

การสังเคราะห์สีย้อมสไตริลที่มีตัวดับแสงสำหรับการตรวจวัดดีเอ็นเอ

Synthesis of quencher-modified styryl dye for DNA detection

โดย

นางสาวอภิชญา บำรุงเมือง

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2563

โครงการ การสังเคราะห์สีย้อมสไตริลสำหรับการตรวจวัดดีเอ็นเอ

โดย นางสาวอภิชญา บำรุงเมือง

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

- | | |
|---------------------------------------|------------------|
| 1. ศาสตราจารย์ ดร.สัมฤทธิ์ วัชรสินธุ์ | ประธานกรรมการ |
| 2. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นำพล อินสิน | กรรมการ |
| 3. ศาสตราจารย์ ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์ | อาจารย์ที่ปรึกษา |

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

.....
(ศาสตราจารย์ ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์)
อาจารย์ที่ปรึกษา

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.วรวิทย์ โฮเวณ)
หัวหน้าภาควิชาเคมี

วันที่ 27 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2564

ชื่อโครงการ การสังเคราะห์สีย้อมสไตริลที่มีตัวดับแสงสำหรับการตรวจวัดดีเอ็นเอ
 ชื่อนิสิตในโครงการ นางสาวอภิชญา บำรุงเมือง เลขประจำตัว 6033108323
 ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ศาสตราจารย์ ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์
 ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2563

บทคัดย่อ

สีย้อมสไตริลนิยมนำมาใช้ในการตรวจวัดดีเอ็นเอเนื่องจากมีสมบัติที่พึงประสงค์หลายประการ เช่น สังเคราะห์ได้ง่าย สามารถปรับแต่งโครงสร้างได้ตามต้องการ ความเสถียรเชิงแสงและแสดงการเพิ่มขึ้นของการวาวแสงเมื่อเข้าจับกับดีเอ็นเอ งานวิจัยนี้มีเป้าหมายที่จะพัฒนาสีย้อมสไตริลชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้น โดยคาดว่า การเพิ่มตัวดับแสงเข้าไปที่ตัวสีย้อมทำให้ความเข้มของการวาวแสงของสีย้อมอิสระจะมีค่าต่ำลงและทำให้มีประสิทธิภาพการตรวจวัดดีเอ็นเอที่ดีขึ้น ในงานวิจัยนี้ได้สังเคราะห์สีย้อมสไตริลฐานเบนโซโทอะโซเลียม 3 ชนิดที่มีตัวดับแสง (dinitrophenyl - DNP, anthraquinone - AQ) และ ตัวเชื่อม (C4 และ TEG) ที่แตกต่างกันได้แก่ BT-DNP, BT-AQ และ BT-O-AQ โดยมีปริมาณผลผลิตอยู่ในช่วงร้อยละ 31-51 และยืนยันโครงสร้างสีย้อมด้วยเทคนิค ^1H NMR และ ^{13}C NMR จากการทดลองพบว่าสีย้อมที่สังเคราะห์ได้แสดงการเปลี่ยนแปลงของการดูดกลืนแสงและการวาวแสงเมื่อจับกับดีเอ็นเอ โดย BT-O-AQ ที่มี AQ เป็นตัวดับแสงเชื่อมต่อกับสีย้อมสไตริล BT ด้วยตัวเชื่อม TEG แสดงการเปลี่ยนแปลงของการวาวแสงมากที่สุด (100 เท่า) อีกทั้งการเกิด blue shift ของการดูดกลืนแสง ซึ่งแสดงถึงการเกิด H-aggregate ของสีย้อมสำหรับสีย้อม BT-DNP และ BT-AQ มีความเข้มของการวาวแสงเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อจับกับดีเอ็นเอและเมื่ออยู่ในเกลียวซอร์อล แสดงให้เห็นว่าตัวดับแสงที่ต่ออยู่กับตัวเชื่อม C4 ยังสามารถดับแสงของสีย้อมที่จับกับดีเอ็นเอได้อยู่แม้ว่าการหมุนของพันธะคู่ที่เชื่อมระหว่างส่วนให้และรับอิเล็กตรอนจะถูกจำกัด สีย้อม BT-O-AQ มีสเปกตรัมการดูดกลืนแสงที่ต่างกันดีเอ็นเอสายเดี่ยวและสายคู่ รวมทั้งในดีเอ็นเอ (AT)₁₀ และ (GC)₁₀ ในขณะที่จะสังเกตเห็นการเกิด blue shift เฉพาะในภาวะที่มีดีเอ็นเอสายคู่และดีเอ็นเอ (GC)₁₀ เท่านั้น แสดงให้เห็นว่าการเกิด blue shift น่าจะเกี่ยวข้องกับการเกิด intercalation ของตัวดับแสง AQ สีย้อม BT-O-AQ แสดงการวาวแสงเพิ่มขึ้นใกล้เคียงกันทั้งในภาวะที่มีดีเอ็นเอสายเดี่ยวและสายคู่ แต่จะมีความเข้มการวาวแสงเพิ่มขึ้นมากในภาวะที่มีดีเอ็นเอ (AT)₁₀ เมื่อเทียบกับ (GC)₁₀ สุดท้ายทดลองการตอบสนองของสีย้อมต่อเกลือทั้งในภาวะที่มีดีเอ็นเอและไม่มีดีเอ็นเอ พบว่าการเติมเกลือจะทำให้สีย้อมหลุดออกจากดีเอ็นเอดังจะเห็นได้จากความเข้มของการวาวแสงที่ลดลงถึงร้อยละ 50 โดยสรุปงานวิจัยนี้สามารถสังเคราะห์สีย้อมสไตริลที่มีความเข้มการวาวแสงของสีย้อมอิสระที่ต่ำและมีการเพิ่มขึ้นของการวาวแสงที่สูงเมื่อเข้าจับกับดีเอ็นเอ รวมถึงแสดงการเกิด blue shift ของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงเมื่ออยู่ในภาวะที่มีดีเอ็นเอสายคู่และดีเอ็นเอ (GC)₁₀ สมบัติเหล่านี้ทำให้สีย้อม BT-O-AQ มีความเหมาะสมในการนำไปใช้ตรวจวัดดีเอ็นเอ แต่ยังคงต้องมีการพัฒนาความเสถียรของสีย้อมในภาวะที่มีเกลือต่อไป

คำสำคัญ: สีย้อมสไตริล, ตัวดับแสง, ดีเอ็นเอ, ฟลูออเรสเซนส์, อินเทอร์คาลิน

Project Title Synthesis of quencher modified styryl dye for DNA detection
Student Name Miss Apichaya Bumrungmueang Student ID 6033108323
Advisor Name Tirayut Vilaivan, D.Phil.

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic Year 2020

Abstract

Styryl dyes have been used extensively for the fluorescence detection of DNA because of their many desirable characteristics including the ease of synthesis, structural fine-tuning, photostability, and the ability to increase fluorescence intensity when binding to DNA. In this study, we aim to develop new styryl dyes with a better performance. By incorporating the quencher, the fluorescence background of the dye is expected to be lower and thus improving the efficiency of DNA staining. Three benzothiazolium-based styryl dyes with different quenchers (dinitrophenyl - DNP, anthraquinone - AQ) and linkers (C4 and TEG), namely **BT-DNP**, **BT-AQ**, and **BT-O-AQ**, were synthesized with percentage yields in the range of 31-51. The structures of the dyes were confirmed by ^1H and ^{13}C NMR. All dyes showed UV absorption and fluorescence change in the presence of DNA. The **BT-O-AQ** dye with AQ quencher linked to the BT styryl dye through a TEG linker showed the largest fluorescence change (100-fold). The **BT-O-AQ** dye also showed a blue-shifted absorption suggesting the formation of H-aggregates. The dyes **BT-DNP**, **BT-AQ** showed very small fluorescence increase in the presence of DNA and in glycerol. This suggested that the quencher attached to the C4 linker may still effectively quench the DNA-bound dye even when the rotation of the double bond joining the electron donor and acceptor was restricted. The dye **BT-O-AQ** showed different responses between ssDNA and dsDNA as well as between $(\text{AT})_{10}$ and $(\text{GC})_{10}$ DNA in terms of UV absorption. On the other hand, the blue-shifted signal was observed only with dsDNA and $(\text{GC})_{10}$ DNA. This suggested that the blue-shifting may associate with the intercalation ability of the AQ quencher. The fluorescence of the dye similarly increased in the presence of ssDNA and dsDNA, but the fluorescence increase was more evident with $(\text{AT})_{10}$ over $(\text{GC})_{10}$. Finally, the effects of salts on the dye **BT-O-AQ** in the absence and presence of DNA were investigated. The binding of the dye and the DNA was attenuated in the presence of salt as shown by the decrease in fluorescence emission by 50%. In summary, styryl dyes exhibiting low background fluorescence and large fluorescence increase in presence of DNA were developed. The dye **BT-O-AQ** showed the largest fluorescence increase upon binding to DNA and exhibited blue-shifted UV absorption spectra only in the presence of dsDNA and $(\text{GC})_{10}$ DNA. These properties should make the **BT-O-AQ** dye useful for DNA detection, although the stability of the dye-DNA in the presence of salts still needs improvement

Keywords: styryl dye, quencher, DNA, fluorescence, intercalation

กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ เรื่อง การสังเคราะห์สีย้อมสไตริลที่มีตัวดับแสง สำหรับการตรวจวัดดีเอ็นเอ สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความอนุเคราะห์จากศาสตราจารย์ ดร. ธีรยุทธ วิไลวัลย์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่ได้กรุณาให้ความช่วยเหลือให้คำปรึกษาเป็นอย่างดีตลอดระยะเวลาที่ทำการวิจัย ตั้งแต่ถ่ายทอดประสบการณ์ต่างๆ ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ห้องปฏิบัติการ พร้อมทั้งเครื่องมือและสารเคมีในการทำวิจัยเป็นอย่างดี รวมทั้งให้ความช่วยเหลือในการเขียนรายงานฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ผู้วิจัยจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร.สัมฤทธิ์ วัชรสินธุ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นำพล อินสิน ที่กรุณาสละเวลาอันมีค่าให้เกียรติเป็นกรรมการสอบโครงการวิจัยครั้งนี้ ตลอดจนกรุณาให้คำแนะนำและตรวจสอบแก้ไขรายงานฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น รวมทั้งคณาจารย์ทุกท่านที่ประสิทธิ์ประสาทวิชา ให้ความรู้และประสบการณ์ต่างๆ ตลอดจนภาควิชาเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่สนับสนุนการใช้ห้องปฏิบัติการและเครื่องมือวิจัยต่างๆ

ขอขอบคุณ นางสาวกชกร ศุภบรรสถิตย์ นางโชติมา วิไลวัลย์ และนายเกรียงศักดิ์ ฝ่ายเครือ ที่คอยให้คำแนะนำตลอดจนให้ความช่วยเหลือในทุกขั้นตอนของการทำวิจัย

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนในการดำเนินงานวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยขอน้อมรำลึกในความกรุณาของทุกท่านที่ได้กล่าวมาข้างต้น และบุคคลที่ไม่ได้เอ่ยนามไว้ ณ ที่นี้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ฅ
สารบัญผนวก	ฉ
สัญลักษณ์และคำย่อ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ	1
1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
1.2.1 หลักการของฟลูออเรสเซนส์	2
1.2.2 สีย้อมสไตริลและสารประกอบที่เกี่ยวข้อง	2
1.2.3 อันตรกิริยาระหว่างสีย้อมสไตริลกับดีเอ็นเอ	4
1.2.4 การใช้ตัวดับแสง (quencher) ในสีย้อมสไตริล	5
1.3 วัตถุประสงค์และขอบเขตงานวิจัย	8
บทที่ 2 การทดลอง	10
2.1 รายการเครื่องมือ อุปกรณ์	10
2.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์	10
2.1.2 รายการสารเคมี	10
2.2 วิธีการทดลอง	11
2.2.1 การสังเคราะห์สีย้อมสไตริล	11
2.2.2 การทดลองยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตเมทรี (UV-vis spectrophotometry)	19
บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	23
3.1 การสังเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์ของสีย้อมสไตริล	23
3.2 การศึกษาสมบัติเชิงแสงของสีย้อมที่สังเคราะห์ได้	31
3.2.1 แอ็บซอร์ปชันและฟลูออเรสเซนส์สเปกตรัมของสีย้อมในภาวะที่ไม่มีและมีดีเอ็นเอ	31
3.2.2 ค่าผลผลิตเชิงควอนตัมทางฟลูออเรสเซนส์	33
3.3 การศึกษากลไกการทำงานของสีย้อม	34
3.3.1 การทดสอบการรบกวนแสงของสีย้อมในกลีเซอรอล	34

3.3.2 การตอบสนองของสีย้อมในสภาวะที่มีดีเอ็นเอสายเดี่ยว (ssDNA) และดีเอ็นเอสายคู่ (dsDNA)	35
3.3.3 ศึกษาการตอบสนองของสีย้อมต่อดีเอ็นเอ (AT) ₁₀ และ (GC) ₁₀	38
3.3.4 ศึกษาการตอบสนองของสีย้อมในสภาวะที่มีเกลือ MgCl ₂ และ NaCl	39
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง	41
เอกสารอ้างอิง	43
ภาคผนวก	47
ประวัติผู้วิจัย	56

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 ลำดับเบสของดีออกซีไรโบนิวคลีอิกแอซิด (DNA) ที่ใช้ในงานวิจัย	11
ตารางที่ 2.2 ปริมาตรดีเอ็นเอ (AT) ₁₀ และ (GC) ₁₀ ที่ใช้ในการทดลองการดูดกลืนแสงของสีย้อมกับโพลิโกดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ (AT) ₁₀ และ (GC) ₁₀	19
ตารางที่ 3.1 ค่า absorption maxima $\lambda_{\max}(\text{abs})$, extinction coefficients (ϵ), emission maxima $\lambda_{\max}(\text{em})$ และอัตราส่วนของการรบกวนแสงของสีย้อมในภาวะที่มีและไม่มีดีเอ็นเอ (F/F_0)	32
ตารางที่ 3.2 ประสิทธิภาพการรบกวนแสงของสีย้อมจากค่าผลผลิตเชิงควอนตัมทางฟลูออเรสเซนส์	33

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1.1 Jablonski diagram	2
รูปที่ 1.2 สีย้อมไซยานินประเภทต่าง ๆ	3
รูปที่ 1.3 โครงสร้างทั่วไปของสีย้อมสไตริล	4
รูปที่ 1.4 โครงสร้างของสีย้อมที่ใช้ในงานของ Xu และคณะ	4
รูปที่ 1.5 รูปแบบการจับกันของดีเอ็นเอกับสีย้อม	5
รูปที่ 1.6 การเกิดกระบวนการ quenching	6
รูปที่ 1.7 ประสิทธิภาพของการดับแสงของสีย้อม ethidium bromide (EB) ด้วยออกซิเจน	6
รูปที่ 1.8 ประสิทธิภาพของการดับแสงของสีย้อม Hoechst 33258 ด้วยไอโอดีนไดดีไอออน	7
รูปที่ 1.9 โครงสร้างของสีย้อมไซยานินที่เชื่อมต่อกับตัวดับแสงผ่านมี <i>p</i> -coumaric acid linker	7
รูปที่ 1.10 การทำงานของสีย้อมที่ตอบสนองต่อการจับกับโปรตีน PYP-tag	8
รูปที่ 1.11 โครงสร้างสีย้อมสไตริลที่จะทำการสังเคราะห์	8
รูปที่ 2.1 แผนภาพการสังเคราะห์ 2,3-dimethylbenzo[d]thiazol-3-ium iodide (1)	11
รูปที่ 2.2 แผนภาพการสังเคราะห์ 2-(4-bromobutoxy)-4-(diethylamino)benzaldehyde (2)	12
รูปที่ 2.3 แผนภาพการสังเคราะห์ 4-(diethylamino)-2-(4-(2,4-dinitrophenoxy)butoxy)benzaldehyde (3a)	12
รูปที่ 2.4 แผนภาพการสังเคราะห์ (<i>E</i>)-2-(4-(diethylamino)-2-(4-(2,4-dinitrophenoxy)butoxy)styryl)-3-methylbenzo[d]thiazol-3-ium hexafluorophosphate (BT-DNP)	13
รูปที่ 2.5 แผนภาพการสังเคราะห์ 4-(diethylamino)-2-(4-((9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracen-2-yl)oxy)butoxy)benzaldehyde (3b)	14
รูปที่ 2.6 แผนภาพการสังเคราะห์ (<i>E</i>)-2-(4-(diethylamino)-2-(4-((9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracen-2-yl)oxy)butoxy)styryl)-3-methylbenzo[d]thiazol-3-ium hexafluorophosphate (BT-AQ)	15
รูปที่ 2.7 แผนภาพการสังเคราะห์ triethylene glycol bis(<i>p</i> -toluenesulfonate) (4)	16
รูปที่ 2.8 แผนภาพการสังเคราะห์ 2-(2-(2-(5-(diethylamino)-2-formylphenoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate (2b)	16
รูปที่ 2.9 แผนภาพการสังเคราะห์ 4-(diethylamino)-2-(2-(2-(2-((9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracen-2-yl)oxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)benzaldehyde (3c)	17

รูปที่ 2.10 แผนภาพการสังเคราะห์ (E)-2-(4-(diethylamino)-2-(2-(2-(2-((9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracen-2-yl)oxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)styryl)-3-methylbenzo[d]thiazol-3-ium (BT-O-AQ)	18
รูปที่ 3.1 โครงสร้างของสีย้อมสไตริลทั้ง 3 ชนิดที่ได้สังเคราะห์ในงานวิจัยนี้	23
รูปที่ 3.2 แผนภาพการสังเคราะห์ BT-DNP, BT-AQ และ BT-O-AQ	24
รูปที่ 3.3 แผนภาพการเกิดปฏิกิริยา Aldol condensation	24
รูปที่ 3.4 ¹ H NMR ของ (E)-2-(4-(diethylamino)-2-(4-(2,4-dinitrophenoxy)butoxy)styryl)-3-methylbenzo[d]thiazol-3-ium hexafluorophosphate (BT-DNP)	25
รูปที่ 3.5 ¹ H NMR ของ (E)-2-(4-(diethylamino)-2-(4-((9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracen-2-yl)oxy)butoxy)styryl)-3-methylbenzo[d]thiazol-3-ium hexafluorophosphate (BT-AQ)	27
รูปที่ 3.6 ¹ H NMR ของ (E)-2-(4-(diethylamino)-2-(2-(2-(2-((9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracen-2-yl)oxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)styryl)-3-methylbenzo[d]thiazol-3-ium (BT-O-AQ)	29
รูปที่ 3.7 แอซอร์พชันและฟลูออเรสเซนส์สเปกตรัมของสีย้อมในภาวะที่ไม่มีและมีดีเอ็นเอ	31
รูปที่ 3.8 ภาพถ่ายของสีย้อมความเข้มข้น 10 μM ก่อนและหลังใส่ดีเอ็นเอ	32
รูปที่ 3.9 การทดสอบการวาวแสงของสีย้อมในกลีเซอรอล	34
รูปที่ 3.10 โครงสร้างของสีย้อม BT	35
รูปที่ 3.11 อัตรากิริยาระหว่างสีย้อมกับกลีเซอรอลที่ทำให้เกิดสัญญาณฟลูออเรสเซนส์	35
รูปที่ 3.12 การตอบสนองของสีย้อม BT-O-AQ ในสภาวะที่มีดีเอ็นเอสายเดี่ยว (ssDNA) และดีเอ็นเอสายคู่ (dsDNA)	36
รูปที่ 3.13 กลไกการเกิด aggregation ของสีย้อม	37
รูปที่ 3.14 การตอบสนองของสีย้อม BT-O-AQ ต่อ salmon sperm DNA	37
รูปที่ 3.15 การตอบสนองของสีย้อม BT-O-AQ ต่อดีเอ็นเอ (AT) ₁₀ และ (GC) ₁₀	38
รูปที่ 3.16 การตอบสนองของสีย้อม BT-O-AQ ในสภาวะที่มีเกลือ MgCl ₂ และ NaCl	39
รูปที่ 3.17 การตอบสนองของสีย้อม BT-O-AQ ในสภาวะที่มีเกลือ MgCl ₂ และ NaCl และดีเอ็นเอ	40

สารบัญผนวก

	หน้า
รูปที่ ผ-1 ภาพถ่ายของสีย้อม BT และ BT-DNP ก่อนและหลังใส่ดีเอ็นเอ ภายใต้แสง UV	48
รูปที่ ผ-2 ภาพถ่ายของสีย้อม BT และ BT-AQ ก่อนและหลังใส่ดีเอ็นเอ ภายใต้แสง UV	48
รูปที่ ผ-3 ภาพถ่ายของสีย้อม BT และ BT-O-AQ ก่อนและหลังใส่ดีเอ็นเอ ภายใต้แสง UV	49
รูปที่ ผ-4 ¹ H NMR ของ 2,3-Dimethylbenzo[d]thiazol-3-ium iodide (1)	49
รูปที่ ผ-5 ¹ H NMR ของ 2-(4-Bromobutoxy)-4-(diethylamino)benzaldehyde (2)	50
รูปที่ ผ-6 ¹ H NMR ของ 4-(Diethylamino)-2-(4-(2,4-dinitrophenoxy)butoxy)benzaldehyde (3a)	50
รูปที่ ผ-7 ¹ H NMR ของ 4-(Diethylamino)-2-(4-((9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracen-2-yl)oxy)butoxy)benzaldehyde (3b)	51
รูปที่ ผ-8 ¹ H NMR ของ Triethylene glycol bis(p-toluenesulfonate) (4)	51
รูปที่ ผ-9 ¹ H NMR ของ 2-(2-(2-(5-(Diethylamino)-2-formylphenoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate (2b)	52
รูปที่ ผ-10 ¹ H NMR ของ 4-(Diethylamino)-2-(2-(2-(2-((9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracen-2-yl)oxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)benzaldehyde (3c)	52
รูปที่ ผ-11 ¹³ C NMR ของ (E)-2-(4-(Diethylamino)-2-(4-(2,4-dinitrophenoxy)butoxy)styryl)-3-methylbenzo[d]thiazol-3-ium hexafluorophosphate (BT-DNP)	53
รูปที่ ผ-12 ¹³ C NMR ของ (E)-2-(4-(Diethylamino)-2-(4-((9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracen-2-yl)oxy)butoxy)styryl)-3-methylbenzo[d]thiazol-3-ium hexafluorophosphate (BT-AQ)	53
รูปที่ ผ-13 ¹³ C NMR ของ (E)-2-(4-(diethylamino)-2-(2-(2-(2-((9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracen-2-yl)oxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)styryl)-3-methylbenzo[d]thiazol-3-ium hexafluorophosphate (BT-O-AQ)	54
รูปที่ ผ-14 2D NMR ชนิด COSY ของ BT-O-AQ (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	54
รูปที่ ผ-15 เปรียบเทียบ ¹ H NMR chemical shift ของ BT-AQ และ BT-O-AQ (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	55
รูปที่ ผ-16 MALDI-TOF แมสสเปกตรัมของ BT-DNP, BT-AQ และ BT-O-AQ (CCA matrix)	55

สัญลักษณ์และคำย่อ

δ	chemical shift
μg	microgram
μL	microliter
μM	micromolar
A	adenine
AQ	anthraquinone
C	cytosine
$^{\circ}\text{C}$	degree Celcius
CDCl_3	deuterated chloroform
d	doublet
$\text{DMSO-}d_6$	deuterated dimethyl sulfoxide
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
DNP	dinitrophenyl
dsDNA	double-stranded deoxyribonucleic acid
EtOAc	ethyl acetate
EtOH	ethanol
G	guanine
Hz	Hertz
LOD	limit of detection
m	multiplet
mg	milligram
mL	milliliter
nm	nanometer
NMR	nuclear magnetic resonance
OTs	<i>p</i> -toluenesulfonate
PMT	photomultiplier tube
R_f	retention factor
s	singlet
ssDNA	single-stranded deoxyribonucleic acid
T	thymine

t	triplet
TEG	triethylene glycol
TLC	thin layer chromatography
UV	ultraviolet

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโคปี เป็นหนึ่งในเทคนิคที่สำคัญในการศึกษาทางด้านชีววิทยาระดับโมเลกุล โดยเฉพาะอย่างยิ่งการวิเคราะห์ดีเอ็นเอหรือกรดนิวคลีอิกประเภทอื่น ๆ เพื่อตรวจสอบความผิดปกติหรือความแตกต่างทางพันธุกรรม เช่น โรคทางพันธุกรรมที่เกิดจากยีนที่ถ่ายทอดลักษณะตำแหน่งเดียว (single gene disorders) การเกิดมิวเทชันและความแตกต่างของลำดับเบสในดีเอ็นเอ¹ เนื่องจากเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์มีความไวสูง สามารถวิเคราะห์ได้ถึงระดับโมเลกุลเดี่ยว ๆ ทำได้โดยตรงในเซลล์ที่ยังมีชีวิต และเป็นแบบเห็นผลได้ทันที (real time)² อีกทั้งยังมีเครื่องมือที่ไม่ซับซ้อน ใช้งานได้ง่าย แต่ดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอตามธรรมชาติไม่มีสมบัติการวาวแสง ทำให้จำเป็นต้องมีการนำสีย้อมมาใช้เพื่อช่วยในการวิเคราะห์ โดยสีย้อมที่นิยมใช้ในการตรวจวัดดีเอ็นเอ ได้แก่ ethidium bromide,³⁻⁵ SYBR gold,^{6, 7} SYBR green,⁸⁻¹⁰ SYBR safe,¹¹ และ EvaGreen¹² แต่สีย้อมเหล่านี้ส่วนใหญ่มีราคาแพง ความเป็นพิษมาก และก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม¹³

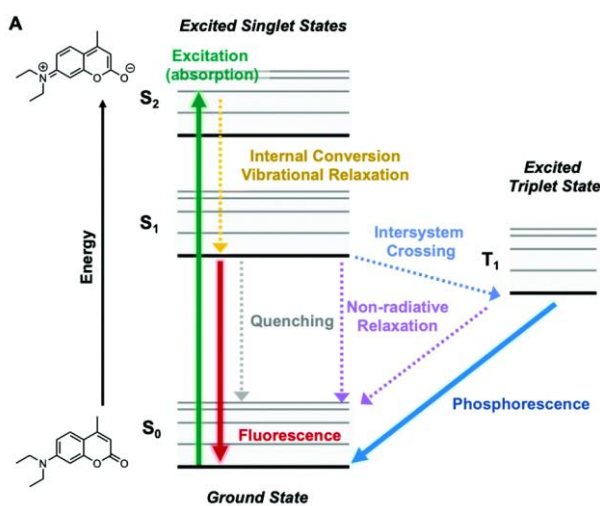
ในปัจจุบันได้มีผู้ให้ความสนใจพัฒนาสีย้อมในกลุ่มสไตริลเพื่อใช้ในการวิเคราะห์เป็นจำนวนมาก¹⁴ โดยสีย้อมสไตริลจะประกอบไปด้วยสองส่วนคือ ส่วนวงอะโรมาติกที่มีอิเล็กตรอนน้อยและส่วนวงอะโรมาติกที่มีอิเล็กตรอนมาก ทั้งสองส่วนถูกเชื่อมต่อกันด้วยพันธะคู่ โดยในสภาวะปกติสีย้อมจะมีการวาวแสงน้อยเนื่องจากเกิดการหมุนของพันธะคู่ที่ตรงกลางโมเลกุลเนื่องจากพันธะคู่นี้มีลักษณะของความเป็นพันธะเดี่ยวสูงเนื่องจากปรากฏการณ์ถ่ายโอนอิเล็กตรอนภายในโมเลกุล (intramolecular charge transfer) ปรากฏการณ์นี้ทำให้สีย้อมในกลุ่มนี้แสดงสมบัติเชิงแสงที่เปลี่ยนไปตามสิ่งแวดล้อม เช่น สภาพขั้วของตัวทำละลาย (solvatochromism) จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าสีย้อมสไตริลหลายชนิดสามารถจับกับดีเอ็นเอแล้วทำให้เกิดการวาวแสงที่เพิ่มขึ้นได้¹⁵ แต่เมื่อสีย้อมเข้าไปจับกับดีเอ็นเอ จะเกิดการวาวแสงที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากการถูกจำกัดการหมุนของพันธะคู่กลางโมเลกุลของสีย้อม ตัวอย่างเช่นในปี 2018 Wang และคณะได้พัฒนาโมเลกุลสีย้อมสไตริล ซึ่งมีประสิทธิภาพในการย้อมติดกรดนิวคลีอิกในเซลล์สิ่งมีชีวิตโดยให้สัญญาณฟลูออเรสเซนส์ที่สูง และสามารถใช้ในการศึกษาวัฏจักรของเซลล์ได้แบบเห็นผลได้ทันที¹⁶

อย่างไรก็ตาม สีย้อมสไตริลบางชนิดให้สัญญาณฟลูออเรสเซนส์ที่สูงแม้ไม่มีกรดนิวคลีอิกเป้าหมาย ทำให้ความแตกต่างของความเข้มการวาวแสงระหว่างก่อนจับกับดีเอ็นเอและหลังจับกับดีเอ็นเอมีความแตกต่างกันน้อย ดังนั้น ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์ที่จะปรับปรุงประสิทธิภาพของสีย้อมสไตริลโดยการปรับเปลี่ยนโครงสร้างด้วยการเพิ่มส่วนโมเลกุลดับแสง (quencher) ลงในโมเลกุลสีย้อม โดยคาดหวังว่าสีย้อมที่พัฒนาขึ้นใหม่จะมีสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ที่ต่ำลงในสภาพสีย้อมอิสระ (ไม่มีกรดนิวคลีอิกเป้าหมาย) และสีย้อมที่ได้จะยังคงความสามารถในการตอบสนองสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ที่สูงในสภาวะที่จับกับกรดนิวคลีอิก เพื่อให้อัตราส่วนระหว่างสัญญาณฟลูออเรสเซนส์เมื่อมีกรดนิวคลีอิกเป้าหมายต่อสัญญาณสีย้อมอิสระ (F/F_0) มีค่าสูงขึ้น ซึ่งนำไปสู่การพัฒนาโมเลกุลสีย้อมสไตริลที่มีประสิทธิภาพในการตรวจวัดกรดนิวคลีอิกที่มากขึ้นด้วย

1.2 ทฤษฎีที่สำคัญและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1.2.1 หลักการของฟลูออเรสเซนส์

หลักการทำงานของฟลูออเรสเซนส์ อธิบายได้ด้วย Jablonski diagram (รูปที่ 1.1) เมื่อโมเลกุลถูกกระตุ้นด้วยแสงที่มีความยาวคลื่นจำเพาะ อิเล็กตรอนจาก ground state จะขึ้นไปอยู่ที่ excited state หลังจากนั้นอิเล็กตรอนจะลดระดับพลังงานลงไปที่ singlet excited state (S_1) ซึ่งจากนั้นจะตกกลับมาสู่ ground state พร้อมกับการคายพลังงานออกมา โดยจะมีทั้ง non-radiative relaxation และ radiative relaxation ซึ่งก็คือการร้าวแสง fluorescence¹⁷ โครงสร้างโมเลกุลมีบทบาทสำคัญในการกำหนดคุณสมบัติการร้าวแสง โดยโมเลกุลที่มีโครงสร้างเป็น conjugated π -system ที่มีลักษณะแบนราบและมีความ rigid เป็นเงื่อนไขสำคัญของโมเลกุลที่จะแสดงสมบัติฟลูออเรสเซนส์¹⁸ นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นที่ส่งผลต่อการร้าวแสง เช่น สภาพขั้ว ความเป็นกรดเบสและความหนืดของตัวทำละลาย¹⁹



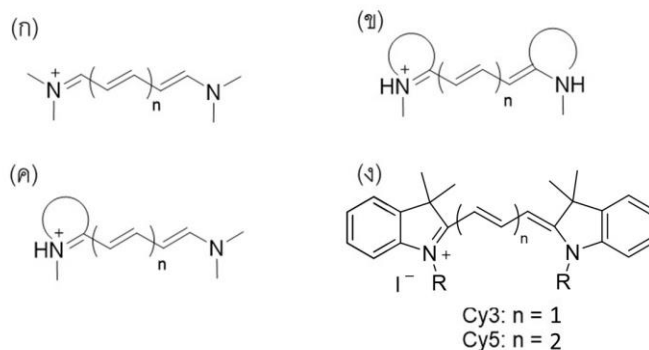
รูปที่ 1.1 Jablonski diagram¹⁷

การออกแบบโมเลกุลของสีย้อมที่ตอบสนองต่อการจับกับดีเอ็นเอจะอาศัยหลักการที่ว่าเมื่อสีย้อมเข้าจับกับดีเอ็นเอ groove หรือ base stack ของดีเอ็นเอจะบังคับให้สีย้อมอยู่ในรูปแบบที่เป็นแบนราบอยู่ในระนาบเดียวกัน¹⁸ นอกจากนี้ตัวสีย้อมจะถูกบังคับให้อยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีขั้วต่ำกว่าสีย้อมอิสระที่อยู่ในน้ำหรือสารละลายบัฟเฟอร์ จึงส่งผลให้การร้าวแสงเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งอาจเป็นไปได้ทั้งการเพิ่มขึ้นหรือลดลงก็ได้ แต่สีย้อมที่ดีควรจะให้การร้าวแสงต่ำในสภาพอิสระและเมื่อจับกับดีเอ็นเอควรให้การร้าวแสงที่สูง

1.2.2 สีย้อมสไตริลและสารประกอบที่เกี่ยวข้อง

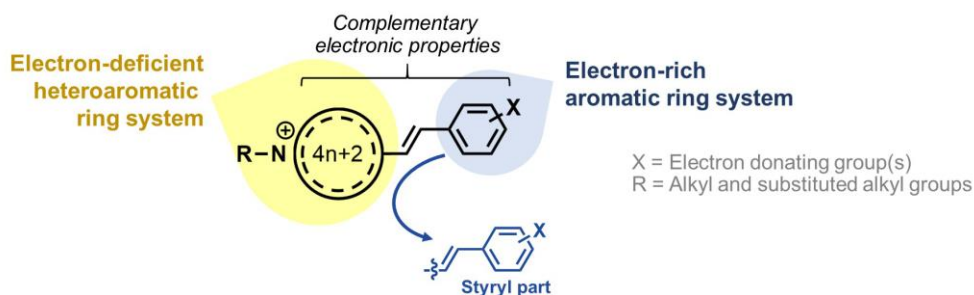
สีย้อมที่นิยมใช้ในการตรวจวัดดีเอ็นเอกลุ่มที่สำคัญคือสีย้อมไซยานิน (cyanine dye) ซึ่งมีลักษณะเฉพาะคือมีไนโตรเจนสองอะตอม ตัวหนึ่งจะต้องมีประจุบวกอีกตัวไม่มีประจุ ทั้งสองตัวจะเชื่อมต่อกันด้วยสายโซ่ polymethine ที่มีจำนวนอะตอมของคาร์บอนเป็นจำนวนคี่ โดยไนโตรเจนทั้งสองตัวนั้นอาจเป็นส่วนหนึ่งของวง heteroaromatic เช่น pyrrole, imidazole, thiazole, pyridine, quinoline, indole และ benzothiazole หรือไม่ก็ได้ สีย้อมไซยานินนั้นสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ แบบวงเปิดหรือวงปิดและ

แบบ hemicyanines²⁰ ซึ่ง hemicyanine คือสีย้อม cyanine ที่ด้านหนึ่งของ conjugated chain ประกอบด้วยวงปิดและอีกด้านหนึ่งของ conjugated chain เป็นแบบวงเปิด²¹ ดังรูปที่ 1.2 ตัวอย่างของสีย้อมไซยานิน ได้แก่ Cy3 และ Cy5



รูปที่ 1.2 สีย้อมไซยานินประเภทต่าง ๆ (ก) วงเปิด, (ข) วงปิด, (ค) hemicyanines และ (ง) Cy3 และ Cy5²⁰

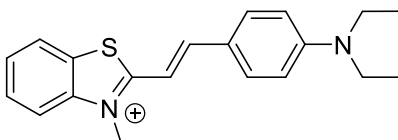
สีย้อมสไตริลมีโครงสร้างที่ใกล้เคียงกับสีย้อมไซยานิน โดยมีส่วนของสไตริลเรดิคัล (Ar-CH=CH-) ซึ่งได้มาจากสไตรีน (styrene) ดังนั้นสีย้อมที่มี radical นี้เป็นองค์ประกอบจึงมีชื่อเรียกว่าสีย้อมสไตริล²² โครงสร้างของสีย้อมสไตริลโดยทั่วไปจะประกอบไปด้วยสองส่วนคือส่วนวงอะโรมาติกที่มีอิเล็กตรอนน้อย (electron deficient) และส่วนวงอะโรมาติกที่มีอิเล็กตรอนมาก (electron rich) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะคู่ในลักษณะที่ทำให้วงทั้งสองคอนจูเกตกัน ดังนั้นจำนวนคาร์บอนอะตอมที่เชื่อมต่อระหว่างวงแหวนทั้งสองจะเป็นเลขคู่ ดังรูปที่ 1.3 ลักษณะการเชื่อมต่อแบบคอนจูเกตดังกล่าวทำให้เกิดการถ่ายโอนอิเล็กตรอนระหว่างวงแหวนทั้งสองได้ มีการรายงานถึงการสังเคราะห์สีย้อมสไตริลครั้งแรกในปี 1920 โดย Konig และคณะ²² สีย้อมสไตริลมีจุดเด่นหลายประการ เช่น มีขั้นตอนการสังเคราะห์ง่าย ไม่เสียสภาพง่ายเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงเป็นเวลานาน ซึ่งต่างจากสีย้อมไซยานินทั่วไปที่ความทนทานต่อแสง (photostability) ต่ำ²³ สามารถปรับเปลี่ยนโครงสร้างเพื่อให้ได้สมบัติการดูดกลืนและการวาวแสงที่ต้องการ มีความเข้มของการวาวแสงสูง และมีสมบัติเชิงแสงที่เปลี่ยนแปลงได้ตามสภาพแวดล้อม (solvatochromism) โดยการวาวแสงจะเพิ่มขึ้นผ่านกระบวนการยับยั้งการหมุนของพันธะคู่ที่เชื่อมวงอะโรมาติกทั้งสองวงเมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีขั้วต่ำซึ่งทำให้การแยกประจุลดลงหรือเมื่อโมเลกุลถูกบังคับให้หยุดนิ่งเช่นการจับกับดีเอ็นเอหรือการอยู่ในตัวทำละลายที่มีความหนืดสูงเช่นกลีเซอรอล ทำให้สีย้อมสไตริลได้ถูกนำไปประยุกต์ใช้ในหลายด้าน เช่น ใช้เป็นตัวตรวจวัดดีเอ็นเอ¹⁴ ตรวจวัดโปรตีน²⁴ ใช้ในการพัฒนาระบบสังเคราะห์แสงจำลอง²⁵ และใช้เป็น chemosensor สำหรับโมเลกุลหรือไอออน เช่น H₂O₂,²⁶ Hg²⁺,²⁷ CN⁻^{28, 29} ตลอดจนใช้ในการย้อมสีเซลล์หรือเนื้อเยื่อต่างๆ เช่น mast cell, keratin และ กระดูกอ่อน (cartilage)³⁰



รูปที่ 1.3 โครงสร้างทั่วไปของสีย้อมสไตริล

1.2.3 อันตรกิริยาระหว่างสีย้อมสไตริลกับดีเอ็นเอ

ในปี 2004 Xu และคณะได้รายงานสีย้อมสไตริลฐานเบนโซโซเลียมที่มีโครงสร้างง่าย ๆ ดังรูปที่ 1.4 เพื่อใช้เป็นในการตรวจวัดกรดนิวคลีอิก³¹ โดยกรดนิวคลีอิกที่ใช้ในการทดลองคือ calf thymus DNA (CT DNA) และ fish sperm DNA (FS DNA) จากการทดลองคณะผู้วิจัยได้เสนอว่าสาเหตุที่ทำให้ความเข้มการวาวแสงของสีย้อมสไตริลเพิ่มขึ้นเกิดจากการที่สีย้อมสไตริลเข้าจับกับดีเอ็นเอที่ minor groove และการเกิด J-aggregate ของสีย้อมซึ่งแสดงโดยการ red-shift ของสเปกตรัมการดูดกลืนแสง โดยโมเลกุลของสีย้อมจะเกิดการเรียงตัวแบบ head to tail โดยในสถานะที่ไม่มีดีเอ็นเอ สีย้อมจะมีความเข้มของการวาวแสงต่ำ แต่เมื่อเติม CT DNA พบว่าความเข้มของการวาวแสงของสีย้อมมีค่ามากขึ้น โดยสามารถตรวจวัดดีเอ็นเอที่ความเข้มข้นต่ำสุดได้ที่ $5-7 \mu\text{g mL}^{-1}$



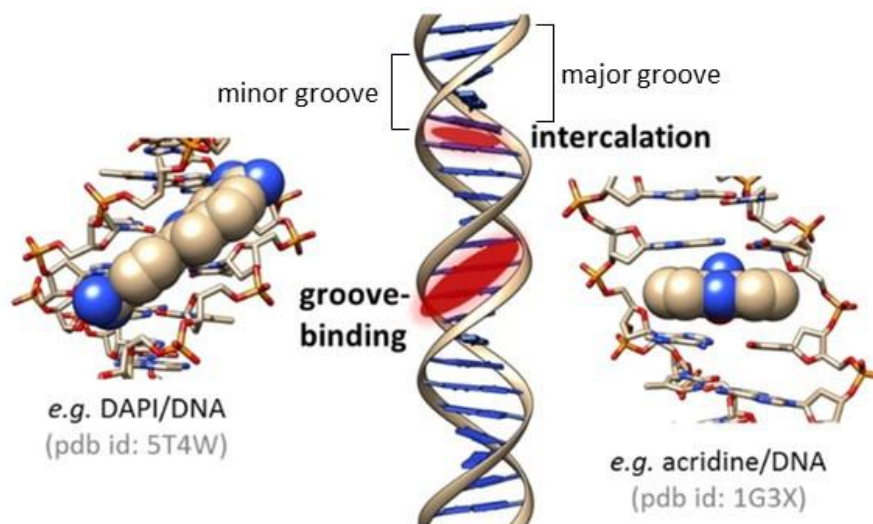
รูปที่ 1.4 โครงสร้างของสีย้อมที่ใช้ในงานของ Xu และคณะ³¹

ในปี 2018 Wang และคณะได้ทำการสังเคราะห์สีย้อมสำหรับใช้ตรวจวัด nucleolus และ chromosome ในวัฏจักรของเซลล์¹⁶ และยังได้มีการจำลองการเกิดอันตรกิริยาระหว่างสีย้อมที่สังเคราะห์ได้กับกรดนิวคลีอิกเป้าหมาย โดยใช้คอมพิวเตอร์โมเดล และได้เสนอว่าสีย้อมเข้าจับกับดีเอ็นเอที่ hydrophobic minor grooves ด้วยพันธะไฮโดรเจน และสีย้อมเข้าจับกับอาร์เอ็นเอที่ hydrophobic major grooves ด้วย π -cation interaction และพันธะไฮโดรเจน

โดยทั่วไปรูปแบบของการจับกันระหว่างโมเลกุลขนาดเล็กเช่นสีย้อมกับดีเอ็นเอ (binding modes) จะมีอยู่หลัก ๆ 2 รูปแบบ ได้แก่ intercalation และ groove binding ซึ่งสีย้อมแต่ละชนิดจะเกิดการเข้าจับกับดีเอ็นเอวิธีใดจะขึ้นอยู่กับสมบัติเฉพาะตัวของสีย้อมชนิดนั้น ๆ เช่น ขนาดและความเกะกะของโมเลกุลของสีย้อม และความยาวของ linker³² การเข้าจับกับดีเอ็นเอแบบ intercalation ซึ่งคือการที่โมเลกุลที่มีวงอะโรมาติกแบน ๆ เข้าไปแทรกอยู่ระหว่างคู่เบสที่ซ้อนๆ กัน (base stack) ในโมเลกุลเกลียวคู่ของดีเอ็นเอ และแบบ groove binding ซึ่งคือการที่โมเลกุลที่มีสมบัติไม่ชอบน้ำและมีรูปร่างโค้งงอแบบพระจันทร์เสี้ยวเข้าเข้าไป

แทรกอยู่ในร่องของดีเอ็นเอ (groove) ซึ่งมี 2 ชนิดคือ major groove และ minor groove เป็นหลัก **ดังรูปที่ 1.5**

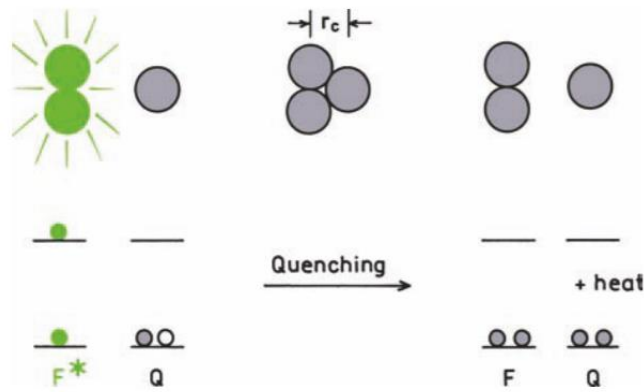
ในปี 2018 Berdnikova และคณะได้ศึกษารูปแบบการจับของสีย้อมสไตริลฐานพิริดีเนียมกับดีเอ็นเอ โดยได้สังเคราะห์สีย้อมประเภท monomeric และ homodimeric 4-alkoxystyryl(pyridinium) แล้วนำมาศึกษาการจับกับดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตเมทรี (UV-vis spectrophotometry), เทคนิคฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรสโกปี (fluorescence spectroscopy) และเทคนิค circular dichroism (CD) จากผลทดลองพบว่าถ้าสีย้อมมี linker สั้น จะเข้าจับกับดีเอ็นเอแบบ intercalation แต่เมื่อเพิ่มความยาวของ linker ขึ้น เป็น C_6 สีย้อมจะเริ่มเข้าจับกับดีเอ็นเอแบบ minor groove binding จนเป็นแบบ major groove binding ที่ linker ยาว C_{10} เนื่องจากเมื่อเพิ่มความยาวของ linker จะทำให้ hydrophobicity เพิ่มขึ้น ไม่เหมาะสมต่อการเกิด intercalation เพราะจะทำให้ส่วนที่เป็น hydrophobic ถูกบังคับให้อยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีขั้วคือน้ำ ในขณะที่การเกิด groove binding ส่วนที่เป็น hydrophobic จะยังสามารถฝังอยู่ใน DNA groove ซึ่งมีสภาพแวดล้อมที่ขั้วต่ำได้³³



รูปที่ 1.5 รูปแบบการจับกันของดีเอ็นเอกับสีย้อม³⁴

1.2.4 การใช้ตัวดับแสง (quencher) ในสีย้อมสไตริล

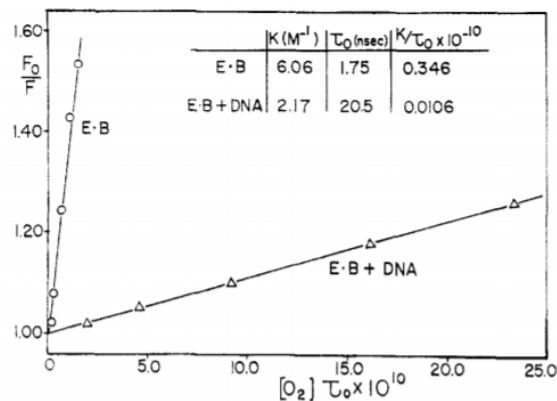
การดับแสงฟลูออเรสเซนส์ (fluorescence quenching) คือกระบวนการที่ทำให้เกิดการลดความเข้มของการวาวแสงฟลูออเรสเซนส์ มีกระบวนการทางเคมีหลายอย่างที่สามารถทำให้เกิดการดับแสงฟลูออเรสเซนส์ได้ เช่น การถ่ายเทพลังงาน (energy transfer), การจัดเรียงตัวใหม่ของโมเลกุล (molecular rearrangements), การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารเมื่ออยู่ที่สภาวะกระตุ้น (excited state reaction) และ การชนกับอะตอมหรือโมเลกุลอื่นขณะที่อยู่ในสภาวะกระตุ้น (collisional quenching)³⁵ การที่จะเกิดกระบวนการดับแสงได้นั้นตัวดับแสงและโมเลกุลสีย้อมจะต้องอยู่ใกล้กันเพื่อให้กลุ่มหมอกอเล็กตรอนของทั้งสองโมเลกุลเกิดปฏิสัมพันธ์กันได้ เมื่อตัวดับแสงเข้าจับกับสีย้อมที่สภาวะกระตุ้น อเล็กตรอนที่สภาวะกระตุ้นใน Lowest Unoccupied Molecular Orbital ของสีย้อมจะกลับไปสู่สภาวะพื้น ทำให้สีย้อมไม่สามารถวาวแสงได้และปล่อยพลังงานออกมาในรูปความร้อนแทน **ดังรูปที่ 1.6**



รูปที่ 1.6 การเกิดกระบวนการ quenching³⁵

ตัวดับแสง (quencher) คือโมเลกุลหรือส่วนของโมเลกุลที่สามารถรับพลังงานจากโมเลกุลของสารวาแสงที่ถูกกระตุ้น ทำให้อิเล็กตรอนที่ถูกกระตุ้นนั้นกลับสู่สถานะพื้นโดยปล่อยพลังงานออกมาในรูปความร้อน แทนที่จะเป็นการเปล่งแสงที่มีความยาวคลื่นต่ำกว่าความยาวคลื่นที่ใช้กระตุ้นตามหลักการของฟลูออเรสเซนส์ปกติ ทำให้โมเลกุลนั้นไม่สามารถเกิดการคายแสงออกมาได้จึงไม่เกิดการวาแสง ซึ่งกระบวนการนี้จะเกิดได้ดีเมื่อส่วนโมเลกุลดับแสงอยู่ใกล้กับสารวาแสงในระยะที่เหมาะสม³⁶

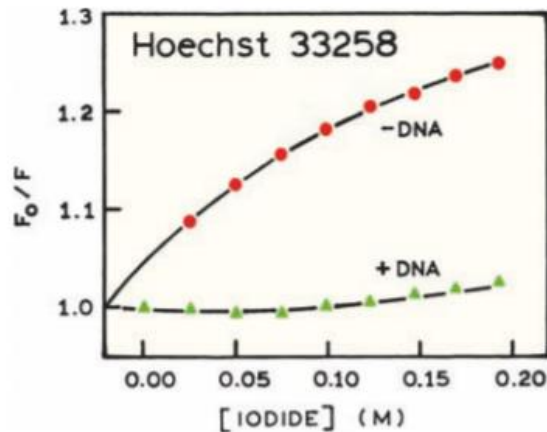
มีงานวิจัยหลายงานที่พบว่าสารวาแสงที่จับกับดีเอ็นเอจะถูกปกป้องจากตัวดับแสง ทำให้ประสิทธิภาพของการดับแสงลดลง เช่น งานวิจัยของ Lakowicz และคณะ³⁷ ได้ทดสอบประสิทธิภาพการดับแสงของสีย้อม ethidium bromide (EB) ด้วยโมเลกุลของออกซิเจน พบว่าเมื่อสีย้อมเข้าจับกับดีเอ็นเอ ประสิทธิภาพของการดับแสงจะลดลงดังรูปที่ 1.7



รูปที่ 1.7 ประสิทธิภาพของการดับแสงของสีย้อม ethidium bromide (EB) ด้วยออกซิเจน โดยกราฟที่มีรูปวงกลมคือสีย้อมอิสระ ส่วนกราฟที่มีรูปสามเหลี่ยมคือสีย้อมที่เข้าจับกับดีเอ็นเอสายคู่แล้ว³⁷

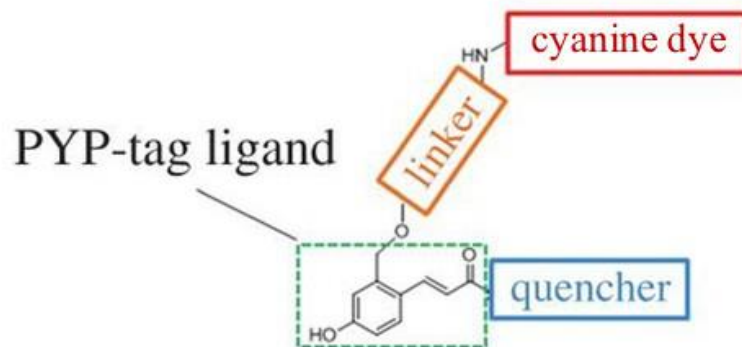
แรงกระทำทางไฟฟ้าสถิตก็อาจส่งผลต่อประสิทธิภาพของการดับแสง ดังในอีกตัวอย่างหนึ่งจากงานวิจัยของ Suh และคณะ³⁸ ได้ทดสอบการดับแสงของสีย้อม Hoechst 33258 โดยใช้ไอโอดีไอออนเป็นตัวดับแสง พบว่าเมื่อสีย้อมเข้าจับกับดีเอ็นเอสายคู่แล้วประสิทธิภาพของการดับแสงจะลดลง ดังรูปที่ 1.8 แต่เมื่อทดลองเปลี่ยนส่วนดับแสงเป็นโมเลกุลออกซิเจนซึ่งไม่มีประจุพบว่าประสิทธิภาพของการดับแสงก่อนและ

หลังเข้าจับกับดีเอ็นเอไม่แตกต่างกัน ซึ่งสาเหตุมาจากผลของประจุลบบนดีเอ็นเอป้องกันไม่ให้ไอโอดีนเกิดอันตรกิริยากับสีย้อมที่จับกับดีเอ็นเอที่บริเวณ minor groove



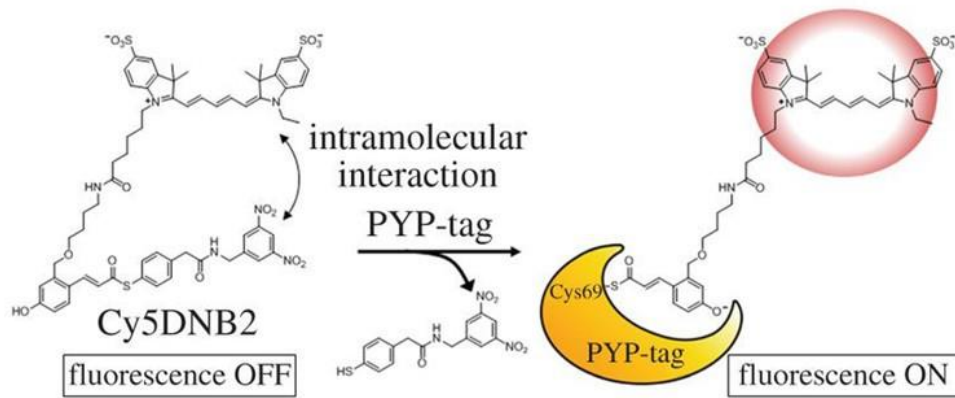
รูปที่ 1.8 ประสิทธิภาพของการดับแสงของสีย้อม Hoechst 33258 ด้วยไอโอดีนไอออน โดยกราฟสีแดงคือสีย้อมอิสระ ส่วนกราฟสีเขียวคือสีย้อมที่เข้าจับกับดีเอ็นเอแล้ว³⁸

ในปี 2017 ได้มีกลุ่มวิจัยของ Hori³⁹ และคณะได้สังเคราะห์สีย้อมไซยานินเพื่อใช้สำหรับตรวจวัดโปรตีนที่ถูกตัดแปรด้วย photoactive yellow protein (PYP) tag โดยได้ทำการต่อส่วนของตัวดับแสง (quencher) ได้แก่ dinitrophenyl group เข้ากับตัวสีย้อม ผ่าน linker ซึ่งเป็น *p*-coumaric acid ที่จะจับกับ PYP-tag อย่างจำเพาะดังรูปที่ 1.9



รูปที่ 1.9 โครงสร้างของสีย้อมไซยานินที่เชื่อมต่อกับตัวดับแสงผ่านมี *p*-coumaric acid linker³⁹

ตัวดับแสงที่เป็นหมู่ dinitrophenyl ทำให้ความเข้มของการรบกวนแสงของสีย้อมอิสระมีความเข้มน้อยลง ซึ่งเกิดจาก intramolecular quenching ระหว่างส่วนโมเลกุลดับแสงกับตัวสีย้อม ดังรูปที่ 1.10 และเมื่อสีย้อมไซยานินนี้จับกับโปรตีนที่ติดฉลากด้วย PYP-tag จะทำให้เกิดการหลุดออกของตัวดับแสง จากการเกิดปฏิกิริยา thiol exchange ระหว่าง Cys ใน PYP-tag กับ DNP thioester การรบกวนแสงของสีย้อมจึงเพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับสีย้อมที่มีตัวดับแสง นอกจากนั้นสีย้อมจะเข้าไปจับกับโปรตีน ทำให้โปรตีนนั้นเกิดการรบกวนแสงด้วย ส่วนสีย้อมที่ไม่จับกับโปรตีนจะไม่เกิดการรบกวนแสง ทำให้อัตราส่วนฟลูออเรสเซนส์ระหว่างก่อนและหลังเข้าจับกับโปรตีน (OFF-ON ratio) มีค่ามากขึ้น³⁹

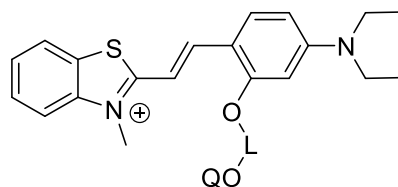


รูปที่ 1.10 การทำงานของสีย้อมที่ตอบสนองต่อการจับกับโปรตีน PYP-tag³⁹

1.3 วัตถุประสงค์และขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนาสีย้อมสไตริลสำหรับการตรวจวัดกรดนิวคลีอิก โดยทำการเพิ่มส่วนดับแสง (quencher) ลงในส่วนของสีย้อมสไตริลโดยคาดหวังว่าสีย้อมที่พัฒนาขึ้นใหม่จะมีสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ที่ต่ำลงเมื่อไม่มีกรดนิวคลีอิกเป้าหมาย และในสภาวะที่มีกรดนิวคลีอิกสีย้อมที่ได้จะยังคงความสามารถในการตอบสนองสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ที่สูง เพื่อให้อัตราส่วนระหว่างสัญญาณฟลูออเรสเซนส์เมื่อมีกรดนิวคลีอิกเป้าหมายต่อสัญญาณสีย้อมเปล่า (F/F_0) มีค่าสูงขึ้น ซึ่งนำไปสู่การพัฒนาโมเลกุลสีย้อมสไตริลที่มีประสิทธิภาพในการตรวจวัดกรดนิวคลีอิกที่มากขึ้นด้วย ซึ่งความท้าทายในการออกแบบอยู่ที่การออกแบบให้ส่วนของตัวดับแสงต้องสามารถดับแสงของสีย้อมอิสระ แต่ไม่สามารถดับแสงของสีย้อมในสภาพที่จับกับดีเอ็นเอได้

ในงานวิจัยจะสังเคราะห์สีย้อมสไตริลที่มีหมู่ benzothiazole เป็นฐานดังรูปที่ 1.11 ซึ่งสีย้อมสไตริลชนิดนี้เป็นสีย้อมที่แสดงการเพิ่มขึ้นของการวาวแสงที่สูงเมื่อเข้าจับกับดีเอ็นเอ และเคยมีผู้ศึกษารูปแบบการเกิดอันตรกิริยากับดีเอ็นเอและมีข้อมูลเกี่ยวสมบัติเชิงแสงของสีย้อมที่ยังไม่ได้เพิ่มส่วนของตัวดับแสงมาก่อนหน้านี้แล้ว จึงสามารถนำมาใช้เป็นตัวเทียบเพื่อศึกษาอิทธิพลของตัวดับแสงได้เป็นอย่างดี³¹



รูปที่ 1.11 โครงสร้างสีย้อมสไตริลที่จะทำการสังเคราะห์ โดย -L- = $(CH_2)_4$ และ $CH_2CH_2OCH_2CH_2OCH_2CH_2$, -Q = dinitrophenyl และ anthraquinone

โดยส่วนดับแสง (Q) ที่สนใจจะนำมาใช้ในงานวิจัยได้แก่ หมู่ dinitrophenyl และหมู่ anthraquinone จากงานวิจัยของ Hori และคณะ³⁹ ที่ได้อภิปรายไปก่อนหน้านี้ แสดงให้เห็นว่าหมู่ dinitrophenyl มีความสามารถทำให้สีย้อมอิสระมีความเข้มของการวาวแสงลดลง แต่เมื่อจับเข้ากับโปรตีน ส่วนดับแสงสามารถ

หลุดออกจากโมเลกุลของสีย้อมแล้วทำให้สีย้อมมีความเข้มการวาวแสงมากกว่าตอนเป็นสีย้อมอิสระได้ และในปี 1997 Gutierrez และคณะได้แสดงให้เห็นว่า quinone และ anthraquinone สามารถเป็นตัวดับแสงที่ดี โดยผ่านกระบวนการ reversible charge transfer โดยที่ quinone จะทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอน (electron acceptor)⁴⁰ การใช้ anthraquinone น่าจะมีข้อได้เปรียบเหนือ dinitrophenyl เนื่องจาก anthraquinone มีความสามารถในการเกิด intercalation กับดีเอ็นเอได้^{41, 42} โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อใช้ร่วมกับ hydrophilic linker เช่น triethyleneglycol (TEG) ซึ่งมีความสามารถในการลดแรงกระทำกับน้ำทำให้ให้เกิด intercalation ได้ดีขึ้น โดยคาดว่า การเกิด intercalation จะช่วยแยกส่วนของตัวดับแสงออกจากตัวสีย้อมได้อย่างมีประสิทธิภาพกว่าตัวดับแสงที่ไม่ได้เกิดอันตรกิริยาใดๆ กับดีเอ็นเออย่าง dinitrophenyl

ในงานวิจัยนี้จะทำการสังเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์ของสีย้อมสไตริลทั้งที่ไม่มีตัวดับแสงและที่มีตัวดับแสงชนิดต่างๆ ตรวจสอบโครงสร้างของสีย้อมที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโคปี (NMR) แล้วศึกษาสมบัติเชิงแสงของสีย้อมที่สังเคราะห์ได้ (absorption, emission, fluorescence quantum yield) จากนั้นจึงนำไปศึกษาความแตกต่างของการวาวแสงของสีย้อมระหว่างสีย้อมอิสระกับสีย้อมเมื่อเข้าจับกับดีเอ็นเอชนิดต่าง ๆ (F/F_0) เช่น ดีเอ็นเอสายเดี่ยว ดีเอ็นเอสายคู่ ตลอดจนดีเอ็นเอที่มีองค์ประกอบของเบสแตกต่างกันได้แก่ (AT)₁₀ และ (GC)₁₀ เพื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงการวาวแสงระหว่างก่อนและหลังเข้าจับกับดีเอ็นเอด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโคปี รวมถึง salmon sperm DNA เพื่อยืนยันว่าการตอบสนองเชิงแสงของสีย้อมต่อดีเอ็นเอสายคู่ไม่ได้เป็นกรณีพิเศษที่เกิดเฉพาะกับตัวดีเอ็นเอสังเคราะห์สายสั้นที่เลือกมาใช้ ผลที่คาดว่าจะได้จากงานวิจัยนี้ คือได้สีย้อมสไตริลที่มีส่วนของโมเลกุลดับแสงที่มีประสิทธิภาพในการตรวจวัดดีเอ็นเอที่ดีขึ้น

บทที่ 2

การทดลอง

2.1 รายการเครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

2.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

การวัดการวาวแสงของสาร กระทำโดยใช้เครื่องฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (fluorescence spectrophotometer) รุ่น Cary Eclipse (Varian/Agent Technologies)

การตรวจวัดสัญญาณการดูดกลืนแสง ใช้เครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis Spectrophotometer) รุ่น Cary Eclipse (Varian/Agent Technologies)

การพิสูจน์เอกลักษณ์ ด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ ใช้เครื่อง JEOL 500 MHz NMR spectrometer รุ่น JNM-ECZ500R/S1 ทำงานที่ความถี่ 500 MHz สำหรับการทดลอง ^1H NMR และ 126 MHz สำหรับการทดลอง ^{13}C NMR และการวัดมวลโมเลกุลใช้เครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ชนิด Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI-TOF Mass Spectrometer) รุ่น Microflex (Bruker Daltonics) โดยใช้ α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CCA, 99%, Sigma Aldrich) เป็น matrix

การชั่งน้ำหนักสาร ใช้เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง DKSH รุ่น AND GR-200

การปิเปตสาร การปิเปตสารปริมาตรน้อยใช้ไมโครปิเปต ยี่ห้อ Eppendorf Research Plus ประเทศเยอรมนี ขนาด 0.1-2.5 μL , 0.5-10 μL , 10-100 μL และ 100-1000 μL สำหรับสารปริมาตรมาก (> 1 mL) ใช้ graduate pipette ชนิดแก้ว ยี่ห้อ HBG ประเทศเยอรมนี

การทำให้สารแห้ง ใช้เครื่องปั๊มสุญญากาศ (diaphragm vacuum pump) รุ่น JK-DVP-0.5A (JKI)

การควบคุมอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา ใช้เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (heating block) รุ่น TDB-400 (Biosan)

การตรวจวัดคุณสมบัติเชิงแสงเบื้องต้นด้วยตาเปล่า UV transilluminator รุ่น VILBER LOURMAT TCP-20.LM และกล้องถ่ายรูป รุ่น EOS M EF-M 18-55 STM

2.1.2 รายการสารเคมี

2.1.2.1 สารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์สี่อ้อมสไตริล ใช้ ammonium hexafluorophosphate (99%) และ 2-methylbenzothiazole (99%) จาก Acros Organics, iodomethane (99%) จาก BDH, 2,4-dinitrophenol (>99%) จาก Fluka, *N,N*-dimethylformamide (anhydrous) จาก LBS, potassium carbonate (99.9%) จาก RCI Labscan, 4-diethylaminosalicylaldehyde (98%) จาก Sigma-Aldrich, 1,4-dibromobutane (>98%) และ 2-hydroxyanthraquinone (>95%) จาก TCI

2.1.2.2 ตัวทำละลายที่ใช้สำหรับการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ ได้แก่ chloroform-*d* (99.8% atom D) และ dimethyl sulfoxide-*d*₆ (99.9% atom D) จาก Cambridge

Isotope Laboratories และตัวทำละลายที่ใช้สำหรับการสังเคราะห์และทำให้บริสุทธิ์ ได้แก่ acetone (99.5%), ethanol (99.7%), ethyl acetate (98%) และ hexanes (98%) จาก RCI Labscan

2.1.2.3 การติดตามปฏิกิริยาเคมี ใช้เทคนิค TLC (Thin Layer Chromatography) ซึ่งเป็นแผ่นอะลูมิเนียมเคลือบด้วยซิลิกาเจล 60 F254 ความหนา 0.2 mm จาก Merck D.C. และการทำสารให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) ใช้ซิลิกาเจลขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 60-200 μm จาก Merck

2.1.2.4 โอลิโกดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์สังเคราะห์ ที่ใช้ในงานวิจัยนี้จาก Integrated DNA Technologies (IDT) จากประเทศสิงคโปร์ โดยมีลำดับเบสดังแสดงตามตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ลำดับเบสของดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ (DNA) ที่ใช้ในงานวิจัย

DNA	Sequence (5' \rightarrow 3')
N24	CCA GGG CAT GGT AGA TCA CTG TAC GCC GCG
N25	CGC GGC GTA CAG TGA TCT ACC ATG CCC TGG
(AT) ₁₀	ATA TAT ATA TAT ATA TAT AT
(GC) ₁₀	GCG CGC GCG CGC GCG CGC GC

2.1.2.5 Salmon sperm DNA (DNA from salmon testes) ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้มาจาก Sigma-Aldrich จากประเทศสหรัฐอเมริกา โดยมี %G-C content = 41.2%

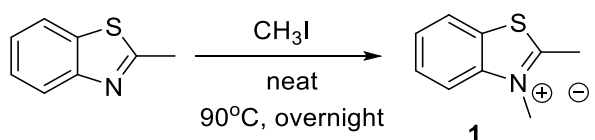
2.1.2.6 การเตรียมตัวอย่างเพื่อการตรวจวัดทั้งหมดใช้น้ำปราศจากไอออนจากเครื่องทำน้ำบริสุทธิ์ Milli-Q (Merck Millipore) มีความต้านทาน 18.2 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$

2.2 วิธีการทดลอง

2.2.1 การสังเคราะห์สี่อ้อมสไตริล

2.2.1.1 การสังเคราะห์สี่อ้อมสไตริลที่มีส่วนของตัวดับแสงเป็น dinitrophenyl และมี linker 4 carbon (BT-DNP)

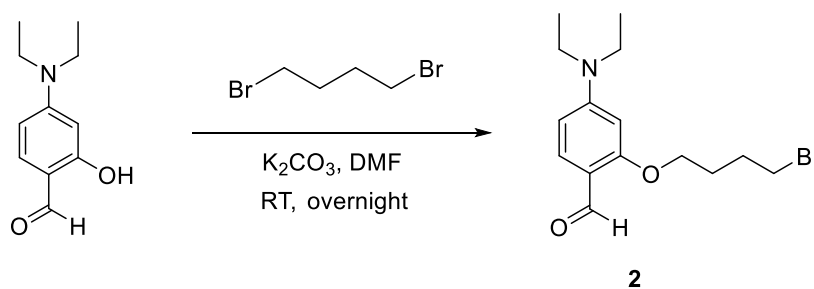
a) 2,3-Dimethylbenzo[d]thiazol-3-ium iodide (1)¹⁵



รูปที่ 2.1 แผนภาพการสังเคราะห์ 2,3-dimethylbenzo[d]thiazol-3-ium iodide (1)

สังเคราะห์สารหมายเลข (1) โดยให้ความร้อนแก่ของผสมระหว่าง 2-methylbenzothiazole (0.64 mL, 5 mmol) กับ iodomethane (0.62 mL, 10 mmol) ในหลอดทดลองที่มีฝาเกลียวปิดสนิทที่ 90°C เป็นเวลา 1 คืน ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (heating block) ดังรูปที่ 2.1 เมื่อครบกำหนดเวลาแล้ว ล้างของแข็งที่ได้ด้วย diethyl ether และกรองเก็บผลิตภัณฑ์ที่ได้แล้วทำให้แห้ง ได้สาร 1 เป็นของแข็งสีขาวขุ่น 0.8397 g คิดเป็นผลผลิต 58%; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.40 (d J = 8 Hz), 8.25 (d J = 8.5 Hz), 7.86 (t J = 8.5 Hz), 7.76 (t J = 7.0 Hz), 4.25 (s, 3H), 3.15 (s, 3H)

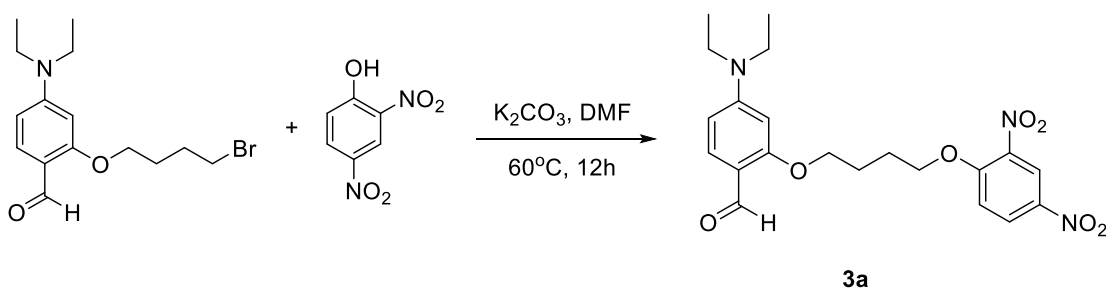
b) 2-(4-Bromobutoxy)-4-(diethylamino)benzaldehyde (2)⁴³



รูปที่ 2.2 แผนภาพการสังเคราะห์ 2-(4-bromobutoxy)-4-(diethylamino)benzaldehyde (2)

ผสม 4-diethylaminosalicylaldehyde (0.4831 g, 2.5 mmol), 1,4-dibromobutane (1.5 mL, 12.5 mmol) และ potassium carbonate ที่เผาเพื่อไล่ความชื้นแล้ว (0.5183 g, 3.75 mmol) ในตัวทำละลาย *N,N*-dimethylformamide (DMF) ที่ปราศจากน้ำ (2 mL) คนสารละลายที่อุณหภูมิห้องภายใต้บรรยากาศไนโตรเจนเป็นเวลา 1 คืน เมื่อปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์แล้วละลายของผสมที่ได้ใน dichloromethane ทำการสกัดด้วยน้ำ (3 x 20 mL) แล้วระเหยตัวทำละลายภายใต้สุญญากาศ และทำสารให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ mobile phase คือ EtOAc : hexane (1 : 4) มีค่า R_f เท่ากับ 0.4 ได้สาร 2 เป็นของเหลวสีน้ำตาลอ่อน 0.5855 g คิดเป็นผลผลิต 68%; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 10.16 (s), 7.71 (d J = 8.9 Hz), 7.25 (d J = 2.4 Hz), 6.32 (d J = 6.2 Hz), 5.28 (d J = 2.5 Hz), 4.11 – 4.05 (td J = 6 Hz, 2H), 3.49 (td J = 6.4, 2.3 Hz, 2H), 3.40 (q J = 7.0 Hz), 2.12 – 1.97 (m), 1.21 (td J = 7.0, 2.2 Hz)

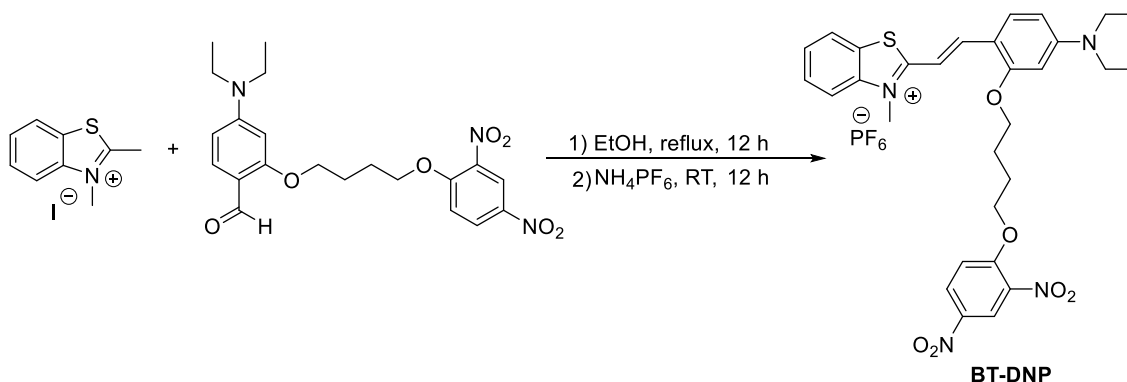
c) 4-(Diethylamino)-2-(4-(2,4-dinitrophenoxy)butoxy)benzaldehyde (3a)



รูปที่ 2.3 แผนภาพการสังเคราะห์ 4-(diethylamino)-2-(4-(2,4-dinitrophenoxy)butoxy)benzaldehyde (3a)

ใช้ 2-(4-bromobutoxy)-4-(diethylamino)benzaldehyde (**2**) (0.3883 g, 1.18 mmol) ทำปฏิกิริยากับ 2,4-dinitrophenol (0.2607 g, 1.416 mmol) และ potassium carbonate (0.2446 g, 1.77 mmol) ใน *N,N*-dimethylformamide ตั้งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน ดังรูปที่ **2.3** จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วย TLC ด้วยอัตราส่วนของ EtOAc ต่อ hexane เป็น 4 : 1 พบว่าสารตั้งต้นทำปฏิกิริยาหมด หลังจากปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์แล้วละลายของผสมที่ได้ใน dichloromethane และนำไปสกัดด้วยน้ำ (3 x 20 mL) เพื่อกำจัด *N,N*-dimethylformamide ระเหยตัวทำละลายภายใต้สุญญากาศ และทำสารให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ mobile phase คือ EtOAc : hexane (1 : 4) มีค่า R_f เท่ากับ 0.3 ได้สาร **3a** เป็นของแข็งสีส้ม 0.1780 g คิดเป็นผลผลิต 35%; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 10.17 (s, 1H), 8.74 (d J = 2.7 Hz, 1H), 8.43 (dd J = 9.2, 2.8 Hz, 1H), 7.72 (d J = 8.7 Hz, 1H), 4.37 (t J = 5.4 Hz, 2H), 4.22 (t J = 5.3 Hz, 1H), 3.44 (d J = 7.1 Hz, 3H), 2.14 (s, 4H), 1.24 (t J = 7.0 Hz, 6H)

d) (*E*)-2-(4-(Diethylamino)-2-(4-(2,4-dinitrophenoxy)butoxy)styryl)-3-methylbenzo[d]thiazol-3-ium hexafluorophosphate (**BT-DNP**)



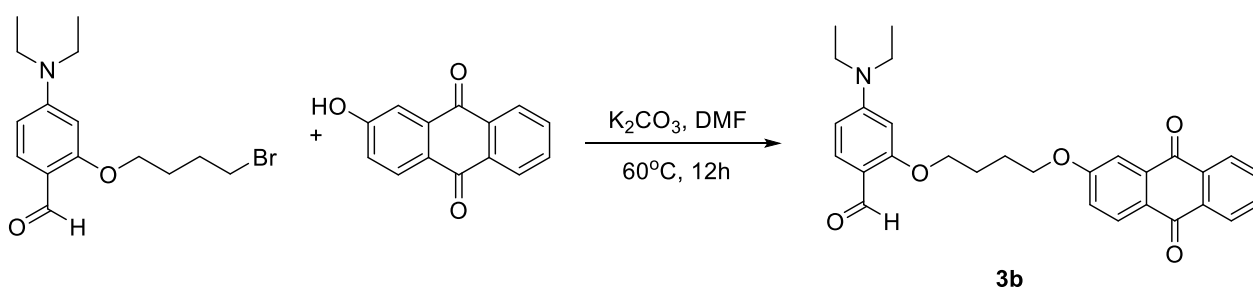
รูปที่ 2.4 แผนภาพการสังเคราะห์ (*E*)-2-(4-(diethylamino)-2-(4-(2,4-dinitrophenoxy)butoxy)styryl)-3-methylbenzo[d]thiazol-3-ium hexafluorophosphate (**BT-DNP**)

ละลาย 2,3-dimethylbenzo[d]thiazol-3-ium iodide (**1**) (0.1173 g, 0.403 mmol) และ 4-(diethylamino)-2-(4-(2,4-dinitrophenoxy)butoxy)benzaldehyde (**3a**) (0.934 g, 0.403 mmol) ในเอทานอล (5 mL) นำไปรีฟลักซ์เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาแลกเปลี่ยน counter anion โดยการเติม ammonium hexafluorophosphate (0.0657 g, 0.403 mmol) ลงในสารละลายที่ได้ในขั้นตอนก่อนหน้า ตั้งปฏิกิริยาต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ดังรูปที่ **2.4** กรองของแข็งที่เกิดขึ้นแล้วล้างผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยเอทานอลและทำให้แห้ง ได้สาร **BT-DNP** เป็นของแข็งสีม่วง 0.2702 g คิดเป็นผลผลิต 48%; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.74 (d J = 2.8 Hz, 1H), 8.49 (dd J = 9.3, 2.8 Hz, 1H), 8.18 (d J = 7.9 Hz, 1H), 8.07 (d J = 15.1 Hz, 1H), 8.02 (d J = 8.4 Hz, 1H), 7.86 (d J = 9.2 Hz, 1H), 7.74 (t J = 7.4 Hz, 1H), 7.63 (t J = 7.7 Hz, 2H), 7.62 (d J = 15.1 Hz, 1H), 7.47 (d J = 15.1 Hz, 1H), 6.52 (d J = 9.2 Hz, 1H), 6.23 (d J = 1.6 Hz, 1H), 4.48 (m, 2H), 4.11 (s, 3H), 4.27 (m, 2H), 3.54 (q J = 6.8

Hz, 4H), 2.06 (m, 4H), 1.18 (t $J = 7.0$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 171.4, 161.8, 156.6, 154.3, 144.6, 142.5, 140.0, 138.9, 130.0, 129.2, 127.5, 126.7, 124.0, 121.8, 116.2, 116.0, 111.5, 106.7, 104.7, 94.4, 70.9, 68.2, 45.0, 35.4, 25.6, 25.7, 13.1; m/z (MALDI-TOF) Calcd for M^+ 576.728, Found 577.212

2.2.1.2 การสังเคราะห์สี่ย้อมสไตริลที่มีส่วนของตัวดับแสงเป็น anthraquinone และมี linker 4 carbon (BT-AQ)

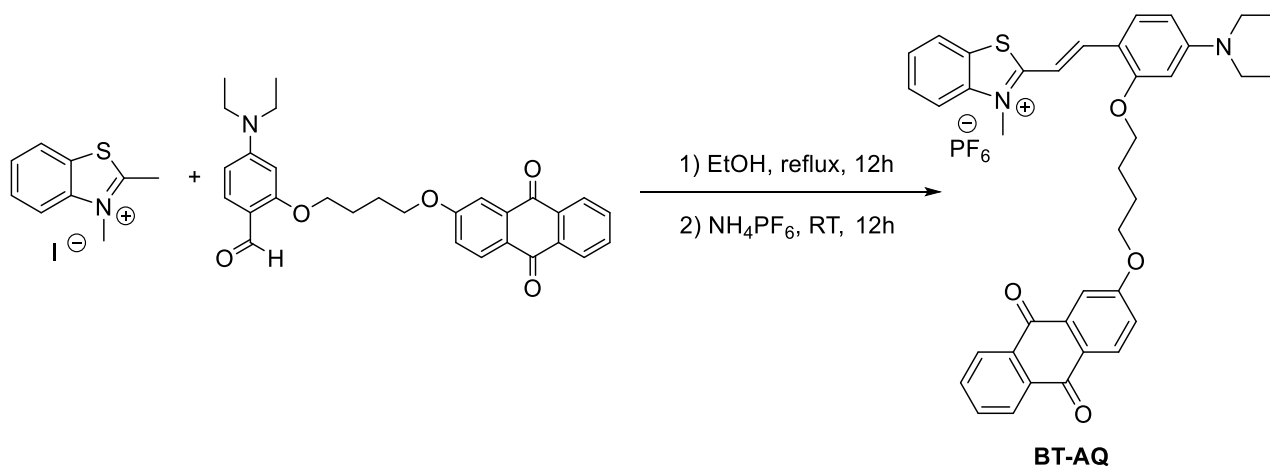
a) 4-(Diethylamino)-2-(4-((9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracen-2-yl)oxy)butoxy)benzaldehyde (**3b**)



รูปที่ 2.5 แผนภาพการสังเคราะห์ 4-(diethylamino)-2-(4-((9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracen-2-yl)oxy)butoxy)benzaldehyde (**3b**)

ใช้ 2-(4-bromobutoxy)-4-(diethylamino)benzaldehyde (**2**) (0.4819 g, 1.468 mmol) ทำปฏิกิริยากับ 2-hydroxyanthraquinone (0.3292 g, 1.468 mmol) และ potassium carbonate (0.3043 g, 2.202 mmol) ใน N,N -dimethylformamide (3 mL) ตั้งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 1 คืน ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน ดังรูปที่ 2.5 จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วย TLC ด้วยอัตราส่วนของ EtOAc ต่อ hexane เป็น 4 : 1 พบว่าสารตั้งต้นทำปฏิกิริยาหมด หลังจากปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์แล้วละลายของผสมที่ได้ใน dichloromethane ทำการสกัดกำจัด N,N -dimethylformamide ด้วยน้ำ (3 x 20 mL) ระเหยตัวทำละลายและทำสารให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ mobile phase คือ EtOAc : hexane (1 : 4) ได้สาร **3b** เป็นของแข็งสีขาวอ่อน 0.4267 g คิดเป็นผลผลิต 61%; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 10.20 (s, 1H), 8.26 (t, 4H), 7.82 – 7.74 (m, 2H), 7.23 – 7.18 (m, 2H), 6.28 (dd $J = 9.1, 2.1$ Hz, 1H), 6.15 (s, 1H), 4.32 (d $J = 4.6$ Hz, 4H), 3.49 (t $J = 6.3$ Hz, 4H), 2.34 (t $J = 7.6$ Hz, 4H), 1.54 (s, 2H), 1.22 (m, 4H)

b) (*E*)-2-(4-(Diethylamino)-2-(4-((9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracen-2-yl)oxy)butoxy)styryl)-3-methylbenzo[d]thiazol-3-ium hexafluorophosphate (BT-AQ)

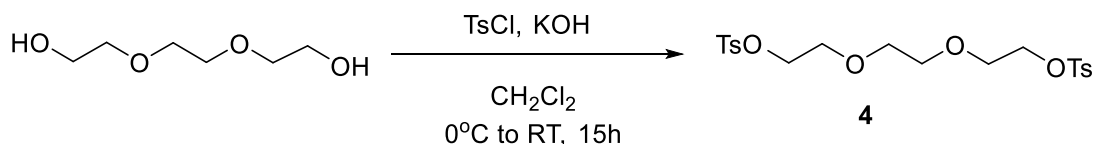


รูปที่ 2.6 แผนภาพการสังเคราะห์ (*E*)-2-(4-(diethylamino)-2-(4-((9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracen-2-yl)oxy)butoxy)styryl)-3-methylbenzo[d]thiazol-3-ium hexafluorophosphate (BT-AQ)

ใช้ 2,3-dimethylbenzo[d]thiazol-3-ium iodide (1) (0.1456 g, 0.5 mmol) และ 4-(diethylamino)-2-(4-((9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracen-2-yl)oxy)butoxy)benzaldehyde (3b) (0.2358 g, 0.5 mmol) ละลายในเอทานอล (5 mL) นำไปรีฟลักซ์เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาแลกเปลี่ยน counter anion โดยการเติม ammonium hexafluorophosphate (0.0815 g, 0.5 mmol) ลงในสารละลายที่ได้ในขั้นตอนก่อนหน้า ตั้งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ดังรูปที่ 2.6 แล้วกรองและล้างเก็บผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยเอทานอลก่อนทำให้แห้ง ได้สาร BT-AQ เป็นของแข็งสีม่วง 0.1588 g คิดเป็นผลผลิต 51%; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.14 (dd $J = 7.6, 0.9$ Hz), 8.08 (d $J = 8.0$ Hz), 8.05 (dd $J = 4.8, 3.9$ Hz), 8.05 – 8.03 (dd), 7.97 (d $J = 15.1$ Hz), 7.91 (dd $J = 7.4, 1.3$ Hz), 7.90 (1H), 7.85 (1H), 7.82 (d $J = 9.2$ Hz), 7.63 (t $J = 7.5$ Hz), 7.57 (d $J = 2.6$ Hz), 7.52 (t $J = 7.0$ Hz), 7.38 (d $J = 15.5$ Hz), 7.35 (dd $J = 8.7, 6.0$ Hz), 6.49 (dd $J = 9.2, 1.8$ Hz), 6.23 (d $J = 1.8$ Hz), 4.37 (s, 2H), 4.30 (s, 2H), 4.01 (s, 3H), 3.53 (q $J = 6.6$ Hz, 4H), 2.07 (m, 4H), 1.18 (t $J = 7.0$ Hz, 6H); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 182.7, 181.7, 171.3, 163.6, 161.8, 154.3, 142.2, 135.4, 135.2, 134.7, 133.4, 133.3, 130.0, 129.1, 127.4, 127.1, 126.7, 126.6, 124.0, 121.7, 115.8, 111.6, 111.1, 106.6, 104.5, 94.4, 68.6, 68.3, 45.0, 35.4, 25.7, 13.2; m/z (MALDI-TOF) Calcd for M^+ 616.810, Found 617.247

2.2.1.3 การสังเคราะห์สี่ย้อมสไตริลที่มีส่วนของตัวดับแสงเป็น anthraquinone และมี triethylene glycol (TEG) linker (**BT-O-AQ**)

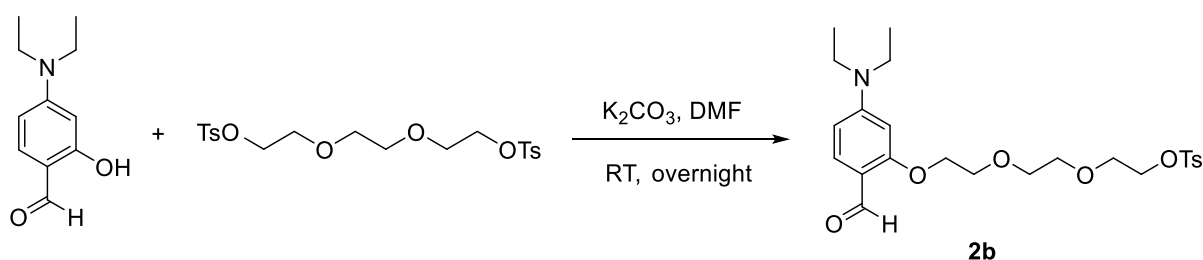
a) Triethylene glycol bis(*p*-toluenesulfonate) (**4**)



รูปที่ 2.7 แผนภาพการสังเคราะห์ triethylene glycol bis(*p*-toluenesulfonate) (**4**)

ละลาย triethylene glycol (0.578 g, 5 mmol) และ *p*-toluenesulfonyl chloride (1.906 g, 10 mmol) ใน dichloromethane จากนั้นค่อย ๆ เติม potassium hydroxide (2.2442 g, 40 mmol) ที่อุณหภูมิ 0 °C และคนสารละลายที่อุณหภูมิ 0 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นตั้งปฏิกิริยาทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 คืน⁴⁴ เมื่อปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์แล้วละลายของผสมที่ได้ใน dichloromethane ก่อนนำมาสกัดด้วยน้ำ (3 x 20 mL) แล้วระเหยตัวทำละลายภายใต้สุญญากาศ ได้สาร **4** เป็นของแข็งสีขาว 1.5429 g คิดเป็นผลผลิต 67%; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.77 (d J = 8.3 Hz, 4H), 7.33 (d J = 8.3 Hz, 4H), 4.12 (t J = 4.8 Hz, 4H), 3.63 (t J = 4.6 Hz, 4H), 3.51 (s, 4H), 2.43 (s, 6H)

b) 2-(2-(2-(5-(Diethylamino)-2-formylphenoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl 4-methylbenzene sulfonate (**2b**)

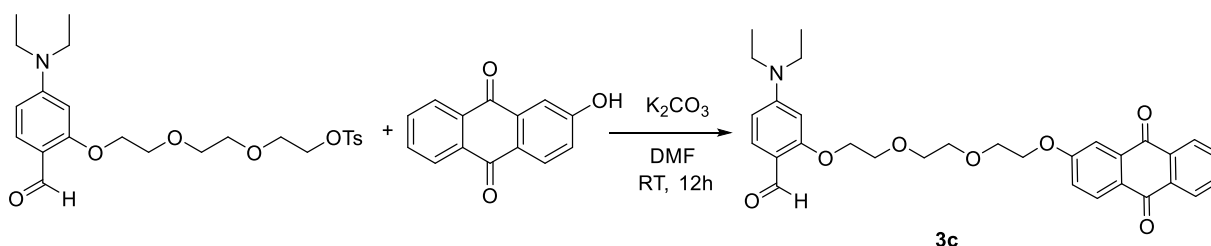


รูปที่ 2.8 แผนภาพการสังเคราะห์ 2-(2-(2-(5-(diethylamino)-2-formylphenoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate (**2b**)

ละลาย triethylene glycol bis(*p*-toluenesulfonate) (**4**) (0.9311 g, 2.0205 mmol), 4-diethylaminosalicylaldehyde (0.1962 g, 1.0153 mmol) และ potassium carbonate ที่เผาเพื่อไล่ความชื้นแล้ว (0.2106 g, 1.5229 mmol) ในตัวทำละลาย *N,N*-dimethylformamide (DMF) ที่ปราศจากน้ำ (2 mL) คนสารละลายที่อุณหภูมิห้องภายใต้บรรยากาศไนโตรเจนเป็นเวลา 1 คืน ดังรูปที่ 2.8 เมื่อปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์แล้วละลายของผสมที่ได้ใน dichloromethane นำมาสกัดเพื่อกำจัด *N,N*-dimethylformamide ด้วยน้ำ (3 x 20 mL) หลังจากนั้นระเหยตัวทำละลายภายใต้สุญญากาศ และทำสารให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบ gradient โดยใช้ mobile phase คือ EtOAc : hexane = 1 : 4, 1 : 2 และ 1 : 1

ตามลำดับ มีค่า R_f เท่ากับ 0.2 ได้สาร **2b** เป็นของเหลวสีน้ำตาล 0.1626 g คิดเป็นผลผลิต 10%; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 10.13 (s, 1H), 7.78 (d J = 8.3 Hz, 2H), 7.69 (d J = 8.9 Hz, 1H), 7.31 (dd J = 8.5 Hz, 2H), 7.25 (s, 1H), 6.28 (d J = 8.2 Hz, 1H), 6.02 (s, 1H), 4.18 (t J = 5 Hz, 2H), 4.14 (t J = 5 Hz, 2H), 3.86 (t J = 4.5 Hz, 2H), 3.60 (d J = 2.6 Hz, 4H), 3.59 (d J = 4.2 Hz, 2H), 3.40 (q J = 7.1 Hz, 4H), 1.62 (s, 3H), 1.19 (t J = 7.1 Hz, 4H).

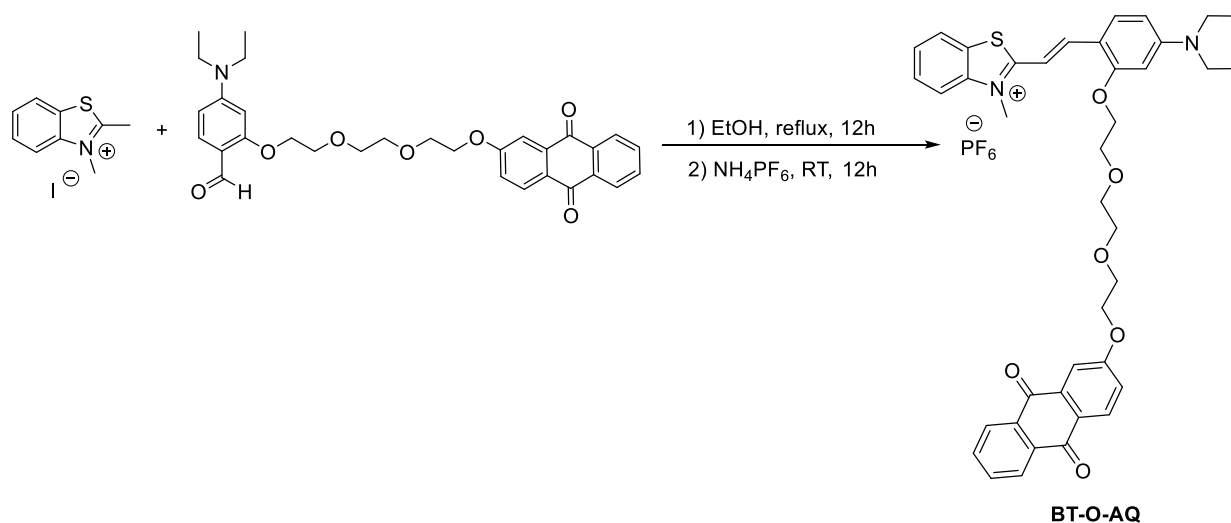
c) 4-(Diethylamino)-2-(2-(2-(2-((9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracen-2-yl)oxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)benzaldehyde (**3c**)



รูปที่ 2.9 แผนภาพการสังเคราะห์ 4-(diethylamino)-2-(2-(2-(2-((9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracen-2-yl)oxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)benzaldehyde (**3c**)

ละลาย 2-hydroxyanthraquinone (0.0830 g, 0.3729 mmol) และ potassium carbonate (0.0703 g, 0.5085 mmol) ใน *N,N*-dimethylformamide (4 mL) คนสารละลายที่อุณหภูมิห้องทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นค่อยๆเติม 2-(2-(2-(5-(diethylamino)-2-formylphenoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate (**2b**) (0.1626 g, 0.339 mmol) แล้วตั้งปฏิกิริยาทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องต่อเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ดังรูปที่ 2.9 เมื่อปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์แล้ว ละลายของผสมที่ได้ใน dichloromethane นำมาสกัดกำจัด *N,N*-dimethylformamide ด้วยน้ำ (3 x 20 mL) หลังจากนั้นระเหยตัวทำละลายภายใต้สุญญากาศ และทำให้สารบริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ mobile phase คือ EtOAc : hexane (1 : 1) ได้สาร **3c** เป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน 0.1265 g คิดเป็นผลผลิต 67%; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 10.17 (s, 1H), 8.27 (td J = 7.8, 1.9 Hz, 2H), 8.23 (d J = 8.6 Hz, 2H), 7.79 – 7.74 (m, 2H), 7.72 (d J = 2.6 Hz, 1H), 7.70 (d J = 9.0 Hz, 1H), 7.32 (d J = 8.4 Hz, 1H), 7.28 (dd J = 8.6, 2.5 Hz, 1H), 5.29 (s, 1H), 4.36 – 4.28 (m, 2H), 4.24 – 4.17 (m, 2H), 3.92 (dd J = 9.2, 4.3 Hz, 4H), 3.77 (d J = 1.1 Hz, 4H), 3.39 (dt J = 14.2, 5.0 Hz, 4H), 2.42 (s), 1.28 – 1.22 (m, 2H), 1.19 (t J = 7.1 Hz, 4H)

d) (*E*)-2-(4-(diethylamino)-2-(2-(2-(2-((9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracen-2-yl)oxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)styryl)-3-methylbenzo[d]thiazol-3-ium hexafluorophosphate (**BT-O-AQ**)



รูปที่ 2.10 แผนภาพการสังเคราะห์ (*E*)-2-(4-(diethylamino)-2-(2-(2-(2-((9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracen-2-yl)oxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)styryl)-3-methylbenzo[d]thiazol-3-ium hexafluorophosphate (**BT-O-AQ**)

รีฟลักซ์ สารละลายผสมระหว่าง 4-(diethylamino)-2-(2-(2-(2-((9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracen-2-yl)oxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)benzaldehyde (**3c**) (0.1201 g, 0.2259 mmol) และ 2,3-dimethylbenzo[d]thiazol-3-ium iodide (**1**) (0.0658 g, 0.2259 mmol) ในเอทานอล (5 mL) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ยืนยันโครงสร้างผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิค ^1H NMR หลังจากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาแลกเปลี่ยน counter anion โดยการเติม ammonium hexafluorophosphate (0.0368 g, 0.2259 mmol) และตั้งปฏิกิริยาต่อที่ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ดังรูปที่ **2.10** แล้วกรองและล้างเก็บผลิตภัณฑ์ด้วยเอทานอลก่อนทำให้แห้ง ได้สาร **BT-O-AQ** เป็นของแข็งสีม่วง 0.060 g คิดเป็นผลผลิต 32%; ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.14 (dd $J = 7.5, 1.4$ Hz), 8.12 (dd $J = 7.4, 1.4$ Hz), 7.93 (dd $J = 8.1, 3.1$ Hz), 7.90 (d $J = 1.4$ Hz), 7.89 (d $J = 7.7, 1.5$ Hz), 7.88 ppm (d $J = 2.3$ Hz), 7.85 (d $J = 8.4$ Hz), 7.64 (d $J = 8.9$ Hz), 7.54 (t $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.49 (m, 1H), 7.41 ppm (d $J = 2.6$ Hz), 7.38-7.35 (t $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.20 (dt $J = 6.9, 3.4$ Hz), 6.42 (dd $J = 9.1, 1.9$ Hz), 6.18 (d $J = 1.7$ Hz), 4.27 (m, 4H), 4.01 (s, 3H), 3.94 – 3.79 (m), 3.72 (d $J = 1.2$ Hz), 3.49 (q $J = 7.0$ Hz), 1.16 (t $J = 7.0$ Hz); ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 182.6, 181.6, 171.4, 163.5, 162.2, 154.0, 142.0, 135.2, 135.1, 134.7, 133.4, 129.7, 129.0, 127.2, 127.1, 126.6, 123.9, 121.2, 115.7, 111.6, 110.7, 106.4, 94.5, 70.8, 70.6, 69.3, 69.2, 68.6, 68.1, 45.0, 35.2, 13.1; m/z (MALDI-TOF) Calcd for M^+ 676.918, Found 677.268

2.2.2 การทดลองยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตเมทรี (UV-vis spectrophotometry)

การวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ บันทึกสัญญาณในช่วงความยาวคลื่น 200-800 nm โดยบันทึกสัญญาณของน้ำและ 1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (blank) ให้เป็น baseline ก่อน จึงค่อย set zero (ตั้งค่าศูนย์) แล้ววัดสัญญาณของสีย้อม

2.2.2.1 การทดลองการดูดกลืนแสงของสีย้อมในกลีเซอรอล

ใช้ stock สีย้อมความเข้มข้น 100 μM ใน DMSO ปิเปตสีย้อมปริมาตร 100 μL , pure กลีเซอรอลปริมาตร 950 μL และ 1 M phosphate buffer (pH 7.4) ปริมาตร 10 μL ลงใน quartz cuvette ปริมาตร 1 mL จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสีย้อมเท่ากับ 10 μM วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายของสีย้อม แล้วนำข้อมูลไปสร้างกราฟระหว่างความยาวคลื่นและค่าการดูดกลืนแสง

2.2.2.2 การทดลองการดูดกลืนแสงของสีย้อมกับโอลิโกดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ ($(\text{AT})_{10}$ และ $(\text{GC})_{10}$)

ใช้ stock สีย้อมที่มีความเข้มข้น 100 μM ใน DMSO และ stock ดีเอ็นเอ ($(\text{AT})_{10}$ 1024.7 μM กับ $(\text{GC})_{10}$ 1632.8 μM ในน้ำ ปิเปตน้ำ, 1 M phosphate buffer (pH 7.4) ปริมาตร 10 μL , สีย้อม ปริมาตร 100 μL และดีเอ็นเอปริมาตรต่าง ๆ ดังตารางที่ 2.2 ลงใน quartz cuvette ขนาด 1 mL จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสีย้อมเท่ากับ 10 μM และความเข้มข้นสุดท้ายของดีเอ็นเอเท่ากับ 5, 10 และ 20 μM ตามลำดับ วัดค่าการดูดกลืนแสงของสีย้อมในดีเอ็นเอที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แล้วนำข้อมูลไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความยาวคลื่นและค่าการดูดกลืนแสง

ตารางที่ 2.2 ปริมาตรดีเอ็นเอ ($(\text{AT})_{10}$ และ $(\text{GC})_{10}$) ที่ใช้ในการทดลองการดูดกลืนแสงของสีย้อมกับโอลิโกดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ ($(\text{AT})_{10}$ และ $(\text{GC})_{10}$)

DNA	ปริมาตร dye stock (μL)	ปริมาตรน้ำที่ใช้ (μL)	ปริมาตร บัฟเฟอร์ (μL)	ปริมาตรที่ปิเปต (μL)		
				ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
$(\text{AT})_{10}$ (Cell 1)	100	870	10	4.9	+4.9	+9.8
$(\text{GC})_{10}$ (Cell 2)	100	878	10	3.1	+3.1	+6.1

2.2.2.3 การทดลองการดูดกลืนแสงของสีย้อมกับ dsDNA (N24+N25) และ ssDNA (N24)

ใช้ stock สีย้อมความเข้มข้น 100 μM ใน DMSO และ stock ssDNA กับ dsDNA 1000 μM ปิเปตน้ำปริมาตร 800 μL , 1 M phosphate buffer (pH 7.4) ปริมาตร 10 μL , สีย้อมปริมาตร 100 μL และก่อนวัดการดูดกลืนแสงแต่ละครั้ง เติมดีเอ็นเอปริมาตร 1, 1.5, 2.5, 5, 10, 30, 50 และ 50 μL ตามลำดับ ลงใน quartz cuvette ปริมาตร 1 mL จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสีย้อมเท่ากับ 10 μM และความเข้มข้นสุดท้าย

ของดีเอ็นเอเท่ากับ 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10 และ 15 μM ตามลำดับ วัดค่าการดูดกลืนแสงของสีย้อมในดีเอ็นเอที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แล้วนำข้อมูลไปสร้างกราฟระหว่างความยาวคลื่นและค่าการดูดกลืนแสง

2.2.2.4 การทดลองการดูดกลืนแสงของสีย้อมกับ salmon sperm DNA

ใช้ stock สีย้อมความเข้มข้น 100 μM ใน DMSO และ stock salmon sperm DNA 4 mg/ μL (คำนวณความเข้มข้นจากการวัดการดูดกลืน UV ที่ 260 nm) ปิเปตน้ำปริมาตร 790 μL , สีย้อมปริมาตร 100 μL , 1 M phosphate buffer (pH 7.4) ปริมาตร 10 μL และก่อนวัดการดูดกลืนแสงแต่ละครั้งเติมดีเอ็นเอปริมาตร 1, 4, 5, 10, 30, 50, 50, 50 และ 50 μL ตามลำดับ ลงใน quartz cuvette ปริมาตร 1 mL จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสีย้อมเท่ากับ 10 μM และความเข้มข้นสุดท้ายของดีเอ็นเอเท่ากับ 0.4, 2, 4, 8, 20, 40, 60, 80, 100 และ 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ตามลำดับ วัดค่าการดูดกลืนแสงของสีย้อมในดีเอ็นเอที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แล้วนำข้อมูลไปสร้างกราฟระหว่างความยาวคลื่นและค่าการดูดกลืนแสง

2.2.2.5 การทดลองการดูดกลืนแสงของสีย้อมในภาวะที่มีเกลือ

ใช้ stock สีย้อมความเข้มข้น 100 μM ใน DMSO และ stock เกลือ MgCl_2 กับ NaCl 2.5 M ปิเปตน้ำปริมาตร 800 μL สำหรับ MgCl_2 และ 740 μL สำหรับ NaCl, 1 M phosphate buffer (pH 7.4) ปริมาตร 10 μL , สีย้อมปริมาตร 100 μL , ดีเอ็นเอปริมาตร 50 μL และก่อนวัดการดูดกลืนแสงแต่ละครั้ง เติมเกลือปริมาตรต่าง ๆ ดังนี้ MgCl_2 2, 2, 4, 12, 20 และ 20 μL , NaCl 10, 10, 20, 40, 160 และ 160 μL ตามลำดับ ลงใน quartz cuvette ปริมาตร 1 mL จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสีย้อมเท่ากับ 10 μM , ความเข้มข้นสุดท้ายของดีเอ็นเอเท่ากับ 5 μM และความเข้มข้นสุดท้ายของเกลือ MgCl_2 เท่ากับ 5, 10, 20, 50, 100 และ 150 mM เปรียบเทียบกับ NaCl ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 25, 50, 100, 200, 600 และ 1000 mM ตามลำดับ วัดค่าการดูดกลืนแสงของสีย้อมในดีเอ็นเอและเกลือที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แล้วนำข้อมูลไปสร้างกราฟระหว่างความยาวคลื่นและค่าการดูดกลืนแสง

2.2.3 การทดลองฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรสโกปี (Fluorescence spectroscopy)

การวัดการวาวแสงด้วยเครื่องฟลูออเรสเซนส์ ใช้ความยาวคลื่นกระตุ้น (λ_{ex}) ที่ 565 nm บันทึกสัญญาณการคายแสงช่วงคลื่นตั้งแต่ 575-800 nm โดยตั้งค่า PMT (photomultiplier tube) voltage เป็น high และ slit กว้าง 5 nm จากนั้นจึงนำสเปกตรัมที่วัดได้ไปหักลบ ด้วย blank (สัญญาณของน้ำและฟอสเฟตบัฟเฟอร์) ในโปรแกรม Microsoft Excel

2.2.3.1 การทดลองการวาวแสงของสีย้อมในกลีเซอรอล

ใช้ stock สีย้อมความเข้มข้น 100 μM ใน DMSO ปิเปตสีย้อมปริมาตร 100 μL , กลีเซอรอลปริมาตร 950 μL และ 1 M phosphate buffer (pH 7.4) ปริมาตร 10 μL ลงใน quartz cuvette ปริมาตร 1 mL จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสีย้อมเท่ากับ 10 μM วัดค่าการวาวแสงของสารละลายของสีย้อมแล้วนำข้อมูลไปสร้างกราฟระหว่างความยาวคลื่นและค่าความเข้มการวาวแสง

2.2.3.2 การทดลองการวาวแสงของสีย้อมกับโพลิโกติออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ (AT)₁₀ และ (GC)₁₀

ใช้ stock สีย้อมที่มีความเข้มข้น 100 μM ใน DMSO และ stock ดีเอ็นเอ (AT)₁₀ 1024.7 μM กับ (GC)₁₀ 1632.8 μM ปิเปตน้ำ, 1 M phosphate buffer (pH 7.4) ปริมาตร 10 μL , สีย้อมปริมาตร 100 μL และดีเอ็นเอปริมาตรต่าง ๆ ดังตารางที่ 2.2 ลงใน quartz cuvette 1 mL จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสีย้อมเท่ากับ 10 μM และความเข้มข้นสุดท้ายของดีเอ็นเอเท่ากับ 5, 10 และ 20 μM ตามลำดับ ใน 10 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ วัดค่าการวาวแสงของสีย้อมในดีเอ็นเอที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แล้วนำข้อมูลไปสร้างกราฟระหว่างความยาวคลื่นและค่าความเข้มการวาวแสง

2.2.3.3 การทดลองการวาวแสงของสีย้อมใน dsDNA (N24+N25) และ ssDNA (N24)

ใช้ stock สีย้อมความเข้มข้น 100 μM ใน DMSO และ stock ssDNA กับ dsDNA 1000 μM ปิเปตน้ำปริมาตร 800 μL , 1 M phosphate buffer (pH 7.4) ปริมาตร 10 μL , สีย้อมปริมาตร 100 μL และก่อนวัดการวาวแสงแต่ละครั้ง เติมดีเอ็นเอปริมาตร 1, 1.5, 2.5, 5, 10, 30, 50 และ 50 μL ตามลำดับ ลงใน quartz cuvette ปริมาตร 1 mL จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสีย้อมเท่ากับ 10 μM และความเข้มข้นสุดท้ายของดีเอ็นเอเท่ากับ 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10 และ 15 μM ตามลำดับ วัดค่าการวาวแสงของสีย้อมในดีเอ็นเอที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แล้วนำข้อมูลไปสร้างกราฟระหว่างความยาวคลื่นและค่าความเข้มการวาวแสง

2.2.3.4 การทดลองการวาวแสงของสีย้อมใน salmon sperm DNA

ใช้ stock สีย้อมความเข้มข้น 100 μM ใน DMSO และ stock salmon sperm DNA 4 mg/ μL ปิเปตน้ำปริมาตร 790 μL , สีย้อมปริมาตร 100 μL , 1 M phosphate buffer (pH 7.4) ปริมาตร 10 μL และก่อนวัดการวาวแสงแต่ละครั้ง เติมดีเอ็นเอปริมาตร 1, 4, 5, 10, 30, 50, 50, 50, 50 และ 50 μL ตามลำดับ ลงใน quartz cuvette ปริมาตร 1 mL จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสีย้อมเท่ากับ 10 μM และความเข้มข้นสุดท้ายของดีเอ็นเอเท่ากับ 0.4, 2, 4, 8, 20, 40, 60, 80, 100 และ 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ตามลำดับ วัดค่าการวาวแสงของสีย้อมในดีเอ็นเอที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แล้วนำข้อมูลไปสร้างกราฟระหว่างความยาวคลื่นและค่าความเข้มการวาวแสง

2.2.3.5 การทดลองการวาวแสงของสีย้อมในภาวะที่มีเกลือ

ใช้ stock สีย้อมความเข้มข้น 100 μM ใน DMSO และ stock เกลือ MgCl_2 กับ NaCl 2.5 M ปิเปตน้ำปริมาตร 800 μL สำหรับ MgCl_2 และ 740 μL สำหรับ NaCl, 1 M phosphate buffer (pH 7.4) ปริมาตร 10 μL , สีย้อมปริมาตร 100 μL , ดีเอ็นเอปริมาตร 50 μL และก่อนวัดการวาวแสงแต่ละครั้ง เติมเกลือปริมาตรต่าง ๆ ดังนี้ MgCl_2 2, 2, 4, 12, 20 และ 20 μL , NaCl 10, 10, 20, 40, 160 และ 160 μL ตามลำดับ ลงใน quartz cuvette ปริมาตร 1 mL จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสีย้อมเท่ากับ 10 μM , ความเข้มข้นสุดท้ายของดีเอ็นเอเท่ากับ 5 μM และความเข้มข้นสุดท้ายของเกลือ MgCl_2 เท่ากับ 5, 10, 20, 50, 100 และ 150 mM เปรียบเทียบกับ NaCl ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 25, 50, 100, 200, 600 และ 1000 mM ตามลำดับวัด

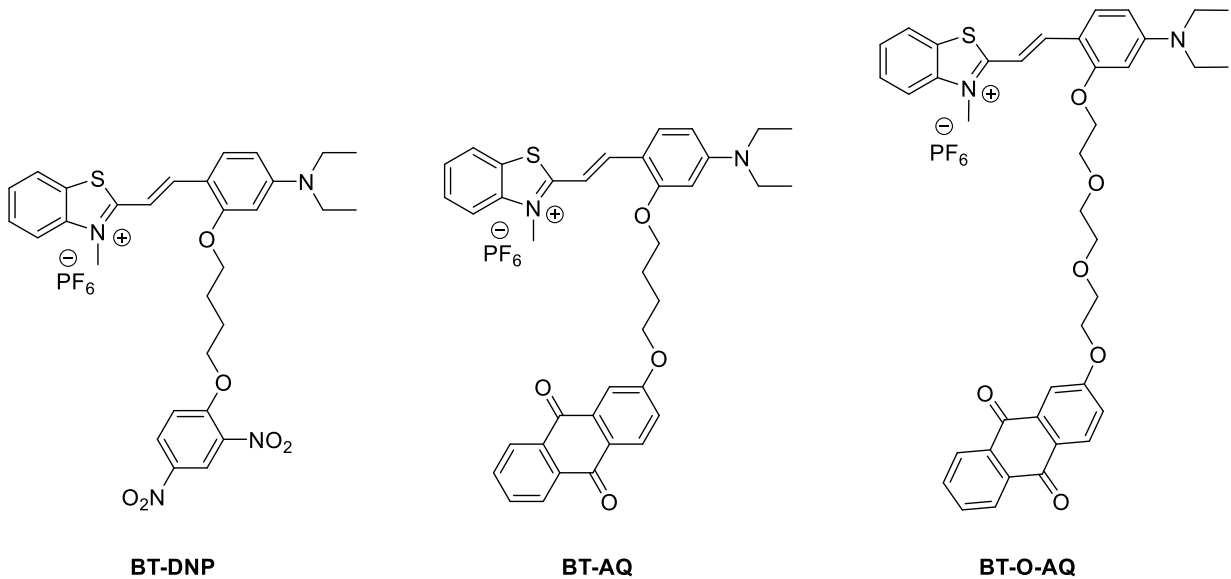
ค่าการรวมแสงของสี่เหลี่ยมในดีเอ็นเอและเกลือที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แล้วนำข้อมูลไปสร้างกราฟระหว่างความยาวคลื่นและค่าความเข้มการรวมแสง

บทที่ 3

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

3.1 การสังเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์ของสีย้อมสไตริล

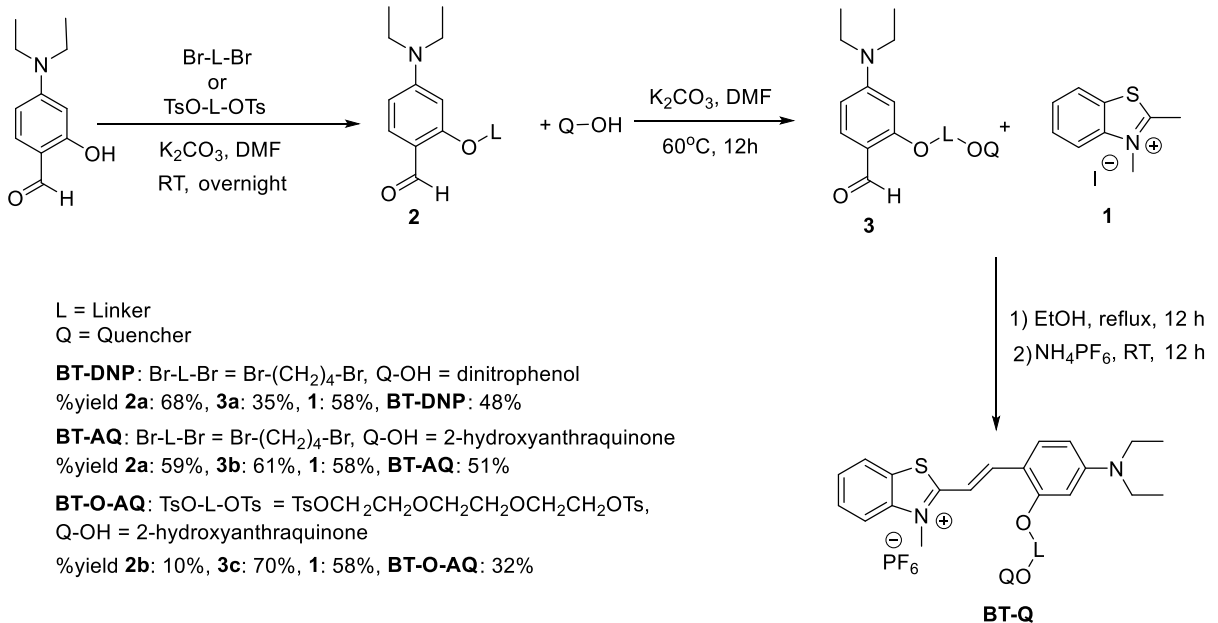
ในงานวิจัยนี้มีเป้าหมายที่จะพัฒนาสีย้อมสไตริลที่แสดงการตอบสนองกับดีเอ็นเอได้ดีขึ้น โดยดัดแปรโครงสร้างหลักของสีย้อมสไตริลให้เชื่อมต่อกับตัวดับแสงเพื่อลดการวาวแสงของสีย้อมอิสระ โดยมีชนิดและความยาวของตัวเชื่อมต่างกัน 3 แบบ ได้แก่ 1) สีย้อมสไตริลที่ประกอบด้วยส่วนตัวดับแสงเป็น dinitrophenyl ที่เชื่อมต่อผ่านตัวเชื่อมที่มีคาร์บอน 4 อะตอม (C4) ได้แก่ **BT-DNP** 2) สีย้อมสไตริลที่ประกอบด้วยส่วนตัวดับแสงเป็น anthraquinone ที่เชื่อมต่อผ่านตัวเชื่อมที่มีคาร์บอน 4 อะตอม (C4) ได้แก่ **BT-AQ** และ 3) สีย้อมสไตริลที่มีส่วนตัวดับแสงเป็น anthraquinone โดยมี triethylene glycol (TEG) เป็นตัวเชื่อม **BT-O-AQ** ดังรูปที่ 3.1 โดยสีย้อมทุกชนิดมีตำแหน่งที่ติดตัวดับแสงตำแหน่งเดียวกันเพื่อจะได้เปรียบเทียบกับกัน



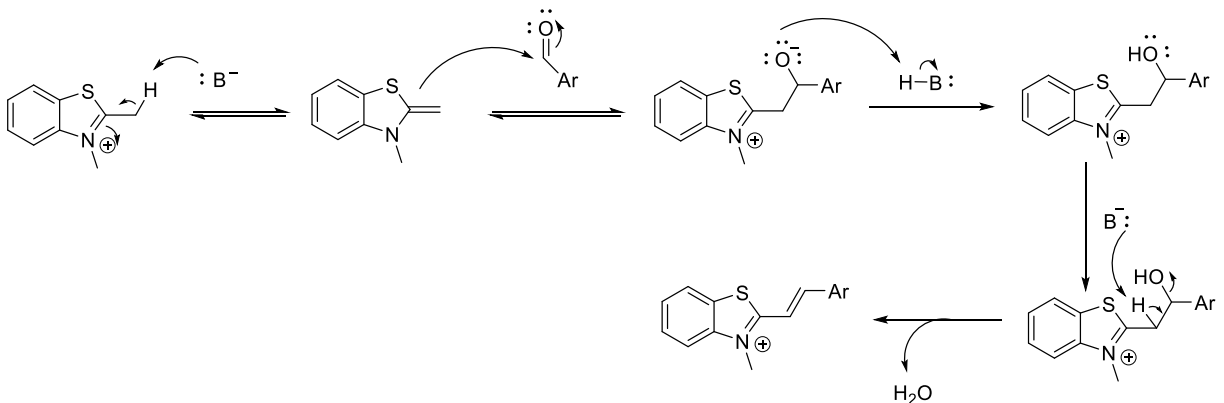
รูปที่ 3.1 โครงสร้างของสีย้อมสไตริลทั้ง 3 ชนิดที่ได้สังเคราะห์ในงานวิจัยนี้

จากการสืบค้นในฐานข้อมูล SciFinder-n⁴⁵ พบว่าสีย้อมเหล่านี้เป็นโมเลกุลใหม่ที่ยังไม่เคยมีผู้รายงานวิธีการสังเคราะห์และสมบัติมาก่อน การสังเคราะห์สีย้อมสไตริลทั้ง 3 ชนิดสามารถทำได้โดยใช้วิธีการมาตรฐาน คล้ายกับที่เคยมีผู้รายงานมาก่อนหน้านี้แล้ว¹⁵ โดยการสังเคราะห์จะเริ่มต้นจากการนำ 4-diethylamino-2-hydroxybenzaldehyde ไปเชื่อมต่อกับ bifunctional linker ได้แก่ 1,4-dibromobutane หรือ triethyleneglycol bis(*p*-toluenesulfonate) ตรงตำแหน่งของหมู่ 2-hydroxy โดยผ่านการเกิดอีเทอร์ด้วยปฏิกิริยา nucleophilic substitution แบบ S_N2 (Williamson ether synthesis) ปฏิกิริยานี้อาศัยโพแทสเซียมคาร์บอเนตเป็นเบสเพื่อดีโพรโตนเนตหมู่ฟีนอลของ 4-diethylamino-2-hydroxybenzaldehyde จากนั้นจึงให้แอลดีไฮด์ที่ยังคงมีหมู่หลุดออก (Br หรือ OTs) เหลืออีกหนึ่งหมู่ทำปฏิกิริยากับตัวดับแสงที่มีหมู่ฟังก์ชันฟีนอลได้แก่ 2,4-dinitrophenol หรือ 2-hydroxyanthraquinone ได้เป็นแอลดีไฮด์ที่เชื่อมต่อกับตัวดับแสง จากนั้นจึงนำแอลดีไฮด์ที่ได้มาทำปฏิกิริยากับ 2,3-dimethylbenzo[d]thiazol-3-ium iodide โดยทำ

ปฏิกิริยาในเอทานอลที่อุณหภูมิรีฟลักซ์ ดังรูปที่ 3.2 ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นปฏิกิริยาการควบแน่นคล้ายกับปฏิกิริยา Aldol condensation ดังกลไกที่แสดงในรูปที่ 3.3 ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสีส้มตามต้องการ และแยกออกมาได้เป็นของแข็งสีม่วงหลังการแลกเปลี่ยนคาน์เตอร์ไอออนจากไอโดไดด์เป็นเฮกซะฟลูออโรสเฟต (PF₆) โดยมีร้อยละของผลที่ได้ของการสังเคราะห์สีส้มทั้ง 3 ชนิด (แสดงเฉพาะขั้นตอนของการควบแน่น) ดังนี้ BT-DNP เท่ากับร้อยละ 48, BT-AQ เท่ากับร้อยละ 51 และ BT-O-AQ เท่ากับร้อยละ 32

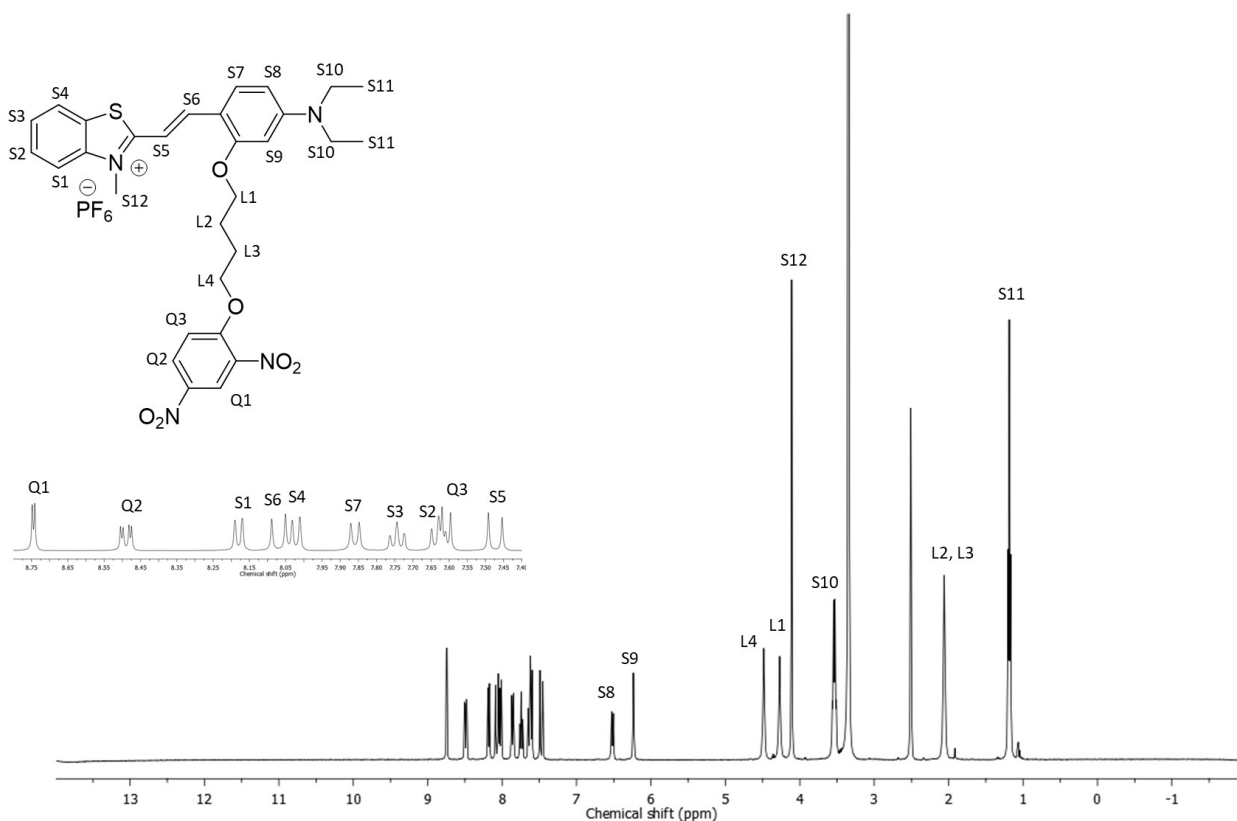


รูปที่ 3.2 แผนภาพการสังเคราะห์ BT-DNP, BT-AQ และ BT-O-AQ



รูปที่ 3.3 แผนภาพการเกิดปฏิกิริยา Aldol condensation

จากนั้นจึงพิสูจน์เอกลักษณ์ของผลิตภัณฑ์ที่ได้เพื่อยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS และนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ โดยสามารถวิเคราะห์ข้อมูล ¹H NMR และ ¹³C NMR สเปกตรัมของสาร BT-DNP, BT-AQ และ BT-O-AQ ได้ดังรูปที่ 3.2, 3.3 และ 3.4 ตามลำดับ



รูปที่ 3.4 ^1H NMR ของ (*E*)-2-(4-(diethylamino)-2-(4-(2,4-dinitrophenoxy)butoxy)styryl)-3-methylbenzo[d]thiazol-3-ium hexafluorophosphate (BT-DNP) (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

สามารถวิเคราะห์ ^1H NMR ของสาร BT-DNP ได้ดังนี้

สัญญาณที่ δ 8.74 ppm ($d J = 2.8$ Hz, 1H) เป็นโปรตอนหมายเลขที่ Q1 บนหมู่ dinitrophenyl ซึ่งเกิดการ deshield มากที่สุด เนื่องจากอยู่ระหว่างหมู่นิโตรทั้งสองกลุ่ม ทำให้โปรตอนดังกล่าวมี chemical shift สูงกว่าโปรตอนตำแหน่งที่ Q2 ที่ δ 8.49 ppm ($dd J = 9.3$ Hz, 1H) ซึ่งอยู่ใกล้กับหมู่นิโตรเพียงหมู่เดียว และโปรตอนตำแหน่งที่ Q3 ที่ δ 7.62 ppm ($d J = 15.1$ Hz, 1H) ซึ่งอยู่ใกล้หมู่ O จะเกิดการ deshield มากที่สุด นอกจากนี้โปรตอนหมายเลข Q1 มีการ coupling กับเฉพาะโปรตอนหมายเลข Q2 จึงให้สัญญาณเป็น doublet โดยมีค่า J น้อย (2.8 Hz) เนื่องจากเป็น meta-coupling ส่วนโปรตอนหมายเลข Q2 ยังเกิดการ coupling กับโปรตอนหมายเลข Q3 อีกด้วยโดยมีค่า J , 9.3 Hz จึงให้สัญญาณเป็น doublet of doublet (dd)

สัญญาณที่ δ 8.18 ppm ($d J = 7.9$ Hz, 1H) เป็นโปรตอนในตำแหน่งที่ S1 บนวง benzothiazolium เนื่องจากมีโปรตอนข้างเคียงเพียง 1 ตัว จึงปรากฏสัญญาณเป็น doublet และอยู่ติดกับไนโตรเจนที่มีประจุบวก ทำให้อิเล็กตรอนถูกดึงไปอยู่ใกล้ไนโตรเจนมากกว่าทำให้โปรตอนดังกล่าวจะถูกพบอยู่บริเวณที่ downfield กว่าโปรตอนในตำแหน่งที่ S4 ของวงเบนโซโทอะโซลที่ δ 8.02 ppm ($d, J = 8.4$ Hz, 1H) ที่อยู่ติดกับซัลเฟอร์ ซึ่งมี EN ต่ำกว่าไนโตรเจน รวมทั้งตำแหน่งที่ S3 ที่สัญญาณ δ 7.74 ppm และ ตำแหน่งที่ S2 ซึ่งขึ้นสัญญาณที่ δ 7.63 ppm โดยทั้งคู่มีรูปแบบเป็น triplet เนื่องจากมีโปรตอนข้างเคียง 2 ตัว

สัญญาณที่ δ 8.07 ppm ($d J = 15.1$ Hz, 1H) เป็นโปรตอนตำแหน่งที่ S6 ที่เป็นส่วนของพันธะคู่ ซึ่งเป็นตำแหน่งที่เมื่ออิเล็กตรอนดีโลคัลไลซ์เข้าไปในวง benzothiazolium แล้วจะ deshield มากกว่าโปรตอนหมายเลข S5 ที่อยู่ติดกัน ซึ่งจะขึ้นสัญญาณที่ δ 7.47 ppm ($d J = 15.1$ Hz, 1H) ตามทฤษฎีโปรตอนทั้งสองจะเกิดการ coupling ซึ่งกันและกัน ให้สัญญาณเป็น doublet ทั้งคู่ และจากค่า J ที่มากถึง 15 Hz จึงน่าจะ เป็น *E*-isomer

สัญญาณที่ δ 7.86 ppm ($d J = 9.2$ Hz, 1H) เป็นโปรตอนตำแหน่งที่ S7 มีลักษณะเป็น doublet เนื่องจากเกิดการ coupling กับโปรตอน S8 ที่อยู่ติดกัน ซึ่งให้สัญญาณที่ δ 6.52 ppm ($d J = 9.2$ Hz, 1H) และที่สัญญาณ δ 6.23 ppm ($d J = 1.6$ Hz, 1H) เป็นโปรตอนตำแหน่งที่ S9 ซึ่งอยู่แยกห่างจากโปรตอนตัวอื่น ทั้งหมดนี้เป็นสัญญาณของโปรตอนบนวง aromatic ฟังก์ชันที่ถูกแทนที่ด้วยหมู่ diethylamino จึงเป็นวงที่ electron rich มากกว่าฟังก์ชันที่ถูกแทนที่ด้วยหมู่ไนโตร

สัญญาณที่ δ 4.48 ppm (m, 2H) เป็นโปรตอนตำแหน่งที่ L4 และ 4.27 ppm (m, 2H) เป็นโปรตอนตำแหน่งที่ L1 โดยตำแหน่งที่อยู่ติดกับหมู่ dinitrophenyl เกิดการ downfield มากกว่าตำแหน่งที่อยู่ใกล้กับ diethylaminophenyl เนื่องจากความสามารถในการดึงอิเล็กตรอนที่ดีกว่าของหมู่ไนโตร โปรตอนทั้งสองชุดเกิดการ coupling กับโปรตอนตำแหน่งที่ L2 และ L3 ที่อยู่ติดกัน โดยให้สัญญาณซ้อนกันที่ δ 2.06 ppm (4H) โดยโปรตอน L1-L4 ทั้งหมดมีลักษณะเป็น multiplet

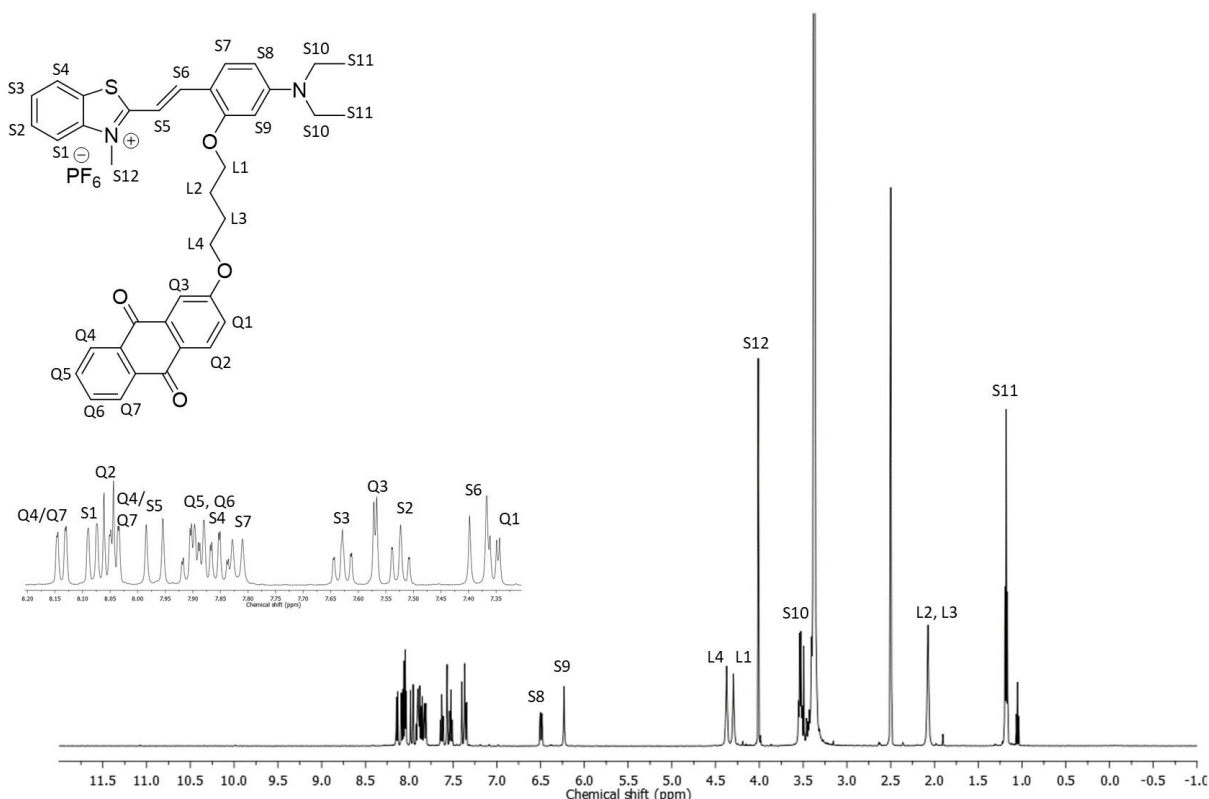
สัญญาณที่ δ 4.11 ppm มีพื้นที่ใต้พีคเป็น 3H มีลักษณะเป็น singlet เป็นโปรตอนหมายเลข S12 ซึ่งเป็นหมู่เมทิลที่ต่อกับไนโตรเจนที่มีประจุบวกของวงเบนโซโทอะโซล ส่วนสัญญาณที่ δ 3.54 ppm เป็นโปรตอนตำแหน่งที่ S10 ซึ่งมีลักษณะเป็น quartet และมีพื้นที่ใต้พีคเป็น 4H และสัญญาณที่ δ 1.18 ppm เป็นโปรตอนตำแหน่งที่ S11 มีลักษณะเป็น triplet และมีพื้นที่ใต้พีค 6H รูปแบบการ coupling และพื้นที่ใต้พีคสอดคล้องกับจำนวนโปรตอนของหมู่เอทิลสองหมู่ที่เกาะอยู่บนไนโตรเจนอะตอมของหมู่ diethylamino

จากการวิเคราะห์สัญญาณ ^1H NMR ทั้งหมดพบว่าสอดคล้องกับโครงสร้างของ BT-DNP จริง

นอกจากนี้ยังได้ยืนยันโครงสร้างของ BT-DNP ด้วยเทคนิค ^{13}C NMR จากโครงสร้างพบว่ามี non-equivalent sp^2 C 21 ตัว และ sp^3 C 7 ตัว โดย 4 ตัวต่อกับหมู่ดึงอิเล็กตรอน (N หรือ O) จาก ^{13}C NMR สเปกตรัมแสดงสัญญาณของ sp^2 C ทั้งหมด 20 สัญญาณ ที่ δ 171.4, 161.8, 156.6, 154.3, 144.6, 142.5, 140.0, 138.9, 130.0, 129.2, 127.5, 126.7, 124.0, 121.8, 116.2, 116.0, 111.5, 106.7, 104.7 และ 94.4 ppm โดยขาดหายไป 1 สัญญาณ อาจเกิดการซ้อนทับโดยบังเอิญหรือสัญญาณของ quaternary carbon บางตัวอาจจะอ่อนมากจนมองไม่เห็น และพบ sp^3 C ทั้งหมด 7 สัญญาณที่ 70.9, 68.2, 45.0, 35.4, 25.6, 25.7 และ 13.1 ppm ซึ่งสอดคล้องกับโครงสร้างที่คาดว่าจะ เป็น

นอกจากนี้ BT-DNP ยังให้สัญญาณแมส (MALDI-TOF) ที่ $m/z = 576.728$ ซึ่งสอดคล้องกับโครงสร้างของ BT-DNP ที่ควรจะให้ค่า m/z ที่ 577.212 จึงสรุปได้ว่าสามารถสังเคราะห์สาร BT-DNP ได้จริง โดยใน

กรณีนี้จะพบพีกที่ $m/z = 560.701$ ซึ่งมีค่าน้อยกว่า M^+ อยู่ 16 ซึ่งอาจเกิดจากการหลุดของออกซิเจน 1 อะตอมภายใต้ภาวะของการไอออนไนซ์ในเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์



รูปที่ 3.5 ^1H NMR ของ (*E*)-2-(4-(diethylamino)-2-(4-((9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracen-2-yl)oxy)butoxy)styryl)-3-methylbenzo[d]thiazol-3-ium hexafluorophosphate (BT-AQ) (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

สามารถวิเคราะห์ ^1H NMR ของสาร BT-AQ ได้ดังนี้

สัญญาณที่ δ 8.08 ppm (d $J = 8.0$ Hz) เป็นโปรตอนในตำแหน่งที่ S1 บนวง benzothiazolium ซึ่งมีลักษณะ เป็น doublet เนื่องจากมีโปรตอนข้างเคียงเพียง 1 ตัว จึงปรากฏสัญญาณ doublet และอยู่ติดกับไนโตรเจนที่มีประจุบวก ทำให้อิเล็กตรอนถูกดึงไปอยู่ใกล้ไนโตรเจนมากกว่าทำให้โปรตอนดังกล่าวจะให้สัญญาณในตำแหน่งที่ downfield กว่าโปรตอนในตำแหน่ง S4 ที่ δ 7.91 (dd $J = 7.4, 1.3$ Hz) ที่อยู่ติดกับซัลเฟอร์ ซึ่งมี EN ต่ำกว่าไนโตรเจน รวมทั้งตำแหน่งที่ S3 ที่สัญญาณ δ 7.63 (t $J = 7.5$ Hz) ppm และตำแหน่งที่ S2 ที่สัญญาณ δ 7.52 (t $J = 7.0$ Hz) ppm โดยทั้งคู่มีรูปแบบเป็น triplet เนื่องจากมีโปรตอนข้างเคียง 2 ตัว

สัญญาณที่ δ 8.14 ppm (dd $J = 7.6, 0.9$ Hz) และสัญญาณที่ δ 8.05-8.03 ppm (dd) เป็นโปรตอนตำแหน่งที่ Q4/Q7 บนวง anthraquinone เนื่องจากอยู่ใกล้กับหมู่ $\text{C}=\text{O}$ ซึ่งเป็นหมู่ดึงอิเล็กตรอนทำให้โปรตอนทั้งสองตัวมี chemical shift สูง แต่ไม่สามารถบอกได้แน่ชัดว่าสัญญาณไหนเป็นของตัวไหน ส่วนสัญญาณที่ δ 7.90 ppm เป็นโปรตอนตำแหน่งที่ Q6 และสัญญาณที่ δ 7.85 ppm เป็นโปรตอนตำแหน่งที่

Q5 เนื่องจากได้รับอิทธิพลจาก หมู่ C=O น้อยกว่า Q7 และ Q4 ในขณะที่โปรตอนตำแหน่งที่ Q3 ที่ δ 7.57 ppm ($d J = 2.6$ Hz) และ Q1 ที่ δ 7.35 (dd $J = 8.7, 6.0$ Hz) ซึ่งอยู่ใกล้กับหมู่ -OR มากกว่า ก็จะเกิดการ deshield น้อยกว่าโปรตอนตำแหน่งที่ Q2 ซึ่งจะขึ้นสัญญาณที่ δ 8.05 (dd $J = 4.8, 3.9$ Hz)

สัญญาณที่ δ 7.97 (d, $J = 15.1$ Hz) เป็นโปรตอนตำแหน่งที่ S5 ที่เป็นส่วนของพันธะคู่ ซึ่งเป็นตำแหน่งที่เมื่ออิเล็กตรอนดีโลคัลไลซ์เข้าไปในวง benzothiazolium แล้วจะ deshield มากกว่าโปรตอนหมายเลข S6 ที่อยู่คู่กัน ซึ่งจะขึ้นสัญญาณที่ δ 7.38 (d $J = 15.5$ Hz) ตามทฤษฎีโปรตอนทั้งสองจะเกิดการ coupling ซึ่งกันและกัน ให้สัญญาณเป็น doublet ทั้งคู่ และจากค่า J ที่มากถึง 15 Hz จึงน่าจะเป็น *E*-isomer

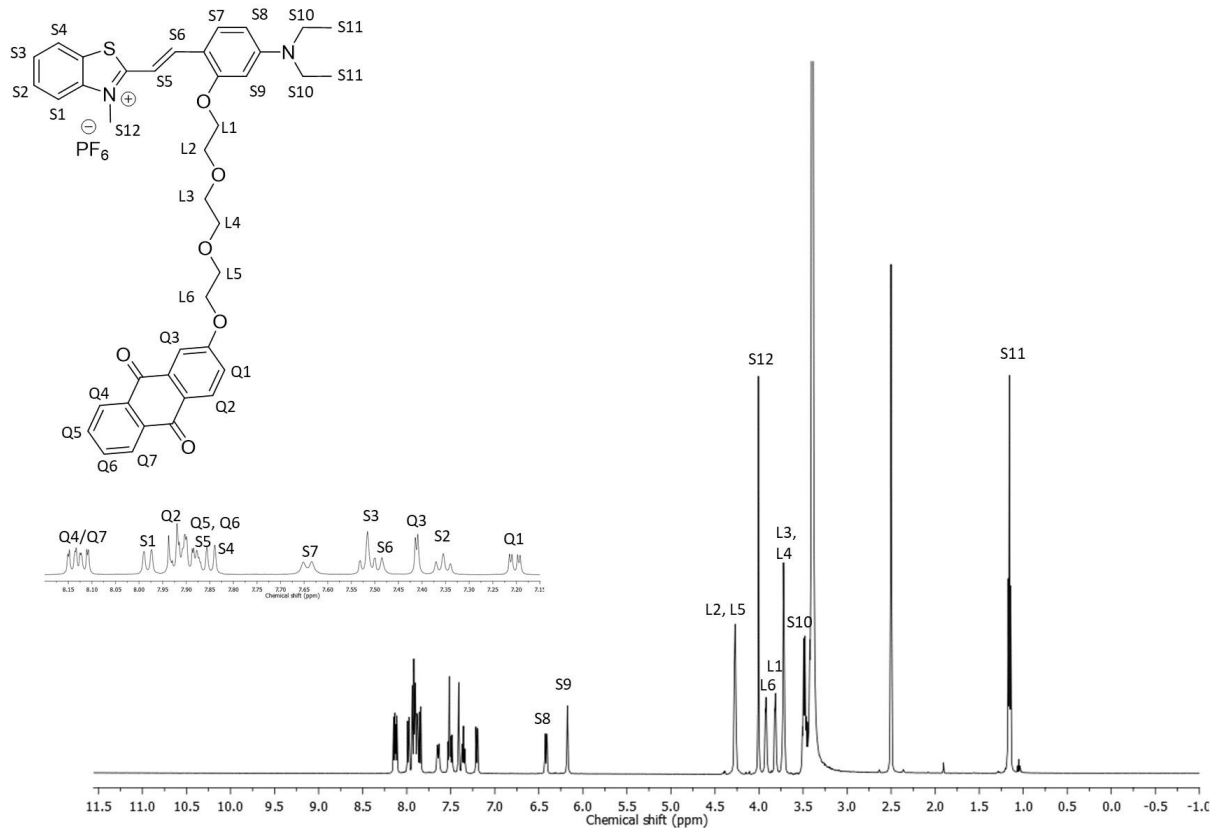
สัญญาณที่ δ 7.82 (d $J = 9.2$ Hz) เป็นโปรตอนตำแหน่งที่ S7 มีลักษณะเป็น doublet เนื่องจากเกิดการ coupling กับโปรตอน S8 ที่อยู่ติดกัน ซึ่งให้สัญญาณที่ δ 6.49 ppm (dd $J = 9.2, 1.8$ Hz) และที่สัญญาณ δ 6.23 ppm (d $J = 1.8$ Hz) เป็นโปรตอนตำแหน่งที่ S9 ซึ่งอยู่แยกห่างจากโปรตอนตัวอื่น ทั้งหมดนี้เป็นสัญญาณของโปรตอนบนวง aromatic ฟังก์ชันที่ถูกแทนที่ด้วยหมู่ diethylamino จึงเป็นวงที่ electron rich มากกว่าฟังก์ชันที่ถูกแทนที่ด้วยหมู่นิโตร

สัญญาณที่ δ 4.37 ppm (s, 2H) เป็นโปรตอนตำแหน่งที่ L4 และ 4.30 ppm (s, 2H) เป็นโปรตอนตำแหน่งที่ L1 โดยตำแหน่งที่อยู่ติดกับหมู่ dinitrophenyl เกิดการ downfield มากกว่าตำแหน่งที่อยู่ใกล้กับ diethylaminophenyl เนื่องจากความสามารถในการดึงอิเล็กตรอนที่ดีกว่าของหมู่นิโตร โปรตอนทั้งสองชุดเกิดการ coupling กับโปรตอนตำแหน่งที่ L2 และ L3 ที่อยู่ติดกัน โดยให้สัญญาณซ้อนกันที่ δ 2.07 ppm (4H) โดยโปรตอน L1-L4 ทั้งหมดมีลักษณะเป็น multiplet

สัญญาณที่ δ 4.01 ppm มีลักษณะเป็น singlet และมีพื้นที่ใต้พีคเป็น 3H เป็นโปรตอนหมายเลข S12 ซึ่งเป็นหมู่เมทิลที่ต่อกับไนโตรเจนที่มีประจุบวกของวงเบนโซลโทอะโซล ส่วนสัญญาณที่ δ 3.53 ppm เป็นโปรตอนตำแหน่งที่ S10 ซึ่งมีลักษณะเป็น quartet และมีพื้นที่ใต้พีคเป็น 4H และสัญญาณที่ δ 1.18 ppm เป็นโปรตอนตำแหน่งที่ S11 มีลักษณะเป็น triplet และมีพื้นที่ใต้พีคเป็น 6H รูปแบบการ coupling และพื้นที่ใต้พีคสอดคล้องกับจำนวนโปรตอนของหมู่เอทิลสองหมู่ที่เกาะอยู่บนไนโตรเจนอะตอมของหมู่ diethylamino

จากการวิเคราะห์สัญญาณ ^1H NMR ทั้งหมดพบว่าสอดคล้องกับโครงสร้างของ BT-AQ จริง นอกจากนี้ยังได้ยืนยันโครงสร้างของ BT-AQ ด้วยเทคนิค ^{13}C NMR จากโครงสร้างพบว่ามี non-equivalent sp^2 C 29 ตัว และ sp^3 C 7 ตัว โดย 4 ตัวต่อกับหมู่ดึงอิเล็กตรอน จาก ^{13}C NMR สเปกตรัมแสดงสัญญาณของ sp^2 C ทั้งหมด 26 สัญญาณ ที่ δ 182.7, 181.7, 171.3, 163.6, 161.8, 154.3, 142.2, 135.4, 135.2, 134.7, 133.4, 133.3, 130.0, 129.1, 127.4, 127.1, 126.7, 126.6, 124.0, 121.7, 115.8, 111.6, 111.1, 106.6, 104.5 และ 94.4 ppm โดยขาดหายไป 3 สัญญาณ อาจเกิดการซ้อนทับโดยบังเอิญหรือสัญญาณของ quaternary carbon บางตัวอาจจะอ่อนมากจนมองไม่เห็น และพบ sp^3 C ทั้งหมด 6 สัญญาณที่ 68.6, 68.3, 45.0, 35.4, 25.7 และ 13.2 ppm โดยขาดหายไป 1 สัญญาณ อาจเกิดการซ้อนทับโดยบังเอิญ ซึ่งสอดคล้องกับโครงสร้างที่คาดว่าจะ

นอกจากนี้ **BT-AQ** ยังให้สัญญาณแมส (MALDI-TOF) ที่ $m/z = 616.810$ ซึ่งสอดคล้องกับโครงสร้างของ **BT-AQ** ที่ควรจะให้ค่า m/z ที่ 617.247 จึงสรุปได้ว่าสามารถสังเคราะห์สาร **BT-AQ** ได้จริง



รูปที่ 3.6 ^1H NMR ของ (*E*)-2-(4-(diethylamino)-2-(2-(2-(2-((9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracen-2-yl)oxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)styryl)-3-methylbenzo[d]thiazol-3-ium (**BT-O-AQ**) (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

เนื่องจาก ^1H NMR สเปกตรัมของสาร **BT-O-AQ** มีความซับซ้อน จึงต้องใช้เทคนิค 2D NMR ได้แก่ cosy เข้าช่วยในการวิเคราะห์ ได้ผลดังนี้

สัญญาณที่ δ 7.98 (d $J = 8.0$ Hz) คาดว่าจะเป็นโปรตอนตำแหน่งที่ S1 บนวง benzothiazolium ซึ่งมีลักษณะ เป็น doublet เนื่องจากมีโปรตอนข้างเคียงเพียง 1 ตัว จึงปรากฏสัญญาณ doublet และอยู่ติดกับไนโตรเจนที่มีประจุบวก ทำให้อิเล็กตรอนถูกดึงไปอยู่ใกล้ไนโตรเจนมากกว่าทำให้โปรตอนดังกล่าวจะถูกพบอยู่บริเวณที่ downfield กว่าโปรตอนในตำแหน่ง S4 ที่อยู่ติดกับซัลเฟอร์ ซึ่งมี EN ต่ำกว่าไนโตรเจน ซึ่งคาดว่าจะอยู่ที่ δ 7.85 ppm (d $J = 8.4$ Hz) รวมทั้งตำแหน่งที่ S3 ที่สัญญาณ δ 7.54 ppm และตำแหน่งที่ S2 ที่สัญญาณ δ 7.35 ppm โดยทั้งคู่มีรูปแบบเป็น triplet เนื่องจากมีโปรตอนข้างเคียง 2 ตัว

สัญญาณที่ δ 8.14 ppm (dd $J = 7.5, 1.4$ Hz) และสัญญาณที่ δ 8.12 ppm (dd $J = 7.4, 1.4$ Hz) คาดว่าเป็นโปรตอนตำแหน่งที่ Q4/Q7 บนวง anthraquinone เนื่องจากอยู่ใกล้กับหมู่ $\text{C}=\text{O}$ ซึ่งเป็นหมู่ดึงอิเล็กตรอนทำให้อิเล็กตรอนดังกล่าวมี chemical shift สูง ส่วนสัญญาณที่ δ 7.90 (m) คาดว่าเป็นโปรตอน

ตำแหน่งที่ Q6 และสัญญาณที่ δ 7.89 (m) คาดว่าเป็นโปรตอนตำแหน่งที่ Q5 เนื่องจากได้รับอิทธิพลจากหมู่ C=O น้อยกว่า Q7 และ Q4 ในขณะที่โปรตอนตำแหน่งที่ Q3 ที่ δ 7.41 ppm ($dJ = 2.6$ Hz) และ Q1 ที่ δ 7.20 ppm ($ddJ = 6.9, 3.4$ Hz) ซึ่งอยู่ใกล้กับหมู่ -OR มากกว่า ก็จะเกิดการ deshield น้อยกว่าโปรตอนตำแหน่งที่ Q2 ซึ่งจะขึ้นสัญญาณที่ δ 7.95 ($ddJ = 7.1, 3.1$ Hz)

สัญญาณที่ δ 7.87 ($dJ = 10.6$ Hz) คาดว่าจะเป็นโปรตอนตำแหน่งที่ S5 ที่เป็นส่วนของพันธะคู่ ซึ่งเป็นตำแหน่งที่เมื่ออิเล็กตรอนดีโลคัลไลซ์เข้าไปในวงเบนโซโทอะโซลแล้วจะเกิดการ deshield มากกว่าโปรตอนหมายเลข S6 ที่อยู่คู่กัน ซึ่งจะขึ้นสัญญาณที่ δ 7.49 (d) ตามทฤษฎีโปรตอนทั้งสองจะเกิดการ coupling ซึ่งกันและกัน ให้สัญญาณเป็น doublet ทั้งคู่

สัญญาณที่ δ 7.64 ($dJ = 8.9$ Hz) เป็นโปรตอนตำแหน่งที่ S7 มีลักษณะเป็น doublet เนื่องจากเกิดการ coupling กับโปรตอน S8 ที่อยู่ติดกัน ซึ่งให้สัญญาณที่ δ 6.42 ppm ($ddJ = 9.1, 1.9$ Hz) และที่สัญญาณ δ 6.18 ppm ($dJ = 1.7$ Hz) เป็นโปรตอนตำแหน่งที่ S9 ซึ่งอยู่แยกห่างจากโปรตอนตัวอื่น อื่นทั้งหมดนี้เป็นสัญญาณของโปรตอนบนวง aromatic ฝั่งที่ถูกแทนที่ด้วยหมู่ diethylamino จึงเป็นวงที่ electron rich มากกว่าฝั่งที่ถูกแทนที่ด้วยหมู่ไนโตร

สัญญาณที่ δ 4.27 ppm เป็นโปรตอนตำแหน่งที่ L2 และ L5 มีลักษณะเป็น multiplet เนื่องจากเกิดการ coupling กับโปรตอนตำแหน่งที่ L1 และ L4 ซึ่งขึ้นสัญญาณที่ δ 3.94-3.79 ppm มีลักษณะเป็น multiplet และสัญญาณที่ δ 3.72 ppm ($d, J = 1.2$ Hz) เป็นโปรตอนของคาร์บอนตำแหน่งที่ L3 และ L4 มีลักษณะเป็น multiplet เนื่องจากเกิดการควบคู่กันเองของตำแหน่งที่ L3 และ L4 สองตำแหน่ง

สัญญาณที่ δ 4.01 ppm มีลักษณะเป็น singlet ที่มีพื้นที่ใต้พีคเป็น 3H เป็นโปรตอนหมายเลข S12 ซึ่งเป็นหมู่เมทิลที่ต่อกับไนโตรเจนที่มีประจุบวกของวงเบนโซโทอะโซลส่วนสัญญาณที่ δ 3.49 ppm ($qJ = 7.0$ Hz) เป็นโปรตอนตำแหน่งที่ S10 ซึ่งมีลักษณะเป็น quartet และมีพื้นที่ใต้พีคเป็น 4H และสัญญาณที่ δ 1.16 ppm ($tJ = 7.0$ Hz) เป็นโปรตอนตำแหน่งที่ S11 มีลักษณะเป็น triplet และมีพื้นที่ใต้พีค 6H รูปแบบการ coupling และพื้นที่ใต้พีคสอดคล้องกับจำนวนโปรตอนของหมู่เอทิลสองหมู่ที่เกาะอยู่บนไนโตรเจนอะตอมของหมู่ diethylamino

เมื่อพิจารณา chemical shift ของตำแหน่งโปรตอนทั้งในส่วนของสี่ย้อมสไตริลและตัวดับแสง ของสี่ย้อม BT-AQ และ BT-O-AQ มีความแตกต่างกันค่อนข้างมาก แสดงว่าความยาวและชนิดของตัวเชื่อม L ที่แตกต่างกัน (C4 ใน BT-AQ และ triethylene glycol ใน BT-O-AQ) น่าจะส่งผลให้เกิดอันตรกิริยาระหว่างส่วนของตัวดับแสงกับสี่ย้อมที่แตกต่างกันด้วย โดยคาดว่าตัวเชื่อม triethylene glycol มีความยาวมากกว่า C4 ตัว AQ จึงอาจจัดตัวให้อยู่ในรูปแบบที่ทำให้ตัวดับแสงและสี่ย้อมสัมผัสกันได้ดีกว่า

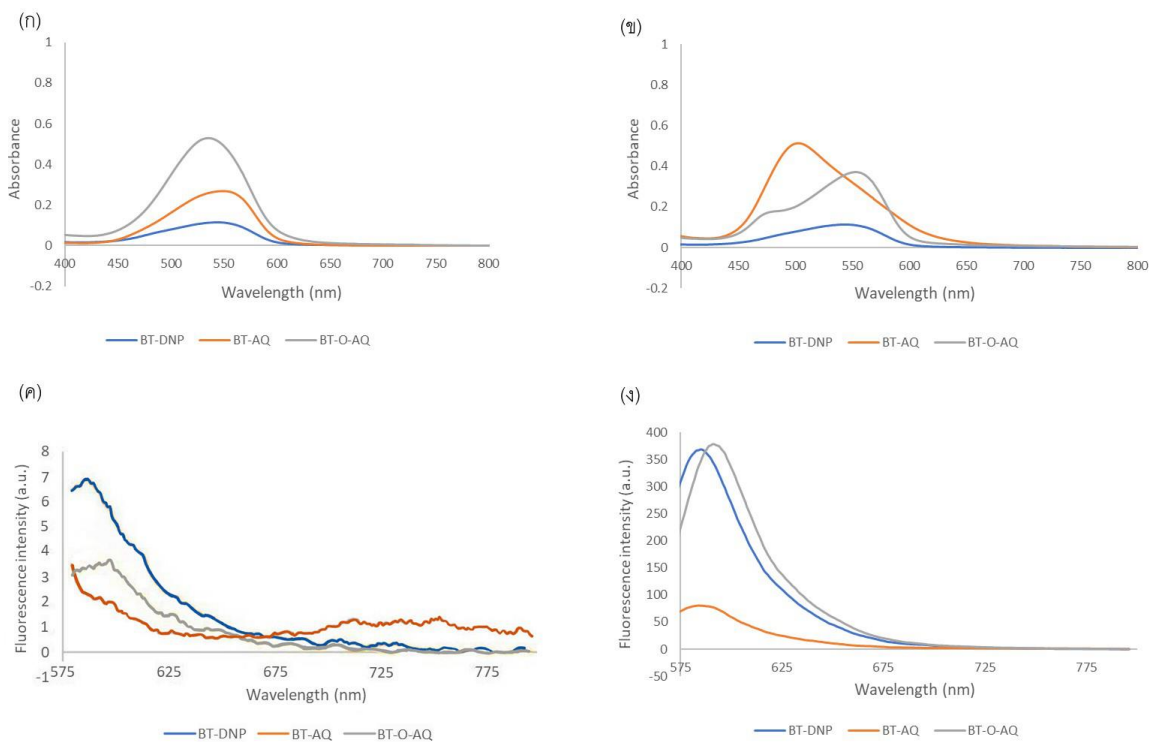
นอกจากนี้ยังได้ยืนยันโครงสร้างของ BT-O-AQ ด้วยเทคนิค ^{13}C NMR จากโครงสร้างพบว่ามี non-equivalent sp^2 C 29 ตัว และ sp^3 C 9 ตัว โดย 8 ตัวต่อกับหมู่ดึงอิเล็กตรอน จาก ^{13}C NMR สเปกตรัมแสดงสัญญาณของ sp^2 C ทั้งหมด 23 สัญญาณ ที่ δ 182.6, 181.6, 171.4, 163.5, 162.2, 154.0, 142.0, 135.2, 135.1, 134.7, 133.4, 129.7, 129.0, 127.2, 127.1, 126.6, 123.9, 121.2, 115.7, 111.6, 110.7, 106.4 และ

94.5 ppm โดยขาดหายไป 6 สัญญาณ อาจเกิดการซ้อนทับโดยบังเอิญหรือสัญญาณของ quaternary carbon บางตัวอาจจะอ่อนมากจนมองไม่เห็น และพบ sp^3 C ทั้งหมด 9 สัญญาณที่ 70.8, 70.6, 69.3, 69.2, 68.6, 68.1, 45.0, 35.2 และ 13.1 ppm ซึ่งสอดคล้องกับโครงสร้างที่คาดว่าจะเป็

นอกจากนี้ BT-O-AQ ยังให้สัญญาณแมส (MALDI-TOF) ที่ 676.918 ซึ่งสอดคล้องกับโครงสร้างของ BT-O-AQ ที่ควรจะให้ค่า m/z ที่ 677.268 จึงสรุปได้ว่าสามารถสังเคราะห์สาร BT-O-AQ ได้จริง

3.2 การศึกษาสมบัติเชิงแสงของสีย้อมที่สังเคราะห์ได้

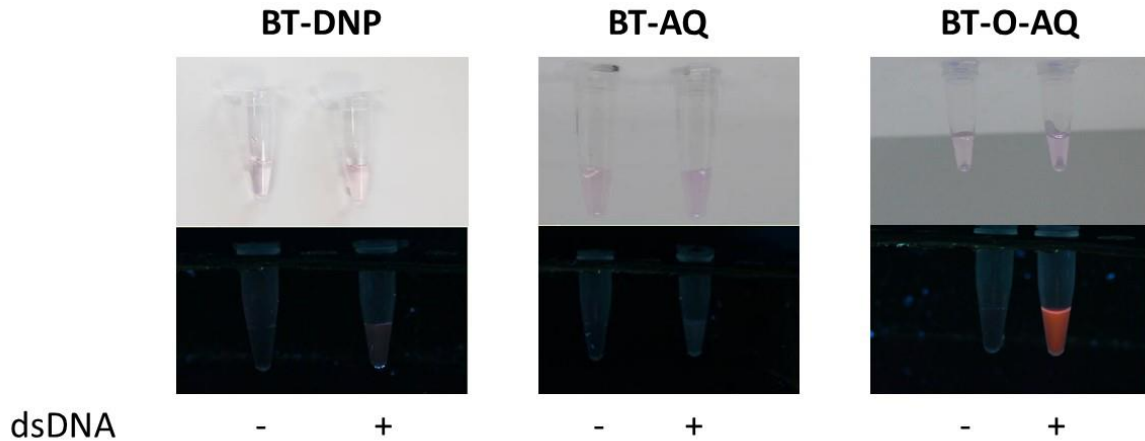
3.2.1 แอปซอร์พชันและฟลูออเรสเซนส์สเปกตรัมของสีย้อมในภาวะที่ไม่มีและมิตีเอ็นเอ



รูปที่ 3.7 แอปซอร์พชันสเปกตรัมของสีย้อมความเข้มข้น 10 μM ในน้ำ (ก) ในสภาพที่ไม่มีดีเอ็นเอ และ (ข) ในสภาพที่มีดีเอ็นเอสายคู่ (N24+N25) ความเข้มข้น 15 μM , ฟลูออเรสเซนส์สเปกตรัมของ (ค) สีย้อมความเข้มข้น 10 μM ในสภาพที่ไม่มีดีเอ็นเอ และ (ง) สีย้อมในสภาพที่มีดีเอ็นเอสายคู่ความเข้มข้น 15 μM

จากกราฟในรูปที่ 3.7 (ก) และ (ข) จะเห็นได้ว่าสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสีย้อมก่อนและหลังเข้าจับกับดีเอ็นเอสายคู่มีความแตกต่างกันอย่างสิ้นเชิง โดยในการทดลองนี้ใช้โพลิโกดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์สังเคราะห์ความยาว 30 เบส ที่เป็นคู่สมกันและมีลำดับเบสแบบสุ่ม (N24: dCCAGGGCATGGTAGATCACTGTACGCCGCG+N25: dCGCGGCGTACAGTGATCTACCATGCCCTGG) เป็นโมเดล โดยใช้สัดส่วนโดยโมลของดีเอ็นเอมากกว่าสีย้อม เพื่อให้แน่ใจว่าได้รับการเปลี่ยนแปลงสูงสุด เมื่อเติมดีเอ็นเอจากกราฟ (ข) จะเห็นว่าแอปซอร์พชันสเปกตรัมเกิดการ shift ของ absorption maxima โดย BT-DNP มีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย, BT-AQ เกิด red shift โดยสัญญาณเห็นเพียงชุดเดียว และ BT-O-AQ เกิดสัญญาณแยกกันเป็นสอง

ชุดชัดเจนซึ่งมีทั้งชุดที่ red shift และ blue shift และจากกราฟ (ค) และ (ง) ซึ่งเป็นฟลูออเรสเซนส์สเปกตรัมเมื่อเปรียบเทียบกับสถานะที่มีและไม่มีดีเอ็นเอ พบว่า BT-AQ มีความเข้มของการวางแสงเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเมื่อเติมดีเอ็นเอ ในขณะที่ BT-DNP และ BT-O-AQ มีความเข้มของการวางแสงเพิ่มขึ้นสูงเมื่อเติมดีเอ็นเอ โดยที่ BT-DNP มีความเข้มฟลูออเรสเซนส์ต่ำกว่า



รูปที่ 3.8 ภาพถ่ายของสีย้อมความเข้มข้น 10 μM ก่อนและหลังใส่ดีเอ็นเอ (N24+N25) ความเข้มข้น 20 μM ใน 10 mM phosphate buffer (pH 7.4) ภายใต้แสงขาว (บน) และแสง UV (ล่าง) ใช้ excitation wavelength 365 nm

จากนั้นจึงได้นำสีย้อมมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 μM วัดความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ เพื่อนำมาคำนวณค่า molar extinction coefficient (ϵ_{max}) โดยใช้ความยาวคลื่นที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสีย้อมแต่ละชนิดในการทำ calibration curve จะได้ผลดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ค่า absorption maxima $\lambda_{\text{max}}(\text{abs})$, extinction coefficients (ϵ), emission maxima $\lambda_{\text{max}}(\text{em})$ และอัตราส่วนของการวางแสงของสีย้อมในภาวะที่มีและไม่มีดีเอ็นเอ (F/F_0) โดยวัดที่ความเข้มข้นของสีย้อม 10 μM ก่อนและหลังใส่ดีเอ็นเอ (N24+N25) ความเข้มข้น 20 μM ใน 10 mM phosphate buffer (pH 7.4) ใช้ excitation wavelength 565 nm

Dye	ϵ_{max} ($\times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)	λ_{max} (nm)				F/F_0
		Dye		Dye+DNA		Dye+DNA
		abs	em	abs	em	
BT-DNP	1.3	542	587	542	585	51.1
BT-AQ	3.8	550	579	500	583	30.2
BT-O-AQ	2.5	540	597	475, 554	591	99.3

3.2.2 ค่าผลผลิตเชิงควอนตัมทางฟลูออเรสเซนส์

หาค่าผลผลิตเชิงควอนตัมทางฟลูออเรสเซนส์ (fluorescence quantum yield, Φ_F) ของสีย้อมทั้ง 3 ชนิด คือ BT-DNP, BT-AQ และ BT-O-AQ เพื่อดูประสิทธิภาพการรวางแสงของสีย้อมระหว่างสีย้อมอิสระกับสีย้อมเมื่อเข้าจับกับดีเอ็นเอ โดยในการทดลองใช้สีย้อมที่ความเข้มข้น 10 μM และใช้ดีเอ็นเอสายคู่ความเข้มข้น 5 μM นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรสโคปี (UV-vis spectroscopy) และวัดค่าการคายแสงด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรสโคปี (Fluorescence spectroscopy) บันทึกสัญญาณการคายแสงช่วงคลื่นตั้งแต่ 500-800 nm โดยตั้งค่า PMT (photomultiplier tube) voltage เป็น medium และนำข้อมูลที่ได้อามาพล็อตกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 nm และพื้นที่ใต้กราฟจากสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ซึ่งนำไปใช้ในการคำนวณค่าประสิทธิภาพการรวางแสงของสีย้อมได้จากสมการ (1) ดังนี้

$$QY_{sample} = QY_{ref} \times \frac{A_{ref}}{A_{sample}} \times \frac{E_{sample}}{E_{ref}} \times \left(\frac{n_{sample}}{n_{ref}} \right)^2 \quad (1)$$

โดย A = ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance)

E = พื้นที่ใต้กราฟการรวางแสง (Integrated fluorescence intensity)

N = ดัชนีหักเหของตัวทำละลาย (refractive index of the solvent)

โดยจะใช้ Rhodamine 6G ในเอทานอล เป็น reference dye ที่ excitation wavelength = 490 nm ซึ่งมีค่า $\Phi_F = 0.95^{46}$ จากการทดลองจะได้ผลดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ประสิทธิภาพการรวางแสงของสีย้อมจากค่าผลผลิตเชิงควอนตัมทางฟลูออเรสเซนส์

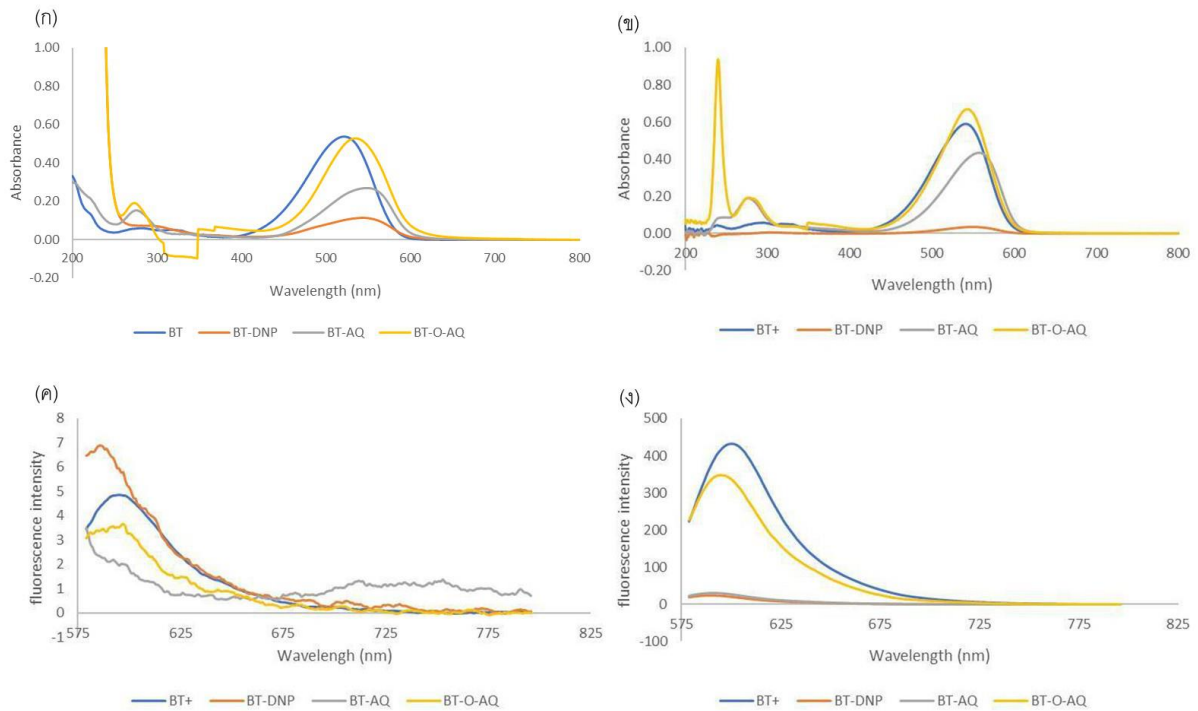
Dye	Φ_F		$\Phi_F(\text{Dye+DNA}) / \Phi_F(\text{Dye})$
	Dye	Dye+DNA	
BT	0.0040	0.0530	13.9
BT-DNP	0.0010	0.0064	6.2
BT-AQ	0.0001	0.0003	3.3
BT-O-AQ	0.0001	0.0041	30.6

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการรวางแสงของสีย้อมทั้ง 3 ตัว จะเห็นได้ว่า BT-O-AQ มีค่า $\Phi_F(\text{Dye+DNA}) / \Phi_F(\text{Dye})$ มากที่สุด ซึ่งหมายความว่า BT-O-AQ จะมีความแตกต่างของประสิทธิภาพการรวางแสงระหว่างสีย้อมก่อนและหลังจับกับดีเอ็นเอมากที่สุด ในขณะที่ BT-DNP และ BT-AQ มีประสิทธิภาพการรวางแสงของสีย้อมเมื่อหลังเข้าจับกับดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นจากสีย้อมอิสระไม่มากนัก และเมื่อเปรียบเทียบค่า F/F_0 ของสีย้อมก่อนและหลังจับกับดีเอ็นเอของสีย้อมทั้ง 3 ตัว ดังตารางที่ 3.1 ในภาวะที่มีดีเอ็นเอ BT-O-AQ มีค่า F/F_0 มากที่สุด รองลงมาคือ BT-DNP และ BT-AQ ซึ่งมีค่า F/F_0 น้อยกว่าสีย้อม BT อาจเกิดจากสีย้อม BT-DNP และ BT-AQ มีความยาวของตัวเชื่อมที่สั้น (C4) เมื่อเทียบกับ BT-O-AQ ทำให้ตัวดับแสงอยู่ใกล้กับสีย้อมมาก ทำให้แม้จะเกิดการจับกับดีเอ็นเอแล้วก็ทำให้การรวางแสงไม่เพิ่มขึ้นมากนัก ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะศึกษาเฉพาะสีย้อม BT-O-AQ เป็นหลัก โดยในบางกรณีจะเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับ BT-AQ ซึ่งมี

ตัวดับแสงเป็น anthraquinone เช่นกัน เพื่อดูผลของตัวเชื่อมระหว่างโครงสร้างหลักกับตัวดับแสง และในบางกรณีจะใช้สีย้อม BT ซึ่งไม่มีตัวดับแสงต่ออยู่เป็นตัวเทียบ

3.3 การศึกษากลไกการทำงานของสีย้อม

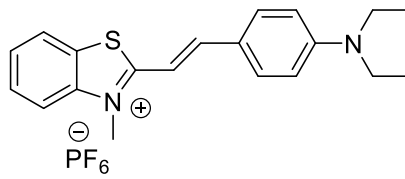
3.3.1 การทดสอบการวาวแสงของสีย้อมในกลีเซอรอล



รูปที่ 3.9 ยูวี-วิสิเบิลสเปกตรัมของสีย้อมความเข้มข้น 10 μM (ก) ในน้ำและ (ข) ในกลีเซอรอล, ฟลูออเรสเซนส์สเปกตรัมของสีย้อมความเข้มข้น 10 μM ใช้ excitation wavelength 565 nm (ค) ในน้ำและ (ง) ในกลีเซอรอล

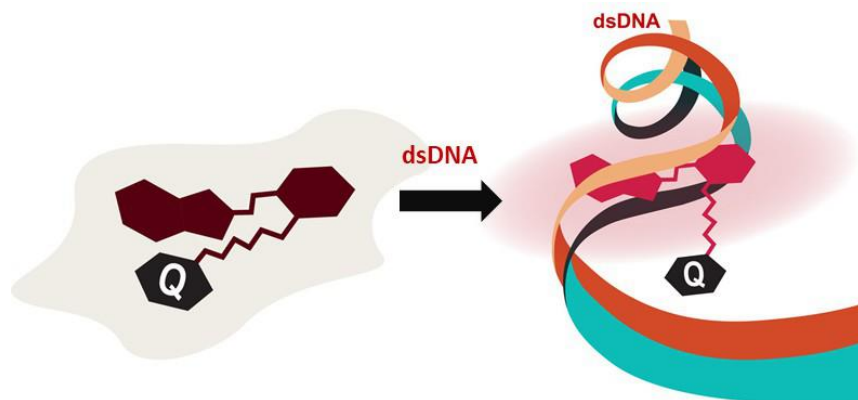
ในการทดลองได้ทำการเปรียบเทียบผลของสีย้อม 4 ชนิด คือสีย้อมที่ไม่มีการตัดแปรด้วยตัวดับแสง BT (รูปที่ 3.10), BT-DNP, BT-AQ และ BT-O-AQ ในน้ำกับในกลีเซอรอล เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงการวาวแสงของสีย้อมเนื่องจากการถูกจำกัดการหมุนของพันธะคู่ที่เชื่อมต่อระหว่างส่วนของ electron donor (วงแหวนเบนซีนที่มีหมู่ไดเอทิลอะมิโน) และ electron acceptor (วงเบนโซโทอะโซล) โดยกลีเซอรอลเป็นตัวทำละลายที่มีความหนืดสูง จะทำให้การหมุนของพันธะคู่ในสีย้อมซึ่งเป็นสาเหตุของการที่สีย้อมมีการวาวแสงที่ต่ำในสภาวะปกติเนื่องจากการเกิด radiationless decay ของโมเลกุลของสีย้อมที่ถูกกระตุ้นด้วยแสงเกิดช้าลง ซึ่งจะส่งผลให้การวาวแสงเพิ่มขึ้น⁴⁷ จากการทดลองจะเห็นได้ว่าในสภาวะที่เป็นน้ำ BT-DNP มีความเข้มการวาวแสงสูงสุด รองลงมาคือ BT และ BT-O-AQ ส่วน BT-AQ มีความเข้มการวาวแสงต่ำที่สุด ส่วนในภาวะที่มีกลีเซอรอล BT ซึ่งไม่มีตัวดับแสงมีความเข้มของการวาวแสงที่สูงที่สุด ซึ่งเป็นไปตามที่คาดไว้ ส่วน BT-DNP และ BT-AQ แทบไม่เกิดการวาวแสงเลยแม้จะอยู่ในกลีเซอรอล แสดงให้เห็นว่าหมู่ DNP และ AQ ยังอยู่ใกล้โครงสร้างหลักของโมเลกุลสีย้อม ซึ่งแม้จะถูกบล็อกการหมุนของพันธะด้วยความหนืดของกลีเซอรอลแล้วก็ยังถูก

ดับแสงได้อาจจะเนื่องมาจากความยาวของตัวเชื่อมที่ค่อนข้างสั้น ส่วน BT-O-AQ แสดงสัญญาณการวาวแสงที่สูง โดยมีค่าต่ำกว่า BT เพียงเล็กน้อยอาจเป็นเพราะในกรณีนี้ตัวดับแสงอยู่ห่างจากโมเลกุลของสีย้อมค่อนข้างมาก การดับแสงจึงมีประสิทธิภาพน้อยกว่า



รูปที่ 3.10 โครงสร้างของสีย้อม BT

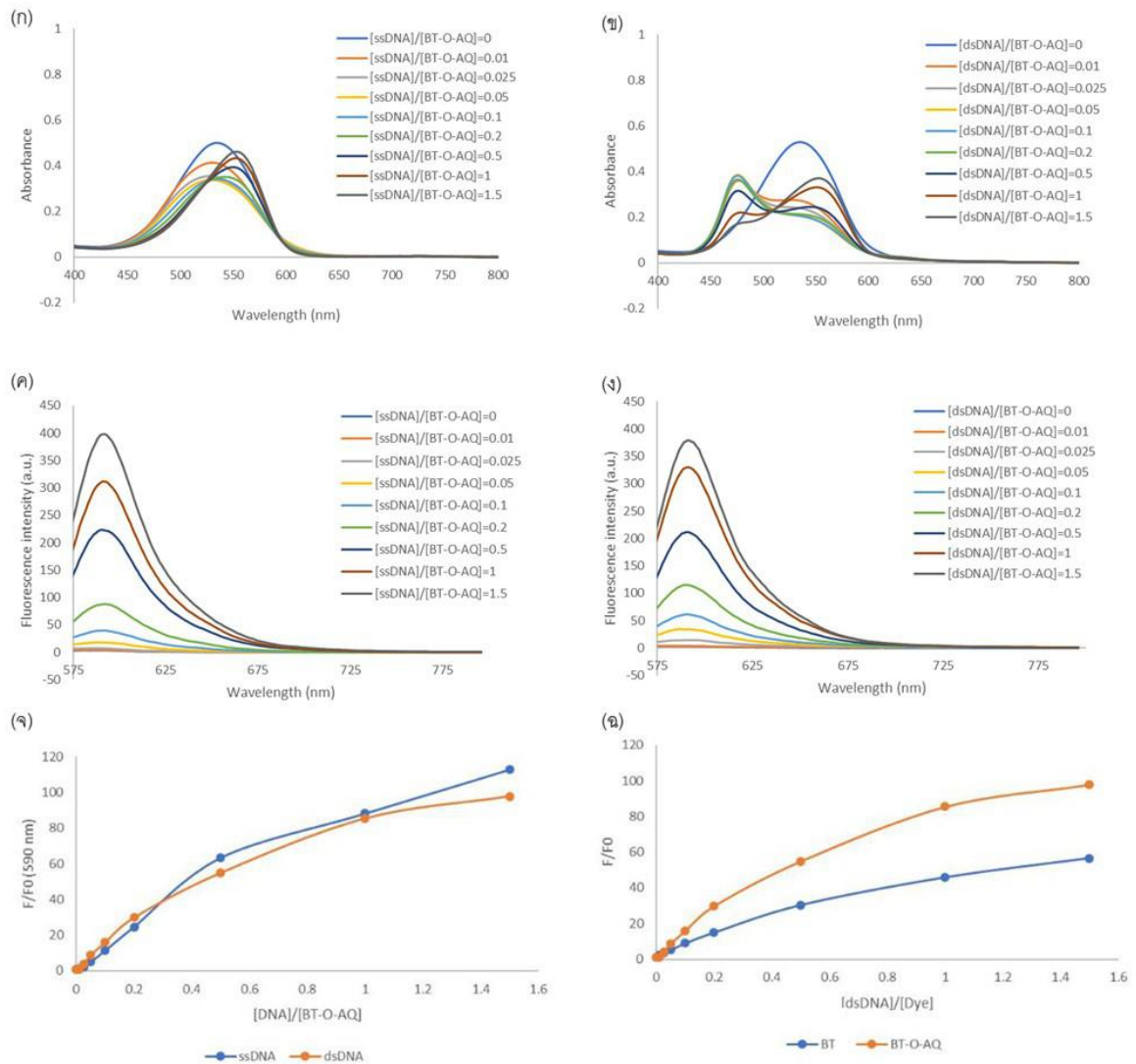
จากผลการทดลองดังกล่าวจึงสามารถอธิบายกลไกการเปลี่ยนแปลงการวาวแสงของสีย้อมในสภาวะที่มีดีเอ็นเอได้ โดยโมเลกุลสีย้อมจะเข้าไปจับกับสายดีเอ็นเอทำให้เกิดการจำกัดการหมุนของพันธะคอนฟอร์เมชัน เช่นเดียวกับกรณีที่อยู่ในกลีเซอรอล และเมื่อสีย้อมเข้าไปจับกับดีเอ็นเอคาดว่าจะส่งผลให้หมู่ดับแสงไม่สามารถเข้าไปเกิดอันตรกิริยากับสีย้อมที่จับยึดกับโครงสร้างของดีเอ็นเอ ทำให้โมเลกุลสีย้อมคืนสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ออกมาได้ ดังรูปที่ 3.11



รูปที่ 3.11 อันตรกิริยาระหว่างสีย้อมกับกลีเซอรอลที่ทำให้เกิดสัญญาณฟลูออเรสเซนส์

3.3.2 การตอบสนองของสีย้อมในสภาวะที่มีดีเอ็นเอสายเดี่ยว (ssDNA) และดีเอ็นเอสายคู่ (dsDNA)

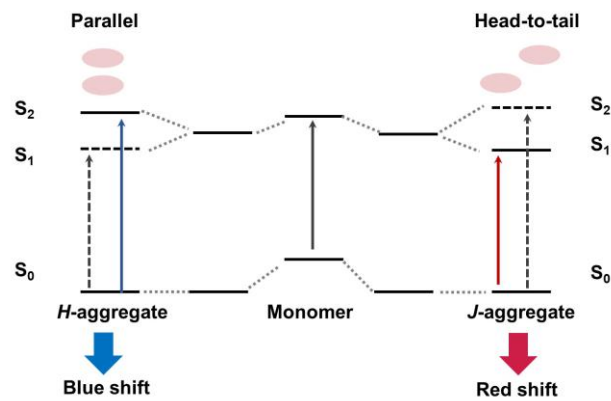
ในการทดลองนี้ได้เลือกสีย้อม BT-O-AQ มาศึกษาการตอบสนองต่อดีเอ็นเอสายเดี่ยว (ssDNA) และดีเอ็นเอสายคู่ (dsDNA) โดยดีเอ็นเอสายเดี่ยวเตรียมจาก N24 ซึ่งเป็นโอลิโกดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์สังเคราะห์ความยาว 30 เบส ที่ความเข้มข้น 10 μM ใน 10 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.4) และน้ำ ส่วนดีเอ็นเอสายคู่เตรียมจาก N24 ความเข้มข้น 10 μM และ N25 ความเข้มข้น 10 μM ซึ่งเป็นโอลิโกดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์สังเคราะห์ที่เป็นคู่สมกับ N24 ใน 10 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.4) และน้ำ โดยในการออกแบบได้มีสมมติฐานว่า AQ เป็นหมู่ที่ทำหน้าที่เป็น intercalator^{41, 42} ซึ่งสามารถเข้าไปแทรกอยู่ระหว่างคู่เบสของดีเอ็นเอสายคู่ได้ดีกว่าดีเอ็นเอสายเดี่ยว ดังนั้นสีย้อมที่มีหมู่ AQ จึงอาจบอกความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอสายคู่และสายเดี่ยวได้ โดยได้ไทเทรตดีเอ็นเอสายเดี่ยวและสายคู่แยกกันลงในสีย้อมทั้งสอง และเปรียบเทียบยูวี-วิสิเบิลสเปกตรัมและฟลูออเรสเซนส์สเปกตรัม ได้ผลการทดลองดังรูป 3.12



รูปที่ 3.12 การดูดกลืนแสง UV-visible ของสีย้อม BT-O-AQ ความเข้มข้น $10 \mu\text{M}$ ในสภาวะที่มีดีเอ็นเอ ความเข้มข้น 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10 และ 15 ใน 10 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.4) (ก) ดีเอ็นเอสายเดี่ยว เทียบกับสภาวะที่มี (ข) ดีเอ็นเอสายคู่, การวางแสงฟลูออเรสเซนส์ของสีย้อม BT-O-AQ ความเข้มข้น $10 \mu\text{M}$ ในสภาวะที่มีดีเอ็นเอความเข้มข้น 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10 และ 15 ใน 10 mM phosphate buffer (pH 7.4) ใช้ excitation wavelength ที่ 565 nm (ค) ดีเอ็นเอสายเดี่ยว เทียบกับสภาวะที่มี (ง) ดีเอ็นเอสายคู่, (จ) เปรียบเทียบค่า F/F_0 ในสภาวะที่มีดีเอ็นเอสายเดี่ยวกับสภาวะที่มีดีเอ็นเอสายคู่ที่ 590 nm, (ฉ) เปรียบเทียบค่า F/F_0 ของสีย้อม BT-O-AQ เทียบกับสีย้อมอ้างอิง BT ในสภาวะที่มีดีเอ็นเอสายคู่ที่ 590 nm

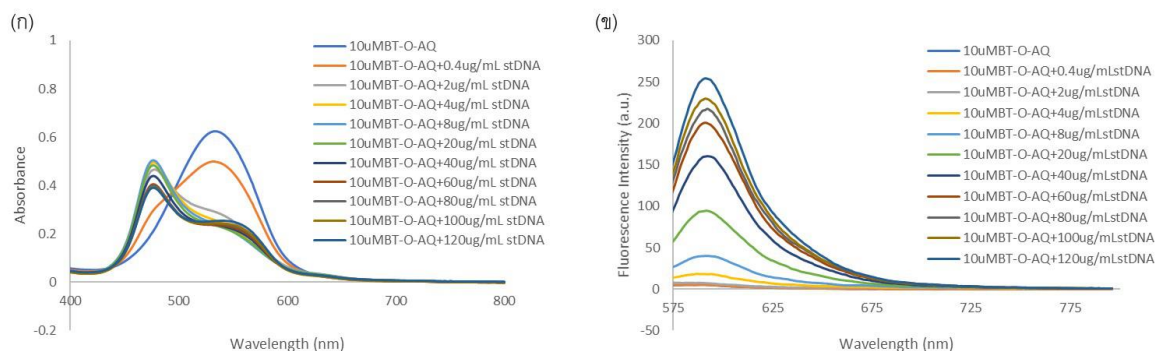
ผลการทดลองไทเทรตดีเอ็นเอเมื่อใช้ BT-O-AQ $10 \mu\text{M}$ และเพิ่มความเข้มข้นของดีเอ็นเอตั้งแต่ 0-15 μM ดังรูปที่ 3.12 จากกราฟ (ก) และ (ข) เป็นกราฟการดูดกลืนแสง พบว่า BT-O-AQ มีการตอบสนองต่อดีเอ็นเอสายเดี่ยวกับดีเอ็นเอสายคู่แตกต่างกันมาก โดยสีย้อมอิสระจะมีการดูดกลืนสูงสุดที่ความยาวคลื่น 540 nm เมื่อเติมดีเอ็นเอสายคู่จะพบสัญญาณใหม่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 476 nm โดยเห็นสัญญาณสองชุดแยกกัน แสดงถึงสอง species ที่แตกต่างกันชัดเจนและไม่เกิดการแลกเปลี่ยนกันหรือการแลกเปลี่ยนเกิดช้ากว่า

timescale ของ electronic transition ซึ่งคาดว่าสัญญาณที่ 476 nm เป็น H aggregate ของสีย้อมเนื่องจากความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสงเลื่อนไปทางสีน้ำเงิน (blue shift)⁴⁸ ซึ่งอธิบายได้ดังรูปที่ 3.13 โดยสันนิษฐานว่าการเกิด blues shift น่าจะเกิดจากการเข้าจับกับดีเอ็นเอบริเวณ GC และการเกิด red shift เกิดจากการเข้าจับกับดีเอ็นเอบริเวณ AT ในขณะที่ฟิสิกการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอสายเดี่ยวการดูดกลืนแสงจะเลื่อนไปทางสีแดง (red shift) เพียงเล็กน้อย และเห็นสัญญาณเพียงชุดเดียวตลอดซึ่งแสดงว่าสีย้อมอิสระและสีย้อมที่จับยึดกับดีเอ็นเอมีการแลกเปลี่ยนกันอย่างรวดเร็ว โดยมีการดูดกลืนสูงสุดที่ความยาวคลื่น 554 nm อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาจากกราฟ (ค) และ (ง) ซึ่งเป็นฟลูออเรสเซนส์สเปกตรัม พบว่าการตอบสนองของ BT-O-AQ ต่อดีเอ็นเอสายเดี่ยวกับดีเอ็นเอสายคู่ไม่แตกต่างกัน โดยเมื่อเทียบค่า F/F_0 ของ BT-O-AQ กับ สีย้อม BT ดังกราฟ (ฉ) พบว่า BT-O-AQ มี F/F_0 ที่ดีกว่า



รูปที่ 3.13 กลไกการเกิด aggregation ของสีย้อม⁴⁹

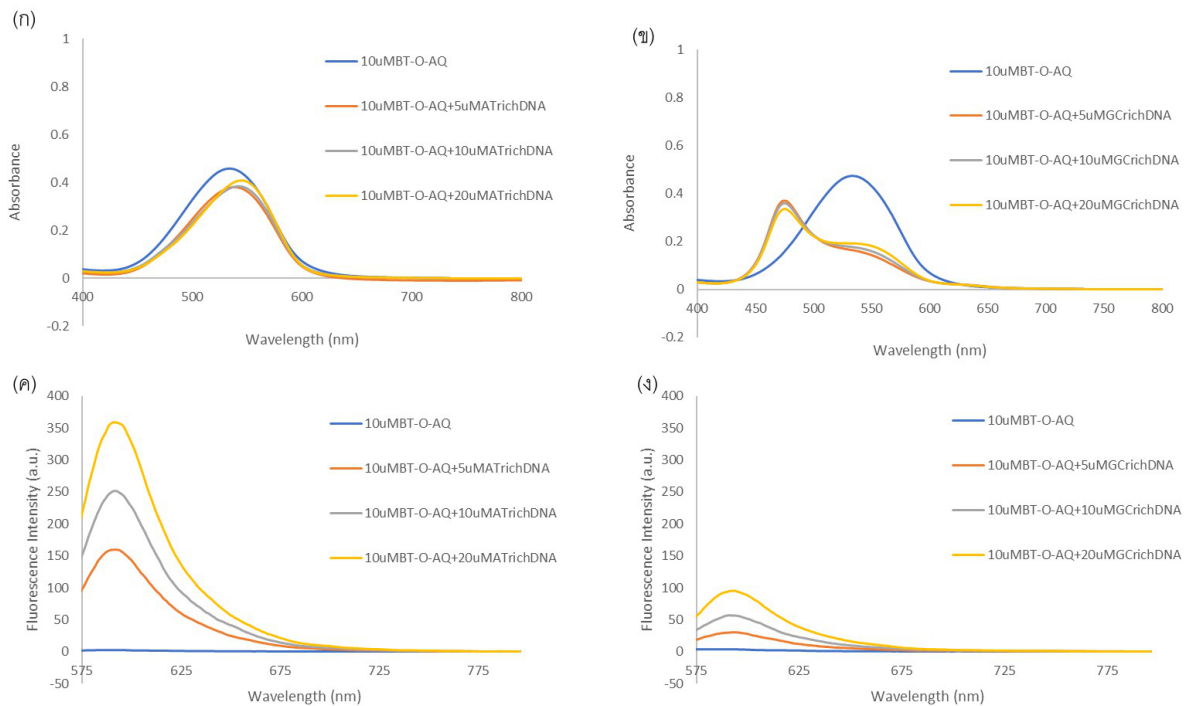
และเพื่อยืนยันว่าการตอบสนองเชิงแสงของ BT-O-AQ ต่อดีเอ็นเอสายคู่ไม่ได้เป็นกรณีพิเศษที่เกิดเฉพาะกับตัวดีเอ็นเอสังเคราะห์สายสั้นที่เลือกมาใช้ จึงได้ทดสอบการตอบสนองของ BT-O-AQ เพิ่มเติมกับดีเอ็นเอสายคู่ที่มีความยาวมากขึ้นคือ salmon sperm DNA ดังรูปที่ 3.14 พบว่าลักษณะของสัญญาณการดูดกลืนแสงและการวาวแสงเหมือนกับของดีเอ็นเอสายคู่ที่ทำมาก่อนหน้านี้ทุกประการ แสดงว่าเมื่อสีย้อมเข้าจับกับดีเอ็นเอสายคู่ จะทำให้เกิดการ aggregate ขึ้น ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของการดูดกลืนแสง ซึ่งไม่พบในดีเอ็นเอสายเดี่ยว แต่การ aggregate ดังกล่าวไม่ส่งผลกระทบต่อการวาวแสงที่แตกต่างกันระหว่างดีเอ็นเอสายคู่และสายเดี่ยว



รูปที่ 3.14 การตอบสนองของสีย้อม BT-O-AQ ต่อ salmon sperm DNA (ก) กราฟการดูดกลืนแสง (ข) กราฟการวาวแสง

3.3.3 ศึกษาการตอบสนองของสีย้อมต่อดีเอ็นเอ (AT)₁₀ และ (GC)₁₀

จากผลการทดลองก่อนหน้านี้พบว่าสีย้อม BT-O-AQ มีการตอบสนองเชิงแสงที่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอสายคู่และสายเดี่ยวได้ ซึ่งคาดว่าจะเกิดจากความสามารถในการเกิด intercalation ของหมู่ AQ ภายใน base stack ของดีเอ็นเอสายคู่ เนื่องจากเป็นที่ทราบกันว่า intercalation จะเกิดได้ดีกับคู่เบส GC เนื่องจากมีพื้นที่สัมผัสมากกว่า⁵⁰ จึงมีความเป็นไปได้ว่าสีย้อมนี้จะตอบสนองกับดีเอ็นเอสายคู่ที่มีลำดับเบสต่างกันได้ด้วย จึงได้ออกแบบการทดลองเพื่อศึกษาการตอบสนองของสีย้อมต่อดีเอ็นเอสังเคราะห์ที่เป็นสายคู่สองระบบคือ (AT)₁₀ และ (GC)₁₀ ผลการทดลองเป็นดังแสดงในรูปที่ 3.15



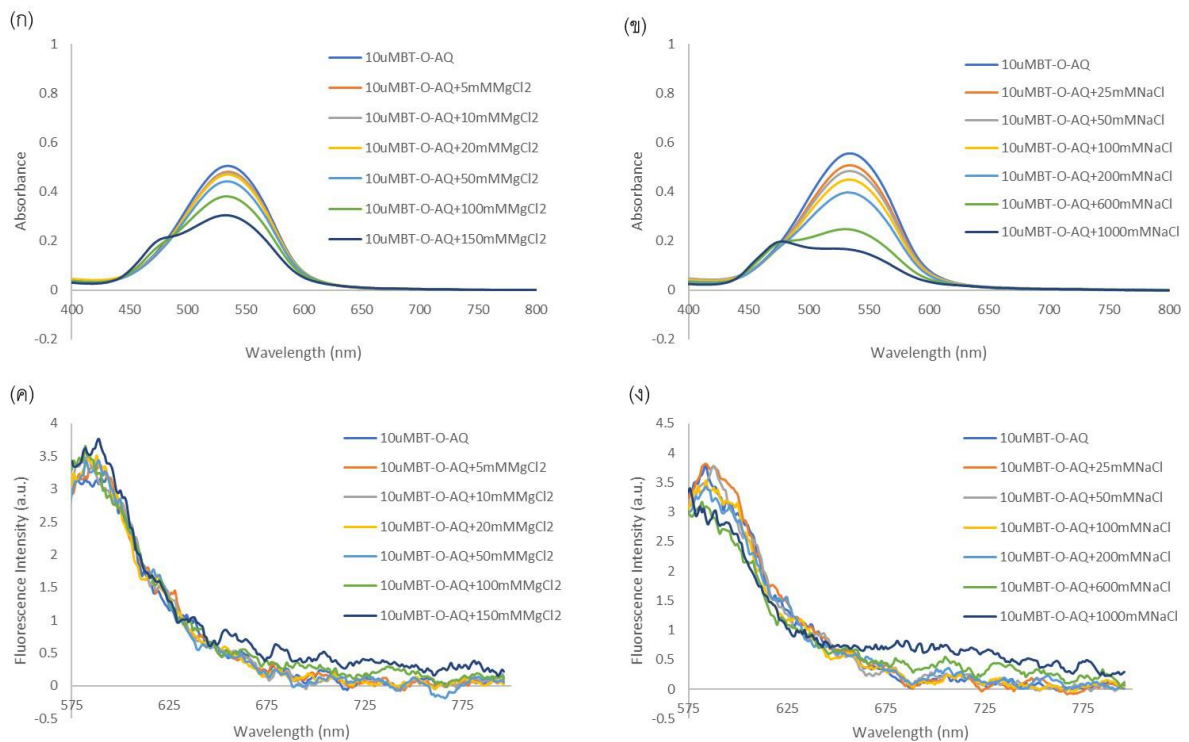
รูปที่ 3.15 การดูดกลืนแสง UV-visible ของสีย้อม BT-O-AQ ความเข้มข้น 10 μM ในสถานะที่มีดีเอ็นเอ ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 μM ใน 10 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.4) สายคู่เบส (ก) (AT)₁₀ และ (ข) (GC)₁₀, การวาวแสงฟลูออเรสเซนส์ของสีย้อม BT-O-AQ ความเข้มข้น 10 μM ในสถานะที่มีดีเอ็นเอความเข้มข้น 5, 10 และ 20 μM ใน 10 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.4) ใช้ excitation wavelength 565 nm สายคู่เบส (ค) (AT)₁₀ และ (ง) (GC)₁₀

จากกราฟในรูปที่ 3.16 (ก) และ (ข) จะเห็นได้ว่าเมื่อ BT-O-AQ เข้าจับกับดีเอ็นเอที่มีคู่เบสเป็น GC จะเกิดการเปลี่ยนแปลงของพีการดูดกลืนแสงมีลักษณะคล้ายกับผลที่ได้เมื่อเข้าจับกับดีเอ็นเอสายคู่ แสดงให้เห็นว่า BT-O-AQ จะสามารถเกิดการ aggregate ได้เฉพาะเมื่อจับกับคู่เบส GC แต่จะไม่เกิดการ aggregate เมื่อจับกับคู่เบส AT และจากกราฟ (ค) และ (ง) จะเห็นได้ว่า BT-O-AQ มีการตอบสนองต่อดีเอ็นเอคู่เบส AT และ GC แตกต่างกัน โดยสีย้อมที่เข้าจับกับคู่เบส AT จะให้การวาวแสงที่เพิ่มขึ้นมากกว่าเมื่อเทียบกับการจับกับคู่เบส GC ซึ่งแสดงว่า aggregate ที่เกิดขึ้นไม่ค่อยวาวแสง หรืออาจเป็นไปได้ว่าถูกดับแสงโดยคู่เบส GC โดยจากข้อมูลที่มีอยู่ยังไม่สามารถบอกได้แน่ชัด แต่ที่บอกได้คือการ aggregate ที่ส่งผลให้การดูดกลืนแสงเปลี่ยน

นั้นไม่ส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของการรวมแสง ดังนั้นกระบวนการดูดกลืนและคายแสงจึงเป็นอิสระต่อกัน ซึ่งสอดคล้องกับผลก่อนหน้าในหัวข้อ 3.3.2 ว่าแม้การดูดกลืนแสงของสีย้อม BT-O-AQ กับดีเอ็นเอสายคู่และสายเดี่ยวจะแตกต่างกันชัดเจน แต่การรวมแสงกลับไม่ค่อยแตกต่างกันนัก เนื่องจากการรวมแสงที่เพิ่มขึ้นจะถูกกำหนดโดยเบส AT (หรือ GC ที่ไม่เข้าคู่) เป็นหลักและไม่เกี่ยวข้องกับการเกิด intercalation ในขณะที่การ aggregate ที่ถูกกำหนดโดยคู่เบส GC จะส่งผลให้เกิดการเลื่อนของการดูดกลืนแสงไปทางสีน้ำเงินแต่ไม่ทำให้การรวมแสงเพิ่มขึ้นมากนัก

3.3.4 ศึกษาการตอบสนองของสีย้อมในสถานะที่มีเกลือ $MgCl_2$ และ $NaCl$

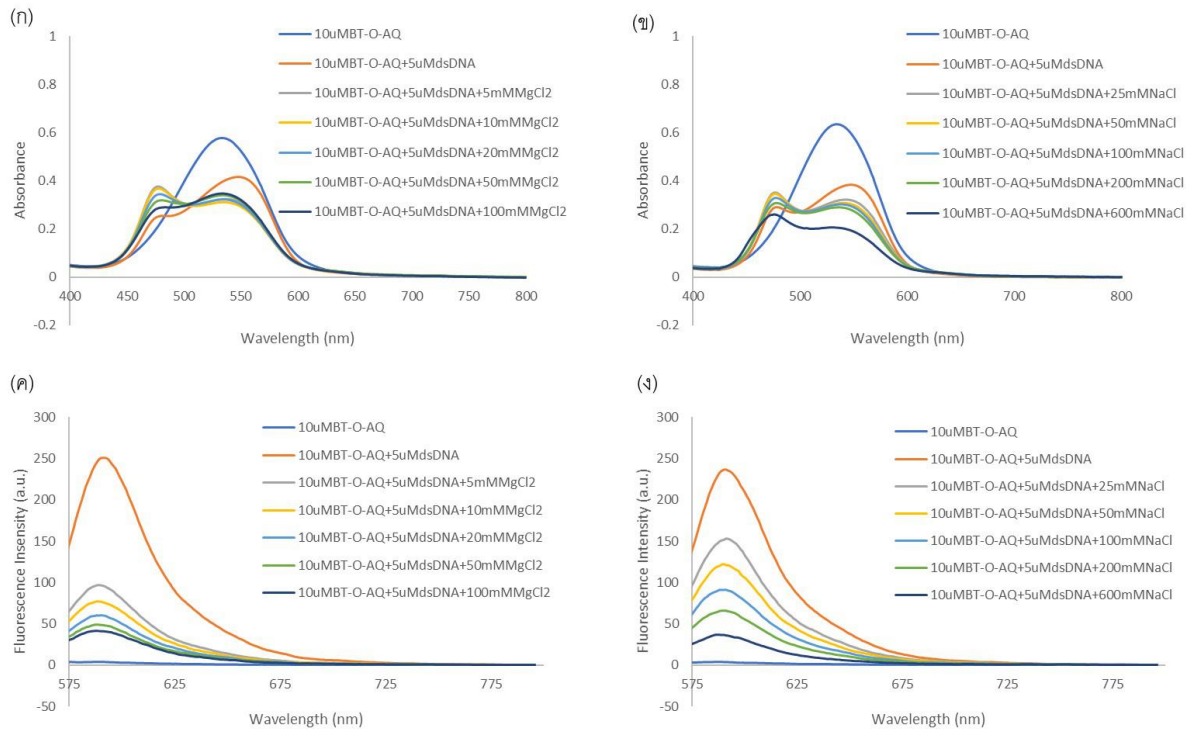
เนื่องจากการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับดีเอ็นเอส่วนใหญ่จะกระทำในสถานะที่มีเกลือ ($NaCl$, $MgCl_2$) อยู่ด้วย ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาอิทธิพลของเกลือต่อการรวมแสงของสีย้อมทั้งในสภาพอิสระและที่จับกับดีเอ็นเอ โดยผลของการเติมเกลือที่มีต่อสีย้อมอิสระเป็นดังแสดงในรูปที่ 3.16 และ 3.17



รูปที่ 3.16 การดูดกลืนแสง UV-visible ของสีย้อม BT-O-AQ ความเข้มข้น 10 μM ในสถานะที่มีเกลือ (ก) $MgCl_2$ ความเข้มข้น 5, 10, 20, 50, 100 และ 150 mM และ (ข) $NaCl$ ความเข้มข้น 25, 50, 100, 200, 600 และ 1000 mM การรวมแสงฟลูออเรสเซนส์ของสีย้อม BT-O-AQ ความเข้มข้น 10 μM ในสถานะที่มีเกลือ (ค) $MgCl_2$ ความเข้มข้น 5, 10, 20, 50 และ 100 mM และ (ง) $NaCl$ ความเข้มข้น 25, 50, 100, 200, 600 mM

จากการทดลองเติมเกลือทั้ง $NaCl$ และ $MgCl_2$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงไปในสีย้อม BT-O-AQ ได้ผลดังแสดงในกราฟรูปที่ 3.16 (ก) และ (ข) จะเห็นว่าที่ความเข้มข้นเกลือสูง พบว่า BT-O-AQ มีพิภักการดูดกลืนแสงที่เลื่อนไปทางสีน้ำเงินคล้ายกับในกรณีที่เติมดีเอ็นเอสายคู่ จึงคาดว่า การเติมเกลือส่งผลให้เกิดการ aggregate ของสีย้อมในลักษณะเดียวกับที่เมื่อสีย้อมจับกับดีเอ็นเอ แต่ต้องเติมเกลือในปริมาณสูงมากถึงจะ

เห็นการเปลี่ยนแปลงของ UV absorption และในทุกกรณีไม่พบการเปลี่ยนแปลงของการวางแสง ดังนั้นเกลือจึงไม่น่าจะส่งผลต่อการตรวจวัดดีเอ็นเอในสภาวะปกติของร่างกาย (physiological conditions) ที่มีเกลือ NaCl ที่ความเข้มข้นประมาณ 150 mM และ $MgCl_2$ ที่ 0.5-5 mM นอกจากนี้ยังได้ทดสอบผลของการเติมเกลือลงใน BT-O-AQ ที่มีดีเอ็นเออยู่ด้วยได้ผลดังแสดงในรูปที่ 3.17



รูปที่ 3.17 การดูดกลืนแสง UV-visible ของสีย้อม BT-O-AQ ความเข้มข้น 10 μ M ในสภาวะที่มีดีเอ็นเอ ความเข้มข้น 5 μ M และเกลือ (ก) $MgCl_2$ ความเข้มข้น 5, 10, 20, 50 และ 100 mM กับ (ข) NaCl ความเข้มข้น 25, 50, 100, 200, 600 mM, การวางแสงฟลูออเรสเซนส์ของสีย้อม BT-O-AQ ความเข้มข้น 10 μ M ในสภาวะที่มีดีเอ็นเอความเข้มข้น 5 μ M และเกลือ (ค) $MgCl_2$ ความเข้มข้น 5, 10, 20, 50 และ 100 mM กับ (ง) NaCl ความเข้มข้น 25, 50, 100, 200, 600 mM

ในการทดลองใช้ BT-O-AQ ในดีเอ็นเอและเกลือ $MgCl_2$ กับ NaCl เพื่อศึกษาผลของเกลือต่อความเข้มการวางแสงและ stability ระหว่างสีย้อมกับดีเอ็นเอ โดยเมื่อเติมเกลือเข้าไปพบว่าความเข้มของการวางแสงลดน้อยลงตามความเข้มข้นของเกลือที่เพิ่มขึ้น แสดงว่าความเสถียรระหว่างดีเอ็นเอและสีย้อมยังไม่ดีนัก โดยการลดลงของการวางแสงในกรณีของ $MgCl_2$ จะเกิดขึ้นเร็วกว่า NaCl ซึ่งสอดคล้องกับความเป็น divalent ion อย่างไรก็ตาม ที่ความเข้มข้น NaCl และ $MgCl_2$ ที่ใกล้เคียงกับ physiological condition ยังคงสังเกตเห็นการวางแสงได้อยู่ แม้จะลดลงไปประมาณ 50% จากภาวะที่ไม่มีเกลือเนื่องจาก ionic strength ที่สูงจะทำให้สีย้อมที่มีประจุบวกหลุดออกจากดีเอ็นเอ ดังนั้นสีย้อมจึงน่าจะยังสามารถนำไปใช้ทดลองย้อมดีเอ็นเอในภาวะ physiological ได้ แต่ควรปรับปรุงประสิทธิภาพการยึดจับกับดีเอ็นเอของสีย้อมให้ดีกว่านี้

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยสามารถสังเคราะห์สีย้อมสไตริลได้ทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ (E)-2-(4-(diethylamino)-2-(4-(2,4-dinitrophenoxy)butoxy)styryl)-3-methylbenzo[d]thiazol-3-ium hexafluorophosphate (BT-DNP), (E)-2-(4-(diethylamino)-2-(4-((9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracen-2-yl)oxy)butoxy)styryl)-3-methylbenzo[d] thiazol-3-ium hexafluorophosphate (BT-AQ) และ (E)-2-(4-(diethylamino)-2-(2-(2-(2-((9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracen-2-yl)oxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)styryl)-3-methylbenzo[d]thiazol-3-ium hexafluorophosphate (BT-O-AQ) โดยได้ยืนยันโครงสร้างของสีย้อมทั้งหมดด้วยเทคนิค ^1H NMR, ^{13}C NMR และ MALDI-TOF MS

จากการศึกษาสมบัติเชิงแสงของสีย้อมที่สังเคราะห์ได้พบว่าสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสีย้อมเมื่อไม่มีดีเอ็นเอและเมื่อมีดีเอ็นเอมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยเมื่อใส่ดีเอ็นเอพบว่าสเปกตรัมการดูดกลืนแสงเกิด red shift เล็กน้อยในกรณีของ BT-DNP และ BT-AQ แต่ของ BT-O-AQ จะมีทั้งส่วนที่เกิด red shift และ blue shift โดยเห็นแยกเป็นสองพีกชัดเจน โดยคาดว่าเกิดการเกิด blue shift จะเป็นผลมาจากการเกิด H-aggregate ของ BT-O-AQ เมื่อมีดีเอ็นเอ ในทุกกรณีการวางแสงจะเพิ่มขึ้นเมื่อมีดีเอ็นเออยู่ด้วยโดยการวางแสงที่เพิ่มขึ้นสามารถเรียงลำดับได้ดังนี้ $\text{BT-O-AQ} > \text{BT-DNP} > \text{BT-AQ}$ โดยสีย้อม BT-O-AQ มีค่าการวางแสงเพิ่มขึ้นเมื่อมีดีเอ็นเอประมาณ 100 เท่าเมื่อเทียบกับสีย้อมอิสระซึ่งเป็นตัวเลขที่ดีกว่าสีย้อม BT ที่ไม่มีตัวดับแสงอยู่ด้วย จากการศึกษาค่าผลผลิตควอนตัมทางฟลูออเรสเซนส์ พบว่า BT-O-AQ มีค่า $\Phi_{\text{F}}(\text{Dye+DNA})/\Phi_{\text{F}}(\text{Dye})$ มากที่สุด

สำหรับการศึกษากลไกการทำงานของสีย้อม ในการทดลองแรกได้เปรียบเทียบผลของสีย้อม 4 ชนิด ได้แก่ BT (ซึ่งเป็นสีย้อมที่ปราศจากตัวดับแสง), BT-DNP, BT-AQ และ BT-O-AQ ในน้ำกับในกลีเซอรอล พบว่า BT-DNP และ BT-AQ แทบไม่เกิดการวางแสงเลยแม้จะอยู่ในกลีเซอรอล ส่วน BT-O-AQ แสดงสัญญาณการวางแสงที่สูง โดยมีค่าต่ำกว่า BT เพียงเล็กน้อย แสดงว่ากลไกการเกิดการวางแสงที่เพิ่มขึ้นของสีย้อมในกลุ่มนี้เหมือนกับสีย้อมที่ไม่มีตัวดับแสง กล่าวคือเกิดจากการจำกัดการหมุนของพันธะคู่ แต่กรณีของ BT-DNP และ BT-AQ ซึ่งมีตัวเชื่อมระหว่างสีย้อมและตัวดับแสงค่อนข้างสั้นจะยังเกิดการ quench อยู่ การวางแสงจึงน้อยกว่า BT-O-AQ ซึ่งมีตัวเชื่อมยาวกว่า จากนั้นจึงได้นำสีย้อม BT-O-AQ ไปศึกษาความสามารถในการตอบสนองกับดีเอ็นเอที่เป็นสายเดี่ยวและดีเอ็นเอสายคู่ โดยในการออกแบบได้มีสมมติฐานว่าสีย้อมดังกล่าวมีหมู่ AQ ซึ่งแสดงสมบัติเป็น intercalator อาจจะแสดงการตอบสนองต่อดีเอ็นเอสายเดี่ยวและสายคู่ได้แตกต่างกัน จากผลการทดลองพบว่า BT-O-AQ จะเกิดการ aggregate เฉพาะในสถานะที่มีดีเอ็นเอสายคู่เท่านั้น โดยพิจารณาจากการเกิด blue shift ของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงแต่การวางแสงจะเพิ่มขึ้นทั้งในกรณีของดีเอ็นเอสายเดี่ยวและสายคู่ ในการทดลองต่อมาได้ศึกษาการตอบสนองของสีย้อมต่อดีเอ็นเอสายคู่ที่มีลำดับเบสแตกต่างกันได้แก่ (AT)₁₀ และ (GC)₁₀ พบว่าสีย้อม BT-O-AQ แสดงการตอบสนองต่อดีเอ็นเอ (AT)₁₀ ในแง่ของการวางแสง โดยให้ความเข้มการวางแสงสูงกว่าในสภาพที่มี (GC)₁₀ มาก แต่จากสเปกตรัมการดูดกลืน

แสงพบว่าสีย้อมจะเกิดการ aggregate เฉพาะกับดีเอ็นเอ (GC)₁₀ แสดงว่ากระบวนการเกิด aggregate น่าจะเกี่ยวข้องกับความสามารถในการเกิด intercalation ของ AQ กับคู่เบส GC และการเกิด aggregate ไม่มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของการรบกวนแสง

นอกจากนี้ยังได้ศึกษาการตอบสนองของสีย้อม BT-O-AQ ในสภาวะที่มีเกลือ MgCl₂ และ NaCl โดยพบว่า BT-O-AQ เมื่อใส่เกลือที่มีความเข้มข้นสูง ๆ สีย้อมจะเกิดการ aggregate ได้ และไม่ส่งผลต่อการรบกวนแสง การเปลี่ยนแปลงนี้จะน้อยมากที่ภาวะ physiological เมื่อทดลองในภาวะที่มีดีเอ็นเอสายคู่อยู่ด้วยพบว่าในสภาวะที่มีเกลือค่าความเข้มข้นการรบกวนแสงลดลง แสดงว่าสีย้อมหลุดออกจากดีเอ็นเอได้เมื่อมีเกลือ โดยเกลือ MgCl₂ จะทำให้การรบกวนแสงลดลงมากกว่า NaCl อย่างไรก็ตาม ที่ความเข้มข้นของเกลือที่ภาวะ physiological ยังสังเกตเห็นการรบกวนแสงได้ดีอยู่แม้ความเข้มข้นจะลดลงเหลือประมาณครึ่งหนึ่งของภาวะที่ไม่มีเกลือ ดังนั้นสีย้อมที่พัฒนาขึ้นยังน่าจะสามารถใช้งานได้ โดยมีจุดเด่นคือสามารถบอกความแตกต่างของดีเอ็นเอที่เป็นสายเดี่ยวและสายคู่ และดีเอ็นเอมีลำดับเบสเป็น GC จาก AT ได้ แต่ควรจะมีการปรับปรุงประสิทธิภาพในการยึดจับกับดีเอ็นเอต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

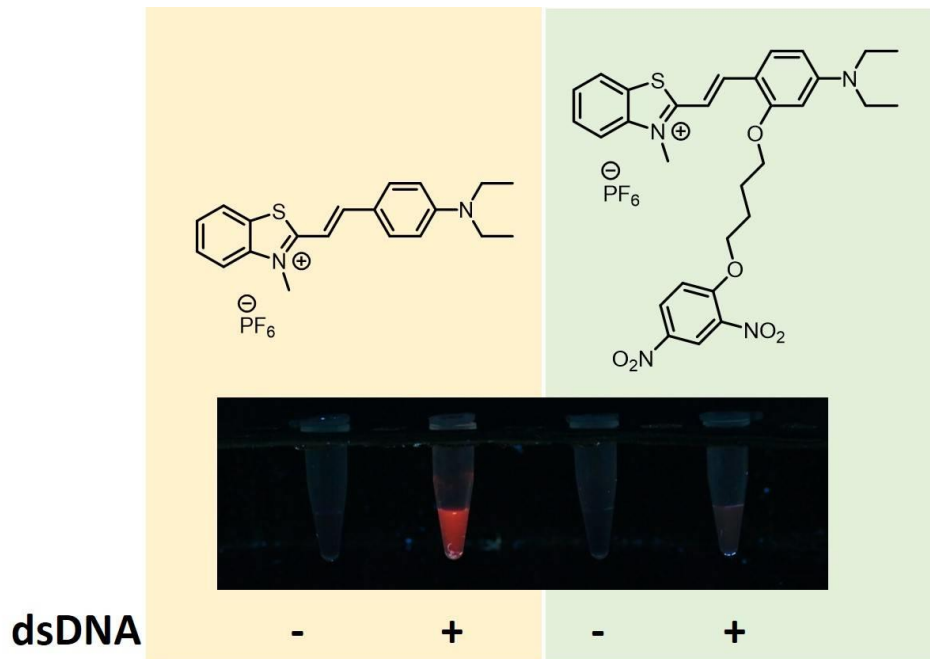
1. Klymchenko, A. S. Solvatochromic and fluorogenic dyes as environment-sensitive probes: design and biological application. *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50*, 366-375.
2. Ettinger, A.; Wittmann, T. Fluorescence live cell imaging. *Methods Cell Biol.* **2014**, *123*, 77-94.
3. Sanchez, M. I.; Martínez-Costas, J.; Gonzalez, F.; Bermudez, M. A.; Vazquez, M. E.; Mascareñ, J. L. In vivo light-driven DNA binding and cellular uptake of nucleic acid stains. *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 1276-1280.
4. Ma, Y.; Zhang, G.; Pan, J. Spectroscopic studies of DNA interactions with food colorant indigo carmine with the use of ethidium bromide as a fluorescence probe. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 10867-10875.
5. Huang, J.; Wang, Z.; Kim, J.-K.; Su, X.; Li, Z. Detecting arbitrary DNA mutations using graphene oxide and ethidium bromide. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 12254-12261.
6. Han, X.; Wang, E.; Cui, Y.; Lin, Y.; Chen, H.; An, R.; Liang, X.; Komiyama, M. The staining efficiency of cyanine dyes for single-stranded DNA is enormously dependent on nucleotide composition. *Electrophoresis* **2019**, *40*, 1708-1714.
7. Guillen, D.; Schievelbein, M.; Patel, K.; Jose, D.; Ouellet, J. A simple and affordable kinetic assay of nucleic acids with SYBR gold gel staining. *PLoS ONE* **2020**, *15*, 1-16.
8. Bourzac, K. M.; LaVine, L. J.; Rice, M. S. Analysis of DAPI and SYBR green I as alternatives to ethidium bromide for nucleic acid staining in agarose gel electrophoresis. *J. Chem. Educ.* **2003**, *80*, 1292-1296.
9. Hu, H.; Zhang, J.; Ding, Y.; Zhang, X.; Xu, K.; Hou, X.; Wu, P. Modulation of the singlet oxygen generation from the double strand DNA-SYBR green I complex mediated by T-Melamine-T mismatch for visual detection of melamine. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 5101-5106.
10. D'Andrea, M.; Coisson, J. D.; Travaglia, F.; Garino, C.; Arlorio, M. Development and validation of a SYBR-green I real-time PCR protocol to detect hazelnut (*Corylus avellana* L.) in foods through calibration via plasmid reference standard. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 11201-11208.
11. Motohashil, K. Development of highly sensitive and low-cost DNA agarose gel electrophoresis detection systems, and evaluation of non-mutagenic and loading dye-type DNA-staining reagents. *PLoS ONE* **2019**, *14*, 1-13.

12. Phillips, T. Common dyes for visualizing and staining DNA. ThoughtCo: www.thoughtco.com. (accessed April 23, 2021).
13. Haines, A. M.; Tobe, S. S.; Kobus, H. J.; Linacre, A. Properties of nucleic acid staining dyes used in gel electrophoresis. *Electrophoresis* **2015**, *36*, 941-944.
14. Bohländer, P. R.; Wagenknecht, H.-A. Synthesis and evaluation of cyanine-styryl dyes with enhanced photostability for fluorescent DNA staining. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 7458-7462.
15. Ditmangklo, B.; Taechalertpaisarn, J.; Siriwong, K.; Vilaivan, T. Clickable styryl dyes for fluorescence labeling of pyrrolidinyl PNA probes for the detection of base mutations in DNA. *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 9712-9725.
16. Wang, K. N.; Chao, X. J.; Liu, B.; Zhou, D. J.; He, L.; Zheng, X. H.; Cao, Q.; Tan, C. P.; Zhang, C.; Mao, Z.-W. Red fluorescent probes for real-time imaging of the cell cycle by dynamic monitoring of the nucleolus and chromosome. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 2635-2638.
17. Jun, J. V.; Chenoweth, D. M.; Petersson, E. J. Rational design of small molecule fluorescent probes for biological applications. *Org. Biomol. Chem.* **2020**, *18*, 5747-5763.
18. Nijegorodov, N.; Luhanga, P. V. C.; Nkoma, J. S.; Winkoun, D. P. The influence of planarity, rigidity and internal heavy atom upon fluorescence parameters and the intersystem crossing rate constant in molecules with the biphenyl basis. *Spectrochimica Acta Part A* **2006**, *64*, 1-5.
19. Sharafy, S.; Muszkat, K. A. Viscosity dependence of fluorescence quantum yields. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 4119-4125.
20. Ziarani, G. M.; Moradi, R.; Lashgari, N.; G. Kruger, H. Chapter 8 - Cyanine dyes. In *Metal-Free Synthetic Organic Dyes*, Ziarani, G. M.; Moradi, R.; Lashgari, N.; G. Kruger, H., Eds. 2018; pp 127-152.
21. Ren, C. B.; Wang, J. J.; Qin, C. X.; Wang, K.; Gao, Q.; Cheng, S.; Dai, L. X.; Chen, G. Q. Research progress in hemicyanine-based polymers. *Designed Monomers and Polymers* **2011**, *14*, 541-558.
22. Deligeorgiev, T.; Vasilev, A.; Kaloyanova, S.; Vaquero, J. J. Styryl dyes – synthesis and applications during the last 15 years. *Color. Technol.* **2010**, *126*, 55-80.
23. Kim, B. H.; Park, S. W.; Lee, D.; Kwon, K.; Kim, J. P. Synthesis of novel hemicyanine dyes for color compensating film in plasma display panels. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2014**, *35*, 2453-2459.

24. Kovalska, V. B.; Kryvorotenko, D. V.; Balanda, A. O.; Losytskyy, M. Y.; Tokar, V. P.; Yarmoluk, S. M. Fluorescent homodimer styrylcyanines: synthesis and spectral-luminescent studies in nucleic acids and protein complexes. *Dyes Pigm.* **2005**, *67*, 47-54.
25. Gust, D.; Moore, T. A. Mimicking photosynthesis. *Science* **1989**, *244*, 35-41.
26. He, L.; Dong, B.; Liua, Y.; Lin, W. Fluorescent chemosensors manipulated by dual/triple interplaying sensing mechanisms. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 6449-6461.
27. Atilgan, S.; Kutuk, I.; Ozdemir, T. A near IR di-styryl BODIPY-based ratiometric fluorescent chemosensor for Hg(II). *Tetrahedron Letters* **2010**, *51*, 892-894.
28. Zali-Boeini, H.; Jonaghani, M. Z. New fluorescent and colorimetric chemosensor for detection of cyanide with high selectivity and sensitivity in aqueous media. *J. Fluoresc.* **2017**, *27*, 1035-1040.
29. Gwon, S. Y.; Rao, B. A.; Kim, H. S.; Son, Y. A.; Kim, S. H. Novel styrylbenzothiazolium dye-based sensor for mercury, cyanide and hydroxide ions. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2015**, *144*, 226-234.
30. Krieg, R.; Eitner, A.; Halbhuber, K. J. Tailoring and histochemical application of fluorescent homo-dimeric styryl dyes using frozen sections: From peroxidase substrates to new cytochemical probes for mast cells, keratin, cartilage and nucleic acids. *Acta Histochemica* **2011**, *113*, 682- 702.
31. Zhu, C. Q.; Zhuo, S.-J.; Zheng, H.; Chen, J. L.; Li, D. H.; Lia, S. H.; Xu, J. G. Fluorescence enhancement method for the determination of nucleic acids using cationic cyanine as a fluorescence probe. *Analyst* **2004**, *129*, 254-258.
32. Das, A. K.; Ihmels, H.; Kölsch, S. Diphenylaminostyryl-substituted quinolinium derivatives as fluorescent light-up probes for duplex and quadruplex DNA. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2019**, *18*, 1373-1381.
33. Berdnikova, D. V.; Sosnin, N. I.; Fedorova, O. A.; Ihmels, H. Governing the DNA-binding mode of styryl dyes by the length of their alkyl substituents – from intercalation to major groove binding. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 545-554.
34. Surin, M.; Ulrich, S. From interaction to function in DNA-templated supramolecular self-assemblies. *ChemistryOpen* **2020**, *9*, 480-498.
35. Quenching of Fluorescence. In *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Lakowicz, J. R., Ed. Springer US: Boston, MA, 2006; pp 277-330.
36. Quenchers. In *Oligo Modifications*, Gene Link: www.genelink.com, 2021; pp 1-3. (accessed April 26, 2021)

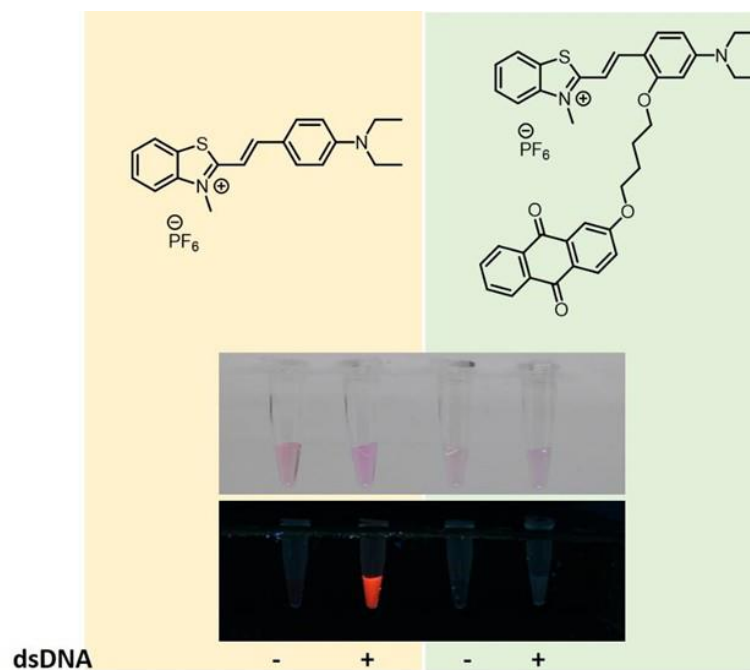
37. Lakowicz, J. R.; Weber, G. Quenching of fluorescence by oxygen. A probe for structural fluctuations in macromolecules. *Biochemistry* **1973**, *12*, 4161-4170.
38. Suh, D.; B. Chaires, J. Criteria for the mode of binding of DNA binding agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **1995**, *3*, 723-728.
39. Hori, Y.; Hirayama, S.; Kikuchi, K. Development of cyanine probes with dinitrobenzene quencher for rapid fluorogenic protein labelling. *Phil. Trans. R. Soc. A* **2017**, *375*, 13-31.
40. Gutierrez, I.; Bertolotti, S. G.; Biasutti, M. A.; Soltermann, A. T.; Garcia, N. A. Quinones and hydroxyquinones as generators and quenchers of singlet molecular oxygen. *Can. J. Chem.* **1997**, *75*, 423-428.
41. Gibson, D.; Binyamin, I.; Haj, M.; Ringel, I.; Ramu, A.; Katzhendler, J. Anthraquinone intercalators as carrier molecules for second-generation platinum anticancer drugs. *Eur. J. Med. Chem.* **1997**, *32*, 823-831.
42. Beckford, S. J.; Dixon, D. W. Molecular dynamics of anthraquinone DNA intercalators with polyethylene glycol side chains. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2012**, *29*, 1065-1080.
43. Paczal, A.; Benyei, A. C.; Kotschy, A. Modular synthesis of heterocyclic carbene precursors. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 5969-5979.
44. Becker, F.; Klaiber, M.; Franzreb, M.; Bräse, S.; Lahann, J. On demand light-degradable polymers based on 9,10-dialkoxyanthracenes. *Macromol. Rapid Commun.* **2020**, *41*, 2000314.
45. <https://scifinder.cas.org> (accessed April 26, 2021).
46. Kubin, R.F.; Fletcher, A.N. Fluorescence quantum yields of some rhodamine dyes. *J. Lumin.* **1982**, *27*, 455-462.
47. Mahmood, T.; Paul, A.; Ladame, S. Synthesis and spectroscopic and DNA-binding properties of fluorogenic acridine-containing cyanine dyes. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 204-207.
48. Nüesch, F.; Grätzel, M. H-aggregation and correlated absorption and emission of a merocyanine dye in solution, at the surface and in the solid state. A link between crystal structure and photophysical properties. *Chem. Phys.* **1995**, *193*, 1-17.
49. Klymchenko, A. S. Emerging field of self-assembled fluorescent organic dye nanoparticles. *J. Nanosci. Lett.* **2013**, *3*, 1-8.
50. Gudnason, H.; Dufva, M.; Bang, D. D.; Wolff, A. Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature. *Nucleic Acids Res* **2007**, *35*, 1-8.

ภาคผนวก



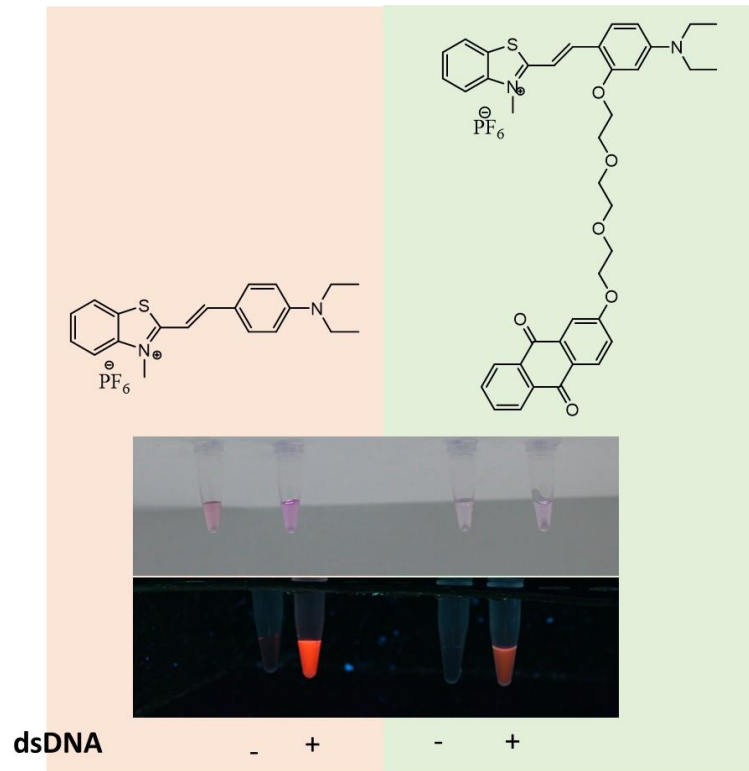
Condition: [Dye] = 10 μ M, [dsDNA] = 20 μ M, dsDNA = **N24+N25** – 5'-CCA GGG CAT GGT AGA TCA CTG TAC GCC GCG-3'+ 5'-CGC GGC GTA CAG TGA TCT ACC ATG CCC TGG-3', in 10 mM PB (pH=7.0)

รูปที่ ผ-1 ภาพถ่ายของสีย้อม BT และ BT-DNP ความเข้มข้น 10 μ M ก่อนและหลังใส่ดีเอ็นเอ (N24+N25) ความเข้มข้น 20 μ M ใน 10 mM phosphate buffer (pH 7.4) ภายใต้แสง UV ใช้ excitation wavelength 365 nm

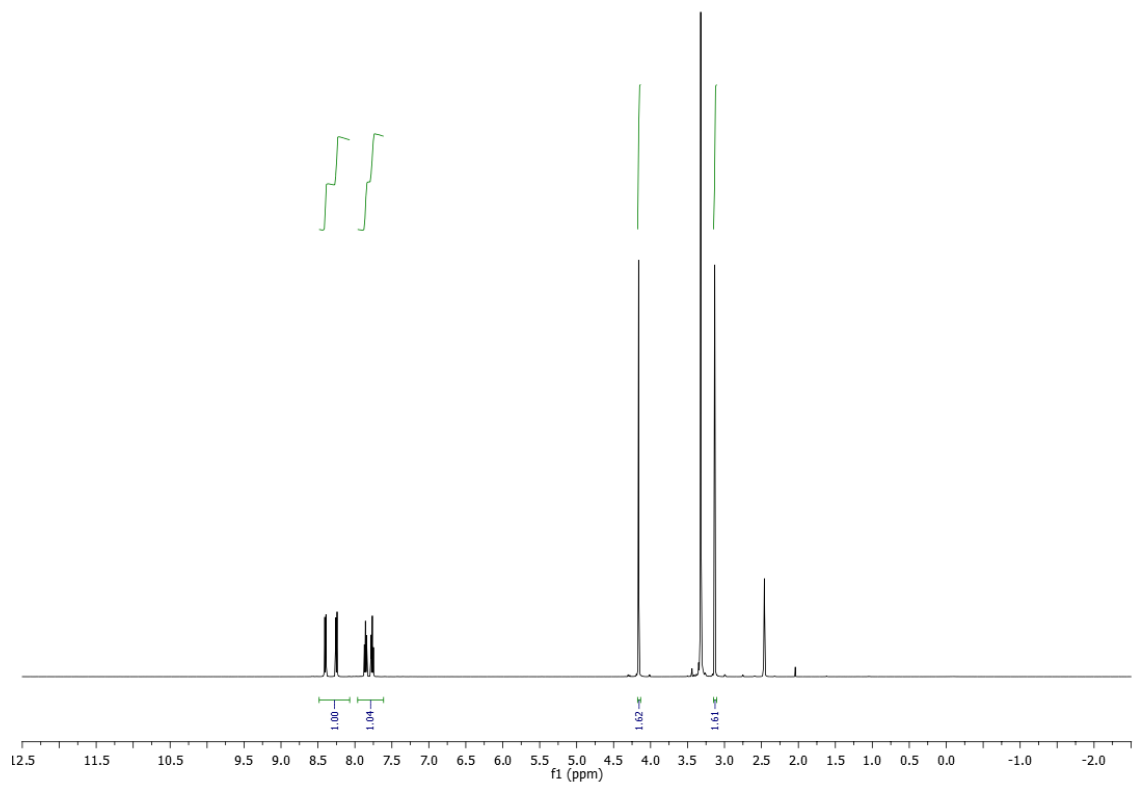


Condition: [Dye] = 10 μ M, [dsDNA] = 20 μ M, dsDNA = **N24+N25** – 5'-CCA GGG CAT GGT AGA TCA CTG TAC GCC GCG-3'+ 5'-CGC GGC GTA CAG TGA TCT ACC ATG CCC TGG-3', in 10 mM PB (pH=7.0)

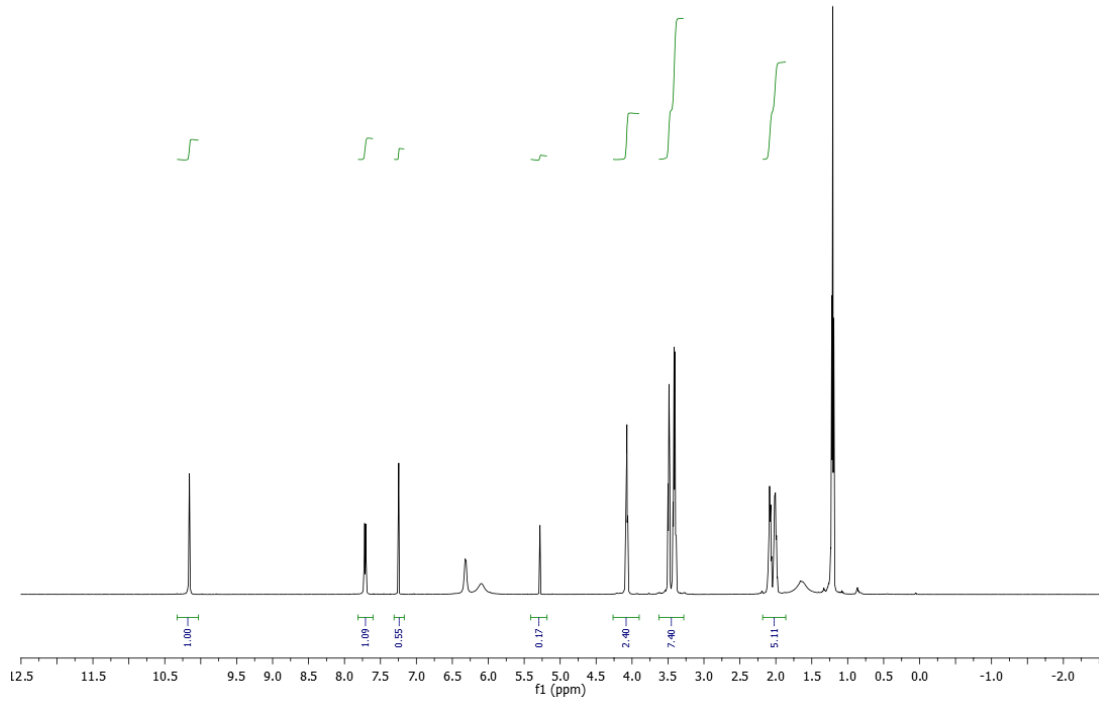
รูปที่ ผ-2 ภาพถ่ายของสีย้อม BT และ BT-AQ ความเข้มข้น 10 μ M ก่อนและหลังใส่ดีเอ็นเอ (N24+N25) ความเข้มข้น 20 μ M ใน 10 mM phosphate buffer (pH 7.4) ภายใต้แสง UV ใช้ excitation wavelength 365 nm



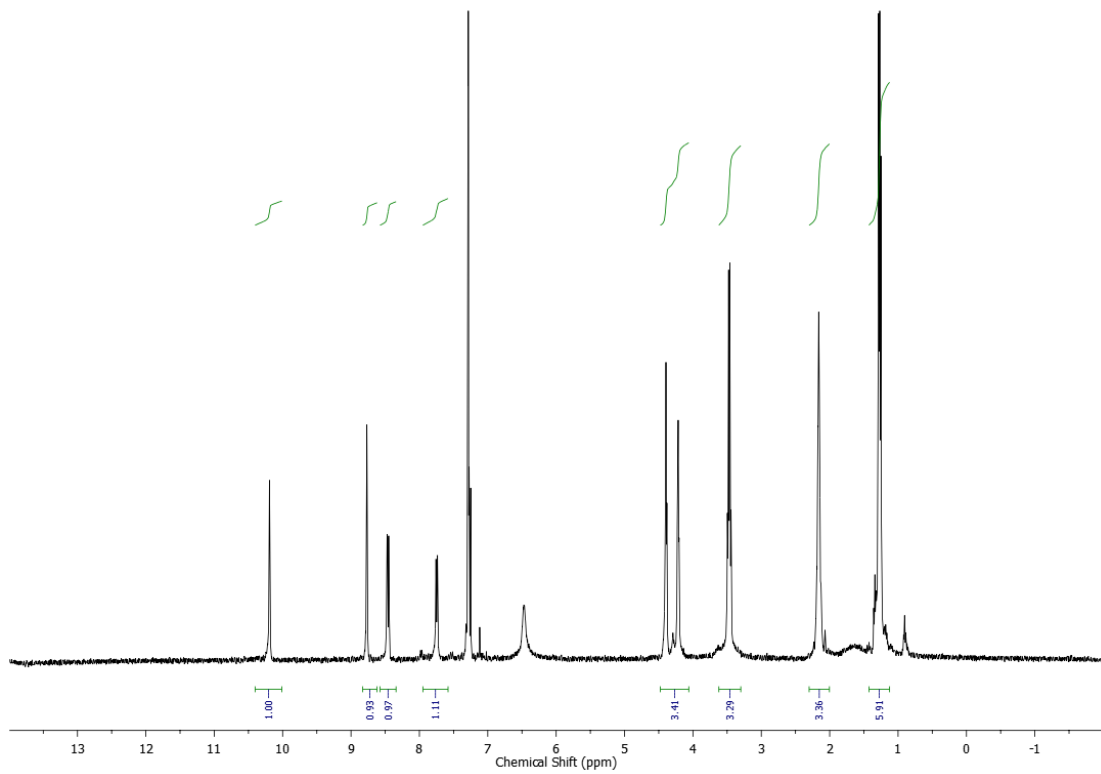
รูปที่ ผ-3 ภาพถ่ายของสีย้อม BT และ BT-O-AQ ความเข้มข้น 10 μM ก่อนและหลังใส่ดีเอ็นเอ (N24+N25) ความเข้มข้น 20 μM ใน 10 mM phosphate buffer (pH 7.4) ภายใต้แสง UV ใช้ excitation wavelength 365 nm



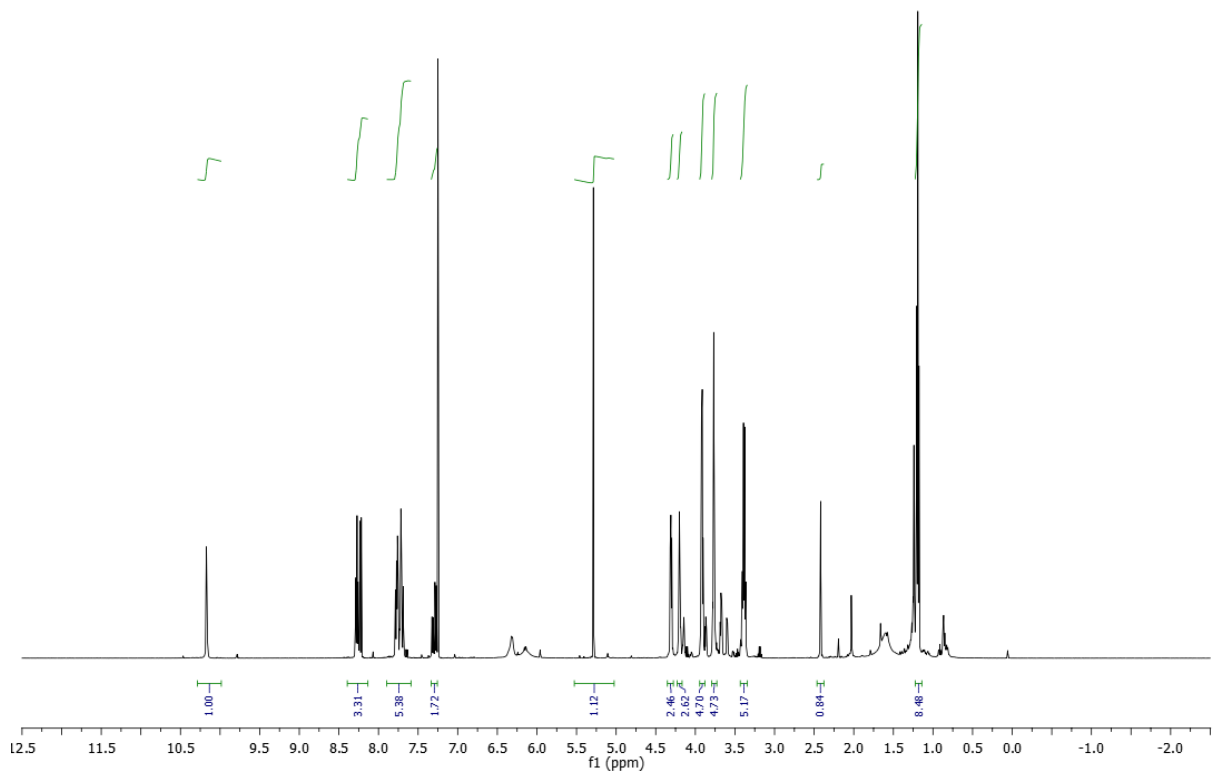
รูปที่ ผ-4 ^1H NMR ของ 2,3-Dimethylbenzo[d]thiazol-3-ium iodide (1)



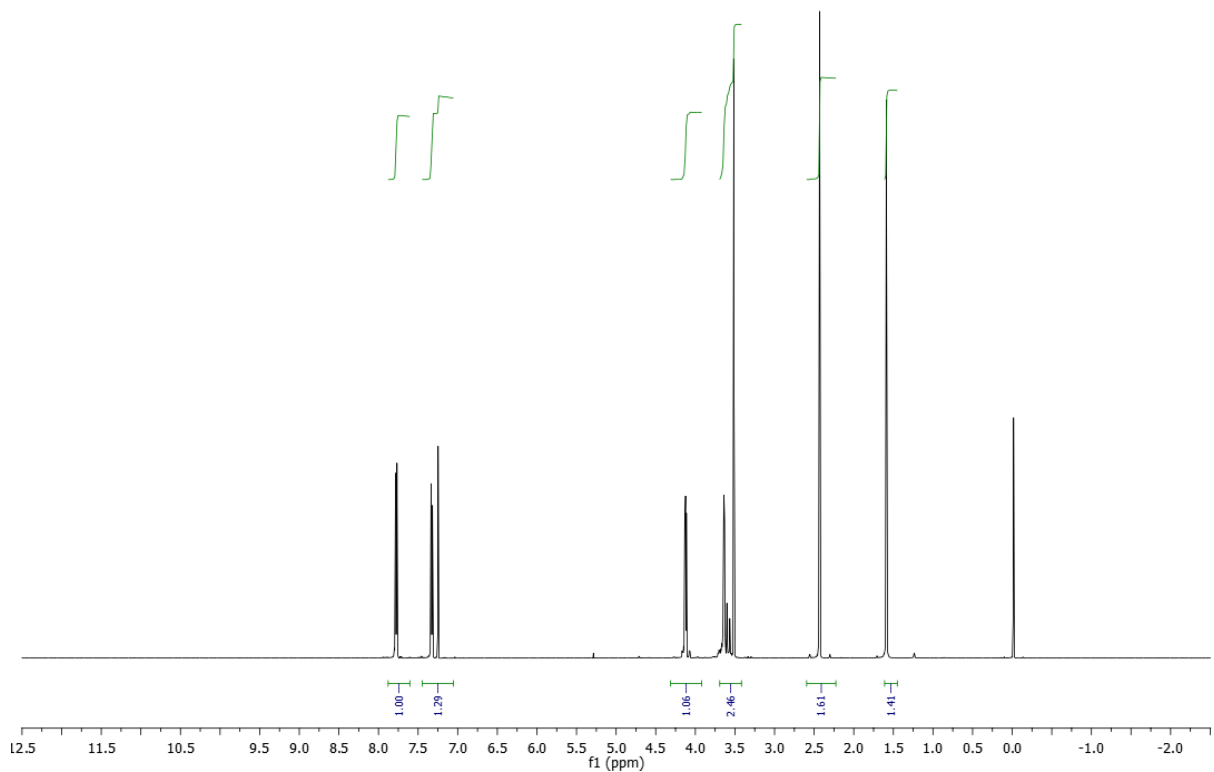
รูปที่ ผ-5 ^1H NMR ของ 2-(4-Bromobutoxy)-4-(diethylamino)benzaldehyde (2)



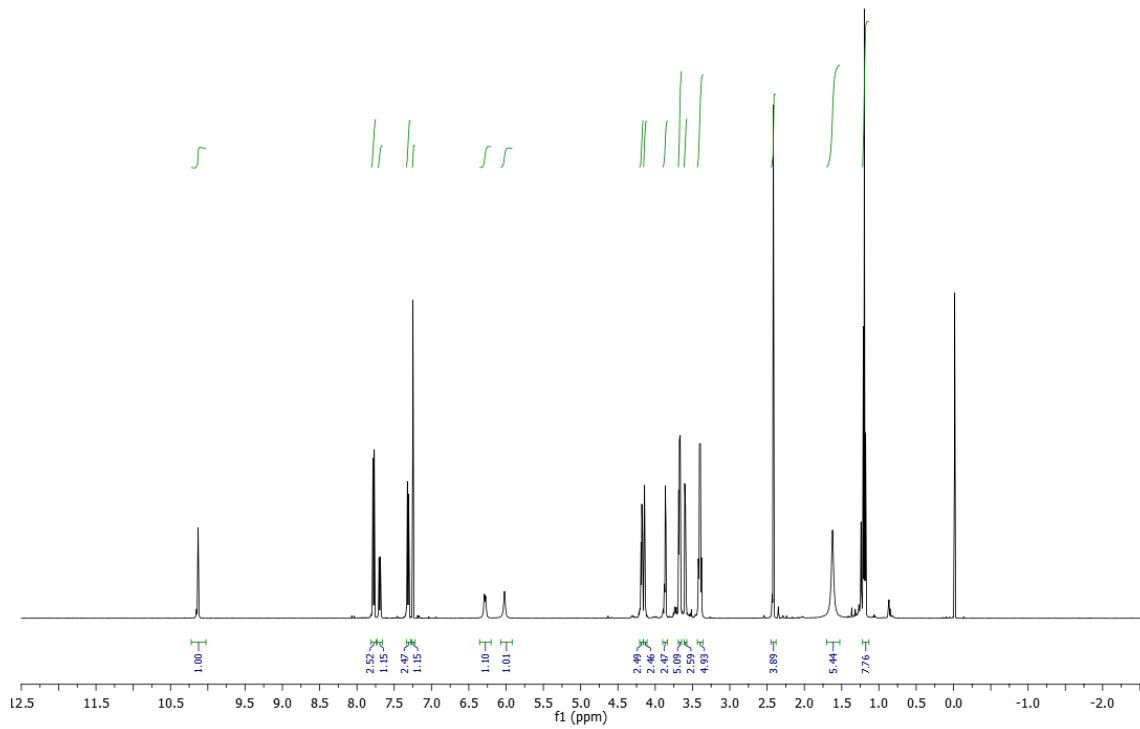
รูปที่ ผ-6 ^1H NMR ของ 4-(Diethylamino)-2-(4-(2,4-dinitrophenoxy)butoxy)benzaldehyde (3a)



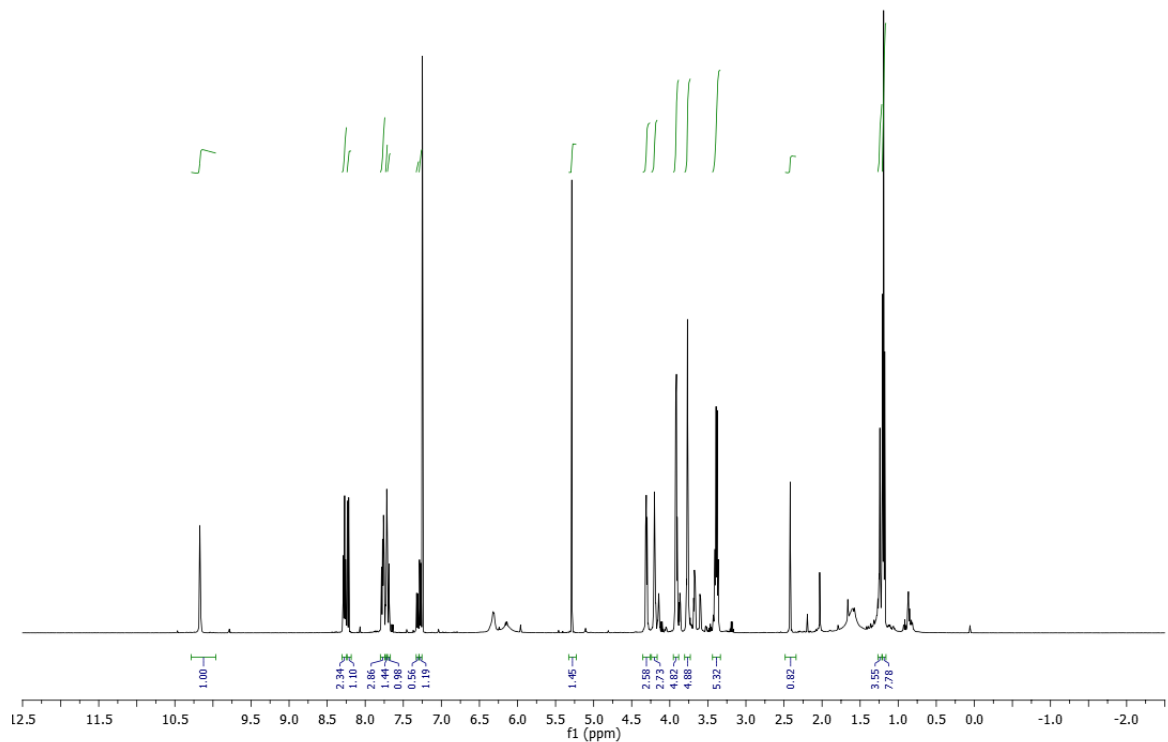
รูปที่ ๗-7 ^1H NMR ของ 4-(Diethylamino)-2-(4-((9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracen-2-yl)oxy)butoxy)benzaldehyde (**3b**)



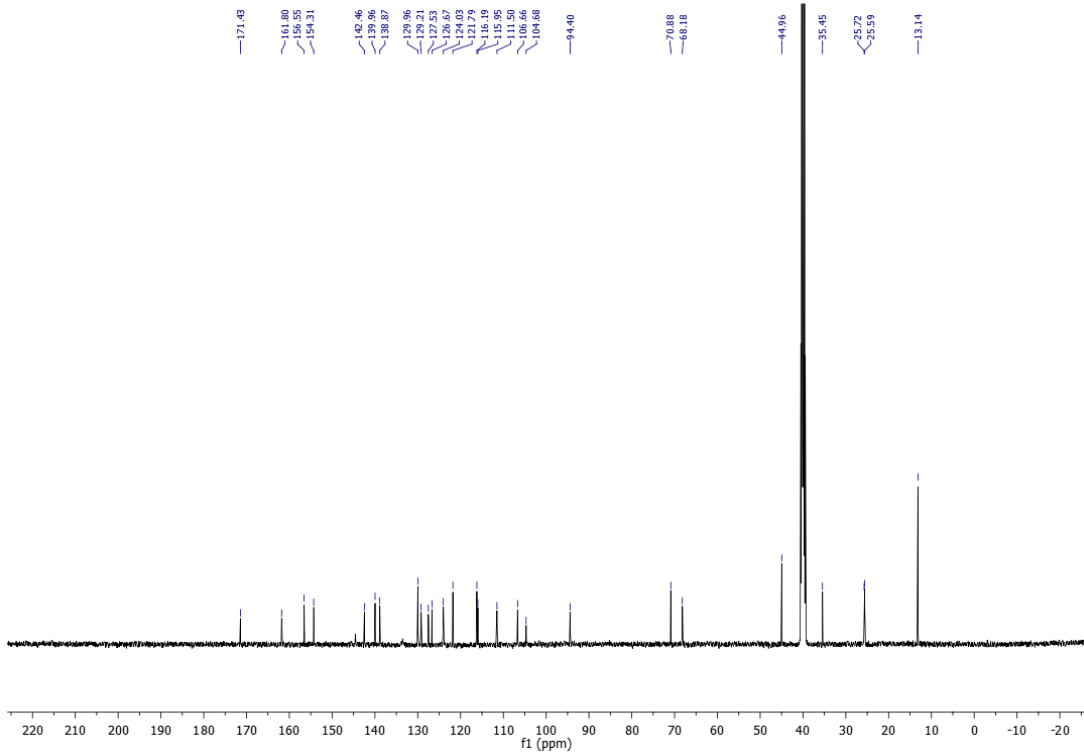
รูปที่ ๗-8 ^1H NMR ของ Triethylene glycol bis(p-toluenesulfonate) (**4**)



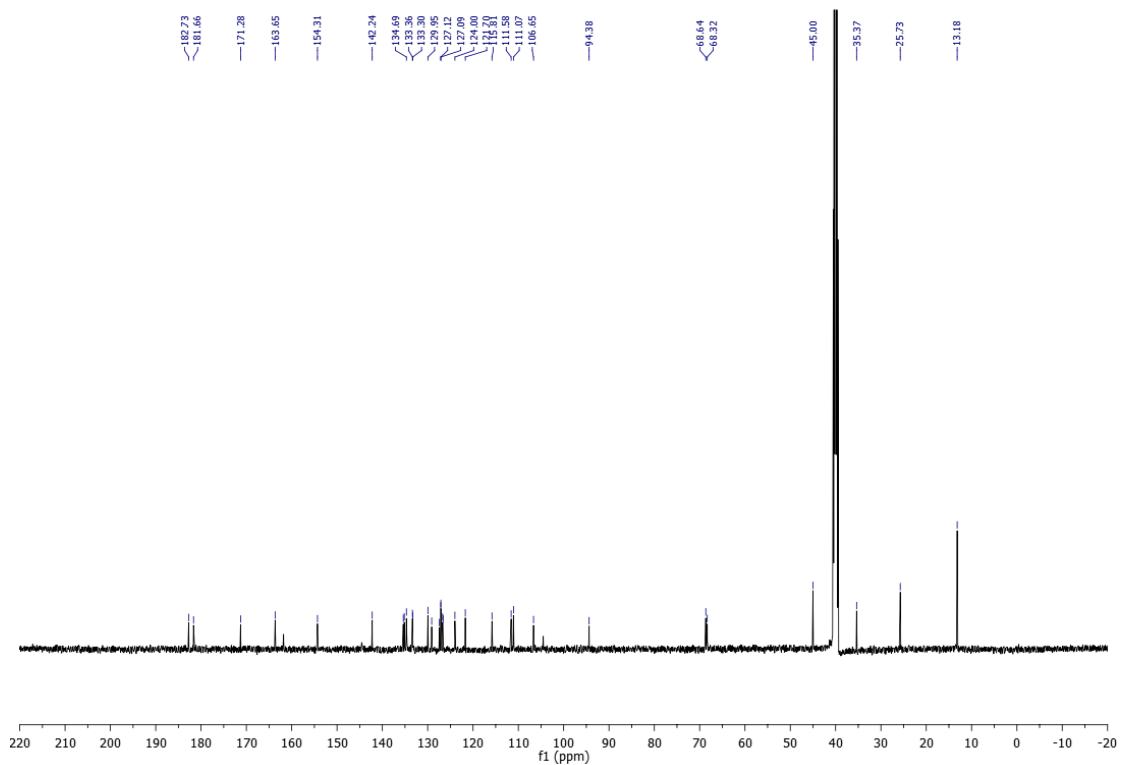
รูปที่ ๘-๑ ^1H NMR ของ 2-(2-(2-(5-(Diethylamino)-2-formylphenoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate (**2b**)



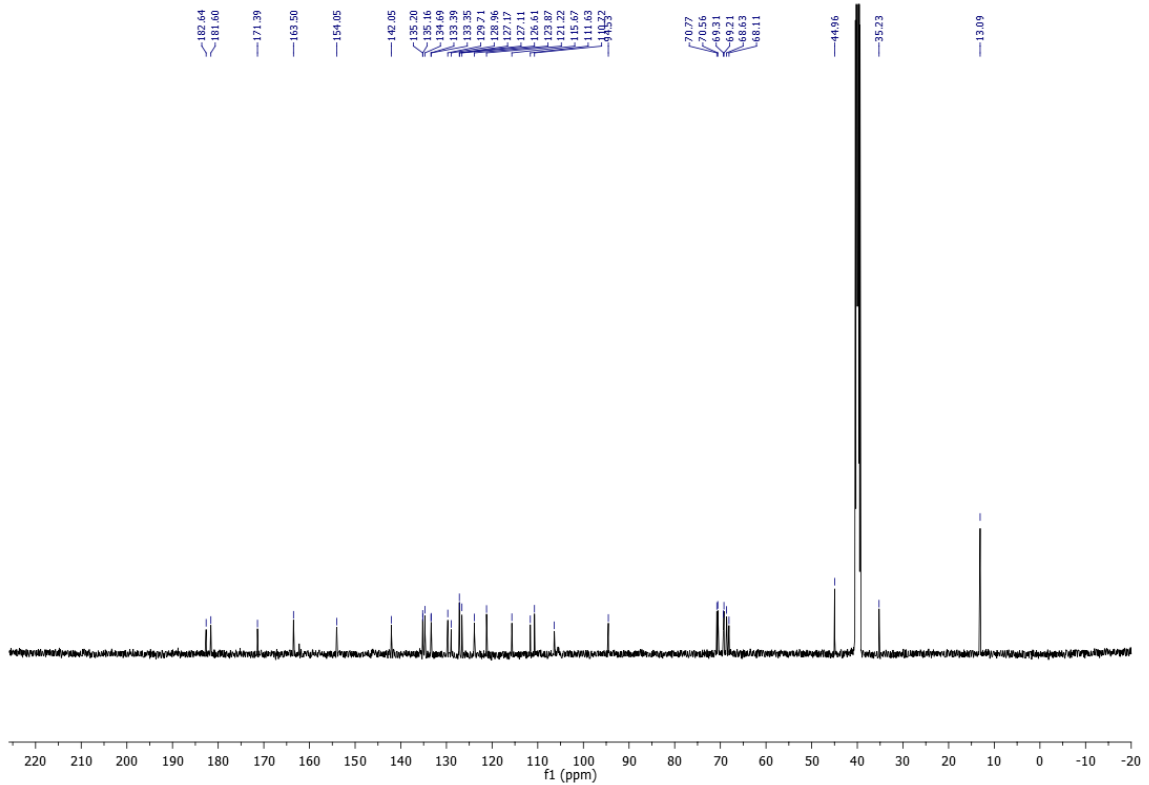
รูปที่ ๘-๑๐ ^1H NMR ของ 4-(Diethylamino)-2-(2-(2-(2-((9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracen-2-yl)oxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)benzaldehyde (**3c**)



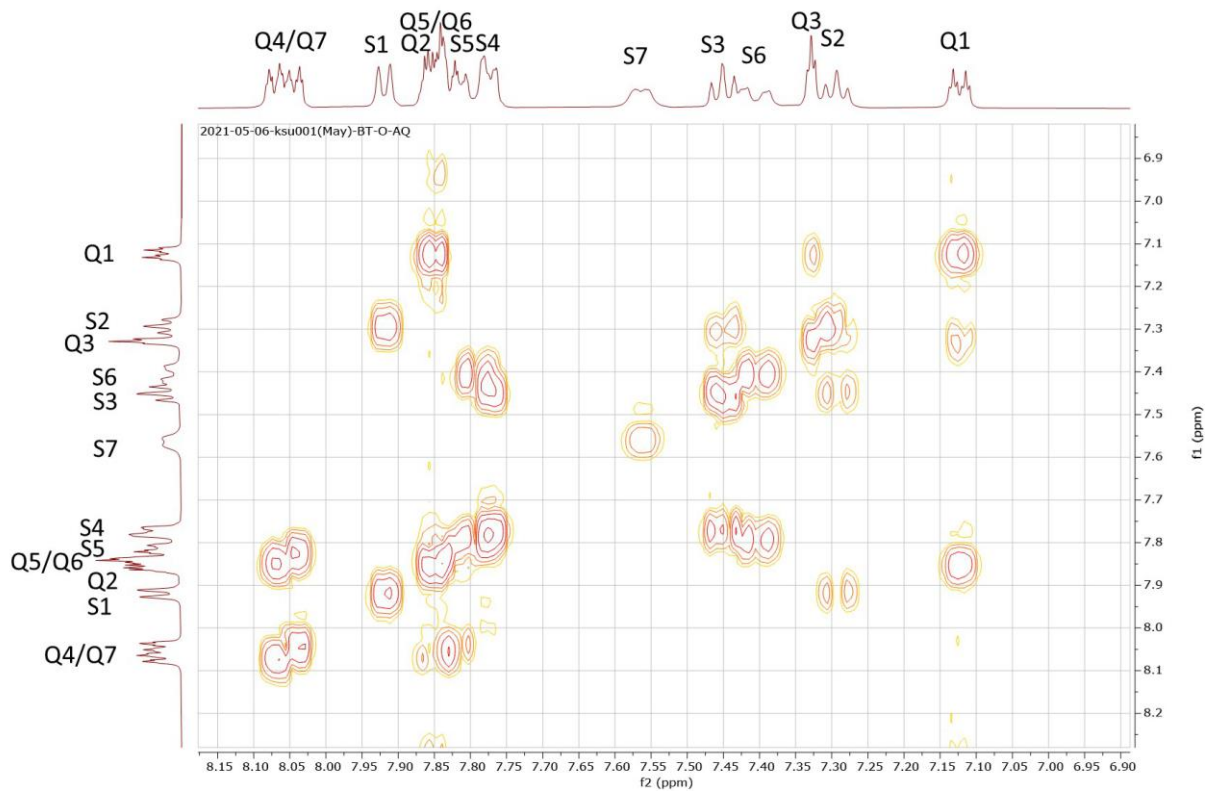
รูปที่ ๑-11 ^{13}C NMR ของ (*E*)-2-(4-(Diethylamino)-2-(4-(2,4-dinitrophenoxy)butoxy)styryl)-3-methylbenzo[d]thiazol-3-ium hexafluorophosphate (BT-DNP)



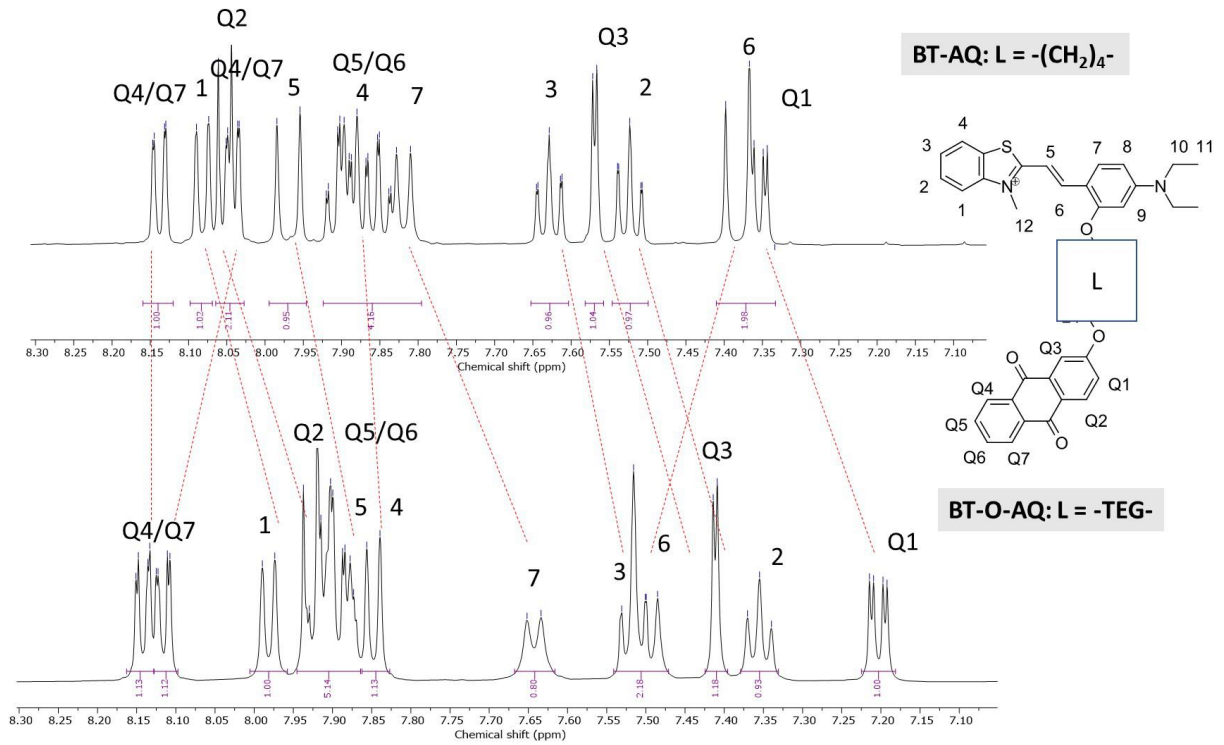
รูปที่ ๑-12 ^{13}C NMR ของ (*E*)-2-(4-(Diethylamino)-2-(4-((9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracen-2-yl)oxy)butoxy)styryl)-3-methylbenzo[d]thiazol-3-ium hexafluorophosphate (BT-AQ)



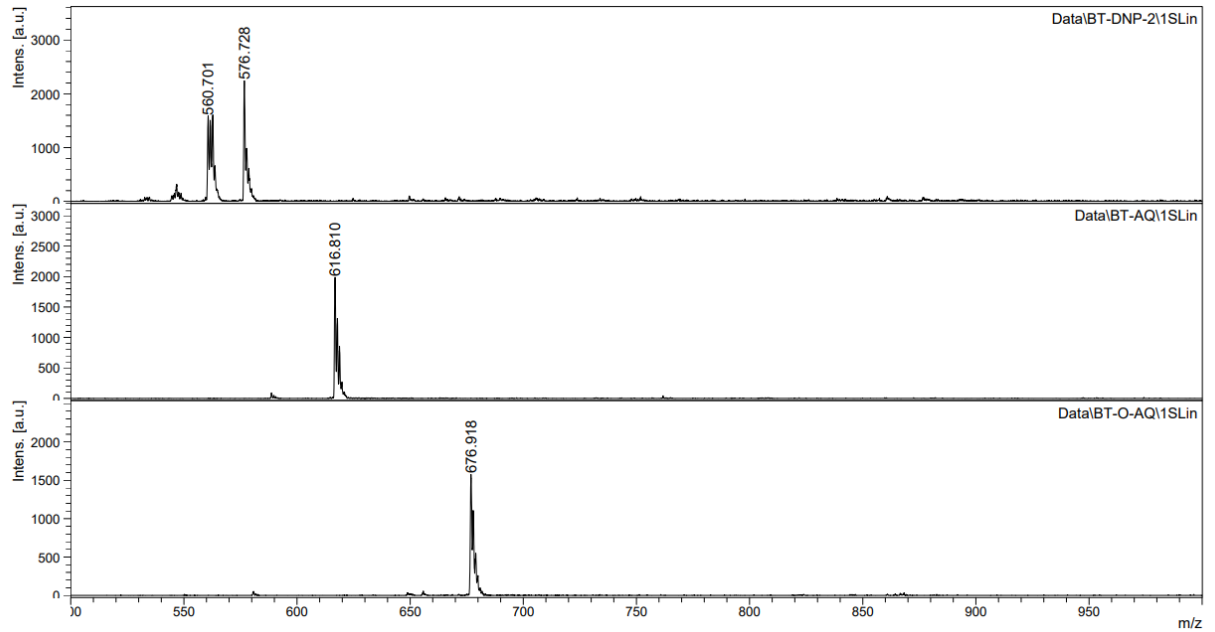
รูปที่ ๗-13 ^{13}C NMR ของ (*E*)-2-(4-(diethylamino)-2-(2-(2-((9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracen-2-yl)oxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)styryl)-3-methylbenzo[d]thiazol-3-ium hexafluorophosphate (BT-O-AQ)



รูปที่ ๗-14 2D NMR ชนิด COSY ของ BT-O-AQ (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)



รูปที่ ๑-15 เปรียบเทียบ 1H NMR chemical shift ของ BT-AQ และ BT-O-AQ (500 MHz, $DMSO-d_6$)



รูปที่ ๑-16 MALDI-TOF แมสสเปกตรัมของ BT-DNP, BT-AQ และ BT-O-AQ (CCA matrix)

ประวัติผู้วิจัย

นางสาวอภิชญา บำรุงเมือง เกิดเมื่อวันที่ 8 เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2542 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนสารสาสน์วิเทศร่มเกล้า จังหวัดกรุงเทพมหานคร เมื่อปีการศึกษา 2559 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2560 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ บ้านเลขที่ 8 ตำบล/แขวงคลองสามประเวศ อำเภอ/เขต ลาดกระบัง จังหวัดกรุงเทพมหานคร รหัสไปรษณีย์ 10520 อีเมล apichaya.m@hotmail.com