

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

開發能增進核酸三螺旋結構穩定性之仿核甘酸

Development of Nucleotide Analogs to Increase the Stability of a Nucleic Acid Triple-Helical Structure

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫
計畫編號：NSC 89 - 2113 - M - 034 - 006 -
執行期間：89年08月01日至90年07月31日

計畫主持人：靳宗玫
共同主持人：

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：中國文化大學化學系

中 華 民 國 90 年 10 月 15 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫名稱：開發能增進核酸三螺旋結構穩定性之仿核苷酸

Development of Nucleotide Analogs to Increase the Stability of a Nucleic Acid Triple-Helical Structure

計畫編號：NSC 89-2113-M-034-006

執行期限：89 年 8 月 1 日至 90 年 7 月 31 日

主持人：靳宗玫 中國文化大學化學系暨應用化學所

計畫參與人員：洪福松、廖文慧、黃鴻文、楊國棟 中國文化大學應用化學所

一、中文摘要

仿核苷酸 N^4 -(6-Aminopyridin-2-yl)-2'-deoxycytidine (P_C) 可與 CG 鹼對作用，幫助核酸三螺旋結構的生成。在本期計畫中，藉由紫外熔點實驗、Ethidium 螢光增色效應和卡計實驗，測量 P_C 在"迴紋針式"和"直鏈式"核酸三螺旋結構中所表現出的物理性質。實驗結果顯示：若將一組鹼基三聚體 P_C CG 置於核酸三螺旋結構的內部，"直鏈式"三螺旋結構的穩定度較不受溶液環境酸鹼值的影響，而"迴紋針式"三螺旋結構在溶液環境由 pH 6.0 升高到 pH 7.0 時，其紫外熔點溫度會略為上升。在中性溶液環境中，單一 P_C 取代位於結構內部比位於末端更能穩定"迴紋針式"三螺旋結構；相反地，在酸性環境中，最穩定的"迴紋針式"結構卻是將 P_C 置於三螺旋體的末端而非內部。此外，若 P_C 以連續 (P_CP_CP_C) 或交替 (P_CT_CP_CT_CP_C) 的方式出現在序列中，寡核酸鏈即無法自我摺疊成三螺旋結構。由此推測數個 P_C 同時鄰近出現在 Hoogsteen 鏈上，可能會導致三螺旋結構扭曲，因此造成三螺旋體的不穩定。

關鍵詞：仿核苷酸 N^4 -(6-Aminopyridin-2-yl)-2'-deoxycytidine (P_C)、CG 鹼對、寡核酸鏈、"迴紋針式"和"直鏈式"核酸三螺旋結構

Abstract

A cytidinyl derivative, N^4 -(6-amino-pyridin-2-yl)-2'-deoxycytidine (P_C), could interact with a CG base pair to support the

triple-helix (triplex) formation of oligodeoxyribonucleotides. Characteristics of P_C in the formation of both "paper clip type" and "linear type" triplexes (PCT and LT, respectively) was monitored by optical methods and isothermal titration calorimetric measurements. Experimental results revealed that the LT with P_C CG internally was independent of the solution pH, whereas the UV melting temperature of the PCT with only one P_C substitution internally was elevated from pH 6.0 to pH 7.0. A single P_C substitution, situated internally but not terminally, facilitated the PCT formation at the neutral pH. However, the best stabilization of the PCT in acidic conditions occurred when P_C at the end of the triplex rather than internally. In addition, a PCT, containing a contiguous P_CP_CP_C or an alternating P_CT_CP_CT_CP_C sequence, could not be formed. Thus, the presence of several nucleotides of P_C in proximity along the Hoogsteen strand may lead to structural distortion such that the rigid PCT with multiple substitutions is not formed.

Keywords: N^4 -(6-aminopyridin-2-yl)-2'-deoxycytidine (P_C), a CG base pair, oligodeoxyribonucleotide, the "paper clip type" and the "linear type" triplexes

二、計畫緣由與目的

寡核酸鏈以反意義或反基因的方式，與 RNA 或 DNA 形成雙螺旋或三螺旋結構應用在基因治療上；同時亦可運用在基礎科學上，研究 DNA 與 RNA 的結構、性質與功能。因此具多元用途之寡核酸鏈及與其相關的研究，日益受到重視。目前被廣泛研究的核酸三螺旋結構，其鹼基三聚體可分作二大類：py (pu py) 和 pu (pu py)。明顯地，第三股寡核酸鏈被限制在和 Watson-Crick 雙螺旋之嘌呤鏈作用。然而，天然核酸的序列是由四種鹼基混合組成的 (DNA 為 A、G、C、T；RNA 為 A、G、C、U)，作用鹼基序列的限制，侷限了反意義和反基因寡核酸鏈的應用與發展，如何解開鹼基序列辨識限制的問題，已成為目今研究的一大課題。

N^4 -(6-Aminopyridin-2-yl)-2'-deoxycytidine (P_C)可與 CG 鹼對作用，幫助核酸三螺旋結構的生成(1)，因此可解除鹼基序列辨識限制的問題，延伸寡核酸鏈與雙螺旋作用的範圍。仿核甘 P_C 的合成方法已於前期計畫中開發出來，其衍生物可從經濟、方便購得的 uridine 經由 triazol procedure 轉換過來(1)。在本期計畫中，我們利用卡計測量含 P_C 之核酸三螺旋結構的熱力學性質，更進一步地以光學方法探討含 P_C 之核酸三螺旋結構的物理性質，內容包括：P_C 自身之序列組合方式 (P_C 以單獨、連續或交替的方式作序列安排) 變換 P_C 在三螺旋結構的位置 (位在結構內部或末端) 以及三螺旋結構自由度 ("迴紋針式"和"直鏈式") 與環境酸鹼值對三螺旋體穩定度的影響。

三、結果與討論

合成的寡核酸鏈序列示於圖一。在設

計上寡核酸鏈 P₁、P₂、P₃ 和 P₄ 為可自我摺疊生成"迴紋針式"核酸三螺旋結構，而 P₆ 則可和 D₆ 聚合生成"直鏈式"三螺旋結構。P₁、P₂ 和 P₆ 僅含一個 P_C，P₃ (P_CP_CP_C) 和 P₄ (P_CCTP_CCTP_C) 則含三個 P_C。P₁ 和 P₂ 由同樣數目的鹼基三聚體組成，但二者 P_C CG 所在位置不同。寡核酸鏈 D_x (x = 1-4) 僅能形成雙螺旋結構，在此作為參考組。寡核酸鏈 C₁ 則為 P₁ 之對照比較組。

Ethidium 螢光增色效應可用來輔助判斷核酸三螺旋或雙螺旋結構的生成。Ethidium 為核酸研究上常用之探針，當其單獨存在於水溶液中時，其所表現出的螢光強度很弱；但當其嵌入核酸螺旋結構中，因厭水性環境其螢光強度會明顯增強；在三螺旋結構中，因第三股寡核酸鏈纏繞在雙螺旋結構的大凹槽上，阻礙 Ethidium 分子的嵌入，因此螢光增強強度較低。我們觀測在波長 520 nm 處之螢光強度變化，由相對螢光強度變化得知核酸螺旋結構的生成狀態。從圖二的數據分析，我們可得到下列訊息(2)：(A)在中性溶液中僅 P₁ 可生成"迴紋針式"三螺旋結構，寡核酸鏈 C₁ 和 P₂ 僅生成雙螺旋。因此 C CG (C₁) 或 ^mC GC (P₂) 取代位在結構內部之 P_C CG，可能會減弱或破壞連續的鹼基層疊作用力，影響核酸三螺旋結構的生成；或是可能由於厭水性的 P_C 位在結構末端 (P₂)，暴露於水溶液環境中導致三螺旋結構不穩定。(B)在設計上 P₃ 和 P₄ 雖然都至少有二個 P_C 置於"迴紋針式"三螺旋結構的內部，應具有生成三螺旋體的潛力；但由螢光增色效應實驗結果得知：無論在中性或酸性環境中，P₃ 和 P₄ 都僅能生成雙螺旋結構。可能是因為體積較大、具立體障礙之鹼基 P_C 相繼鄰近出現在結構緊密之三螺旋體中，造成結構

扭曲導致三螺旋體不穩定。

此外，我們發現：寡核酸鏈 P2 在酸性環境中可自我摺疊成"迴紋針式"三螺旋結構，且隨 pH 值降低三螺旋結構越加穩定。由紫外熔點溫度實驗結果得知：(A) 在 pH 5.0 時第三股寡核酸鏈解離溫度 (T_m)，P2 (34 °C) 比 P1 (27 °C) 高，因此在酸性環境中，將 PC 置於三螺旋結構的末端比置放於內部，更能穩定"迴紋針式"三螺旋結構。(B)P1 之三螺旋熔解溫度受溶液環境酸鹼值影響，在中性環境中 (T_m 17 °C) 較酸性環境中 (T_m 14 °C) 略高；但同樣僅含一個 PC 位在結構內部之三螺旋體 P6:D6 其熔點溫度較不受溶液酸鹼值的影響。

在圖三卡計實驗裡(3)，我們求得 P6:D6 之三螺旋結構生成的熱力學函數：

$$H(-4.17 \text{ kcal/mol}), \quad S(11.54 \text{ cal/mol}),$$

$G(-7.55 \text{ kcal/mol})$ 和平衡常數 $K(4.32 \times 10^5 \text{ M}^{-1})$ 。檢視這些數據可知：三螺旋結構的生成其 H 、 S 對自由能 G 都有正面的貢獻，使分子間寡核酸鏈的聚合為自發生成；雖然 H 值不是很大，但焓的增加有助於三螺旋結構的穩定生成。

四、計畫成果自評

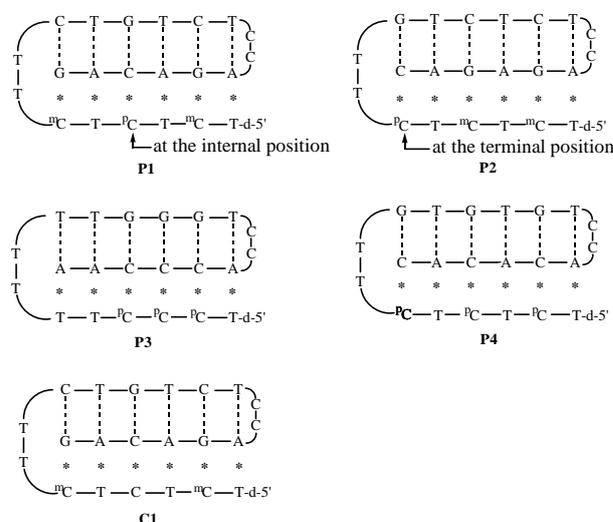
在 89 年度計畫中原預定進行仿核甘 N^4 -(6-aminopyridin-2-yl)-2'-deoxycytidine (PC) 之合成與含 PC 之寡核酸鏈的物性量測，以了解 PC 之性質與適用範圍。由實驗結果得知：PC-CG 可在中性溶液中幫助三螺旋結構的生成，並已獲得熱力學數據；但因立體障礙效應，數個 PC 出現在鄰近位置將導致三螺旋結構的不穩定。雖然鹼基序列辨識限制的問題仍未完全解決，對仿核甘 PC 性質的了解將有助於設計含 PC 之反基因或反意義試劑，應用於

學術研究、生物技術或醫藥科技等領域。本報告之內容與原計畫相同，並已達成預期目標，且數據結果已整理分析，彙整撰寫成論文投稿發表。

五、參考文獻

1. Chin, T.-M.; Chung, K.-Y.; Chen, J.-J.; Lin, W.-C.; Kan, L.-S. *J. Chin. Chem. Soc.* **1999**, *46*, 1.
2. 曾銘勳，中國文化大學應用化學所碩士論文，民國 89 年 6 月。
3. 洪福松，89 年度中國化學年會手冊 (BI-06)。

"迴紋針式"核酸三螺旋結構：



D1: 5'-d-TTTTTT-TT-CTGTCT-CC-AGACAG

D2: 5'-d-TTTTTT-TT-GTCTCT-CC-AGAGAC

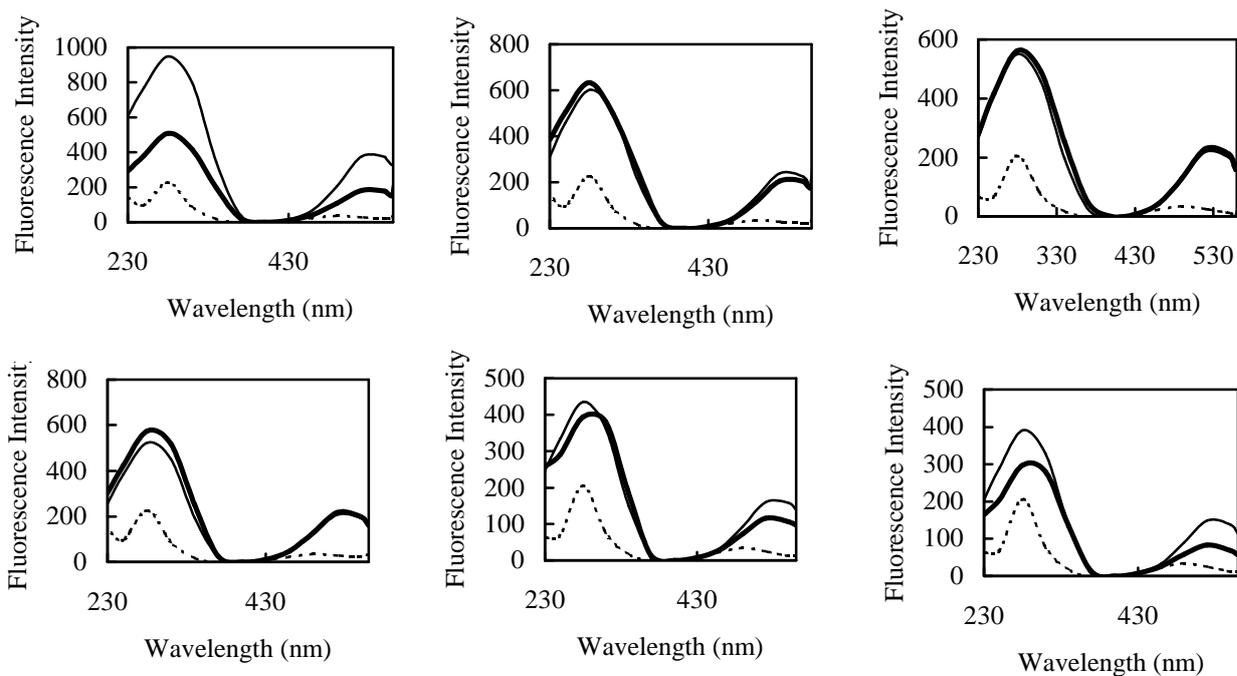
D3: 5'-d-TTTTTT-TT-TTGGGT-CC-ACCCAA

D4: 5'-d-TTTTTT-TT-GTGTGT-CC-ACACAC

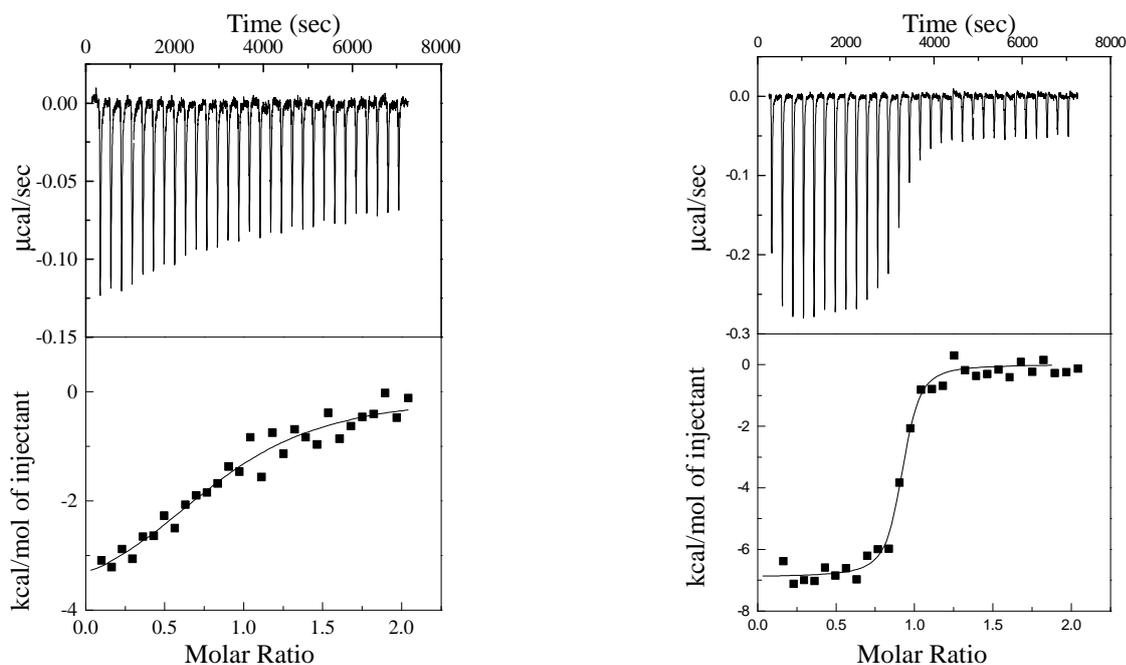
"直鏈式"核酸三螺旋結構：



圖一：寡核酸鏈序列



圖二：Ethidium 螢光增色效應實驗。(上左)：EB(虛線)、EB + P1 (粗實線)、EB + D1 (細實線)(pH 7.0)；(上中)：EB(虛線)、EB + P3 (粗實線)、EB + D3 (細實線)(pH 7.0)；(上右)：EB (虛線)、EB + P4 (粗實線)、EB + D4 (細實線)(pH 4.5)；(下)：EB(虛線)、EB + P2 (粗實線)、EB + D2 (細實線)(左 pH 7.0、中 pH 6.0、右 pH 5.0)。



圖三：卡計實驗(ITC)。三螺旋體(P6:D6) (左)與雙螺旋體(D6) (右)之生成熱能變化圖。