



โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การเชื่อมกันของพีเอ็นเอที่มีคอนฟอร์เมชันจำกัดในภาวะสารละลาย
Solution-phase ligation of conformationally constrained PNA

ชื่อนิสิต นางสาวโสสมลวัญย์ ทิพย์ขุนทอง

ภาควิชา เคมี

ปีการศึกษา 2560

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเชื่อมกันของพีเอ็นเอที่มีคอนฟอร์เมชันจำกัดในภาวะสารละลาย
Solution-phase ligation of conformationally constrained PNA

โดย

นางสาวโสมลวัลย์ ทิพย์ขุนทอง

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


ปีการศึกษา 2560

โครงการ การเชื่อมกันของพีเอ็นเอที่มีคอนฟอร์เมชันจำกัดในภาวะสารละลาย

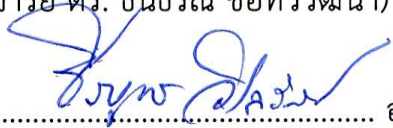
โดย นางสาวโสมลวิณัย ทิพย์ขุนทอง

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ความสามารถล้ำ อ่างเกียรติภูมิ คุณประสิทธิภาพ ทราบศาสตร์แท้จริง รู้สรรพสิ่ง
พร้อมพรั้ม ทักชะชำนาญ ทำงานร่วมใจจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

.....  ประธานกรรมการ

(อาจารย์ ดร. ชนธรรณ ขอทวิวัฒนา)

.....  อาจารย์ที่ปรึกษา

(ศาสตราจารย์ ดร. ชีรยุทธ วิไลวัลย์)

.....  กรรมการ

(อาจารย์ ดร. ชฎิล กุลสิงห์)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

..... หัวหน้าภาควิชาเคมี

(รองศาสตราจารย์ ดร. วุฒิชัย พาราสุข)

วันที่ เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2561

คุณภาพของการเขียนรายงานเล่มนี้อยู่ในระดับ ดีมาก ดี พอใช้

ชื่อโครงการ การเชื่อมกันของพีเอ็นเอที่มีคอนฟอร์เมชันจำกัดในภาวะสารละลาย
 ชื่อนิสิตในโครงการ นางสาวโสมลวิทย์ ทิพย์ขุนทอง เลขประจำตัว 5733176323
 ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ศาสตราจารย์ ดร. อธิรุท วิไลวัลย์
 ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2560

บทคัดย่อ

เพปไทด์นิวคลีอิกแอซิด (พีเอ็นเอ) เป็นสารสังเคราะห์เลียนแบบโพลิโกนิวคลีโอไทด์ธรรมชาติ ซึ่งประกอบด้วยแกนหลักเป็นเพปไทด์ที่ปราศจากประจุ ซึ่งส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของความแข็งแรงของการจับยึดและความจำเพาะต่อการเข้าสู่เบสของพีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอที่สูงกว่าดีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอ ด้วยคุณสมบัติที่ตีเทียมของพีเอ็นเอ มันจึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ ได้อย่างหลากหลาย โดยทั่วไป การสังเคราะห์พีเอ็นเอนิยมกระทำโดยการสังเคราะห์เพปไทด์บนวัฏภาคของแข็ง ซึ่งจะให้ประสิทธิภาพสูงกว่าในวัฏภาคสารละลาย อย่างไรก็ตาม ประสิทธิภาพในการสังเคราะห์ลดลงอย่างมากเมื่อสังเคราะห์พีเอ็นเอโอลิโกเมอร์ที่มีความยาวมากๆ (มากกว่า 10-15 เบส) ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยสนใจที่จะพัฒนาวิธีการสังเคราะห์พีเอ็นเอที่มีลำดับเบสยาวขึ้น โดยอาศัยกระบวนการเชื่อมต่อเปรียบเทียบกัน 3 วิธี ดังนี้ 1) การเชื่อมกันด้วยการทำปฏิกิริยาคลิก (Click reaction) ระหว่างหมู่ฟังก์ชันเอไซด์ กับแอลไคน์ 2) การเชื่อมกันด้วยปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนของไทออล (Thiol-exchange reaction) ของหมู่ฟังก์ชันไทออลกับฟิรดิลไดซัลไฟด์ และ 3) การเชื่อมกันด้วยการทำปฏิกิริยาไมเคิลแอดดิชัน (Michael addition reaction) ของหมู่ฟังก์ชันไทออลกับมาลิอิมัด โดยพีเอ็นเอที่ใช้ในงานวิจัยนี้คือพีเอ็นเอชนิดที่มีคอนฟอร์เมชันจำกัดที่เรียกว่าเอซีพีซีพีเอ็นเอซึ่งแสดงสมบัติการจับยึดกับดีเอ็นเอที่แข็งแรงและจำเพาะเจาะจงกว่าพีเอ็นเอปกติ ปฏิกิริยาเชื่อมต่อจะกระทำกับไธเมอร์ของเอซีพีซีพีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเป็น TT และผ่านการดัดแปรที่เหมาะสมเป็นตัวอย่างทดสอบ โดยติดตามการเกิดปฏิกิริยาการดัดแปรและการเชื่อมต่อของพีเอ็นเอด้วยเทคนิคัลดีทอพ แมสสเปกโตรเมทรี พบว่า การเชื่อมกันของพีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาไมเคิลแอดดิชันของเอซีพีซีพีเอ็นเอที่ถูกดัดแปรด้วยหมู่ไทออลและเอซีพีซีพีเอ็นเอที่ถูกดัดแปรด้วยหมู่มาลิอิมัดให้ผลดีที่สุด โดยการเติมหมู่ไทออลเข้าไปที่เอซีพีซีพีเอ็นเอในรูปแบบที่ถูกปกป้องด้วยหมู่อะเซทิลโดยอาศัยการสังเคราะห์เพปไทด์ตามปกติ จากนั้นจึงกำจัดหมู่ปกป้องออกด้วยไฮดราซีน โดยสามารถกำจัดไดซัลไฟด์ที่เป็นผลิตภัณฑ์ข้างเคียงและเปลี่ยนให้เป็นไทออลโมโนเมอร์โดยการทำปฏิกิริยากับทริส(คาร์บอกซีเอทิล)ฟอสฟิน (TCEP) ก่อนนำไปเชื่อมต่อกับเอซีพีซีพีเอ็นเอที่ถูกดัดแปรด้วยหมู่มาลิอิมัด การศึกษาโดยมัลติ-ทอพแสดงให้เห็นประสิทธิภาพการเชื่อมต่อที่ดีดังจะเห็นได้จากการเกิดผลิตภัณฑ์จากการเชื่อมต่อที่ต้องการเป็นส่วนใหญ่ โดยมีผลิตภัณฑ์ข้างเคียงอื่นเกิดน้อยมาก

คำสำคัญ: พีโรลิดินิลพีเอ็นเอ, การเชื่อมกันของไบโอโมเลกุล, ปฏิกิริยาไมเคิลแอดดิชัน, ปฏิกิริยาคลิก, ปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนของไทออล

Project Title Solution-phase ligation of conformationally constrained PNA
Student Name Miss Somlawan Thipkunthong Student ID 5733176323
Advisor Name Professor Tirayut Vilaivan, Ph.D.
Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic Year 2017



Abstract

Peptide nucleic acid (PNA) is a synthetic oligonucleotide mimic consisting of an uncharged peptide backbone which contributes to a higher binding affinity and sequence specificity of PNA•DNA when compared to DNA•DNA hybrids. With excellent benefits of PNA, this molecule has been successfully applied in various applications. Generally, the PNA synthesis is carried out by solid phase peptide synthesis which offers a higher efficiency than solution phase synthesis. However, the efficiency of PNA synthesis is dramatically decreased for long chain of PNA oligomers (more than 10-15 bases). In this study, we tried to develop a reliable ligation method for synthesizing longer PNA oligomers by comparing three methods, namely 1) Click reaction between azide and alkyne, 2) Thiol-exchange reaction of thiol and pyridine disulfide, and 3) Michael addition reaction of thiol and maleimide. The PNA used in this study is the conformationally constrained acpcPNA that showed even stronger affinity and sequence specificity towards DNA than conventional PNA. The ligation reactions were performed using appropriately modified acpcPNA dimer as a model (TT sequence). The progress of the acpcPNA modification and ligation was monitored by MALDI-TOF mass spectrometry. The ligation of two short acpcPNA sequences via Michael addition between thiol modified acpcPNA and maleimide-modified acpcPNA gave the best results. The thiol group was introduced to the acpcPNA via standard peptide coupling in the form of acetyl-protected thiol, which was subsequently deprotected using hydrazine. The disulfide by-product was also formed, but this could be converted to the monomeric thiol by treatment with tris(carboxyethyl)phosphine (TCEP) before being linked with the maleimide-modified acpcPNA. MALDI-TOF results showed the highest efficiency as revealed by the predominant formation of the desired ligated acpcPNA and little other by-products.

Keywords: Pyrrolidiny PNA, Bioconjugation, Michael addition, Click reaction, Thiol-exchange reaction

กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ เรื่อง การสังเคราะห์การเชื่อมกันของพีเอ็นเอกับดีเอ็นเอ และพีเอ็นเอกับพีเอ็นเอ สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความรู้และคำแนะนำจากศาสตราจารย์ ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ ข้อคิด ตลอดจนให้ความช่วยเหลือและการสนับสนุนเป็นอย่างดีตลอดระยะเวลาที่ทำการวิจัย รวมทั้งให้ความช่วยเหลือในการเขียนรายงานฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ คณะผู้วิจัยจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้ และขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.ธนธรณ์ ขอทวีวัฒนา และอาจารย์ ดร.ชฎิล กุลสิงห์ ที่ให้เกียรติสละเวลามาเป็นกรรมการประเมินโครงการนี้

ขอขอบคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ประสิทธิ์ประสาทวิชา ให้ความรู้และประสบการณ์ต่างๆ ขอขอบคุณภาควิชาเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่สนับสนุนการใช้ห้องปฏิบัติการและเครื่องมือวิจัยต่างๆ ขอขอบคุณคุณโชติมา วิไลวัลย์ ที่คอยให้คำแนะนำถึงข้อปฏิบัติภายในห้องปฏิบัติการ ขอขอบคุณ นายฐิติพงษ์ คำเคนทรงพานุช นายชญัญ เจริญภักดี นางสาวเพ็ญทิพ เมืองแก้ว นายณัฐพล จิระกิตติวุฒิ นางสาวกชกร ศุภาวรสถิตย์ นางสาวตรีชฎา รัชฎจักร นายเกรียงศักดิ์ ฝ่ายเครือ นางสาวดวงรัตน์ นิ่มอนุสรณ์กุล และนางสาวบุญส่ง ดิษมังคล์ ที่คอยให้คำแนะนำตลอดจนให้ความช่วยเหลือในทุกๆ ขั้นตอนของการทำวิจัย และขอขอบคุณทุกๆ กำลังใจและความช่วยเหลือจากพ่อ แม่ และเพื่อนๆ ในภาควิชาเคมี

ขอขอบคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนในการดำเนินงานวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยขอโน้มรำลึกในความกรุณาของทุกท่านที่ได้กล่าวมากล่าวมาข้างต้น และบุคคลที่ไม่ได้เอ่ยนามไว้ ณ ที่นี้

สารบัญ

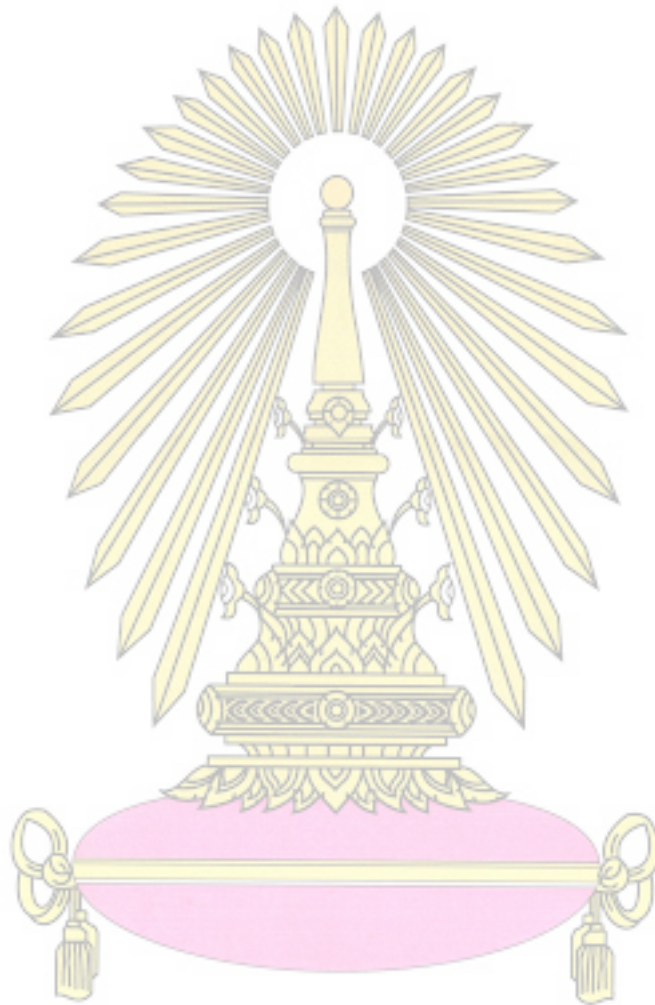
	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญรูปภาพประกอบ	ณ
สัญลักษณ์และคำย่อ	ฐ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
1.2.1 เพปไทด์นิวคลีอิกแอซิด (พีเอ็นเอ)	2
1.2.2 การเชื่อมกันของไปโอโมเลกุล	4
a.) การเชื่อมกันของไปโอโมเลกุลด้วยปฏิกิริยาคลิก	4
b.) การเชื่อมกันของไปโอโมเลกุลด้วยหมู่ไทออล	7
1.3 วัตถุประสงค์และขอบเขตของการวิจัย	12
บทที่ 2 การทดลอง	
2.1 รายการเครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี	13
2.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์	13
2.1.2 สารเคมี	13
2.2 การสังเคราะห์พีเอ็นเอบนวัฏภาคของแข็ง	14
2.3 การเชื่อมกันของพีเอ็นเอผ่านการทำปฏิกิริยาคลิกของหมู่ไฮไซด์และหมู่แอลไคน์	16
2.3.1 การสังเคราะห์ (<i>N</i> -fluorenylmethoxycarbonyl)- <i>cis</i> -4-(azido)-D-proline pentafluorophenyl ester 4	16
2.3.2 การตัดแปรปลายด้านอะมิโน (N-terminus) ของพีเอ็นเอด้วยสาร 4	17
2.3.3 การตัดแปรปลายคาร์บอกซิล (C-terminus) ของพีเอ็นเอด้วย propiolic acid	18
2.4 การเชื่อมกันของพีเอ็นเอผ่านการทำปฏิกิริยา thiol-exchange ของ cysteine ที่มีหมู่ปกป้อง 3-nitro-2-pyridylsulfenyl (Npys) กับหมู่ไทออลอิสระ	19
2.4.1 การตัดแปรปลายด้านอะมิโน (N-terminus) ของพีเอ็นเอด้วย <i>S</i> -acetyl-thioglycolic acid pentafluorophenyl ester	19
2.4.2 การตัดแปรปลายด้านอะมิโน (N-terminus) ของพีเอ็นเอด้วย <i>N</i> -(9-fluorenylmethoxycarbonyl)- <i>S</i> -(3-nitro-2-pyridylthio)-L-cysteine	19
2.4.3 การเชื่อมกันของพีเอ็นเอของพีเอ็นเอ HSCH ₂ CO-TT-LysNH ₂ และพีเอ็นเอ H-Cys(Npys)-TT-LysNH ₂	20

2.5 การเชื่อมกันของพีเอ็นเอผ่านการทำปฏิกิริยาระหว่างหมู่ไทออลและหมู่มาลิอิมด์	21
2.5.1 การตัดแปรปลายด้านอะมิโน (N-terminus) ของพีเอ็นเอด้วย sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate (SMCC)	21
2.5.2 การตัดแปรปลายด้านอะมิโน (N-terminus) ของพีเอ็นเอด้วย N-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-S-trityl-L-cysteine	22
2.5.3 การเชื่อมกันของพีเอ็นเอ H-Cys-TT-LysNH ₂ และพีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH ₂	22
2.5.4 การตัดแปรปลายด้านอะมิโน (N-terminus) ของพีเอ็นเอด้วยตัวเชื่อม S-acetylthioglycolic acid pentafluorophenyl ester	23
2.5.5 การเชื่อมกันของพีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH ₂ และพีเอ็นเอ HSCH ₂ CO-TT-LysNH ₂	23
2.6 การสังเคราะห์ 4-azidobenzoic acid 6	25
บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	
3.1 การเชื่อมกันของพีเอ็นเอผ่านการทำปฏิกิริยาคลิคของหมู่ไฮไซด์และหมู่แอลไคน์	26
3.1.1 การสังเคราะห์ (N-flouren-9-ylmethoxycarbonyl)-cis-4-(azido)-D-proline pentafluorophenyl ester 4	26
3.1.2 การตัดแปรปลายด้านอะมิโน (N-terminus) ของพีเอ็นเอด้วยสาร 4	28
3.1.3 ความพยายามในการตัดแปรปลายด้านคาร์บอกซิล (C-terminus) ของพีเอ็นเอด้วย propiolic acid	30
3.2 การเชื่อมกันของพีเอ็นเอผ่านการทำปฏิกิริยา thiol-exchange ของ cysteine ที่มีหมู่ปกป้อง 3-nitro-2-pyridylsulfenyl (Npys) กับหมู่ไทออลอิสระ	33
3.2.1 การตัดแปรปลายด้านอะมิโน (N-terminus) ของพีเอ็นเอด้วย S-acetylthioglycolic acid pentafluorophenyl ester	33
3.2.2 การตัดแปรปลายด้านอะมิโน (N-terminus) ของพีเอ็นเอด้วย N-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-S-(3-nitro-2-pyridylthio)-L-cysteine ด้วยวิธีที่ 1 และวิธีที่ 2	34
3.2.3 การเชื่อมกันของพีเอ็นเอ Fmoc-Cys(Npys)-TT-LysNH ₂ และพีเอ็นเอ HSCH ₂ CO-TT-LysNH ₂	37
3.3 การเชื่อมกันของพีเอ็นเอผ่านการทำปฏิกิริยาระหว่างหมู่ไทออลและมาลิอิมด์	39
3.3.1 การตัดแปรปลายด้านอะมิโน (N-terminus) ของพีเอ็นเอด้วยตัวเชื่อม sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxamide	39
3.3.2 การตัดแปรปลายด้านอะมิโน (N-terminus) ของพีเอ็นเอด้วยตัวเชื่อม N-(9-fluorenylmethoxy-carbonyl)-S-trityl-L-cysteine	41
3.3.3 การเชื่อมกันของพีเอ็นเอ H-Cys-TT-LysNH ₂ และพีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH ₂	43
3.3.4 การเชื่อมกันของพีเอ็นเอ AcSCH ₂ CO-TT-LysNH ₂ และพีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH ₂	45
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง	54

เอกสารอ้างอิง
ประวัติผู้วิจัย

56

60



สารบัญรูปร่างประกอบ

รูปที่		หน้า
1.1	โครงสร้าง DNA และ aegPNA	2
1.2	การเข้าคู่กันของ aegPNA และ DNA แบบแอนติพาราเรล	3
1.3	โครงสร้างของ (1) γ -modified PNA และ (2) พีโรลิดีนิลพีเอ็นเอชนิด acpcPNA	4
1.4	กลไกการปฏิกิริยาทั่วไปของปฏิกิริยาคลิก โดย Fokin, Sharpless และคณะ	5
1.5	การเชื่อมกันของ peptide-alkyne กับ 4-azidopropyl oligonucleotide โดยปฏิกิริยาคลิก	5
1.6	โครงสร้าง thioacetamido nucleic acids (TANA)	6
1.7	การเชื่อมกันระหว่างหมู่แอลไคน์และหมู่ไฮไดรด์ที่ถูกปรับเปลี่ยนบนเบส uracil ของสายโพลิโกนิวคลีโอไทด์สองสาย	6
1.8	การเชื่อมกันของพีเอ็นเอกับสายโพลิโกนิวคลีโอไทด์ผ่านการทำปฏิกิริยาคลิก	7
1.9	การเชื่อมกันระหว่างโพลิโกนิวคลีโอไทด์ผ่านการทำปฏิกิริยา CuAAC	7
1.10	โครงสร้างของกรดอะมิโน L-cysteine	8
1.11	การเกิดปฏิกิริยาของ thiolate กับ (1) haloacetamide, (2) maleimide, และ (3) disulfide	8
1.12	กลไกการเกิดปฏิกิริยาของหมู่ไทออลกับหมู่มาลีอิมด์	9
1.13	(1) การเชื่อมกันของ bis-PNA กับ duplex DNA และ (2) การเชื่อมกันของสายโพลิโกนิวคลีโอไทด์ และ bis-PNA	9
1.14	การเชื่อมต่อกันระหว่าง CPP กับพีเอ็นเอผ่านปฏิกิริยาไทออล-มาลีอิมด์	10
1.15	กลไกการเกิดปฏิกิริยาของ thiol กับ pyridyl disulfide	11
1.16	การเชื่อมกันของ Cys(Npys) บนเพปไทด์และหมู่ออลิเบนโพรตีน	11
1.17	การเชื่อมกันของเพปไทด์ MTD กับพีเอ็นเอ ผ่านการทำปฏิกิริยา thiol-exchange	12
1.18	หลักการเชื่อมกันของพีเอ็นเอที่ในงานวิจัยนี้	12
2.1	แผนภาพการสังเคราะห์ (<i>N</i> -fluorenylmethoxycarbonyl)- <i>cis</i> -4-(azido)-D-prolinepenta fluorophenyl ester 4	16
2.2	การตัดแปรปลายด้านอะมิโน (N-terminus) ของพีเอ็นเอด้วยสาร 4	17
2.3	การตัดแปรปลายคาร์บอกซิล (C-terminus) ของพีเอ็นเอด้วย propiolic acid	18
2.4	การตัดแปรปลายด้านอะมิโนของพีเอ็นเอด้วย <i>S</i> -acetyl-thioglycolic acid pentafluorophenyl ester	19
2.5	การตัดแปรปลายด้านอะมิโนของพีเอ็นเอด้วย <i>N</i> -(9-fluorenylmethoxycarbonyl)- <i>S</i> -(3-nitro-2-pyridylthio)-L-cysteine	19

2.6	การสังเคราะห์การเชื่อมกันของพีเอ็นเอ HSCH ₂ CO-TT-LysNH ₂ และพีเอ็นเอ H-Cys(Npys)-TT-LysNH ₂	20
2.7	การตัดแปรปลายด้านอะมิโน (N-terminus) ของพีเอ็นเอด้วย sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate	21
2.8	การตัดแปรปลายด้านอะมิโน (N-terminus) ของพีเอ็นเอด้วย N-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-S-trityl-L-cysteine	22
2.9	การเชื่อมกันของพีเอ็นเอ Cys-TT-LysNH ₂ และพีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH ₂	22
2.10	การเชื่อมกันของพีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH ₂ และพีเอ็นเอ HSCH ₂ CO-TT-LysNH ₂	23
2.11	แผนภาพการสังเคราะห์ 4-azidobenzoic acid 6	25
3.1	กลไกการเกิดปฏิกิริยาแทนที่ด้วยหมู่เอไซด์	26
3.2	¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃) ของ (N-flouren-9-ylmethoxycarbonyl)-cis-4-(azido)-D-proline pentafluorophenyl ester 4	27
3.3	IR spectrum ของ (N-flouren-9-ylmethoxycarbonyl)-cis-4-(azido)-D-proline pentafluorophenyl ester 4	28
3.4	โครงสร้างที่คาดว่าจะเกิดขึ้นและค่าแมสที่พบเทียบกับค่าแมสที่คำนวณได้ของพีเอ็นเอในการตัดแปรปลายด้านอะมิโน (N-terminus) ของพีเอ็นเอด้วยสาร 4	29
3.5	mass spectrum ของ (1) พีเอ็นเอ H-TT-LysNH ₂ และ (2) พีเอ็นเอ Fmoc-cis-4-(azido)-D-proline-TT-LysNH ₂	30
3.6	mass spectrum ของ (1) พีเอ็นเอ Ac-TT-LysNH ₂ , (2) การเชื่อมกันของพีเอ็นเอ Ac-TT-LysNH ₂ กับ propiolic acid เป็น 3 ชั่วโมง และ (3) 5 ชั่วโมง ด้วยวิธีที่ 1	31
3.7	mass spectrum ของ (1) พีเอ็นเอ Ac-TT-LysNH ₂ และ (2) การเชื่อมพีเอ็นเอ Ac-TT-LysNH ₂ กับ propiolic acid เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (3) 4 ชั่วโมง ด้วยวิธีที่ 2	32
3.8	โครงสร้างที่คาดว่าจะเกิดขึ้นและค่าแมสที่พบเทียบกับค่าแมสที่คำนวณได้ของพีเอ็นเอในการตัดแปรปลายด้านคาร์บอกซิล (C-terminus) ของพีเอ็นเอด้วย propiolic acid ด้วยวิธีที่ 1 และวิธีที่ 2	32
3.9	mass spectrum ของ (1) พีเอ็นเอ H-TT-LysNH ₂ และ (2) พีเอ็นเอ AcSCH ₂ CO-TT-LysNH ₂	33
3.10	โครงสร้างที่คาดว่าจะเกิดขึ้นและค่าแมสที่พบเทียบกับค่าแมสที่คำนวณได้ของพีเอ็นเอในการตัดแปรปลายด้านอะมิโน (N-terminus) ของพีเอ็นเอด้วย S-acetyl-thioglycolic acid pentafluorophenyl ester	34
3.11	mass spectrum ของ (1) พีเอ็นเอ H-TT-LysNH ₂ และการเชื่อมกันระหว่างพีเอ็นเอ H-TT-LysNH ₂ และ (2) Fmoc-Cys(Npys)-OH ที่เวลา 1 ชั่วโมง (3) 12 ชั่วโมง ด้วยวิธีที่ 1	35

3.12	โครงสร้างที่คาดว่าจะเกิดขึ้นและค่าแมสที่พบเทียบกับค่าแมสที่คำนวณได้ของพีเอ็นเอใน การตัดแปรรูปปลายด้านอะมิโน (N-terminus) ของพีเอ็นเอด้วย <i>N</i> -(9-fluorenylmethoxy-carbonyl)- <i>S</i> -(3-nitro-2-pyridylthio)-L-cysteine ด้วยวิธีที่ 1 และวิธีที่ 2	36
3.13	mass spectrum ของ (1) พีเอ็นเอ TT-LysNH ₂ และ (2) การเชื่อมกันระหว่างพีเอ็นเอ H-TT-LysNH ₂ กับ Fmoc-Cys(Npys)-OH ที่เวลา 2 ชั่วโมงด้วยวิธีที่ 2	37
3.14	โครงสร้างที่คาดว่าจะเกิดขึ้นและค่าแมสที่พบเทียบกับค่าแมสที่คำนวณได้ของพีเอ็นเอใน การเชื่อมกันของพีเอ็นเอ Fmoc-Cys(Npys)-TT-LysNH ₂ และพีเอ็นเอ HSCH ₂ CO-TT-LysNH ₂	38
3.15	mass spectrum ของ (1) พีเอ็นเอสารตั้งต้น AcSCH ₂ CO-TT-LysNH ₂ ที่ถูกกำจัดหมู่อะ เซทิลด้วย 20% piperidine ใน DMF, (2) พีเอ็นเอสารตั้งต้น Fmoc-Cys(Npys)-TT-LysNH ₂ , การทำปฏิกิริยาของพีเอ็นเอ HSCH ₂ CO-TT-LysNH ₂ และ (3) พีเอ็นเอ Fmoc-Cys(Npys)-TT-LysNH ₂ ใน 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง, (4) 3 ชั่วโมง	39
3.16	mass spectrum ของ (1) พีเอ็นเอ H-TT-LysNH ₂ และ (2) พีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH ₂	40
3.17	โครงสร้างที่คาดว่าจะเกิดขึ้นและค่าแมสที่พบเทียบกับค่าแมสที่คำนวณได้ของพีเอ็นเอใน การตัดแปรรูปปลายด้านอะมิโน (N-terminus) ของพีเอ็นเอด้วยตัวเชื่อม sulfosuccinimidyl 4-(<i>N</i> -maleimido- methyl) cyclohexane-1-carboxamide	40
3.18	mass spectrum ของ (1) พีเอ็นเอ H-TT-LysNH ₂ และ (2) พีเอ็นเอ H-TT-LysNH ₂ ที่ถูก ตัดแปรรูปด้วย Fmoc-Cys(Trt)-OH	41
3.19	โครงสร้างที่คาดว่าจะเกิดขึ้นและค่าแมสที่พบเทียบกับค่าแมสที่คำนวณได้ของพีเอ็นเอใน การตัดแปรรูปปลายด้านอะมิโน (N-terminus) ของพีเอ็นเอด้วยตัวเชื่อม <i>N</i> -(9-fluorenylmethoxy-carbonyl)- <i>S</i> -trityl-L-cysteine	42
3.20	การเกิดปฏิกิริยารีดักชันของพันธะ disulfide ด้วย TCEP	43
3.21	โครงสร้างที่คาดว่าจะเกิดขึ้นและค่าแมสที่พบเทียบกับค่าแมสที่คำนวณได้ของพีเอ็นเอใน การเชื่อมกันของพีเอ็นเอ H-Cys-TT-LysNH ₂ และพีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH ₂	44
3.22	mass spectrum ของ (1) พีเอ็นเอ H-Cys-TT-LysNH ₂ , (2) พีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH ₂ , (3) การเชื่อมกันระหว่างพีเอ็นเอ H-Cys-TT-LysNH ₂ และ พีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH ₂ ที่ เวลาหนึ่งคืน และ (4) ที่เติม TCEP 1 mg	45
3.23	โครงสร้างที่คาดว่าจะเกิดขึ้นและค่าแมสที่พบเทียบกับค่าแมสที่คำนวณได้ของพีเอ็นเอใน การเชื่อมกันของพีเอ็นเอ AcSCH ₂ CO-TT-LysNH ₂ และพีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH ₂ ด้วยวิธี ที่ 1, วิธีที่ 2, วิธีที่ 3 และวิธีที่ 4	46

3.24	mass spectrum ของ (1) พีเอ็นเอ HSCH ₂ CO-TT-LysNH ₂ ที่ถูกกำจัดหมู่ Ac ด้วย conc. NH ₃ , (2)พีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH ₂ , การเชื่อมกันระหว่างพีเอ็นเอ HSCH ₂ CO-TT-LysNH ₂ และ (3) พีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH ₂ ที่เวลา 1 ชั่วโมง และ (4) ที่เติม TCEP 1 mg	47
3.25	mass spectrum ของ (1) พีเอ็นเอ HSCH ₂ CO-TT-LysNH ₂ ที่ถูกกำจัดหมู่ Ac ด้วย 1 M NaOH, (2) พีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH ₂ , (3) การเชื่อมกันระหว่างพีเอ็นเอ HSCH ₂ CO-TT-LysNH ₂ กับพีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH ₂ ที่เวลา 1 ชั่วโมง	48
3.26	mass spectrum ของ (1) พีเอ็นเอ HSCH ₂ CO-TT-LysNH ₂ ที่ถูกกำจัดหมู่ Ac ด้วย 0.5 M hydrazine, (2) พีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH ₂ , การเชื่อมกันระหว่างพีเอ็นเอ HSCH ₂ CO-TT-LysNH ₂ และ (3) พีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH ₂ ที่เวลา 1 ชั่วโมง และ (4) ที่เติม TCEP 1 mg	49
3.27	แผนภาพการกำจัด TCEP ด้วยหมู่เอไซด์	50
3.28	mass spectrum ของ (1) พีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH ₂ 0.025 μmol, (2) พีเอ็นเอ HSCH ₂ CO-TT-LysNH ₂ 0.0125 μmol ที่ถูกกำจัดหมู่ Ac ด้วย 0.5 M hydrazine, (3) HSCH ₂ CO-TT-LysNH ₂ ที่ถูกเติมด้วย TCEP และ (4) การเชื่อมกันระหว่างพีเอ็นเอ HSCH ₂ CO-TT-LysNH ₂ และพีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH ₂ ที่เวลา 1 ชั่วโมง หลังจากเติม 4-azidobenzoic acid	50
3.29	mass spectrum ของ (1) พีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH ₂ 0.25 μmol, (2) พีเอ็นเอ HSCH ₂ CO-TT-LysNH ₂ 0.25 μmol ที่ถูกกำจัดหมู่ Ac ด้วย 0.5 M hydrazine, (3) HSCH ₂ CO-TT-LysNH ₂ ที่ถูกเติมด้วย TCEP และการเชื่อมกันระหว่างพีเอ็นเอ HSCH ₂ CO-TT-LysNH ₂ และ (4) พีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH ₂ ที่เวลา 1 ชั่วโมง หลังจากเติม 4-azidobenzoic acid	51
3.30	แผนภาพการสังเคราะห์ของ 4-azidobenzoic acid 6	51
3.31	¹ H NMR (400 MHz, DMSO) ของ 4-azidobenzoic acid 6	52
3.32	IR spectrum ของ 4-azidobenzoic acid 6	52

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

Ac	acetyl
acpc	2-aminocyclopentanecarboxylic acid
aeg	<i>N</i> -2-aminoethylglycine
Boc	<i>tert</i> -butoxycarbonyl
CDCl ₃	deuterated chloroform
CH ₂ Cl ₂	dichloromethane
Cys	cysteine
DI	deionized
DMSO- <i>d</i> ₆	deuterated dimethylsulfoxide
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DNA	deoxyribonucleic acid
Dpm	diphenylmethyl
Fmoc	fluorenylmethyloxycarbonyl chloride
Lys	lysine
MALDI-TOF	matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight
MCC	maleimidocyclohexanecarboxy
mg	milligram
mL	milliliter
mM	millimolar
mmol	millimole
Mtt	methyltrityl
NMR	nuclear magnetic resonance
Npys	3-nitro-2-pyridylthio
Pfp	pentafluorophenyl
PNA	peptide nucleic acid
Tfa	trifluoroacetic acid
Trt	trityl
μL	microliter

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันโพลิโกนิวคลีโอไทด์สังเคราะห์ซึ่งสามารถเข้าคู่กับสายดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอได้อย่างสมบูรณ์แบบจำเพาะเจาะจง มีบทบาทในการพัฒนาเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ได้หลากหลาย เช่น การพัฒนาเพื่อนำไปใช้ในการรักษาโรคเกี่ยวกับพันธุกรรม¹ (gene therapy) และการตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอ² (DNA sequence determination) เพื่อวัตถุประสงค์ต่างๆ เช่น การตรวจวินิจฉัย เป็นต้น แต่ดีเอ็นเอเมื่ออยู่ในสภาวะของร่างกายปกติจะไม่เสถียรและถูกย่อยด้วยเอนไซม์นิวคลีเอสได้ง่าย นอกจากนี้การที่ดีเอ็นเอมีหมู่ฟอสเฟตอยู่ในสายโซ่หลักทำให้มีประจุลบและเกิดแรงผลักระหว่างดีเอ็นเอสองสายที่มาเข้าคู่กัน ความเสถียรของการเข้าคู่กันของดีเอ็นเอจึงมีขีดจำกัด

ภายหลังจึงได้มีการพัฒนาพีเอ็นเอ^{3,4} (peptide nucleic acids, PNA) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์เลียนแบบสายโพลิโกนิวคลีโอไทด์ธรรมชาติเพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าวข้างต้น โดยโครงสร้างของพีเอ็นเอประกอบไปด้วยสายหลักที่ไม่มีประจุทำให้การเข้าคู่กันระหว่างพีเอ็นเอกับดีเอ็นเอปราศจากแรงผลักระหว่างประจุลบของหมู่ฟอสเฟต ทำให้สามารถจับกับดีเอ็นเอที่เป็นเป้าหมายได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าดีเอ็นเอจับกับดีเอ็นเอด้วยกันเองในธรรมชาติ โดยการเข้าคู่เบสระหว่างพีเอ็นเอกับดีเอ็นเอเป็นไปตามกฎของวัตสัน-คริก เช่นเดียวกับการเข้าคู่กันเองของดีเอ็นเอ กล่าวคือ เบสไทมีน (T) เข้าคู่กับ เบสอะดีนีน (A) ด้วยพันธะไฮโดรเจนสองพันธะ ส่วนเบสไซโตซีน (C) เข้าคู่กับเบสกวานีน (G) ด้วยพันธะไฮโดรเจนสามพันธะ

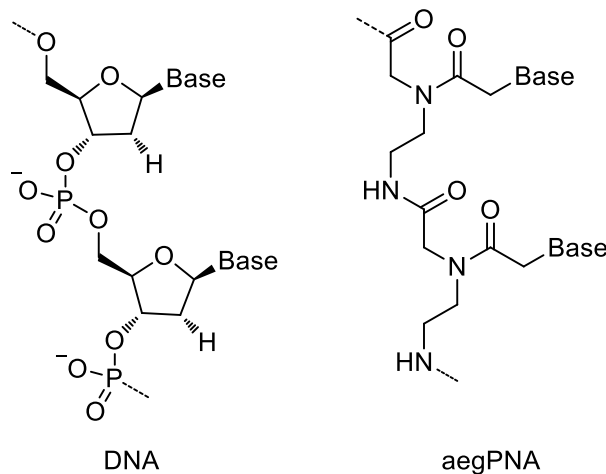
ในการสังเคราะห์สายโพลิโกนิวคลีโอไทด์ รวมทั้งพีเอ็นเอ ส่วนใหญ่จะใช้วิธีการสังเคราะห์บนวัฏภาคของแข็งที่พัฒนาขึ้นมาโดย Merrifield⁵ สำหรับการสังเคราะห์เพปไทด์ ซึ่งแม้จะเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าการสังเคราะห์ในวัฏภาคสารละลาย เนื่องจากสามารถใช้โมโนเมอร์มากเกินไปเพื่อบังคับให้ปฏิกิริยาเกิดไปข้างหน้าได้อย่างสมบูรณ์โดยไม่มีปัญหาเรื่องการแยกผลิตภัณฑ์ออกจากโมโนเมอร์ที่เกินพอเพราะผลิตภัณฑ์จะอยู่บนวัฏภาคของแข็ง จึงสามารถล้างโมโนเมอร์ที่เกินพอออกได้ง่าย แต่วิธีนี้ก็ยังมีข้อจำกัดที่เมื่อสังเคราะห์โพลิโกเมอร์ที่มีความยาวมากๆ โดยแม้ประสิทธิภาพการเชื่อมต่อของโมโนเมอร์ในแต่ละขั้นจะสูง แต่เมื่อทำซ้ำๆ หลายรอบ จะทำให้ประสิทธิภาพโดยรวมลดลง จึงทำให้อายุของผลิตภัณฑ์ที่ได้ต่ำ ตัวอย่างเช่น ถ้าปฏิกิริยาเชื่อมต่อของโมโนเมอร์ในแต่ละขั้นมีประสิทธิภาพ 90% เมื่อผ่านไป 10, 20 และ 50 รอบ ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่มีความยาว 10, 20 และ 50 หน่วยจะเหลือ 34.9, 12.2 และ 0.5% ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า ยิ่งถ้าความยาวเพิ่มขึ้น ประสิทธิภาพจะลดลงเป็นทวีคูณ โดยปกติการสังเคราะห์พีเอ็นเอจะได้ประสิทธิภาพได้ถึงความยาวประมาณ 10-15 เบสเท่านั้น ในงานวิจัยนี้ต้องการที่จะแก้ไขปัญหาดังกล่าว โดยการสังเคราะห์พีเอ็นเอที่มีลำดับเบสยาวขึ้นจากพีเอ็นเอสายสั้นๆ สองสาย โดยผ่านกระบวนการเชื่อมต่อที่เหมาะสม เช่น การเชื่อมกันด้วยการทำปฏิกิริยาคลิก (click reaction) ของหมู่ฟังก์ชันเอไซด์กับแอลไคน์ และการเชื่อมกันด้วยการทำปฏิกิริยาไมเคิลแอดดิชัน (Michael addition) และปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนของไทออล (thiol-exchange

reaction) โดยคาดว่า การเชื่อมต่อพีเอ็นเอสายสั้นๆ นี้จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสังเคราะห์พีเอ็นเอสายยาว และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการเชื่อมต่อระหว่างพีเอ็นเอกับโมเลกุลอื่น เช่น ดีเอ็นเอ หรือเพปไทด์ เพื่อให้ได้โมเลกุล พีเอ็นเอผสมที่อาจนำไปใช้พัฒนาทางด้านเทคโนโลยีทางพันธุกรรมต่างๆ

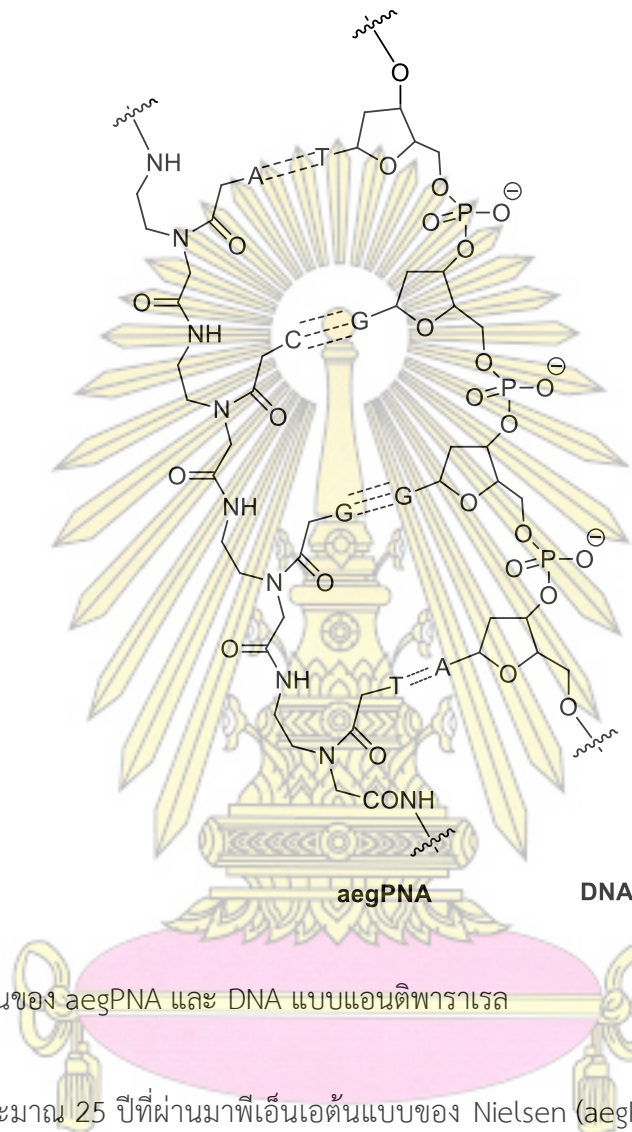
1.2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1.2.1 เพปไทด์นิวคลีอิกแอซิด (พีเอ็นเอ)

พีเอ็นเอ⁶ หรือเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิด หรือพอลิเอไมด์นิวคลีอิกแอซิด เป็นสารสังเคราะห์เลียนแบบสายโพลิโกนิวคลีโอไทด์ธรรมชาติ ในปี 1991 Nielsen และคณะ³⁻⁶ ได้สังเคราะห์พีเอ็นเอต้นแบบที่เรียกว่า aminoethylglycyl PNA (aegPNA) ได้จากการการเลียนแบบโครงสร้างดีเอ็นเอด้วยการแทนที่หมู่น้ำตาลและหมู่ฟอสเฟตด้วย *N*-(2-aminoethylglycine) ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเพปไทด์ ดังรูปที่ 1.1 พีเอ็นเอแสดงสมบัติการจับยึด (hybridization) กับดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอเป้าหมายเหมือนกับดีเอ็นเอจับกับดีเอ็นเอด้วยกันเองโดยอาศัยความจำเพาะของการเข้าคู่กันระหว่างเบสในโมเลกุล และเนื่องจากโครงสร้างของพีเอ็นเอประกอบไปด้วยสายพอลิเพปไทด์ที่ไม่มีประจุทำให้การเข้าคู่กันระหว่างพีเอ็นเอกับดีเอ็นเอปราศจากแรงผลักระหว่างประจุลบของหมู่ฟอสเฟตดังที่พบในดีเอ็นเอ ทำให้พีเอ็นเอสามารถจับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวได้อย่างมีประสิทธิภาพ เกิดเป็นโมเลกุลผสมแบบดับเบิลเฮลิคซ์ที่มีความเสถียรมากกว่าดีเอ็นเอจับกับดีเอ็นเอด้วยกันเองดังรูปที่ 1.2 โดยพีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอจะแสดงความจำเพาะเจาะจงที่สูงกว่าดีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอ โดยพีเอ็นเอจะให้โมเลกุลผสมที่มีความผิดพลาดในการเข้าคู่ของลำดับเบสได้น้อยกว่าดีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอ นอกจากนี้ยังพบว่าพีเอ็นเอยังมีความเสถียรต่อเอนไซม์นิวคลีเอสและโปรตีเอสอีกในร่างกาย⁷ สมบัติที่น่าสนใจเหล่านี้จึงทำให้มีการศึกษาและพัฒนาเกี่ยวกับพีเอ็นเออย่างต่อเนื่อง



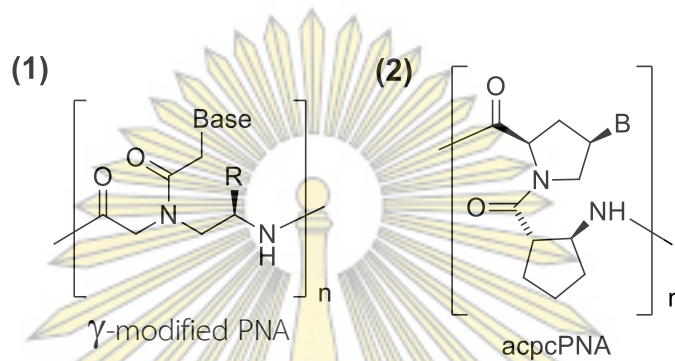
รูปที่ 1.1 โครงสร้าง DNA และ aegPNA



รูปที่ 1.2 การเข้าคู่กันของ aegPNA และ DNA แบบแอนติพาราเรล

ในช่วงประมาณ 25 ปีที่ผ่านมาพีเอ็นเอต้นแบบของ Nielsen (aegPNA) ได้ถูกนำไปประยุกต์ใช้ใน ด้านต่างๆ เช่น การรักษาโรคโดยการควบคุมการแสดงออกทางพันธุกรรม⁸ และตรวจวินิจฉัยโรค⁹ มีการพัฒนา ต่อมาเพื่อปรับปรุงสมบัติบางประการให้ดีขึ้น เช่น ความสามารถในการจับยึดกับดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอ เป้าหมาย ตัวอย่างที่สำคัญหนึ่งคือการแทนที่ไฮโดรเจนอะตอมบนตำแหน่ง γ ของ *N*-2-aminoethylglycine backbone ของ aegPNA ดังรูปที่ 1.3 (a) ด้วยหมู่แอลคิลขนาดเล็ก เช่น ไฮดรอกซีเมทิล หรืออะมิโนแอลคิล เกิดเป็น γ -PNA ที่แสดงสมบัติการจับยึดที่ดีกว่าพีเอ็นเอต้นแบบเนื่องจากการบังคับคอนฟอร์เมชันของโมเลกุล ของพีเอ็นเอด้วยหมู่แอลคิลที่เพิ่มเข้าไป¹⁰ อีกวิธีการหนึ่งที่นิยมใช้ในการบังคับคอนฟอร์เมชันของพีเอ็นเอคือ การทำให้โครงสร้างมีลักษณะเป็นวงแหวน เช่น ในปี 2005 Vilaivan และคณะ^{11,12,13} ได้พัฒนาระบบของ pyrrolidiny PNA ดังรูปที่ 1.3 (b) ที่ใช้วงแหวนพิร์โรลิดีนเป็นตัวจำกัดคอนฟอร์เมชันของพีเอ็นเอ ตัวอย่างเช่น acpcPNA ซึ่งมีโครงสร้างหลักเป็น D-prolyl-2-aminocyclopentanecarboxylic acid ซึ่งนอกจากจะ สามารถจับกับดีเอ็นเอได้อย่างแข็งแรง และจำเพาะเจาะจงกว่า aegPNA พิร์โรลิดินิลพีเอ็นเอยังมีสมบัติพิเศษ อีกหลายประการที่แตกต่างจากพีเอ็นเอปกติ เช่น การเลือกจับเฉพาะในทิศทางแอนติพาราเรลเหมือนกับใน ธรรมชาติ เท่านั้น โดยเป็นผลจาก pyrrolidiny PNA ถูกจำกัดความยืดหยุ่นจากโครงสร้างของวงแหวนพิร์โรลิดีน ทำให้ไม่สามารถจับกับดีเอ็นเอทิศทางพาราเรลเหมือนกับ aegPNA การเลือกจับกับดีเอ็นเอได้ดีกว่าอาร์

เอ็นเอและการที่พีโรลิดินิลพีเอ็นเอไม่สามารถเข้าคู่กันเอง ทำให้มีการนำพีโรลิดินิลพีเอ็นเอไปประยุกต์ใช้งานได้อย่างกว้างขวาง^{14,15}



รูปที่ 1.3 โครงสร้างของ (1) γ -modified PNA และ (2) พีโรลิดินิลพีเอ็นเอชนิด acpcPNA

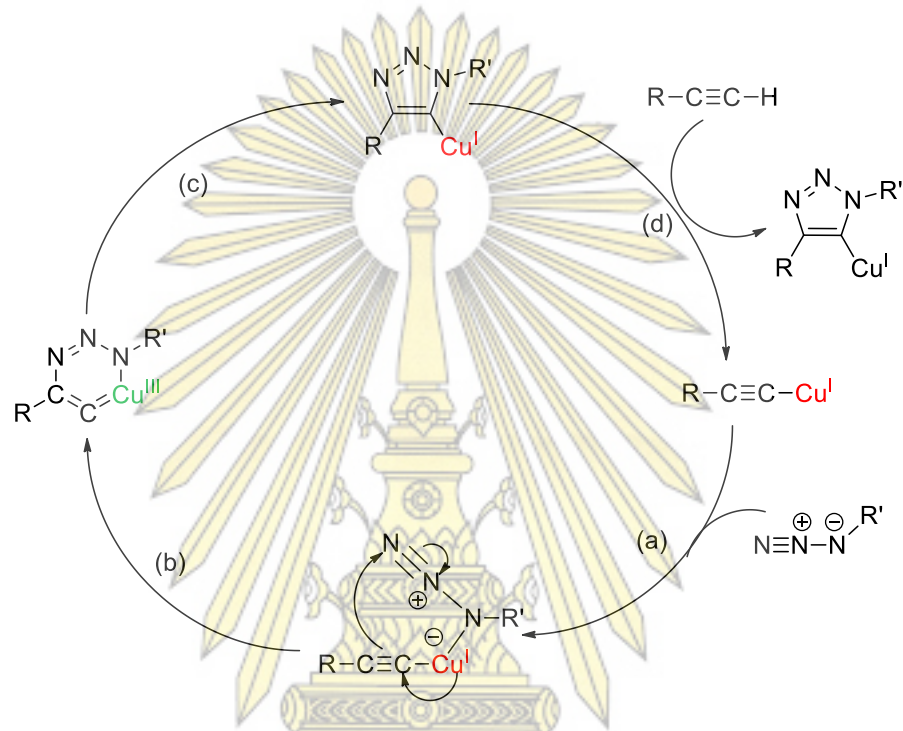
1.2.2 การเชื่อมกันของไบโอโมเลกุล

การเชื่อมกันระหว่างไบโอโมเลกุล (bioconjugation)¹⁶ คือ การเชื่อมกันระหว่างโมเลกุลสองโมเลกุลหรือมากกว่านั้นด้วยการทำปฏิกิริยาทางเคมีจนเกิดเป็นพันธะโควาเลนต์ที่มีความเสถียร ซึ่งสามารถเกิดได้ง่ายภายใต้ภาวะที่ไม่รุนแรงและเข้ากันได้กับไบโอโมเลกุลที่สนใจโดยไม่ทำลายไบโอโมเลกุลให้เสื่อมสภาพ เช่น ในบัพเพอร์ที่มีน้ำเป็นตัวทำละลายที่อุณหภูมิห้องหรือต่ำกว่า และมีความจำเพาะเจาะจงสูง โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้างเคียงอื่น ซึ่งการเชื่อมต่อนี้จะทำให้ไบโอโมเลกุลมีฟังก์ชันการทำงานที่หลากหลายที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในสาขาต่างๆได้ เช่น ใช้ในการติดตามการทำงานในเซลล์ ใช้ในการขนส่งยาเข้าสู่เซลล์เป้าหมาย เป็นต้น ตัวอย่างของปฏิกิริยาที่นิยมใช้ในการเชื่อมต่อไบโอโมเลกุลเข้าด้วยกัน¹⁷ ได้แก่ click reaction, thiol-base reaction และ hydrazone/oxime formation ซึ่งที่ผ่านมามีเฉพาะปฏิกิริยาคลิกเท่านั้นที่เคยมีผู้นำมาประยุกต์ใช้ในการเชื่อมต่อพีเอ็นเอสองสายเข้าด้วยกัน^{23,25}

a.) การเชื่อมกันของไบโอโมเลกุลด้วยปฏิกิริยาคลิก

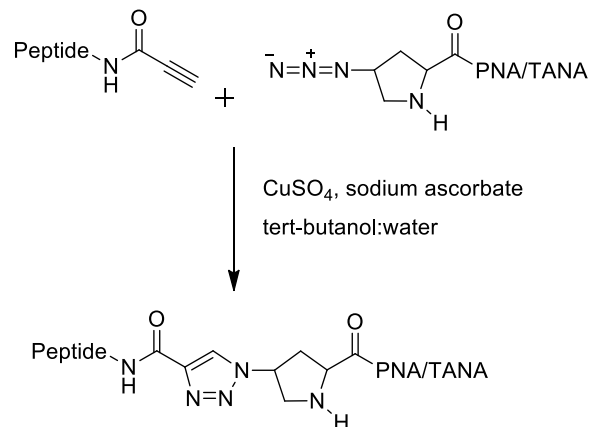
ปฏิกิริยาการปิดวงของหมู่เอไซด์และหมู่แอลโคไนด์เกิดเป็นสารประกอบ 1,2,3-ไตรอะโซล มีชื่อเฉพาะว่า Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition ซึ่งแต่เดิมปฏิกิริยานี้จะเกิดภายใต้ภาวะที่ค่อนข้างรุนแรง และมี regioselectivity ที่ไม่ดีนัก แต่เมื่อไม่นานมานี้ Meldal¹⁸ และ Sharpless¹⁹ ได้ค้นพบว่าปฏิกิริยานี้สามารถเร่งได้ด้วย Cu(I) ทำให้เกิดปฏิกิริยาภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรงที่อุณหภูมิห้อง ได้เป็นผลิตภัณฑ์เพียง regioisomer เดียวคือ 1,4-disubstituted 1,2,3-triazoles ที่มีความเสถียร ดังรูปที่ 1.4 โดยกลไกการเกิดปฏิกิริยาเริ่มจาก Cu(I) จะเข้าไปโคออดิเนตกับหมู่แอลโคไนด์ จากนั้นหมู่เอไซด์จะเข้ามาทำปฏิกิริยากับหมู่แอลโคไนด์นี้ ส่งผลให้หมู่ฟังก์ชันทั้งสองอยู่ใกล้ชิดกันและเกิดผลิตภัณฑ์เป็นวง triazole ที่มีความเสถียร ปัจจุบันปฏิกิริยานี้เป็นที่รู้จักกันในชื่อของ click reaction²⁰ จากการที่มันเป็นปฏิกิริยาที่ทำได้ง่าย ไม่ยุ่งยากและเกิดได้อย่างรวดเร็ว อีกทั้งยังมีความจำเพาะเจาะจงสูง โดยเกิดเฉพาะกับหมู่แอลโคไนด์และหมู่เอไซด์ ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันที่ไม่ค่อยพบในธรรมชาติ

มันจึงเป็นหนึ่งในปฏิกิริยาที่ได้รับความนิยมในการนำมาประยุกต์ใช้ในการเชื่อมต่อระหว่างไปโอโมเลกุล เช่น การตัดแปลงโปรตีนโดยโมเลกุลขนาดเล็ก²¹ การเชื่อมกันระหว่างเพปไทด์และดีเอ็นเอ²² เป็นต้น

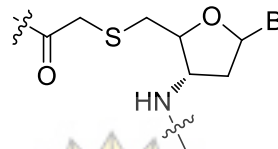


รูปที่ 1.4 กลไกการปฏิกิริยาทั่วไปของปฏิกิริยาคลิก โดย Fokin, Sharpless และคณะ

ในปี 2007 Gogoi และคณะ²³ ได้เชื่อมต่อเพปไทด์และพีเอ็นเอเข้าด้วยกันโดยอาศัย click reaction ระหว่างหมู่แอลไคโนจาก propynoic acid ที่ต่อบนสายเพปไทด์ และหมู่เอไซด์ที่ต่อบนพีเอ็นเอหรือทีเอเอ็นเอ (thioacetamido nucleic acid ซึ่งเป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์สังเคราะห์ที่มีการแทนที่หมู่ฟอสเฟตของดีเอ็นเอ ด้วย $\text{N}^{\text{3}'}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2$ ดังรูปที่ 1.6) โดยผ่านกรดอะมิโน (2S,4S)-4-azidoproline และใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา คือ Cu(I) ในน้ำ พบว่าสามารถเชื่อมต่อกันได้อย่างจำเพาะเจาะจงและปราศจากการรบกวนจากหมู่ฟังก์ชันอื่นในระบบ ดังรูปที่ 1.5

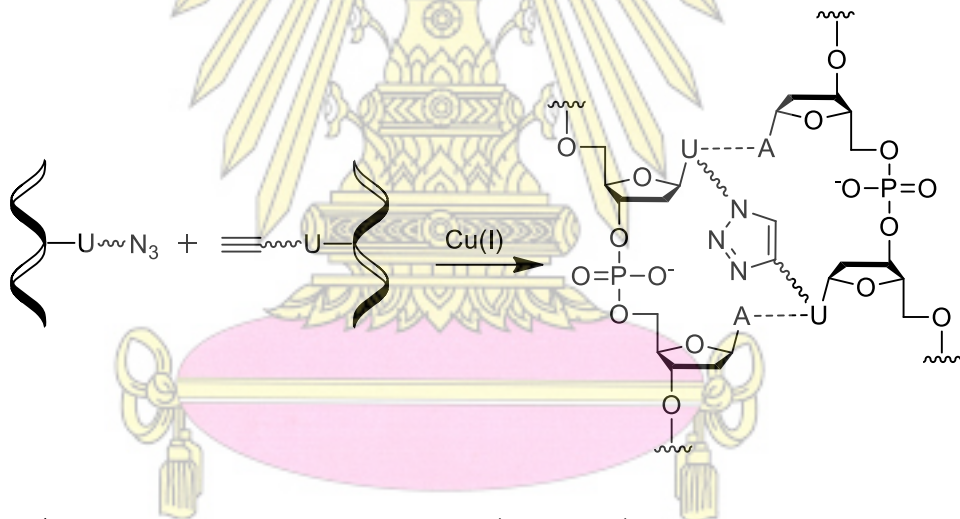


รูปที่ 1.5 การเชื่อมกันของ peptide-alkyne กับ 4-azidoprolyl oligonucleotide โดยปฏิกิริยาคลิก



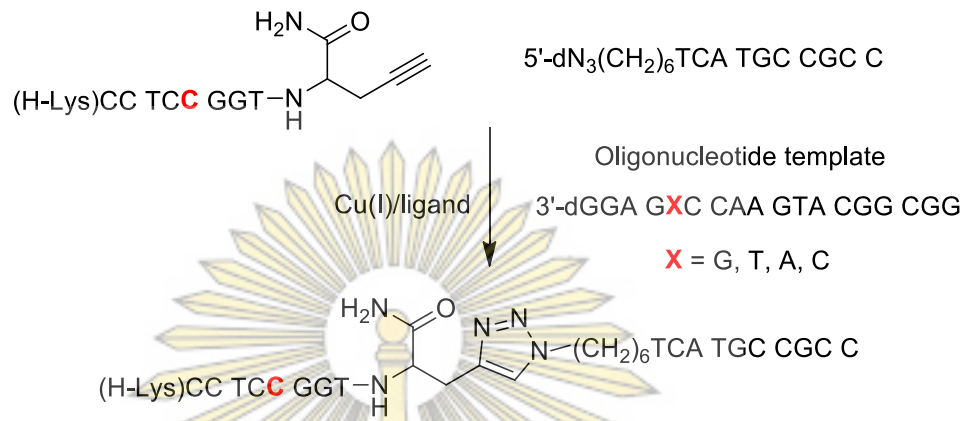
รูปที่ 1.6 โครงสร้าง thioacetamido nucleic acids (TANA)

ในปี 2008 Kocalka และคณะ²⁴ ได้เชื่อมต่อสายดีเอ็นเอสองสายบนวิภาคของแข็ง โดยการตัด แปรหมู่แอลไคน์และหมู่เอไซด์ลงบนเบส uracil ของดีเอ็นเอแต่ละสาย จากนั้นจึงนำมาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ โคเวเลนต์ ดังรูปที่ 1.7 ที่ทำให้การเข้าคู่กันของสายดีเอ็นเอมีความเสถียรต่อความร้อนมากกว่าปกติถึง 30 °C และไม่รบกวนโครงสร้างแบบ B-DNA ที่ได้จากการเข้าคู่กันของ DNA สองสาย ซึ่งเป็นรูปแบบของดีเอ็นเอที่พบบ่อยที่สุดในธรรมชาติ



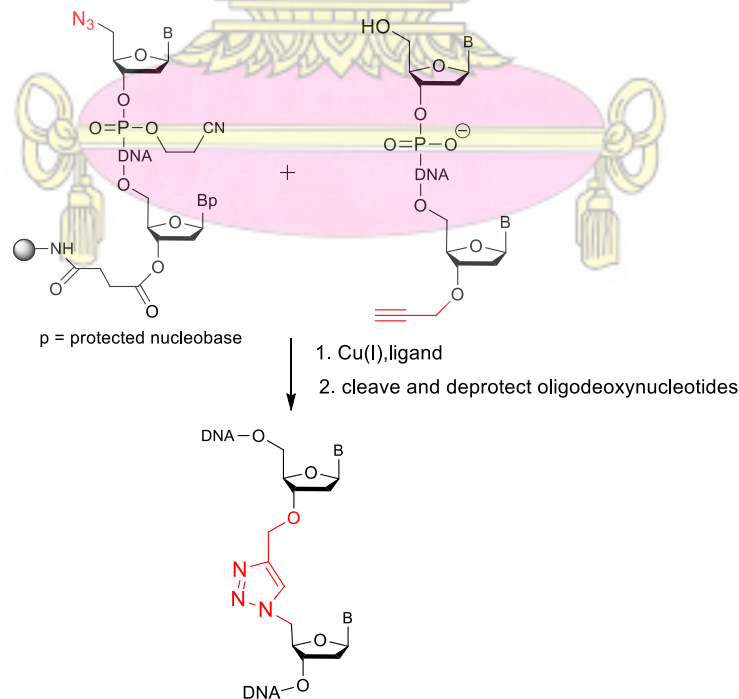
รูปที่ 1.7 การเชื่อมกันระหว่างหมู่แอลไคน์และหมู่เอไซด์ที่ถูกปรับเปลี่ยนลงบนเบส uracil ของสายโพลิ-นิวคลีโอไทด์สองสาย

ในปี 2010 Peng และคณะ²⁵ ได้พัฒนาวิธีการสังเคราะห์พีเอ็นเอสายยาวหรือการเชื่อมพีเอ็นเอกับโมเลกุลอื่น โดยใช้ปฏิกิริยาคลิกของหมู่เอไซด์บนปลายด้านอะมิโนกับหมู่แอลไคน์บนปลายด้านคาร์บอกซิลของอีกโมเลกุลหนึ่ง โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยา คือ Cu(I) และเมื่อสังเคราะห์โพลิโกเมอร์ที่มีสายยาวมากขึ้นจะส่งผลให้ร้อยละของผลิตภัณฑ์ลดลง ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทำปฏิกิริยาแบบ templated ligation หรือ การเชื่อมกันระหว่างโมเลกุล โดยอาศัยสายโพลิโกนิวคลีโอไทด์แม่แบบที่สามารถเข้าคู่กับพีเอ็นเอและดีเอ็นเอได้ ทำให้มีความจำเพาะเจาะจงในการเชื่อมกันมากขึ้น และสามารถเกิดปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการเชื่อมพีเอ็นเอกับพีเอ็นเอ และพีเอ็นเอกับดีเอ็นเอ ภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรงได้ ส่วนการเชื่อมพีเอ็นเอกับเพปไทด์สามารถสังเคราะห์ได้โดยไม่ต้องอาศัย template ดังรูปที่ 1.8



รูปที่ 1.8 การเชื่อมของพีเอ็นเอกับสายโอลิโกนิวคลีโอไทด์ผ่านการทำปฏิกิริยาคลิก

ในปี 2013 Qiu และคณะ²⁶ ได้สังเคราะห์สายโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่มีลำดับเบสยาวถึง 186 เบส โดยการทำปฏิกิริยา Cu(I) catalyzed [3+2] azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) ของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ถูกตัดแปรด้วยหมู่ไฮไดรอกไซด์และแอลไคน์ ดังรูปที่ 1.9 ซึ่งมีประสิทธิภาพดีกว่าการสังเคราะห์สายโอลิโกนิวคลีโอไทด์ตามวิธีทั่วไป

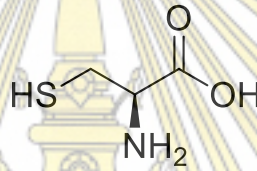


รูปที่ 1.9 การเชื่อมกันระหว่างโอลิโกนิวคลีโอไทด์ผ่านการทำปฏิกิริยา CuAAC

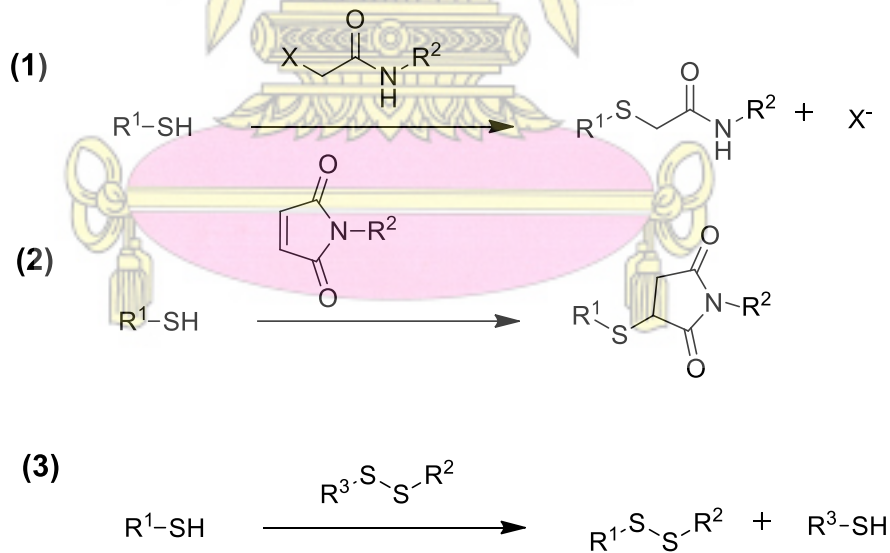
b.) การเชื่อมกันของไบโอโมเลกุลด้วยหมู่ไทออล

ในธรรมชาติหมู่ไทออล (thiol) หรือหมู่ซัลไฟด์ไรล (sulfhydryl) เป็นหมู่ที่มีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาหรือมีความเป็นนิวคลีโอไฟล์ที่ดี ซึ่งสามารถพบได้ในส่วนประกอบของโซ่ข้าง (side chain) ของ

กรดอะมิโนซิสเทอีน (cysteine) ในโปรตีน ดังรูปที่ 1.10 และหมู่ไทออลยังมีความจำเพาะเจาะจงในการเกิดปฏิกิริยาสูง อีกทั้งยังเป็นนิวคลีโอไฟล์ที่ดีในช่วง pH ที่กว้าง จึงนิยมนำหมู่ไทออลมาประยุกต์ใช้ในการเชื่อมกันระหว่างไบโอโมเลกุล¹⁷ เช่น ปฏิกิริยาระหว่างหมู่ไทออล และหมู่ haloacetyls, maleimides, aziridines, acryloyls, arylating agents, vinylsulfones และ pyridyl disulfides (รูปที่ 1.11) แต่หมู่ไทออลมักเกิดเป็นพันธะ disulfide ได้ง่ายจากปฏิกิริยาออกซิเดชันในอากาศ จึงมักต้องทำปฏิกิริยารีดักชันเพื่อให้เกิดเป็นหมู่ไทออลอิสระ โดยรีดิวซิงเอเจนต์ที่นิยมใช้ คือ tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP)²⁷ เนื่องจากมีความสามารถในการละลายน้ำที่ดี ไม่มีกลิ่นและไม่เป็นพิษ อีกทั้งยังทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนที่เสถียร



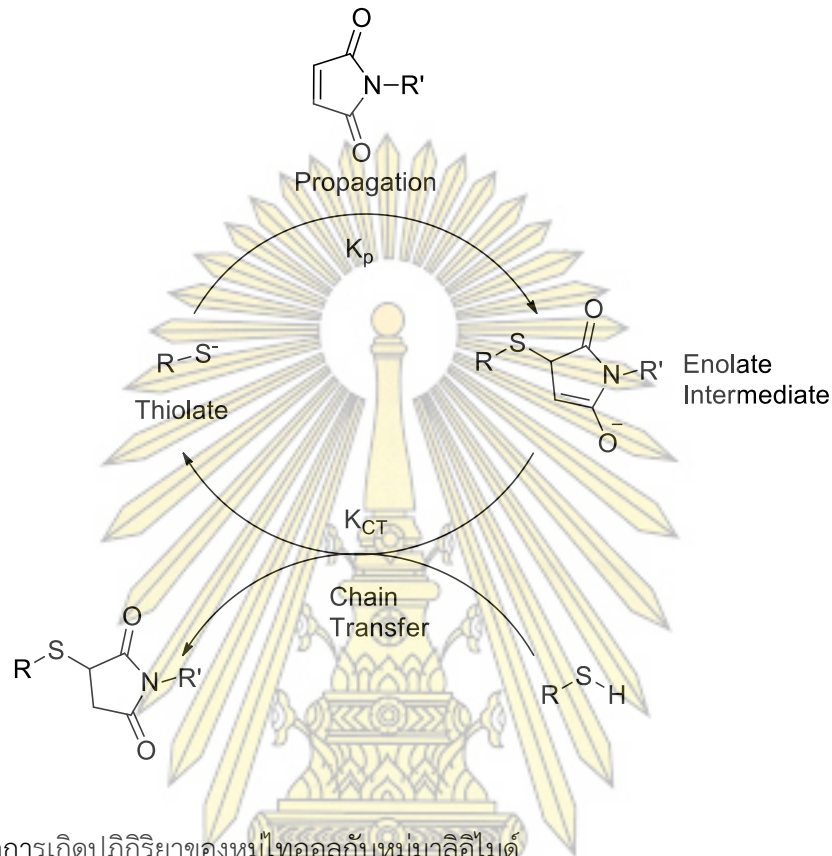
รูปที่ 1.10 โครงสร้างของกรดอะมิโน L-Cysteine



รูปที่ 1.11 การเกิดปฏิกิริยาของ thiolate กับ (1) haloacetamide, (2) maleimide, และ (3) disulfide

Michael addition reaction

หมู่ไทออลสามารถเกิดปฏิกิริยา Michael addition อย่างจำเพาะเจาะจงกับหมู่มาลอิไมด์ที่เป็น Michael acceptor ที่ดี ดังรูปที่ 1.12 โดยเกิดปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิห้องและที่ช่วง pH 6.5 ถึง 7.5 โดยไม่ต้องอาศัยตัวเร่งปฏิกิริยา เกิดเป็นผลิตภัณฑ์เป็น thiol-maleimide adduct ที่มีความเสถียร



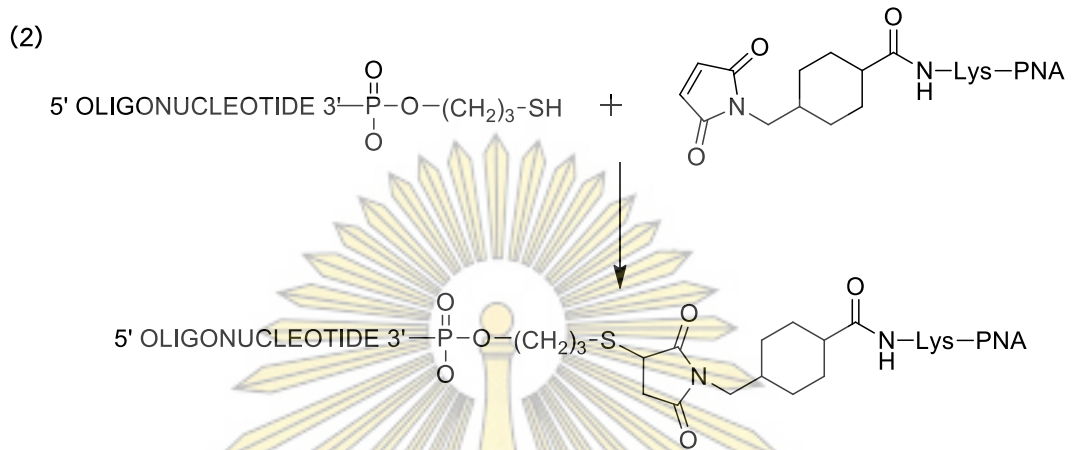
รูปที่ 1.12 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของหมู่ไทออลกับหมู่มาลิอิมัด

ในปี 2002 Rogers และคณะ²⁸ ได้สังเคราะห์โมเลกุลลูกผสมของพีเอ็นเอและดีเอ็นเอ โดยใช้วิธี postsynthetic ligation ในการเชื่อมต่อระหว่างพีเอ็นเอที่อยู่ในรูป PNA-DNA-PNA triplex (bis-PNA) ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายสั้นๆที่มีลำดับเบสชนิด purine ดังรูปที่ 1.13 (1) ที่ถูกตัดแปรด้วยหมู่มาลิอิมัดกับดีเอ็นเอที่มีหมู่ไทออล เกิดเป็นพันธะโคเวเลนต์ ดังรูปที่ 1.13 (2) ที่ทำให้โมเลกุลนี้สามารถซ่อมแซมดีเอ็นเอเป้าหมายได้อย่างจำเพาะเจาะจง ซึ่งคุณสมบัตินี้อาจนำไปใช้ในการแก้ไขข้อบกพร่องของยีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับโรคทางพันธุกรรมได้

(1)

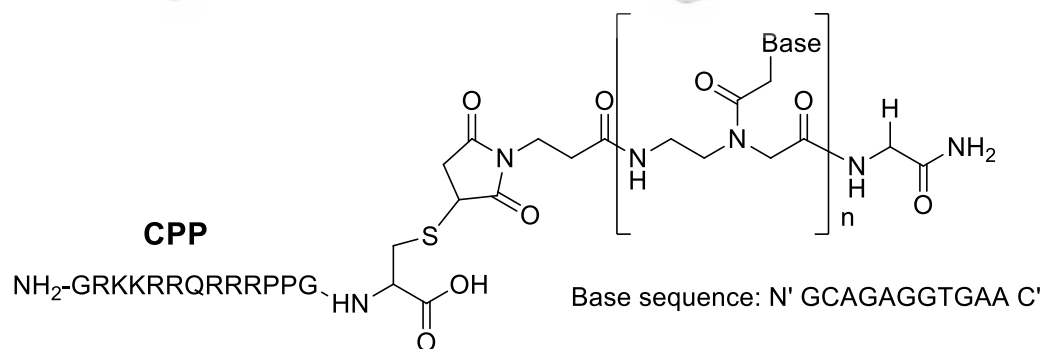


K = Lys-(SMCC), J = pseudoisocytosine



รูปที่ 1.13 (1) การเชื่อมกันของ bis-PNA กับ duplex DNA และ (2) การเชื่อมกันของสายโอลิโกนิวคลีโอไทด์ และ bis-PNA

ในปี 2016 Zeng และคณะ²⁹ ได้พัฒนาโมเลกุลแอนติเซนส์ ซึ่งเป็นพีเอ็นเอที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของยีนธรรมชาติได้ แต่พีเอ็นเอไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ได้ จึงต้องมีการเชื่อมต่อกับเพปไทด์สายสั้นๆ (cell-penetrating peptide, CPP) โดยการทำให้ปฏิกิริยาระหว่างหมู่ไทออลของ cysteine ในเพปไทด์กับหมู่มาลิอีนไนด์บนพีเอ็นเอที่มีลำดับเบสตรงข้ามกับลำดับเบสของไวรัสตับอักเสบบี เกิดเป็นไบโอคอนจูเกตที่เรียกว่า Tat-PNA-DR (cell-penetrating peptide-conjugated peptide nucleic acid (PNA)-direct repeat) ซึ่งสามารถยับยั้งไวรัสตับอักเสบบีได้ทั้งในหลอดทดลองและในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต โดยมีความเป็นพิษที่ต่ำ ดังรูปที่ 1.14

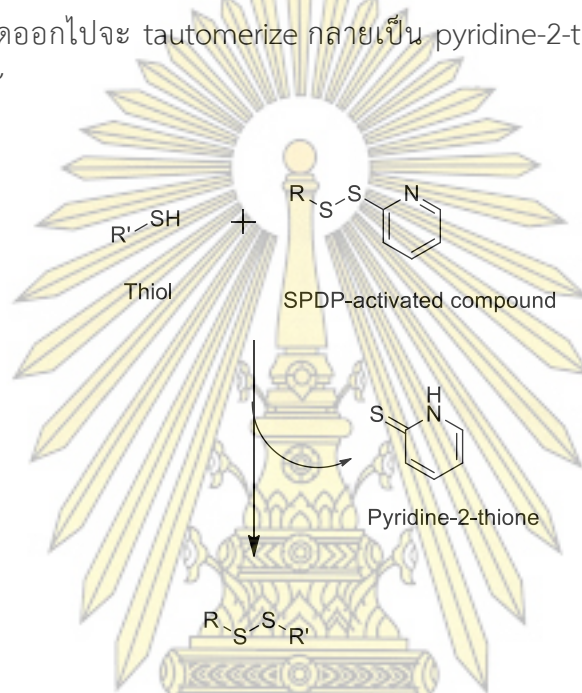


รูปที่ 1.14 การเชื่อมต่อกันระหว่าง CPP กับพีเอ็นเอผ่านปฏิกิริยาไทออล-มาลิอีนไนด์

Thiol-exchange reactions

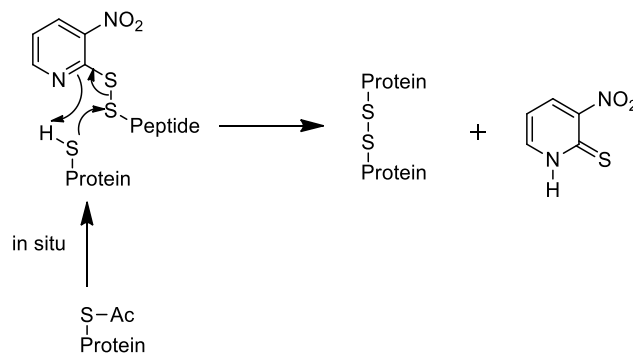
ปฏิกิริยา thiol-exchange เป็นปฏิกิริยาระหว่างหมู่ disulfide กับหมู่ไทออล โดยจะเกิดปฏิกิริยา nucleophilic substitution ที่ซัลเฟอร์อะตอมของหมู่ disulfide ดังรูปที่ 1.15 ปฏิกิริยานี้สามารถเกิดได้ในช่วง pH ที่พบได้ภายในเซลล์ส่วนใหญ่และมีความจำเพาะเจาะจงสูง แต่มีข้อจำกัด คือ จะต้องทำภายใต้

สถานะที่ไม่มีออกซิเจนเพื่อป้องกันการเกิด byproduct ในการบังคับให้เกิดการแทนที่บนซัลเฟอร์อะตอมใดอะตอมหนึ่งของหมู่ไธลไฟด์ และเพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาผันกลับจำเป็นต้องทำให้ซัลเฟอร์อะตอมหนึ่งมีความเป็นหมู่หลุดออกที่ดี ซึ่งมักนิยมใช้หมู่พิริดีลไธลไฟด์ หรือ ไนโตรพิริดีลไธลไฟด์ เนื่องจากหมู่ pyridinethiolate ที่หลุดออกไปจะ tautomerize กลายเป็น pyridine-2-thione ที่เสถียรและไม่สามารถกลับเข้ามาทำปฏิกิริยาได้



รูปที่ 1.15 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของ thiol กับ pyridyl disulfide

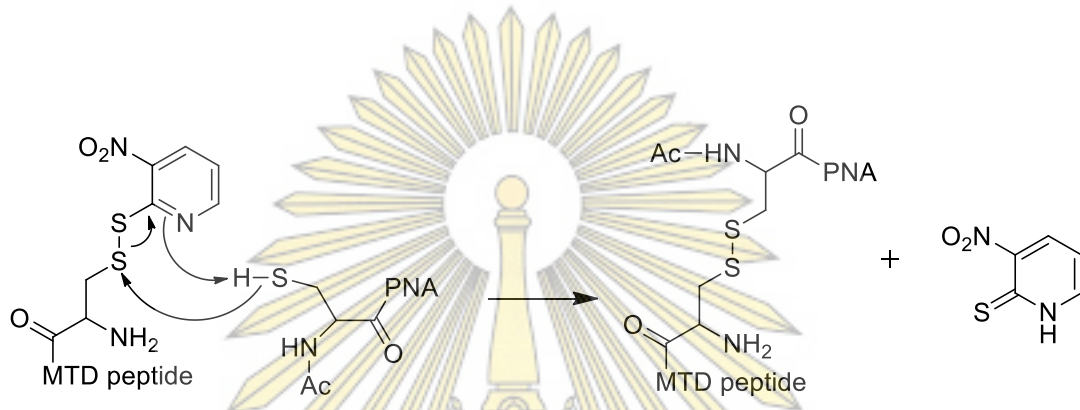
ในปี 1988 Druffhout และคณะ³⁰ ได้ทำการสังเคราะห์การเชื่อมกันของเพปไทด์และโปรตีนบนภูมิภาคของแข็ง ผ่านการสร้างพันธะไธลไฟด์ ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาที่ไม่รุนแรงระหว่างหมู่ไทอลของ cysteine ที่มีหมู่ปกป้อง 3-nitro-2-pyridylsulfenyl (Npys) กับหมู่ไทอลอิสระที่ได้จากการกำจัดหมู่ acetyl ดังรูปที่ 1.16



รูปที่ 1.16 การเชื่อมกันของ Cys(Npys) บนเพปไทด์และหมู่ไทอลบนโปรตีน

ในปี 2005 Tripathi และคณะ³¹ ได้สังเคราะห์การเชื่อมกันของพีเอ็นเอที่มีลำดับเบสตรงข้ามกับอาร์เอ็นเอของไวรัส HIV-1 กับเพปไทด์ชนิด MTD ที่ช่วยในการขนส่งพีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ โดยด้านปลายอะมิโนเพปไทด์ MTD ประกอบด้วยกรดอะมิโน cytosine ที่สามารถเกิดปฏิกิริยากับพีเอ็นเอที่ถูกดัดแปรด้วย

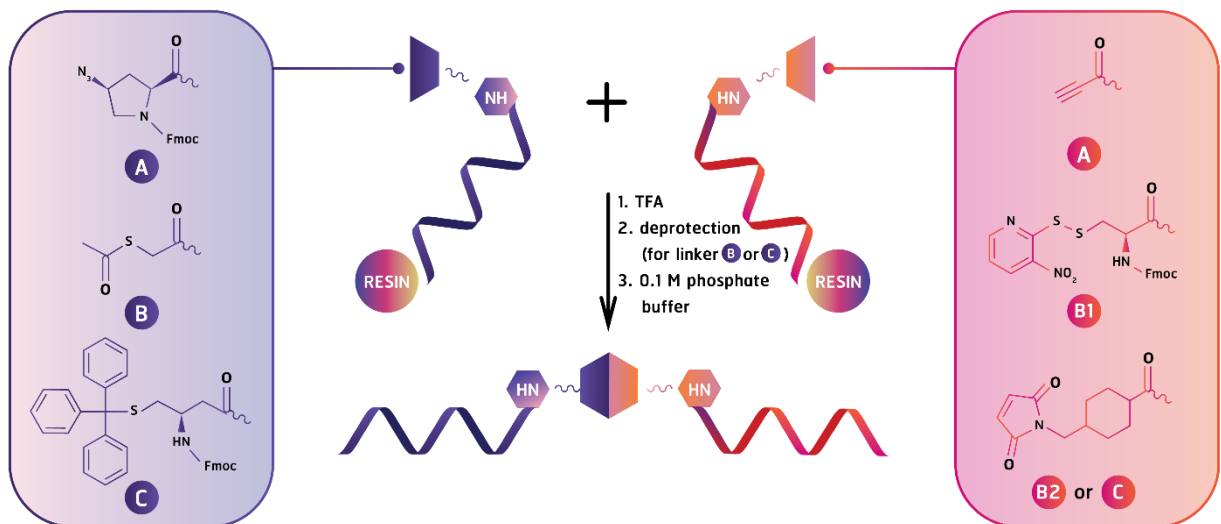
cystosine ที่มีหมู่ปกป้องคือ 3-nitro-pyridine sulphenyl [Cys(Npys)] ทำให้สามารถเกิดเป็นพันธะไดซัลไฟด์ได้อย่างรวดเร็ว ดังรูปที่ 1.17 ทำให้พีเอ็นเอสามารถเข้าสู่เซลล์และยับยั้งการจำลองตัวของเชื้อไวรัส HIV-1 ได้



รูปที่ 1.17 การเชื่อมกันของเพปไทด์ MTD กับพีเอ็นเอ ผ่านการทำปฏิกิริยา thiol-exchange

1.3 วัตถุประสงค์และขอบเขตของการวิจัย

ในงานวิจัยนี้คณะผู้วิจัยสนใจที่จะสังเคราะห์พีเอ็นเอที่มีลำดับเบสยาวขึ้นจากพีเอ็นเอสายสั้นๆ โดยจะหาวิธีการที่เหมาะสมในการเชื่อมต่อพีเอ็นเอสายสั้นๆ เข้าด้วยกัน เช่น การเชื่อมกันด้วยการทำปฏิกิริยาคลิกของหมู่ฟังก์ชันไฮดริลและหมู่ฟังก์ชันแอลไคน์ การเชื่อมกันด้วยการทำปฏิกิริยาของหมู่ฟังก์ชันไทออลกับ pyridyl disulfides หรือ maleimides โดยจะทดสอบประสิทธิภาพการเชื่อมต่อแบบต่างๆ โดยใช้พีเอ็นเอชนิด acpcPNA ที่มีลำดับเบสเป็น T2 เป็นโมเดลทดสอบ และติดตามผลโดยใช้เทคนิค MALDI-TOF mass spectrometry โดยจะประเมินจากการได้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ ความสมบูรณ์ของปฏิกิริยา และการเกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียง



รูปที่ 1.18 หลักการเชื่อมกันของพีเอ็นเอที่ในงานวิจัยนี้

บทที่ 2

การทดลอง

2.1 รายการเครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

2.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- การขังน้ำหนักรสาร: เครื่องชั่งของ DKSH รุ่น AND GR-200
- การปิเปตสาร: ไมโครปิเปต ยี่ห้อ optipette ขนาด 0.1-2.0 μL ,
ยี่ห้อ RAININ Pipet-Lite XLS ขนาด 0.5-10.0 μL , 2-20 μL , 20-200 μL ,
ยี่ห้อ BOECO Germany ขนาด 100-1000 μL
- การทำให้สารแห้ง: เครื่องปั๊มสุญญากาศ (diaphragm vacuum pump) รุ่น JK-DVP-0.5A ยี่ห้อ JKI
- การระเหยตัวทำละลาย: เครื่องกลั่นระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (rotary evaporator) รุ่น R-200, R-114, R-3 ยี่ห้อ BUCHI
- ตรวจสอบการเรืองแสงของสารภายใต้รังสียูวี: UV transilluminator รุ่น VILBER LOURMAT TCP-20.LM
- การพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF mass spectrometry: เครื่อง MALDI-TOF mass spectrometer รุ่น Microflex บริษัท Bruker
- การพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค ^1H NMR (Proton nuclear magnetic resonance): เครื่อง Varian Mercury-400 NMR spectrometer ที่ความถี่ 400 MHz

2.1.2 สารเคมี

- การสังเคราะห์ตัวเชื่อมพีเอ็นเอ ใช้สารตั้งต้น *N-tert-butoxycarbonyl-trans-4-(p-tolylsulfonyloxy)-D-proline diphenylmethyl ester* ได้รับความอนุเคราะห์จากนิสิตปริญญาโท-เอกในกลุ่มวิจัยของ ศาสตราจารย์ ดร. ชีรยุทธ วิไลวัลย์, Fmoc *N*-hydroxysuccinimide ester (FmocOSu), pentafluorophenyl trifluoroacetate, sodium azide, anisole, trifluoroacetic acid (TFA), *N,N*-diisopropylethylamine (DIEA) จาก Sigma-Aldrich
- พีเอ็นเอตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา คือ H-TT-LysNH₂ สังเคราะห์โดยผู้วิจัยและบางส่วนได้รับความอนุเคราะห์จากคุณชัชติมา วิไลวัลย์ และนิสิตปริญญาโท-เอกในกลุ่มวิจัยของ ศาสตราจารย์ ดร. ชีรยุทธ วิไลวัลย์

- สารเคมีที่ใช้ในการเชื่อมกันระหว่างสายพีเอ็นเอ ได้แก่ propiolic acid, tris(-2carboxyethyl) phosphine hydrochloride (TCEP) จาก Sigma-Aldrich และ 4-(*N*-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylic acid 3-sulfo-*N*-hydroxysuccinimide ester sodium salt (SMCC) จาก Sigma-Aldrich, *S*-acetylthioglycolic acid pentafluorophenyl ester จาก Fluka และ *N*-(9-fluorenylmethoxy carbonyl)-*S*-trityl-L-cysteine (Fmoc-Cys(Trt)-OH), *N*-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-*S*-(3-nitro-2-pyridylthio)-L-cysteine (Fmoc-Cys(Npys)-OH) จาก ChemImpex และ 1.0 M phosphate buffer จาก นิสิตปริญญาโท-เอกในกลุ่มวิจัยของศาสตราจารย์ ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์ และ pyridinium *p*-toluenesulfonate, (benzotriazol-1-yloxy) tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate (PyBOP), 4-methylmorpholine (NMM), *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC), pyridinium *p*-toluenesulfonate (PPTS) จาก TCI, hydroxy-7-aza- benzotriazole (HOAt), 1,8-diazabicyclo-[5,4,0]-undec-7-ene (DBU), *N,N,N',N'*-tetramethyl-*O*-(1*H*-benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate (HBTU)
- น้ำที่ใช้เป็นตัวทำละลายได้แก่ น้ำ Milli-Q จากเครื่อง Millipak® 40 Express Filter Millipore (USA)
- ตัวทำละลายอินทรีย์ใช้ชนิด analytical grade จาก RCI Labscan, Thailand ได้แก่ ethanol, acetonitrile, dimethylformamide (DMF), ethyl acetate, diethyl ether และ dichloromethane จาก Burdick & Jackson ได้แก่ methanol จาก Scharlau ได้แก่ hexane
- ตัวทำละลายอินทรีย์ใช้ชนิด analytical grade จาก Sigma-Aldrich ได้แก่ hydrochloric acid, sodium hydroxide, sodium bicarbonate

2.2 การสังเคราะห์พีเอ็นเอบนวัสดุภาคของแข็ง

การสังเคราะห์พีเอ็นเอบนวัสดุภาคของแข็งจะใช้หลอดหยดแก้วที่ถูกตัดปลายและหลอมปิดปลาย หลอดให้เหลือเพียงช่องให้สารละลายผ่านเท่านั้นด้วยเศษแก้วความยาว 3-5 mm จากนั้นบรรจุวัสดุภาคของแข็งชนิด TentaGel S-RAM Fmoc resin 7.1 mg (1.5 μ mol) ที่ใช้สำหรับการสังเคราะห์พีเอ็นเอในหลอดที่เตรียมไว้ เมื่อจะสังเคราะห์พีเอ็นเอต้องแช่เรซินในตัวทำละลาย DMF 10 นาทีก่อนแล้วเป่าให้แห้งด้วยลูกยาง ก่อนจะใส่รีเอเจนต์ที่ต้องการทำปฏิกิริยาลงในหลอดพลาสติกที่มีฝาปิดขนาด 1.5 mL และใช้หลอดหยดที่มีวัสดุภาคของแข็งที่เตรียมไว้ดูดรีเอเจนต์เข้าไปให้ท่วม และทิ้งไว้ตามเวลาที่กำหนด เมื่อเสร็จสิ้นการทำปฏิกิริยาก็ใช้ลูกยางเป่าสารละลายออกทางด้านล่างของหลอดหยด จากนั้นล้างสารละลายที่เหลืออยู่บนวัสดุภาคของแข็งด้วย DMF และเป่าให้แห้งเพื่อเตรียมสังเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

2.2.1 ขั้นตอนการ deprotect

เมื่อเริ่มการสังเคราะห์ต้องมีการกำจัดหมู่ Fmoc โดยใช้ stock solution #1 (สารละลายผสมระหว่าง piperidine 20 μ L, DBU 2 μ L และ DMF 78 μ L) 100 μ L เป็นเวลา 5 นาทีและเป่าไลรีเอเจนต์ออกจะทำให้ได้หมู่อะมิโนที่สามารถเกิดปฏิกิริยากับโมโนเมอร์ตัวต่อไปได้ จากนั้นล้างด้วย DMF (3 x 1 mL) แล้วเป่าให้แห้ง

2.2.2 ขั้นตอนการ coupling

การสังเคราะห์พีเอ็นเอในการทดลองนี้จะใช้กรดอะมิโนไลซีนเป็นเริ่มต้นของพีเอ็นเอ โดยเริ่มจากการนำวัฏภาคของแข็งจากขั้นตอนการ deprotect มาทำปฏิกิริยากับสารผสมของกรดอะมิโนไลซีนชนิดต่างๆ ดังนี้

- Fmoc-Lys(Mtt)-OH (3.75 mg, 6.0 μ mol) หรือ Fmoc-Lys(Tfa)-OH (3.75 mg, 6.0 μ mol) กับ HATU (2.2 mg, 6.3 μ mol) ในสารละลาย stock solution #2 (DIEA 70 μ L ใน DMF 930 μ L) 15 μ L เป็นเวลา 30 นาที

- Fmoc-Lys(Boc)-Opfp (4.8 mg, 7.6 μ mol) กับ stock solution #2 (15 μ L) และ stock solution #3 (HOAt 1.1 mg ใน DMF 20 μ L) 15 μ L เป็นเวลา 30 นาที

เป่าไลรีเอเจนต์ออก จากนั้นล้างด้วย DMF (3 x 1 mL) แล้วเป่าให้แห้ง หลังจากต่อกรดอะมิโนลงบนเรซินแล้วการต่อรอบต่อไปจะใช้พิโรลิดินิลมอโนเมอร์ (6.0 μ mol) สลับกับตัวเชื่อม (SS-ACPC spacer) (3.1 mg, 6.0 μ mol) โดยสารแต่ละตัวจะต้องผสมกับ stock solution #2 (15 μ L) และ stock solution #3 15 μ L ทำปฏิกิริยาเป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที เป่าไลรีเอเจนต์ออก จากนั้นล้างด้วย DMF (3 x 1 mL) แล้วเป่าให้แห้ง

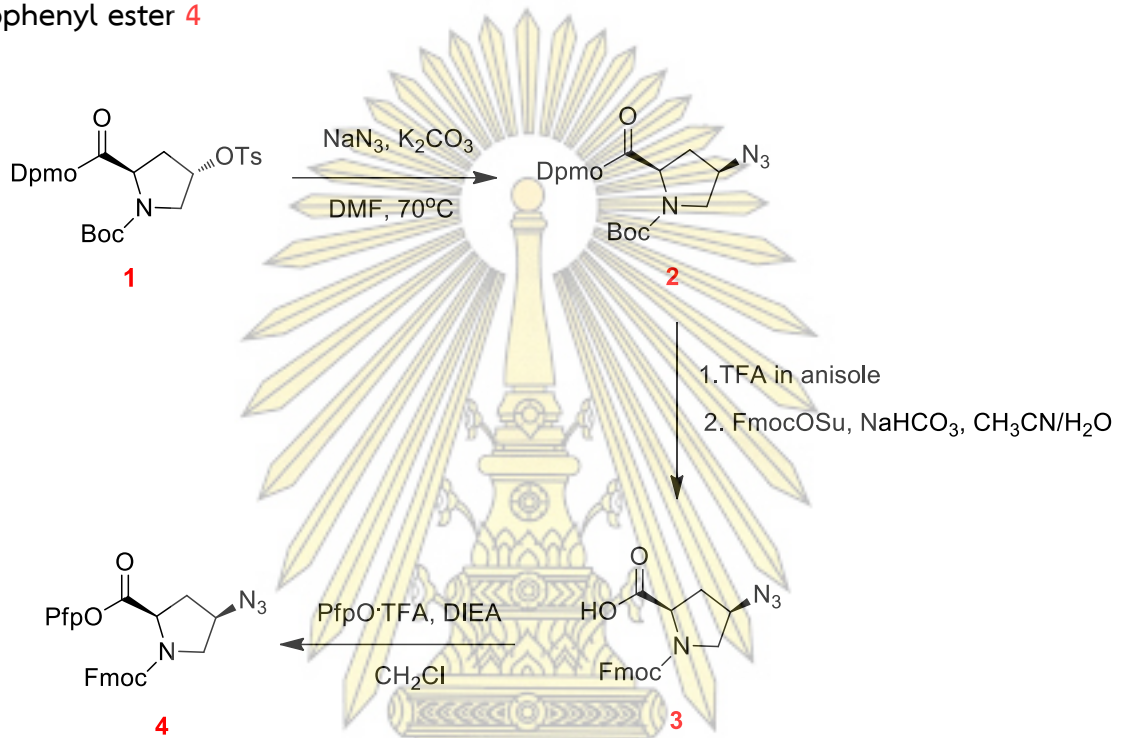
2.2.3 ขั้นตอนการ capping

ขั้นการ acylate ด้วย acetic anhydride (5 μ L) ผสมกับ stock solution #2 (30 μ L) ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 5 นาที เป่าไลรีเอเจนต์ออก จากนั้นล้างด้วย DMF (3 x 1 mL) แล้วเป่าให้แห้ง

เมื่อจบขั้นตอนแสดงว่าเป็นการสังเคราะห์พีเอ็นเอหนึ่งรอบ ซึ่งจะทำการซ้ำรอบไปเรื่อยๆ โดยเปลี่ยนเฉพาะขั้นตอนการ coupling คือเปลี่ยนไปใช้แทนพิโรลิดินิลมอโนเมอร์สลับกับการใช้ตัวเชื่อม (SS-ACPC spacer) แทน ทำเช่นนี้สลับไปเรื่อยๆจนได้สายเพปไทด์ที่มีลำดับเบสตามต้องการ

2.3 การเชื่อมกันของพีเอ็นเอผ่านการทำปฏิกิริยาคคลิกของหมู่เอไซด์และหมู่แอลไคน์

2.3.1 การสังเคราะห์ (N-flouren-9-ylmethoxycarbonyl)-cis-4-(azido)-D-proline pentafluorophenyl ester **4**



รูปที่ 2.1 แผนภาพการสังเคราะห์ (N-flouren-9-ylmethoxycarbonyl)-cis-4-(azido)-D-prolinepenta fluorophenyl ester **4**

ละลายสาร **1** 0.5514 g (0.99 mmol, 1 eq.) ในขวดก้นกลม เติม sodium azide 0.0751 g (1.16 mmol, 1 eq.) และ anhydrous K_2CO_3 0.2126 g (1.54 mmol, 1 eq.) ในตัวทำละลาย DMF (3 mL) และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน นำไปละลายด้วย CH_2Cl_2 และสกัดด้วยน้ำ DI (3 x 15 mL) ก่อนจะนำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศที่อุณหภูมิ 45 °C จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาว **2** 0.2504 g (59.9%)

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.30 (d, $J = 32.0$ Hz, 10H), 6.92 (d, $J = 19.7$ Hz, 1H), 4.49 (d, $J = 53.4$ Hz, 1H), 4.14 (s, 1H), 3.83 – 3.36 (m, 2H), 2.49 (s, 1H), 2.19 (s, 1H), 1.36 (d, $J = 87.0$ Hz, 9H)

ละลายสาร **2** 0.2337 g (0.55 mmol, 1 eq.) ใน anisole (1 mL) แล้วจึงเติม TFA (2 mL) ที่ให้ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเป่าไล่ TFA ด้วยแก๊สไนโตรเจนจนสารละลายแห้งและไม่มีกลิ่นของ anisole จึงล้างตะกอนที่ได้ด้วย diethyl ether และเติมสารละลาย CH_3CN/H_2O (อัตราส่วน 1:1) (2 mL) จากนั้นใส่ $NaHCO_3$ 0.12 g (1.43 mmol, 2.6 eq.) จน pH ของสารละลายอยู่ในช่วง pH 8-9 จึงค่อยๆ เติม FmocOSu 0.1594 g (0.47 mmol, 1 eq.) คนสารละลายทิ้งไว้เพื่อให้ทำปฏิกิริยาเป็นเวลาหนึ่งคืน นำสารมาระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศและละลายน้ำเพียงเล็กน้อยก่อน

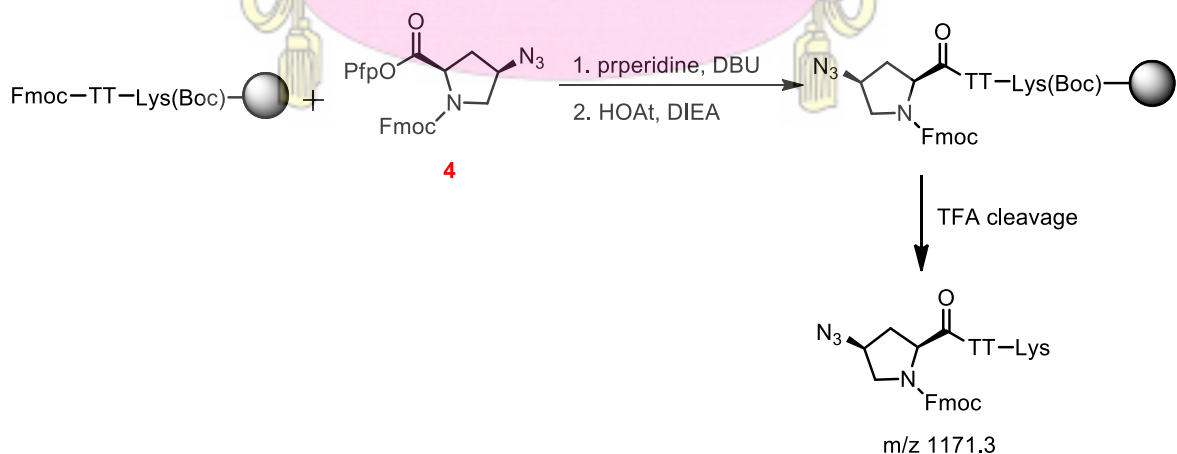
นำไปสกัดด้วย diethyl ether (3 x 15 mL) จากนั้นนำชั้นน้ำมาตกตะกอนด้วยการปรับ pH ให้เป็น 2 ด้วย concentrated HCl และสกัดด้วย CH₂Cl₂ (3 x 15 mL) อีกครั้งจึงนำไป ระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องกลั่น ระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาวอมเหลืองเล็กน้อย **3** 0.1310 g

ละลายสาร **3** 0.2262 g (0.60 mmol, 1 eq.) ใน CH₂Cl₂ แล้วจึงเติม DIEA (0.21 mL, 1.20 mmol, 2 eq.) และนำไปคนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จึงค่อยๆเติม PfpOTf (0.21 mL, 1.20 mmol, 2 eq.) และนำไปคนที่อุณหภูมิห้องต่อเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปสกัดด้วย 10% HCl (2 x 20 mL), น้ำ DI (2 x 20 mL) และ saturated NaHCO₃ (2 x 20 mL) ตามลำดับ และนำไประเหยตัวทำละลายที่ อุณหภูมิห้อง ละลายด้วย CH₂Cl₂ เล็กน้อยเพื่อนำไปแยกสารด้วยโครมาโทกราฟีโดยชะด้วยระบบเกรเดียนท์ ของ ethyl acetate:hexanes ตั้งแต่ 10-50% ethyl acetate จากนั้นจึงนำสารที่แยกได้ไประเหยตัวทำ ละลายออก และนำมาตกตะกอนใหม่โดยการละลายด้วย CH₂Cl₂ (5 mL) แล้วเติม hexane (40 mL) และตั้ง ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที เมื่อนำไปกรองสุญญากาศจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาว **4** 0.1862 g (56.7%)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.29 – 7.83 (m, 8H), 4.71 – 4.90 (m, 1H), 4.52 – 4.64 (m, 1H), 4.28 – 4.49 (m, 2H), 4.25 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H), 3.59 – 3.90 (m, 2H), 2.44 – 2.71 (m, 2H)

IR spectrum: -N₃ (2121 cm⁻¹), C=O stretching (1795 cm⁻¹), C=O stretching (1701 cm⁻¹), aromatic ring (1516 cm⁻¹), C-O stretching (1338 cm⁻¹)

2.3.2 การตัดแปรรูปปลายด้านอะมิโน (N-terminus) ของพีเอ็นเอด้วยสาร **4**

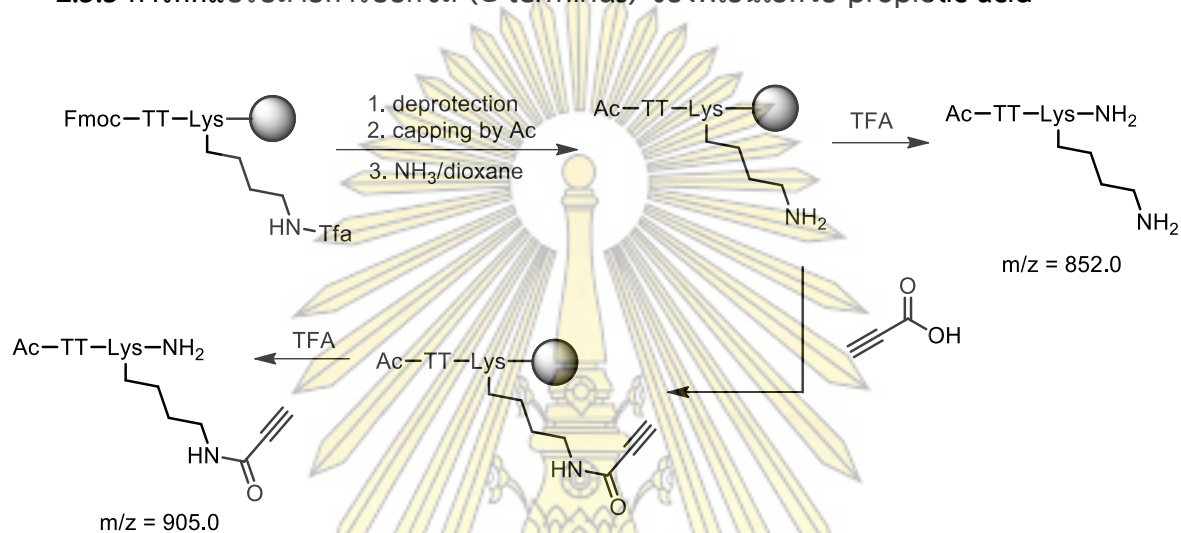


รูปที่ 2.2 การตัดแปรรูปปลายด้านอะมิโน (N-terminus) ของพีเอ็นเอด้วยสาร **4**

นำพีเอ็นเอ Fmoc-TT-Lys(Boc) บนวัดมวลของแข็ง 1.5 μmol มาทำปฏิกิริยากำจัดหมู่ Fmoc โดยใช้ stock solution #1 (สารละลายผสมระหว่าง piperidine 20 μL, DBU 2 μL และ DMF 78 μL) 100 μL เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจึงตัดแปรรูปหมู่อะมิโนที่เกิดขึ้นด้วยสาร **4** 3.3 mg (6.0 μmol, 4 eq.) ใน สารละลายผสมระหว่าง stock solution #2 (DIEA 70 μL ใน DMF 930 μL) 15 μL และ stock solution

#3 (HOAt 1.1 mg ใน DMF 20 μL) 15 μL เป็นเวลา 1 ชั่วโมงและติดตามผลด้วยเทคนิค MALDI-TOF mass spectrometry หลังจากปลดพีเอ็นเอออกจากวัฏภาคของแข็งด้วย TFA

2.3.3 การตัดแปรรปลายคาร์บอกซิล (C-terminus) ของพีเอ็นเอด้วย propiolic acid



รูปที่ 2.3 การตัดแปรรปลายคาร์บอกซิล (C-terminus) ของพีเอ็นเอด้วย propiolic acid

นำพีเอ็นเอ Fmoc-TT-Lys(Tfa) บนวัฏภาคของแข็ง 1.5 μmol มาทำปฏิกิริยากำจัดหมู่ Fmoc โดยใช้ stock solution #1 (100 μL) เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจึงตัดแปรรหมู่อะมิโนที่เกิดขึ้นด้วย acetic anhydride (10 μL) ในสารละลายผสมระหว่าง stock solution #2 (15 μL) และ stock solution #3 (15 μL) เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยากำจัดหมู่ Tfa ด้วยสารละลายผสมระหว่าง concentrated aqueous NH_3 และ dioxane (อัตราส่วน 1:1, ปริมาตร 2 mL) ที่อุณหภูมิ 60-65 $^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลาหนึ่งคืน จึงนำไปตัดแปรรปลายด้านคาร์บอกซิล (C-terminus) ด้วย propiolic acid 2 วิธีดังนี้

a.) การตัดแปรรปลายด้านคาร์บอกซิล (C-terminus) ด้วย propiolic acid วิธีที่ 1

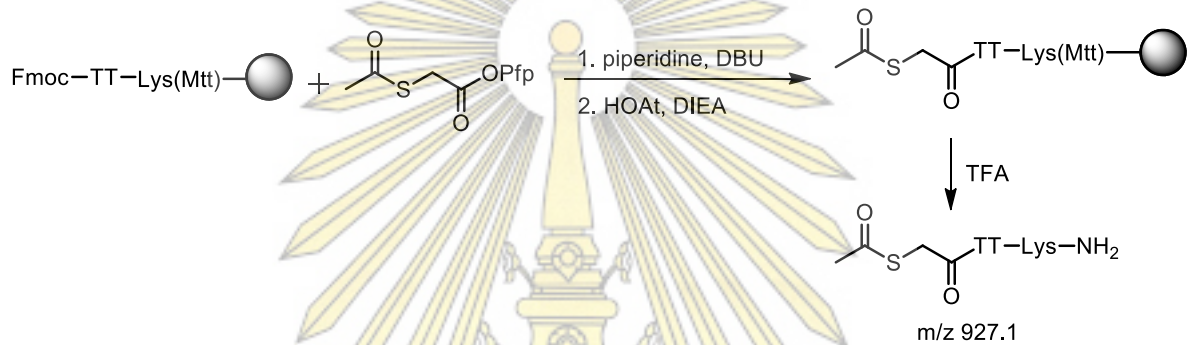
นำพีเอ็นเอ Ac-TT-Lys(Tfa) บนวัฏภาคของแข็ง 0.25 μmol มาทำปฏิกิริยากับสารละลายผสมระหว่าง HBTU 2.2 mg (6.0 μmol , 24 eq.), HOBt 0.8 mg (6.0 μmol , 24 eq.), DIEA (1 μL , 6.0 μmol , 24 eq.) และ propiolic acid (1 μL , 15.0 μmol , 60 eq.) ตามลำดับ เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมงและติดตามผลด้วยเทคนิค MALDI-TOF mass spectrometry หลังจากปลดพีเอ็นเอออกจากวัฏภาคของแข็งด้วย TFA

b.) การตัดแปรรปลายด้านคาร์บอกซิล (C-terminus) ด้วย propiolic acid วิธีที่ 2

นำพีเอ็นเอ Ac-TT-Lys(Tfa) บนวัฏภาคของแข็ง 0.25 μmol มาทำปฏิกิริยากับสารละลายผสมระหว่าง PyBOP 3.1 mg (6.0 μmol , 24 eq.) ใน DMF 30 μL , propiolic acid (1 μL , 15.0 μmol , 60 eq.), PPTS 1.5 mg (6.0 μmol , 24 eq.) ใน DMF 30 μL และ NMM (1 μL , 6.0 μmol , 24 eq.) ตามลำดับ เป็นเวลา 2-6 ชั่วโมงและติดตามผลด้วยเทคนิค MALDI-TOF mass spectrometry หลังจากปลดพีเอ็นเอออกจากวัฏภาคของแข็งด้วย TFA

2.4 การเชื่อมกันของพีเอ็นเอผ่านการทำปฏิกิริยา thiol-exchange ของ cysteine ที่มีหมู่ปกป้อง 3-nitro-2-pyridylsulfenyl (Npys) กับหมู่ไทออลอิสระ

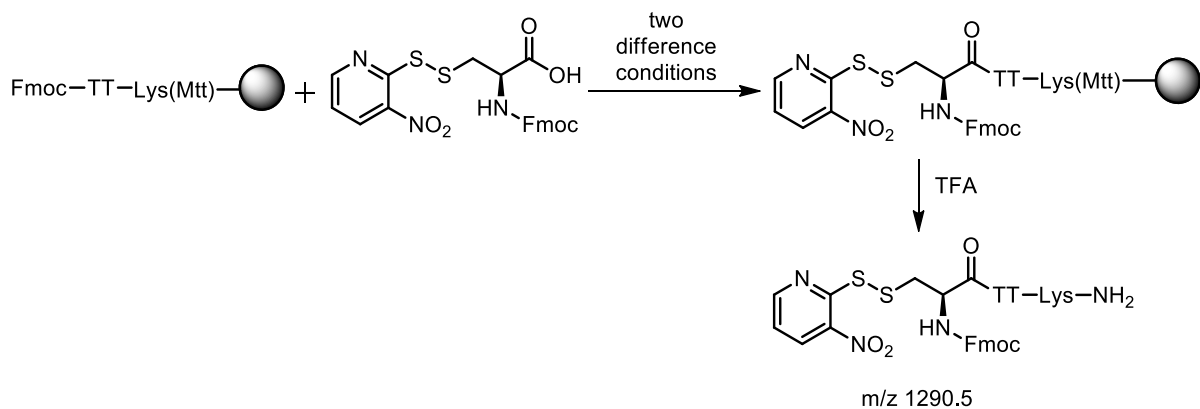
2.4.1 การตัดแปรรูปปลายด้านอะมิโน (N-terminus) ของพีเอ็นเอด้วย S-acetyl-thioglycolic acid pentafluorophenyl ester



รูปที่ 2.4 การตัดแปรรูปปลายด้านอะมิโนของพีเอ็นเอด้วย S-acetyl-thioglycolic acid pentafluorophenyl ester

นำพีเอ็นเอ Fmoc-TT-Lys(Mtt) บนวฏภาคของแข็ง 0.25 μmol มาทำปฏิกิริยากำจัดหมู่ Fmoc โดยใช้ stock solution #1 (100 μL) เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจึงตัดแปรรูปหมู่อะมิโนที่เกิดขึ้นด้วย S-acetyl-thioglycolic acid pentafluorophenyl ester (1 μL , 5.2 μmol , 21 eq.) ในสารละลายผสมระหว่าง stock solution #2 (15 μL) และ stock solution #3 (15 μL) และติดตามผลด้วยเทคนิค MALDI-TOF massspectrometry หลังจากปลดพีเอ็นเอออกจากวฏภาคของแข็งด้วย TFA

2.4.2 การตัดแปรรูปปลายด้านอะมิโน (N-terminus) ของพีเอ็นเอด้วย N-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-S-(3-nitro-2-pyridylthio)-L-cysteine



รูปที่ 2.5 การตัดแปรรูปปลายด้านอะมิโนของพีเอ็นเอด้วย N-(9-fluorenylmethoxy carbonyl)-S-(3-nitro-2-pyridylthio)-L-cysteine

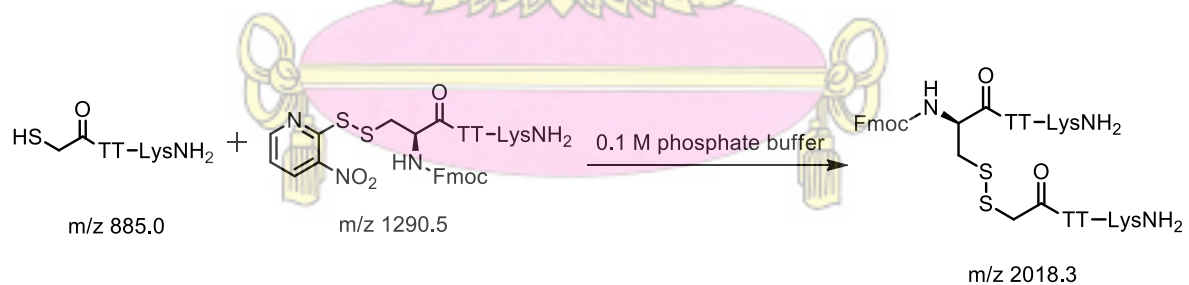
a.) วิธีที่ 1

นำพีเอ็นเอ Fmoc-TT-Lys(Mtt) บนวัฏภาคของแข็ง 0.25 μmol มาทำปฏิกิริยากำจัดหมู่ Fmoc โดยใช้ stock solution #1 (100 μL) เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจึงตัดแปรหมู่อะมิโนที่เกิดขึ้นด้วย Fmoc-Cys(Npys)-OH 3.0 mg (6.0 μmol , 60 eq.) ใน DMF 30 μL ในสารละลายผสมระหว่าง PyBOP 3.1 mg (6.0 μmol , 24 equiv.) ใน DMF 30 μL , PPTS 1.5 mg (6.0 μmol , 24 eq.) ใน DMF 30 μL และ NMM (1 μL , 6.0 μmol , 24 eq.) ตามลำดับ เป็นเวลาหนึ่งคืนและติดตามผลด้วยเทคนิค MALDI-TOF mass spectrometry หลังจากปลดพีเอ็นเอออกจากวัฏภาคของแข็งด้วย TFA

b.) วิธีที่ 2

นำพีเอ็นเอ Fmoc-TT-Lys(Mtt) บนวัฏภาคของแข็ง 0.25 μmol มาทำปฏิกิริยากำจัดหมู่ Fmoc เหมือนกับวิธีที่ 1 จากนั้นจึงตัดแปรหมู่อะมิโนที่เกิดขึ้นด้วย Fmoc-Cys(Npys)-OH 3.0 mg (6.0 μmol , 60 eq.) ใน CH_2Cl_2 ในสารละลาย DCC 3.1 mg (6.0 μmol , 24 eq.) เป็นเวลา 2 ชั่วโมงและติดตามผลด้วยเทคนิค MALDI-TOF mass spectrometry หลังจากปลดพีเอ็นเอออกจากวัฏภาคของแข็งด้วย TFA

2.4.3 การเชื่อมกันของพีเอ็นเอของพีเอ็นเอ HSCH₂CO-TT-LysNH₂ และพีเอ็นเอ H-Cys(Npys)-TT-LysNH₂

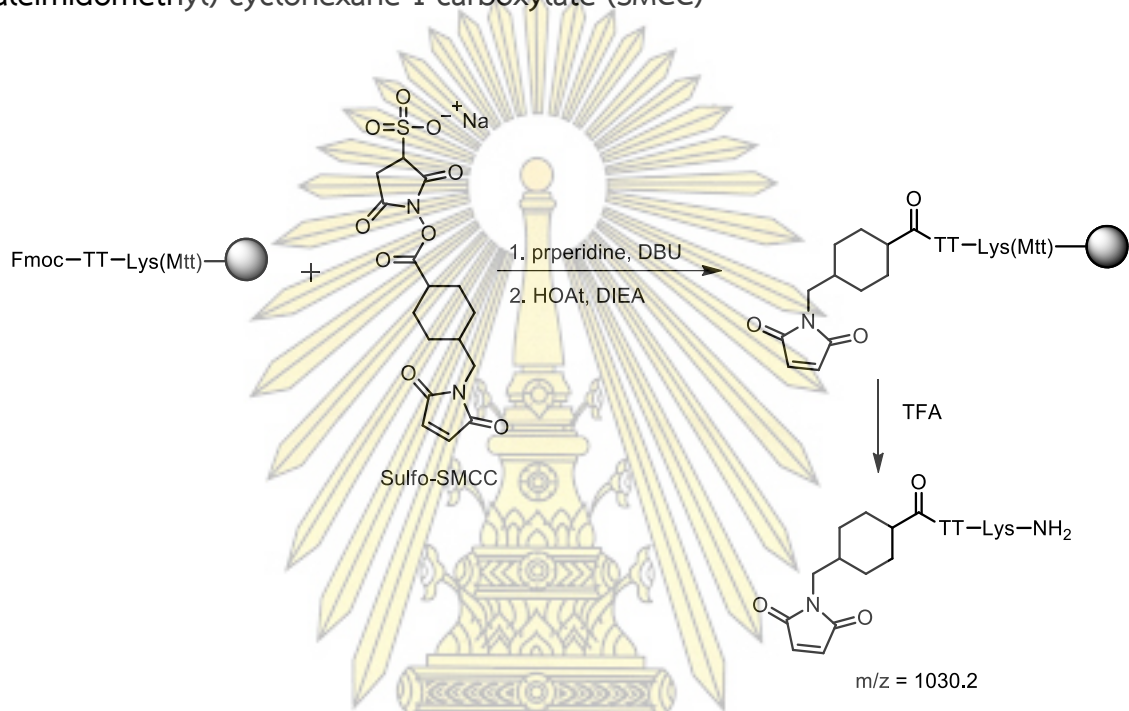


รูปที่ 2.6 การสังเคราะห์การเชื่อมกันของพีเอ็นเอ HSCH₂CO-TT-LysNH₂ และพีเอ็นเอ H-Cys(Npys)-TT-LysNH₂

ปลดพีเอ็นเอที่ถูกตัดแปรปลายด้านอะมิโนด้วย S-acetylthioglycolic acid pentafluorophenyl ester (AcSCH₂CO-TT-LysNH₂) 0.25 μmol และพีเอ็นเอที่ถูกตัดแปรปลายด้านอะมิโนด้วยตัวเชื่อม Fmoc-Cys(Npys)-OH (Fmoc-Cys(Npys)-TT-LysNH₂) 0.25 μmol จากวัฏภาคของแข็งด้วย TFA (300 μL x 3) เป่าไล่ TFA ให้แห้งด้วยแก๊สไนโตรเจนและตกตะกอนด้วย diethyl ether (300 μL x 3) จากนั้นกำจัดหมู่ acetyl จากพีเอ็นเอ AcSCH₂CO-TT-LysNH₂ ด้วยสารละลาย 20% piperidine 50 μL ใน DMF เป็นเวลา 10 นาที และตกตะกอนด้วย diethyl ether (300 μL x 3) ก่อนจะนำไปทำปฏิกิริยากับพีเอ็นเอ Fmoc-Cys(Npys)-TT-LysNH₂ ในสารละลาย 0.01 M phosphate buffer 10 μL ที่อุณหภูมิห้อง และติดตามผลด้วยเทคนิค MALDI-TOF mass spectrometry

2.5 การเชื่อมกันของพีเอ็นเอผ่านการทำปฏิกิริยาระหว่างหมู่ไทออลและหมู่มาลิอิมิด

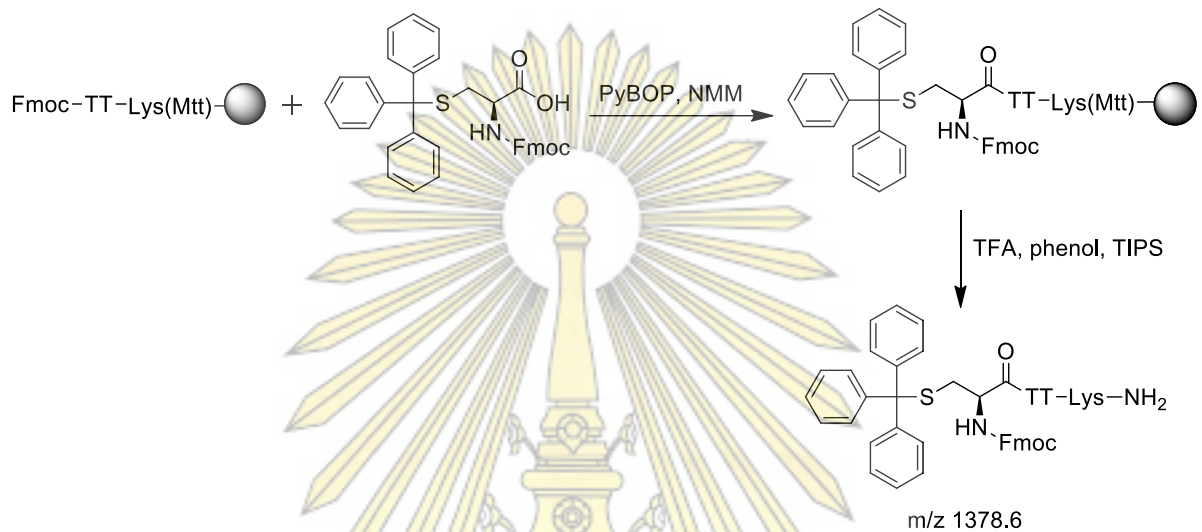
2.5.1 การตัดแปรรปลายด้านอะมิโน (N-terminus) ของพีเอ็นเอด้วย sulfosuccinimidyl 4-(*N*-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate (SMCC)



รูปที่ 2.7 การตัดแปรรปลายด้านอะมิโน (N-terminus) ของพีเอ็นเอด้วย sulfosuccinimidyl 4-(*N*-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate

นำพีเอ็นเอ Fmoc-TT-Lys(Mtt) บณวัญภาคของแข็ง 0.25 μmol มาทำปฏิกิริยากำจัดหมู่ Fmoc โดยใช้ stock solution #1 (100 μL) เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจึงตัดแปรรหมู่อะมิโนที่เกิดขึ้นด้วย SMCC 1 mg (3 μmol , 12 eq.) ในสารละลายผสมระหว่าง stock solution #2 (15 μL) และ stock solution #3 (15 μL) เป็นเวลา 1 ชั่วโมงและติดตามผลด้วยเทคนิค MALDI-TOF mass spectrometry หลังจากปลดพีเอ็นเอออกจากวัญภาคของแข็งด้วย TFA

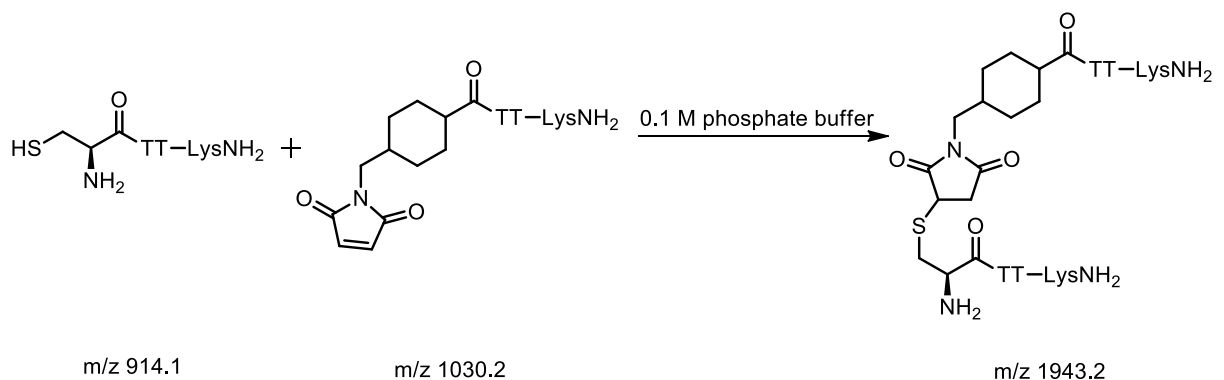
2.5.2 การตัดแปรรูปปลายด้านอะมิโน (N-terminus) ของพีเอ็นเอด้วย *N*-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-*S*-trityl-L-cysteine



รูปที่ 2.8 การตัดแปรรูปปลายด้านอะมิโน (N-terminus) ของพีเอ็นเอด้วย *N*-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-*S*-trityl-L-cysteine

นำพีเอ็นเอ Fmoc-TT-Lys(Mtt) บนวักภาคของแข็ง 0.50 μmol มาทำปฏิกิริยากำจัดหมู่ Fmoc โดยใช้ stock solution #1 (100 μL) เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจึงตัดแปรรูปหมู่อะมิโนที่เกิดขึ้นด้วย Fmoc-Cys(Trt)-OH 3.5 mg (6.0 μmol , 12 eq.) ใน DMF 30 μL ในสารละลายผสมระหว่าง PyBOP 3.1 mg (6.0 μmol , 12 eq.) ใน DMF 30 μL และ NMM 1 μL (6.0 μmol , 12 eq.) ตามลำดับ เป็นเวลา 3 ชั่วโมงและติดตามผลด้วยเทคนิค MALDI-TOF mass spectrometry หลังจากปลดพีเอ็นเอออกจากวักภาคของแข็งด้วย TFA

2.5.3 การเชื่อมกันของพีเอ็นเอ H-Cys-TT-LysNH₂ และพีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH₂



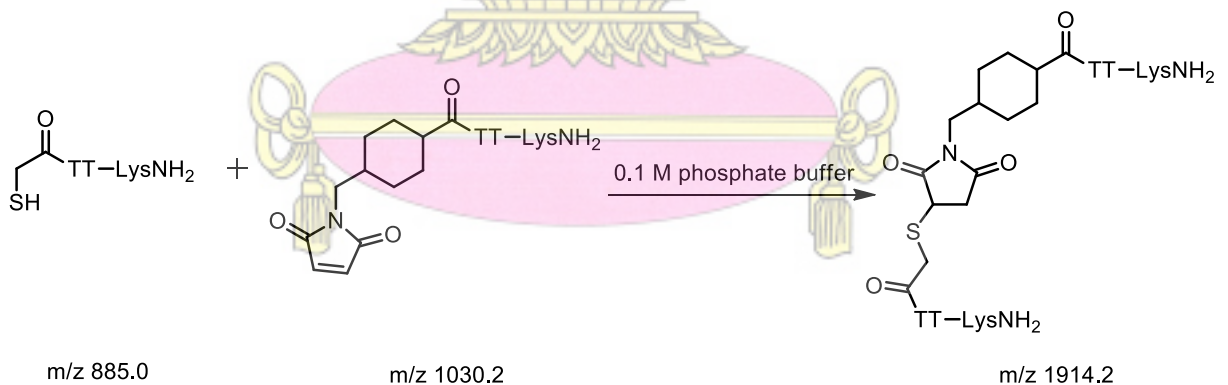
รูปที่ 2.9 การเชื่อมกันของพีเอ็นเอ H-Cys-TT-LysNH₂ และพีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH₂

ปลดพีเอ็นเอ MCC-TT-Lys(Mtt) บนวักภาคของแข็ง 0.50 μmol ด้วยวิธีเหมือนในข้อ 2.3.3 และนำพีเอ็นเอ Fmoc-Cys(Trt)-TT-Lys(Mtt) 0.50 μmol มาทำปฏิกิริยากำจัดหมู่ Fmoc โดยใช้ stock solution #1 (100 μL) เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นปลดพีเอ็นเอด้วยสารละลายผสมที่ประกอบด้วย TFA (880 μL), น้ำ DI (50 μL), phenol 50 mg, TIPS (20 μL) และตักตะกอนด้วย diethyl ether (300 $\mu\text{L} \times 3$) จากนั้นนำพีเอ็นเอทั้งสองเส้นนี้ไปทำปฏิกิริยากันในสารละลาย 0.1 M phosphate buffer (50 μL) และติดตามผลด้วยเทคนิค MALDI-TOF mass spectrometry

2.5.4 การตัดแปรรูปปลายด้านอะมิโน (N-terminus) ของพีเอ็นเอด้วยตัวเชื่อม S-acetylthioglycolic acid pentafluorophenyl ester

นำพีเอ็นเอ Fmoc-TT-Lys(Mtt) บนวักภาคของแข็ง 1.0 μmol มาตัดแปรรูปปลายด้านอะมิโนด้วย S-acetylthioglycolic acid pentafluorophenyl ester โดยใช้วิธีเหมือนในหัวข้อ 2.3.1 และติดตามผลด้วยเทคนิค MALDI-TOF mass spectrometry หลังจากปลดพีเอ็นเอออกจากวักภาคของแข็งด้วย TFA

2.5.5 การเชื่อมกันของพีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH₂ และพีเอ็นเอ HSCH₂CO-TT-LysNH₂



รูปที่ 2.10 การเชื่อมกันของพีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH₂ และพีเอ็นเอ HSCH₂CO-TT-LysNH₂

a.) วิธีที่ 1

เมื่อปลดพีเอ็นเอที่ถูกตัดแปรรูปปลายด้านอะมิโนด้วย S-acetyl-thioglycolyl group (AcSCH₂CO-TT-Lys(Mtt)) 0.25 μmol และพีเอ็นเอที่ถูกตัดแปรรูปปลายด้านอะมิโนด้วย sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxamide (MCC-TT-Lys(Mtt)) 0.25 μmol จากวักภาคของแข็ง ด้วยวิธีเหมือนในข้อ 2.3.3

นำพีเอ็นเอ AcSCH₂CO-TT-LysNH₂ 0.25 μmol มาทำปฏิกิริยากับ concentrated NH₃ 50 μL และ EDTA 1 mg เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม acetic acid 50 μL เติมน้ำ DI 100 μL

และนำไป freeze dry เป็นเวลา 1 คืน ก่อนจะนำไปทำปฏิกิริยากับพีเอ็นเอ MCC-TTLysNH₂ อีกสายในสารละลาย 0.1 M phosphate buffer (50 μ L) และติดตามผลด้วยเทคนิค MALDI-TOF mass spectrometry

b.) วิธีที่ 2

เมื่อปลดพีเอ็นเอ AcSCH₂CO-TT-LysNH₂ 0.25 μ mol และพีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH₂ 0.25 μ mol จากวัฏภาคของแข็งด้วยวิธีเหมือนในข้อ 2.3.3 นำพีเอ็นเอ AcSCH₂CO-TT-LysNH₂ 0.25 μ mol มาทำปฏิกิริยากับ 1 M NaOH 50 μ L และ EDTA 1 mg เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม acetic acid 28.6 μ L เพื่อให้ pH เป็นกลาง ก่อนจะนำไปทำปฏิกิริยากับพีเอ็นเออีกสายในสารละลาย 1 M phosphate buffer (0.5 μ L) และติดตามผลด้วยเทคนิค MALDI-TOF mass spectrometry

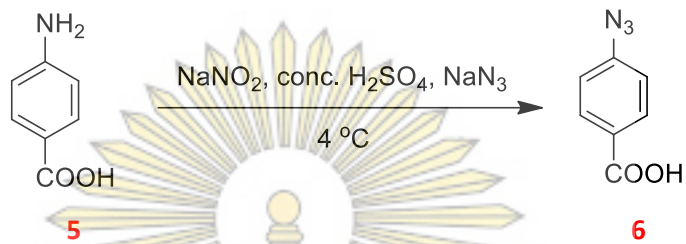
c.) วิธีที่ 3

เมื่อปลดพีเอ็นเอ AcSCH₂CO-TT-LysNH₂ 0.25 μ mol และพีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH₂ 0.25 μ mol จากวัฏภาคของแข็งด้วยวิธีเหมือนในข้อ 2.3.3 นำพีเอ็นเอ AcSCH₂CO-TT-LysNH₂ 0.25 μ mol มาทำปฏิกิริยากับ 0.5 M hydrazine (10 μ L) เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจึงหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม acetone (10 μ L) และนำไปทำปฏิกิริยาพีเอ็นเออีกสายในสารละลาย 0.1 M phosphate buffer (50 μ L) และติดตามผลด้วยเทคนิค MALDI-TOF mass spectrometry

d.) วิธีที่ 4

เมื่อปลดพีเอ็นเอ AcSCH₂CO-TT-LysNH₂ 0.25 μ mol และพีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH₂ 0.25 μ mol จากวัฏภาคของแข็งด้วยวิธีเหมือนในข้อ 2.3.3 และนำมาละลายพีเอ็นเอ AcSH₂CCO-TT-LysNH₂ 0.25 μ mol ในน้ำ Milli-Q 100 μ L และพีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH₂ 0.25 μ mol ในน้ำ Milli-Q 100 μ L จากนั้นเปิดสารละลายพีเอ็นเอ AcSH₂CCO-TT-LysNH₂ 10 μ L มาทำปฏิกิริยากับ 0.5 M hydrazine (10 μ L) เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจึงหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม acetone (10 μ L) และนำไปทำปฏิกิริยากับสารละลาย 40 mM TCEP (3.4 μ L, 0.14 μ mol, 11 eq.) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทำต่อกับ 4-azidobenzoic acid ที่ผู้วิจัยสังเคราะห์ในหัวข้อ 2.5 0.2 mg (1.4 μ mol, 112 eq.) ก่อนจะนำไปทำปฏิกิริยากับพีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH₂ ในสารละลาย 1 M phosphate buffer (5 μ L) และติดตามผลด้วยเทคนิค MALDI-TOF mass spectrometry และนำพีเอ็นเอ AcSCH₂CO-TT-LysNH₂ 0.25 μ mol และพีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH₂ 0.25 μ mol ที่ถูกปลดจากวัฏภาคของแข็งแล้วมาเชื่อมกันด้วยวิธีที่ 4 และติดตามผลด้วยเทคนิค MALDI-TOF mass spectrometry

2.6 การสังเคราะห์ 4-azidobenzoic acid 6



รูปที่ 2.11 แผนภาพการสังเคราะห์ 4-azidobenzoic acid 6

ละลายสาร 5 (5.0152 g, 36 mmol) ในขวดกั่นกลมด้วยน้ำ (25 mL) และ concentrated. H_2SO_4 (8 mL) และนำสารละลายที่ได้ไปทำให้เย็นที่ $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 15 นาที ก่อนจะค่อยๆ ใส่สารละลาย sodium nitrite ที่เย็น (2.6674 g, 39 mmol; ในน้ำ DI 5 mL) จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยากับสารละลาย sodium azide (2.9015 g, 45 mmol; ในน้ำ DI 7 mL) เป็นเวลา 15 นาที นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปกรอง ล้างด้วยน้ำเย็น และทำให้แห้งใน โถดูดความชื้นจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาว 6 (2.8221 g, 17 mmol, %yield = 47.2%)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.94 (d, $J = 7.6\text{ Hz}$, 2H), 7.19 (d, $J = 8.1\text{ Hz}$, 2H)

IR spectrum: O-H stretching (2813 cm^{-1} , 2543 cm^{-1} , 2404 cm^{-1}), $-\text{N}_3$ (2101 cm^{-1}) C=O stretching (1671 cm^{-1}) และ C=C stretching (1599 cm^{-1})

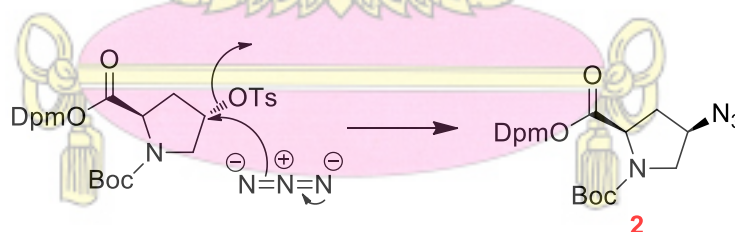
บทที่ 3

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

3.1 การเชื่อมกันของพีเอ็นเอผ่านการทำปฏิกิริยาคลิกของหมู่เอไซด์และหมู่แอลไคน์

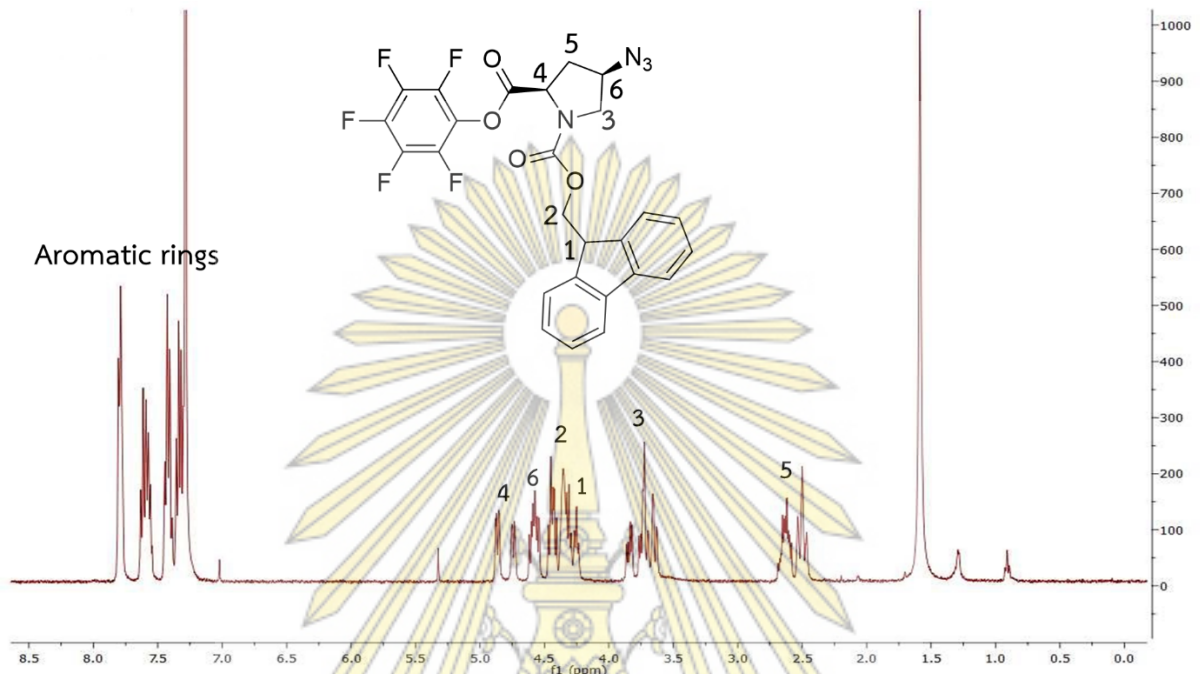
3.1.1 การสังเคราะห์ (*N*-fluorenylmethoxycarbonyl)-*cis*-4-(azido)-D-proline pentafluorophenyl ester **4**

การสังเคราะห์ตัวเชื่อมสาร **4** นี้ทำได้จากการทำปฏิกิริยา 4 ขั้นตอนหลักจากสารตั้งต้น *N*-*tert*-butoxy-carbonyl-*trans*-4-(*p*-tolylsulfonyloxy)-D-proline diphenylmethyl ester โดยใช้วิธีของ Mansa wat และคณะ³² ที่ได้สังเคราะห์สารนี้ในปี 2012 โดยในขั้นแรกเป็นปฏิกิริยาการแทนที่แบบนิวคลีโอฟิลิกด้วยไฮเดียมเอไซด์ ซึ่งสามารถเกิดผ่านกลไกการเกิดปฏิกิริยาแบบ S_N2 เนื่องจากมีหมู่ tosyl ที่เป็นหมู่หลุดออกที่ดี เกิดเป็นสาร **2** ดังรูปที่ 3.1 จากนั้นจะปรับเปลี่ยนหมู่ปกป้องของโมโนเมอร์ให้เหมาะสมต่อการนำไปต่อบนสายพีเอ็นเอโดยการนำมาทำปฏิกิริยากำจัดหมู่ปกป้อง diphenylmethyl (Dpm) และ *tert*-butoxycarbonyl (Boc) ดังรูปที่ 3.1 ด้วย trifluoroacetic acid (TFA) และแทนที่หมู่ Boc ด้วยหมู่ปกป้อง fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) และ pentafluorophenyl (Pfp) เกิดเป็นโมเลกุลที่ **4**



รูปที่ 3.1 กลไกการเกิดปฏิกิริยาแทนที่ด้วยหมู่เอไซด์

ผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาวอมเหลืองหนัก 0.1862 g คิดเป็น %yield เท่ากับ 56.7% ข้อมูล ¹H NMR สเปกตรัมของสาร **4** เป็นดังแสดง ดังรูปที่ 3.2 และ IR spectrum ของสาร **4** ดังรูปที่ 3.3 และสามารถวิเคราะห์ ¹H NMR ของสาร **4** ได้ดังนี้



รูปที่ 3.2 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) ของ (N-flouren-9-ylmethoxycarbonyl)-*cis*-4-(azido)-D-proline pentafluorophenyl ester **4**

ซึ่งตำแหน่งสัญญาณ ^1H NMR ของสาร **4** มีค่าใกล้เคียงกับเอกสารอ้างอิง³³ โดยสามารถวิเคราะห์ได้ดังนี้

สัญญาณ δ 7.29 – 7.83 (m, 8H) เป็นโปรตอนบนวงอะโรมาติกของ Fmoc ที่ขึ้นเป็น multiplet

สัญญาณ δ 4.71 – 4.90 (m, 1H) เป็นโปรตอนของคาร์บอนที่อยู่ระหว่างไนโตรเจนบนวงไพโรลีนและ OPfp (ตำแหน่งที่ 4)

สัญญาณ δ 4.52 – 4.64 (m, 1H) เป็นโปรตอนของคาร์บอนที่อยู่ติดกับหมู่เอไซด์บนวงไพโรลีน (ตำแหน่งที่ 6)

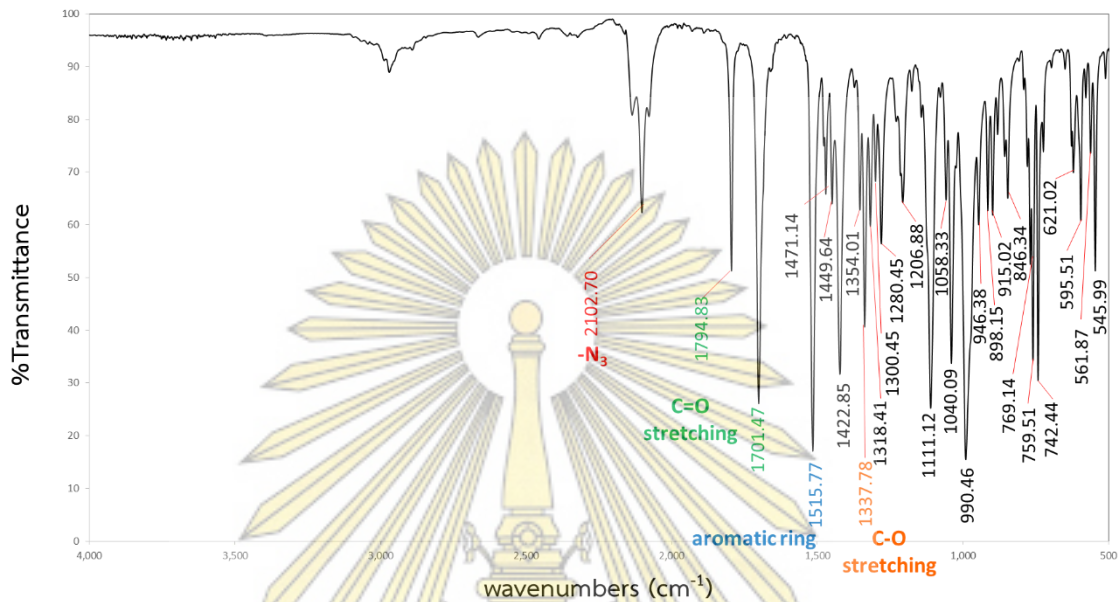
สัญญาณ δ 4.28 – 4.49 (m, 2H) เป็นโปรตอนของคาร์บอนที่อยู่ตรงตำแหน่งติดกับหมู่เอสเทอร์ (ตำแหน่งที่ 2)

สัญญาณ δ 4.25 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H) เป็นโปรตอนของคาร์บอนที่อยู่ตรงตำแหน่งถัดจากวงอะโรมาติกของ Fmoc (ตำแหน่งที่ 1)

สัญญาณ δ 3.59 – 3.90 (m, 2H) เป็นโปรตอนของคาร์บอนที่อยู่ติดกับไนโตรเจนบนวงไพโรลีน (ตำแหน่งที่ 3)

สัญญาณ δ 2.44 – 2.71 (m, 2H) เป็นโปรตอนของคาร์บอนที่อยู่บนวงไพโรลีน (ตำแหน่งที่ 5)

และสามารถวิเคราะห์ IR spectrum ของสาร **4** ได้ดังนี้



รูปที่ 3.3 IR spectrum ของ (N-flouren-9-ylmethoxycarbonyl)-*cis*-4-(azido)-D-proline pentafluorophenyl ester **4**

ความยาวคลื่นที่ 2121 cm^{-1} เป็นสัญญาณของ N_3 ของหมู่ฟังก์ชันเอไซด์

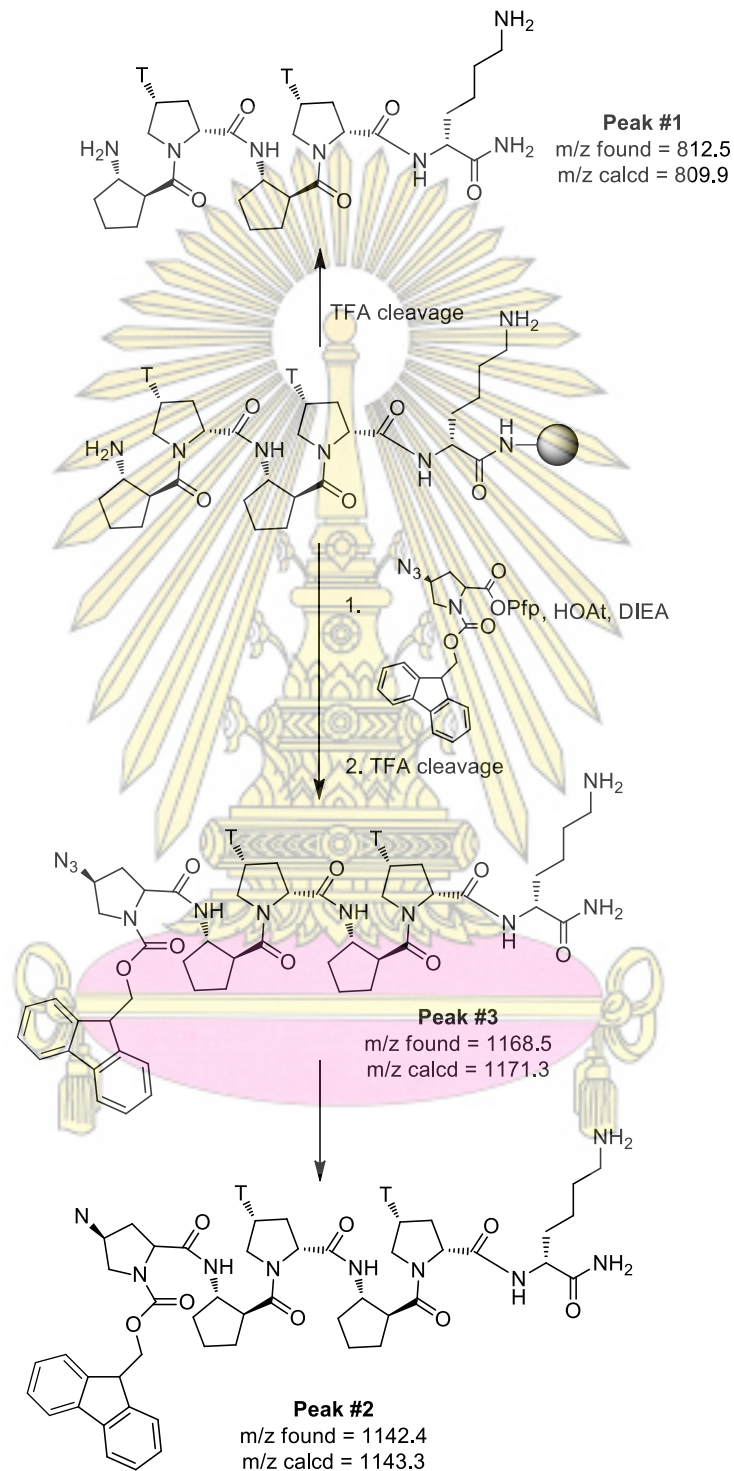
ความยาวคลื่นที่ 1795 cm^{-1} และ 1702 cm^{-1} เป็นสัญญาณของ C=O stretching ของหมู่ฟังก์ชัน ester ในสาร **4**

ความยาวคลื่นที่ 1516 cm^{-1} เป็นสัญญาณของ C=C stretching ของวงอะโรมาติก

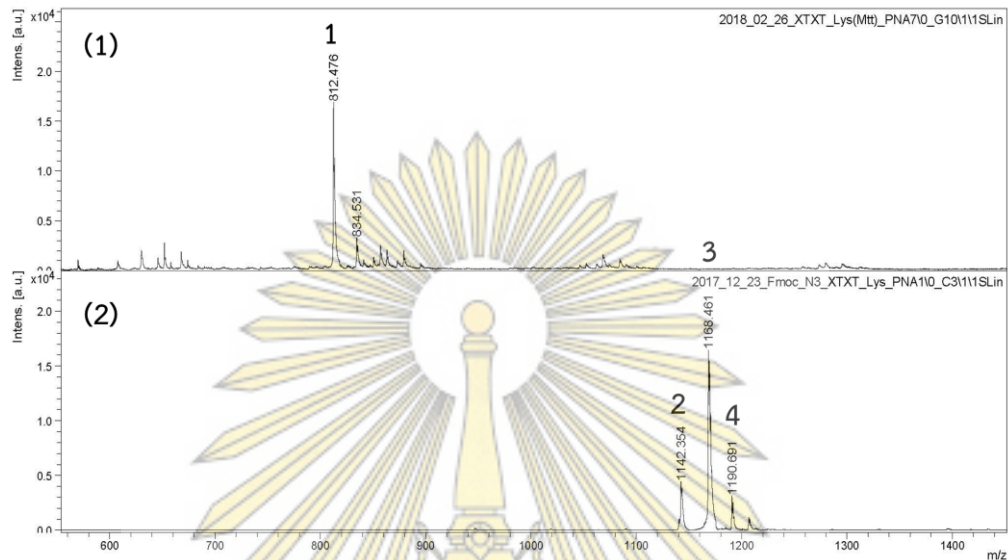
ความยาวคลื่นที่ 1338 cm^{-1} เป็นสัญญาณของ C-O stretching ของ ester

3.1.2 การตัดแปรปลายด้านอะมิโน (N-terminus) ของพีเอ็นเอด้วยสาร **4**

เมื่อผู้วิจัยได้พิสูจน์เอกลักษณ์ของตัวเชื่อมสาร **4** ด้วยเทคนิค $^1\text{H NMR}$ และนำมาทดสอบการเชื่อมกับพีเอ็นเอ Fmoc-TT-Lys(Boc) บนวฏภาคของแข็ง $1.5\ \mu\text{mol}$ โดยเมื่อกำจัดหมู่ Fmoc แล้วจะทำให้ไนโตรเจนบนปลายด้านอะมิโนของพีเอ็นเอสามารถเกิดปฏิกิริยากับสาร **4** เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ดังรูปที่ 3.4 จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF mass spectrometry พบว่า สาร **4** สามารถเชื่อมต่อกับพีเอ็นเอได้ด้วยปฏิกิริยาแทนที่ที่คาร์บอนิล โดยมีหมู่อะมิโนของพีเอ็นเอเป็นนิวคลีโอไฟล์ และหมู่ $-\text{OC}_6\text{F}_5$ เป็นหมู่หลุดออก เกิดเป็นพันธะเอไมด์ ซึ่งเมื่อแยกผลิตภัณฑ์ออกจากวฏภาคของแข็งโดยใช้ trifluoroacetic acid ซึ่งจะทำให้หมู่ Boc บน Lys หลุดออกไปพร้อมกัน พบ $m/z = 1168.5$ ซึ่งสอดคล้องกับค่าที่คำนวณได้ของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการคือ Fmoc-*cis*-4-(azido)-D-proline-TT-LysNH₂ (m/z calcd = 1171.3, $[\text{M} + \text{Na}^+ = 1194.3]$) และพบ $m/z = 1142.4$ ซึ่งสอดคล้องกับค่าที่คำนวณได้ของผลิตภัณฑ์ที่เกิดการหลุดออกของ N_2 คือ $m/z = 1143.3$ เนื่องจากหมู่เอไซด์สามารถสลายตัวได้ง่าย ดังรูปที่ 3.4 และรูปที่ 3.5 และไม่พบพิกของสารตั้งต้นเหลือ แสดงว่าปฏิกิริยาเกิดได้ค่อนข้างสมบูรณ์



รูปที่ 3.4 โครงสร้างที่คาดว่าจะเกิดขึ้นและค่าแมสที่พบเทียบกับค่าแมสที่คำนวณได้ของพีเอ็นเอในการตัดแปรปลายด้านอะมิโน (N-terminus) ของพีเอ็นเอด้วยสาร **4**



รูปที่ 3.5 mass spectrum ของ (1) พีเอ็นเอ H-TT-LysNH₂ และ (2) พีเอ็นเอ Fmoc-*cis*-4-(azido)-D-proline-TT-LysNH₂

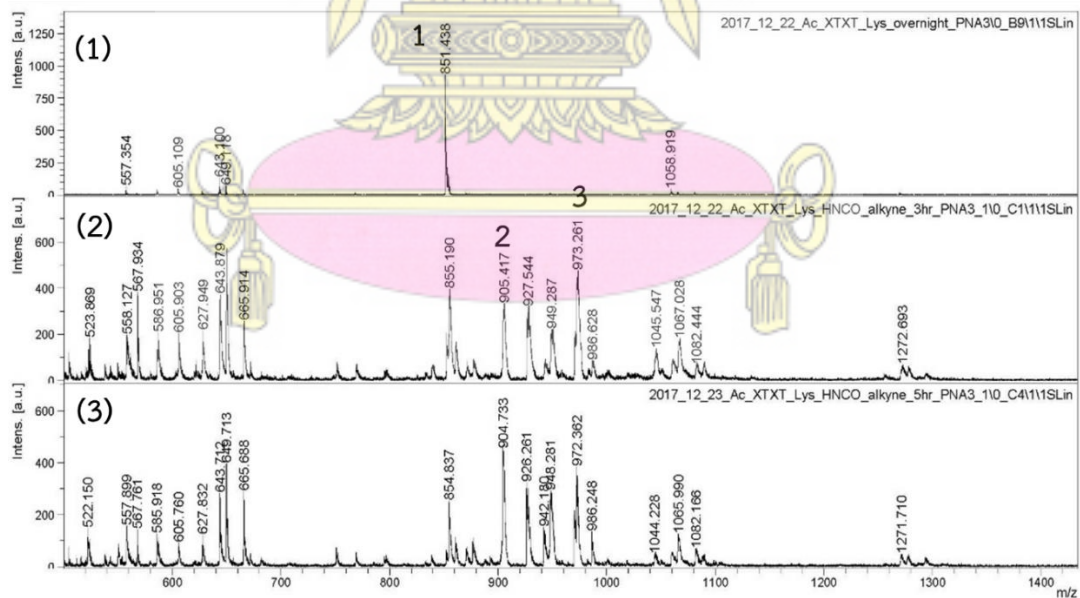
3.1.3 ความพยายามในการตัดแปรปลายด้านคาร์บอกซิล (C-terminus) ของพีเอ็นเอด้วย propiolic acid

งานวิจัยนี้ผู้วิจัยต้องการตัดแปรปลายคาร์บอกซิลของพีเอ็นเอ Fmoc-TT-Lys(Tfa) บนวัฏภาคของแข็ง ให้มีหมู่ฟังก์ชันแอลโคห์นที่สามารถนำไปทำปฏิกิริยากับหมู่ฟังก์ชันไฮดรอกซิลของพีเอ็นเออีกเส้น โดยการตัดแปรจะทำบนหมู่เอมิโนของไลซีนตรงปลายด้านคาร์บอกซิล ดังนั้นจึงต้องเลือกหมู่ปกป้องไลซีนที่สามารถกำจัดออกได้โดยไม่ทำให้พีเอ็นเอหลุดจากวัฏภาคของแข็ง ในที่นี้เลือกใช้หมู่ Tfa ซึ่งกำจัดออกได้ในภาวะเบส โดยเริ่มจากการปกป้องปลายด้านเอมิโนด้วยหมู่ที่ไม่ว่องไวต่อปฏิกิริยา ซึ่งทำได้โดยการกำจัดหมู่ Fmoc ออก และตามด้วยการปกป้องด้วยหมู่อะเซทิล จากนั้นกำจัดหมู่ Tfa ออกด้วยการนำไปทำปฏิกิริยากับเบส คือ concentrated aqueous NH₃ และ dioxane (อัตราส่วน 1:1, ปริมาตร 2 mL) ทำให้พีเอ็นเอด้านปลายคาร์บอกซิลมีหมู่เอมิโนอิสระที่พร้อมจะเชื่อมต่อกับ propiolic acid

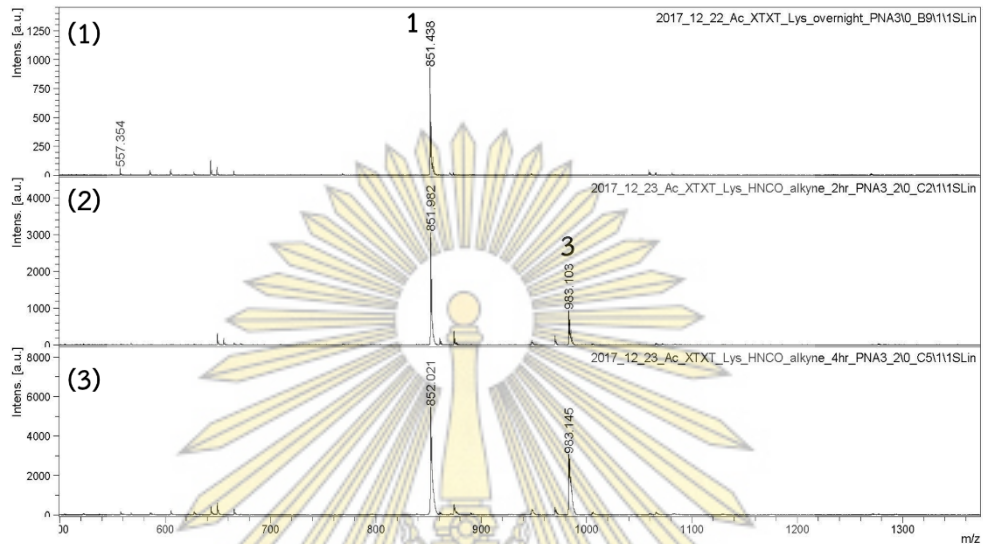
ในงานวิจัยได้แบ่งพีเอ็นเอบนวัฏภาคของแข็งที่ผ่านการติดหมู่อะเซทิลและกำจัดหมู่ Tfa แล้วออกเป็นสองส่วน ส่วนละ 0.25 μmol เพื่อนำไปตัดแปรปลายคาร์บอกซิลของพีเอ็นเอด้วยตัวเชื่อม propiolic acid ด้วยการทำปฏิกิริยากับสารละลายผสมระหว่าง HBTU 2.2 mg (6.0 μmol , 24 eq.), HOBt 0.8 mg (6.0 μmol , 24 eq.), DIEA (1 μL , 6.0 μmol , 24 eq.) และ propiolic acid (1 μL , 15.0 μmol , 60 eq.) ตามลำดับ ในวิธีที่ 1 และการทำปฏิกิริยากับสารละลายผสมระหว่าง PyBOP 3.1 mg (6.0 μmol , 24 eq.) ใน DMF 30 μL , propiolic acid (1 μL , 15.0 μmol , 60 eq.), PPTS 1.5 mg (6.0 μmol , 24 eq.) ใน DMF 30 μL และ NMM (1 μL , 6.0 μmol , 24 eq.) ตามลำดับ ในวิธีที่ 2 และติดตามการเกิดปฏิกิริยาด้วยเทคนิค MALDI-TOF mass spectrometry เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับพบว่า วิธีที่ 1 สามารถเชื่อมต่อกับ propiolic acid เข้ากับพีเอ็นเอได้ โดยจะให้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการคือ Ac-TT-Lys(propioyl)-NH₂ ซึ่งพบ $m/z = 904.7$ (m/z

calcd = 905.0, $[M + Na]^+ = 928.0$) แต่ให้ผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่คาดว่าเกิดจากการที่ propiolic acid สองตัวเข้าทำปฏิกิริยาด้วย โดยพบ $m/z = 973.3$ (m/z calcd = 958.0, $[M + Na]^+ = 981.0$) และปฏิกิริยาเกิดได้ไม่สมบูรณ์ และเมื่อเพิ่มเวลาในการทำปฏิกิริยามากขึ้นพบว่าสารตั้งต้น Ac-TT-LysNH₂ ลดลงแต่ไม่หมด โดยยังพบ $m/z = 851.4$ (m/z calcd = 852.0) และมีสัญญาณอื่นที่ไม่สามารถระบุแน่ชัดได้อีกหลายสัญญาณ ดังรูปที่ 3.6 และ รูปที่ 3.8

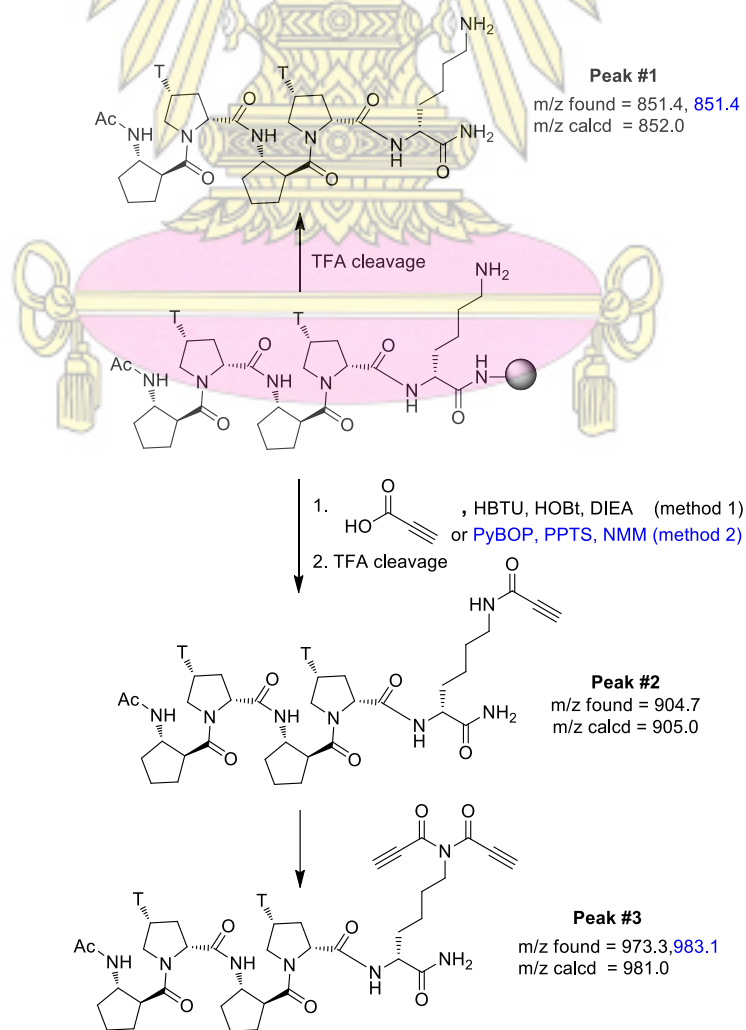
จากการทำปฏิกิริยารูปที่ 1 จะเห็นได้ว่ายังไม่ค่อยมีประสิทธิภาพ ทำให้ผู้วิจัยสนใจที่จะนำพีเอ็นเอ Ac-TT-Lys บนวัฏภาคของแข็ง 0.25 μmol มาทำปฏิกิริยารูปที่ 2 ซึ่ง Jarikote และคณะ³⁴ ได้เคยนำมาใช้ในการทำปฏิกิริยากับพีเอ็นเออื่นก่อนหน้านี้ ปรากฏว่าไม่พบพิกแมสที่ตรงกับผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ และพีเอ็นเอตั้งต้นไม่หมด แต่พบ $m/z = 983.1$ (m/z calcd = 958.0, $[M + Na]^+ = 981.0$) ดังรูปที่ 3.7 และรูปที่ 3.8 ซึ่งเป็นพิกของผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่คาดว่าเกิดจากการที่ propiolic acid สองตัวเข้าทำปฏิกิริยา เนื่องจากโมเลกุลของ propiolic acid มีขนาดเล็กทำให้มีความว่องไวในการทำปฏิกิริยา เนื่องจากยังไม่สามารถสังเคราะห์พีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับหมู่แอลไคโนโดยผ่าน propiolic acid ได้ ระหว่างที่หาวิธีที่เหมาะสมอยู่จึงได้ศึกษาวิธีอื่นควบคู่ไปด้วย



รูปที่ 3.6 mass spectrum ของ (1) พีเอ็นเอ Ac-TT-LysNH₂, (2) การเชื่อมกันของพีเอ็นเอ Ac-TT-LysNH₂ กับ propiolic acid เป็น 3 ชั่วโมง และ (3) 5 ชั่วโมง ด้วยวิธีที่ 1



รูปที่ 3.7 mass spectrum ของ (1) พีเอ็นเอ Ac-TT-LysNH₂ และ (2) การเชื่อมพีเอ็นเอ Ac-TT-LysNH₂ กับ propiolic acid เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (3) 4 ชั่วโมง ด้วยวิธีที่ 2

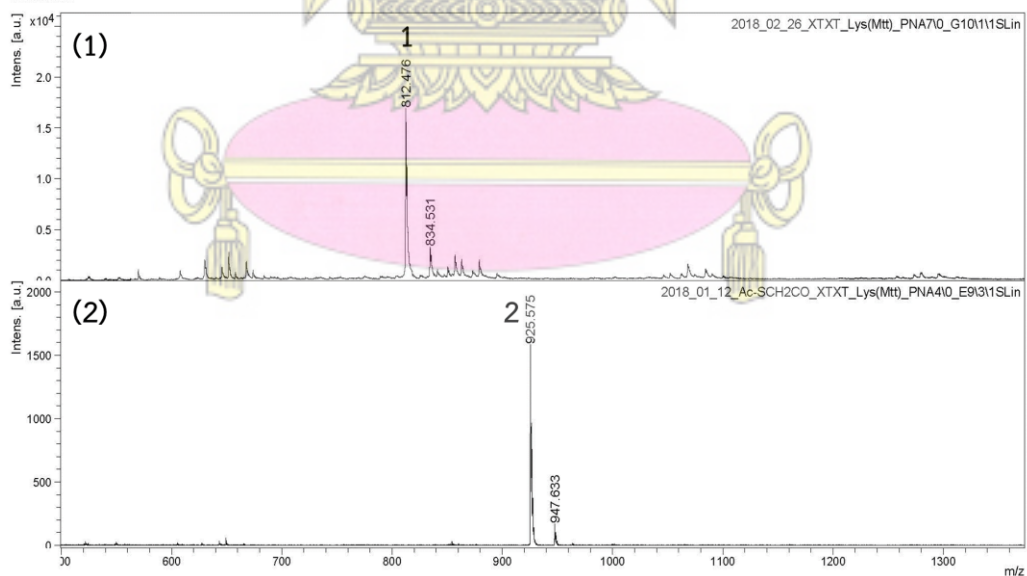


รูปที่ 3.8 โครงสร้างที่คาดว่าจะเกิดขึ้นและค่าแมสที่พบเทียบกับค่าแมสที่คำนวณได้ของพีเอ็นเอในการตัดแปรปลายด้านคาร์บอกซิล (C-terminus) ของพีเอ็นเอด้วย propiolic acid ด้วยวิธีที่ 1 และวิธีที่ 2

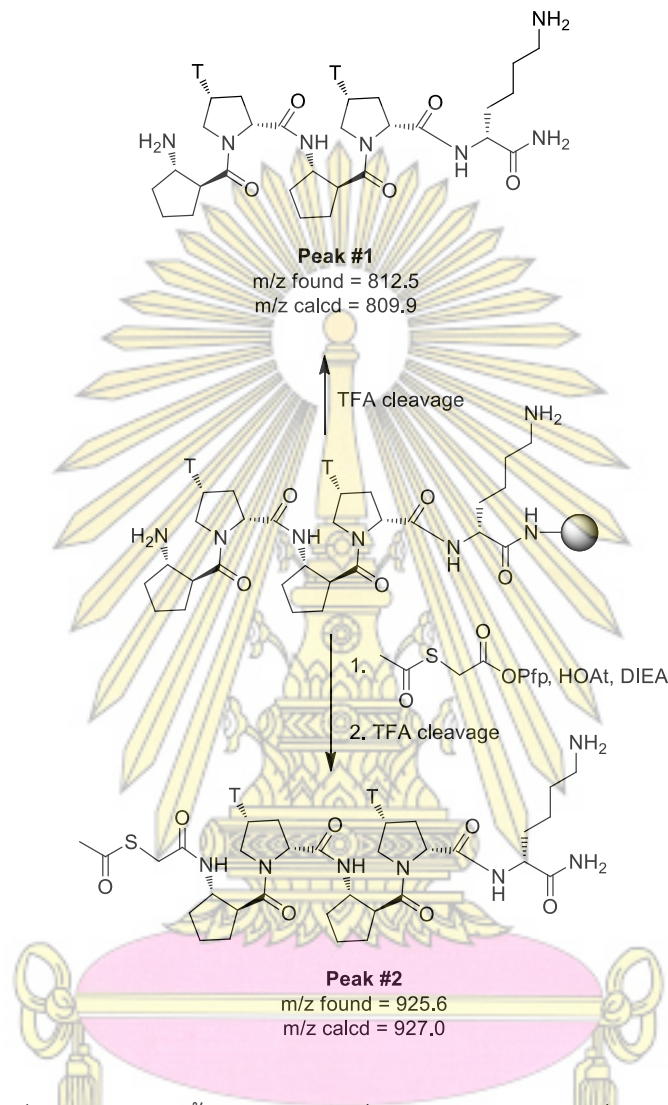
3.2 การเชื่อมกันของพีเอ็นเอผ่านการทำปฏิกิริยา thiol-exchange ของ cysteine ที่มีหมู่ปกป้อง 3-nitro-2-pyridylsulfenyl (Npys) กับหมู่ไทออลอิสระ

3.2.1 การตัดแปรปลายด้านอะมิโน (N-terminus) ของพีเอ็นเอด้วย *S*-acetyl-thioglycolic acid pentafluorophenyl ester

เนื่องจากหมู่ไทออลสามารถพบได้ในส่วนประกอบของโซ่ข้างของกรดอะมิโน cysteine ในธรรมชาติ จึงมีผู้นิยมใช้หมู่ไทออลในการเชื่อมระหว่างไบโอโมเลกุล³⁵ โดยปฏิกิริยา Michael addition หรือปฏิกิริยา thiol exchange อย่างไรก็ตาม พีเอ็นเอไม่มีหมู่ไทออล ดังนั้นในการทดลองนี้ผู้วิจัยได้นำพีเอ็นเอ Fmoc-TT-Lys(Boc) บนวัฏภาคของแข็งมาทำปฏิกิริยากับ *S*-acetyl-thioglycolic acid pentafluorophenyl ester เพื่อติดหมู่ไทออล เข้าไปที่ปลายด้านอะมิโนของพีเอ็นเอก่อน โดยมีหมู่ปกป้องไทออลคือหมู่ acetyl เนื่องจากหมู่ไทออลอิสระไม่เสถียร สามารถถูกออกซิไดซ์เป็นไดซัลไฟด์ได้ง่ายในอากาศ เมื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF mass spectrometry พบว่า สามารถเชื่อมต่อหมู่ *S*-acetyl-thioglycolyl กับพีเอ็นเอได้สำเร็จ เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการคือ AcSCH₂CO-TT-LysNH₂ และเกิดได้สมบูรณ์ ซึ่งพบ $m/z = 925.58$ (m/z calcd = 927.06) โดยไม่มีพีกของพีเอ็นเอที่เป็นสารตั้งต้นเหลืออยู่ ดังรูปที่ 3.9 และรูปที่ 3.10



รูปที่ 3.9 mass spectrum ของ (1) พีเอ็นเอ H-TT-LysNH₂ และ (2) พีเอ็นเอ AcSCH₂CO-TT-LysNH₂

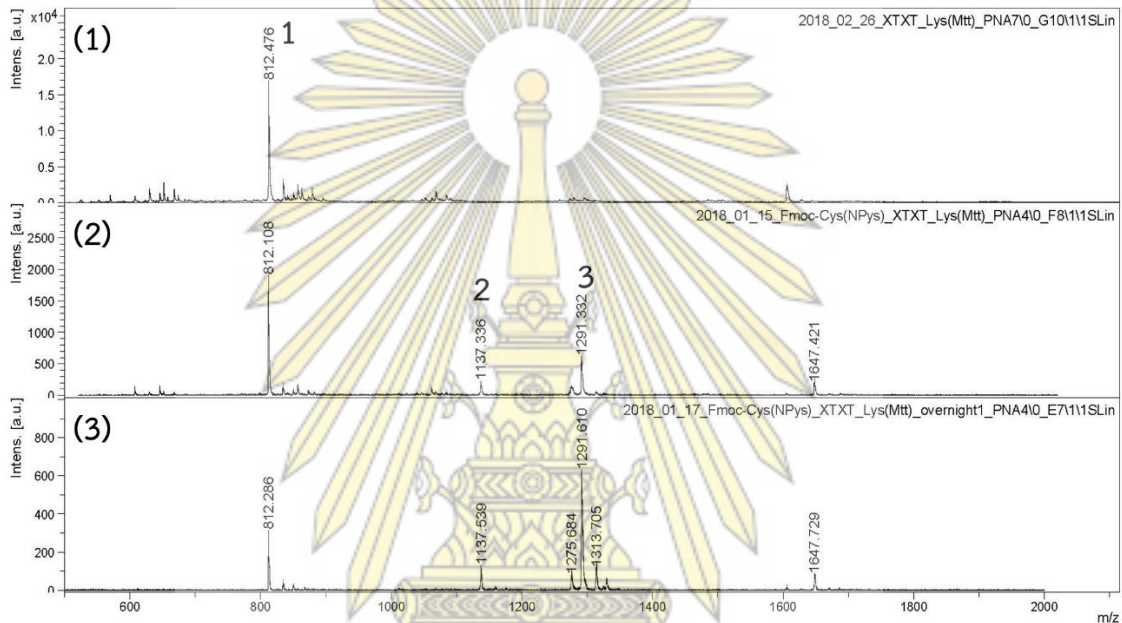


รูปที่ 3.10 โครงสร้างที่คาดว่าจะเกิดขึ้นและค่าแมสที่พบเทียบกับค่าแมสที่คำนวณได้ของพีเอ็นเอในการตัดแปรรูปด้านอะมิโน (N-terminus) ของพีเอ็นเอด้วย *S*-acetyl-thioglycolic acid pentafluorophenyl ester

3.2.2 การตัดแปรรูปด้านอะมิโน (N-terminus) ของพีเอ็นเอด้วย *N*-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-*S*-(3-nitro-2-pyridylthio)-*L*-cysteine ด้วยวิธีที่ 1 และวิธีที่ 2

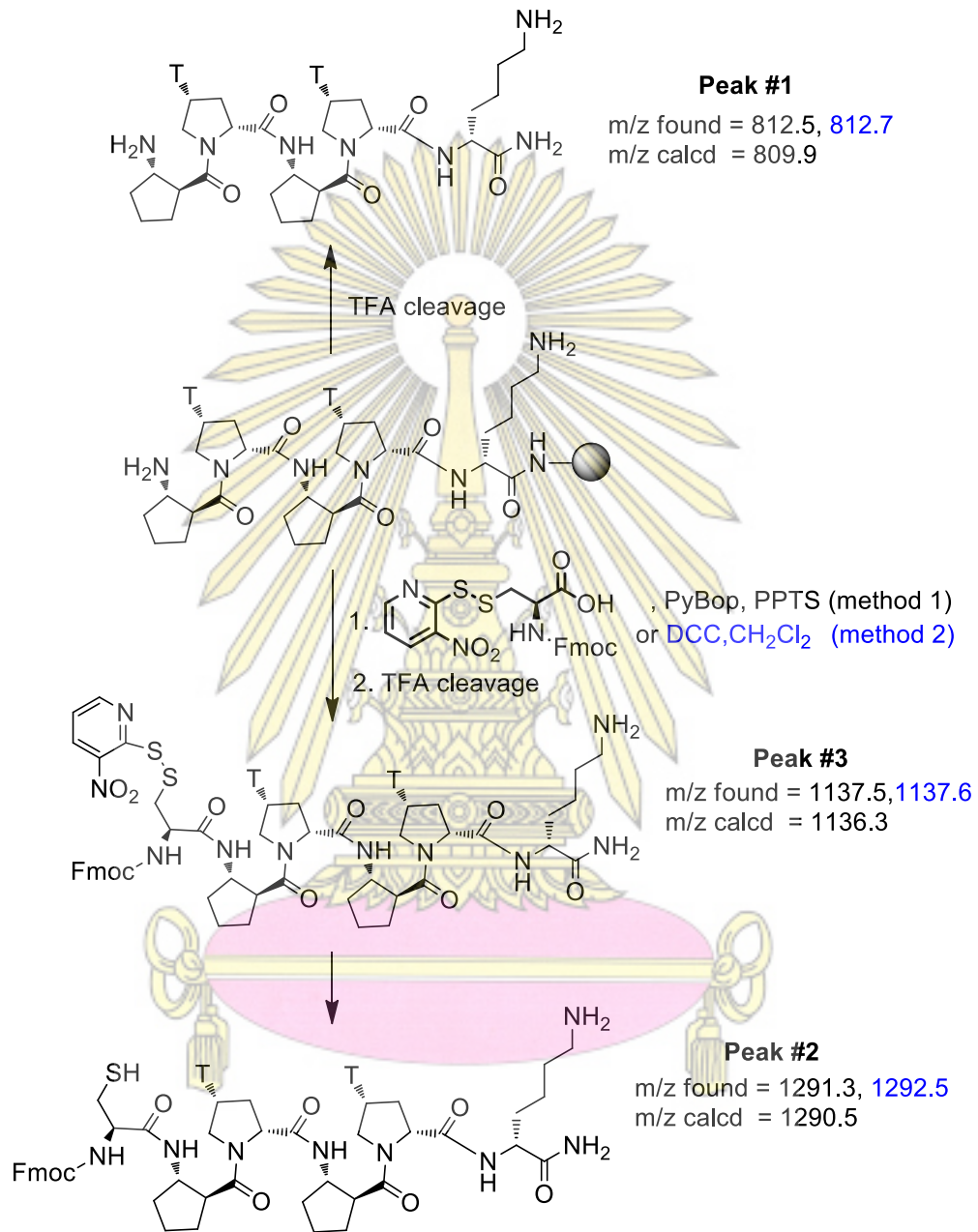
จากวิธีที่ 2 ในการทำปฏิกิริยาระหว่างตัวเชื่อม propionic acid กับพีเอ็นเอ Ac-TT-Lys บนวัฏภาคของแข็ง พบว่าปฏิกิริยาสามารถเกิดได้ดีพอสมควร ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะนำวิธีดังกล่าวมาใช้ในการทำปฏิกิริยาในการเชื่อม *N*-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-*S*-(3-nitro-2-pyridylthio)-*L*-cysteine [Fmoc-Cys(Npys)-OH] กับพีเอ็นเอ Fmoc-TT-LysNH₂ โดยใช้ Fmoc-Cys(Npys)-OH 3.0 mg (6.0 μmol, 60 eq.) ใน DMF 30 μL ในสารละลายผสมระหว่าง PyBOP 3.1 mg (6.0 μmol, 24 equiv.) ใน DMF 30 μL, PPTS 1.5 mg (6.0 μmol, 24 eq.) ใน DMF 30 μL และ NMM (1 μL, 6.0 μmol, 24 eq.) และพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF mass spectrometry พบว่าสามารถเชื่อมต่อกับ Fmoc-Cys(Npys)-OH กับพีเอ็นเอได้ โดยพบ m/z = 1291.3 (m/z calcd = 1290.5) ซึ่งเป็นพิกของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการคือ Fmoc-Cys(Npys)-TT-LysNH₂ ดังรูป

ที่ 3.11 และรูปที่ 3.12 แต่ยังมีพิกของพีเอ็นเอตั้งต้นเหลือที่ $m/z = 812.1$ และยังพบ $m/z = 1137.5$ (m/z calcd = 1136.3) ซึ่งคาดว่าเป็นพิกของ Fmoc-Cys-TT-LysNH₂ ที่เกิดจากการแตกของพันธะไดซัลไฟด์ ทำให้หมู่ Npys หลุดออก และยังเกิด $m/z = 1647.4$ ซึ่งไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นสารใด

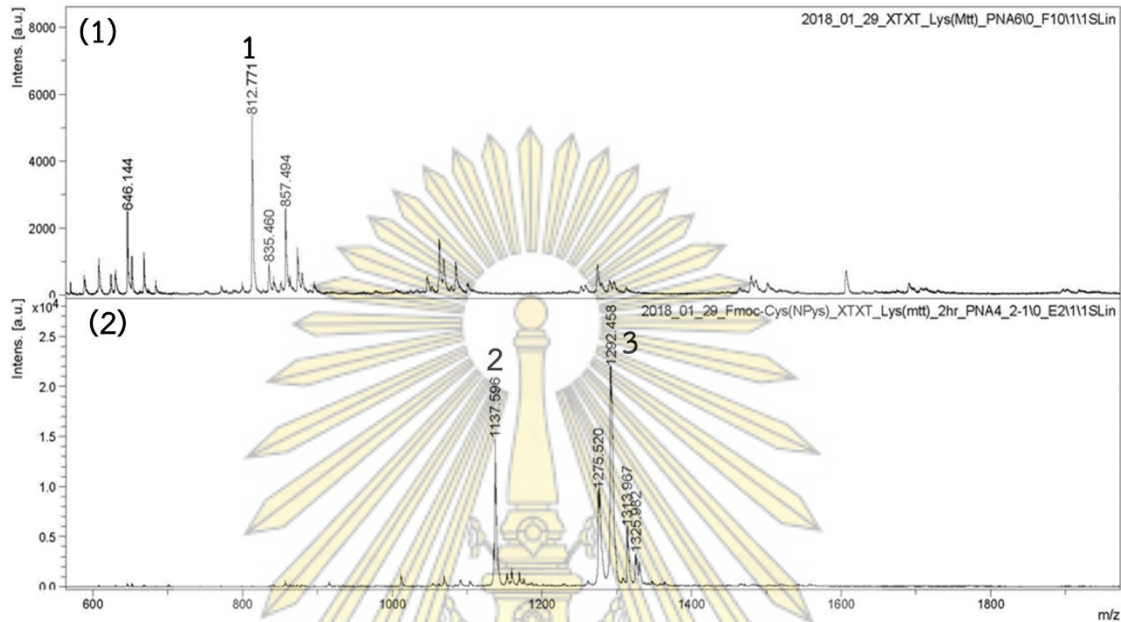


รูปที่ 3.11 mass spectrum ของ (1) พีเอ็นเอ H-TT-LysNH₂ และการเชื่อมกันระหว่างพีเอ็นเอ H-TT-LysNH₂ และ (2) Fmoc-Cys(Npys)-OH ที่เวลา 1 ชั่วโมง (3) 12 ชั่วโมง ด้วยวิธีที่ 1

ผู้วิจัยจึงได้เปลี่ยนภาวะของการทำปฏิกิริยาเป็นวิธีที่ 2 โดยใช้ Fmoc-Cys(Npys)-OH 3.0 mg (6.0 μ mol, 60 eq.) ใน CH₂Cl₂ ในสารละลาย DCC 3.1 mg (6.0 μ mol, 24 eq.) ซึ่งเป็นวิธีที่ Sheehan และคณะ³⁶ ใช้ในการเชื่อมโมเลกุลสองโมเลกุลที่มีหมู่ฟังก์ชันคาร์บอกซิลและหมู่ฟังก์ชันอะมิโนด้วยพันธะเพปไทด์หรือเอไมด์ และพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF mass spectrometry พบว่า พบ $m/z = 1292.5$ (m/z calcd = 1290.5) ซึ่งตรงกับพิกของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการคือ Fmoc-Cys(Npys)-TT-LysNH₂ และพบ $m/z = 1137.6$ (m/z calcd = 1136.3) ซึ่งเป็นพิกของ Fmoc-Cys-TT-LysNH₂ ที่เกิดจากการแตกของพันธะไดซัลไฟด์ ทำให้หมู่ Npys หลุดออกเหมือนกับวิธีที่ 1 แต่วิธีนี้สามารถเกิดปฏิกิริยาได้อย่างสมบูรณ์มากกว่า โดยสังเกตได้จากการที่ไม่พบพิกแแม่สของพีเอ็นเอสารตั้งต้น ดังรูปที่ 3.12 และรูปที่ 3.13 ผู้วิจัยจึงได้ทดลองนำพีเอ็นเอ Fmoc-Cys(Npys)-TT-LysNH₂ ไปทำปฏิกิริยาเชื่อมกับพีเอ็นเอที่มีหมู่ไทออลต่อไป



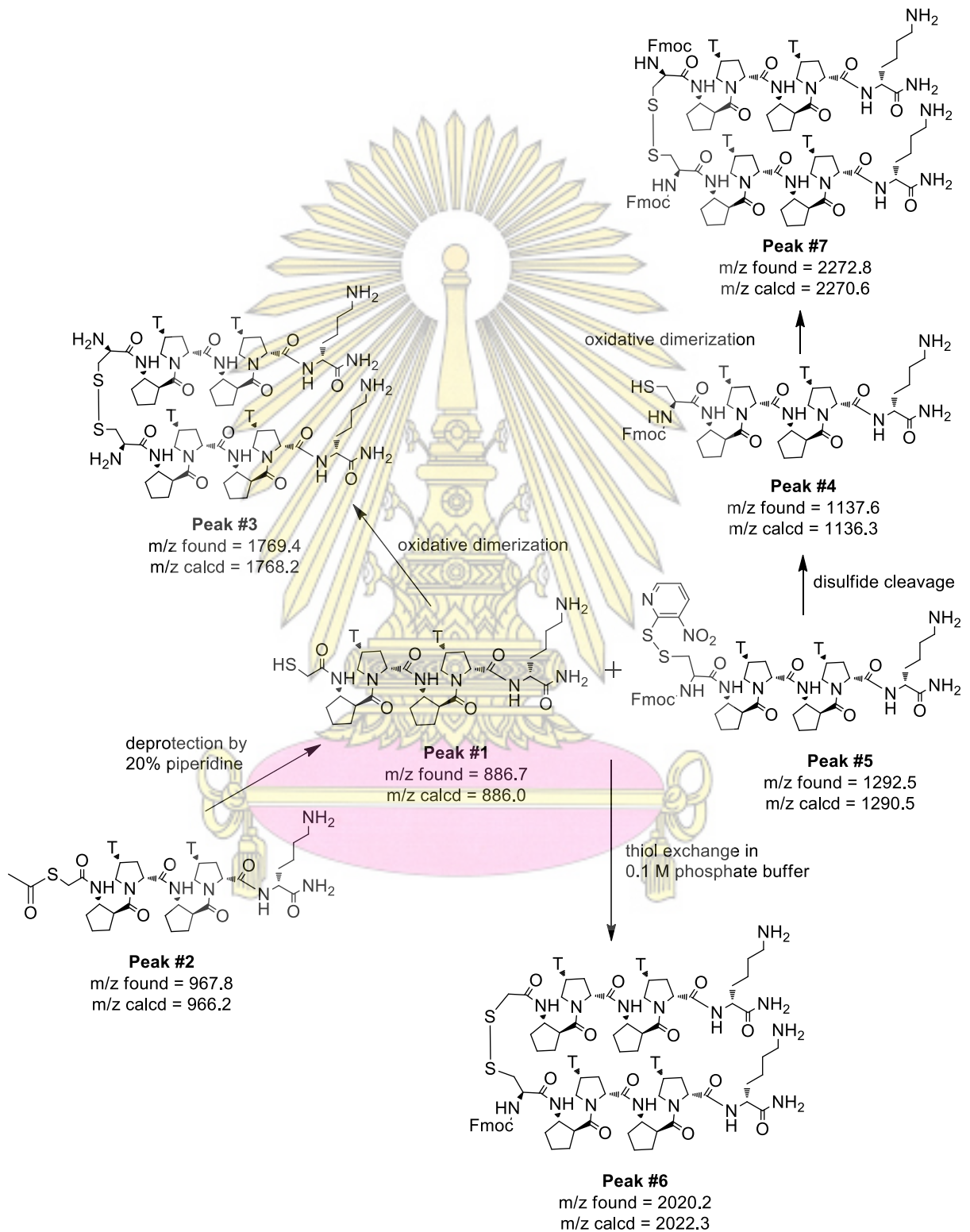
รูปที่ 3.12 โครงสร้างที่คาดว่าจะเกิดขึ้นและค่าแมสที่พบเทียบกับค่าแมสที่คำนวณได้ของพีเอ็นเอในการตัดแปรรูปด้านอะมิโน (N-terminus) ของพีเอ็นเอด้วย *N*-(9-fluorenylmethoxy-carbonyl)-*S*-(3-nitro-2-pyridylthio)-*L*-cysteine ด้วยวิธีที่ 1 และวิธีที่ 2



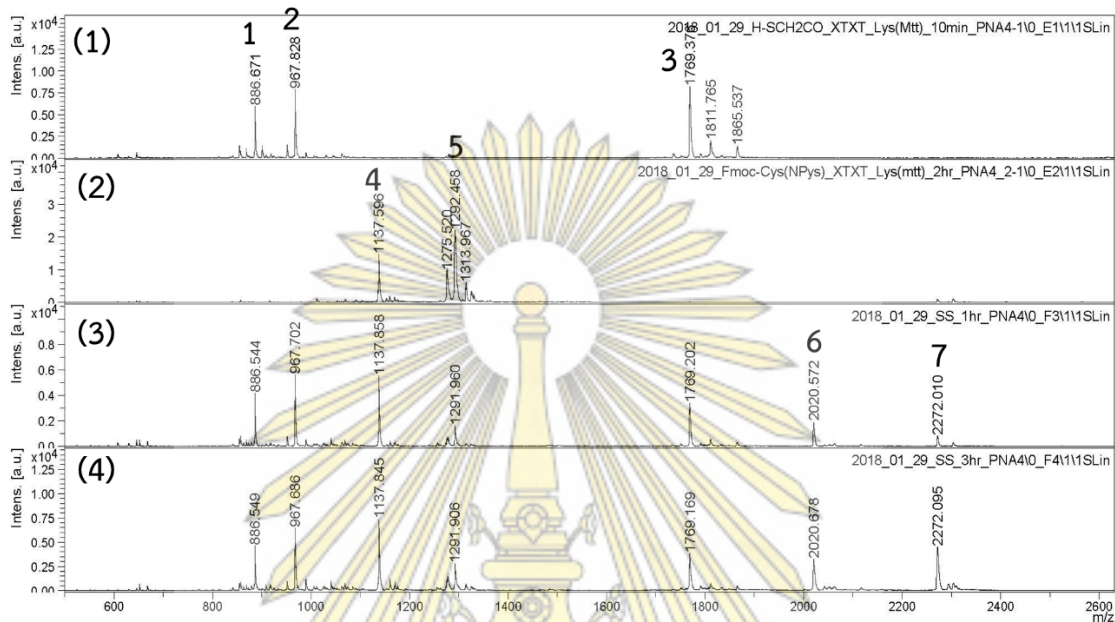
รูปที่ 3.13 mass spectrum ของ (1) พีเอ็นเอ TT-LysNH₂ และ (2) การเชื่อมกันระหว่างพีเอ็นเอ H-TT-LysNH₂ กับ Fmoc-Cys(Npys)-OH ที่เวลา 2 ชั่วโมงด้วยวิธีที่ 2

3.2.3 การเชื่อมกันของพีเอ็นเอ Fmoc-Cys(Npys)-TT-LysNH₂ และพีเอ็นเอ HSCH₂CO-TT-LysNH₂

หลังจากสังเคราะห์พีเอ็นเอ Fmoc-Cys(Npys)-TT-LysNH₂ และพีเอ็นเอ AcSCH₂CO-TT-LysNH₂ ซึ่งต้องทำการกำจัดหมู่อะเซทิลออกก่อนโดยใช้ 20% piperidine ใน DMF ให้เกิดเป็นพีเอ็นเอ HSCH₂CO-TT-LysNH₂ และนำพีเอ็นเอสายนี้มาทำปฏิกิริยากันใน 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) และติดตามผลทุกๆครึ่งชั่วโมงด้วยการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF mass spectrometry พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปครึ่งชั่วโมง พบ m/z = 2020.2 (m/z calcd = 2022.3) [พิกหมายเลข 6 ในรูปที่ 3.15 (3)] ซึ่งเป็นพิกของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการเพียงเล็กน้อย ซึ่งอาจเกิดจากการกำจัดหมู่ปกป้อง AcS ออกไม่สมบูรณ์ ดังจะเห็นได้จากการที่ยังมีพิกของ AcSCH₂CO-TT-LysNH₂ อยู่ [พิกหมายเลข 2 ในรูปที่ 3.15 (1)] และยังพบพิกของ dimer ที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของ HS-TT-LysNH₂ ที่ m/z = 1769.3 [พิกหมายเลข 3 ในรูปที่ 3.15 (1)] และเมื่อเวลาผ่านไปพิกของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการไม่ได้เพิ่มขึ้น แต่กลับพบ m/z = 2272.8 (m/z calcd = 2270.6) ซึ่งเป็นพิกของผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่เป็น dimer ของ Fmoc-Cys-TT-LysNH₂ [พิกหมายเลข 7 ในรูปที่ 3.15 (4)] โดยสามารถวิเคราะห์ข้อมูล mass spectrum ทั้งหมดได้ดังรูปที่ 3.14



รูปที่ 3.14 โครงสร้างที่คาดว่าจะเกิดขึ้นและค่าแมสที่พบเทียบกับค่าแมสที่คำนวณได้ของพีเอ็นเอในการเชื่อมกันของพีเอ็นเอ Fmoc-Cys(Npys)-TT-LysNH₂ และพีเอ็นเอ HSCH₂CO-TT-LysNH₂

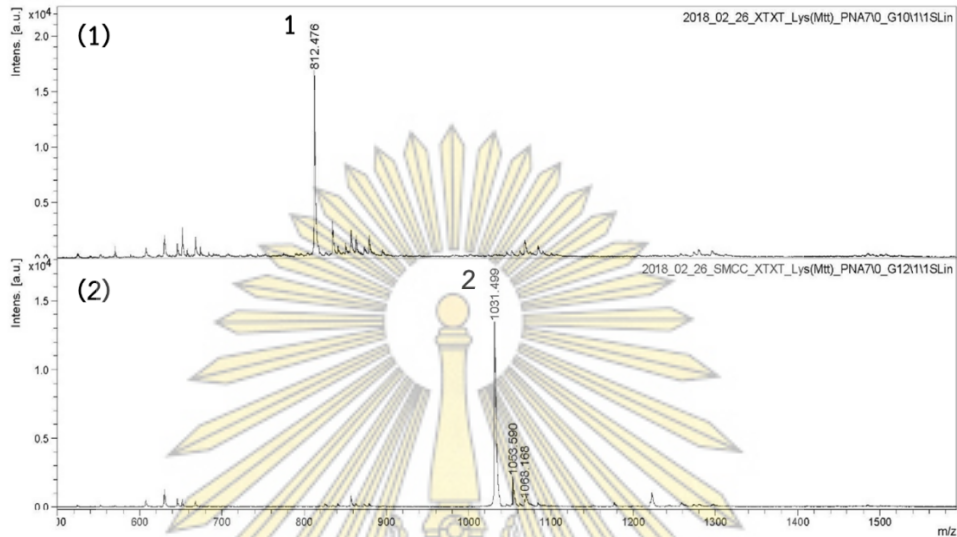


รูปที่ 3.15 mass spectrum ของ (1) พีเอ็นเอสารตั้งต้น AcSCH₂CO-TT-LysNH₂ ที่ถูกกำจัดหมู่เอเซทิลด้วย 20% piperidine ใน DMF, (2) พีเอ็นเอสารตั้งต้น Fmoc-Cys(Npys)-TT-LysNH₂, (3) การทำปฏิกิริยาของพีเอ็นเอ HSCH₂CO-TT-LysNH₂ กับพีเอ็นเอ Fmoc-Cys(Npys)-TT-LysNH₂ ใน 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง, (4) 3 ชั่วโมง

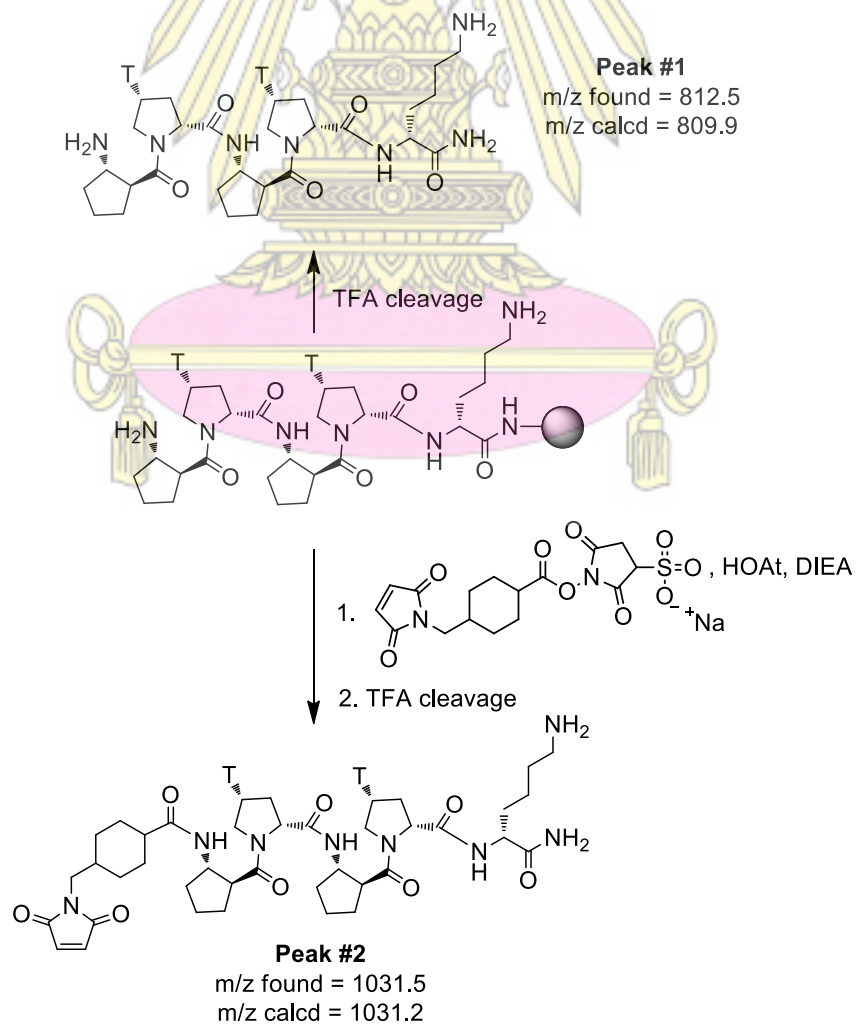
3.3 การเชื่อมกันของพีเอ็นเอผ่านการทำปฏิกิริยาระหว่างหมู่ไทออลและมาลิอิมด์

3.3.1 การตัดแปรปลายด้านอะมิโน (N-terminus) ของพีเอ็นเอด้วยตัวเชื่อม sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxamide

จากผลการทำปฏิกิริยาการเชื่อมของพีเอ็นเอสองสายด้วยพันธะไดซัลไฟด์ในหัวข้อ 3.2 พบว่าเกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียงค่อนข้างมาก เนื่องจากความไม่เสถียรของทั้งฝั่งพีเอ็นเอที่ติด Fmoc-Cys(Npys)- และ HS- ผู้วิจัยจึงทดลองอีกวิธีหนึ่งในการเชื่อมต่อ คือใช้ปฏิกิริยาไมเคิลแอดดิชันระหว่างพีเอ็นเอที่มีหมู่ไทออลกับพีเอ็นเอที่ติดหมู่มาลิอิมด์ (maleimide) โดยในการติดหมู่มาลิอิมด์ จะใช้ตัวเชื่อม sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate (sulfoSMCC) ซึ่งมีจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ โดยสามารถเกิดปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็วกับหมู่ไทออลแบบจำเพาะเจาะจง ตัวอย่างเช่น Rogers และคณะ³⁷ ได้นำวิธีนี้มาใช้ในการเชื่อมกันของพีเอ็นเอและดีเอ็นเอ จากผลการทดลองพบว่า sulfoSMCC สามารถเกิดปฏิกิริยาได้อย่างสมบูรณ์กับพีเอ็นเอ Fmoc-TT-Lys บนวิภาคของแข็ง เกิดผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ และจากผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF mass spectrometry พบว่าพบ m/z = 1031.5 ซึ่งสอดคล้องกับ MCC-TT-LysNH₂ (m/z calcd = 1030.1) ดังรูปที่ 3.16 และรูปที่ 3.17



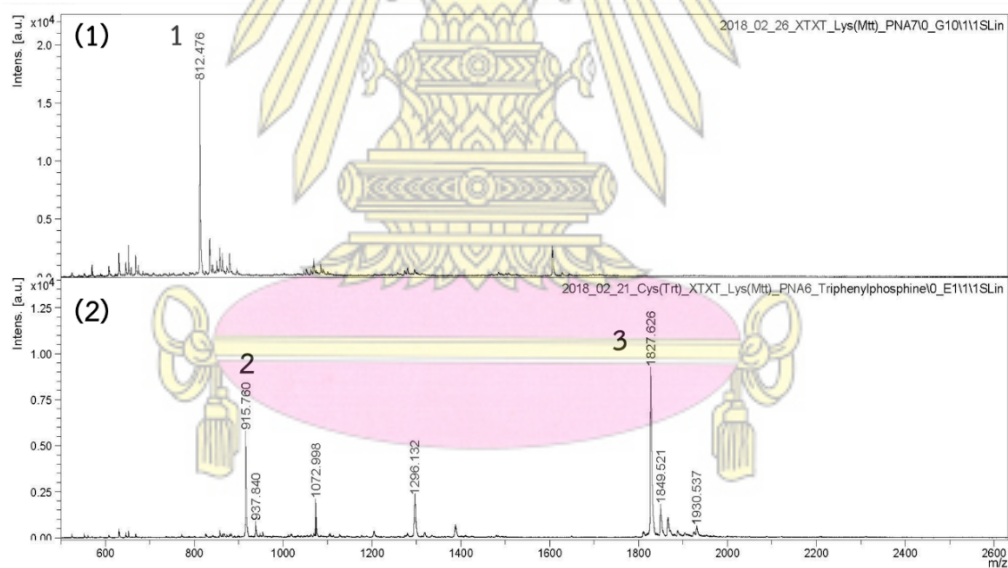
รูปที่ 3.16 mass spectrum ของ (1) พีเอ็นเอ H-TT-LysNH₂ และ (2) พีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH₂



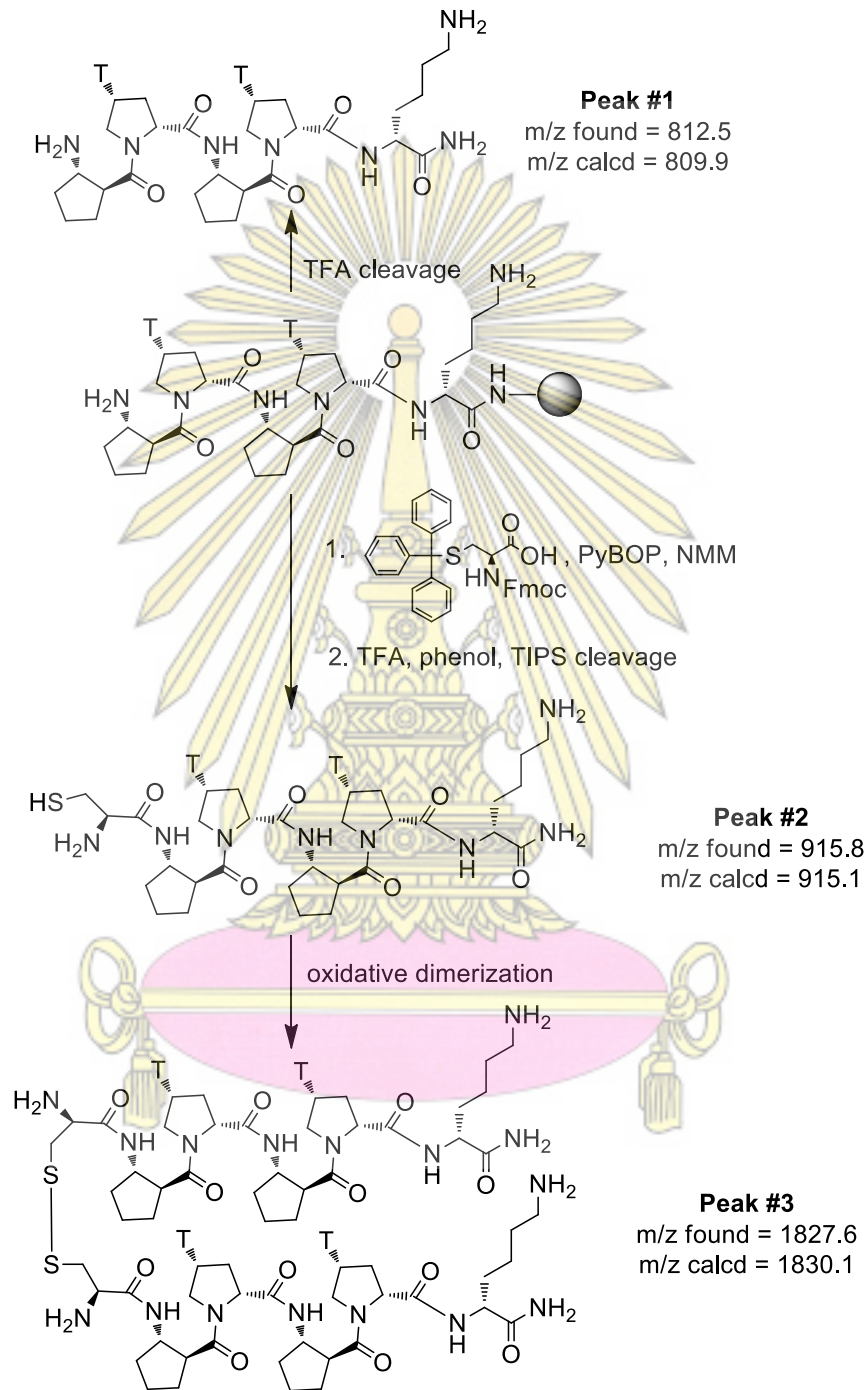
รูปที่ 3.17 โครงสร้างที่คาดว่าจะเกิดขึ้นและค่าแมสที่พบเทียบกับค่าแมสที่คำนวณได้ของพีเอ็นเอในการดัดแปลงปลายด้านอะมิโน (N-terminus) ของพีเอ็นเอด้วยตัวเชื่อม sulfosuccinimidyl 4-(*N*-maleimido-methyl) cyclohexane-1-carboxamide

3.3.2 การตัดแปรปลายด้านอะมิโน (N-terminus) ของพีเอ็นเอด้วยตัวเชื่อม *N*-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-*S*-trityl-L-cysteine

เนื่องจากเมื่อทำการกำจัดหมู่อะซีลจากพีเอ็นเอ AcSCH₂CO-TT-LysNH₂ ทำให้เกิดเป็นพันธะไดซัลไฟด์ได้ ผู้วิจัยจึงเปลี่ยนมาใช้ตัวเชื่อม *N*-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-*S*-trityl-L-cysteine [Fmoc-Cys(Trt)-OH] แทน โดยเมื่อตัดแปรพีเอ็นเอด้วย Fmoc-Cys(Trt)-OH แล้วได้กำจัดหมู่ Fmoc และปลดพีเอ็นเอจากวัฏภาคของแข็งพร้อมกับกำจัดหมู่ Trt โดยใช้ TFA ที่มี triisopropylsilane (TIPS) อยู่ด้วยตามวิธีของ Fang และคณะ³⁸ และพิสูจน์เอกลักษณ์พีเอ็นเอที่ได้ด้วยเทคนิค mass spectrometry พบว่า พบ $m/z = 915.8$ (m/z calcd = 914.1) ซึ่งเป็นพิกของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการคือ H-Cys-TT-LysNH₂ แต่ก็ยังพบปฏิกิริยาข้างเคียงคือการเกิดพันธะไดซัลไฟด์ได้ โดยพบ $m/z = 1827.6$ (m/z calcd = 1827.1) ซึ่งสูงกว่าพิกของผลิตภัณฑ์ ดังรูปที่ 3.18 และรูปที่ 3.19



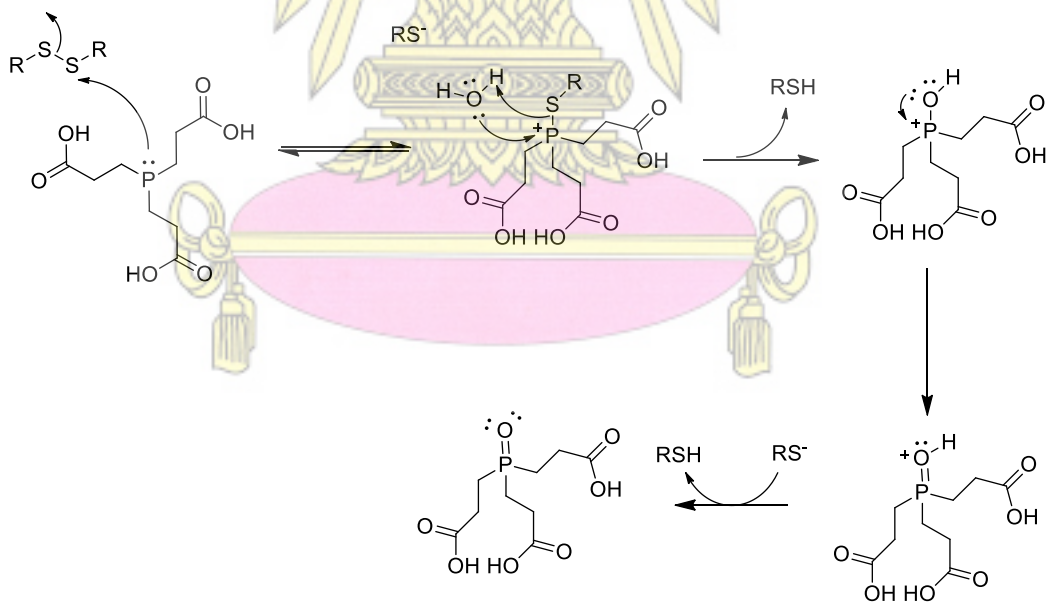
รูปที่ 3.18 mass spectrum ของ (1) พีเอ็นเอ H-TT-LysNH₂ และ (2) พีเอ็นเอ H-TT-LysNH₂ ที่ถูกตัดแปรด้วย Fmoc-Cys(Trt)-OH



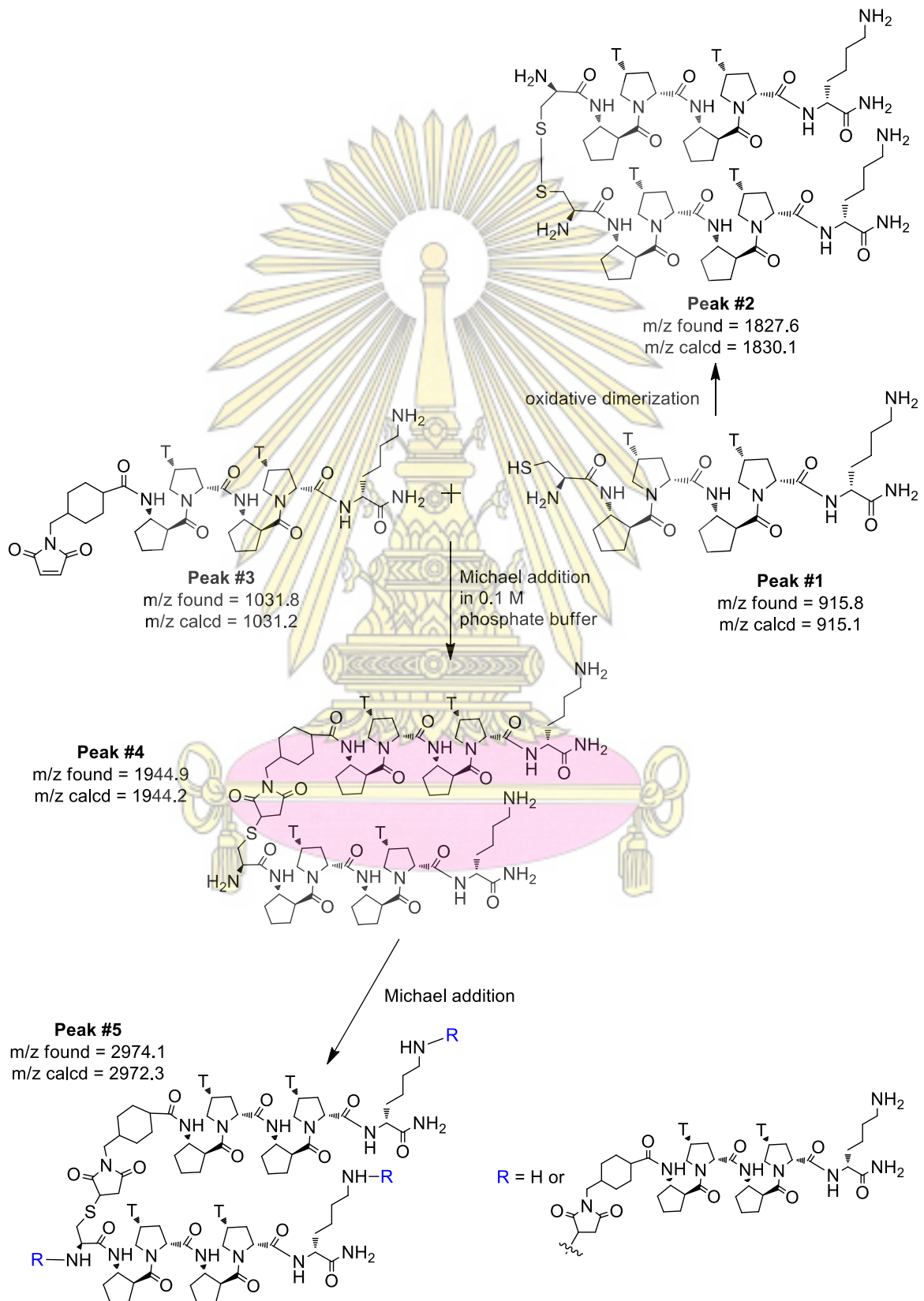
รูปที่ 3.19 โครงสร้างที่คาดว่าจะเกิดขึ้นและค่าแมสที่พบเทียบกับค่าแมสที่คำนวณได้ของพีเอ็นเอในการตัดแปรรูปด้านอะมิโน (N-terminus) ของพีเอ็นเอด้วยตัวเชื่อม *N*-(9-fluorenylmethoxy-carbonyl)-*S*-trityl-L-cysteine

3.3.3 การเชื่อมกันของพีเอ็นเอ H-Cys-TT-LysNH₂ และพีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH₂

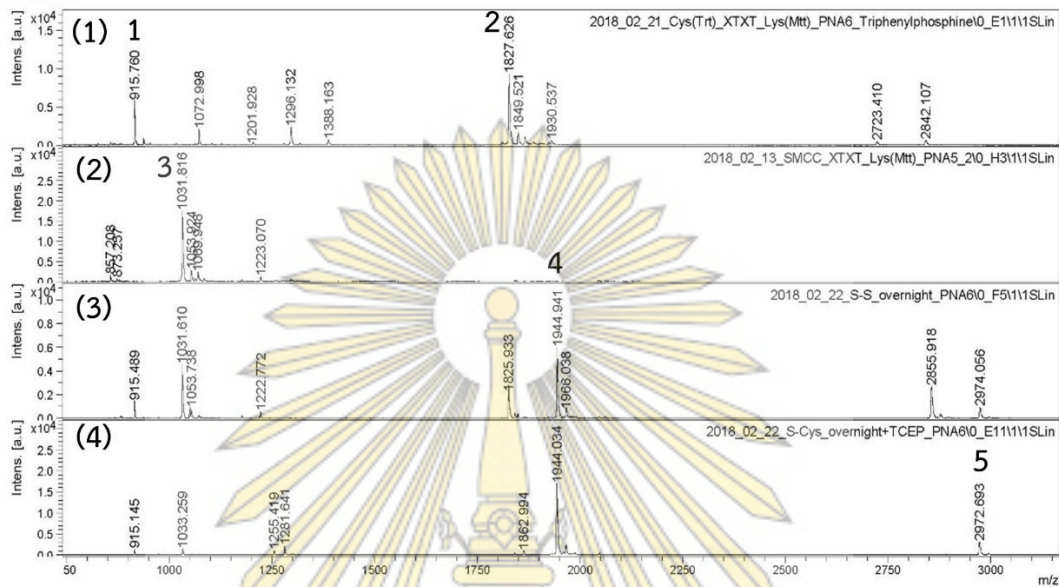
หลังจากสังเคราะห์พีเอ็นเอ H-Cys-TT-LysNH₂ และพีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH₂ ได้แล้ว ในขั้นต่อไป ผู้วิจัยได้นำพีเอ็นเอสองสายนี้มาทำปฏิกิริยากันใน 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) และพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF mass spectrometry พบว่า พบ $m/z = 1944.9$ (m/z calcd = 1944.2) ซึ่งเป็นพิกของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ ดังรูปที่ 3.22 (1) แต่พบ $m/z = 2974.1$ ซึ่งคาดว่าเป็นพิกของผลิตภัณฑ์ที่ทำปฏิกิริยากับ MCC-PNA อีกสายหนึ่งผ่านปฏิกิริยา michael addition ของหมู่อะมิโนบน cysteine หรือ lysine กับหมู่มาลอิไมด์ (maleimide) เกิดดังรูปที่ 3.22 (2) เนื่องจากหมู่อะมิโนก็มีความเป็นนิวคลีโอไฟล์เช่นกัน และยังคงพบพีเอ็นเอที่เป็นสารตั้งต้นทั้งสองสายอยู่ โดยพบ H-Cys-TT-LysNH₂ ที่อยู่ในรูปของไดเมอร์อีกด้วย ผู้วิจัยจึงได้เติมตัวรีดิวซ์พันธะไดซัลไฟด์ ได้แก่ tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride (TCEP) ลงไป โดยหมู่ฟอสฟินจะเข้าทำปฏิกิริยากับพันธะไดซัลไฟด์ทำให้พันธะเกิดการแตกออกดังกลไกที่แสดงในรูปที่ 3.20 พบว่าเกิดผลิตภัณฑ์เพิ่มมากขึ้น และสารตั้งต้นพีเอ็นเอทั้งสองสายนี้เหลือน้อยมากเมื่อเทียบกับผลิตภัณฑ์ ดังรูปที่ 3.21 และรูปที่ 3.22



รูปที่ 3.20 การเกิดปฏิกิริยารีดักชันของพันธะ disulfide ด้วย TCEP



รูปที่ 3.21 โครงสร้างที่คาดว่าจะเกิดขึ้นและค่าแมสที่พบเทียบกับค่าแมสที่คำนวณได้ของพีเอ็นเอในการเชื่อมกันของพีเอ็นเอ H-Cys-TT-LysNH₂ และพีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH₂



รูปที่ 3.22 mass spectrum ของ (1) พีเอ็นเอ H-Cys-TT-LysNH₂, (2) พีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH₂, (3) การเชื่อมกันระหว่างพีเอ็นเอ H-Cys-TT-LysNH₂ และ พีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH₂ ที่เวลาหนึ่งคืน และ (4) ที่เติม TCEP 1 mg

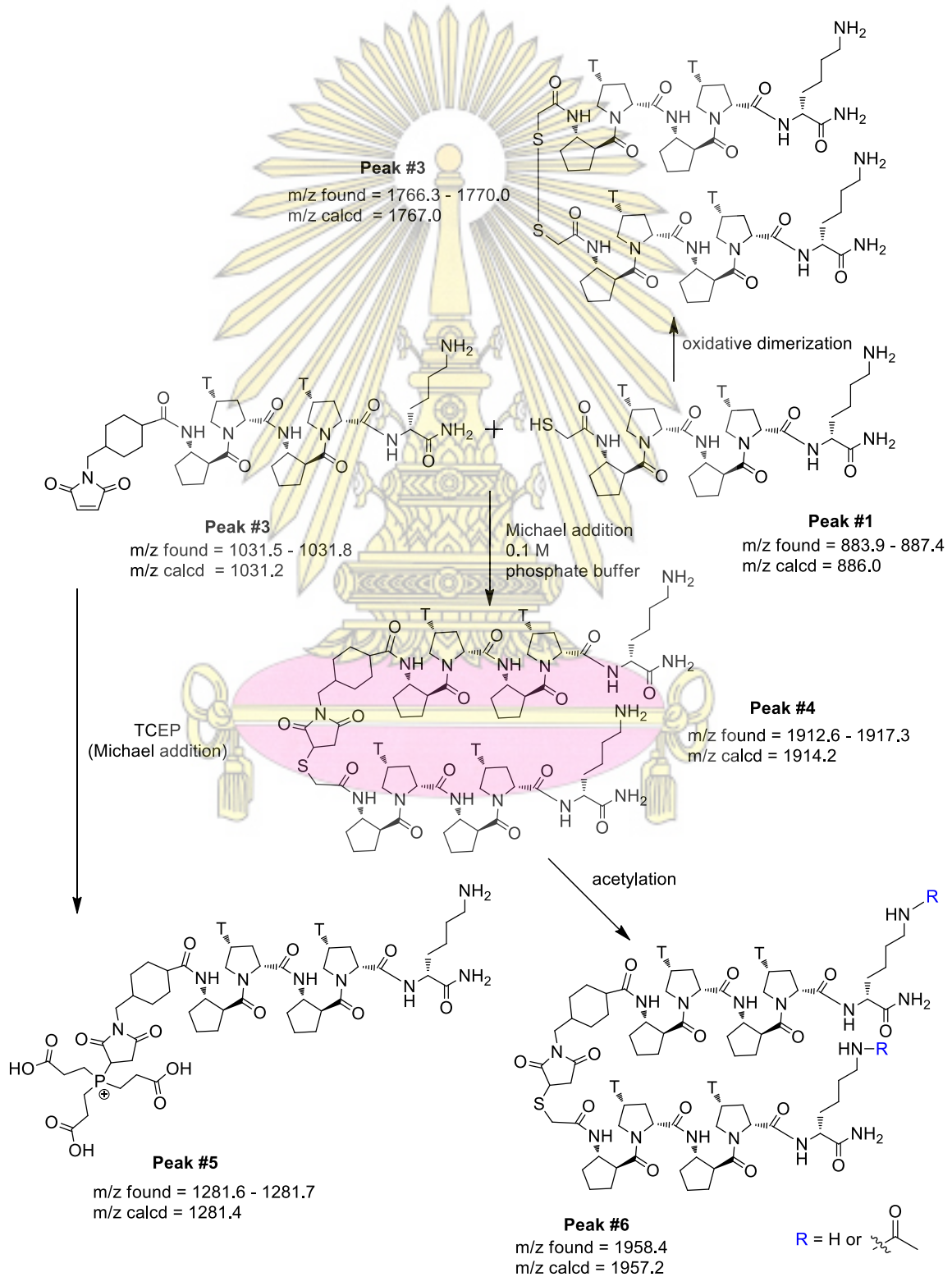
3.3.4 การเชื่อมกันของพีเอ็นเอ AcSCH₂CO-TT-LysNH₂ และพีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH₂

เนื่องจากการเติม TCEP ช่วยแก้ปัญหาเรื่องการเกิดไดเมอร์ได้ ผู้วิจัยจึงทดลองการทำปฏิกิริยาเชื่อมต่อโดยใช้ AcS-TT-LysNH₂ เป็นนิวคลีโอไฟล์แทน H-Cys-TT-LysNH₂ ด้วย โดยทดลองหลายวิธีเปรียบเทียบกับดังนี้

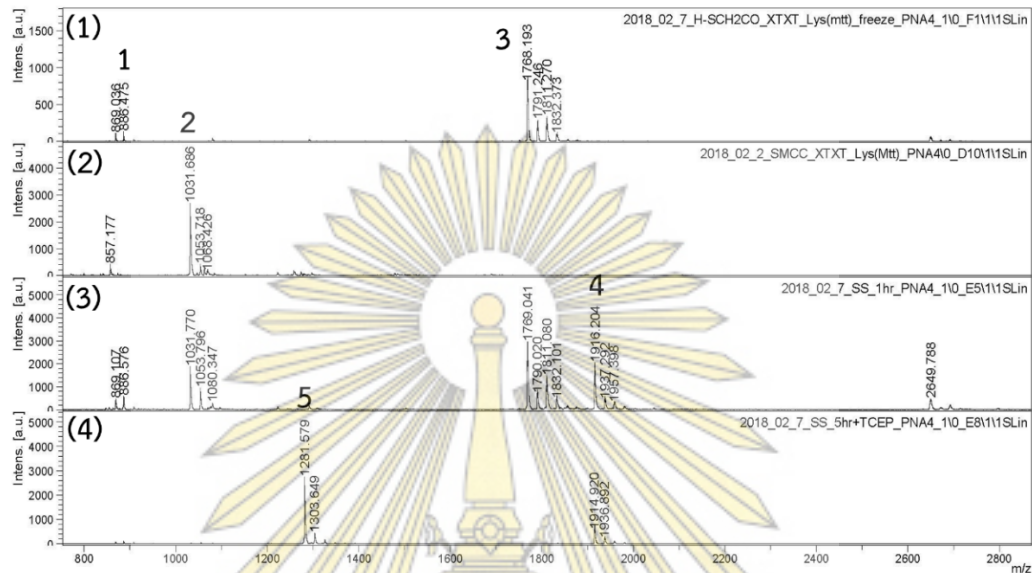
a.) วิธีที่ 1

เมื่อปลดพีเอ็นเอทั้งสองสายจากวัฏภาคของแข็งแล้ว นำพีเอ็นเอ AcSCH₂CO-TT-LysNH₂ (พีเอ็นเอ 0.25 μmol ในน้ำ 100 μL) ไปกำจัดหมู่อะเซทิลด้วยการเติม concentrated NH₃ 50 μL และ EDTA 1 mg เพื่อเพิ่มโอกาสให้พีเอ็นเอทั้งสองเส้นเข้าทำปฏิกิริยากันมากขึ้น และหยุดปฏิกิริยาด้วย acetic acid (50 μL) เพื่อให้เกิดเป็นเกลือแอมโมเนียมอะซิเตตที่สามารถระเหยให้แห้งได้ จากนั้นเติมน้ำ DI ก่อนนำเข้าเครื่อง freeze dry เพื่อให้พีเอ็นเอแห้งก่อนจะนำไปทำปฏิกิริยากับพีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH₂ ใน 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) และติดตามผลด้วยเทคนิค MALDI-TOF mass spectrometry จะเห็นได้ว่าหลังการ freeze dry HSCH₂CO-TT-LysNH₂ ส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของไดเมอร์ เมื่อให้ทำปฏิกิริยากับ พีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH₂ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าพบ m/z 1916.2 (m/z calcd = 1914.2) ซึ่งเป็นพิกของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ [พิกหมายเลข 4 ในรูปที่ 3.24 (3)] แต่สารตั้งต้นพีเอ็นเอทั้งสองสายทั้งสองสายยังทำปฏิกิริยากันไม่หมด โดยพีเอ็นเอ HSCH₂CO-TT-LysNH₂ จะอยู่ในรูปของไดเมอร์จำนวนมาก ผู้วิจัยจึงเติม TCEP ลงไปทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าไดเมอร์ถูกรีดิวส์จนหมด แต่ TCEP ส่วนที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาสามารถเข้าไปแย่งทำ

ปฏิกิริยากับพีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH₂ เหลือได้ เกิดเป็น TCEP adduct ของ MCC-TT-LysNH₂ ดังโครงสร้างที่ 5 ในรูปที่ 3.23 โดยพบ adduct นี้เป็นผลิตภัณฑ์หลัก [พิกหมายเลข 5 ในรูปที่ 3.24 (4)]



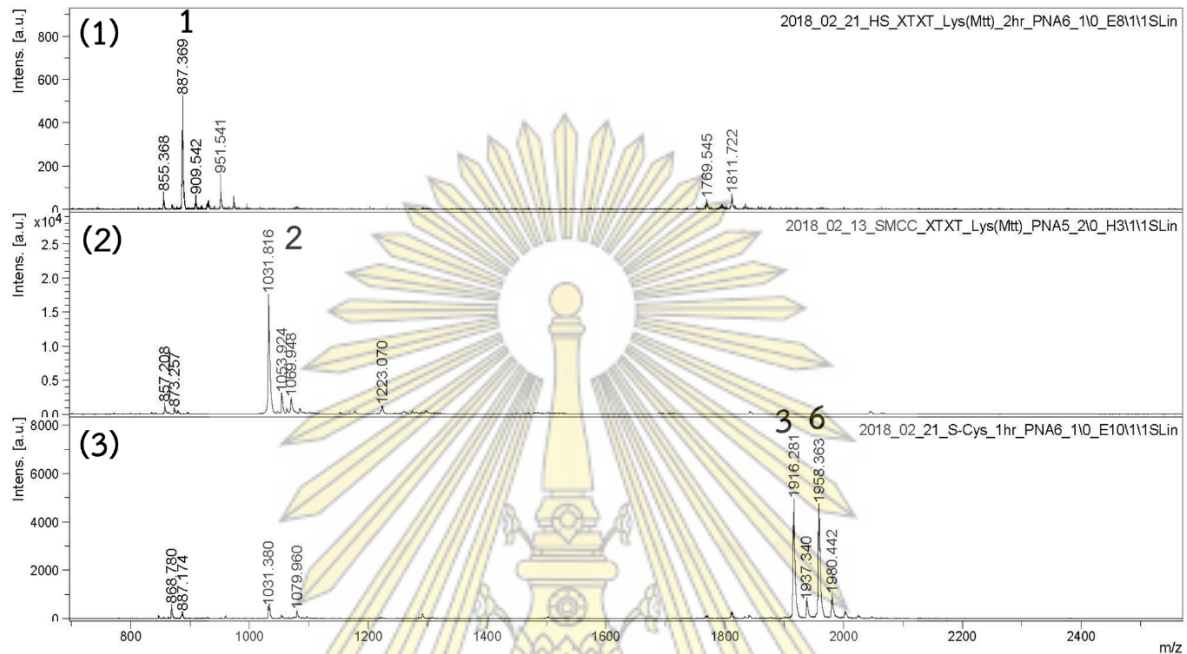
รูปที่ 3.23 โครงสร้างที่คาดว่าจะเกิดขึ้นและค่าแอมสที่พบเทียบกับค่าแอมสที่คำนวณได้ของพีเอ็นเอในการเชื่อมกันของพีเอ็นเอ AcSCH₂CO-TT-LysNH₂ และพีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH₂ ด้วยวิธีที่ 1, วิธีที่ 2, วิธีที่ 3 และวิธีที่



รูปที่ 3.24 mass spectrum ของ (1) พีเอ็นเอ HSCH₂CO-TT-LysNH₂ ที่ถูกกำจัดหมู่ Ac ด้วย conc. NH₃, (2) พีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH₂, การเชื่อมกันระหว่างพีเอ็นเอ HSCH₂CO-TT-LysNH₂ และ (3) พีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH₂ ที่เวลา 1 ชั่วโมง และ (4) ที่เติม TCEP 1 mg

b.) วิธีที่ 2

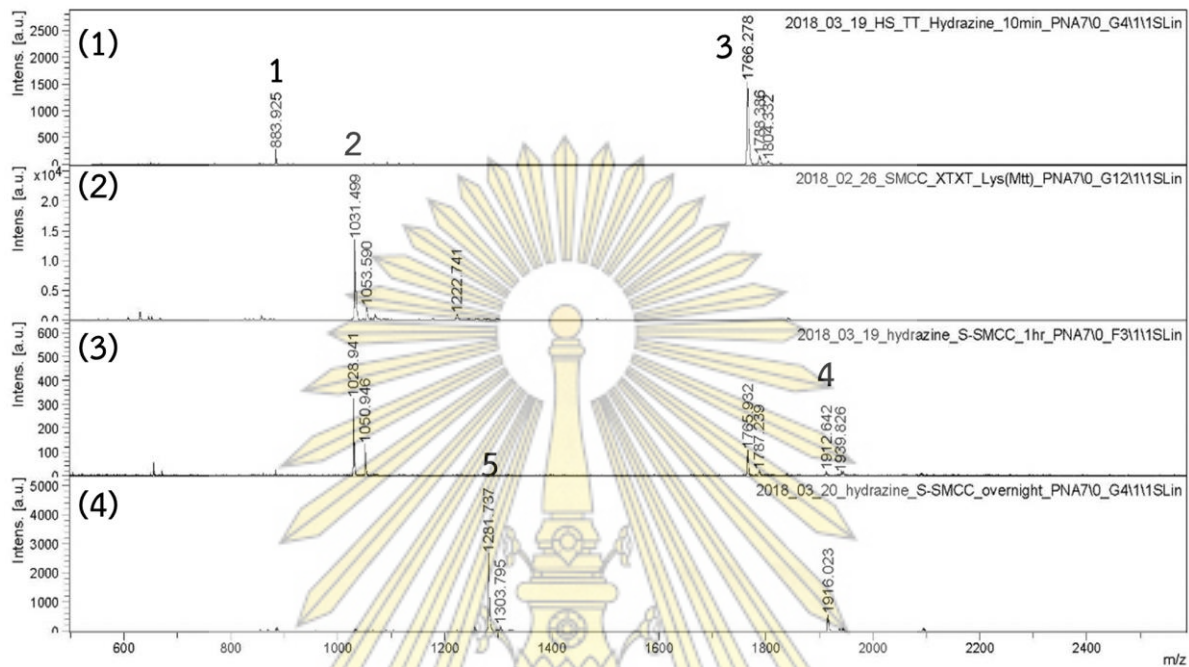
ในวิธีนี้ผู้วิจัยได้นำพีเอ็นเอ AcSCH₂CO-TT-LysNH₂ (0.25 μmol ในน้ำ 100 μL) ไปกำจัดหมู่อะเซติลออกโดยการทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสด้วย 1 M NaOH 50 μL และ EDTA 1 mg และหยุดปฏิกิริยาด้วยการทำให้สารละลายมี pH เป็นกลางด้วย acetic acid และติดตามผลด้วยเทคนิค MALDI-TOF mass spectrometry พบว่าปฏิกิริยาการกำจัดหมู่ AcS สามารถเกิดได้สมบูรณ์ โดยไม่มีพีกของไธเมอร์เกิดมากนัก เมื่อนำไปทำปฏิกิริยากับพีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH₂ ใน 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) พบว่าพบ m/z = 1916.3 (m/z calcd = 1914.2) ซึ่งเป็นพีกของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ แต่ให้ผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่น่าจะมีโครงสร้างเหมือนกับผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ แต่ยังคงมีหมู่อะเซติลอยู่ด้วย โดยสันนิษฐานว่าเกิดจากหมู่อะเซติลที่หลุดออกไปสามารถย้ายตำแหน่งมาอยู่ที่หมู่อะมิโนของ lysine โดยพบ m/z = 1958.4 (m/z calcd = 1957.2) อย่างไรก็ตาม วิธีนี้สารตั้งต้นทำปฏิกิริยาหมด และดูค่อนข้างสะอาดกว่าภาวะก่อนหน้านี้ ดังรูปที่ 3.23 และรูปที่ 3.25 (3)



รูปที่ 3.25 mass spectrum ของ (1) พีเอ็นเอ HSCH₂CO-TT-LysNH₂ ที่ถูกกำจัดหมู่ Ac ด้วย 1 M NaOH, (2) พีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH₂, (3) การเชื่อมกันระหว่างพีเอ็นเอ HSCH₂CO-TT-LysNH₂ กับพีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH₂ ที่เวลา 1 ชั่วโมง

c.) วิธีที่ 3

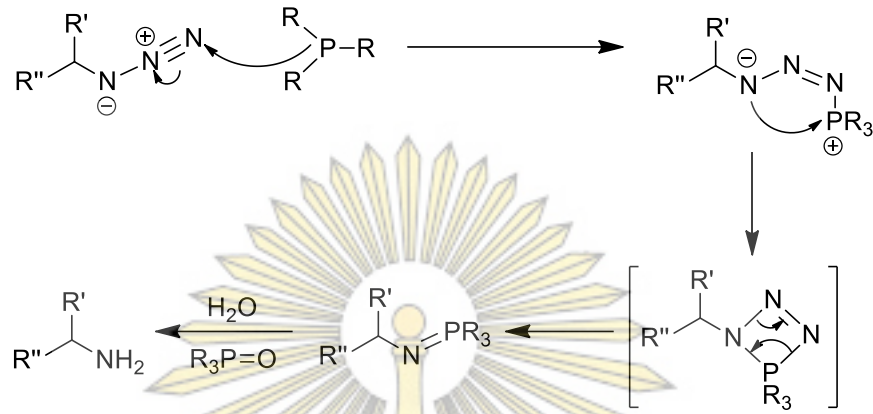
ในอีกวิธีหนึ่ง ผู้วิจัยได้หาภาวะของการกำจัดหมู่อะเซทิลใหม่ โดยการนำพีเอ็นเอ AcSCH₂CO-TT-LysNH₂ 0.25 μmol ในน้ำ 100 μL ไปทำปฏิกิริยากับ 0.5 M hydrazine 10 μL และหยุดปฏิกิริยาด้วย acetone พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที พีเอ็นเอ AcSCH₂CO-TT-LysNH₂ ถูกกำจัดหมู่อะเซทิลจนหมด แต่พบว่าเกิดเป็นไดเมอร์จำนวนมาก เมื่อนำไปทำปฏิกิริยากับพีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH₂ 0.25 μmol และติดตามผลด้วยเทคนิค MALDI-TOF mass spectrometry ผลปรากฏว่าพบพิกแมสของผลิตภัณฑ์ที่ m/z = 1912.6 (m/z calcd = 1914.2) น้อยมาก ดังรูปที่ 3.23 และรูปที่ 3.26 (3) ผู้วิจัยจึงเติม TCEP ลงไปทำปฏิกิริยาทำให้ไดเมอร์ถูกรีดิวส์ พบว่าเกิดผลิตภัณฑ์มากขึ้นเล็กน้อย และเกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียงจาก TCEP ที่ใส่เข้าไปแย่งจับกับพีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH₂ คล้ายกับที่พบในวิธีที่ 1 ดังรูปที่ 3.26 (4)



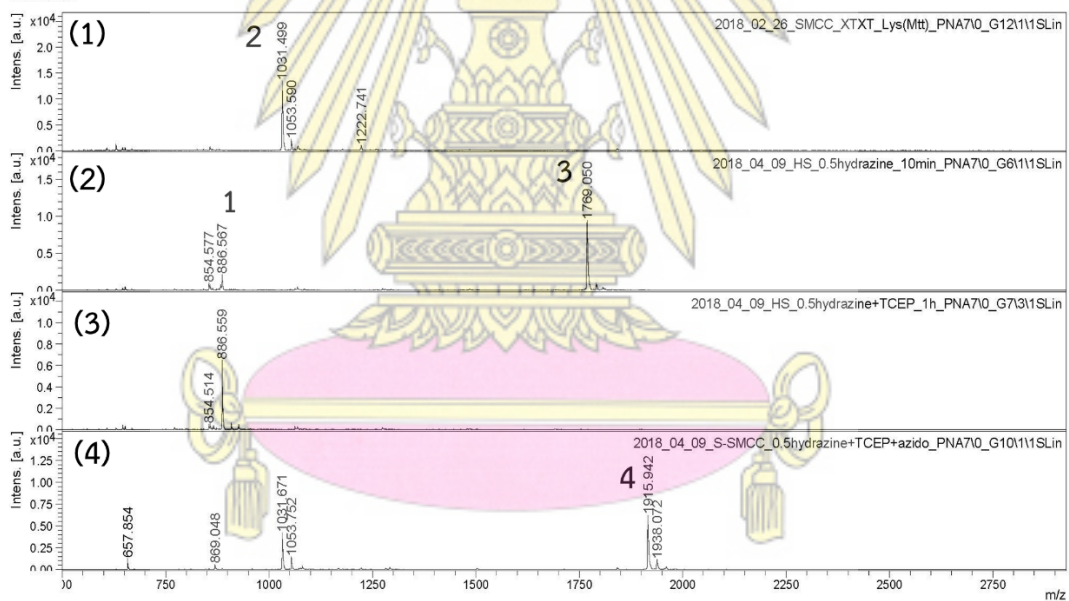
รูปที่ 3.26 mass spectrum ของ (1) พีเอ็นเอ HSCH₂CO-TT-LysNH₂ ที่ถูกกำจัดหมู่ Ac ด้วย 0.5 M hydrazine, (2) พีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH₂, การเชื่อมกันระหว่างพีเอ็นเอ HSCH₂CO-TT-LysNH₂ และ (3) พีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH₂ ที่เวลา 1 ชั่วโมง และ (4) ที่เติม TCEP 1 mg

d.) วิธีที่ 4

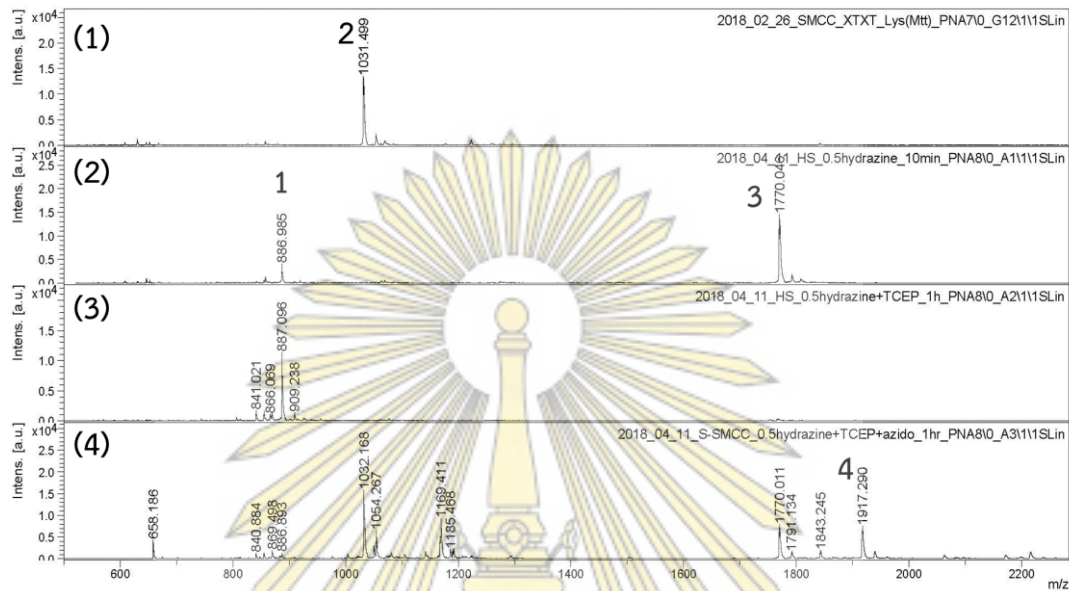
จากปัญหาการทดลองก่อนหน้านี้ที่พบว่าสามารถกำจัดหมู่อะเซทิลจาก AcSCH₂CO-TT-LysNH₂ ได้โดยใช้ NH₃ หรือ N₂H₄ โดยจำเป็นต้องใส่ TCEP เพื่อให้ไดเมอร์ของ HSCH₂CO-TT-LysNH₂ แตกออก แต่กลับพบปฏิกิริยาข้างเคียงจาก TCEP เข้าทำปฏิกิริยากับพีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH₂ ด้วย ผู้วิจัยจึงหาวิธีในการกำจัด TCEP ที่มากเกินไปก่อน โดยการนำไปทำปฏิกิริยากับ 4-azidobenzoic acid ตามวิธีของ Henkel และคณะ³⁹ เพื่อกำจัด TCEP ที่เกินก่อนนำไปทำปฏิกิริยากับพีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH₂ ดังรูปที่ 3.27 โดย 4-azidobenzoic acid จะทำปฏิกิริยา Staudinger ที่ทำให้สามารถกำจัด TCEP ได้ เมื่อใช้พีเอ็นเอ AcSH₂CCO-TT-LysNH₂ ทำปฏิกิริยากับพีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH₂ ที่สเกล 0.025 μmol เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และติดตามผลด้วยเทคนิค MALDI-TOF mass spectrometry พบว่าไม่มีไดเมอร์เกิดขึ้น และพีเอ็นเอ HSCH₂CO-TT-LysNH₂ ถูกทำปฏิกิริยาจนหมด เกิดเป็นพิกแมสของผลิตภัณฑ์ที่ m/z = 1915.9 (m/z calcd = 1914.2) แต่ยังมีพิกของ MCC-TT-LysNH₂ เหลือ ซึ่งอาจเกิดจากการใส่เกิน ดังรูปที่ 3.23 และรูปที่ 3.28 (4) แต่เมื่อเพิ่มสเกลพีเอ็นเอทั้งสองสายเป็น 0.25 μmol เท่ากัน พบว่าปฏิกิริยาเกิดได้ไม่ดี โดยยังมีไดเมอร์ของ HSCH₂CO-TT-LysNH₂ เหลือค่อนข้างมาก อีกทั้งยังเกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียงจำนวนมาก ดังรูปที่ 3.23 และรูปที่ 3.29 จึงยังจำเป็นต้องศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในสเกลใหญ่ รวมทั้งพีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซับซ้อนมากขึ้นต่อไป



รูปที่ 3.27 แผนภาพการกำจัด TCEP ด้วยหมู่เอไซด์

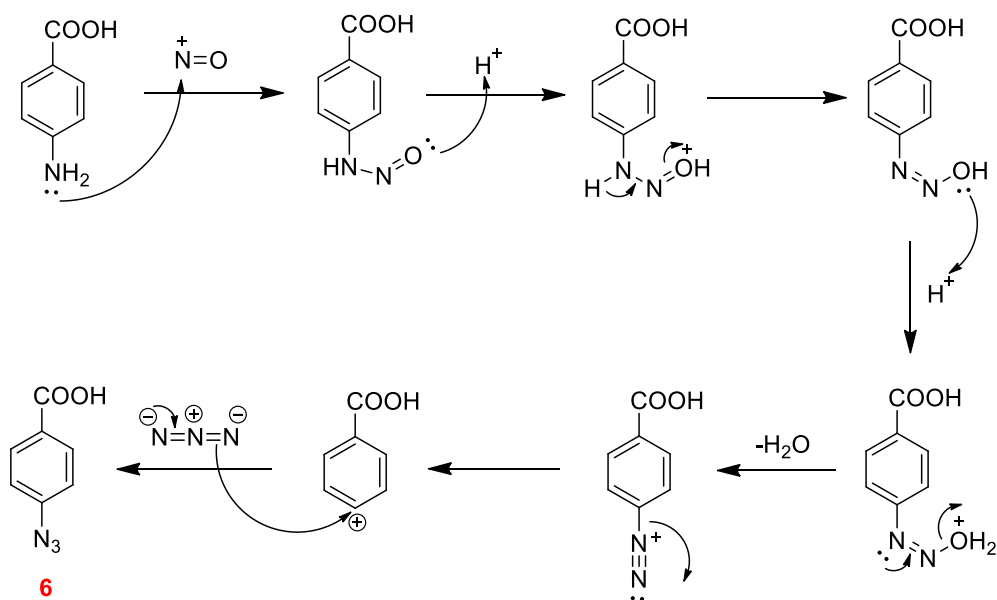


รูปที่ 3.28 mass spectrum ของ (1) พีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH₂ 0.025 μ mol, (2) พีเอ็นเอ HSCH₂CO-TT-LysNH₂ 0.0125 μ mol ที่ถูกกำจัดหมู่ Ac ด้วย 0.5 M hydrazine, (3) HSCH₂CO-TT-LysNH₂ ที่ถูกเติมด้วย TCEP และ (4) การเชื่อมกันระหว่างพีเอ็นเอ HSCH₂CO-TT-LysNH₂ และพีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH₂ ที่เวลา 1 ชั่วโมง หลังจากเติม 4-azidobenzoic acid

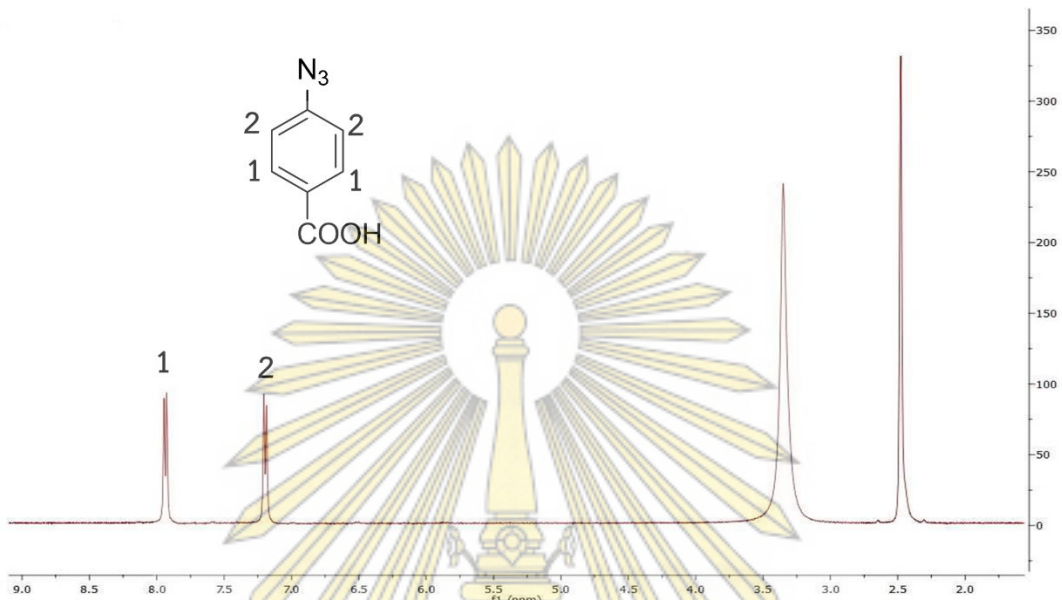


รูปที่ 3.29 mass spectrum ของ (1) พีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH₂ 0.25 μ mol, (2) พีเอ็นเอ HSCH₂CO-TT-LysNH₂ 0.25 μ mol ที่ถูกกำจัดหมู่ Ac ด้วย 0.5 M hydrazine, (3) HSCH₂CO-TT-LysNH₂ ที่ถูกเติมด้วย TCEP และการเชื่อมกันระหว่างพีเอ็นเอ HSCH₂CO-TT-LysNH₂ และ (4) พีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH₂ ที่เวลา 1 ชั่วโมง หลังจากเติม 4-azidobenzoic acid

หมายเหตุ: การสังเคราะห์สาร 4-azidobenzoic acid **6** จะอาศัยปฏิกิริยาไดอะโซไทโอเซชันของ 4-อะมิโนเบนโซอิกแอซิด ตามด้วยปฏิกิริยาแทนที่ด้วยไฮไดรเอซิดดังรูปที่ 3.30 ตามวิธีการของ Addy และคณะ⁴⁰ ซึ่งจะได้สาร **6** เป็นของแข็งสีขาว 47.2% yield ข้อมูล ¹H NMR สเปกตรัม ดังรูปที่ 3.31 และ IR spectrum ดังรูปที่ 3.32



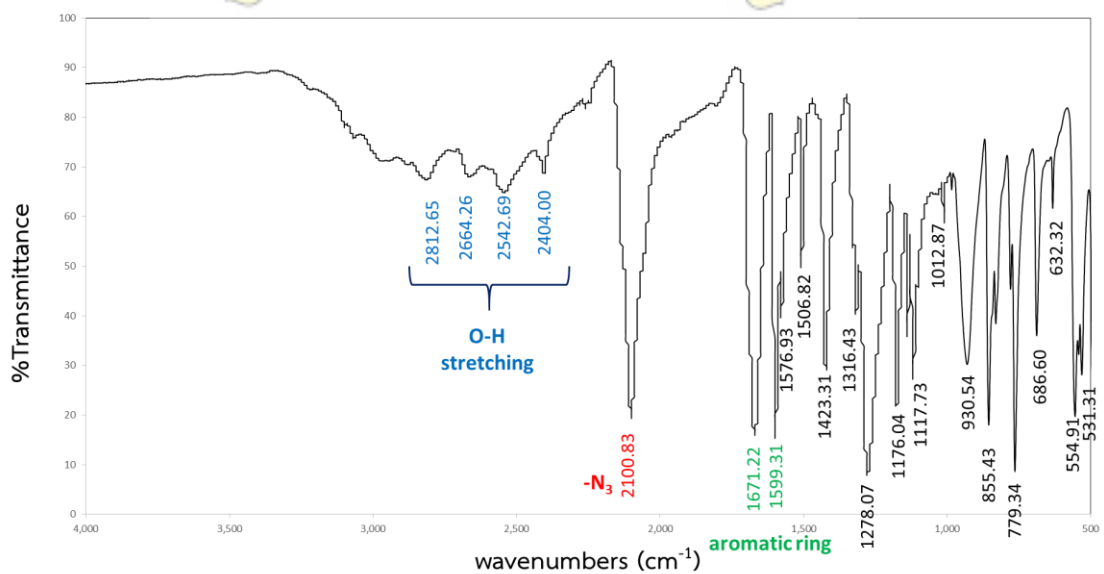
รูปที่ 3.30 แผนภาพการสังเคราะห์ของ 4-azidobenzoic acid **6**



รูปที่ 3.31 ^1H NMR (400 MHz, DMSO) ของ 4-azidobenzoic acid **6**

สัญญาณ δ 7.94 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H) เป็นโปรตอนบนวงอะโรมาติกตำแหน่ง ortho ของหมู่คาร์บอกซิล ซึ่งจะ deshield มากที่สุดและขึ้นเป็น doublet (ตำแหน่งที่ 1)

สัญญาณ δ 7.19 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H) เป็นโปรตอนบนวงอะโรมาติกตำแหน่ง meta ของหมู่คาร์บอกซิล ซึ่งจะ deshield รองลงมาและขึ้นเป็น doublet (ตำแหน่งที่ 2) และสามารถวิเคราะห์ IR spectrum ของสาร **6** ได้ดังนี้



รูปที่ 3.32 IR spectrum ของ 4-azidobenzoic acid **6**

ความยาวคลื่นที่ 2101 cm^{-1} เป็นสัญญาณของ N=N stretching ของหมู่ฟังก์ชันไนไตรด์

ความยาวคลื่นที่ 2813 cm^{-1} , 2543 cm^{-1} และ 2404 cm^{-1} เป็นสัญญาณของ O-H stretching ของหมู่ฟังก์ชัน carboxylic acid

ความยาวคลื่นที่ 1672 cm^{-1} C=O stretching ของหมู่ฟังก์ชัน carboxylic acid

ความยาวคลื่นที่ 1599 cm^{-1} เป็นสัญญาณของ C=C stretching ของวงอะโรมาติก



บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ศึกษาเพื่อหาวิธีการที่เหมาะสมในการเชื่อมพีเอ็นเอชนิด acpcPNA สายสั้นๆ สองสายให้มีลำดับเบสยาวขึ้น โดยใช้ปฏิกิริยา copper catalyzed azide-alkyne cycloaddition (click reaction) และปฏิกิริยาเชื่อมต่อโดยอาศัยหมู่ไทออล ผ่านปฏิกิริยา thiol-exchange ของ cysteine ที่มีหมู่ปกป้อง 3-nitro-2-pyridylsulfenyl (Npys) หรือปฏิกิริยา michael addition ของหมู่ไทออลเข้ากับมาลอิไมด์ โดยงานวิจัยได้ศึกษาการดัดแปรพีเอ็นเอตัวอย่างที่มีลำดับเบสเป็น H-TT-Lys-NH₂ บนวัฏภาคของแข็งด้วยหมู่ฟังก์ชันที่ว่องไวที่เหมาะสมกับการเชื่อมต่อ ตลอดจนการทดลองหาภาวะในการเชื่อมต่อ และติดตามผลด้วยเทคนิค MALDI-TOF mass spectrometry

ในงานวิจัยส่วนที่ใช้ปฏิกิริยา click reaction สามารถสังเคราะห์ตัวเชื่อมที่มีหมู่เอไซด์ (*N*-fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*cis*-4-(azido)-*D*-proline pentafluorophenyl ester **4** และต่อเข้ากับปลายด้านอะมิโนของพีเอ็นเอได้เป็นผลสำเร็จ แต่ในส่วนการดัดแปรพีเอ็นเอปลายด้านคาร์บอกซิลด้วย propionic acid ด้วยสารละลายผสมระหว่าง HBTU, HOBT และ DIEA (วิธีที่ 1) หรือสารละลายผสมระหว่าง PyBOP, PPTS และ NMM (วิธีที่ 2) พบว่าเฉพาะวิธีที่ 1 ที่ให้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ อย่างไรก็ตาม ทั้งสองวิธีปฏิกิริยาเกิดได้ไม่สมบูรณ์และเกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่เกิดจาก propionic acid เข้าทำปฏิกิริยาสองตัว จึงไม่สามารถนำพีเอ็นเอที่ได้มาเชื่อมต่อกันในขั้นสุดท้าย

อีกวิธีหนึ่งที่ได้ทดลองนำมาใช้เชื่อมต่อกับพีเอ็นเอคือการทำปฏิกิริยา thiol-exchange ของ cysteine ที่มีหมู่ปกป้อง 3-nitro-2-pyridylsulfenyl (Npys) กับหมู่ไทออลอิสระ พบว่า การดัดแปรพีเอ็นเอปลายด้านอะมิโนด้วย *S*-acetyl-thioglycolic acid pentafluorophenyl ester สามารถเกิดปฏิกิริยาได้อย่างสมบูรณ์ และการดัดแปรพีเอ็นเอปลายด้านอะมิโนด้วย *N*-(9-fluorenylmethoxy-carbonyl)-*S*-(3-nitro-2-pyridylthio)-*L*-cysteine [Fmoc-Cys(Npys)-OH] ด้วยสารละลายผสมระหว่าง PyBOP, PPTS และ NMM (วิธีที่ 1) และสารละลายผสมระหว่าง DCC และ CH₂Cl₂ (วิธีที่ 2) พบว่าวิธีที่ 2 สามารถเกิดปฏิกิริยาได้อย่างสมบูรณ์กว่า แต่พบปัญหาหมู่ปกป้อง Npys หลุดออกเป็นบางส่วน และสารตั้งต้นฝั่งไทออล คือ AcS-TT-LysNH₂ ไม่สามารถกำจัดหมู่ Ac ได้สมบูรณ์ด้วย 20% piperidine ใน DMF และบางส่วนเกิดเป็น dimer ทำให้เมื่อนำมาเชื่อมกันพบว่าถึงแม้ว่าจะพบพิกที่มีแมสตรงกับผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ แต่ปฏิกิริยายังเกิดได้ไม่สมบูรณ์ และเกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียงค่อนข้างมาก ผู้วิจัยจึงได้ทดลองอีกวิธีหนึ่งคือการทำปฏิกิริยา michael addition ระหว่างพีเอ็นเอที่มีหมู่ไทออลจาก *N*-(9-fluorenylmethoxy-carbonyl)-*S*-trityl-*L*-cysteine กับพีเอ็นเอที่ติดหมู่มาลอิไมด์ (maleimide) จาก sulfosuccinimidyl 4-(*N*-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxamide (SMCC) พบว่าสามารถดัดแปรพีเอ็นเอทั้งสองเส้นด้วยตัวเชื่อมทั้งสองได้อย่างสมบูรณ์ และกำจัดหมู่ Trt จากหมู่ไทออลได้อย่างสมบูรณ์เมื่อปลดออกจากวัฏภาคของแข็ง และเมื่อนำไปเชื่อมพีเอ็นเอสองสายพบว่าเกิดผลิตภัณฑ์ที่ต้องการได้ดีกว่าวิธีการอื่นที่ผ่านมา แต่สารตั้งต้น HS-TT-LysNH₂ เกิดอยู่ในรูป dimer ค่อนข้างมาก ผู้วิจัยจึงได้เติม tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride (TCEP) เพื่อทำ

หน้าที่รีดิวซ์ dimer กลับมาเป็นไทออล พบว่า ผลิตภัณฑ์สามารถเกิดได้มากขึ้น แต่ยังคงผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่ได้จากปฏิกิริยาไมเคิลแอดดิชันของ TCEP เข้าไปที่หมู่มาลีอิมิด

นอกจากนี้ยังได้ทดลองเชื่อมต่อพีเอ็นเอเข้าด้วยกันโดยผ่านการทำปฏิกิริยาไมเคิลแอดดิชัน ระหว่างพีเอ็นเอที่มีหมู่ไทออลและหมู่มาลีอิมิด (maleimide) โดยผ่านการใช้ตัวเชื่อม S-acetyl-thioglycolic acid pentafluorophenyl ester แทน และเปรียบเทียบวิธีการกำจัดหมู่ Ac ทั้งหมด 4 วิธี คือ วิธีที่ 1 ใช้สารละลายผสมระหว่าง concentrated NH_3 และ EDTA, วิธีที่ 2 ใช้สารละลายผสมระหว่าง 1 M NaOH และ EDTA, วิธีที่ 3 ใช้สารละลาย 0.5 M hydrazine ก่อนจะนำไปทำปฏิกิริยากับพีเอ็นเอ MCC-TT-LysNH₂ และเติม TCEP พบว่าวิธีที่ 2 ให้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการค่อนข้างมาก แต่เกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่เกิดจากหมู่ Ac ที่หลุดออกจากหมู่ไทออลเข้าทำปฏิกิริยากับ lysine และวิธีที่ 1 และ 3 ปฏิกิริยาเกิดได้ค่อนข้างดี แต่ให้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นไทออลที่ต้องการน้อยมาก โดยส่วนใหญ่จะเป็น dimer ทำให้จำเป็นต้องเติม TCEP ลงไปด้วยในการทำปฏิกิริยา ซึ่งพบว่า TCEP สามารถแย่งจับกับ MCC-TT-LysNH₂ ส่งผลให้เกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียงมาก ต่อมาผู้วิจัยจึงทดสอบวิธีที่ 4 คือการใช้ 0.5 M hydrazine ในการกำจัดหมู่ Ac ซึ่งจะได้ dimer และนำไปทำต่อกับ TCEP จากนั้นกำจัด TCEP ที่เกินออกด้วย 4-azidobenzoic acid ก่อนจะนำไปเชื่อมกับ MCC-TT-LysNH₂ พบว่าปฏิกิริยาเกิดได้ค่อนข้างสมบูรณ์ และไม่มีปฏิกิริยาข้างเคียงเมื่อทำในสเกลเล็ก แต่เมื่อเพิ่มสเกลของการทำปฏิกิริยาพบว่าปฏิกิริยาเกิดได้ไม่สมบูรณ์ อย่างไรก็ตาม วิธีการเชื่อมพีเอ็นเอด้วยการทำปฏิกิริยาไมเคิลแอดดิชันของไทออลกับหมู่มาลีอิมิดเป็นวิธีที่ให้ผลดีที่สุดเมื่อเทียบกับวิธีอื่น และควรจะต้องมีการทำซ้ำและ/หรือปรับปรุงภาวะต่อไปเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาได้ดีขึ้นในระดับสเกลใหญ่ และกับพีเอ็นเอที่มีความยาวและมีลำดับเบสที่ซับซ้อนขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- 1 Davies, A. M.; Gandara, D. R.; Lara, P. N.; Mack, P. C.; Lau, D. H. M.; Gumerlock, P. H. Antisense Oligonucleotides in the Treatment of Non-Small-Cell Lung Cancer. *Clin. Lung Cancer*. **2003**, *4*, 68-73.
- 2 Li, H.; Rothberg, L. J., DNA Sequence Detection Using Selective Fluorescence Quenching of Tagged Oligonucleotide Probes by Gold Nanoparticles. *Anal. Chem*. **2004**, *76*, 5414-5417.
- 3 Nielsen, P. E., M. An Introduction to Peptide Nucleic Acid. *Curr. Issues Mol. Biol*. **1999**, *1*, 89-104.
- 4 Vilaivan, T. PyrrolidinyL PNA with α/β -Dipeptide Backbone: From Development to Applications. *Acc. Chem. Res*. **2015**, *48*, 1645-1656.
- 5 Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc*. **1963**, *85*, 2149-2154.
- 6 Nielsen, P. E.; Egholm, M.; Berg, R. H.; Buchardt, O. Sequence-Selective Recognition of DNA by Strand Displacement with a Thymine-Substituted Polyamide. *Science* **1991**, *254*, 1497.
- 7 Demidov, V. V.; Potaman, V. N.; Frank-Kamenetskii, M. D.; Egholm, M.; Buchard, O.; Sönnichsen, S. H.; Nielsen, P. E. Stability of Peptide Nucleic Acids in Human Serum and Cellular Extracts. *Biochem. Pharmacol*. **1994**, *48*, 1310-1313.
- 8 Kaihatsu, K.; Huffman, K. E.; Corey, D. R. Intracellular Uptake and Inhibition of Gene Expression by PNAs and PNA-Peptide Conjugates. *Biochemistry*. **2004**, *43*, 14340-14347.
- 9 Zhao, C.; Hoppe, T.; Setty, M. K. H. G.; Murray, D.; Chun, T.-W.; Hewlett, I.; Appella, D. H. Quantification of Plasma Hiv RNA Using Chemically-Engineered Peptide Nucleic Acids. *Nat. Commun*. **2014**, *5*, 5079-5079.
- 10 Dragulescu-Andrasi, A.; Rapireddy, S.; Frezza, B. M.; Gayathri, C.; Gil, R. R.; Ly, D. H. A Simple γ -Backbone Modification Preorganizes Peptide Nucleic Acid into a Helical Structure. *J. Am. Chem. Soc*. **2006**, *128*, 10258-10267.
- 11 Vilaivan, T.; Suparpprom, C.; Harnyuttanakorn, P.; Lowe, G. Synthesis and Properties of Novel PyrrolidinyL PNA Carrying β -Amino Acid Spacers. *Tetrahedron Lett*. **2001**, *42*, 5533-5536.

-
- 12 Suparpprom, C.; Srisuwannaket, C.; Sangvanich, P.; Vilaivan, T. Synthesis and Oligodeoxynucleotide Binding Properties of Pyrrolidinyl Peptide Nucleic Acids Bearing Prolyl-2-Aminocyclopentanecarboxylic Acid (ACPC) Backbones. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 2833-2837.
- 13 Vilaivan, T.; Srisuwannaket, C. Hybridization of Pyrrolidinyl Peptide Nucleic Acids and DNA: Selectivity, Base-Pairing Specificity, and Direction of Binding. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1897-1900.
- 14 Yotapan, N.; Nim-anussornkul, D.; Vilaivan, T. Pyrrolidinyl Peptide Nucleic Acid Terminally Labeled with Fluorophore and End-Stacking Quencher as a Probe for Highly Specific DNA Sequence Discrimination. *Tetrahedron.* **2016**, *72*, 7992-7999.
- 15 Kangkamano, T.; Numnuam, A.; Limbut, W.; Kanatharana, P.; Vilaivan, T.; Thavarungkul, P. Pyrrolidinyl PNA Polypyrrole/Silver Nanofoam Electrode as a Novel Label-Free Electrochemical Mirna-21 Biosensor. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *102*, 217-225.
- 16 Farkaš, P.; Bystrický, S. Chemical Conjugation of Biomacromolecules: a Mini-Review. *Chem. Pap.* **2010**, *64*, 683-695.
- 17 Stenzel, M. H. Bioconjugation Using Thiols: Old Chemistry Rediscovered to Connect Polymers with Nature's Building Blocks. *ACS Macro Lett.* **2013**, *2*, 14-18.
- 18 Meldal, M.; Tornøe, C. W. Cu-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2952-3015.
- 19 Hein, J. E.; Tripp, J. C.; Krasnova, L. B.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. Copper(I)-Catalyzed Cycloaddition of Organic Azides and 1-Iodoalkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 8018-8021.
- 20 Liang, L.; Astruc, D. The Copper(I)-Catalyzed Alkyne-Azide Cycloaddition (CuAAC) "Click" Reaction and Its Applications. an Overview. **2011**, *255*, 2933-2945.
- 21 Boutureira, O.; Bernardes, G. J. L. Advances in Chemical Protein Modification. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 2174-2195.
- 22 Vilaivan, T.; Suparpprom, C.; Harnyuttanakorn, P.; Lowe, G. Synthesis and Properties of Novel Pyrrolodinyl PNA Carrying β -Amino Acid Spacers. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 5533-5536.
- 23 Gogoi, K.; Mane, M. V.; Kunte, S. S.; Kumar, V. A. A Versatile Method for the Preparation of Conjugates of Peptides with DNA/PNA/Analog by Employing Chemo-Selective Click Reaction in Water. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 139-139.

-
- 24 Kočalka, P.; El-Sagheer Afaf, H.; Brown, T. Rapid and Efficient DNA Strand Cross-Linking by Click Chemistry. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1280-1285.
- 25 Peng, X.; Li, H.; Seidman, M. A Template-Mediated Click-Click Reaction: PNA-DNA, PNA-PNA (or Peptide) Ligation, and Single Nucleotide Discrimination. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *22*, 4194-4197.
- 26 Qiu, J.; El-Sagheer, A. H.; Brown, T. Solid Phase Click Ligation for the Synthesis of Very Long Oligonucleotides. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 6959-6961.
- 27 Burns, J. A.; Butler, J. C.; Moran, J.; Whitesides, G. M. Selective Reduction of Disulfides by Tris(2-Carboxyethyl)Phosphine. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2648-2650.
- 28 Rogers, F. A.; Vasquez, K. M.; Egholm, M.; Glazer, P. M. Site-Directed Recombination via Bifunctional PNA-DNA Conjugates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 16695-16700.
- 29 Zeng, Z.; Han, S.; Hong, W.; Lang, Y.; Li, F.; Liu, Y.; Li, Z.; Wu, Y.; Li, W.; Zhang, X.; Cao, Z. A Tat-Conjugated Peptide Nucleic Acid Tat-PNA-DR Inhibits Hepatitis B Virus Replication *In Vitro* and *In Vivo* by Targeting LTR Direct Repeats of HBV RNA. *Mol. Ther.--Nucleic Acids* **2016**, *5*, 295-308.
- 30 Drijfhout, J. W.; Perdijk, E. W.; Weijer, W. J.; Bloemhoff, W. Controlled Peptide-Protein Conjugation by Means of 3-Nitro-2-Pyridinesulfonyl Protection-Activation. *Int. J. Pept. Protein Res.* **2009**, *32*, 161-166.
- 31 Tripathi, S.; Chaubey, B.; Ganguly, S.; Harris, D.; Casale, R. A.; Pandey, V. N. Anti-Hiv-1 Activity of Anti-Tar Polyamide Nucleic Acid Conjugated with Various Membrane Transducing Peptides. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 4345-4356.
- 32 Mansawat, W.; Boonlua, C.; Siriwong, K.; Vilaivan, T. Clicked Polycyclic Aromatic Hydrocarbon as a Hybridization-Responsive Fluorescent Artificial Nucleobase in Pyrrolidinyl Peptide Nucleic Acids. *Tetrahedron.* **2012**, *68*, 3988-3995.
- 33 Klein, L. L.; Li, L.; Chen, H.-J.; Curty, C. B.; DeGoey, D. A.; Grampovnik, D. J.; Leone, C. L.; Thomas, S. A.; Yeung, C. M.; Funk, K. W.; Kishore, V.; Lundell, E. O.; Wodka, D.; Meulbroek, J. A.; Alder, J. D.; Nilius, A. M.; Lartey, P. A.; Plattner, J. J. Total Synthesis and Antifungal Evaluation of Cyclic Aminohexapeptides. *Biorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 1677-1696.
- 34 Jarikote, D. V.; Köhler, O.; Socher, E.; Seitz, O. Divergent and Linear Solid-Phase Synthesis of PNA Containing Thiazole Orange as Artificial Base. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 3187-3195.

-
- 35 Stenzel, M. H. Bioconjugation Using Thiols: Old Chemistry Rediscovered to Connect Polymers with Nature's Building Blocks. *ACS Macro Lett.* **2013**, *2*, 14-18.
- 36 Sheehan, J. C.; Hess, G. P. A New Method of Forming Peptide Bonds. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 1067-1068.
- 37 Rogers, F. A.; Vasquez, K. M.; Egholm, M.; Glazer, P. M. Site-Directed Recombination via Bifunctional PNA-DNA Conjugates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 16695.
- 38 Fang, G. M.; Seitz, O. Synthesis of Bipartite Tetracysteine PNA Probes for DNA In Situ Fluorescent Labeling. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **2017**, *71*, 4.78.1-4.78.14.
- 39 Henkel, M.; Röckendorf, N.; Frey, A. Selective and Efficient Cysteine Conjugation by Maleimides in the Presence of Phosphine Reductants. *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27*, 2260-2265.
- 40 Addy, P. S.; Erickson, S. B.; Italia, J. S.; Chatterjee, A. A Chemoselective Rapid Azo-Coupling Reaction (CRACR) for Unclickable Bioconjugation. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 11670-11673.



ประวัติผู้วิจัย

นางสาวโสมลวณีย์ ทิพย์ขุนทอง เกิดเมื่อวันที่ 26 เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2538 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนนวมินทราชินูทิศ บดินทรเดชา จังหวัดกรุงเทพมหานคร เมื่อปี 2556 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2557 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ บ้านเลขที่ 25 แขวงลาดพร้าว เขต ลาดพร้าว จังหวัด กรุงเทพมหานคร รหัสไปรษณีย์ 10230 อีเมล somlawan_nn@hotmail.com

