การตรวจวัดอันตรกิริยาแบบนอนโคเวเลนต์ของ PNA/DNA

ด้วยอิเล็กโทรสเปรย์แมสสเปกโทรเมตรี

นายภูมิบดี วิเชฏฐพงษ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2556
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5472070523

DETERMINATION OF NONCOVALENT INTERACTIONS OF PNA/DNA BY ELECTROSPRAY MASS SPECTROMETRY

Mr. Phumbodee Wichettapong

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Chemistry
Department of Chemistry
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2013
Copyright of Chulalongkorn University

Thesis Title	DETERMINATION OF NONCOVALENT INTERACTIONS OF PNA/DNA BY ELECTROSPRAY MASS SPECTROMETRY
By	Mr. Phumbodee Wichettapong
Field of Study	Chemistry
Thesis Advisor	Associate Professor Polkit Sangvanich, Ph.D.
Thesis Co-Advisor	Professor Tirayut Vilaivan, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

S. Hannongbua ..... Dean of the Faculty of Science

(Professor Supot Hannongbua, Dr.rer.nat.)

THESIS COMMITTEE

Warinthorn Chavasiri ..... Chairman

(Assistant Professor Warinthorn Chavasiri, Ph.D.)

Polkit Sangvanich ..... Thesis Advisor

(Associate Professor Polkit Sangvanich, Ph.D.)

Tirayut Vilaivan ..... Thesis Co-Advisor

(Professor Tirayut Vilaivan, Ph.D.)

N Ngamrojanavanich ..... Examiner

(Associate Professor Nattaya Ngamroynavanich, Ph.D.)

N. Muangsin ..... Examiner

(Associate Professor Nongnuj Muangsin, Ph.D.)

Onrapak Reamtong ..... External Examiner

(Onrapak Reamtong, Ph.D.)

ภูมิบดี วิเชฏฐพงษ์ : การตรวจวัดอันตรกิริยาแบบนอนโคเวเลนต์ของ PNA/DNA ด้วยอิเล็กโทรสเปรย์แมสสเปกโทรเมตรี. (DETERMINATION OF NONCOVALENT INTERACTIONS OF PNA/DNA BY ELECTROSPRAY MASS SPECTROMETRY) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ศ. ดร. ธีรยุทธ วิไลวัลย์, 79 หน้า.

กรดเพปไทด์นิวคลีอิก (Peptide nucleic acid; PNA) คือสารที่สังเคราะห์เลียนแบบกรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก (Deoxyribonucleic acid; DNA) แต่มีสายโซ่หลักแตกต่างจาก DNA และมีคุณสมบัติในการจับยึดกันกับ DNA คู่สมได้ดีมากกว่า ในงานวิจัยที่ผ่านมาได้อธิบายว่าการจับยึดกันระหว่าง PNA กับ DNA คู่สมมีความเสถียรมากกว่าการจับยึดกันของ DNA จับยึดกับ DNA หรือ DNA จับยึดกับ RNA เพราะสารประกอบเชิงซ้อน PNA และ DNA ไม่มีแรงผลักระหว่างโมเลกุล อันเนื่องมาจาก PNA เป็นสารที่ไม่มีประจุ ในงานวิจัยนี้ได้ทดลองเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเสถียรของ acpcPNA ที่มีลำดับเบสแตกต่างกัน 6 ชนิด โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่มดังนี้ กลุ่มที่1เลือกใช้ acpcPNA 4 ชนิด คือ p01(TT), p02(AA), p03(CC), p04(GG) ซึ่งทั้ง 4 ชนิดนี้มีความแตกต่างกันของลำดับเบสในตำแหน่งที่ 4 และ 7 บนสายของ acpcPNA และกลุ่มที่ 2 เลือกใช้ acpcPNA จำนวน 2 ชนิด คือ p05 และ p06 ที่มีจำนวนเบส G+C รวมกันมากกว่า 70% ขึ้นไป ทำการศึกษาความเสถียรของ acpcPNA กับ DNA คู่สมในสภาวะแก๊สด้วยอิเล็กโทรสเปรย์แมสสเปกโทรเมตรี (ESI-MS) เปรียบเทียบกับความเสถียรในสภาวะสารละลายด้วยยูวีวิสเบิลสเปกโทรสโกปี (UV-vis) จากผลการทดลองด้วยESI-MS ในสภาวะแก๊สพบว่าสามารถหาความสัมพันธ์ของความเสถียรของสารประกอบเชิงซ้อน acpcPNA-DNA ได้ด้วยค่าพลังงานที่ศูนย์กลางมวล (Center-of-mass collision energy ; E_{CM}) โดยนำพลังงานที่ได้ไปเปรียบเทียบกับค่าอุณหภูมิการหลอมเหลว (Melting temperature ; T_m) ซึ่งเป็นค่าที่บอกถึงความเสถียรของสารประกอบเชิงซ้อน acpcPNA-DNA ในสภาวะสารละลาย จากผลการเปรียบเทียบที่ได้ระหว่างค่าความเสถียรของสารประกอบ acpcPNA-DNA ในสภาวะแก๊ส (E_{CM}) กับค่าความเสถียรของสารประกอบเชิงซ้อน acpcPNA-DNA ในสภาวะสารละลาย (T_m) ทำให้ทราบอิทธิพลที่มีผลต่อความเสถียรของสารประกอบเชิงซ้อน acpcPNA-DNA ที่แตกต่างกัน อิทธิพลที่ส่งผลกระทบต่อความเสถียรของสารประกอบเชิงซ้อน acpcPNA-DNA สามารถอธิบายได้ด้วยปัจจัยต่างๆดังนี้คือ base stacking และ hydrogen bonding, ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยสามารถอธิบายอิทธิพลที่ส่งผลต่อเสถียรภาพของสารประกอบ PNA-DNA ได้จากพลังงานภายในของสารประกอบ PNA-DNA ในสถานะแก๊ส ซึ่งเราคาดว่าข้อมูลที่ได้จากการทดลองนี้สามารถนำไปใช้เปรียบเทียบเสถียรภาพของสารประกอบ PNA-DNA ในสภาวะแก๊ส และในสภาวะสารละลายได้ ผู้วิจัยหวังว่าจะสามารถนำข้อมูลที่ได้ไปศึกษา และประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อไปเช่น ใช้ร่วมกับเทคนิค PCR หรือใช้พัฒนาโพรบตรวจติดตามความผิดปกติของหน่วยพันธุกรรม เป็นต้น

ภาควิชา เคมี ลายมือชื่อนิสิต ภูมิบดี วิเชฏฐพงษ์

สาขาวิชา เคมี ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ปีการศึกษา 2556 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

2108631871

5472070523 : MAJOR CHEMISTRY
KEYWORDS: ACPCPNA/ ESI-MS/ CID/ CENTER-OF-MASS COLLISION ENERGY

PHUMBODEE WICHETTAPONG: DETERMINATION OF NONCOVALENT INTERACTIONS OF PNA/DNA BY ELECTROSPRAY MASS SPECTROMETRY. ADVISOR: ASSOC. PROF. POLKIT SANGVANICH, Ph.D., CO-ADVISOR: PROF. TIRAYUT VILAIVAN, Ph.D., 79 pp.

The structure of peptide nucleic acid is similar to DNA, whereas it differs in phosphate and sugar groups, which improves the hybridization property. The stabilities of the PNA-DNA complexes were previously found to be more stable than the complexes of DNA-DNA or DNA-RNA because the charge repulsion between PNA-DNA complexes did not appear. In this research, the relationships between the stability of 6 species of acpcPNA were investigated. The groups of PNA were divided into 2 sets. The first set consisted of 4 bases (T, A, C, G) which differed on positions 4 and 7 on the strand of the acpcPNA. For the second set, two PNAs in this set conclude more than 70% of G and C base. The stability of PNA-DNA complexes in the gas phase can be measured by centre-of-mass collision energy (E_{CM}) using electrospray mass spectrometry (ESI-MS). The obtained E_{CM} values go in the same direction as the melting temperature (T_m) measured by UV-vis spectroscopy (UV-vis), indicating that the stability of PNA-DNA complexes in the gas phase correlates well with that in the solution phase. On the contrary, the obtained E_{CM} values of the first set of acpcPNA-DNA complexes (G or C base on positions 4 and 7) go in the inverse direction as they are influenced by base stacking and hydrogen bonding. The experiment confirms that the stability of PNA-DNA complexes can be explained by the inner energy of the complexes. The most striking aspect of our data is the disparity between the solution phase and gas phase stabilities. We hope that this data information will be used for further study and applied for in vitro use such as PCR primers and hybridization probes.

2108631 87

Department:	Chemistry	Student's Signature	ภุมีบดี วิเชตพงษ์
Field of Study:	Chemistry	Advisor's Signature	
Academic Year:	2013	Co-Advisor's Signature	

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to initially thank to my master thesis advisor, Assoc. Prof. Dr. Polkit Sangvanich, and my thesis co-advisor, Prof. Dr. Tirayut Vilaivan, for his guidance throughout the master studying. They had always expressed an enthusiastic approach to instrument and chemistry. I owe any future successful to his influence. I would like to thank Assist. Prof. Dr. Warinthorn Chavasiri, Assoc. Prof. Dr. Nattaya Ngamroynavanich, Assoc. Prof. Dr. Nongnuj Muangsin, Dr. Onrapak Reamtong, and Dr. Nawaporn Vinayavekhin for their interest, value suggestions, comments as committee members and thesis examiners. I would like to thank Mrs. Chotima Vilaivan for preparation of PNA and DNA samples for the experiments.

I would like to my parents and family for their love, kindness, encouragement and financial support throughout my life. Finally, I would like to fully thank the 90th anniversary of Chulalongkorn University fund (Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund) for financial support and inspiration for my scientific career.

CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT iv

ENGLISH ABSTRACT v

ACKNOWLEDGEMENTS vi

CONTENTS vii

LIST OF TABLES ix

LIST OF FIGURES x

LIST OF ABBREVIATIONS xiii

CHAPTER I Introduction 1

1.1. Noncovalent Interaction 1

1.2. Introduction to Peptide Nucleic Acid (PNA) 1

1.2.1. PNA-DNA Hybridization 2

1.2.2. Applications of Peptide Nucleic Acid 3

1.2.2.1. Antisense and Antigene Therapy 3

1.2.2.2. PNA Probes in Nucleic Acid Biosensors 4

1.2.2.3. PCR Technique 5

1.2.3. Theory of Mass Spectrometry 6

1.2.3.1. General Mass Spectroscopy 6

1.2.3.2 The Electrospray Ionization Process 7

1.2.3.3 Collision Induced Dissociation 8

1.2.3.4. Research Examples Related to the ESI-MS for the Determination of Noncovalent Interaction 9

1.3. The Objective in this Research 11

CHAPTER II EXPERIMENT 12

2.1. Chemicals 12

2.2. Purification and Cleavage of PNA Oligomers 12
2.3. Characterization of acpcPNA by ESI-MS Analysis 12
2.4. Experimental Conditions to Observe PNA-DNA Duplexes 12
2.5. Analyses of Mass Spectra of PNA-DNA Duplexes 13
2.6. Studies of Noncovalent Interaction in PNA-DNA Duplexes 13
CHAPTER III Result and discussion 14
3.1 Experimental conditions to observe PNA-DNA duplexes 14
3.2. Analyses of mass spectra of PNA-DNA duplexes 17
3.3 Studies of noncovalent interaction in PNA-DNA duplexes 23
3.4. Stability of PNA-DNA duplexes in solution phase versus gas phase 27
CHAPTER IV Conclusion 34
REFERENCES 33
VITA 79

LIST OF TABLES

Table Page

3.1. Sequences and other properties of PNA and DNA used in the experiment.....19

3.2. Energy and melting temperature value of PNA-DNA complexes.....30

LIST OF FIGURES

Figure Page

1. 1. Chemical structure of a Watson-Crick and Hoogsteen base pair....2

1. 2. Chemical structures of a DNA and aegPNA molecule....2

1. 3. PNA binding modes for double stranded DNA....3

1. 4. Antigene and antisense strategy. An antigene oligomer could bind to a complementary sequence in the DNA and inhibit transcription of the gene....4

1. 5. Molecule sorting on spatially addressable microarrays....5

1. 6. An illustration of how PCR works....6

1. 7. Structure of acpcPNA....6

1. 8. Mechanism of cellular uptake of Pep-1 based on the structure and biophysical characterization....8

1. 9. Noncovalent complex form....12

1. 10. Show a type of noncovalent interaction....13

3. 1. ESI mass spectra of pT_9-dA_9 prepared in water: acetonitrile 90:10 showing the multiple charged pT_9-dA_9 duplexes and single stranded dA_9....17

3. 2. Relationship between dissociation energy (E_{CM}) and intensity of pT_9-dA_9....17

3. 3. ESI mass spectra of pT_9-dT_9 prepared in water: acetonitrile 90:10....18

3. 4. Mass spectra of p01 (TT) -d01 (AA) duplex, showing the multiple charged species obtained....20

3. 5. Mass spectra of p02 (AA) -d02 (TT) duplex, showing the multiple charged species obtained....20

3. 6. Mass spectra of p03 (CC) -d03 (GG) duplex, showing the multiple charged species obtained....21

Figure Page

3. 7. Mass spectra of p04 (GG) -d04 (CC) duplex, showing the multiple charged species obtained....22

3. 8. Mass spectra of p05-d05 duplex, showing the multiple charged species obtained....23

3. 9. Mass spectra of p06-d06 duplex, showing the multiple charged species obtained....24

3. 10. Relationship between energy and relative intensity of duplex p01 (TT) - d01 (AA). The relative intensity relate with ion abundance of duplex ion....25

3. 11. Relationship between energy and relative intensity of duplex p02 (AA) - d02 (TT). The relative intensity relate with ion abundance of duplex ion....26

3. 12. Relationship between energy and relative intensity of duplex p03 (CC) - d03 (GG). The relative intensity relate with ion abundance of duplex ion....26

3. 13. Relationship between energy and relative intensity of duplex p04 (GG) - d04 (CC). The relative intensity relate with ion abundance of duplex ion....27

3. 14. Relationship between energy and relative intensity of duplex p05-d05. The relative intensity relate with ion abundance of duplex ion....27

3. 15. Relationship between energy and relative intensity of duplex p06-d06. The relative intensity relate with ion abundance of duplex ion....28

3. 16. The relationship between energy of and relative intensity of hybrids of p01 (TT), p02 (AA), p03 (CC), p04 (GG) with their complementary DNA (charge 6-). The relative intensity relate with ion abundance of duplex ion....29

3. 17. Melting curves of hybrids of p01 (TT), p02 (AA), p03 (CC), p04 (GG) with their complementary DNA (measured at 260 nm, in sodium phosphate buffer, pH 7.0 at 1 μM concentration)....29

Figure Page

3. 18. Melting curves of hybrids of p05 with its complementary DNA (measured at 260 nm, in sodium phosphate buffer, pH 7.0 at 1 μM concentration).....31

3. 19. Melting curves of hybrids of p06 with its complementary DNA (measured at 260 nm, in sodium phosphate buffer, pH 7.0 at 1 μM concentration).....32

LIST OF ABBREVIATIONS

ACN	=	Acetonitrile
acpcPNA	=	Prolyl-2-aminocyclopentane-carboxylic acid
aegPNA	=	Aminoethylglycyl PNA
CID	=	Collision induce dissociation
Da	=	Dalton
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
E_{CM}	=	Center-of-mass collision energy
ESI-MS	=	Electrospray mass spectrometry
eV	=	Electronvolt
HPLC	=	High-performance liquid chromatography
KeV	=	kiloelectronvolt
KV	=	Kilovolt
min	=	Minute
MS	=	Mass spectrometry
MW.	=	Molecular weight
PCR	=	Polymerase chain reaction
PNA	=	Peptide Nucleic Acid
RNA	=	Ribonucleic acid
T_m	=	Melting temperature
µL	=	Microliter
µM	=	Micromolar
UV-*vis*	=	Ultraviolet–visible spectroscopy