

การตรวจวัดอันตรกิริยาแบบนอนโคเวเลนต์ของ PNA/DNA

ด้วยอิเล็กโทรสเปร์ย์แมสสเปกโตรเมตรี



นายภูมิบัติ วิเชษฐพงษ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2556

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



5472070523

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

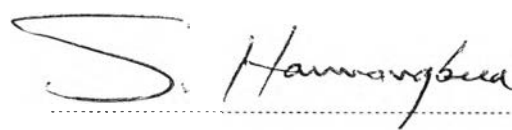
Mr. Phumbodee Wichettapong

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

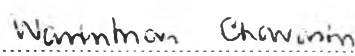
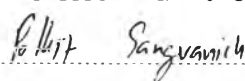
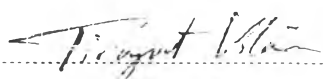
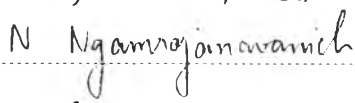
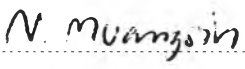

Thesis Title DETERMINATION OF NONCOVALENT  
INTERACTIONS OF PNA/DNA BY ELECTROSPRAY  
MASS SPECTROMETRY  
By Mr. Phumbodee Wichettapong  
Field of Study Chemistry  
Thesis Advisor Associate Professor Polkit Sangvanich, Ph.D.  
Thesis Co-Advisor Professor Tirayut Vilaivan, Ph.D.

---

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

.....Dean of the Faculty of Science  
(Professor Supot Hannongbua, Dr.rer.nat.)

#### THESIS COMMITTEE

.....Chairman  
(Assistant Professor Warinthorn Chavasiri, Ph.D.)  
.....Thesis Advisor  
(Associate Professor Polkit Sangvanich, Ph.D.)  
.....Thesis Co-Advisor  
(Professor Tirayut Vilaivan, Ph.D.)  
.....Examiner  
(Associate Professor Nattaya Ngamrojjanavanich, Ph.D.)  
.....Examiner  
(Associate Professor Nongnuj Muangsin, Ph.D.)  
.....External Examiner  
(Onrapak Reamtong, Ph.D.)

ภูมิบัติ วิชฎฐพงษ์ : การตรวจวัดอันตรกิริยาแบบนอนโคเวเลนต์ของ PNA/DNA ด้วยอิเล็กโทรสเปย์แมสสเปกโทรเมตรี. (DETERMINATION OF NONCOVALENT INTERACTIONS OF PNA/DNA BY ELECTROSPRAY MASS SPECTROMETRY) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร. พลฤกษ์ แสงวณิช, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ศ. ดร. ธีรยุทธ วิไลวัลย์, 79 หน้า.

กรดเพปไทด์นิวคลีอิก (Peptide nucleic acid; PNA) คือสารที่สังเคราะห์เลียนแบบกรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก (Deoxyribonucleic acid; DNA) แต่มีสายโซ่หลักแตกต่างจาก DNA และมีคุณสมบัติในการจับยึดกับ 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 กลุ่มที่ 1 เลือกใช้ 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 คู่สมในสถานะแก๊สด้วยอิเล็กโทรสเปย์แมสสเปกโทรเมตรี (ESI-MS) เปรียบเทียบกับความเสถียรในสถานะสารละลายด้วยวิธี UV-vis, ฟิล์มสเปกโทรสโกปี (UV-vis) จากผลการทดลองด้วย ESI-MS ในสถานะแก๊สพบว่าสามารถหาความสัมพันธ์ของความเสถียรของสารประกอบเชิงซ้อน acpcPNA-DNA ได้ด้วยค่าพลังงานที่ศูนย์กลางมวล (Center-of-mass collision energy ;  $E_{CM}$ ) โดยนำพลังงานที่ได้ไปเปรียบเทียบกับค่าอุณหภูมิการหลอมเหลว (Melting temperature ;  $T_m$ ) ซึ่งเป็นค่าที่บอกถึงความเสถียรของสารประกอบเชิงซ้อน acpcPNA-DNA ในสถานะสารละลาย จากผลการเปรียบเทียบที่ได้ระหว่างค่าความเสถียรของสารประกอบ acpcPNA-DNA ในสถานะแก๊ส ( $E_{CM}$ ) กับค่าความเสถียรของสารประกอบเชิงซ้อน acpcPNA-DNA ในสถานะสารละลาย ( $T_m$ ) ทำให้ทราบอิทธิพลที่มีผลต่อความเสถียรของสารประกอบเชิงซ้อน acpcPNA-DNA ที่แตกต่างกัน อิทธิพลที่ส่งผลกระทบต่อความเสถียรของสารประกอบเชิงซ้อน acpcPNA-DNA สามารถอธิบายได้ด้วยปัจจัยต่างๆ ดังนี้คือ base stacking และ hydrogen bonding, ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยสามารถอธิบายอิทธิพลที่ส่งผลกระทบต่อเสถียรภาพของสารประกอบ PNA-DNA ได้จากพลังงานภายในของสารประกอบ PNA-DNA ในสถานะแก๊ส ซึ่งเราคาดว่าข้อมูลที่ได้จากการทดลองนี้สามารถนำไปใช้เปรียบเทียบเสถียรภาพของสารประกอบ PNA-DNA ในสถานะแก๊ส และในสถานะสารละลายได้ ผู้วิจัยหวังว่าจะสามารถนำข้อมูลที่ได้อธิบาย และประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อไปเช่น ใช้ร่วมกับเทคนิค PCR หรือใช้พัฒนาโปรบตรวจติดตามความผิดปกติของหน่วยพันธุกรรม เป็นต้น

ภาควิชา	เคมี	ลายมือชื่อนิสิต	ภูมิบัติ วิชฎฐพงษ์
สาขาวิชา	เคมี	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ป. 4
ปีการศึกษา	2556	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ป. 4



210863187

# # 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.

Department: Chemistry

Field of Study: Chemistry

Academic Year: 2013

Student's Signature 

Advisor's Signature 

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 <sub>9</sub> -dA <sub>9</sub> prepared in water: acetonitrile 90:10 showing the multiple charged pT <sub>9</sub> -dA <sub>9</sub> duplexes and single stranded dA <sub>9</sub> .....	17
3. 2. Relationship between dissociation energy ( $E_{CM}$ ) and intensity of pT <sub>9</sub> -dA <sub>9</sub> .....	17
3. 3. ESI mass spectra of pT <sub>9</sub> -dT <sub>9</sub> 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 $\mu$ M 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 $\mu$ M 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 $\mu$ M 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
$\mu$ L	=	Microliter
$\mu$ M	=	Micromolar
UV-vis	=	Ultraviolet-visible spectroscopy

