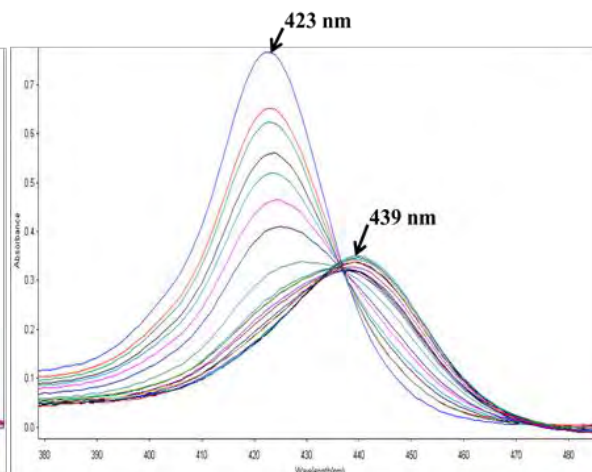
2.1. ผลการดูดกลืนแสงในสถานะเกลือ NaCl หรือ KCl และลิแกนด์ TMPyP4 เมื่อไทเทรตด้วย quadruplex ของ SRF promoter 01

ก)



% hypochromicity = 72 %

ข)

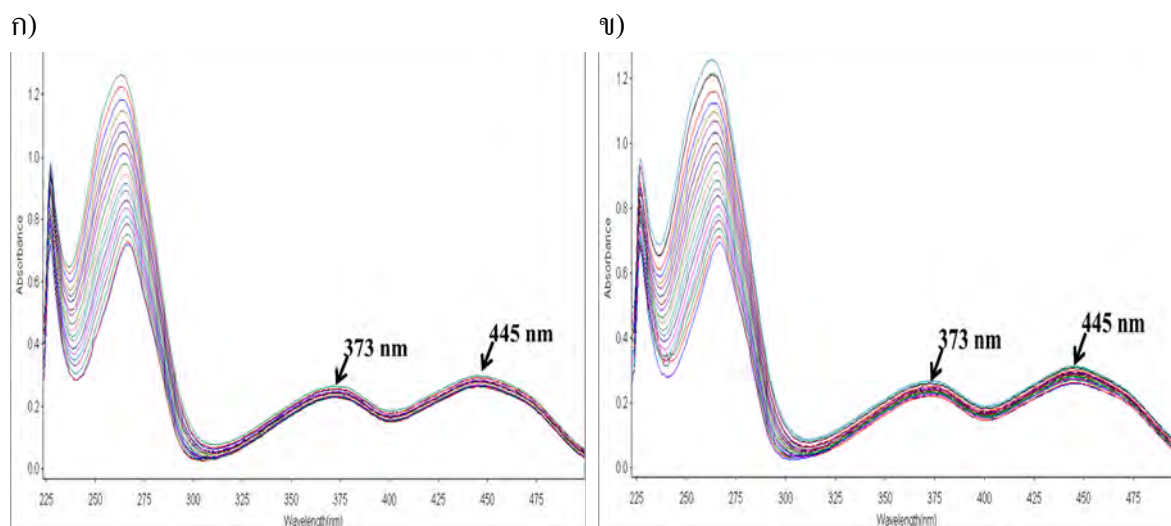


% hypochromicity = 74 %

ภาพที่ 22 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ TMPyP4 7 μM ก) เมื่อไทเทรตด้วย quadruplex ของ SRF promoter 01 48 μM ใน 100 mM KCl ข) เมื่อไทเทรตด้วย quadruplex ของ SRF promoter 45 μM ใน 100 mM NaCl

ในสถานะที่มี TMPyP4 7 μM ใน K^+ 100 mM พบว่าหลังการไทเทรตด้วย SRF promoter 01 48 μM เกิด red shift ของสเปกตรัมจาก 422 nm เป็น 439 nm และมีค่า hypochromicity คือ 72 % เช่นเดียวกับในสถานะที่มี TMPyP4 7 μM ใน Na^+ 100 mM พบว่าหลังการไทเทรตด้วย SRF promoter 01 45 μM เกิด red shift ของสเปกตรัมจาก 423 nm เป็น 439 nm และมีค่า hypochromicity คือ 74 % ซึ่งการดูดกลืนแสงที่น้อยลงและการ shift ของสเปกตรัม แสดงให้เห็นถึงการเกิดอันตรกิริยาระหว่างโครงสร้าง quadruplex ของ SRF promoter 01 และลิแกนด์ TMPyP4 ขึ้นในทั้งสองสถานะ

2.2. ผลการดูดกลืนแสงในสถานะเกลือ NaCl หรือ KCl และลิแกนด์ Riboflavin เมื่อไทเทรตด้วย quadruplex ของ SRF promoter 01

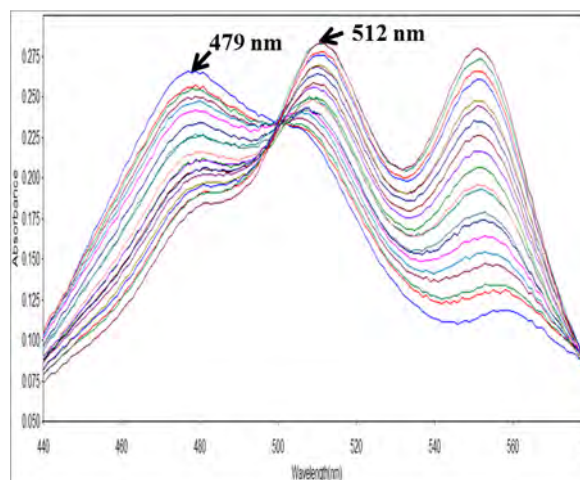


ภาพที่ 23 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ Riboflavin 35 μM ก) เมื่อไทเทรตด้วย quadruplex ของ SRF promoter 01 45 μM ใน 100 mM KCl ข) เมื่อไทเทรตด้วย quadruplex ของ SRF promoter 45 μM ใน 100 mM NaCl

ในสถานะที่มี Riboflavin 35 μM ใน K^+ 100 mM พบว่าหลังการไทเทรตด้วย SRF promoter 01 45 μM ไม่เกิด red shift ของสเปกตรัม และไม่มีค่า hypochromicity เช่นเดียวกันกับในสถานะที่มี Riboflavin 35 μM ใน Na^+ 100 mM พบว่าหลังการไทเทรตด้วย SRF promoter 01 100 μM ไม่เกิด red shift ของสเปกตรัม และไม่สามารถคำนวณค่า hypochromicity ได้ ดังนั้นจึงแสดงให้เห็นว่าไม่มีการเกิดอันตรกิริยาระหว่างโครงสร้าง quadruplex ของ SRF promoter 01 และลิแกนด์ Riboflavin ในทั้งสองสถานะ

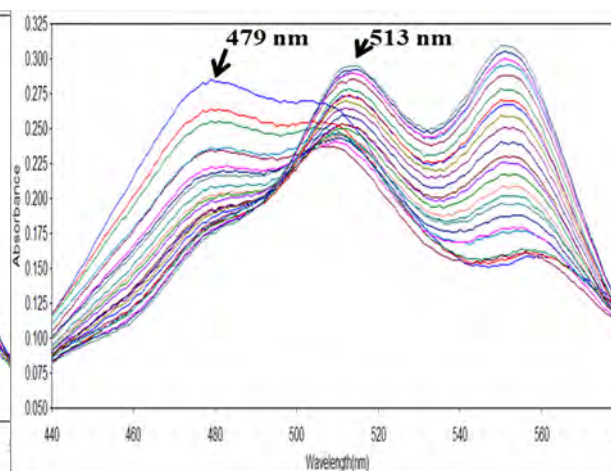
2.3. ผลการดูดกลืนแสงในสถานะเกลือ NaCl หรือ KCl และลิแกนด์ PIPER เมื่อไทเทรตด้วย quadruplex ของ SRF promoter 01

ก)



% hypochromicity = 39 %

ข)

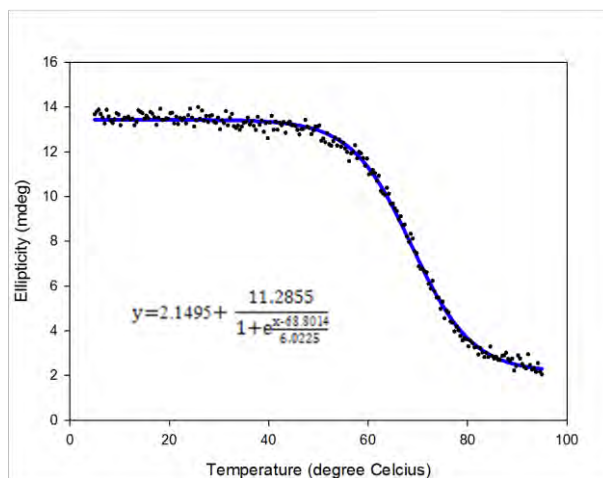


% hypochromicity = 41 %

ภาพที่ 24 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ PIPER 60 μM ก) เมื่อไทเทรตด้วย quadruplex ของ SRF promoter 01 100 μM ใน 100 mM KCl ข) เมื่อไทเทรตด้วย quadruplex ของ SRF promoter 100 μM ใน 100 mM NaCl

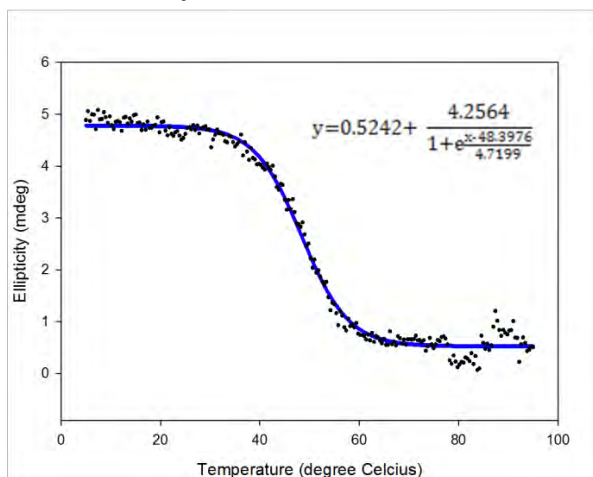
ในสถานะที่มี PIPER 60 μM ใน K^+ 100 mM พบว่าหลังการไทเทรตด้วย SRF promoter 01 100 μM เกิด red shift ของสเปกตรัมจาก 479 nm เป็น 512 nm และมีค่า hypochromicity คือ 39 % เช่นเดียวกับในสถานะที่มี PIPER 60 μM ใน Na^+ 100 mM พบว่าหลังการไทเทรตด้วย SRF promoter 01 100 μM เกิด red shift ของสเปกตรัมจาก 479 nm เป็น 513 nm และมีค่า hypochromicity คือ 41 % ซึ่งการดูดกลืนแสงที่น้อยลงและการ shift ของสเปกตรัม แสดงให้เห็นถึงการเกิดอันตรกิริยาระหว่างโครงสร้าง quadruplex ของ SRF promoter 01 และลิแกนด์ PIPER ขึ้นในทั้งสองสถานะ

3. การค่า melting temperature (T_m)



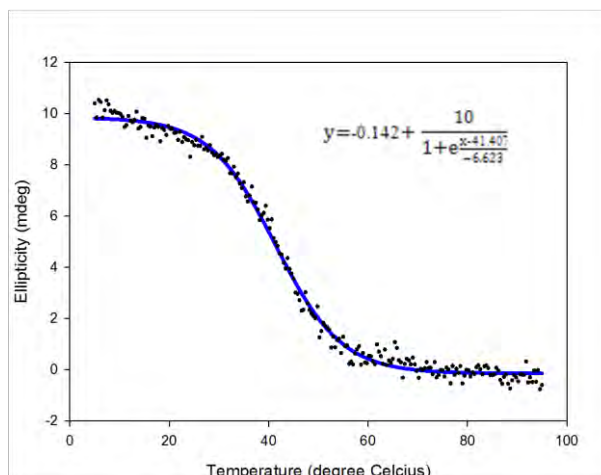
ภาพที่ 25 Melting Curve ของ SRF promoter 01 10 μM ที่มีเกลือ KCl 100 mM ในบัฟเฟอร์ 1XTE pH 7.4 วัดด้วยเครื่อง CD ที่ 260 nm ที่ 5-95 $^{\circ}\text{C}$

จากสมการได้ค่า $x_0 = 68.801$ หมายความว่า SRF promoter 01 ที่มี K^+ 100 mM มีค่า T_m คือ 68.801 $^{\circ}\text{C}$ แสดงว่า K^+ ช่วยให้โครงสร้าง quadruplex แบบ parallel ที่มี external loop มีความคงตัวทางอุณหพลศาสตร์ เนื่องจากมีค่า T_m สูง



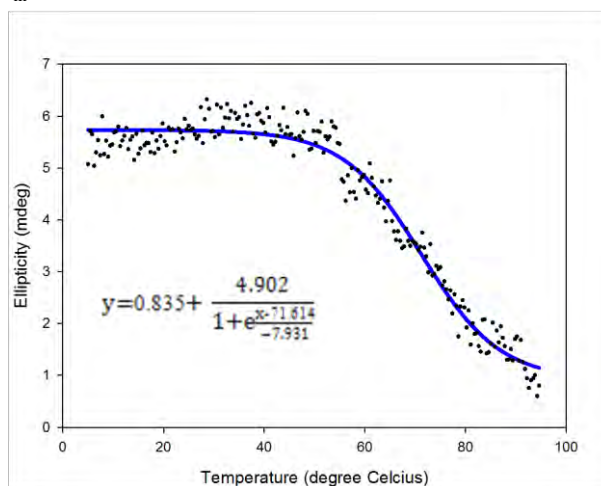
ภาพที่ 26 Melting Curve ของ SRF promoter 01 10 μM ที่มีเกลือ NaCl 100 mM ในบัฟเฟอร์ 1XTE pH 7.4 วัดด้วยเครื่อง CD ที่ 290 nm ที่ 5-95 $^{\circ}\text{C}$

จากสมการได้ค่า $x_0 = 48.398$ หมายความว่า SRF promoter 01 ที่มี Na^+ 100 mM มีค่า T_m คือ 48.398 $^{\circ}\text{C}$ แสดงว่า Na^+ ช่วยให้โครงสร้าง quadruplex แบบ anti-parallel ค่อนข้างคงตัวทางอุณหพลศาสตร์ เนื่องจากมีค่า T_m ค่อนข้างสูง แต่ค่าที่ได้ต่ำกว่าตัวอย่างที่มี K^+



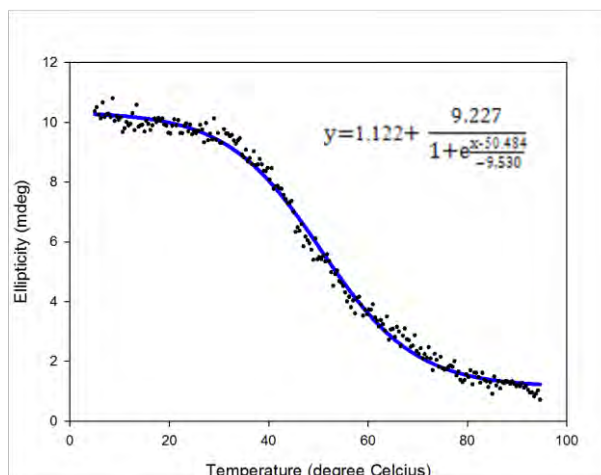
ภาพที่ 27 Melting Curve ของ SRF promoter 01 10 μM ที่มีลิแกนด์ TMPyP4 อัตราส่วน 1:5 ในบัฟเฟอร์ 1XTE pH 7.4 วัดด้วยเครื่อง CD ที่ 260 nm ที่ 5-95 $^{\circ}\text{C}$

จากสมการได้ค่า $x_0 = 41.407$ หมายความว่า DNA: TMPyP4 อัตราส่วน 1:5 มีค่า T_m คือ 41.407 $^{\circ}\text{C}$ แสดงว่าลิแกนด์ TMPyP4 ไม่ช่วยให้โครงสร้าง quadruplex มีความคงตัวทางอุณหพลศาสตร์ เนื่องจากมีค่า T_m ต่ำ



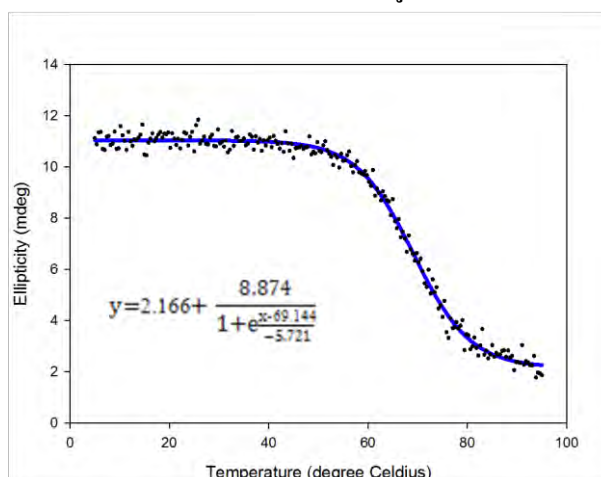
ภาพที่ 28 Melting Curve ของ SRF promoter 01 10 μM ที่มีลิแกนด์ TMPyP4 อัตราส่วน 1:5 ในสภาวะที่มีเกลือ KCl 100 mM ในบัฟเฟอร์ 1XTE pH 7.4 วัดด้วยเครื่อง CD ที่ 260 nm ที่ 5-95 $^{\circ}\text{C}$

จากสมการได้ค่า $x_0 = 71.614$ หมายความว่า DNA: TMPyP4 อัตราส่วน 1:5 ในสภาวะที่มีเกลือ KCl 100 mM มีค่า T_m คือ 71.614 $^{\circ}\text{C}$ ซึ่งค่าที่ได้เพิ่มขึ้นจากตัวอย่างที่มี K^+ เพียงอย่างเดียว (68.801 $^{\circ}\text{C}$) แสดงว่าลิแกนด์ TMPyP4 จะช่วยเพิ่มความคงตัวทางอุณหพลศาสตร์ของโครงสร้าง quadruplex แบบ parallel ที่มี external loop ในสภาวะที่มี K^+ อยู่ด้วย



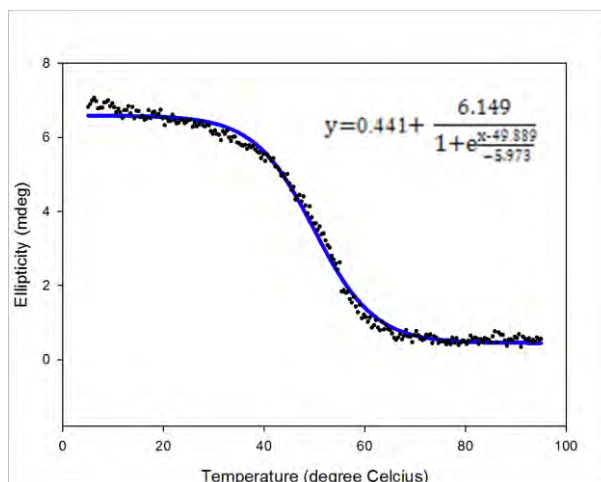
ภาพที่ 29 Melting Curve ของ SRF promoter 01 10 μM ที่มีลิแกนด์ TmPyP4 อัตราส่วน 1:5 ในสภาวะที่มีเกลือ NaCl 100 mM ในบัฟเฟอร์ 1XTE pH 7.4 วัดด้วยเครื่อง CD ที่ 260 nm ที่ 5-95 $^{\circ}\text{C}$

จากสมการได้ค่า $x_0 = 50.484$ หมายความว่า DNA: TmPyP4 อัตราส่วน 1:5 ในสภาวะที่มีเกลือ NaCl 100 mM มีค่า T_m คือ 50.484 $^{\circ}\text{C}$ ซึ่งค่าที่ได้ไม่แตกต่างจากตัวอย่างที่มี Na^+ เพียงอย่างเดียว (48.398 $^{\circ}\text{C}$) แสดงว่าลิแกนด์ TmPyP4 ไม่ค่อยช่วยเพิ่มความคงตัวของโครงสร้าง quadruplex แบบ parallel ในสภาวะที่มี Na^+ อยู่ด้วย



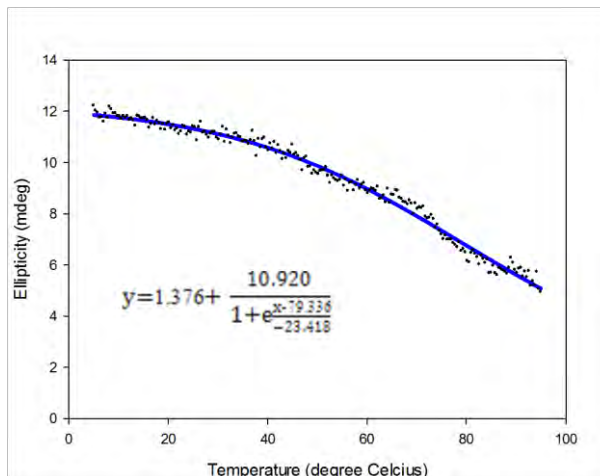
ภาพที่ 30 Melting Curve ของ SRF promoter 01 10 μM ที่มีลิแกนด์ Riboflavin อัตราส่วน 1:5 ในสภาวะที่มีเกลือ KCl 100 mM ในบัฟเฟอร์ 1XTE pH 7.4 วัดด้วยเครื่อง CD ที่ 260 nm ที่ 5-95 $^{\circ}\text{C}$

จากสมการได้ค่า $x_0 = 69.144$ หมายความว่า DNA: Riboflavin อัตราส่วน 1:5 ในสภาวะที่มีเกลือ KCl 100 mM มีค่า T_m คือ 69.144 $^{\circ}\text{C}$ ซึ่งค่าที่ได้ไม่แตกต่างจากตัวอย่างที่มี K^+ เพียงอย่างเดียว (68.801 $^{\circ}\text{C}$) แสดงว่าลิแกนด์ Riboflavin ไม่ช่วยเพิ่มความคงตัวของโครงสร้าง quadruplex แบบ parallel ที่มี external loop ในสภาวะที่มี K^+ อยู่ด้วย



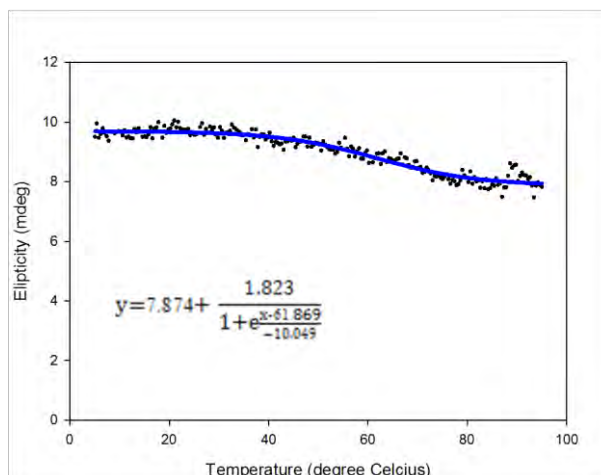
ภาพที่ 31 Melting Curve ของ SRF promoter 01 10 μM ที่มีลิแกนด์ Riboflavin อัตราส่วน 1:5 ในสภาวะที่มีเกลือ NaCl 100 mM ในบัฟเฟอร์ 1XTE pH 7.4 วัดด้วยเครื่อง CD ที่ 290 nm ที่ 5-95 $^{\circ}\text{C}$

จากสมการได้ค่า $x_0 = 49.889$ หมายความว่า DNA: Riboflavin อัตราส่วน 1:5 ในสภาวะที่มีเกลือ NaCl 100 mM มีค่า T_m คือ 49.889 $^{\circ}\text{C}$ ซึ่งค่าที่ได้ไม่แตกต่างจากตัวอย่างที่มี Na^+ เพียงอย่างเดียว (48.398 $^{\circ}\text{C}$) แสดงว่าลิแกนด์ Riboflavin ไม่ค่อยช่วยเพิ่มความคงตัวของโครงสร้าง quadruplex แบบ anti-parallel ในสภาวะที่มี Na^+ อยู่ด้วย



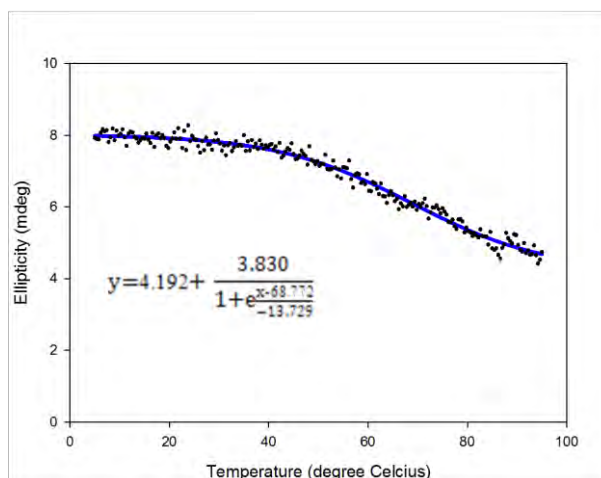
ภาพที่ 32 Melting Curve ของ SRF promoter 01 10 μM ที่มีลิแกนด์ PIPER อัตราส่วน 1:5 ในบัฟเฟอร์ 1XTE pH 7.4 วัดด้วยเครื่อง CD ที่ 260 nm ที่ 5-95 $^{\circ}\text{C}$

จาก melting curve ไม่สามารถหาค่า T_m ได้เนื่องจากค่า ellipticity ไม่ตกลงมาที่ baseline แต่สามารถประมาณค่า T_m ได้โดยมีค่ามากกว่า 75 $^{\circ}\text{C}$ แสดงว่าลิแกนด์ PIPER ช่วยให้โครงสร้าง quadruplex แบบ parallel ในสภาวะที่มี Na^+ มีความคงตัวของโครงสร้าง เนื่องจากมีค่า T_m สูง



ภาพที่ 33 Melting Curve ของ SRF promoter 01 10 μM ที่มีลิแกนด์ PIPER อัตราส่วน 1:5 ในสถานะที่มีเกลือ KCl 100 mM ในบัฟเฟอร์ 1XTE pH 7.4 วัดด้วยเครื่อง CD ที่ 260 nm ที่ 5-95 $^{\circ}\text{C}$

จาก melting curve ไม่สามารถหาค่า T_m ได้เนื่องจากค่า ellipticity ไม่ตกลงมาที่ baseline แต่สามารถประมาณค่า T_m ได้โดยมีค่ามากกว่า 75 $^{\circ}\text{C}$ แสดงว่าลิแกนด์ PIPER ช่วยให้โครงสร้าง quadruplex แบบ parallel มีความคงตัวทางอุณหพลศาสตร์ เนื่องจากมีค่า T_m สูง



ภาพที่ 34 Melting Curve ของ SRF promoter 01 10 μM ที่มีลิแกนด์ PIPER อัตราส่วน 1:5 ในสถานะที่มีเกลือ NaCl 100 mM ในบัฟเฟอร์ 1XTE pH 7.4 วัดด้วยเครื่อง CD ที่ 260 nm ที่ 5-95 $^{\circ}\text{C}$

จาก melting curve ไม่สามารถหาค่า T_m ได้เนื่องจากค่า ellipticity ไม่ตกลงมาที่ baseline แต่สามารถประมาณค่า T_m ได้โดยมีค่ามากกว่า 75 $^{\circ}\text{C}$ แสดงว่าลิแกนด์ PIPER ช่วยให้โครงสร้าง quadruplex แบบ parallel ในสถานะที่มี K^+ มีความคงตัวทางอุณหพลศาสตร์ เนื่องจากมีค่า T_m สูง

ตารางที่ 14 ค่า melting temperature ของโครงสร้างควอดรูเพ็กซ์ในสภาวะต่างๆ

Sample	T_m (°C)
SRF with 100 mM K^+	68.80
SRF with 100 mM Na^+	48.40
SRF:TMPyP4 (ratio= 1:5)	41.41
SRF:TMPyP4 (ratio= 1:5) with 100 mM K^+	71.61
SRF:TMPyP4 (ratio= 1:5) with 100 mM Na^+	50.48
SRF:Riboflavin (ratio= 1:5) with 100 mM K^+	69.14
SRF:Riboflavin (ratio= 1:5) with 100 mM Na^+	49.89
SRF:PIPER (ratio= 1:5)	>75
SRF: PIPER (ratio= 1:5) with 100 mM K^+	>75
SRF: PIPER (ratio= 1:5) with 100 mM Na^+	>75

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

ในงานวิจัยนี้ แสดงให้เห็นว่าบริเวณ โปรโมเตอร์ของยีน SRF สามารถเกิดโครงสร้างควอดรูเพล็กซ์ขึ้นได้ โดยใช้สาร โมเลกุลขนาดเล็ก หรือลิแกนด์เป็นตัวเหนี่ยวนำ PIPER เป็นลิแกนด์หนึ่งที่สามารถเหนี่ยวนำยีน SRF ให้เกิดโครงสร้างควอดรูเพล็กซ์แบบ parallel ในสภาวะที่ปราศจาก monovalent cation ได้ และเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีโพแทสเซียมไอออน PIPER สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดโครงสร้างควอดรูเพล็กซ์แบบ parallel ได้เช่นเดียวกัน แต่ในสภาวะที่มีโซเดียมไอออนมีความแตกต่างจากสภาวะอื่น คือ PIPER จะเหนี่ยวนำให้เกิดโครงสร้างควอดรูเพล็กซ์แบบ mixed parallel/antiparallel แล้วจึงเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปแบบอีกครั้งหลังการ reannealing เป็นแบบ parallel ซึ่งเป็นรูปแบบสุดท้ายที่เหมือนกับสองสภาวะก่อนหน้า นอกจากนี้ได้ทำการยืนยันผลการเกิดอันตรกิริยาระหว่าง SRF promoter 01 และ PIPER ในสภาวะที่มีโซเดียมไอออน และ โพแทสเซียมไอออนด้วยวิธี UV-vis absorption titration พบว่ามีการลดลงของค่าการดูดกลืนแสง และจุดยอดของสเปกตรัมเกิด red shift ขึ้น พร้อมทั้งหาค่า T_m เพื่อศึกษาความคงตัวของอุณหภูมิศาสตร์ ปรากฏว่า PIPER สามารถช่วยเพิ่มความคงตัวของควอดรูเพล็กซ์ที่เกิดขึ้นในทุกสภาวะโดยมีค่า $\Delta T_m > 5$ องศาเซลเซียส เมื่อเทียบกับควอดรูเพล็กซ์ที่เกิดในสภาวะที่มีโซเดียมไอออน หรือโพแทสเซียมไอออน สำหรับ riboflavin เป็นอีกลิแกนด์หนึ่งที่น่าสนใจ จากการทดสอบด้วย CD spectroscopy ไม่พบการเหนี่ยวนำให้เกิดโครงสร้างควอดรูเพล็กซ์ขึ้น รวมทั้งไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปแบบควอดรูเพล็กซ์ในสภาวะที่มีโซเดียมไอออน หรือโพแทสเซียมไอออน และเมื่อทดสอบด้วย UV-vis absorption titration ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของสเปกตรัม ซึ่งสอดคล้องกับการทดสอบหาความคงตัวของอุณหภูมิศาสตร์ที่ได้ค่า T_m ใกล้เคียงกับควอดรูเพล็กซ์ในสภาวะที่มีเพียงโซเดียมไอออน หรือโพแทสเซียมไอออนเท่านั้น จากผลการทดลองทั้งหมดจึงสรุปได้ว่ามีเพียง PIPER เท่านั้นที่สามารถเกิดอันตรกิริยากับโครงสร้างควอดรูเพล็กซ์ในบริเวณ SRF promoter 01 งานวิจัยนี้จึงเป็นการค้นพบเพิ่มเติมถึงผลของสารโมเลกุลขนาดเล็กที่มีต่อโครงสร้างควอดรูเพล็กซ์ในบริเวณ โปรโมเตอร์ของยีน SRF ซึ่งอาจใช้เป็นแนวทางในการศึกษาผลกระทบต่าง ๆ ที่มีต่อการทำหน้าที่ของยีน SRF และอาจทำให้ส่งผลต่อการเจริญเติบโต การแบ่งตัวของเซลล์ต่าง ๆ ที่ยีน SRF ไปเกี่ยวข้องในอนาคตได้

รายการอ้างอิง

1. Luedtke NW. Targeting G-Quadruplex DNA with Small Molecules. *CHIMIA International Journal for Chemistry*. 2009;63(3):134-9.
2. Burge S, Parkinson GN, Hazel P, Todd AK, Neidle S. Quadruplex DNA: sequence, topology and structure. *Nucleic Acids Research*. 2006;34(19):5402-15.
3. Spencer JA, Misra RP. Expression of the SRF gene occurs through a Ras/Sp/SRF-mediated-mechanism in response to serum growth signals. *Oncogene*. 1999;18(51):7319-27.
4. Saengpao D, Kammalasananon K, Charoenviriyakul C. Study of Gquadruplex-forming Motif in the SRF Promoter Region. A Senior Project for the Bachelor of science Program in Pharmacy Chulalongkorn University. 2010.
5. Balasubramanian S, Hurley LH, Neidle S. Targeting G-quadruplexes in gene promoters: a novel anticancer strategy? *Nat Rev Drug Discov*. 2011;10(4):261-75.
6. Franceschin M, Rossetti L, D'Ambrosio A, Schirripa S, Bianco A, Ortaggi G, et al. Natural and synthetic G-quadruplex interactive berberine derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2006;16(6):1707-11.
7. Han H, Cliff CL, Hurley LH. Accelerated Assembly of G-Quadruplex Structures by a Small Molecule†. *Biochemistry*. 1999;38(22):6981-6.
8. Han H, Hurley LH. G-quadruplex DNA: a potential target for anti-cancer drug design. *Trends in pharmacological sciences*. 2000;21(4):136-42.
9. Tuesuwan B. DNA Cleavage Chemistry of Pyridinium-Based Heterocyclic Skipped Aza-Enediynes and Targeting SV40 Large T-Antigen G-Quadruplex DNA Helicase Activity by G-Quadruplex Interactive Agents. *Biochemistry*. 2007:149-55.
10. Lauhon CT, Szostak JW. RNA aptamers that bind flavin and nicotinamide redox cofactors. *Journal of the American Chemical Society*. 1995;117(4):1246-57.
11. Souza Queiroz KC, Zambuzzi WF, Machado D. A possible anti-proliferative and anti-metastatic effect of irradiated riboflavin in solid tumours. *Cancer Lett*. 2007;258:126-34.
12. Neidle S. 9 - Design Principles for Quadruplex-binding Small Molecules. *Therapeutic Applications of Quadruplex Nucleic Acids*. Boston: Academic Press; 2012. p. 151-74.
13. Neidle S. The structures of quadruplex nucleic acids and their drug complexes. *Current Opinion in Structural Biology*. 2009;19(3):239-50.

14. Haider SM, Neidle S, Parkinson GN. A structural analysis of G-quadruplex/ligand interactions. *Biochimie*. 2011;93(8):1239-51.
15. Neidle S. 2 - DNA and RNA Quadruplex Structures. *Therapeutic Applications of Quadruplex Nucleic Acids*. Boston: Academic Press; 2012. p. 21-42.
16. Zhou W, Brand N, Ying L. G-Quadruplexes—Novel Mediators of Gene Function. *J of Cardiovasc Trans Res*. 2011;4(3):256-70.
17. Kypr J, Kejnovská I, Renciuik D, Vorlíčková M. Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA. *Nucleic Acids Research*. 2009;37(6):1713-25.
18. Rujan IN, Meleney JC, Bolton PH. Vertebrate telomere repeat DNAs favor external loop propeller quadruplex structures in the presence of high concentrations of potassium. *Nucleic Acids Research*. 2005;33(6):2022-31.
19. Seo YJ, Lee IJ, Kim BH. Detection of structure-switching in G-quadruplexes using end-stacking ability. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2008;18(14):3910-3.
20. Zhang H, Wang X, Wang P, Pang S, Ai X, Zhang J. Interactions between meso-tetrakis(4-(N-methylpyridinium))porphyrin TMPyP4 and DNA G-quadruplex of telomeric repeated sequence TTAGGG. *Sci China Ser B-Chem*. 2008;51(5):452-6.
21. Zhang H, Xiao X, Wang P, Pang S, Qu F, Ai X, et al. Conformational conversion of DNA G-quadruplex induced by a cationic porphyrin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2009;74(1):243-7.
22. Martino L, Pagano B, Fotticchia I, Neidle S, Giancola C. Shedding Light on the Interaction between TMPyP4 and Human Telomeric Quadruplexes. *J Phys Chem*. 2009 113:14779-86.
23. Pedroso IM, Duarte LF, Yanez G, Baker AM, Fletcher TM. Induction of parallel human telomeric G-quadruplex structures by Sr²⁺. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;358(1)::298-303.
24. Xue Y, Kan Z-y, Wang Q, Yao Y, Liu J, Hao Y-h, et al. Human Telomeric DNA Forms Parallel-Stranded Intramolecular G-Quadruplex in K⁺ Solution under Molecular Crowding Condition. *Journal of the American Chemical Society*. 2007;129(36):11185-91.
25. Yu H-Q, Miyoshi D, Sugimoto N. Characterization of Structure and Stability of Long Telomeric DNA G-Quadruplexes. *Journal of the American Chemical Society*. 2006;128(48):15461-8.

26. Bejugam M, Sewitz S, Shirude PS, Rodriguez R, Shahid R, Balasubramanian S. Trisubstituted Isoalloxazines as a New Class of G-Quadruplex Binding Ligands: Small Molecule Regulation of c-kit Oncogene Expression. *Journal of the American Chemical Society*. 2007;129(43):12926-7.
27. Tan J-H, Gu L-Q, Wu J-Y. Design of Selective G-quadruplex Ligands as Potential Anticancer Agents. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. 2008;8(11):1163-78.
28. Blackburn GM. *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry. 2006.
29. Fedoroff OY, Salazar M, Han H, Chemeris VV, Kerwin SM, Hurley LH. NMR-Based Model of a Telomerase-Inhibiting Compound Bound to G-Quadruplex DNA. *Biochemistry*. 1998;37(36):12367-74.
30. Han H, Langley DR, Rangan A, Hurley LH. Selective Interactions of Cationic Porphyrins with G-Quadruplex Structures. *Journal of the American Chemical Society*. 2001;123(37):8902-13.
31. Kerwin SM, Chen G, Kern JT, Thomas PW. Perylene diimide G-quadruplex DNA binding selectivity is mediated by ligand aggregation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2002;12(3):447-50.
32. Kypr a, Kejnovska I, Renciuik D, Vorlickova M. Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA. *Nuc Acids Res*. 2009;37(6):1713–25.
33. Wei C, Han G, Jia G, Zhou J, Li C. Study on the interaction of porphyrin with G-quadruplex DNAs. *Biophysical Chemistry*. 2008;137(1):19-23.
34. Randazzo A, Spada G, Silva M. *Circular Dichroism of Quadruplex Structures*. Springer Berlin Heidelberg; 2012. p. 1-20.
35. Zhang H, Xiao X, Wang P, Pang S, Qu F, Ai X, et al. Conformational conversion of DNA G-quadruplex induced by a cationic porphyrin. *Spectrochimica Acta*. 2009;74:243-7.
36. Rachwal PA, Fox KR. Quadruplex melting. *Methods*. 2007;43(4):291-301.
37. Jenkins T. Optical Absorbance and Fluorescence Techniques for Measuring DNA–Drug Interactions. In: Fox K, editor. *Drug-DNA Interaction Protocols*: Springer New York; 1998. p. 195-218.
38. Suh D, Chaires JB. Criteria for the mode of binding of DNA binding agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 1995;3(6):723-8.

