

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫名稱：開發與合成仿核糖酸以增進核酸螺旋結構之穩定度與其物性研究(1/2)

Synthesis and Physical Study of Nucleotide Analogs to Enhance the Stability of
Nucleic Acid Helical Structure

計畫編號：NSC 90-2113-M-034-003

執行期限：90 年 8 月 1 日至 91 年 7 月 31 日

主持人：靳宗政 中國文化大學化學系暨應用化學所

計畫參與人員：黃鴻文、張恩慈、張治敏、郭浚彥、鍾采紋 中國文化大學應用化學所

摘要：

這是二年期計畫中的第一年，主要工作分作三部份在進行：(1) 物性研究核糖衍生物 N^4 -(6-aminopyridin-2-yl)-2'-deoxycytidine (^PC) 對核酸三螺旋結構穩定度的影響，(2) 建立"髮夾式"核酸三螺旋結構模型，(3) 開發仿核糖 2'-deoxy-5-azacytidine (^AC) 的合成方法。在本期計畫中三個部分的研究工作我們都有所進展，其中核糖衍生物 ^PC 對核酸三螺旋結構穩定度影響的物性量測部分，已有相當的成果，實驗數據已整理分析撰寫成論文，發表於國際期刊 *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 19, 543-553 (2001) (2001 年 12 月)。核糖衍生物 ^PC 能在生理環境中和 CG 鹼對作用，幫助核酸三螺旋結構的生成，因此可延伸寡核酸鏈與核酸雙螺旋作用的範圍，解除鹼基序列辨識限制的問題。在本期計畫中，我們藉由紫外熔點實驗、圓二色光譜、Ethidium 螢光增色效應和卡計實驗，量測與分析含 $^P\text{C} \cdot \text{CG}$ 之核酸三螺旋體的基本物理性質，內容包括： ^PC 自身之序列組合方式 (^PC 以單獨、連續或交替的方式作序列安排)、變換 ^PC 在三螺旋結構中的位置 (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"三螺旋結構) 與溶液環境 (溫度、酸鹼度和陽離子種類) 等因素，以了解 ^PC 的性質與 $^P\text{C} \cdot \text{CG}$ 在核酸三螺旋結構中的應用範疇。部分實驗數據與結果討論摘錄於下面的進度報告中。同時，我們也設計"髮夾式"核酸三螺旋結構並進行物性研究，探討"髮夾式"核酸探針與目標單股 DNA 或 RNA 作用的情況。系列寡核酸鏈 AG_n ($5'$ -d-(AG) $_n$ T $_4$ (CT) $_n$, $n = 2-5$) 與 TC_n ($5'$ -d-(TC) $_n$, $n = 2-5$) 在 DNA 自動合成儀上製備出來，用以有系統地研究"髮夾式"核酸三螺旋結構的生成與其物理性質。在設計理念上，寡核酸鏈 AG_n 可自我摺疊生成"髮夾式"Watson-Crick 雙螺旋結構，進而與目標股嘔啶鏈 TC_n 藉由 Hoogsteen 氫鍵聚合，生成"髮夾式"核酸三螺旋結構。"髮夾式"核酸三螺旋結構的生成與其穩定度高低是運用紫外熔點測定、圓二色光譜和電泳實驗來偵測與判斷。目前我們已探討的項目包括：髮夾長度 n 、溶液酸鹼度、溫度和陽離子種類等因素，對"髮夾式"核酸三螺旋結構穩定度的影響；在第二年期計畫中我們將針對目前實驗結果的發現作進一步的研究，並彙整實驗數據撰寫成論文發表。針對此"髮夾式"核酸三螺旋結構之鹼基序列辨識限制的問題，我們設計與合成仿核糖 2'-deoxy-5-azacytidine (^AC)，2'-deoxy-5-azacytidine 的合成途徑與方法已在實驗室中開發出來，預計在第二年期計畫中將完成 2'-deoxy-5-azacytidine phosphoramidite 的合成工作，並將之嵌入上述"髮夾式"核酸三螺旋結構模型中進行物性量測。

關鍵詞：核糖衍生物 N^4 -(6-aminopyridin-2-yl)-2'-deoxycytidine (^PC)、仿核糖 2'-deoxy-5-azacytidine (^AC)、"迴紋針式"核酸三螺旋結構、"直鏈式"核酸三螺旋結構、"髮夾式"核酸三螺旋結構

Abstract:

This is the first year in a two-year proposal. Some of our research works are highlighted as following: (1) physical studies of the nucleic acid triple helix (triplex) containing a cytidinyl derivative, N^4 -(6-aminopyridin-2-yl)-2'-deoxycytidine (^PC), in the Hoogsteen strand; (2) building up a model of the "hairpin type" triplex; (3) developing a synthetic approach for a nucleotide analog, 2'-deoxy-5-azacytidine (^AC). We have had a significant progress in these research works. The experimental results of oligonucleotides containing ^PC have been published in the *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 19, 543-553 (2001) (December, 2001). A cytidinyl derivative ^PC could interact with a CG base pair to support the triplex formation of oligonucleotides, thus extending the recognition range of a DNA duplex by the Hoogsteen strand. Characteristics of ^PC in the formation of both intramolecular and intermolecular triplexes were monitored by measurements of optical methods and isothermal titration calorimetry. In the *JBSD* article, we provided complete characterization on the thermal parameters of a triplex containing ^PC including the solution conditions (the pH and the nature of cations), the sequence composition (single versus multiple ^PC 's), the ^PC 's position (internal versus terminal) and type (isolated, clustered or alternating), and finally, the structural flexibility of a triplex ("paper clip type" versus "linear type" triplex). In the mean time, we developed an approach for targeting pyrimidine DNA or RNA single strands by the triplex formation in the $\text{Py} \cdot \text{PuPy}$ motif. This systematical approach used "hairpin type" Watson-Crick DNA probes ($5'$ -d-(AG) $_n\text{T}_4(\text{CT})_n$, $n = 2-5$) to complex with the corresponding target pyrimidine strands ($5'$ -d-(TC) $_n$, $n = 2-5$) through the formation of Hoogsteen hydrogen bonds. The formation of "hairpin type" triplexes was monitored by UV thermal denaturation, CD spectra and gel shift experiments. Effects of the stem length (of the "hairpin type" triplex), the temperature, the solution pH, and the cations on the stability of a complex were examined. More studies are underway, and the experimental results will be published in the near future. The other interest of our research is to eliminate the limitation of the recognition range of a single strand DNA or RNA by antigene or antisense oligonucleotides, respectively, through the triplex formation. The synthetic strategies and procedures have been developed for derivatives of 2'-deoxy-5-azacytidine (^AC) which is designed to form base triads $\text{G} \cdot ^A\text{CG}$ in the $\text{Py} \cdot \text{PuPy}$ motif and $\text{G}^A\text{C} \cdot \text{C}$ in the $\text{PyPu} \cdot \text{Pu}$ motif. We shall continue on the syntheses of 2'-deoxy-5-azacytidine derivatives. Its phosphoramidite will be incorporate into oligonucleotides by a DNA synthesizer to analyze the physical property of "hairpin type" triplexes containing ^AC .

Keywords: N^4 -(6-aminopyridin-2-yl)-2'-deoxycytidine (^PC), 2'-deoxy-5-azacytidine (^AC), "paper clip type" triplex, "linear type" triplex, "hairpin type" triplex

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，其不同處在於三股寡核酸鏈間相對的位置和方向性，及鹼基三聚體間相互作用的方式。

第一大類：由嘧啶鹼基組成之寡核酸鏈以平行於 Watson-Crick duplex 之嘌呤鏈的方向，藉由 Hoogsteen 氫鍵作用纏繞在核酸雙螺旋的大凹槽上，主要包含 T·AT 及 C⁺·GC 二組鹼基三聚體。明顯地，目標股（Watson-Crick 雙螺旋核酸）之 CG 與 TA 二組鹼基對無法與第三股寡核酸鏈探針互補，造成核酸三螺旋結構的不穩定；或"髮夾式"核酸探針缺乏鹼基對去辨識目標股（第三股寡核酸鏈）之鹼基 G 和 A，與之生成穩定的鹼基三聚體。

第二大類：以富含嘌呤鹼基的寡核酸鏈以反平行於嘌呤鏈的方向，藉由 reverse Hoogsteen 氫鍵纏繞在雙螺旋的大凹槽上，主要包含 CG·G、TA·A 及 TA·T 三組鹼基三聚體。明顯地，"髮夾式"核酸探針缺乏鹼基對去辨識目標股（第三股寡核酸鏈）之鹼基 C，與之生成穩定的鹼基三聚體。

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因而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。在此計畫中即提出仿核糖酸和核糖酸衍生物的設計與合成，以增加鹼基三聚體的組合數目，進而提高辨識鹼基之機率。在這個二年期計畫中，我們即針對核酸三螺旋結構中之鹼基序列辨識限制的問題，設計與合成核糖酸衍生物 N⁴-(6-aminopyridin-2-yl)-2'-deoxycytidine（^PC）與仿核糖酸 2'-deoxy-5-azacytidine（^aC）。核糖酸衍生物 ^PC 能在生理環境中和 CG 鹼對作用，生成穩定的鹼基三聚體 ^PC·CG，增加第一大類鹼基三聚體的組合數目；仿核糖酸 2'-deoxy-5-azacytidine（^aC）有潛力生成鹼基三聚體：G·^aCG（第一大類鹼基三聚體）和 G^aC·C（第二大類鹼基三聚體），鹼基三聚體組合數的增加可使得"髮夾式"核酸三螺旋結構中之第二大類鹼基序列辨識限制的問題完全得到解決。

同時，我們也設計"髮夾式"核酸三螺旋結構並進行物性研究，探討"髮夾式"核酸探針與目標單股 DNA 或 RNA 作用的情況，建立"髮夾式"核酸三螺旋結構模型。稍後製備出的仿核糖酸衍生物 2'-deoxy-5-azacytidine phosphoramidite 將嵌入寡核酸鏈中進行物性研究，以了解其對核酸三螺旋結構的影響與適用範疇。

計畫進度報告：

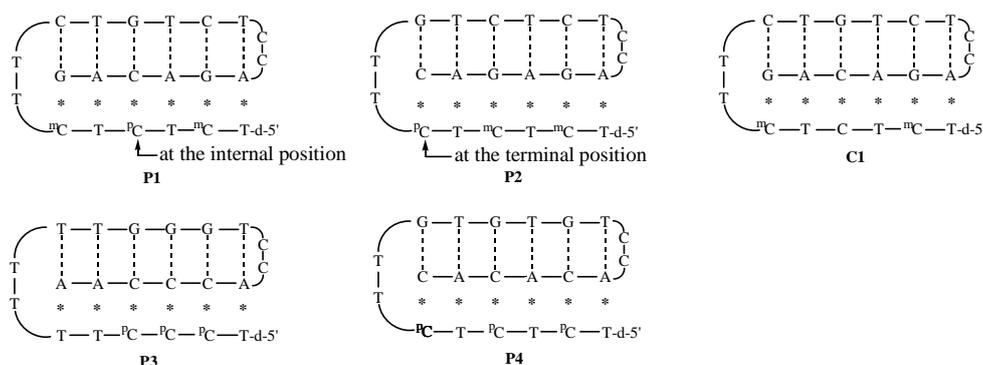
一、物性研究仿核糖酸 N⁴-(6-aminopyridin-2-yl)-2'-deoxycytidine（^PC）對核酸三螺旋結構穩定度的影響

核糖酸衍生物 N⁴-(6-aminopyridin-2-yl)-2'-deoxycytidine（^PC）預期能在生理環境中和 CG 鹼對作用，生成穩定的鹼基三聚體 ^PC·CG，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，延伸寡核酸鏈與核酸雙螺旋作用的範圍。在前期計畫中，我們已合成出 N^4 -(6-aminopyridin-2-yl)-2'-deoxycytidine phosphoramidite，並將之嵌入系列寡核酸鏈中；本期計畫將延續前期末完成的工作，量測與分析含 $^P\text{C} \cdot \text{CG}$ 之核酸三螺旋體的基本物理性質，內容包括： ^PC 自身之序列組合方式（ ^PC 以單獨、連續或交替的方式作序列安排）、變換 ^PC 在三螺旋結構中的位置（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"三螺旋結構）與溶液環境等因素，對核酸三螺旋結構穩定度的影響，以了解 ^PC 的性質與 $^P\text{C} \cdot \text{CG}$ 在核酸三螺旋結構中的應用範疇。這部分的實驗結果目前已整理分析撰寫成論文，發表於國際期刊 *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 19, 543-553 (2001) (2001 年 12 月)。詳細實驗結果與更多的討論請參閱期刊論文內容，今僅將部分實驗數據與結果討論摘錄於下面的報告中。

在此計畫中，我們設計與合成寡核酸鏈 **P1**、**P2**、**P3** 和 **P4**，其序列設計為可自我摺疊生成"迴紋針式"核酸三螺旋結構，而寡核酸鏈 **P5** 和 **P6** 則分別和核酸雙螺旋 **D5** 與 **D6** 之序列互補，可在適當環境中聚合生成"直鏈式"三螺旋結構。**P1**、**P2** 和 **P6** 僅含一個 ^PC ，**P3** ($^P\text{C}^P\text{C}^P\text{C}$)、**P4** ($^P\text{CT}^P\text{CT}^P\text{C}$) 和 **P5** ($^P\text{CT}^P\text{CT}^P\text{C}$) 則含三個 ^PC 。**P1** 和 **P2** 由同樣數目的鹼基三聚體組成，但二者 $^P\text{C} \cdot \text{CG}$ 所在位置不同。寡核酸鏈 **Dx** ($x = 1-4$) 僅能自我摺疊形成雙螺旋結構，在此作為參考組。寡核酸鏈 **C1** 則為 **P1** 之對照比較組。合成的寡核酸鏈鹼基序列示於下圖。

"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：

P5: 5'-d-TTTTTT $^P\text{CT}^P\text{CT}^P\text{CT}$ TTTTT

D5: 5'-d-AAAAACACACAAAAA

3'-d-TTTTTTGTGTTTTTT

P6: 5'-d-TTTTTTTT ^PCT TTTTTTTT

D6: 5'-d-AAAAAAACAAAAAAA

3'-d-TTTTTTTTGTTTTTTTTT

含 ³P 之寡核酸鏈的物理性質，我們運用紫外熔點實驗、圓二色光譜、Ethidium 螢光增色效應和卡計實驗等方法，量測其核酸螺旋結構的變化與熱力學數據。實驗結果已詳細記錄與討論於發表的文獻中，以下僅將紫外熔點實驗的實驗數據（列於表一）做一綜合整理與結果歸納。

表一：寡核酸鏈 **C1**、**P1**、**D1**、**P2**、**D2**、**P3**、**P4**、**P5:D5** (1:1) 和 **P6:D6** (1:1) 之紫外熔點溫度 (°C)。寡核酸鏈 **C1**、**P1**、**D1**、**P2**、**D2**、**P3** 和 **P4** 之濃度為 5 μM；**P5:D5** 或 **P6:D6** 之濃度則為 2 μM。緩衝溶液 (pH 4.5-6.0) 為 acetate buffer，緩衝溶液 (pH 7.0) 為 phosphate buffer，皆含 150 mM NaCl。紫外熔點溫度 T_{m1} 為第三股寡核酸鏈自 Watson-Crick 雙螺旋體解離之溫度； T_{m2} 為 Watson-Crick 雙螺旋結構解離之溫度。

pH	oligomer	20 mM MgCl ₂		20 mM MgCl ₂
		T_{m1} / T_{m2}	T_{m1} / T_{m2}	5 mM spermine T_{m1} / T_{m2}
7.0	C1	66	66	66
	P1	66	17 / 65	19 / 66
	D1	64	67	67
	P2	66	68	68
	D2	66	68	67
	P3	60	61	57
	P4	61	65	68
	P5:D5	47	10 / 47	26 / 50
	P6:D6	33 / 43	35 / 45	44 ^a
6.0	C1	10 / 66	11 / 66	18 / 66
	P1	13 / 65	14 / 66	35 / 67
	D1	67	67	67
	P2	18 / 66	18 / 68	26 / 68
	D2	66	67	67
	P5:D5	46	13 / 47	29 / 49
	P6:D6	33 / 44	35 / 45	44 ^a
5.0	C1	25 / 60	29 / 62	-
	P1	24 / 60	27 / 62	-
	D1	61	64	-
	P2	33 / 63	34 / 65	-
	D2	61	64	-
4.5	P3	55	56	53
	P4	57	61	63
	P5:D5	45	12 / 45	28 / 50
	P6:D6	31 / 41	32 / 42	42 ^a

^a T_m for the triplex-to-coil transition.

根據表一之紫外熔點實驗數據，我們可歸納出下列結果：

#含一個核衍生物^PC之寡核酸鏈

在 pH 7.0 的溶液中，寡核酸鏈 **P1** 可生成"迴紋針式"三螺旋結構，而寡核酸鏈 **C1** 和 **P2** 僅生成雙螺旋體。因此在生理環境中，鹼基三聚體 ^PC·CG 可幫助核酸三螺旋結構的生成，且 ^PC·CG 位在結構內部 (**P1**) 比位在結構末端 (**P2**) 更能幫助穩定核酸三螺旋結構。^C·CG (**C1**) 或 ^mC·GC (**P2**) 取代位在結構內部之 ^PC·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；或可能由於厭水性鹼基 ^PC 位在結構末端，暴露於水溶液環境中導致三螺旋結構的不穩定，因而寡核酸鏈 **C1** 與 **P2** 無法自我摺疊生成三螺旋體。

在酸性溶液中，寡核酸鏈 **C1**、**P1** 和 **P2** 皆給予二個紫外熔點溫度值 T_{m1} 和 T_{m2} ，表示寡核酸鏈可自我摺疊生成三螺旋結構；且隨溶液環境酸度增加 (由 pH 6.0 至 pH 5.0)， T_{m1} 溫度值隨之升高，此乃因鹼基三聚體 ^mC⁺·GC 之 Hoogsteen 氫鍵作用力在酸性環境中增強，幫助三螺旋結構更趨穩定所致。在 pH 5.0 時，**P2** 之第三股寡核酸鏈解離溫度 (34 °C) 比 **P1** 之 T_{m1} 值 (27 °C) 高，因此推知：在酸性環境中，將 ^PC 置於三螺旋結構的末端 (**P2**) 比置放於內部 (**P1**)，更能穩定"迴紋針式"三螺旋結構。

#含三個核衍生物^PC之寡核酸鏈

寡核酸鏈 **P3** 和 **P4** 雖然都至少有二個 ^PC 置於"迴紋針式"三螺旋結構的內部 (示於上圖)，類似於寡核酸鏈 **P1** 的例子，因此應具有生成三螺旋結構的潛力。但由 Ethidium 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。由此推測：數個體積較大、具立體障礙之核衍生物 ^PC 同時鄰近出現在 Hoogsteen 鏈上，可能會導致三螺旋結構扭曲，造成結構緊密之"迴紋針式"三螺旋體不穩定。

另一方面，設計成"直鏈式"三螺旋結構之寡核酸鏈聚合體 **P5:D5**，在鹼基序列組合上同樣含有三個核衍生物 ^PC。由紫外熔點溫度實驗數據分析可得知：在添加陽離子 20 mM MgCl₂ 或 5 mM spermine 的環境中，寡核酸鏈 **P5** 與雙螺旋體 **D5** 可穩定聚合生成三螺旋結構。結構自由度較高之"直鏈式"三螺旋結構較結構緊密之"迴紋針式"三螺旋結構，似乎更易接受體積大、具立體障礙之核衍生物 ^PC；因此，鹼基三聚體 ^PC·CG 較適用於自由度高之"直鏈式"三螺旋結構中。

核衍生物 ^PC 的立體障礙效應可由比較聚合體 **P5:D5** 和 **P6:D6** 的穩定度，得到進一步的佐證。"直鏈式"三螺旋聚合體 **P5:D5** 和 **P6:D6** 有同樣的寡核酸鏈長度，但 **P5:D5** 含有三組位在三螺旋結構內部之鹼基三聚體 ^PC·CG，**P6:D6** 僅含有一組 ^PC·CG (示於上圖)。然而，聚合體 **P5:D5** 必須在添加陽離子 MgCl₂ 或 spermine 的環境中才能生成，而寡核酸鏈 **P6** 無須添加陽離子 (MgCl₂ 或 spermine) 即可與雙螺旋體 **D6** 穩定聚合；且聚合體 **P6:D6** 在中性、不含 MgCl₂ 或 spermine 的環境中，第三股寡核酸鏈 **P6** 自雙螺旋體 **D6** 的解離溫度高達 33 °C。在添加陽離子 20 mM MgCl₂ 的溶液環境中，聚合體 **P6:D6** 的穩定度 (T_{m1} : 32-35 °C) 遠較聚合體 **P5:D5** 的穩定度 (T_{m1} : 10-13 °C) 明顯地高出 20 °C 以上。

更進一步地，我們發現溶液酸鹼度對含 ^PC·CG 之"直鏈式"三螺旋結構穩定度的影響不大，此可由 pH 4.5 至 pH 7.0，三螺旋聚合體 **P5:D5** 和 **P6:D6** 之 T_{m1} 溫度值變化範

圍很小 ($\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$) 可推論得知。

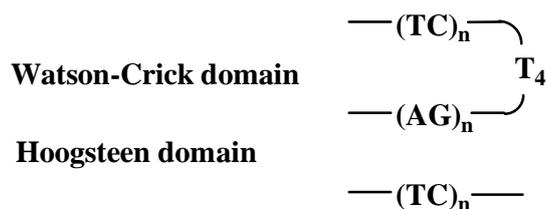
#陽離子 spermine 對三螺旋結構穩定度的影響

根據紫外熔點實驗數據表 (表一): 在添加 spermine 的溶液環境中, 核酸三螺旋體 **C1**、**P1**、**P2**、**P5:D5** 和 **P6:D6** 所測得的 T_{m1} 溫度值皆較無添加 spermine 溶液環境中所測得相對應的 T_{m1} 溫度值高, 尤其在酸性環境中 T_{m1} 溫度值更是大幅提升, 因此 spermine 確可幫助穩定含 $\text{P}^{\text{C}} \cdot \text{CG}$ 之核酸三螺旋結構。

二、建立"髮夾式"核酸三螺旋結構模型

一般而言, 形成"髮夾式"或"環狀式"的核酸三螺旋結構要較三條獨立寡核酸鏈聚合生成的"直鏈式"核酸三螺旋結構穩定, 且鹼基序列結合專一性與抗酵素水解性也較"直鏈式"為佳。因此在這個計畫中, 我們設計與合成了一系列寡核酸鏈用以有系統地研究"髮夾式"核酸三螺旋結構的生成與其物理性質。在設計理念上, 寡核酸鏈 **AG_n** (其核酸序列為: $5'\text{-d}(\text{AG})_n\text{T}_4(\text{CT})_n$, $n = 2\text{-}5$) 可自我摺疊生成"髮夾式"Watson-Crick 雙螺旋結構; 進而三螺旋結構的形成即由"髮夾式"探針 **AG_n** 與目標股嘔啶鏈 **TC_n** ($5'\text{-d}(\text{TC})_n$, $n = 2\text{-}5$) 藉由 Hoogsteen 氫鍵聚合, 生成"髮夾式"核酸三螺旋結構, 如圖二所示。²

"髮夾式"核酸三螺旋結構模型:



這個部分的研究可以是獨立的, 也可以是與計畫中另一部份仿核糖酸衍生物 ($2'\text{-deoxy-5-azacytidine phosphoramidite}$) 的合成工作相關。在第一年期的計畫中, 我們已分別著手進行仿核糖酸衍生物的合成與建立"髮夾式"核酸三螺旋結構模型。 $2'\text{-deoxy-5-azacytidine phosphoramidite}$ 預計在第二年期計畫中完成, 將運用 DNA 自動合成儀嵌入所建立的"髮夾式"核酸三螺旋結構模型中, 進行物性研究。以下報告謹針對"髮夾式"核酸三螺旋結構模型物性研究的初步結果, 做一整理敘述於下。

"髮夾式"核酸三螺旋結構的生成與其穩定度是運用紫外熔點測定、圓二色光譜和電泳實驗來偵測與判斷。寡核酸鏈 **AG_n** 與 **TC_n** 以 1:1 的比例混合組成, 在 0.02 N acetate buffer、150 mM NaCl、20 mM MgCl_2 之緩衝溶液中, 添加與不添加 5 mM spermine, 進行物性量測。目前我們已探討的項目包括: 髮夾長度 n (即鹼基三聚體的數目)、溶液酸鹼度 (pH 4.5 和 pH 6.0) 和陽離子種類 (spermine) 等因素, 對"髮夾式"核酸三螺旋結構穩定度的影響。表二列出紫外熔點測定實驗所得結果。

表二：寡核酸鏈 **AGn:TCn** (1:1) 與 **AGn** 之紫外熔點溫度 (°C)。寡核酸鏈 **AGn:TCn** 或 **AGn** 之濃度為 2 μ M。緩衝溶液為 acetate buffer, 含 150 mM NaCl 和 20 mM MgCl₂。紫外熔點溫度 T_{m1} 為第三股寡核酸鏈自 Watson-Crick 雙螺旋體解離之溫度； T_{m2} 為 Watson-Crick 雙螺旋結構解離之溫度。

oligomer	pH 4.5		pH 6.0	
	5 mM spermine		5 mM spermine	
	T_{m1} / T_{m2}	T_{m1} / T_{m2}	T_{m1} / T_{m2}	T_{m1} / T_{m2}
AG5:TC5	70 ^a	75 ^a	31 / 77	34 / 76
AG4:TC4	60 ^a	64 ^a	16 / 71	17 / 72
AG3:TC3	29 ^a	34 ^a	<5 / 58	<5 / 58
AG2:TC2	35	37	44	45
AG5	70	73	76	76
AG4	64	66	72	71
AG3	29	34	58	59
AG2	36	37	44	44

^a T_m for the triplex-to-coil transition.

從表二中我們可得下列訊息：

#髮夾長度 n 對核酸三螺旋結構之影響

在 pH 6.0 時，由紫外熔點實驗結果得知：當長度 $n > 2$ 時，獲得二個熔點溫度 T_{m1} 和 T_{m2} ，因此推知：寡核酸鏈 **AGn** 與 **TCn** 在髮夾長度 $n = 3-5$ 時可聚合生成三螺旋體；而寡核酸鏈 **AG2** 與 **TC2** 無法穩定聚合，因此僅觀測到寡核酸鏈 **AG2** 自我摺疊生成雙螺旋結構的解離溫度。當髮夾長度 $n = 3$ 時，核酸三螺旋的解離溫度小於 5 °C，因此 **AG3** 與 **TC3** 所生成的三螺旋結構並不很穩定；必須當長度 $n \geq 4$ 時，寡核酸鏈 **AGn** 與 **TCn** 才能聚合成穩定的"髮夾式"三螺旋結構。

在 pH 4.5 的緩衝溶液中，寡核酸鏈 **AGn** 與 **TCn** ($n = 2-5$) 的混合溶液皆只測得一個熔點溫度。由以前的研究經驗推知：在酸性環境中因鹼基三聚體 $C^+ \cdot GC$ 之穩定度增強，可提高核酸三螺旋結構的穩定度，第三股寡核酸鏈解離的溫度值可因而升高。³ 因此當酸鹼值由 pH 6.0 降至 pH 4.5 時，寡核酸鏈 **AGn** 與 **TCn** ($n = 3-5$) 間的 Hoogsteen 氫鍵作用力增強，所形成之"髮夾式"三螺旋體，其三螺旋結構幾乎可達到與雙螺旋一樣的穩定。而在 pH 6.0 時，無法穩定聚合的寡核酸鏈 **AG2** 與 **TC2**，則需進一步地由圓二色光譜輔助鑑定核酸螺旋結構的變化。由圓二色光譜圖判斷：寡核酸鏈 **AG2** 與 **TC2** 仍無法穩定聚合生成三螺旋結構，因此所測得的熔點溫度仍為 **AG2** 雙螺旋的解離溫度。

由表二之紫外熔點溫度高低比較：在同一環境下，當髮夾長度越長，寡核酸鏈 **AGn** 與 **TCn** ($n = 3-5$) 所生成之三螺旋體穩定度越高。

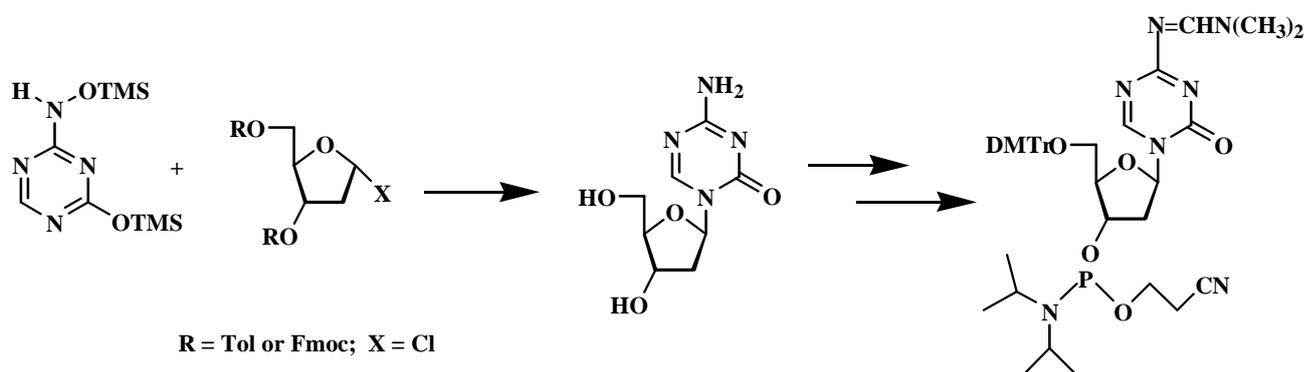
#陽離子 spermine 對三螺旋結構穩定度的影響

四價陽離子 spermine 藉由中和核酸鏈上磷酸酯骨幹之負電荷，可使寡核酸鏈 **AGn** 與 **TCn** ($n = 3-5$) 的聚合作用更強，因此三螺旋體的熔點溫度略為提升。

三、開發仿核 β -2'-deoxy-5-azacytidine (aC) 的合成方法

根據分子模型模擬，仿核 β -2'-deoxy-5-azacytidine (aC) 可生成數種鹼基三聚體包括： $G \cdot ^aCG$ （第三股寡核酸鏈與 Watson-Crick 雙螺旋結構平行的類型）和 $G^aC \cdot C$ （第三股寡核酸鏈與 Watson-Crick 雙螺旋結構反平行的類型），作用鹼基組合數的增加可解除在核酸三螺旋結構中鹼基序列辨識限制的困擾。在本期計畫中，我們已開發出仿核 β -2'-deoxy-5-azacytidine 的合成方法，將氯化 \pm 喃糖衍生物和鹼基矽化衍生物直接進行糖 β -縮合反應，如下圖所示。惟反應進行所需無水操作條件非常嚴苛，易導致較低產率，此部份仍待克服。在第二年期計畫中，我們將嘗試其他糖 β -縮合方法，提高仿核 β -2'-deoxy-5-azacytidine 的合成產率。同時，進一步地也將現已合成出的 β -2'-deoxy-5-azacytidine 接上適當的活化官能基與保護基，使之能適用於 DNA 自動合成儀，嵌入前述"髮夾式"核酸三螺旋結構模型中進一步做物性研究。

仿核 β -2'-deoxy-5-azacytidine phosphoramidite 的合成路徑設計：



計畫成果自評：

在 90 年度計畫中原預定進行含核 β -衍生物 N^4 -(6-aminopyridin-2-yl)-2'-deoxycytidine (aPC) 之寡核酸鏈的物性量測，以了解 aPC 之性質與在核酸三螺旋結構中的適用範圍。由實驗結果得知： $^aPC \cdot CG$ 可在中性溶液中幫助三螺旋結構的生成，並已由卡計實驗獲得熱力學數據；實驗數據已整理分析撰寫成論文，發表於國際期刊 *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*。同時，我們也業已建立"髮夾式"核酸三螺旋結構模型；在這個題目中，我們設計與合成了系列寡核酸鏈：可自我摺疊之"髮夾式"核酸探針 AG_n ($5'$ -d-(AG) $_n$ T $_4$ (CT) $_n$, $n = 2-5$) 與目標股嘧啶鏈 TC_n ($5'$ -d-(TC) $_n$, $n = 2-5$)，用以有系統地研究"髮夾式"核酸三螺旋結構的生成與其物理性質。第一年計畫執行中即已有初步成果和新的發現，第二年將繼續更進一步地進行"髮夾式"核酸三螺旋結構模型的性質研究，並將數據結果整理分析，彙整撰寫成論文投稿發表。仿核 β -2'-deoxy-5-azacytidine phosphoramidite 的合成預期將在第二年計畫中執行完成，並嵌入上述"髮夾式"核酸三螺旋結構模型中進行物性研究。本報告之內容與原計畫相同，並已達成預期目標。

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*, 751-758.
2. 黃鴻文、靳宗政和甘魯生，九十年度中國化學會年會手冊，PC-6。
3. Chin, T.-M.; Lin, S.-B.; Lee, S.-Y.; Chang, M.-L.; Cheng, A.Y.-Y.; Chang, F.-C.; Pasternack, L.; Huang, D.-H.; Kan, L.-S. *Biochemistry* **2000**, *39*, 12457-12464.