

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

開發與合成仿核甘酸以增進核酸螺旋結構之穩定度與其物  
性研究(2/2)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2113-M-034-001-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：中國文化大學化學系

計畫主持人：靳宗玫

計畫參與人員：張恩慈, 張治敏, 郭浚彥, 鍾采紋, 陳芳琳

報告類型：完整報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 10 月 20 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：開發與合成仿核甘酸以增進核酸螺旋結構之穩定度與其物性研究(2/2)

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

計畫編號：NSC 91-2113-M-034-001

執行期限：91 年 8 月 1 日至 92 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：張恩慈、張治敏、郭浚彥、鍾采紋、陳芳琳 中國文化大學應用化學所

### 摘要：

本計畫主要進行工作為：(1) 開發與製備適用於 DNA 自動合成儀上之 5-氮去氧胞甘衍生物 (2'-deoxy-5-azacytidine derivatives) 的合成方法與條件；(2) 將 5-氮去氧胞甘 (2'-deoxy-5-azacytidine,  $^3\text{C}$ ) 嵌入寡核酸鏈中，探討含鹼基三聚體  $\text{G } ^3\text{CG}$ 、 $\text{A } ^3\text{CG}$ 、 $\text{T } ^3\text{CG}$  或  $\text{C } ^3\text{CG}$  之核酸三螺旋結構穩定度；(3) 建立由"髮夾式"雙螺旋與單股嘧啶鏈所生成之核酸三螺旋結構模型。在本期計畫中三部分的研究工作我們都有所進展，其中核酸三螺旋結構模型的研究，已於近日彙整撰寫成論文投稿於國際期刊，部分實驗數據與結果討論將摘錄於下面的進度報告中。在本計畫中，我們設計與合成系列能生成"髮夾式"雙螺旋之寡核酸鏈  $\text{Hn}$  ( $5'\text{-d}(\text{AG})_n\text{T}_4(\text{CT})_n$ ,  $n = 2-4$ ) 與單股嘧啶鏈  $\text{Pn}$  ( $5'\text{-d}(\text{TC})_n$ )，用以建立一新式、 $\text{py-pupy}$  型之核酸三螺旋結構並探討其物理性質。在設計理念上，寡核酸鏈  $\text{Hn}$  可自我摺疊生成"髮夾式"Watson-Crick 雙螺旋結構，進而與目標股嘧啶鏈  $\text{Pn}$  藉由 Hoogsteen 氫鍵聚合，生成核酸三螺旋結構。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和圓二色光譜來偵測與判斷。由實驗結果得知：當髮夾長度  $n > 2$  時，在酸性條件下 ( $\text{pH } 4.5-6.0$ )，寡核酸鏈  $\text{Hn}$  即可與目標股嘧啶鏈  $\text{Pn}$  聚合，生成穩定的核酸三螺旋結構。"髮夾式"核酸雙螺旋探針較直鏈型或 Watson-Crick 互補寡核酸鏈對目標股有更高的聚合親和性。然而核酸三螺旋結構的穩定度不僅與酸鹼值或髮夾長度有關，亦與緩衝溶液種類相關聯。我們不僅建立了一個核酸三螺旋模型系統，而且實驗數據結果能幫助找出穩定核酸三螺旋結構的溶液環境條件。另一研究方向為：解除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 5-氮去氧胞甘及其適用於 DNA 自動合成儀的 phosphoramidite 衍生物。5-氮去氧胞甘與其衍生物的合成途徑與方法已在實驗室中開發出來，在本計畫中已完成 2'-deoxy-5-azacytidine phosphoramidite 的合成工作，並將之嵌入上述"髮夾式"核酸雙螺旋結構中進行物性量測。在四組鹼基三聚體中 ( $\text{G } ^3\text{CG}$ 、 $\text{A } ^3\text{CG}$ 、 $\text{T } ^3\text{CG}$  和  $\text{C } ^3\text{CG}$ )，鹼基對  $^3\text{CG}$  能與核甘  $\text{G}$  或  $\text{A}$  作用生成較穩定的鹼基三聚體，幫助  $\text{py-pupy}$  型之核酸三螺旋結構的生成，因此可延伸核酸雙螺旋與單股 DNA 作用的範圍，解除鹼基序列辨識限制的問題。

**關鍵詞：** "髮夾式"核酸雙螺旋結構、緩衝溶液種類、核酸三螺旋結構穩定度、5-氮去氧胞甘、鹼基序列辨識限制

## Abstract:

Some of our research works are highlighted as following: (1) development of synthetic approaches for a cytidinyl analog, 2'-deoxy-5-azacytidine (<sup>a</sup>C), and its phosphoramidite derivative for application on a DNA synthesizer; (2) physical studies of stability of a nucleic acid triplex containing **G<sup>a</sup>CG**, **A<sup>a</sup>CG**, **T<sup>a</sup>CG** or **C<sup>a</sup>CG**; (3) building up a triplex model composed of a hairpin duplex with a homopyrimidine single strand through Hoogsteen base pairing. We have had significant progresses in these research works. A manuscript describing the experimental results of a triplex model has been prepared and submitted to an international journal. It has been observed that a group of unusually stable DNA hairpin duplexes (**Hn**: 5'-d-(AG)<sub>n</sub>T<sub>4</sub>(CT)<sub>n</sub>, n = 2-4) are directed to homopyrimidine sequences (**Pn**: 5'-d-(TC)<sub>n</sub>) by py-py-type triplex formation, resulting in high binding affinity and specificity. The experimental results of UV thermal denaturation and CD spectroscopy showed that the short bimolecular triplex **Hn:Pn** (1:1) could be formed in acidic conditions (pH 4.5-6.0) as the helix length n > 2. This hairpin strategy for nucleic acid recognition of a pyrimidine strand has a substantial binding advantage over either the conventional linear analog or simple Watson-Crick DNA complement. The triplex stability of **Hn** with **Pn** is not only helix length- and pH-dependent but also extremely sensitive to the nature of a buffer. In the present study, we provide a simple triplex system, and the data presented may be useful in defining the experimental conditions necessary to stabilize triplex DNA. The other interest of our research is to eliminate the limitation of sequence recognition of a single strand DNA by oligonucleotides through triplex formation. The synthetic strategies and procedures have been developed for derivatives of 2'-deoxy-5-azacytidine (<sup>a</sup>C) which is designed to form a base triad **G<sup>a</sup>CG**. The cytidinyl analog 2'-deoxy-5-azacytidine and its derivatives were synthesized and incorporated into oligonucleotides on a DNA synthesizer. Characteristics of <sup>a</sup>C in triplex formation and stability were monitored by measurements of optical methods. It was observed that the base triads **G<sup>a</sup>CG** and **A<sup>a</sup>CG**, among **G<sup>a</sup>CG**, **A<sup>a</sup>CG**, **T<sup>a</sup>CG** and **C<sup>a</sup>CG**, showed greater ability in supporting py-py-type triplex formation, and thus extended the recognition range of a DNA single strand by a duplex containing a base pair <sup>a</sup>CG.

**Keywords:** hairpin duplex, the nature of a buffer, triplex stability, 2'-deoxy-5-azacytidine, limitation of sequence recognition

## 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<sup>1</sup>。

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<sup>+</sup>、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 Watson-Crick duplex 之嘌呤鏈的方向，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，目標股（第三股寡核酸鏈）之鹼基 C，缺乏鹼基對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。在此計畫中我們即提出 5-氮去氧胞甘（2'-deoxy-5-azacytidine, <sup>a</sup>C）及其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。根據分子模型模擬，5-氮去氧胞甘有潛力生成鹼基三聚體：G<sup>a</sup>CG（第一大類鹼基三聚體），鹼基三聚體組合數的增加可使得核酸三螺旋結構中，辨識之鹼基數目增加，進而穩定核酸三螺旋結構。

同時，我們也設計與建立核酸三螺旋結構模型，探討"髮夾式"核酸探針與目標單股 DNA 作用的情況。計畫中預期：藉由核甘橋樑（-TTTT-）連結之"髮夾式"核酸雙螺旋體其穩定度會增加，進而提高其與目標股寡核酸鏈作用之親和性。且製備出的 5-氮去氧胞甘衍生物（2'-deoxy-5-azacytidine phosphoramidite）將嵌入能生成"髮夾式"核酸探針之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：

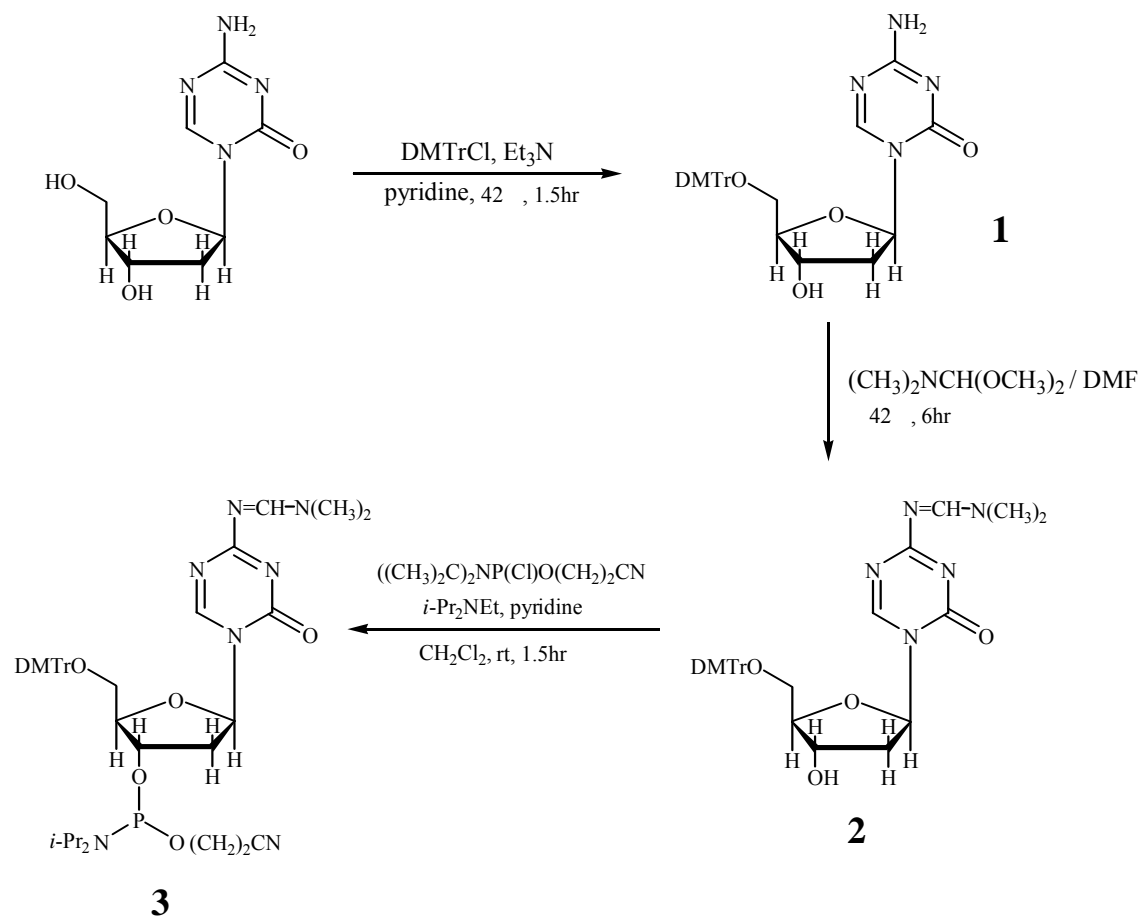
### 一、開發 5-氮去氧胞苷衍生物的合成方法與其在核酸三螺旋結構中之物性研究

根據分子模型模擬，5-氮去氧胞苷 (2'-deoxy-5-azacytidine,  $^3\text{C}$ ) 可生成鹼基三聚體： $\text{G } ^3\text{CG}$  (第三股寡核酸鏈與 Watson-Crick 雙螺旋結構平行的類型)，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<sup>2</sup>。在前期計畫執行中，我們已開發出 5-氮去氧胞苷的合成方法，將氯化夫喃糖衍生物和矽化鹼基衍生物直接進行糖苷縮合反應。惟反應進行所需無水操作條件非常嚴苛，易導致較低產率，必須非常謹慎的操作才能獲得良好產率，進行接續的反應步驟。在本期計畫中，我們進一步地將已合成出的 $\beta$ -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 自動合成儀上。這些衍生物的合成方法與條件，已在本期計畫中開發完成，並已有相當的產量可嵌入寡核酸鏈中做物理性質的探討。

#### # 5-氮去氧胞苷及其衍生物之合成

5-氮去氧胞苷將用 DNA 自動合成儀嵌入寡核酸鏈中，因此 3'-羥基、5'-羥基和 4-胺基必須選用適當的活化基與保護基保護起來<sup>2</sup>。5'-羥基一般是以 DMTr group 作為保護基，當我們參考文獻上發表的合成方法來進行保護基反應時，往往得到產率很低 (約 30%) 的所需產物(1)。因為 5-氮去氧胞苷的製備並不容易且其在商業上的售價非常昂貴，因此我們花了一段時間嘗試許多不同的合成反應條件，尋找 5'-羥基接上 DMTr group 的反應條件，希望能提高反應產率。目前已找出最有利的反應操作技術與反應條件，此步驟產率已可高達 95%。接下來即是將產物(1) 溶於溶劑 DMF 中，與 *N,N*-dimethyl formamide dimethyl acetal 於 42 °C 攪拌反應，生成 4-胺基被保護的產物(2)；而後產物(2)即轉換為 phosphoramidite derivative (3)。合成反應途徑與條件示於圖一。

5-氮去氧胞苷嵌入能生成髮夾式核酸雙螺旋結構之寡核酸鏈序列中，並與富含嘧啶鹼基之寡核酸鏈以 Hoogsteen 氫鍵方式作用，聚合生成核酸三螺旋體。共設計四組鹼基三聚體： $\text{G } ^3\text{CG}$ 、 $\text{A } ^3\text{CG}$ 、 $\text{T } ^3\text{CG}$ 、 $\text{C } ^3\text{CG}$ ，來測試  $^3\text{C}$  對四種鹼基之親和性。去氧胞苷 C 將用來與  $^3\text{C}$  之性質作對照比較，因此也合成另一可生成髮夾式核酸雙螺旋結構之寡核酸鏈 (在  $^3\text{C}$  之位置上以 C 替代之)，可與單股富含嘧啶之核酸鏈聚合生成四組鹼基三聚體： $\text{G } \text{CG}$ 、 $\text{A } \text{CG}$ 、 $\text{T } \text{CG}$  和  $\text{C } \text{CG}$ 。在文獻上，能與鹼基 G 聚合之天然鹼基對為 TA，因此我們也合成一組寡核酸鏈能生鹼基三聚體： $\text{G } \text{TA}$ 。本計畫中所合成之寡核酸鏈序列與所生成之核酸三螺旋結構，將以示意圖的方式示於圖二。



圖一 2'-Deoxy-5-azacytidine derivatives 的合成反應途徑與條件

(target) 5'-TCTCTXTC

(probe) 5'-AGAGAYAG  
TCTCTXTC

X YX = G <sup>a</sup>CG, A <sup>a</sup>CG, T <sup>a</sup>CG, C <sup>a</sup>CG  
G CG, A CG, T CG, C CG  
G TA

圖二 寡核酸鏈序列與核酸三螺旋結構示意圖

## # 5-氮去氧胞甘對核酸三螺旋結構之影響

我們運用紫外光可見光分光光譜儀及圓二色光譜儀，探討核酸三螺旋之生成與穩定度<sup>3</sup>。溶液環境條件為：20 mM phosphate buffer (pH 4.5) 150 mM NaCl、20 mM MgCl<sub>2</sub>。紫外熔點所測結果列於表一<sup>2</sup>。

由紫外熔點溫度與圓二色光譜的結果顯示：

(1) 鹼基對<sup>a</sup>CG可與鹼基G、A、T或C聚合，生成鹼基三聚體，且G<sup>a</sup>CG或A<sup>a</sup>CG較T<sup>a</sup>CG和C<sup>a</sup>CG略為穩定。

(2) 含G<sup>a</sup>CG或A<sup>a</sup>CG之核酸三螺旋體與相對應含G<sup>a</sup>CG或G<sup>a</sup>TA及A<sup>a</sup>CG之核酸三螺旋體比較，也顯得略為穩定。

(3) 鹼基三聚體G<sup>a</sup>CG將可取代G<sup>a</sup>TA，運用在核酸三螺旋結構中幫助穩定核酸三螺旋結構。鹼基三聚體組合數的增加可使得以核酸三螺旋結構方式辨識之鹼基序列增加。

表一 核酸三螺旋體 (X<sup>a</sup>YX) 之紫外熔點溫度

Triplex Symbol	G <sup>a</sup> CG	A <sup>a</sup> CG	T <sup>a</sup> CG	C <sup>a</sup> CG
<i>T<sub>m</sub></i> (°C)	14	14	10	10

Triplex Symbol	G <sup>a</sup> CG	A <sup>a</sup> CG	T <sup>a</sup> CG	C <sup>a</sup> CG	G <sup>a</sup> TA
<i>T<sub>m</sub></i> (°C)	11	9	13	13	12

## 二、建立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由"髮夾式"核酸雙螺旋與單股核酸鏈所生成之核酸三螺旋結構。在設計理念上，寡核酸鏈 **H<sub>n</sub>** (其核酸序列為：5'-d-(AG)<sub>n</sub>T<sub>4</sub>(CT)<sub>n</sub>, n = 2-4) 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 **H<sub>n</sub>** 與目標股嘧啶鏈 **P<sub>n</sub>** (5'-d-(TC)<sub>n</sub>, n = 2-4)，藉由 Hoogsteen 氫鍵聚合，生成核酸三螺旋結構，圖三所示即為核酸三螺旋結構模型與合成的寡核酸鏈序列。

		symbol	sequence
Watson-Crick domain		<b>H2</b>	5'-d-AGAGTTTTCTCT
		<b>H3</b>	5'-d-AGAGAGTTTTCTCTCT
		<b>H4</b>	5'-d-AGAGAGAGTTTTCTCTCTCT
Hoogsteen domain		<b>P2</b>	5'-d-TCTC
		<b>P3</b>	5'-d-TCTCTC
		<b>P4</b>	5'-d-TCTCTCTC
		<b>L1</b>	5'-d-CTCTCTCT
		<b>L2</b>	5'-d-AGAGAGAG
		<b>L3</b>	5'-d-GAGAGAGA

圖三 核酸三螺旋結構模型與合成的寡核酸鏈序列

核酸三螺旋結構的生成與其穩定度是運用紫外熔點測定和圓二色光譜來偵測與判斷。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 4.5-6.0）和配製緩衝溶液之鹽類種類等因素，對核酸三螺旋結構生成與穩定度的影響。同時與同序列組成、"直鏈式"三螺旋結構相比較。寡核酸鏈 **H<sub>n</sub>** 與 **P<sub>n</sub>** 以 1:1 的比例混合組成，在 20 mM 緩衝溶液中進行物性量測（pH 4.5：acetate buffer；pH 6.0：phosphate、cacodylate、MOPSO 或 PIPES buffer），另添加 150 mM NaCl 和 20 mM MgCl<sub>2</sub>。

#### # "髮夾式"核酸雙螺旋結構之生成

由表二與濃度相依性的研究可知：寡核酸鏈 **H<sub>n</sub>** 在濃度 2 μM – 100 μM 範圍內，其紫外熔點溫度變化不大（平均值 ± 1 °C）。此乃意味者：寡核酸鏈 **H<sub>n</sub>** 可自我摺疊生成"髮夾式"核酸雙螺旋結構，如圖三所示。



表二 寡核酸鏈 **Hn** 之紫外熔點溫度。寡核酸鏈 **Hn** 之濃度為 2  $\mu\text{M}$ 。緩衝溶液為 20 mM acetate buffer 或 20 mM phosphate buffer，含 150 mM NaCl 和 20 mM  $\text{MgCl}_2$ 。

	concentration ( $\mu\text{M}$ )	$T_m$ ( $^{\circ}\text{C}$ )		
		<b>H2</b>	<b>H3</b>	<b>H4</b>
pH 6.0 (phosphate)	100	44	61	70
	50	43	60	69
	25	42	59	68
	2	44	60	70
	average $T_m$	43	60	69
pH 4.5 (acetate)	100	35	56	63
	50	35	56	63
	25	36	55	61
	2	37	57	61
	average $T_m$	36	56	62

#### # 髮夾長度 $n$ 與環境酸鹼值 pH 對核酸三螺旋結構之影響

從表三中我們可得下列訊息：

由紫外熔點實驗結果得知：在 pH 6.0 的緩衝溶液中，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 **Hn** 與 **Pn** 在髮夾長度  $n = 3-4$  時可聚合生成穩定的三螺旋結構；而寡核酸鏈 **H2** 與 **P2** 無法穩定聚合，因此僅觀測到寡核酸鏈 **H2** 自我摺疊生成雙螺旋結構解離的熔點溫度。

在 pH 4.5 的緩衝溶液中，寡核酸鏈 **Hn** 與 **Pn** ( $n = 2$  或 4) 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  $\text{C}^+ \text{GC}$  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。<sup>4</sup> 因此當酸鹼值由 pH 6.0 降至 pH 4.5 時，寡核酸鏈 **Hn** 與 **Pn** 間的 Hoogsteen 氫鍵作用力增強（因  $\text{C}^+ \text{GC}$  聚合更加穩定），因此我們觀測到核酸三螺旋體 **H3:P3** 之紫外熔點溫度上升（由  $7^{\circ}\text{C}$  升高至  $26^{\circ}\text{C}$ ）。依理類推，核酸三螺旋體 **H4:P4** 之穩定度也會增強；因此所觀測到核酸三螺旋體 **H4:P4** 之紫外熔點溫度  $60^{\circ}\text{C}$  為三螺旋直接解離至單股核酸鏈之熔點溫度，即所形成之核酸三螺旋體，其三螺旋結構幾乎可達到與"髮夾式"雙螺旋結構一樣的穩定。而在 pH 6.0 時，寡核酸鏈 **H2** 與 **P2** 相互作用的情況，需進一步地由圓二色光譜輔助鑑定核酸結構的變化。

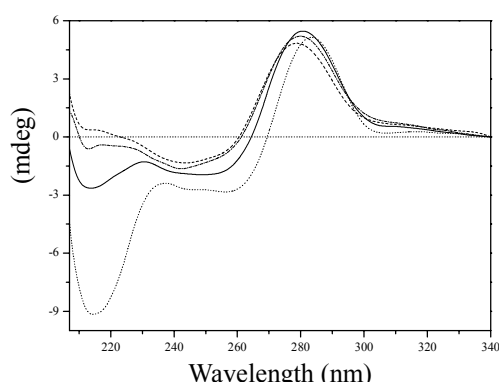
表三 寡核酸鏈  $H_n:P_n$  (1:1) 之紫外熔點溫度。每條寡核酸鏈的濃度為  $2 \mu\text{M}$ 。緩衝溶液為  $20 \text{ mM}$  acetate buffer 或  $20 \text{ mM}$  phosphate buffer，含  $150 \text{ mM}$  NaCl 和  $20 \text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$ 。紫外熔點溫度  $T_{m1}$  為第三股寡核酸鏈自 Watson-Crick 雙螺旋體解離之熔點溫度； $T_{m2}$  為 Watson-Crick 雙螺旋結構解離之熔點溫度。

	$T_{m1} / T_{m2}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	
	pH 4.5 (acetate)	pH 6.0 (phosphate)
<b>H2:P2</b>	/ 35	/ 44
<b>H3:P3</b>	26 / 57	7 / 61
<b>H4:P4</b>	60 <sup>a</sup>	27 / 70
<b>L1:L2</b>	/ 28	-
<b>L1:L2:P4</b>	30 <sup>a</sup>	-
<b>L3:P4</b>	/ 22	-

a:  $T_m$  為核酸三螺旋結構直接解離為單股寡核酸鏈之熔點溫度

圖四為寡核酸鏈  $H_n$  與  $P_n$  在 acetate buffer (pH 4.5) 所測得的圓二色光譜圖。含寡核酸鏈  $H_2$  與  $P_2$  之待測溶液在  $5^{\circ}\text{C}$  所獲得的圓二色光譜圖在波長  $240 \text{ nm}$  有一負吸收峰，其圖譜類型較接近寡核酸鏈  $H_3$  與  $P_3$  在  $45^{\circ}\text{C}$  ( $> T_{m1} : 26^{\circ}\text{C}$ ) 所獲得的圓二色光譜圖類型，而不同於寡核酸鏈  $H_n$  與  $P_n$  ( $n = 3-4$ ) 在  $5^{\circ}\text{C}$  所獲得的圓二色光譜圖類型 (在波長  $214 \text{ nm}$  有一負吸收峰) 經由圓二色光譜圖解析：寡核酸鏈  $H_2$  與  $P_2$  在 pH 4.5 仍無法穩定聚合生成三螺旋結構，因此在 pH 4.5 所測得的熔點溫度 ( $35^{\circ}\text{C}$ ) 為"髮夾式"雙螺旋  $H_2$  解離的熔點溫度。

由紫外熔點與圓二色光譜實驗結果得知：在酸性環境中 (pH 4.5-6.0)，寡核酸鏈  $H_n$  與  $P_n$  在髮夾長度  $n = 3-4$  時可聚合生成穩定的三螺旋結構；而寡核酸鏈  $H_2$  與  $P_2$  無法穩定聚合，因此僅觀測到寡核酸鏈  $H_2$  自我摺疊生成雙螺旋結構的熔點溫度。由表四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  $H_n$  與  $P_n$  ( $n = 3-4$ ) 所生成之三螺旋體穩定度越高。



圖四 圓二色光譜圖。每條寡核酸鏈的濃度為  $2 \mu\text{M}$ 。測量條件：pH 4.5、 $20 \text{ mM}$  acetate buffer、 $150 \text{ mM}$  NaCl 和  $20 \text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$ 。  
 $5^{\circ}\text{C}$ ：(---)  $H_2$  與  $P_2$ , (—)  $H_3$  與  $P_3$ ,  
 (...)  $H_4$  與  $P_4$  ;  $45^{\circ}\text{C}$ ：(---)  $H_3$  與  $P_3$ .

## # "髮夾式"與"直鏈式"之比較

由表三得知：同序列組成之"髮夾式"核酸雙螺旋體(H4)較"直鏈式"雙螺旋體(L1:L2)之紫外熔點溫度高，因此以核甘橋樑(-TTTT-)連結之"髮夾式"核酸雙螺旋體其穩定度較高 ( $\Delta T_m = 32^\circ\text{C}$ )。且當二者與目標股 P4 聚合時，"髮夾式"核酸探針亦具有較高的親和性 ( $\Delta T_m = 30^\circ\text{C}$ )。另者，目標股 P4 與其 Watson-Crick 互補股所聚合之雙螺旋體 (L3:P4)，其熔點溫度 ( $T_m = 22^\circ\text{C}$ ) 亦較由 Hoogsteen 氫鍵作用生成之核酸三螺旋體 H4:P4 ( $T_m = 60^\circ\text{C}$ ) 低許多。由此得知"髮夾式"核酸探針策略對目標股有相當好的親和性。

## # 緩衝溶液對核酸三螺旋結構之影響

另外，我們也針對在同一酸鹼值下，不同緩衝溶液對核酸三螺旋結構穩定度之影響作一探討。三螺旋體 H4:P4 在 pH 6.0 不同緩衝溶液中測得紫外熔點溫度 (dissociation of the Hoogsteen/Watson-Crick domains) 為  $27^\circ/70^\circ$  (phosphate)  $> 23^\circ/71^\circ$  (cacodylate)  $> 19^\circ/70^\circ$  (MOPSO)  $> 12^\circ/71^\circ$  (PIPES) (依照 Hoogsteen domain 之熔點溫度排序)。明顯地，緩衝溶液的種類對核酸三螺旋結構穩定度有很大的影響，但對"髮夾式"核酸雙螺旋結構穩定度影響不大。這部分我們正進一步在深入研究中。

## 參考文獻

1. Beal, P.A. and Dervan, P.B. *J. Amer. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4976.
2. 鍾采紋，中國文化大學應用化學所碩士論文，92年6月。
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. and Kan, L.-S. *Biochemistry* **2000**, *39*, 12457.
4. Chin, T.-M.; Tseng, M.-H.; Chung, K.-Y.; Hung, F.-S.; Lin, S.-B. and Kan, L.-S. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2001**, *19*, 543.

## 計畫成果自評

在計畫中原預定進行 5-氮去氧胞甘 ( $^a\text{C}$ ) 及其衍生物的合成，合成工作已完成並已將 5-氮去氧胞甘嵌入核酸三螺旋結構中進行物性研究。由實驗結果得知： $\text{G}^a\text{CG}$  和  $\text{A}^a\text{CG}$  可穩定聚合，幫助三螺旋結構的生成，因此達到原計畫中預期的目的：解除鹼基序列辨識限制的問題。同時，我們也業已建立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："髮夾式"核酸探針 Hn 與目標股 Pn，並探討長度 n、pH 與緩衝溶液種類對三螺旋結構之影響。此部份結果已撰寫成論文投稿 本報告之內容與原計畫相同，並已達成預期目標

