



行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

探討位置-2' 取代基對核酸三螺旋穩定度的影響和核酸探針的設計與物性
研究

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC 93-2113-M-034-003

執行期間：93年08月01日至94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：彭工及、廖博生、王子寧、廖聖英

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 94 年 10 月 25 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：探討位置-2'取代基對核酸三螺旋穩定度的影響
和核酸探針的設計與物性研究

The Effect of 2'-Substituent on Stability of Triple-Helical Nucleic Acid
and Design/Physical Study of Nucleic Acid Probe

計畫編號：NSC 93-2113-M-034-003-

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：彭工及、廖博生、王子寧、廖聖英 中國文化大學應用化學所

摘要

核酸序列 5'-d-(AG)_n 和 5'-d-(TC)_n 為基因中常出現的序列，我們針對此二基因序列設計與發展髮夾式寡核酸鏈探針 5'-d-(TC)_nT₄(CT)_n 和 5'-d-(AG)_nT₄(CT)_n。寡核酸鏈探針自身的檢測靈敏度，及其對目標核酸鏈的親和性與辨識專一性，都是決定寡核酸鏈探針效益的重要考量。在本計畫中即分成二個項目進行研究，期望發展出兼具多項優點之寡核酸鏈探針。

1.發展親和性高和抗酵素降解作用佳之寡核酸鏈試劑。探討核苷之夫喃糖構形 (C2'-endo 或 C3'-endo) 及鹼基之厭水性取代基對髮夾式核酸三螺旋結構穩定度的影響。在 93 年度研究計畫中，設計與合成位置-2'經化學修飾的尿苷衍生物—2'-deoxyuridine(傾向 C2'-endo 構形)和 2'-O-methyluridine(傾向 C3'-endo 構形)，並將之嵌入寡核酸鏈中進行物性測量與分析。同時也合成了一系列寡核酸鏈組 (實驗組一：5'-d-(XC)₃T₄(CY)₃ + 5'-d-(AG)₃；實驗組二：5'-d-(CX)₃T₄(YC)₃ + 5'-d-(GA)₃；X, Y = thymidine、2'-O-methyluridine、2'-deoxyuridine)。經紫外光熔點實驗測量獲得熔點溫度，得知在髮夾式核酸三螺旋結構中，位置-2'以甲氧基取代可大幅提昇三螺旋結構的穩定度，比 5-甲基對髮夾式核酸三螺旋結構穩定度的影響更為重要；且 C3'-endo 的夫喃糖構形比 C2'-endo 的構形更能幫助髮夾式核酸三螺旋結構的生成。

2.發展生成核酸三螺旋結構的螢光寡核酸鏈探針。將寡核酸鏈鏈結螢光物質 (Fluorescein, F) 或可吸收螢光能量的抑制物 (dabcyl, Q)，運用靈敏的螢光訊號強弱變化及螢光能量傳遞現象，探索螢光寡核酸鏈探針和目標分子間交互作用的行為。在本期計畫中合成了螢光寡核酸鏈 5'-d-TCTCTCTCTTTTGGAGAGAGA-F、5'-F-d-AGAGAGAGTTTTCTCTCTCT，以及目標寡核酸鏈 5'-d-CTCTCTCT-Q、5'-d-TCTCTCTC-Q，主要目的是運用螢光寡核酸鏈探針的特色，探討核酸三螺旋結構中 Hoogsteen strand 相對於 Watson strand 的相對方向性，同時也可作為核酸三螺旋結構生成之輔助實驗證明。由螢光實驗結果顯示，在 py·pupy 類型的核

酸三螺旋結構中，Hoogsteen strand 相對於 Watson strand 應是以平行的方向產生氫鍵作用力，纏繞在雙螺旋之大凹槽內，與雙螺旋雜合生成三螺旋體。

關鍵詞：髮夾式核酸三螺旋結構、夫喃糖構形、位置-2'化學修飾的尿苷衍生物、螢光寡核酸鏈探針

Abstract

The studies of oligonucleotide-directed triple helix (triplex) formation have been a wide spreading event. The 5'-d-(AG)_n and 5'-d-(TC)_n sequences are found at unexpectedly high levels in eukaryotic genomes. The strategies provided here will give the homopyrimidine and homopurine sequences to be recognized by an oligonucleotide through the triplex formation. It is very important to enhance the sensitivity of an oligonucleotide as a probe, and the binding affinity and specificity to the target nucleic acid. In this research project, two subjects are highlighted as the following.

1. To investigate the stability of nucleic acid triple helices containing 2'-modified uridine in the Hoogsteen domain and/or the Watson-Crick domain. The electronegativity of a 2'-substituent makes the furanosyl conformation of a nucleotide different. In this project, uridine derivatives with a variety of substituents on the position-2' have been synthesized, such as 2'-deoxyuridine with a tendency to show the C2'-endo conformation and 2'-*O*-methyluridine preferring the C3'-endo conformation. It has been also made a series of hairpin-type triplex-forming oligonucleotides (5'-d-(XC)₃T₄(CY)₃ + 5'-d-(AG)₃; 5'-d-(CX)₃T₄(YC)₃ + 5'-d-(GA)₃; X, Y = thymidine, 2'-deoxyuridine or 2'-*O*-methyluridine). The UV thermal melting experiments indicate that the 2'-methoxy group is better than the 5-methyl group on enhancing the hairpin-type triplex stability, and the C3'-endo conformation of the furanosyl ring facilitates the triplex formation relative to the C2'-endo conformation.

2. To design triplex-forming fluorescent probes. Oligonucleotides covalently linked to a fluorescent dye (fluorescein, F) or a quencher (dabcyl, Q) are designed to probe interactions between biomolecules, to study the orientation of a Hoogsteen strand relative to the purine strand of a Watson-Crick duplex, and to detect the triplex formation. It has been made a series of fluorescent oligonucleotides including 5'-d-TCTCTCTCTTTGAGAGAGA-F and 5'-F-d-AGAGAGAGTTTCTCTCTCT, as well as the targets 5'-d-CTCTCTCT-Q and 5'-d-TCTCTCTC-Q. The fluorescent experiments indicate that the Hoogsteen strand in the py • pupy-type triplex winds parallel to the Watson strand, and binds to a Watson-Crick duplex in the major groove

through the hydrogen bonding.

Keywords: hairpin-type triple helix, the furanosyl conformation of a nucleotide, 2'-modified uridine, fluorescent oligonucleotide

計畫緣由與目的

寡核酸鏈能辨識互補 DNA 或 RNA 的功能，使得與寡核酸鏈相關的研究及其潛在的應用獲得世人的重視，其中一種辨識核酸的策略便是生成核酸三螺旋結構。一個良好的核酸探針必須具備與目標物有高親和性與辨識專一性，並且容易合成製備，才能廣為應用。形成髮夾式或環狀式的核酸三螺旋結構通常要比直鏈式三螺旋構型更為穩定，甚至比同長度、同序列之雙螺旋體的熔解溫度值高。此乃因其中兩股核酸鏈連結一起後，可彼此相互作用較不易解離，進而增加三螺旋結構的穩定性。此外由於目標物經過 Watson-Crick domain 和 Hoogsteen domain 兩次的辨識，其所表現出的鹼基序列辨識專一性也都較形成直鏈式三螺旋構型之寡核酸鏈為佳。而單股自我摺疊之髮夾式核酸探針較環狀式核酸探針在合成製備上更為容易，因此具多項優點（容易合成製備、高親和性、良好專一性）的髮夾式核酸探針，具有相當的發展潛力與發展空間。在 93 年度執行計畫中，我們以髮夾式核酸三螺旋結構為研究目標，進行下列二項課題的實驗探討。

1. 探討夫喃糖構形對核酸三螺旋結構穩定度的影響

未經化學修飾過的寡核酸鏈在細胞內極易受到核酸水解酵素的攻擊，造成磷酸二酯鍵的斷裂。寡核酸鏈含位置-2'化學修飾之核苷酸可增強其抗酵素降解性（nuclease resistance），同時位置-2'若以高電負度的取代基修飾，使夫喃糖呈現 C3'-endo 構形，可增加雙螺旋結構的穩定性。但位置-2'經化學修飾之核苷酸對核酸三螺旋穩定度的影響目前尚不清楚。本計畫即針對位置-2'被修飾之核苷酸（夫喃糖呈現 C3'-endo 或 C2'-endo 構形）對核酸三螺旋體之 Hoogsteen domain 和 Watson-Crick domain 的穩定度影響，作一系列研究探討。設計與合成一系列生成髮夾式核酸三螺旋結構之寡核酸鏈，並化學合成在位置-2'上作取代修飾的尿苷衍生物（包括 2'-deoxyuridine 和 2'-O-methyluridine），將之嵌入寡核酸鏈中。同時在寡核酸鏈嵌入尿苷衍生物之位置置換胸苷做性質比較，探討位置-2'取代基之電負度及位置-5 取代基之厭水性作用力，對核酸三螺旋結構穩定度的影響。期能開發穩定度高、專一性佳、抗酵素降解性好之寡核酸鏈探針。

2. 螢光寡核酸鏈探針的設計與合成

螢光寡核酸鏈探針的發展近年來非常受到矚目，主要的偵測原理是設計一段寡核酸鏈能與目標物（DNA、RNA 或 protein）相互作用，並在此寡核酸鏈上鍵結螢光物質作為特異性標誌。目前常用的螢光寡核酸鏈探針偵測系統有 FRET

(fluorescence resonance energy transfer)、TaqMan、molecular beacon、scorpion primer 等。螢光寡核酸鏈探針適合在 *in vivo* 和 *in vitro* 的環境中，定量、定性分析 DNA、RNA 和 protein 的微量樣品。除了學術研究上的需要，現今以寡核酸鏈探針做 DNA 分析為主的檢驗項目，在臨床上的應用範圍十分廣泛，包括基因分型、腫瘤篩檢、血清免疫分析、微生物鑑定等，因此螢光寡核酸鏈探針極具未來發展的潛力。在核酸三螺旋結構中有關 Hoogsteen strand 的方向性（即相對於雙螺旋之嘧啶鏈為同一方向或反向），在文獻上一直未有確切的實驗證明。在 93 年度研究計畫中我們初次以螢光寡核酸鏈探針做為研究題目，設計與合成一系列生成髮夾式核酸三螺旋結構之寡核酸鏈，並將之接上螢光化學基團和吸收螢光能量之抑制基團；運用螢光寡核酸鏈探針具有核酸分子辨識專一性和螢光技術高靈敏度的特色，探索 Hoogsteen strand 相對於雙螺旋之嘧啶鏈（即核酸三螺旋結構中之 Watson strand）的相對方向性，並作為核酸三螺旋結構生成之輔助實驗證據。

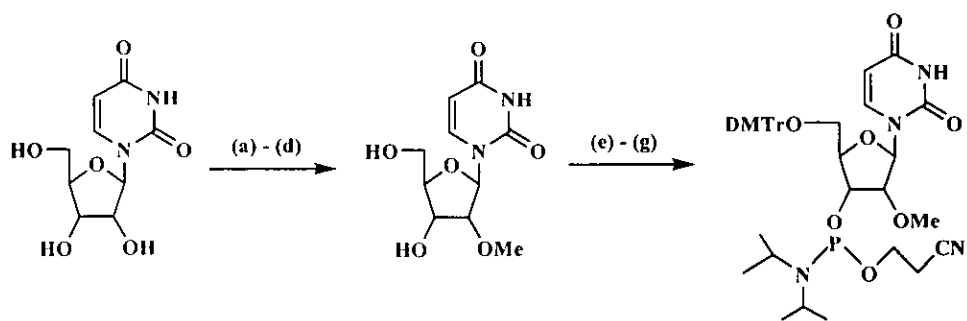
計畫進度報告

1. 探討夫喃糖構形對核酸三螺旋結構穩定度的影響

DNA 與 RNA 在結構上的不同處有二，一是鹼基 T 與 U 之不同，其差異在鹼基 T 之位置-5 有一個甲基取代基，而鹼基 U 之位置-5 為氫；第二個差異即在夫喃糖位置-2' 的官能基變化上，RNA 為 2'-OH，DNA 則為去氧結構（2'-H）。這不僅使得雙螺旋 DNA 和雙螺旋 RNA 的構形及穩定度不同，也使得 DNA 和 RNA 的化學性質與生化功能有所差異。根據構形研究：位置-2' 若為高電負度的取代基會使夫喃糖以 C3'-endo 的構形為主，若為弱電負度取代基則傾向 C2'-endo 的構形。因為目前大部分與夫喃糖構形變化相關的實驗數據，多是針對雙螺旋核酸，有關 homotriplex 與 heterotriplex 結構穩定度的討論，在文獻上報導的非常有限，且大都侷限在由天然核苷酸所組成的寡核酸鏈中，對位置-2' 經化學修飾之核酸三螺旋的系列探討是付諸闕如。因此在本期計畫中，夫喃糖構形對核酸三螺旋穩定度的影響是我們目前首要探討的課題。

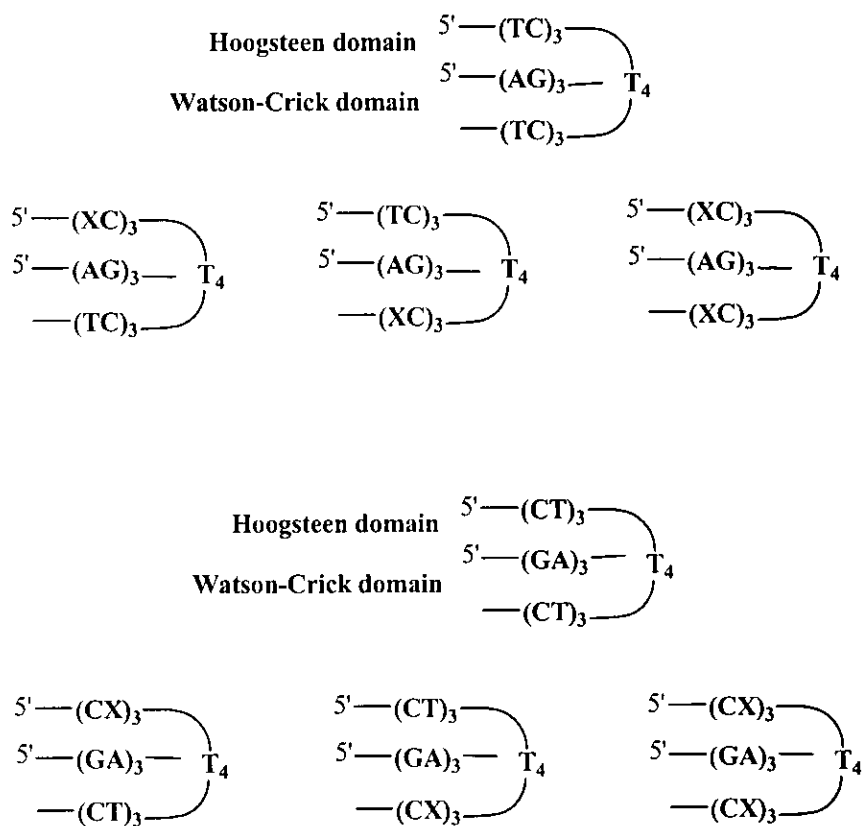
首先我們合成了尿苷衍生物 2'-O-methyluridine (M；夫喃糖以 C3'-endo 的構形為主)，合成流程步驟簡繪於圖一，並以 phosphoramidite chemistry 的方式，運用 DNA 自動合成儀將之嵌入能形成髮夾式核酸三螺旋結構之寡核酸鏈中（如圖二所示）。在與之相對的比較組中，我們在 2'-O-methyluridine 之相同位置我們亦以 2'-deoxyuridine (D；夫喃糖以 C2'-endo 的構形為主) 和 thymidine (T) 替代之。所合成之寡核酸鏈序列及其代號列於表一。

圖一 尿苷衍生物 2'-O-methyluridine derivative 之合成流程簡圖



(a) TIPDSCl₂, Py, -15 °C (b) TolCl, Et₃N, DMA (c) CH₃I, Ag₂O, Benzene (d) NH₄OH, 1,4-dioxane (e) *n*-Bu₄NF, THF (f) DMTrCl, Py (g) *i*-Pr₂NP(Cl)O(CH₂)₂CN, *i*-Pr₂NEt

圖二 髮夾式核酸三螺旋結構示意圖



表一 設計與合成的寡核酸鏈鹼基序列及其代號

代 號	寡核酸鏈序列	備 註
XC3T4CY3	5'-d-(XC) ₃ T ₄ (CY) ₃	X, Y = T、2'-deoxyuridine (D)、 2'-O-methyluridine (M)
CX3T4YC3	5'-d-(CX) ₃ T ₄ (YC) ₃	
AG3	5'-d-AGAGAG	
GA3	5'-d-GAGAGA	

在物理性質測量方面，我們運用紫外光/可見光分光光譜儀進行紫外光熔點實驗，偵測寡核酸鏈探針與目標股生成雙螺旋或三螺旋結構，及其在不同溶液環境中和不同溫度下的結構穩定度，這可由熔點溫度值(T_m)的高低來判斷。實驗組 XC3T4CY3 (寡核酸鏈探針 XC3T4CY3 + 目標股 AG3)，或者實驗組 CX3T4YC3 (CX3T4YC3 + GA3)，經紫外光熔點實驗測量得知，二個組合之探針股和目標股在適當的溶液環境條件下，可藉由氫鍵等作用力生成髮夾式核酸三螺旋結構。相關的實驗條件、實驗數據 (表二) 以及實驗結果討論敘述於下。

實驗條件：紫外光觀測波長 260 nm；石英比色管光徑長 1 cm

寡核酸鏈實驗組各以 2 μ M、1:1 的比例混合置備

緩衝溶液條件：150 mM NaCl、20 mM MgCl₂、20 mM acetate buffer (pH 4.5)

150 mM NaCl、20 mM MgCl₂、20 mM phosphate buffer (pH 6.0)

表二 寡核酸鏈之實驗組合和紫外光熔點實驗結果

實驗組 編號	寡核酸鏈實驗組	紫外光熔點溫度 T_m (°C)	
		pH 4.5	pH 6.0
1	TC3T4CT3 + AG3	30	22
2	CT3T4TC3 + GA3	29	21
3	TC3T4CD3 + AG3	31	23
4	DC3T4CT3 + AG3	33	23
5	DC3T4CD3 + AG3	30	23
6	CT3T4DC3 + GA3	28	24
7	CD3T4TC3 + GA3	31	21
8	CD3T4DC3 + GA3	29	21
9	MC3T4CM3 + AG3	38	31
10	MC3T4CT3 + AG3	38	32
11	TC3T4CM3 + AG3	37	28

結果討論 1

由表三之實驗數據可推得：髮夾式核酸三螺旋結構在組類中 XC3T4CY3 或 CX3T4YC3，因相對熔點溫度值接近，表示鹼基序列起始排列順序對結構之穩定度影響有限，可能因所探討之核酸三螺旋的立體結構很小，所以鹼基層疊作用力大小差異不大。

表三 在 pH 4.5 和 pH 6.0 緩衝溶液中，髮夾式核酸三螺旋 XC3T4CY3 和 CX3T4YC3 之熔點溫度比較

實驗組 (a) vs (b)		實驗組 (1) vs (2)	實驗組 (3) vs (6)	實驗組 (4) vs (7)	實驗組 (5) vs (8)
熔點溫度差 ΔT_m (°C) ($T_m(a) - T_m(b)$)	pH 4.5	1	3	2	1
	pH 6.0	1	-1	2	2

結果討論 2

由表四的實驗數據可推論得知：

- (1) 含有 2'-O-methyluridine 之髮夾式核酸三螺旋結構較含 2'-deoxyuridine 之髮夾式核酸三螺旋結構，所顯示之紫外光熔點溫度高，差值約 5~9 °C。因此夫喃糖構形 C3'-endo 較 C2'-endo 顯然更能幫助髮夾式核酸三螺旋結構的生成。
- (2) 實驗組 (MC3T4CM3 + AG3) 在磷酸緩衝溶液，當 Hoogsteen domain 含 2'-O-methyluridine 時，髮夾式核酸三螺旋結構會有較佳的穩定度。

表四 核苷衍生物 2'-O-methyluridine 和 2'-deoxyuridine 對髮夾式核酸三螺旋結構穩定度的影響

實驗組 (a) vs (b)		實驗組 (11) vs (3)	實驗組 (10) vs (4)	實驗組 (9) vs (5)
熔點溫度差 ΔT_m (°C) ($T_m(a) - T_m(b)$)	pH 4.5	6	5	8
	pH 6.0	5	9	8

結果討論 3

表五的實驗數據可推論得知：

- (1) 2'-O-methyluridine 較 thymine 更能穩定髮夾式核酸三螺旋結構，亦即夫喃糖構形對髮夾式核酸三螺旋結構穩定度的影響，相較鹼基上置放厭水性取代基增加厭水性作用力，更能輔助髮夾式核酸三螺旋結構的生成。
- (2) 在核苷酸化學結構上 2'-deoxyuridine 與 thymidine 之差異為：thymidine 在位置 -5 較 2'-deoxyuridine 多一個甲基化學基團。由實驗結果顯示，在體積很小的髮夾式核酸三螺旋體中，化學基團甲基所生成的厭水性作用力，對髮夾式核酸

三螺旋結構穩定度的貢獻幾乎可以忽略。

表五 尿苷衍生物 2'-O-methyluridine 和 2'-deoxyuridine 與胸苷 thymidine 對髮夾式核酸三螺旋結構穩定度的影響

實驗組 (a) vs (b)		實驗組 (9) vs (1)	實驗組 (5) vs (1)	實驗組 (8) vs (2)
熔點溫度差 ΔT_m (°C) ($T_{m(a)} - T_{m(b)}$)	pH 4.5	8	0	0
	pH 6.0	9	1	0

2. 髮夾式螢光寡核酸鏈探針的運用—核酸鏈相對方向性的研究

螢光寡核酸鏈探針即為一條寡核酸鏈鍵結攜帶螢光性物質作為特異性標誌，它為生物分子間交互作用的研究提供了相當大的便利。在核酸三螺旋結構中有關 Hoogsteen strand 的方向性（即相對於雙螺旋之嘧啶鏈為同一方向或反向），在文獻上一直未有確切的實驗證明。我們運用螢光能量傳遞（fluorescence resonance energy transfer, FRET）的現象，探索 Hoogsteen strand 相對於雙螺旋之嘧啶鏈（即核酸三螺旋結構中之 Watson strand）的相對方向性。在核酸鏈相對方向性的研究中，實驗設計是將髮夾式寡核酸鏈探針的 5'-端或 3'-端接上螢光標誌（fluorescein、F），在 Hoogsteen strand 的 3'-端接上吸收螢光能量的抑制物（dabcyl、Q）。因為螢光能量傳遞的效率與兩物質間的距離成極劇負相關，敏銳變化的相對螢光強度，將可讓我們對寡核酸鏈雜合結構中之相對方向性會有更進一步的瞭解。

螢光儀實驗條件：激發光波長 485 nm；激發光光柵 10 nm；放射光光柵 10 nm

緩衝溶液條件：150 mM NaCl、20 mM MgCl₂、20 mM acetate buffer (pH 4.5)

設計與合成的寡核酸鏈鹼基序列如下所示：

代號	寡核酸鏈鹼基序列
GAF	5'-d-TCTCTCTCTTTTGAGAGAGA-F
FAG	5'-F-d-AGAGAGAGTTTTCTCTCTCT
CTD	5'-d-CTCTCTCT-D
TCD	5'-d-TCTCTCTC-D

寡核酸鏈之實驗組合：

實驗組一：GAF、GAF + CTD、GAF + TCD

實驗組二：FAG、FAG + TCD

計畫成果自評

在本期計畫中我們發展髮夾式核酸三螺旋結構，針對基因中常出現的序列 5'-d-(AG)_n 和 5'-d-(TC)_n，設計與發展寡核酸鏈探針 5'-d-(TC)_nT₄(CT)_n 和 5'-d-(AG)_nT₄(CT)_n，探針與目標序列將形成髮夾式核酸三螺旋結構來進行分子辨識。主要研究題目分二個方向進行，其一為：探討夫喃糖構形和厭水性作用力對髮夾式核酸三螺旋結構的影響；合成了尿苷衍生物 2'-O-methyluridine (其夫喃糖傾向 C3'-endo 立體構形) 並將之嵌入寡核酸鏈中，使之出現在髮夾式核酸三螺旋結構中之 Watson-Crick domain 和 Hoogsteen domain。同時我們也在三螺旋結構中 2'-O-methyluridine 之位置，以 2'-deoxyuridine (其夫喃糖傾向 C2'-endo 立體構形) 和 thymidine 置換取代。經由核苷衍生物的有機合成工作，及紫外光熔點測量實驗，關於研究計畫中欲探討之研究課題—夫喃糖構形和鹼基之厭水性取代基二者對立體結構較小之髮夾式核酸三螺旋結構穩定度的影響，已獲得諸多的實驗成果及進一步地了解。另外，我們也初次開始進行螢光寡核酸鏈探針的實驗，將螢光物 fluorescein 鍵結在寡核酸鏈的 3'端或 5'端，運用螢光能量傳遞現象探討生物分子間之交互作用。在 93 年度計畫中，我們所規劃的研究題目為：在 py·pupy 類型的核酸三螺旋結構中，Hoogsteen strand 相對於 Watson strand 的方向性探索。在這個課題上我們也獲得螢光實驗結果，證實了 Hoogsteen strand 相對於 Watson strand 以平行的方向與嘌呤鏈進行雜合，構成核酸三螺旋體。本報告之內容與原計畫相同，並已達成目標。