

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

※※※

※ 合成能解除核酸鹼基序列辨識限制之仿核甘酸與其物性研究 ※

※ Synthesis and Physical Study of Nucleotide Analog to Eliminate ※

※ the Limitation of DNA or RNA Sequence Recognition ※

※※※

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 89-2113-M-034-002-

執行期間：88年08月01日至89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 89 年 10 月 12 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：合成能解除核酸鹼基序列辨識限制之仿核甘酸與其物性研究
Synthesis and Physical Study of Nucleotide Analog to Eliminate the Limitation of
DNA or RNA Sequence Recognition

計畫編號：NSC 89-2113-M-034-002

執行期限：88年8月1日至89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：羅惠珍、陳皞卓、洪福松、廖文慧、黃友樵 中國文化大學應用化學所

一、中文摘要

寡核酸鏈 $TaCb$ ($5'$ -d-(TC) $_3Ta$ (CT) $_3Cb$ -(AG) $_3$, $a, b = 0-4$) 能自我摺疊形成迴紋針式核酸三螺旋結構，為尋找寡核酸鏈自我摺疊的最佳條件，及了解迴紋針式核酸三螺旋的物理性質，我們設計與合成一系列橋樑長度不同 ($a, b = 0-4$) 之寡核酸鏈，及變化寡核酸鏈濃度、溫度、鹽類種類和酸鹼度等環境條件，以 UV 熔點溫度實驗和 CD 光譜測量其物理性質。由實驗結果得知：寡核酸鏈 $TaCb$ ($a, b = 0-4$) 分別在酸性和中性環境中生成三螺旋和雙螺旋結構；且 $TaCb$ ($a, b = 1-4$) 之三螺旋（在 pH 4.5）和雙螺旋（在 pH 7.0 和 8.0）結構穩定度較不受橋樑長度（即 a, b 值）的影響；然而在 pH 6.0 時，三螺旋體的穩定度卻與橋樑長度有密切關係。因此新設計的仿核甘酸可在這經濟有效且敏銳的三螺旋模型系統中，測量其物理性質。此外，我們也合成仿核甘酸—2'-deoxypseudoisocytidine (D) 和 2'-O-methylpseudoisocytidine (M)，並將之嵌入上述寡核酸鏈 T2C2 中，取代在 Hoogsteen strand 之核甘酸 C。紫外光和圓二色光譜儀的物理性質測量結果顯示：在中性緩衝溶液中，當第三股的三個 C 都被 D 或 M 取代時，寡核酸鏈才能生成迴紋針式三螺旋體；且含 M 之寡核酸鏈所形成的三螺旋體，較相對應含 D 之三螺旋體所表現出之溶解溫度值為高。在此核酸三螺旋模型系統中我們證明：仿核甘酸 D 有類似 M 的性質，能取代

C，幫助寡核酸鏈在中性或弱鹼環境中生成三螺旋結構。

關鍵詞：迴紋針式核酸三螺旋、橋樑長度、仿核甘酸 2'-deoxypseudoisocytidine (D) 和 2'-O-methylpseudoisocytidine (M)

Abstract

The formation of a DNA "paper-clip" type triple helix with a common sequence $5'$ -d-(TC) $_3Ta$ (CT) $_3Cb$ (AG) $_3$ ($a, b = 0-4$) was studied by UV thermal melting experiments and CD spectra. These DNA oligomers form triplexes and duplexes in slightly acidic and neutral conditions, respectively. The stability of the formed triplexes (at pH 4.5) or duplexes (at pH 7.0 or 8.0) does not vary significantly with the size of loops ($a, b = 1-4$). At pH 6.0, the triplex stability is, however, a function of a and b . Thus, we have here a model system, $5'$ -d-(TC) $_3Ta$ -(CT) $_3Cb$ (AG) $_3$, that could form a triplex effectively with ($a, b = 1-4$) and without ($a, b = 0$) loops in acidic conditions. In addition, the triplex formation of oligomers with replacement of one, two, or three 2'-deoxycytidine in the Hoogsteen strand by either 2'-deoxypseudoisocytidine (D) or 2'-O-methylpseudoisocytidine (M) was also studied in the sequence $5'$ -d-(TX) $_3T_2$ (CT) $_3C_2$ -(AG) $_3$ ($X = C, D$ or M). Both CD spectra and UV melting results showed that only D3

((TX)₃ = (TD)₃) and M3 ((TX)₃ = (TM)₃) were able to form the “paper-clip” structure in both neutral and acidic conditions. The stability of M3 is slightly higher than that of D3 in the neutral conditions. We hereby proved that 2'-deoxypseudoisocytidine, similar to 2'-O-methylpseudoisocytidine, could replace 2'-deoxycytidine in the Hoogsteen strand to provide triplex formation at neutral pH.

Keywords: “paper-clip” type triple helix; the size of loops; 2'-deoxypseudoisocytidine (D); 2'-O-methylpseudoisocytidine (M)

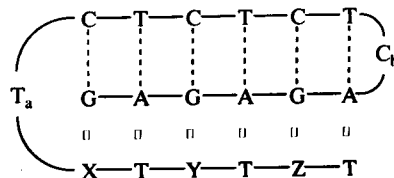
二、緣由與目的

寡核酸鏈與 RNA 或 DNA 形成三螺旋結構，應用在基因治療或基礎科學研究上，用以了解核酸的結構、性質與功能，因此具有多元用途之寡核酸鏈，與其相關的研究日益受到重視。鹼基三聚體—C⁺·GC，必須在弱酸性的環境中才能穩定聚合，而生物體之生理環境卻呈弱鹼性，被鹼中和之質子化胞嘧啶，遂而造成核酸三螺旋結構的不穩定。設計無需質子化的鹼基以取代胞嘧啶是目前研究發展的重點之一。我們已經證明：鹼基 pseudoisocytosine (^vC) 在結構上可與 guanosine 同時生成二個 Hoogsteen 氫鍵，因此在中性或弱鹼環境中可與 GC 鹼對生成穩定三聚體—^vC·GC。

在計畫中我們建立了新的、有效的核酸三螺旋模型系統：5'-d-(TC)₃T_a(CT)₃C_b-(AG)₃ (a, b = 0 - 4)，5'-d-C_b 與 5'-d-T_a 分別為連結 Watson-Crick 雙螺旋間以及第三股寡核酸鏈和雙螺旋間的橋樑(圖一)。這條很短的寡核酸鏈，在適當環境中可自我摺疊形成迴紋針式核酸三螺旋體，因此人工設計合成的仿核苷酸，可嵌入其中檢

測其對核酸三螺旋或雙螺旋結構之影響。為進一步了解此系統性質與尋找最佳的生成條件，我們變化橋樑長度(表一)以及環境條件，以 UV/VIS 和 CD 光譜儀觀測其物理性質。

同時，我們也合成仿核苷酸—2'-deoxy-pseudoisocytidine (D) 及 2'-O-methylpseudoisocytidine (M)，並以 phosphoramidite chemistry 的方法，在 DNA 自動合成儀上，將其嵌入上述三螺旋模型系統中(表一)。研究仿核苷酸 D 與 M 對核酸三螺旋結構穩定性之影響，並比較二者間所表現出之性質異同，以了解位置-2'之烷氧基對核酸三螺旋體穩定性之貢獻。



圖一：迴紋針式核酸三螺旋結構示意圖

三、結果與討論

我們用 UV/VIS 光譜儀來測量寡核酸鏈所生成之三螺旋或雙螺旋體在不同環境中的穩定性，這反映在熔解溫度值 (T_m) 上；CD 光譜儀則用來判別核酸三螺旋和雙螺旋結構的生成。我們探討在各種不同條件下，包括：寡核酸鏈濃度、溫度、鹽類種類和酸鹼度等，對核酸三螺旋或雙螺旋結構穩定度的影響。UV/VIS 光譜儀所量得的數據列於表二、表三和表四中； T_{m1} 為雙股螺旋解離為單股寡核酸鏈之熔解溫度， T_{m2} 則為第三股寡核酸鏈自雙螺旋體解離之溫度。從表中的數據分析，我們可得到下列訊息：

1. 由表二，寡核酸鏈 TaCb (a, b = 0 - 4) 在 pH 6.0 獲得兩個熔解溫度值，表示生成三螺旋結構。而在 pH 4.5、7.0 和 8.0

雖然都只表現出一個 T_m 值，但由 T2C2 在 15 °C 時之 CD 光譜可得知：當酸鹼度由 pH 4.5 升高至 pH 8.0 時，特色吸收峰 220 nm 消失，且位移至 240 nm，這個變化表示 Hoogsteen strand 由 Watson-Crick duplex 解離。因此在酸性環境中寡核酸鏈 TaCb (a, b = 0-4) 生成核酸三螺旋體，但在中性或鹼性環境中，僅能摺疊成雙螺旋結構。此乃因鹼基 C 在酸性環境中被質子化與 GC 鹼對生成氫鍵，聚合成 C⁺·GC，增加 Hoogsteen domain 的穩定度，使得在 pH 4.5 時 Hoogsteen domain 與 Watson-Crick domain 幾乎同時解離。

2. 由表三，濃度變化之 UV 熔點實驗可發現：在濃度 0.4 - 400 μ M 間，寡核酸鏈 TaCb (a, b = 0-4) 之 T_m 值變化在很小的一個範圍內 ($\pm 3^\circ\text{C}$)。可推知：生成的結構是分子內三螺旋，非分子間三螺旋，即寡核酸鏈 TaCb 傾向自我摺疊生成迴紋針式核酸三螺旋體，而非分子間聚合。
3. 由表二，在 pH 4.5、7.0 或 8.0 時，在同一酸鹼度下寡核酸鏈 TaCb (a, b = 1-4) 之 T_m 值變化表現在很小的一個範圍內，可推知：當 Hoogsteen domain 或 Watson-Crick domain 聚合緊密時，橋樑的長度 (a, b = 1-4) 對核酸三螺旋或雙螺旋結構穩定度只有些微的影響。但在 pH 6.0 時，Hoogsteen domain 的穩定度會受到橋樑長度影響，以 a, b = 2 對環境變化最敏銳，因此我們選擇寡核酸鏈 T2C2 做為研究核酸三螺旋物性之模型系統。
4. 由表二可知：在任何同樣環境中，寡核酸鏈 T0C0 之 T_m 值最低，進一步在 nmr 圖譜測得：三螺旋體之兩端鹼基三聚體，或解離或扭曲，以形成摺疊時所需之橋樑，因此穩定度較低。
5. 在模型系統 T2C2 中，仿核苷酸 D 與 M

取代 Hoogsteen strand 之核苷酸 C，所得結果列於表四。顯然地，當三個 C 都被 D 或 M 取代時，寡核酸鏈才能在中性環境中生成三螺旋體，且 M 比 D 更能幫助三螺旋結構的生成。同樣地，質子化的 D 或 M 可增加三螺旋結構的穩定度。鹽類 NaCl 或 MgCl₂ 對含 D 或 M 之三螺旋結構穩定度影響並不大。

四、計畫成果自評

在 89 年度計畫中，我們建立了經濟有效且敏銳的核酸三螺旋模型系統，且將仿核苷酸 D 與 M 成功地嵌入其中並測量其物理性質。仿核苷酸 D 之合成與性質尚未見諸文獻報導，本實驗室成功地發展出仿核苷酸 D 之合成方法且證明：仿核苷酸 D 確可取代在 Hoogsteen strand 中之核苷酸 C，與 GC 聚合幫助三螺旋結構在中性環境中生成，對反基因試劑的研究與發展有重要貢獻。數據結果已彙整撰寫成論文，將於 *Biochemistry* 第 39 期 (2000 年 10 月) 中發表。

五、參考文獻

1. 張富昭 單一寡核酸鏈之三螺旋之形成與構形研究—匝的長度與酸鹼值作用中國文化大學應用化學所，碩士論文。
2. 程郁郁 含假異胞嘧啶及其衍生物之去氧寡核酸鏈在水溶液中形成核酸三螺旋之研究 中國文化大學應用化學所，碩士論文。
3. 張木力 2'-deoxypseudoisocytidine Derivative 的合成與應用 中國文化大學應用化學所，碩士論文。
4. 李思吟 2'-O-methylpseudoisocytidine Derivative 的合成與應用 中國文化大學應用化學所，碩士論文。

表一：寡核酸鏈的序列

sequence (5'-3')	symbol	sequence (5'-3')	symbol
TCTCTC(T) ₀ CTCTCT(C) ₀ AGAGAG	T0C0	TMTCTC(T) ₂ CTCTCT(C) ₂ AGAGAG	M1
TCTCTC(T) ₁ CTCTCT(C) ₁ AGAGAG	T1C1	TMTMTC(T) ₂ CTCTCT(C) ₂ AGAGAG	M2
TCTCTC(T) ₂ CTCTCT(C) ₂ AGAGAG	T2C2	TMTMTM(T) ₂ CTCTCT(C) ₂ AGAGAG	M3
TCTCTC(T) ₃ CTCTCT(C) ₃ AGAGAG	T3C3	TDTCTC(T) ₂ CTCTCT(C) ₂ AGAGAG	D1
TCTCTC(T) ₃ CTCTCT(C) ₄ AGAGAG	T3C4	TDTDTC(T) ₂ CTCTCT(C) ₂ AGAGAG	D2
TCTCTC(T) ₄ CTCTCT(C) ₃ AGAGAG	T4C3	TDTDTC(T) ₂ CTCTCT(C) ₂ AGAGAG	D3
TCTCTC(T) ₄ CTCTCT(C) ₄ AGAGAG	T4C4		

表二：寡核酸鏈 (5'-d-(TC)₃T_a(CT)₃C_b(AG)₃ a, b = 0-4) 之熔點溫度 (°C)

pH =	4.5		6.0		7.0		8.0	
	oligomer	T _{m1} /T _{m2}	T _{m1}	T _{m2}	T _{m1}	T _{m2}	T _{m1}	T _{m2}
	T0C0	56	32	55	57	57		
	T1C1	66	43	67	66	66		
	T2C2	60	15	64	63	64		
	T3C3	63	29	66	63	62		
	T3C4	63	25	64	63	62		
	T4C3	64	22	64	64	64		
	T4C4	63	17	65	65	63		

表三：寡核酸鏈 (5'-d-(TC)₃T_a(CT)₃C_b(AG)₃ a, b = 0-4) 在 pH 4.5 溶液中之熔點溫度

conc. (μM)	T _m (°C)						
	T0C0	T1C1	T2C2	T3C3	T3C4	T4C3	T4C4
4.0×10 ⁻¹	52	64	61	64	66	66	62
4.0×10 ⁰	56	66	60	63	63	64	63
4.0×10 ¹	55	66	60	60	60	65	62
4.0×10 ²	-	69	58	59	60	64	60

表四：寡核酸鏈 (D1、D2、D3、M1、M2 和 M3) 之熔點溫度 (°C)

oligomer		D1	M1	D2	M2	D3	M3	
pH 4.5	T _{m1}	60	60	53	30	29	25	
	T _{m2}				65	63	67	
pH 7.0	T _{m1}					5	18	
	T _{m2}	65	65	66	63	67	67	
MgCl ₂	pH 4.5	T _{m1}	-	-	-	-	32	26
		T _{m2}	-	-	-	-	63	67
	pH 7.0	T _{m1}	-	-	-	-	10	21
		T _{m2}	-	-	-	-	65	67