

分类号_____

密级_____

UDC _____

编号_____

中国科学院研究生院

博士学位论文

肽核酸的合成、修饰及其杂交研究

李进都

指导教师 陈 淼 研究员

中国科学院兰州化学物理研究所

申请学位级别 理学博士 学科专业名称 物理化学

论文提交日期 2008 年 4 月 论文答辩日期 2008 年 5 月

培养单位 中国科学院兰州化学物理研究所

学位授予单位 中国科学院研究生院

答辩委员会主席_____



博士学位论文

肽核酸的合成、修饰及其杂交研究

导 师： 陈 淼 研究员 博士

博 士 生： 李进都

专 业： 物理化学

研究方向： 肽核酸的合成、修饰及其杂交研究

培养单位： 中国科学院兰州化学物理研究所

起止日期： 2003.9 - 2008.5

二零零八年五月

Ph. D. Thesis

**Synthesis, Modification of Peptide Nucleic Acids and
Studies of Their Hybridization to DNA**

Jindu Li

**Directed by
Professor Miao Chen**

**A Dissertation Submitted to Graduate School, Chinese Academy of
Sciences in Partial Fulfillment of Requirements for the Degree of
Doctor of Philosophy in Physical Chemistry**

May, 2008

目录

缩写	VI
摘要	XI
Abstract	XIII
第一章 绪论	1
1.1 引言	1
1.2 PNA 的结构和性质	3
1.2.1 PNA 的结构	3
1.2.2 PNA 的物理化学性质	3
1.3 PNA 的合成和修饰	5
1.3.1 PNA 的合成	5
1.3.2 PNA 的修饰	5
1.4 PNA 的杂交	6
1.4.1 稳定双螺旋的因素	6
1.4.2 PNA 的杂交	8
1.5 PNA 应用	10
1.5.1 反义应用	10
1.5.2 抗基因应用	10
1.5.3 PNA 作为诊断工具	10
1.5.4 PNA 在生物芯片中的应用	11
1.5.5 PNA 在生物传感器中的应用	12
1.5.6 PNA 的其它应用	13
1.6 选题依据与研究思路	14
参考文献	14
第二章 PNA 单体的合成	25
2.1 概述	25

2.2 经典骨架的合成	26
2.2.1 烷基化反应	26
2.2.2 席夫碱的还原反应	28
2.2.3 Mitsunobu 反应	30
2.2.4 实验部分	30
2.3 天然核碱基的保护和乙酰化	31
2.3.1 保护基	31
2.3.2 碱基的保护和乙酰化	33
2.3.4 实验	39
2.3.4.1 保护试剂 Cbz-Cl 的合成	39
2.3.4.2 胸腺嘧啶乙酰化	39
2.3.4.3 胞嘧啶的保护及乙酰化	39
2.3.4.4 腺嘌呤的保护及乙酰化	40
2.3.4.5 鸟嘌呤的保护及乙酰化	41
2.4 经典 PNA 单体的合成	42
2.4.1 单体氮端是酸性脱除保护基	42
2.4.2 单体氮端是碱性脱除保护基	44
2.4.3 实验	45
参考文献	48
第三章 二茂铁标记 PNA 单体的合成及性质	51
3.1 引言	51
3.2 放射性标记	51
3.3 荧光标记	51
3.4 电化学标记	53
3.4.1 标记在氮端	54
3.4.2 标记在碳端	54
3.4.3 标记在骨架上	54
3.4.4 标记在碱基上	55
3.5 新的标记分子合成及其对 PNA 单体的标记和性质研究	55

3.5.1 新标记分子的合成	55
3.5.2 茂铁偶氮苯甲酸对 PNA 单体的标记	56
3.5.3 标记分子和标记单体的性质	57
3.6 实验	61
3.6.1 3-茂铁基-2-丁烯酸的合成	61
3.6.2 Fc-Azo-COOH 的合成	62
3.6.3 Fc-Azo-T-OEt 的合成	63
3.6.4 紫外可见吸收光谱实验	64
3.6.5 电化学实验	64
参考文献	65
第四章 新型偶氮类 PNA 单体的合成及性质	69
4.1 引言	69
4.2 PNA 骨架的改造	70
4.2.1 在骨架上引入支链	70
4.2.2 在骨架上引入环状结构	72
4.2.3 不符合“6+3”规则的骨架改造	75
4.3 连接分子的变化	75
4.4 碱基的变化	76
4.4.1 仍与 DNA 包含氢键作用的碱基替代	77
4.4.2 通过堆积作用保持杂交功能	78
4.4.3 具有新功能的碱基替代	79
4.5 偶氮类 PNA 单体的合成	80
4.5.1 偶氮苯取代碱基的 PNA 单体的合成和性质	81
4.5.1.1 单体 1 的合成和性质	80
4.5.1.2 单体 2 的合成和性质	84
4.5.2 萘偶氮苯取代碱基的 PNA 单体合成与性质	86
4.5.2.1 萘偶氮苯单体的合成	86
4.5.2.2 萘偶氮苯 PNA 单体的性质	87
4.6 实验	91

4.6.1 偶氮苯单体 1 的合成	91
4.6.2 偶氮苯单体 2 的合成	92
4.6.3 萘偶氮苯单体 3 的合成	93
4.6.4 萘偶氮苯单体 4 的合成	94
参考文献	95
第五章 固相合成 PNA 寡聚体	101
5.1 引言	101
5.2 基本原理	101
5.3 Boc/Cbz 策略合成 PNA	101
5.3.1 树脂选择	104
5.3.1.1 树脂的功能化 (Linker)	105
5.3.1.2 树脂的取代量 (substituting degree,SD)	105
5.3.2 上树脂和洗涤	108
5.3.2.1 上树脂	108
5.3.2.2 洗涤	108
5.3.3 脱保护	109
5.3.4 偶联	109
5.3.4.1 缩合剂	110
5.3.4.2 其他影响因素	113
5.3.5 盖帽	114
5.3.6 PNA 解离、纯化和 PNA 副反应	114
5.3.6.1 解离	114
5.3.6.2 纯化	114
5.3.6.2 质谱	115
5.3.6.4 PNA 合成中的副反应	115
5.4 实验	116
5.4.1 上树脂	116
5.4.2 固相合成	117
5.4.3 HPLC 分离和质谱表征	118

参考文献	123
第六章 PNA 与 DNA 杂交研究	125
6.1 引言	125
6.2 N-PNA 与 DNA 杂交的紫外光谱研究	125
6.3 PNA 与 DNA 杂交的电化学研究	128
6.3.1 用指示剂研究 PNA 与 DNA 的杂交	128
6.3.2 电化学标记的 PNA 与 DNA 的电化学检测	131
6.3.2.1 电极表面 DNA 量的确定	133
6.3.2.2 PNA 浓度的确定	134
6.3.2.3 电化学检测	134
6.4 PNA 与 DNA 杂交的 AFM 研究	137
6.4.1 金表面 DNA 与 PNA-Fc 杂交的变化	138
6.4.2 N-PNA 与 DNA 杂交 AFM 研究	139
6.5 实验	142
6.5.1 电化学实验	143
6.5.2 AFM 实验	143
参考文献	145
第七章 结束语	149
7.1 主要研究内容和结论	149
7.2 存在的问题和今后的研究设想	150
作者简介	151
已发表或待发表论文	152
致 谢	153
附 录	155

缩写

A	adenine	腺嘌呤
Ac	acetyl	乙酰基
Ad	adamantyl	金刚烷基
AdTSV	adsorptive stripping voltammetric	吸附溶出伏安法
Adoc	adamantylloxycarbonyl	金刚烷氧基羰基
AFM	atomic Force Microscopy	原子力显微镜
Alloc or AOC	allyloxycarbonyl	烯丙氧羰基
An	anisoyl	茴香酰基
AOP	7-azabenzotriazol-1-yl-oxytris(pyrrolidino)phosphonium	吡啶并三唑啉盐 (见表 5-6)
A ^Z	6-N-(benzyloxycarbonyl)adenine	6-N-苄氧羰基腺嘌呤
A ^Z CH ₂ COOH	6-N-(benzyloxycarbonyl)adenin-9-yl-acetic acid	6-N-苄氧羰基腺嘌呤-9-乙酸
B	base	碱基
BA ^Z H	adenine PNA monomer	腺嘌呤 PNA 单体
BC ^Z H	cytosine PNA monomer	胞嘧啶 PNA 单体
BG ^P H	guanine PNA monomer	鸟嘌呤 PNA 单体
Bhoc	benzhydryloxycarbonyl	二苯基甲氧羰基
Bn	benzyl	苄基
BNH	PNA containing azobenzene formic acid monomer	偶氮苯甲酸 PNA 单体
BN2H	PNA containing azobenzene acetic acid monomer	偶氮苯乙酸 PNA 单体
Bn-G-CH ₂ COOH	6-O-benzylguanine-9-yl-acetic acid	6-氧-苄基-鸟嘌呤-9-乙酸
G ^P H	(2-Amino-6-(benzyloxy)purin-9-yl)acetic acid	6-氧-苄基-鸟嘌呤-9-乙酸
Boc	t-butoxycarbonyl	叔丁氧羰基
(Boc) ₂ O	di-tert-butyl dicarbonate	碳酸二叔丁酯
BOP	Benzotriazol-1-yl-N-oxy-tris(dimethyl amino)phosphonium	苯并三唑啉盐(见表 5-5)
Bpoc	1-methyl-1-(4-biphenyl)ethoxycarbonyl	1-甲基-1-(4-联苯基)乙氧羰基
BTH	thymine PNA monomer	胸腺嘧啶 PNA 单体
i-Bu	isobutyryl	异丁酰基
t-Bu	tert-butyl	叔丁基
tBuBz	4-tert-butyl benzoyl	4-叔丁基苯甲酰基

Bz	benzoyl	苯甲酰基
C	cytosine	胞嘧啶
Cbz or Z	benzyloxycarbonyl	苄氧羰基
Cbz-ONSu	benzyl succinimido carbonate	苯甲氧羰酰琥珀酰亚胺
Cbz-Im ⁺ EtBF ₄		苄氧羰基乙基四氟硼酸咪唑盐
CC	chonocoulometry	计时库仑法
CMPI	2-chloro-1-methylpyridium chloride	2-氯-1-甲基吡啶氯化物
CPE	the constant phase angle element	常相位角元素
CV	cyclic voltammetry	循环伏安法
d	doublet	双重峰
D ₀	diffusion coefficient	扩散系数
DCC	N,N'-dicyclohexyl carbodiimide	N,N'-二环己基碳二亚胺
DCM	dichloromethane	二氯甲烷
DECA	N,N-diethylcyclohexylamine	二乙基环己基胺
DEPBT	3-(diethoxyphosphoryloxy)-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-one	3-(二乙氧基磷酰氧基)-1,2,3-苯并三嗪-4-酮
DhBtOH	3-hydroxy-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-one	3-羟基-1,2,3-苯并三嗪-4(3H)-酮
DIEA	diisopropylethylamine	二异丙基乙胺
DIC	N,N'-diisopropylcarbodiimide	N,N'-二异丙基碳二亚胺
Dipmoc	diisopropylmethyloxycarbonyl	二异丙基甲氧羰基
DMAP	4-dimethylaminopyridine	4-二甲氨基吡啶
DMF	N,N-dimethylformamide	N,N-二甲基甲酰胺
DMSO	dimethyl sulfoxide	二甲基亚砜
DMSO-d ₆	perdeuterated dimethyl sulfoxide	氘代二甲基亚砜
DNA	deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
Dpc	diphenylcarbonyl	二苯基甲酰基
DPPA	diphenylphosphoryl azide	二苯基磷酰基叠氮化物
DPV	differential pulse voltammetry	差示脉冲法
DSC	differential scanning calorimetry	差示扫描量热法
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide	1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺
EIS	electrochemical impedance spectra	电化学阻抗谱
Et	ethyl	乙基
Et ₃ SiH	triethylsilane	三乙基硅烷
ESI-MS	electrospray ionisation mass spectrometry	电喷雾质谱

F	faraday constant	法拉第常数
FAB-MS	fast atom bombardment mass spectrometry	快中子轰击质谱
Fc	ferrocene	二茂铁
FFM	friction force microscopy	摩擦力显微镜
Fmoc	9-fluorenylmethoxycarbonyl	芴甲氧羰基
Fmoc-ONSu	N-(9-fluorenylmethoxycarbonyloxy) succinimide	芴甲氧羰酰琥珀酰亚胺
FMSA	trifluoromethanesulphonic acid	三氟甲磺酸
FRET	förster resonance energy transfer	荧光共振能量转移
FT-IR	fourier Transform Infrared spectrometer	傅立叶红外转换光谱
G	guanine	鸟嘌呤
GCE	glassy carbon electrode	玻碳电极
h	hour	小时
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate	2-(7-偶氮苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脒六氟磷酸酯
HBTU	O-Benzotriazole-N,N,N',N'-tetramethyl-uronium-hexafluorophosphate	苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脒六氟磷酸酯
HF	hydrofluoric Acid	氢氟酸
HOAt	1-hydroxy-7-azabenzotriazole	1-羟基-7-偶氮苯并三氮唑
HOBt	1-hydroxybenzotriazole	1-羟基-苯并三氮唑
HONb	N-hydroxy-5-norbornene-2,3-dicarboxylic imide	N-羟基-5-降冰片烯-2,3-二酰亚胺
HOObt	3-hydroxy-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-one	3-羟基-1,2,3-苯并三嗪-4(3H)-酮
HOSu	N-hydroxysuccinimide	N-羟基琥珀酰亚胺
HPLC	high performance liquid chromatography	高效液相色谱法
ITC	isothermal titration calorimetry	等温滴定量热法
Me	methyl	甲基
m	multiplet	多重峰
MB	methylene blue	甲基蓝
MBHA	4-methylbenzhydrylamine	4-甲基苯胺树脂
MCH	mercaptohexanol	巯基己醇
min	minutes	分钟
Mmt	p-methoxyphenyldiphenylmethyl	对甲氧基苯基二甲基
mol	mole	摩尔
mRNA	messenger RNA	信使 RNA
Mz	4-methyloxybenzyloxycarbonyl	对甲氧基苄氧羰基

N _A	avogadro's number	阿夫加德罗常数
NCA	N-carboxyanhydride	N-羧基内酸酐
HMDE	hanging mercury drop electrode	悬汞滴电极
NEM	N-ethylmorpholine	N-乙基吗啉
NMM	N-methylmorpholine	N-甲基吗啉
NMP	N-methylpyrrolidone	N-甲基吡咯烷酮
NMR	nuclear magnetic resonance	核磁共振
N-PNA	PNA containing azobenzene unit	包含偶氮苯的 PNA
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链反应
PG	protect group	保护基团
PEG	polyethylene glycol	聚乙二醇
Pht	phthalic anhydride	邻苯二甲酸酐
Pfp	pentafluorophenyl	五氟苯酯
PNA	Peptide Nucleic Acid	肽核酸
Py	pyridine	吡啶
PyBrop	bromo-tris-pyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate	三吡咯烷基溴化磷六氟磷酸盐
Rapoports reagent	N1-benzyloxycarbonyl-N3-methylimidazolium	1-苄氧羰基-3-甲基咪唑盐
RNA	ribonucleic acid	核酸
R _{ct}	charge-transfer resistance	电荷传输电阻
R _{ms}	root mean square roughness	均方根粗糙度
RP	reverse phase	反相
R _s	solution resistance	溶液电阻
R _x	pinholes in the monolayer structure	结构缺陷电阻
q	quartet	四重峰
SD	substituting degree	取代量
SMM	scanning magnetic microscopy	扫描磁力显微镜
SPMs	scanning probe microscopes	扫描探针显微镜
SPPS	solid-phase peptide synthesis	固相肽合成
SThM	scanning thermal microscopy	扫描热力学显微镜
STM	scanning tunneling microscope	扫描隧道显微镜
t	triplet	三重峰
T	thymine	胸腺嘧啶

TATU	O-(7-Azabenzotriazole-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium tetrafluoroborate	
TBTU	O-(benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetra methyluronium tetrafluoroborate	
Tfa	trifluoroacetyl	三氟乙酰基
TFA	trifluoroacetic acid	三氟乙酸
THF	tetrahydrofuran	四氢呋喃
Tm	thermal melting temperature	解链温度
TMAC	tetramethylammonium chloride	四甲基氯化铵
Tos	4-toluenesulfonyl	对甲苯磺酰基
TOTU	O-[(cyano(ethoxycarbonyl)methylene)amino]-1,1,3,3-Umnethyluronium tetrafluoroborate	
Trt	triphenylmethyl	三苯甲基
s	singlet	单重峰
UV	ultra violet	紫外光
W	warburg impedance	Warburg阻抗
ΨC	pseudo cytosine	伪胞嘧啶
δ	chemical shift in ppm	化学位移

中文摘要

自 1991 年 Nielsen 等人首次设计并合成了核酸类似物肽核酸 (PNA), 由于其具有优异的杂交特性, 近十年被广泛用于生物芯片, 基因药物, 分子生物学工具等领域的研究。为了拓展 PNA 的应用, 有关 PNA 的新合成方法及 PNA 的分子修饰的研究仍在不断继续。到目前为止, PNA 单体的价格仍十分昂贵, 限制了其广泛引用。为此, 本论文讨论了 PNA 单体的合成方法, 并合成了电活性和光活性基团修饰的 PNA 单体; 在讨论了 PNA 寡聚体合成的基础上, 成功地合成了电活性基团二茂铁标记的 PNA 寡聚体以及包含偶苯基团的 PNA 寡聚体, 研究了它们与 DNA 的杂交性质。论文主要的研究内容如下:

1. 通过比较多种合成路线实现了高效经济的 PNA 单体的合成, 然后通过固相合成法合成了各种 PNA 寡聚体, 包括电活性基团二茂铁标记的 PNA 寡聚体。将 DNA 靶分子组装在金电极表面, 然后用二茂铁标记的 PNA 作为信号探针, 通过电化学的方法成功的检测了 PNA 与 DNA 的杂交。
2. 为了研究外界光调节 PNA 与 DNA 的杂交性质, 合成了一类具有偶氮官能团的 PNA 单体。通过研究它们在光照下的紫外可见光谱的变化, 发现它们具有可逆的光致异构特性。同时蔡基偶氮苯单体还表现了可逆的的荧光光谱变化, 这将为它们新的应用奠定基础。
3. 通过修改 PNA 固相合成步骤, 成功地把偶氮类 PNA 单体插入到 PNA 序列中。通过紫外可见光谱研究了 N-PNA 单链和 N-PNA/DNA 双链中偶氮苯基团的顺反异构性质, 可以发现偶氮苯基团无论在 N-PNA 单链中还是在 N-PNA/DNA 双链中都可以经历顺反异构, 并且表现出了不同的顺反异构速率常数。
4. 通过电化学和 AFM 方法对 N-PNA 与 DNA 的杂交进行了研究。电化学研究发现, 在 N-PNA/DNA 双螺旋中偶氮基团的顺反异构能够调节电子的传输。

AFM 研究发现, 当组装在单晶硅表面的 N-PNA 在紫外光照射前后与金纳米颗粒标记的 DNA 杂交作比较时, 表面的金纳米颗粒数随着偶氮基团在 PNA 中的位置不同而发生变化。当偶氮苯单元在 PNA 两端时, 光照后的 N-PNA 与金颗粒标记 DNA 杂交, 这时颗粒数下降, 然而偶氮苯单元在 N-PNA 中间时变化不明显。

关键词: 肽核酸; 合成; 偶氮苯; 电化学; 顺反异构; 原子力显微镜

4. The hybridization between N-PNA and DNA was studied by AFM and electrochemical methods. The photoisomerization of azobenzene in N-PNA/DNA double helix could regulate the transport of electron. The effect of hybridization between N-PNA and DNA can also be observed from AFM imaging. These results indicate that the position of azobenzene in N-PNA does not influence the hybridization but the trans-cis isomerization of azobenzene unit can influence hybridization.

Key words: peptide nucleic acid; synthesis; azobenzene; electrochemistry; trans-cis isomerization; AFM

Abstract

During the latest decade a number of different nucleic acid analogs have been synthesized. An example of this is peptide nucleic acid (PNA), a DNA mimic with a noncyclic peptide-like backbone, which was first synthesized by Nielsen *et al.* in 1991. Because PNA displays very good hybridization properties, it have been widely used in many areas of chemistry, biology, and medicine including drug discovery, genetic diagnostics, molecular recognition and biochip. During the latest decade research, novel applications of this versatile PNA are still emerging. However, up to date, the price of PNA monomer is still very expensive which has inhibited its widespread application. In this thesis, the synthetic methods of the PNA monomers were discussed. The PNA monomers modified by electroactive and photoactive groups were synthesized. The ferrocene labeled PNA oligomers and PNA containing azobenzene unit were synthesized and their hybridization with DNA were studied. The main contents of this thesis are listed in the following:

1. PNA monomers were synthesized, then PNA oligomers were successfully prepared by solid phase synthesis. The electrochemical detection of hybridization was completed by using ferrocene labeled PNA as signaling probes.
2. In order to regulate the hybridization between PNA and DNA through the outside stimulation, PNA monomers containing azo group were synthesized first. The new PNA monomers showed reversible photoisomerization with UV and visible light irradiation, and the fluorescence of phenylazonaphthalene PNA monomers might make them especially useful as structural probes.
3. The azo PNA monomers were incorporated into PNA oligomers by a typical ^tBoc method. The azobenzene of N-PNA single strand and N-PNA/DNA double strand showed reversible photoisomerization with UV and visible light irradiation. The hybridization of N-PNA with complementary DNA resulted in a considerable decrease of the photoisomerization rate constant of the azobenzene.

第一章 绪论

1.1 引言

1953 年 Watson 和 Crick 提出了脱氧核糖核酸(DNA)的双螺旋结构模型,并阐明了 DNA 是遗传信息的携带者,开辟了现代分子生物学的新纪元。在 Watson 和 Crick 工作基础上,生物学家提出了分子生物学中心法则,简单的说就是指遗传信息从 DNA 传递给 RNA,再从 RNA 传递给蛋白质的转录和翻译的过程,以及遗传信息从 DNA 传递给 DNA 的复制过程,可以用图 1-1 说明^[1-3]。

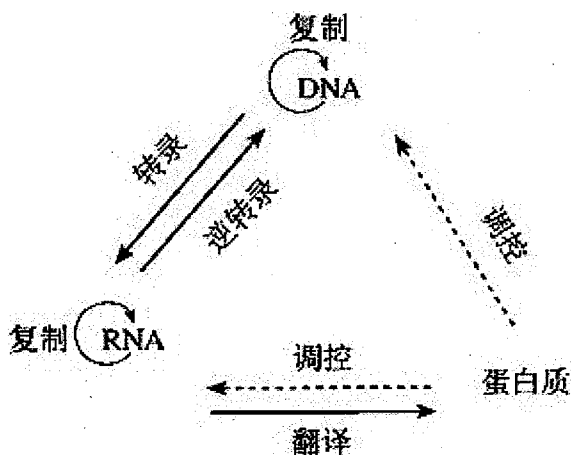


图 1-1 生物学中心法则

Figure1-1 The central dogma of biology

DNA 分子一般与互补序列的 DNA 以双螺旋形式存在,这种序列识别是通过碱基之间氢键相互作用的配对原则(图 1-2)。这种配对原则是十分简单的:胸腺嘧啶(T)与腺嘌呤(A)配对,胞嘧啶(C)与鸟嘌呤(G)配对。

这种碱基配对的分子识别事件是自然界中最为重要的,因为他们携带着基因遗传信息;这些基因遗传信息正常的表达是符合中心法则,见图 1-3 a。在基因表达水平上通过反义、抗基因策略治疗疾病已经吸引了药物化学家的广泛注意,见图 1-3 b, c^[4-7]。我们去干涉这种基因表达,可以通过寡聚核苷酸绑定到 DNA 或 RNA 上,然而这种绑定仍然主要是通过标准的碱基配对原则。天然的核苷酸已经显示了反义、抗基因的特征,然而 DNA 和 RNA 会被核酸酶酶解,因此限制了它们的应用。

在过去多年中,人们合成了大量的核苷酸衍生物,它们大多是对磷酸基团、核糖和碱基的修饰,例如图 1-4 所示^[8-12]。

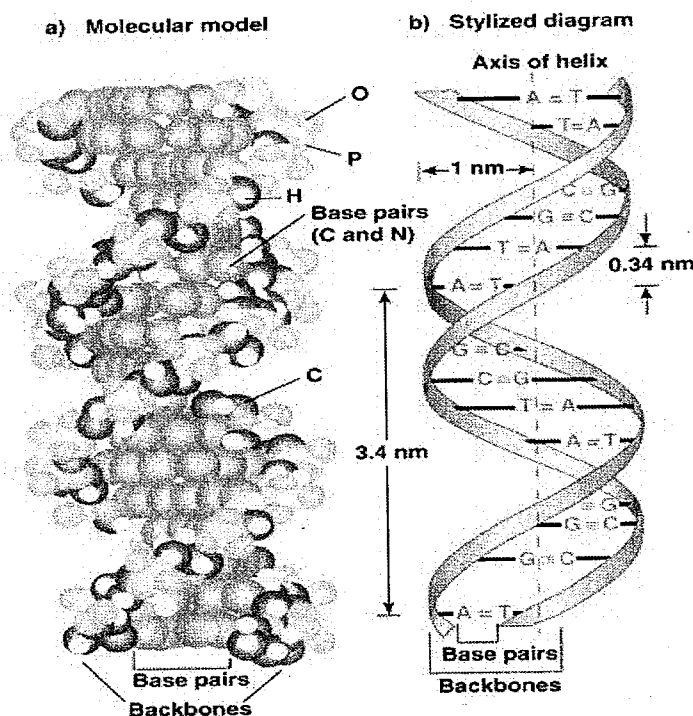


图 1-2 DNA 双螺旋结构

Figure 1-2 The structure of DNA double helix

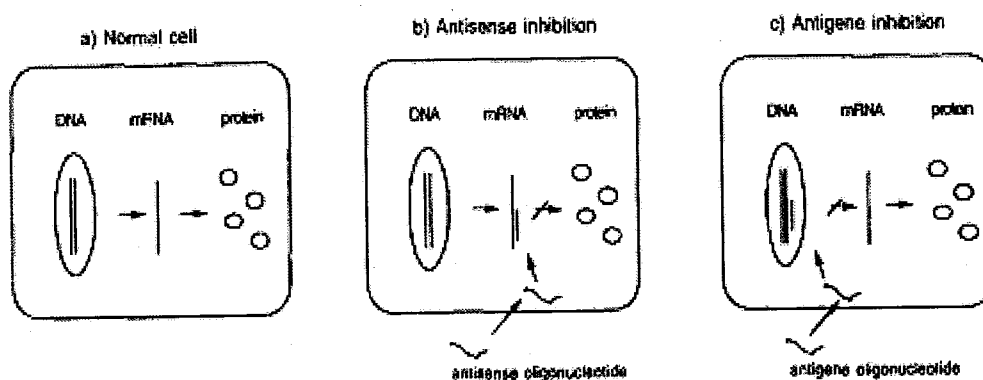


图 1-3 示意图 (a)正常基因表达, DNA 被转录到 mRNA, 然后被翻译成多肽产物; (b)反义抑制, 反义核苷酸通过 Watson-Crick 氢键绑定到 mRNA 上, 这样就抑制了 mRNA 翻译成多肽; (c)抗基因抑制, 通过抗基因寡聚核苷酸绑定到 DNA 上抑制转录, 这种绑定或许是通过三螺旋的形成或者链取代。[25]

Figure 1-3 Schematic illustration of (a) Normal gene expression. DNA is transcribed into mRNA followed by translation to give multiple copies of the protein gene product; (b) Antisense inhibition. An antisense oligonucleotide binds specifically to mRNA via Watson-Crick hydrogen bonding whereby it inhibits translation of mRNA into protein; (c) Antisense inhibition. Transcription is inhibited by the binding of an antisense oligonucleotide to DNA. The binding may be mediated through triplex formation or strand displacement.

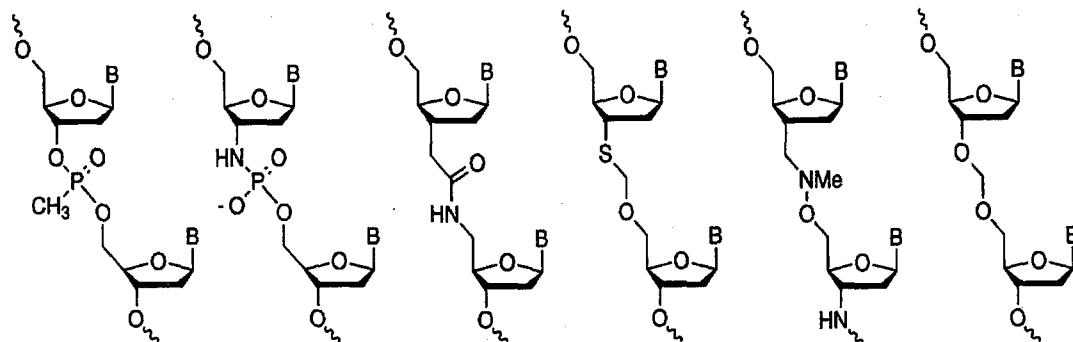


图 1-4 修饰的寡聚核苷酸

Figure 1-4 Examples of modified oligonucleotides

化学修饰大多仅提高了它们的生物稳定性,但是保持它们对 DNA 和 RNA 的亲合力和特异性也同样重要。这些类似物仅对天然核苷酸的结构做了少量的变化,有很少的努力在对 DNA 的骨架进行大的改动后而获得成功。然而, Nielsen 等人通过计算机模拟设计了一种全新的 DNA 类似物 Peptide Nucleic Acid (PNA),并在 1991 年成功的合成了 PNA,验证了与 DNA 的杂交亲和力^[13]。通过对 PNA 的进一步研究发现它比其它 DNA 类似物具有更好的特性,有望成为第三代反义、抗基因试剂,从而引起了化学家、药物学家以及生物学家的广泛关注^[14-17]。

1.2 PNA 的结构和性质

1.2.1 PNA 的结构

PNA 是 DNA 的类似物,最初设计是为了作为配体识别 DNA 双螺旋结构,通过 Hoogsteen 碱基配对绑定到 DNA 双螺旋的大沟槽中,其骨架结构单元为(2-氨基乙基)甘氨酸,碱基部分通过亚甲基连接在骨架的氨基 N 上,见图 1-5 所示^[13,18]。

我们通过比较 PNA 和 DNA 结构可以发现它们有相似的框架结构。在 DNA 中每个重复的骨架结构单元是六个化学键,而碱基到骨架的距离是三个化学键,在 PNA 中同样也有这个规律,这就是“6+3”规则。通过实验已经证明各种修改过的 PNA 类似物,当打破这个规则后他们的杂交亲和力一般会降低^[19-22]。

1.2.2 PNA 的物理化学性质

由于在 PNA 中, DNA 的磷酸酯骨架已经被中性的(2-氨基乙基)甘氨酸所取代,所以 PNA 是非离子性、不带电荷的,因此在与 DNA 或 RNA 杂交时就减少了链间的静电斥力, PNA 与 DNA 或 RNA 的杂交亲和力增强^[23,24]。PNA 的电中性导致了

水溶性较差（与 DNA 相比），也导致了不同程度的聚集，而这种聚集度和溶解度与 PNA 的长度以及嘌呤/嘧啶的比例有关^[25]。

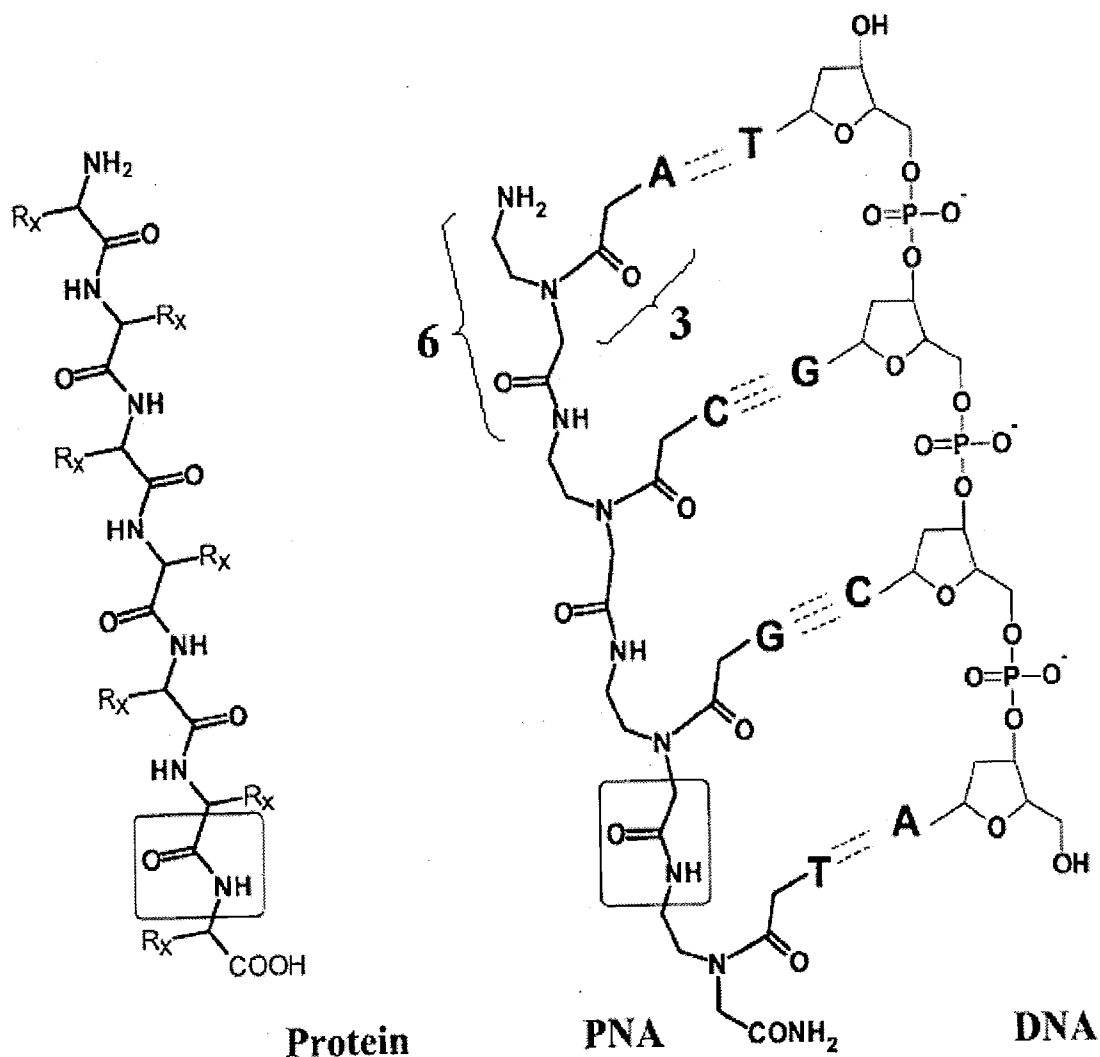


图 1-5 肽（Rx 是一种氨基酸的侧链），PNA 和 DNA 的化学结构。

肽和 PNA 的酰胺键被显示在框中。

Figure 1-5 Chemical structures of a protein (peptide) (where Rx is an amino acid side chain), a PNA and a DNA molecule. The amide (peptide) bond characteristic for both PNA and protein is boxed in.

由于 PNA 与 DNA 除了碱基外，没有共同的功能团，所以 PNA 的化学稳定性、生物稳定性与 DNA 存在明显的差异。DNA 在强酸作用下可引起脱嘌呤，而 PNA 却相当稳定，但是在碱性环境中 PNA 氨基端露出自由氨基具有不稳定性^[26]。由于 PNA 不是酶的底物，所以 PNA 不易酶切，也不易水解，从而使其能作为有效的反义、抗基因试剂^[27-29]。

1.3 PNA的合成和修饰

1.3.1 PNA合成

PNA不存在手性中心,是非手性分子,所以不必经过立体选择性的途径就可以被合成。PNA寡聚物可按照标准的肽固相合成方案进行合成^[30, 31],如可采用二苯甲基胺聚苯乙烯树脂作为固相载体,当然也可采用其它功能化树脂作固相载体,例如PEG树脂;为了直接作生物传感器,也可以直接在单晶硅表面合成PNA寡聚物^[32]。L. Kim, Dueholm, M. Egholm等人首次合成包含四种不同碱基的PNA寡聚物时,采用的保护策略是:Boc保护骨架的伯氨基团,而Cbz用于保护碱基环外氨基基团^[33]。由于脱Boc基团需要酸性环境,如果要在自动合成仪上进行合成,酸性环境是非常不利的,会对仪器有一定的腐蚀作用,因此人们又采用了Fmoc保护骨架的伯氨基团,然后用哌啶脱除,这种策略比较适合自动合成^[34]。最初在用Fmoc策略合成PNA时,碱基环外氨基基团用Cbz来保护,但是用Cbz保护的单体溶解度并不好,经过广泛的筛选,发现Bhoc可作为最好的候选者,因为它可以在0.2mol/l NMP中保存数周。因此,经过十几年的研究^[35-37],合成PNA基本上形成了Boc和Fmoc两种最为基本和常用的策略,而且两种方法的细节也非常成熟,包括合成所用的树脂、溶剂、偶联试剂、脱保护试剂、解离试剂等都是相似的^[38-42]。

1.3.2 PNA的修饰

由于PNA优异的性质,引起了人们的研究热潮,随着研究的深入,人们通过修饰PNA使其获得了更好的特性。例如为了提高PNA的溶解度在PNA的羧基端或骨架上修饰上带正电荷的赖氨酸,也可以修饰上带负电的羧酸等^[43, 44];为了使PNA具有新的功能,给PNA修饰标记上荧光分子,电化学活性分子等^[45-52]。用于反义或抗基因的PNA寡聚物一般大小为12~18聚体,它们一般不能被原核或真核细胞所摄取,因此,设计PNA导入系统是十分必要的。人们合成了细胞穿透肽与PNA的共轭物来克服这种问题,例如穿透肽、转运肽、Tat肽以及核定位肽等^[53-57]。除了共轭修饰上肽之外当然也可以修饰上一个亲酯性的脂肪酸尾巴,同样也可以将PNA导入细胞^[58]。虽然纯的PNA具有显著的结合特性,但是它却与DNA或RNA有截然不同的性质,例如在与核酸修饰酶作用时不能作为底物被识别,这就限制了PNA的某些应用,如不能作为DNA聚合酶、DNA激酶、DNA连接酶的底物,因

此人们为了改善此种缺点, 合成了 PNA/DNA 嵌合体, 它明显的改善了溶解度, 而且具有了生物活性。它们的嵌合形式是多种多样的, 例如图 1-6 所示几种^[59-63]。

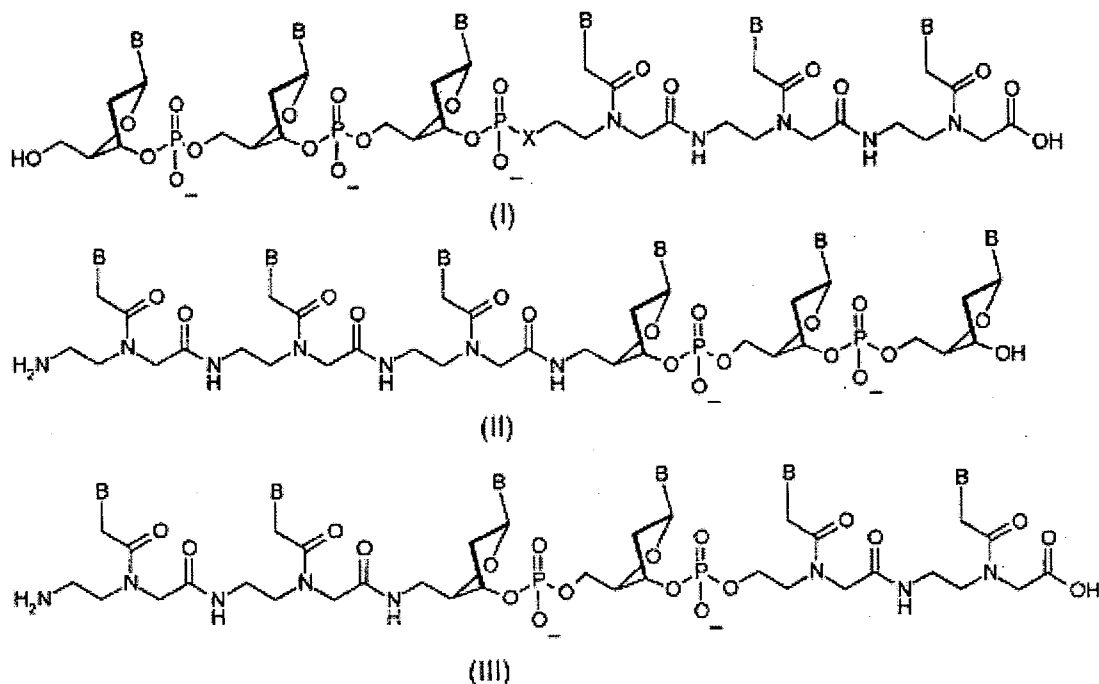


图 1-6 PNA/DNA 嵌合体: (I) 5'-DNA-(linker)-PNA-(pseudo-3'), X=NH or O; (II) (pseudo-5')-PNA-(linker)-DNA-3'; (III) (pseudo-5')-PNA-(linker)-DNA-(linker)-PNA-(pseudo-3').
Figure 1-6. PNA/DNA chimeras: (I) 5'-DNA-(linker)-PNA-(pseudo-3'), X.NH or O; (II) (pseudo-5')-PNA-(linker)-DNA-3'; (III) (pseudo-5')-PNA-(linker)-DNA-(linker)-PNA-(pseudo-3').

1.4 PNA 的杂交

1.4.1 稳定双螺旋的因素

无论是 PNA 与 DNA 或 RNA 杂交还是 DNA 与 DNA 杂交, 既然它们能够形成双螺旋结构, 必然有稳定它们的因素。

第一是氢键, 氢键被认为是酸性质子与电子供体之间的静电引力。双螺旋碱基之间的识别正是通过氢键的形成来完成的, 它们的稳定性也随着 GC 碱基对的数目增加而增加, 因为 GC 碱基对之间有三个氢键, 而 TA 之间仅有两个。见图 1-7 所示。

第二是碱基堆积, 碱基堆积被认为对双螺旋的稳定性起到了重要的作用, 但是它的实质还不是十分清楚。各种不同理论被提出来, 用来说明这种作用, 包括静电作用力, 范德华力, 偶极-偶极相互作用力, 疏水作用力等, 然而没有一个让人十分满意的解释。近来的工作显示表面 π 电子的交叠是一种重要的作用对碱基堆积^[64]。

因此人们尝试了用多环芳烃取代碱基，同样存在 π 电子的交叠，而且并未发现双螺旋的稳定性明显下降^[65-68]。Makoto Komiyama 等同样用平面的偶氮苯分子取代碱基，它们并没有显著的影响杂交，并且还有部分包含偶氮苯的 DNA 能增加杂交亲和力，同时还能通过顺反异构调节 DNA 之间的杂交^[69-74]。从中受到启发，我们也成功的合成了包含偶氮苯的 PNA。

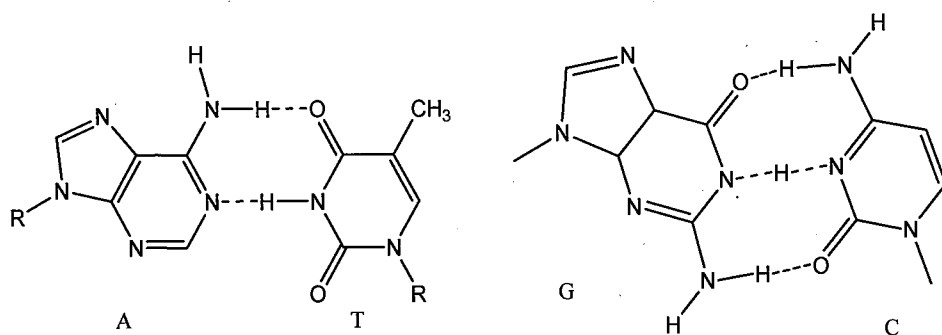


图 1-7 Watson-Crick 氢键

Figure 1-7 Watson-Crick hydrogen bonds

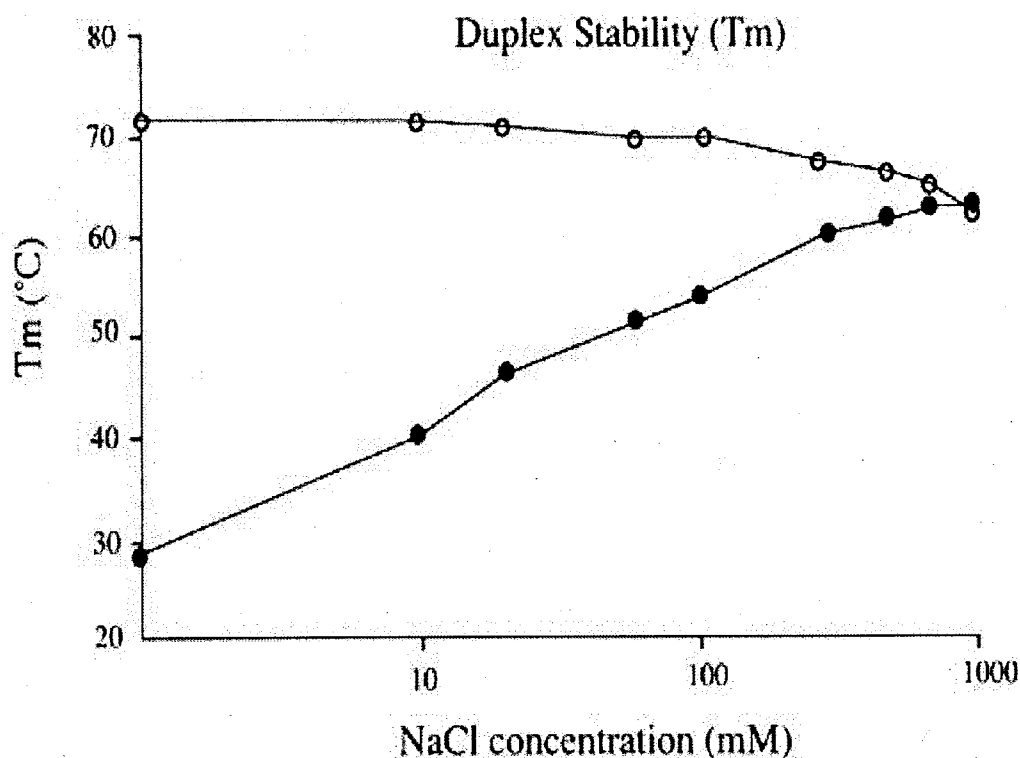


图 1-8 离子强度对PNA/DNA(空心点)和DNA/ DNA双螺旋(实心点)的热力学稳定性的影响 (T_m)。

Figure 1-8 Ionic strength dependence of thermal stability (T_m) of PNA/DNA (open symbols) and DNA/ DNA duplex (closed symbols)

第三是静电作用力, DNA 或 RNA 的戊糖磷酸骨架带有负电荷, 因此当它们形成双螺旋时存在着静电斥力, 降低了双螺旋的稳定性, 但是可以控制离子强度来降低这种静电斥力。然而 PNA 的骨架却是电中性的, 因此 PNA 和 DNA 或 RNA 杂交时不存在静电斥力, 从而亲和力增强, 而且不受离子强度的影响^[75]。见图 1.8 所示, 离子强度对 T_m 的影响。

1.4.2 PNA 的杂交

PNA 最初的设计是作为 DNA 双螺旋的大沟槽绑定配体, 但随着研究发现 PNA 可以以多种方式与 DNA 和 RNA 杂交。例如图 1-9 所示, 显示了 PNA 与 DNA 和 RNA 的相互作用形式。

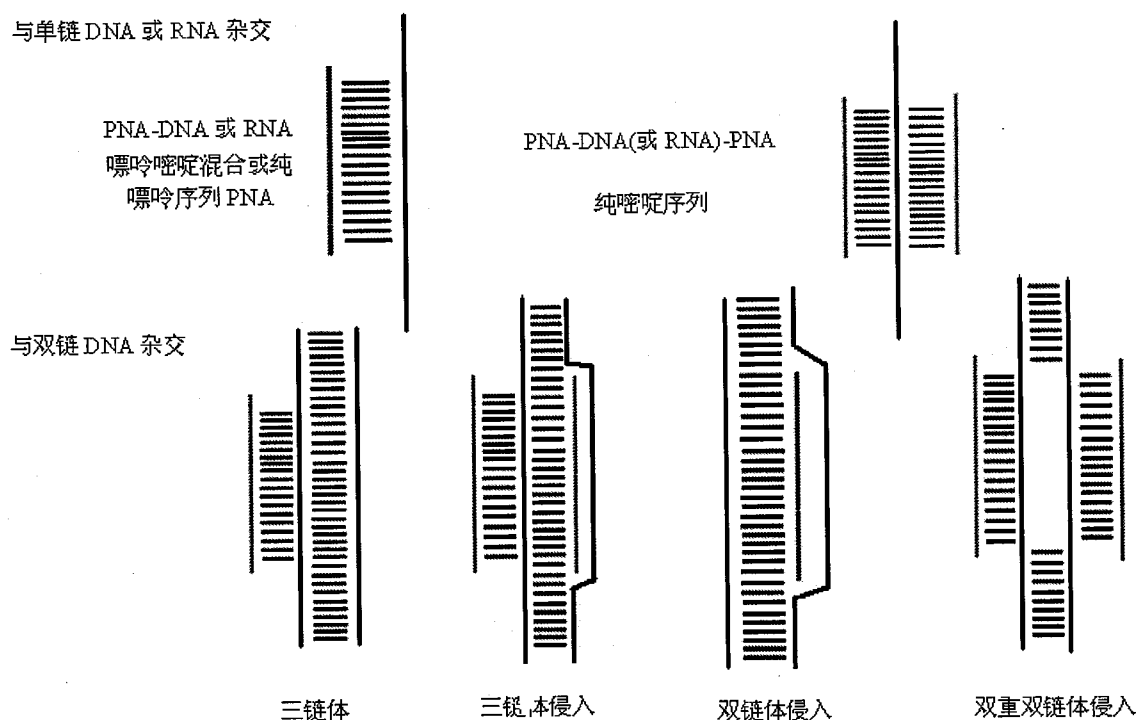


图 1-9 PNA 靶向作用于与 DNA 或 RNA (红线代表 PNA, 黑线代表 DNA)

Figure 1-9 PNA binding modes for targeting DNA or RNA.

我们可以看到 PNA 以一种序列依赖的方式与互补的 DNA 或 RNA 序列杂交, 遵从 Waston-Crick 氢键结合原则, 也可形成既包含 Waston-Crick 氢键又包含 Hoogsteen 碱基配对的三链体结构^[76-80]。两种氢键的结构见图 1-10 所示。可以发现 Hoogsteen 链中的胞嘧啶改为伪胞嘧啶(ΨC , 见图 1-10), 可以消除 DNA·PNA-DNA 三链体对 pH 的依赖性, 而不影响三链体的稳定性^[81]。在这么多的杂交方式中, 其中一条全嘌呤的 DNA 或 RNA 链与两条序列互补的 PNA 链间形成的三链体是特别

稳定的, 因为当全嘧啶的 PNA 寡聚体与互补的双链 DNA 靶标结合时, 不是形成常规的 PNA-DNA₂ 三链体, 而是形成一种三链体侵入复合物。

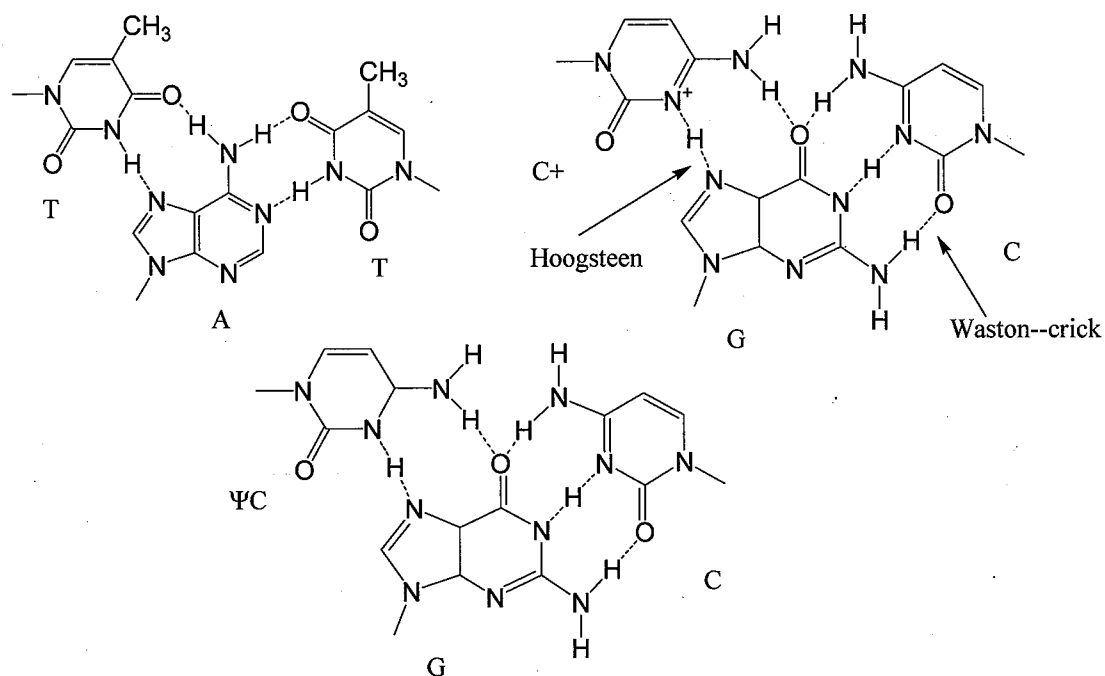


图 1-10 形成三螺旋时的氢键

Figure 1-10 The hydrogen bonds of triplex helix

通过 NMR 方法研究了 PNA/RNA^[82]和 PNA/DNA^[83]的结构, 然而 PNA₂-DNA 三螺旋^[84]和 PNA/PNA 双螺旋^[85]的结构是通过 X 射线晶体学的方法研究。它们的结构如图 1-11 所示^[86]。

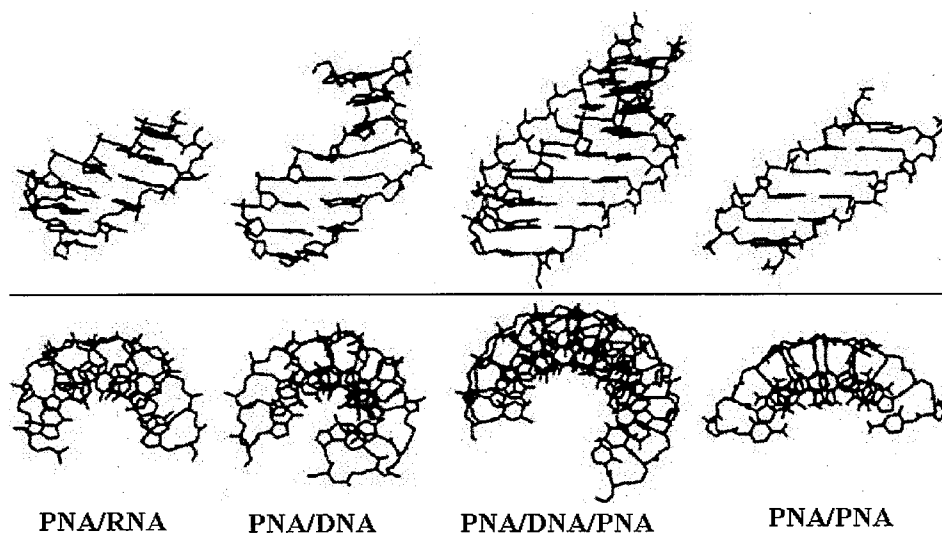


图 1-11 各种 PNA 复合物的结构

Figure 1-11 Structures of various PNA complexes

从图1-11中结构可以看出PNA寡聚体的结构会以不同程度的变化适应寡聚核苷酸，因为它的结构有一定的柔韧性；但是PNA也有自己比较倾向的结构“P-型螺旋结构”，从纯PNA/PNA双螺旋结构看，这是更加明显的，螺距为2.4nm，螺旋旋转一周是18个碱基对，而A-型螺旋结构或B-型螺旋结构，螺旋旋转一周为10-11个碱基对。

1.5 PNA 应用

PNA 对 DNA/RNA 的识别特性，以及非常好的化学和生物学稳定性，使 PNA 已经在基因治疗药物开发、基因诊断、生物传感器以及作为分子生物学和生物技术的分子工具等方面得到广泛应用。

1.5.1 反义应用

关于PNA对基因表达的反义下调作用已经进行了很多研究^[87-97]，大量的体外实验结果表明：在mRNA的翻译起始点（AUG）的周围或上游区域，是用PNA进行抑制的最敏感区域^[98-100]，除了用可形成三链体的PNA外，也还可以用与吗啉类似的寡聚物^[101, 102]，由于PNA-RNA双链体不是RNaseH的底物，所以PNA对翻译的反义抑制机理与寡聚核苷酸不同，它的反义作用是基于空间阻断RNA加工、细胞质转运或翻译^[103]。因此，在使用PNA的反义实验中，与用其它的DNA类似物一样，通过测试一系列的PNA对mRNA不同区域的靶向作用，来确定理想的靶标。

1.5.2 抗基因应用

由于PNA能与DNA形成稳定的三链体结构或链侵入或链替代的复合物，因此可以终止转录过程^[100, 104]。虽然PNA通过与DNA形成三链体或双重双链体，破坏了DNA的双螺旋结构，并阻断了蛋白对DNA的识别^[105-107]，但是PNA作为抗基因试剂还的一个主要障碍是，在生理盐浓度下，PNA的链侵入或形成复合物的速度是相当慢的^[108]。经过不断的研究发现，使用负超螺旋DNA可以使PNA的结合速度增加200倍^[109]；还有就是可以用带有正电荷的PNA以及偶联有阳离子肽的PNA，它们结合特性都可以得到改善^[110, 111]。

1.5.3 PNA作为诊断工具

PNA寡聚物的优良杂交性质以及独特的化学性质，已经应用于不同的基因诊断中。例如，PNA探针用于原位杂交可产生很高的信噪比，而且温和的洗涤步骤常可

以使样品的形态保持较好。PNA-FISH技术已经被用于端粒分析^[112-114]、染色体修饰^[115]、以及医学和环境样品中病毒和细菌的诊断^[116-123]。当然还有其他应用,例如可用于单点突变分析中的沉默PCR扩增^[124], PNA分子信标^[125, 126]和PNA发光探针,并用于实时定量PCR技术中^[127-129]。

1.5.4 PNA在生物芯片中的应用

生物芯片是近年来发展起来一种高通量、多作用靶点的DNA阵列分析技术,在基因的多态性检测和基因表达分析方面,有着相当的优点。

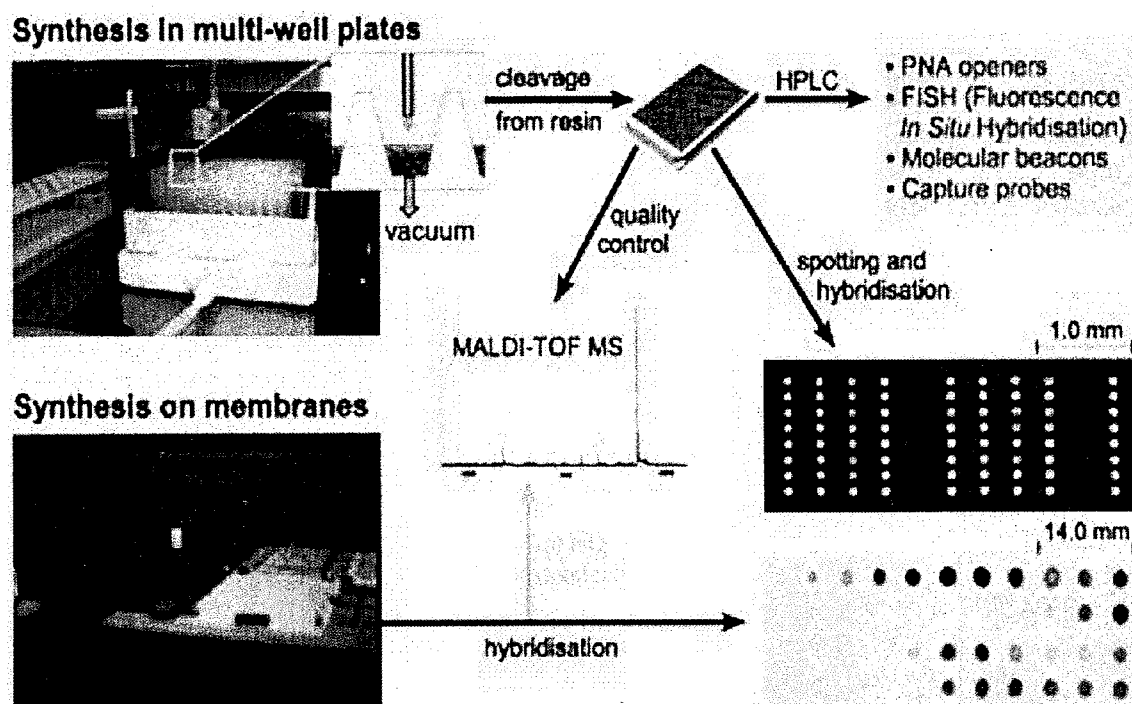


图1-12 制备PNA阵列的两种步骤;一种是SPOT方法,另一种是在阵列表面原位直接合成

Figure 1-12 Schematic representation of the two procedures established for the creation of PNA-arrays. PNA-synthesis occurs either in resin-filled micro-well plates or by in situ synthesis directly on the array surface.

功能化阵列系统的基本要求是,自某一温度,所有的不同探针可以与其靶序列进行高度特异性的杂交。虽然通过改变探针的位置和长度或者向杂交缓冲溶液中加入高摩尔浓度的TMAC, DNA探针可以满足上述要求;但是使用起来很复杂,有时一些不需要的副反应严重限制了探针与靶序列的接近,导致信号强度的损失。对于该问题的一个解决办法是设计与核酸探针的物理性质完全不同的探针,然而PNA正好可以满足这种要求。这样,用PNA代替DNA分子,制成的PNA阵列在与核酸靶标

形成双链时会具有很还好的选择性, 而且形成的双链体具有高度的稳定性。例如, R. Fank开发了SPOT方法可用来制备PNA寡聚物阵列^[32, 130, 131], 当然还可以在表面直接合成PNA阵列, 如图1-12所示。PNA阵列正在向微型化、高密度发展, 将会使PNA成为很重要的核酸分析工具, 可以生产出具有优越杂交特性的PNA芯片^[23]。

1.5.5 PNA在生物传感器中的应用

生物传感器是利用生物识别性质进行选择性的生物分析的装置。这样的装置包括耦合在内部的生物识别单元和物理转换器。目的是将生物识别过程转换成有用的信号, 且信号强度与靶标物的浓度成比例。由于将样品的处理和测量步骤结合在一起, 生物传感器可以不必进行样品的制备, 因此在现场分析方面具有很好的商业应用前景^[23]。然而, 核酸识别层的使用在生物传感器技术中是一种相对较新的且令人鼓舞的研究领域^[132-134]。

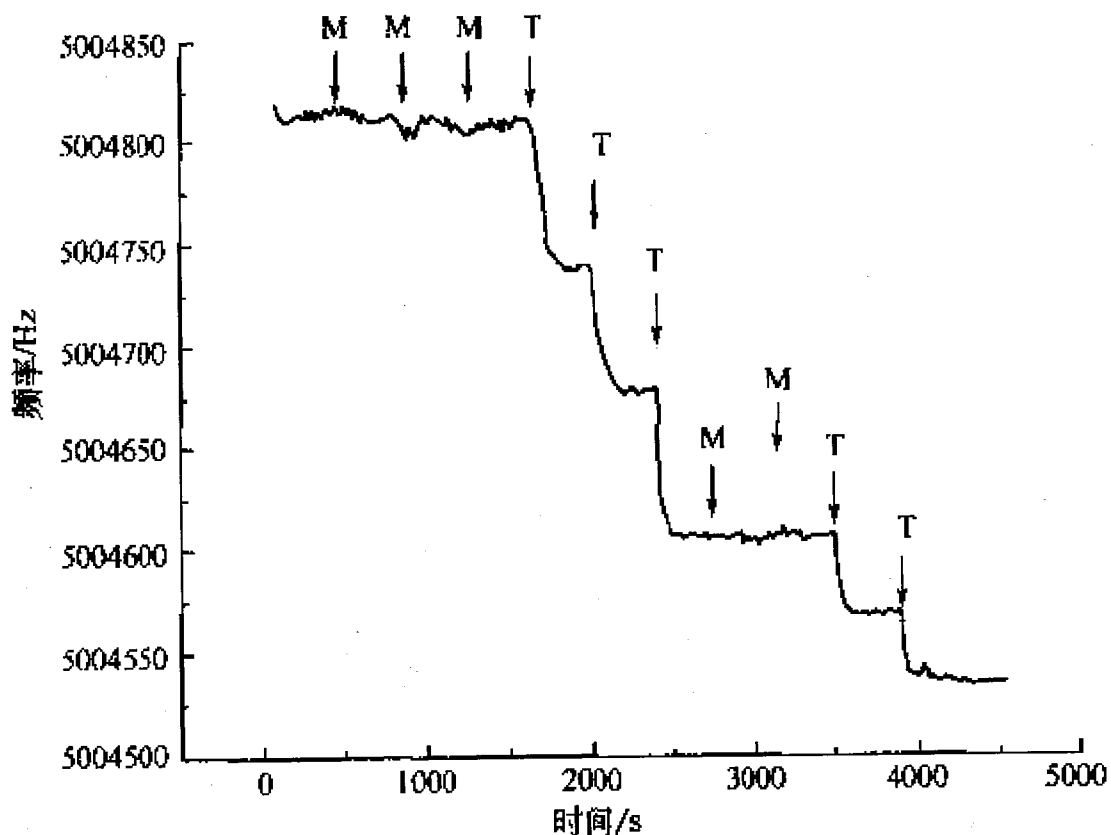


图1-13 PNA/QCM对加入的靶标(T)和错配(M)的寡核苷酸的频率-时间响应^[136]。

Figure 1-13 Frequency-time response of a PNA/QCM to additions of the target(T) and mismatch(M) oligonucleotides. The hybridization event results in decreased frequency, reflecting the increased mass of the crystal.

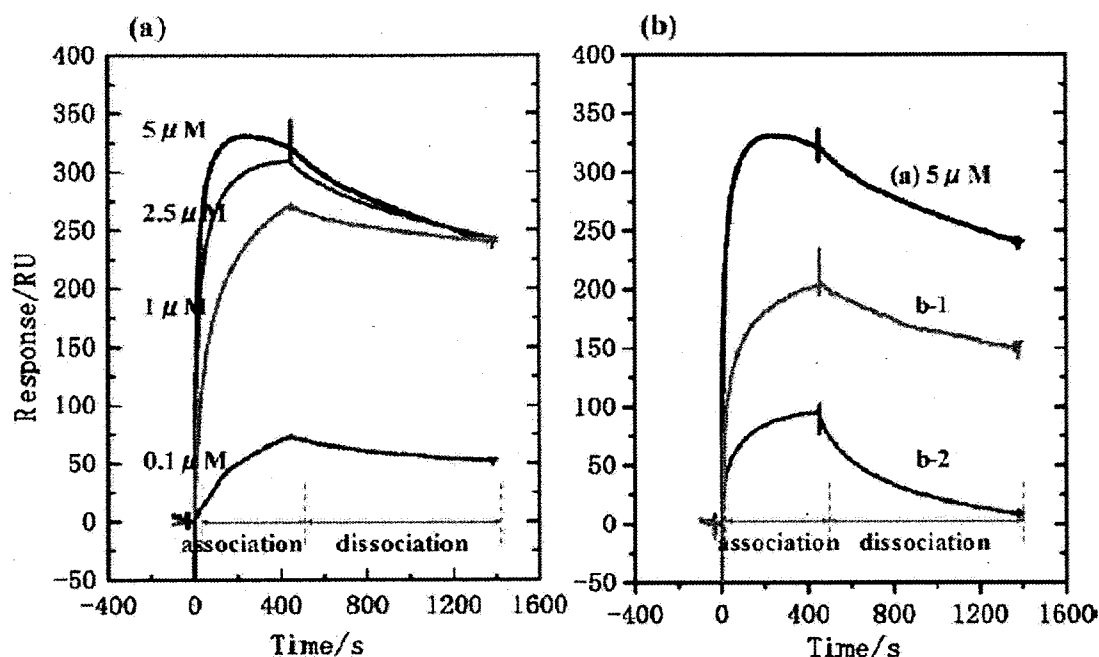


图 1-14 PNA与DNA杂交的SPR响应.

Figure 1-14 SPR responses for PNA-DNA hybridization. (a) CYP2C9*2 was used as a probe PNA, and the target DNA was complementary to CYP2C9*2 (target DNA 2). The target DNA concentrations were (from top to bottom) 5.0, 2.5, 1.0, and 0.1 μM . (b-1) The top sensorgram shows CYP2C9*2 with a target DNA containing a single base mismatch (5.0 μM). (b-2) The bottom sensorgram shows immobilized PNA with a single base mismatch (CYP2C9*1) with the CYP2C9*2 complimentary target DNA (5.0 μM).[138]

PNA的引入为DNA生物传感器的发展提供了令人鼓舞的机遇。表面固定有PNA识别层可明显的改善DNA生物传感器的序列识别特异性,极大的改善了十分相近序列间的分辨率,这一点在PNA/DNA杂交过程的电化学转换^[135]以及其它类型的生物传感器中都可发现^[136, 137]。现在常用的PNA生物传感器的信号转换方式主要有三种:电化学、QCM、SPR。Wang等人对电化学和QCM为信号转换方式的PNA生物传感器作了大量的工作。例如图1-13显示了通过QCM实时监测PNA-DNA杂交过程^[136];图1-14显示了Takeshi Uno等人对PNA-DNA杂交的SPR研究^[138]。

1.5.6 PNA的其它应用

PNA具有独特的杂交性质,所以还有其它多方面的应用。例如用于目标核酸的纯化^[139];PNA结合甲基化酶以及其它的限制性内切酶,可作为稀有的基因组切割剂,这种方法被称作PNA辅助的稀有切割技术^[140];测定端粒的大小^[112];抗病毒应用^[141]等等,由于PNA涉及的专业面太广,不可能一一详细阐述。

1.6 选题依据与研究思路

PNA 与 DNA 相比具有优良的特性,例如亲和力高、特异性高、不易酶切和水解等,所以 PNA 已经被广泛合成及修饰,并且在有机化学、分子生物学、医学等方面引起了人们的极大兴趣。但是在 PNA 的电化学标记和电化学检测核酸方面还没有广泛探讨,其次,利用光照来调节 PNA 与 DNA 杂交的工作还未见报道。基于选题依据,本论文的研究内容主要包括以下几部分内容:

1. 合成了 PNA 单体,并用二茂铁偶氮苯修饰了 PNA 单体,并充分研究它们的电化学性质和光化学性质。
2. 合成了 PNA 寡聚体和二茂铁标记的 PNA 寡聚体,并且成功的把新合成的偶氮苯 PNA 单体插入到 PNA 寡聚体中。
3. 通过电化学方法研究了二茂铁标记的 PNA 与 DNA 的杂交,并且通过紫外可见吸收光谱、电化学方法、AFM 方法研究了用紫外光来调节 N-PNA 与 DNA 的杂交。

参考文献

1. G. Karp, Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments, 2nd Ed., Karp, G., Ed., John Wiley and Sons, Inc., New York, NY, 1999.
2. B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J. D. Watson, Molecular Biology of the Cell, 3rd Ed., Garland Publishing, Inc., New York, NY, 1994.
3. L. Stryer, Biochemistry, 3rd Ed., W. H. Freeman and Company, New York, NY, 1988.
4. E. Uhlmann, A. Peyman, Antisense oligonucleotides: a new therapeutic principle. *Chem. Rev.* 1990, 90: 543-584.
5. C. Hélène, The anti-gene strategy: control of gene expression by triplex-forming oligonucleotides. *Anti-Cancer Drug Design* 1991, 6: 569-584.
6. S. T. Crooke, Oligonucleotide therapy. *Curr. Opin. in Biotechnol.* 1992, 3: 656-661.
7. S. T. Crooke, C. F. Bennett, Progress in antisense oligonucleotide therapeutic. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1996, 36: 107-129.

8. E. Uhlmann, A. Peyman, D. W. Will, *Encyclopedia of Cancer*, Vol. 1 (Ed.: J. R. Bertino), Academic Press, San Diego, CA, 1997, pp. 64-81.
9. P. O. P., Tso, P. S. Miller, L. A. Aurelian, Murakami, C. Agris, K. R. Blake, S.-B. Lin, B. L. Lee, C. C. Smith, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1988, 507, 220
10. S. Gryaznov, J.-K. Chen, Oligodeoxyribonucleotide N3'.fwdarw.P5' Phosphoramidates: synthesis and Hybridization Properties. *J. Am. Chem. Soc.* 1994, 116: 3143-3144.
11. A. D. Mesmaeker, A. Waldner, J. Lebreton, P. Hoffmann, V. Fritsch, R. M. Wolf, S. M. Freier, Amides as a New Type of Backbone Modification in Oligonucleotides. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 1994, 33: 226-229.
12. R. J. Jones, K.-Y. Lin, J. F. Milligan, S. W. Matteucci, Synthesis and binding properties of pyrimidine oligodeoxynucleoside analogs containing neutral phosphodiester replacements: the formacetal and 3'-thioformacetal internucleoside linkages. *J. Org. Chem.* 1993, 58: 2983.
13. P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science* 1991, 254:1497- 1500.
14. M. Egholm, P. E. Nielsen, O. Buchardt, R. H. Berg, Recognition of guanine and adenine in DNA by cytosine and thymine containing peptide nucleic acids (PNA) . *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114: 9677-9678.
15. M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, R. H. Berg, Peptide nucleic acids (PNA). Oligonucleotide analogs with an achiral peptide backbone. *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114: 1895-1897.
16. M. Egholm, C. Behrens, L. Christensen, R. H. Berg, P. E. Nielsen, O. uchardt, Peptide nucleic acids containing adenine or guanine recognize thymine and cytosine in complementary DNA sequences. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1993, 9: 800-801.
17. M. Egholm, O. Buchardt, L. Christensen, C. Behrens, S. M. Freier, D. A. Driver, R. H. Berg, S. K. Kim, B. Norden, P. E. Nielsen, PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules. *Nature* 1993, 365: 566-568.
18. P. E. Nielsen, M. Egholm. R. H. Berg, O. Buchardt, Peptide nucleic acids (PNA). DNA analogues with a polyamide backbone. In "Antisense Research and Application" Crook, S., and Lebleu, B. (eds.) CRC Press, Boca Raton, 1993. pp. 363-373.
19. P. E. Nielsen, G. Haaima, Peptide nucleic acid (PNA). A DNA mimic with a pseudopeptide backbone, *Chem. Soc. Rev.*, 1997, 26: 73-78.
20. A. Ray, B. Norden, Peptide nucleic acid (PNA): its medical and biotechnical applications and promise for the future. *FASEB J.* 2000 14:1041-1060.
21. K. L. Dueholm, P. E. Nielsen, Chemistry, properties and applications of PNA (peptide nucleic acid). *New J. Chem.* 1997, 21: 19-31.
22. T. Joseph, synthetic studies on Peptide Nucleic Acids 1) Toward a circular bis-peptide nucleic acid 2) sequence and linker effects in bis-PNA hybridization to DNA. 2004, Ph. D. Thesis.

- 23 何为 马立人主编, 肽核酸, 化学工业出版社, 2003.
- 24 P. E. Nielsen, Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications 1st Ed. 1999.
- 25 B. Hyrup, P. E. Nielsen, Peptide nucleic acids (PNA): Synthesis, properties and potential applications *Bioorg. Med. Chem.* 1996, 4: 5-23.
- 26 M. Eriksson, L. Christensen, J. Schmidt, Sequence dependent N-terminal rearrangement and degradation of peptide nucleic acid (PNA) in aqueous solution. *New J.Chem.* 1998, 22: 1055-1059.
- 27 G. Aldrian-Herrada, M. G. Desarmenien, H. Orcel, A peptide nucleic acid (PNA) is more rapidly internalized in cultured neurons when coupled to a retro-inverso delivery peptide. The antisense activity depresses the target mRNA and protein in magnocellular oxytocin neurons *Nucleic Acids Res.* 1998, 26: 4910-4916
- 28 A. F. Faruqi, M. Egholm, P. M. Glazer. Peptide nucleic acid-targeted mutagenesis of a chromosomal gene in mouse cells. *PNAS* 1998, 95: 1398-1403.
- 29 L. Mologni, E. Marchesi, P. E. Nielsen, Inhibition of promyelocytic leukemia (PML)/retinoic acid receptor- α and PML expression in acute promyelocytic leukemia cells by anti-PML peptide nucleic acid *Cancer Res.* 2001, 61: 5468-5473.
- 30 R. B. Merrifield Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* 1963, 85: 2149-2154.
- 31 R. B. Merrifield, Solid-Phase Synthesis. *Science*, 1986, 232: 341-347.
- 32 J. Weiler, H. Gausepohl, N. Hauser, O. N. Jensen, J. D Hoheisel. Hybridisation based DNA screening on peptide nucleic acid (PNA) oligomer arrays. *Nucleic Acids Res.* 1997, 25: 2792-2799.
- 33 L. Kim, Dueholm, M. Egholm, C. Behrens, L.Christensen, F. Henrik, Hansen, Tore Vulpius, H. Kenneth, Petersen, R. H. Berg, P. E. Nielsen, Ole Buchardt. Synthesis of Peptide Nucleic Acid Monomers Containing the Four Natural Nucleobases: Thymine, Cytosine, Adenine, and Guanine and Their Oligomerization. *J. Org. Chem.* 1994, 59: 5767-5773.
- 34 S. A. Thomson, J. A. Josey, R. Cadilla, M.D. Gaul, C. F. Hassman, M. J. Luzzio, A. J. Pipe, K. L. Reed, D. J. Ricca, R. W. Wiethe, S. A.Noble, Fmoc Mediated Synthesis of Peptide Nucleic Acids. *Tetrahedron* 1995, 51: 6179.-6194.
- 35 L. Christensen, R. Fitzpatrick, B. Gildea, Solid-phase synthesis of peptide nucleic acids. *J. Pept. Sci.* 1995, 1: 175-183.
- 36 J. Christopher, Vearing1 & John V. Fecondo. A rapid coupling protocol for the synthesis of peptide nucleic acids *Letters in Peptide Science*, 2002, 9: 211-219.
- 37 T. Koch, H. F. Hansen, P. Anderson, T. Larsen, H.G. Batz, K. Otteson, H. Ørum, Improvements in automated PNA synthesis using Boc/Z monomers. *J. Pept. Res.*, 1997, 49: 80-88.
- 38 S. A. Kates. A. Fernando, Solid-Phase Synthesis A Practical Guide 2000 Marcel Dekker, Inc. 270 Madison Avenue, New York, NY.

- 39 D. A. Braasch, J. N. Christopher, R. C. David, Synthesis and Purification of Peptide Nucleic Acids *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry* 2002, 4.11.1-4.11.18
- 40 D. A. Braasch, R. C. David, Synthesis, Analysis, Purification, and Intracellular Delivery of Peptide Nucleic Acids. *Methods*. 2001, **23**: 97-107.
- 41 P. E. Nielsen, Peptide nucleic acids methods and protocols. *Methods in Molecular Biology*. 2002. Volme 208.
- 42 P. E. Nielsen, Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications 2nd Ed. 2004.
- 43 J. P. Vernille, L. C. Kovell, J. W. Schneider, Peptide Nucleic Acid (PNA) Amphiphiles: Synthesis, Self-Assembly, and Duplex Stability. *Bioconjugate Chem.* 2004, 15: 1314-1321.
- 44 D. I. Prokhorov, Yu. G. Kirillova, N. P. Boyarskaya, A. N. Tevyashova, O. V. Esipova, E. N. Zvonkova and V. I. Shvets . Synthesis of Thymine-Containing Monomers of Negatively Charged Peptide Nucleic Acids. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2005, 39: 323-328.
- 45 A. Okamoto, K. Tanabe, I. Saito, Synthesis and Properties of Peptide Nucleic Acids Containing a Psoralen Unit. *Org. Lett.*, 2001, 3: 925-927.
- 46 L. D. Mayfield, C. R. David, Enhancing solid phase synthesis by a noncovalent protection strategy-efficient coupling of rhodamine to resin-bound peptide nucleic acids *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1999, 9: 1419-1422.
- 47 S. Nicke, W. Gunnar, W. Dongyuan, M. Kubista, Light-Up Probes: Thiazole Orange-Conjugated Peptide Nucleic Acid for Detection of Target Nucleic Acid in Homogeneous Solution. *Anal. Biochem.* 2000, 281: 26-35.
- 48 P. Wolffs, R. Knutsson, R. Sjöback, P. Radström, PNA-Based Light-Up Probes for Real-Time Detection of Sequence-Specific PCR Products. *BioTechniques*. 2001, 31: 766-771.
- 49 I. Hisafumi, F. Kitagawa, Y. Nakamura, Efficient functional molecule incorporation method to functionalized peptide nucleic acid (PNA): use in synthesis of labeled PNA oligomers. *Tetrahedron*, 2007, 63: 5677-5689.
- 50 Oliver Seitz, Solid-Phase Synthesis of Doubly Labeled Peptide Nucleic Acids as Probes for the Real-Time Detection of Hybridization. *Angewandte Chemie* . 39: 3249-3252.
- 51 A. Maurer, K. Heinz-Bernhard, N. Metzler-Nolte, Synthesis and Electrochemical Characterization of Metallocene-PNA Oligomers. *Eur. J. Inorg. Chem.* 2005, 3207-3210.
- 52 C. Baldoli, C. Rigamonti, S. Maiorana, E. Licandro, L. Falciola, A New Triferrocenyl-tris(hydroxymethyl)aminomethane Derivative as a Highly Sensitive Electrochemical Marker of Biomolecules: Application to the Labelling of PNA Monomers and Their Electrochemical Characterization. *Chem. Eur. J.* 2006, 12: 4091- 4100.
- 53 M. Pooga, U. Soomets, M. Hallbrink, A. Valkna, K. Saar, K. Rezaei, U. Kahl, J. X. Hao, X. J. Xu, Z. Wiesenfeld-Hallin, T. Hokfelt, A. Bartfai, U. Langel, Cell penetrating PNA constructs regulate galanin receptor levels and modify pain transmission in vivo. *Nat. Biotechnol.*, 1998, 16: 857-861

- 54 G. Aldrian-Herrada, M. G. Desarmenien, H. Orcel, L. Boissin-Agasse, J. Mery, J. Brugidou, A. Rabie, A peptide nucleic acid (PNA) is more rapidly internalized in cultured neurons when coupled to a retro-inverso delivery peptide. The antisense activity depresses the target mRNA and protein in magnocellular oxytocin neurons. *Nucleic Acids Res.* 1998, 26: 4910-4916.
- 55 G. Cutrona, E. M. Carpaneto, M. Ulivi, S. Roncella, O. Landt, M. Ferrarini, L. C. Boffa, Effects in live cells of a c-myc anti-gene PNA linked to a nuclear localization signal *Nat. Biotechnol.* 2000, 18: 300-303.
- 56 D. Derossi, G. Chassaing, A. Prochiantz, Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery. *Trends Cell. Biol.* 1998, 8: 84-87.
- 57 L. Good, S. K. Awasthi, R. Dryselius, O. Larsson, P. E. Nielsen, Bactericidal antisense effects of peptide-PNA conjugates. *Nat. Biotechnol.* 2001, 19: 360-364.
- 58 T. Ljungstrom, H. Knudsen, P. E. Nielsen, Cellular Uptake of Adamantyl Conjugated Peptide Nucleic Acids. *Bioconjugate Chem.* 1999, 10: 965-972.
- 59 K. H. Petersen, D. K. Jensen, M. Egholm, P. E. Nielsen, O. Buchardt, A PNA-DNA linker synthesis of N-((4,4'-dimethoxytrityloxy)ethyl)-N-(thymine-1-ylacetyl)glycine. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1995, 5: 1119-1124.
- 60 E. Uhlmann, D. W. Will, G. Breipohl, D. Langner, A. Rytte, Synthesis and properties of PNA/DNA chimeras. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1996, 35: 2632-2635.
- 61 A. C. van der Laan, N. J. Meeuwenoord, E. Kuyl-Yeheskiely, R. S. Oosting, R. Brands, J. H. van Boom, Solid support synthesis of a PNA-DNA hybrid. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* 1995, 114: 295-297.
- 62 F. Bergmann, W. Bannwarth, S. Tam, Solid phase synthesis of directly linked PNA-DNA-hybrids. *Tetrahedron Lett.* 1995, 36: 6823-6826.
- 63 A. C. van der Laan, R. Brill, R. G. Kuimelis, E. Kuyl-Yeheskiely, J. H. van Boom, A. Andrus, A convenient automated solid-phase synthesis of PNA-(5')-DNA-(3')-PNA chimera. *Tetrahedron Lett.* 1997, 38: 2249-2252.
- 64 K. M. Guckian, B. A. Schweitzer, R. X.-F. Ren, C. J. Sheils, D. C. Tahmassebi, E. T. Kool, Factors Contributing to Aromatic Stacking in Water: Evaluation in the Context of DNA. *J. Am. Chem. Soc.* 2000, 122: 2213-2222.
- 65 H. Challa, M. L. Styers, S. A. Woski, Nitroazole Universal Bases in Peptide Nucleic Acids. *Org. Lett.* 1999, 1: 1639-1641.
- 66 N. Shibata, B. K. Das, H. Honjo, Y. Takeuchi, Synthesis of nonpolar peptide nucleic acid monomers containing fluoroaromatics. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2001, 1605-1611.
- 67 A. F. Kathryn, S. A. Woski, Fluoroaromatic universal bases in peptide nucleic acids. *Chem. Commun.* 2002, 2206-2207.
- 68 B. Armitage, D. Ly, T. Koch, H. Frydenlund, H. Ørum, G. B. Schuster, Hairpin-Forming Peptide Nucleic Acid Oligomers, *Biochemistry* 1998, 37: 9417-9425.

-
- 69 A. Yamazawa, X. Liang, H. Asanuma, M. Komiyama, Photocontrol of triple-helix formation by using azobenzene-bearing oligo(thymidine). *Angew. Chem.* 2000, 112: 2446-2447.
 - 70 H. Asanuma, T. Yoshida, T. Ito, M. Komiyama, Photo-responsive oligonucleotides carrying azobenzene at the 2'-position of uridine, *Tetrahedron lett.* 1999, 40: 7995-7998.
 - 71 H. Asanuma, T. Ito, T. Yoshida, X. Liang, M. Komiyama, Photoregulation of the formation and dissociation of a DNA duplex by using the cis-trans isomerization of azobenzene. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1999, 38: 2393-2395.
 - 72 X. Liang, H. Asanuma, M. Komiyama, Photoregulation of DNA triplex formation by azobenzene. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124: 1877-1883.
 - 73 X. Liang, H. Asanuma, H. Kashida, A. Takasu, T. Sakamoto, G. Kawai, M. Komiyama, NMR study on the photoresponsive DNA tethering an azobenzene. Assignment of the absolute configuration of two diastereomers and structure determination of their duplexes in the trans-form. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125: 16408-16415
 - 74 D. Matsunaga, H. Asanuma, M. Komiyama, Photoregulation of RNA digestion by RNase H with azobenzene-tethered DNA. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126: 11452-11453.
 - 75 S. Tomac, M. Sarkar, T. Ratilainen, P. Wittung, P. E. Nielsen, B. Norden, A. Graslund, Ionic Effects on the Stability and Conformation of Peptide Nucleic Acid Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118: 5544-5552.
 - 76 P. E. Nielsen, M. Egholm, O. Buchardt, Evidence for (PNA)-2/DNA triplex structure upon binding of PNA to dsDNA by strand displacement. *Journal of Molecular Recognition.* 1994, 7: 165-170.
 - 77 D. Y Cherny, B. P Belotserkovskii, M. D Frank-Kamenetskii, M. Egholm, O. Buchardt, R. H Berg, P. E Nielsen, DNA Unwinding Upon Strand-Displacement Binding of a Thymine-Substituted Polyamide to Double-Stranded DNA. *PNAS.* 1993; 90: 1667-1670.
 - 78 N. J Pfeffer, J. C Hanvey, J. E Bisi, S. A Thomson, C. F Hassman, S. A Noble, L. E Babiss, Strand-Invasion of Duplex DNA by Peptide Nucleic Acid Oligomers. *PNAS.* 1993; 90: 10648-10652.
 - 79 P. Wittung, P. Nielsen, B. Norden, Direct observation of strand invasion by peptide nucleic acid (PNA) into double-stranded DNA. *J. Am. Chem. Soc.* 118: 7049-7054.
 - 80 P. E Nielsen, Peptide nucleic acid targeting of double-stranded DNA. *Curr. Med. Chem.* 2001, 8: 545-550.
 - 81 M. Egholm, L. Christensen, K. L. Deuholm, O. Buchardt, J. Coull, P. E. Nielsen, Efficient pH-independent sequence-specific DNA binding by pseudoisocytosine-containing bis-PNA. *Nucleic Acids Res.* 1995, 23: 217-222.
 - 82 S. C. Brown, S. A. Thomson, J. M. Veal, D. G. Davis, NMR solution structure of a peptide nucleic acid complexed with RNA. *Science.* 1994, 265: 777-780.

- 83 M. Eriksson, P. E. Nielsen, Solution structure of a peptide nucleic acid-DNA duplex. *Nat. Structural Biol.* 1996, 3: 410–413.
- 84 L. Betts, J. A. Josey, J. M. Veal, S. R. Jordan, A nucleic acid triple helix formed by a peptide nucleic acid-DNA complex. *Science*. 1995, 270: 1838–1841.
- 85 H. Rasmussen, J. S. Kastrup, J. N. Nielsen, J. M. Nielsen, P. E. Nielsen, Crystal structure of a peptide nucleic acid (PNA) duplex at 1.7 Å resolution. *Nat. Structural Biol.* 1997, 4: 98–101.
- 86 M. Lindgren, M. Hallbrink, A. Prochiantz, U. Langel, Cell-penetrating peptides. *Trends Pharmacol. Sci.* 2000, 21: 99–103.
- 87 M. Pooga, U. Soomets, M. Hlbrink, A. Valkna, K. Saar, K. Rezaei, Cell penetrating PNA constructs regulate galanin receptor levels and modify pain transmission *in vivo*. *Nat. Biotechnol.* 1998, 16: 857–861.
- 88 G. Aldrian-Herrada, M. G. Desarménien, H. Orcel, L. Boissin-Agasse, J. Méry, J. Brugidou, A. Rabié, A peptidenucleic acid (PNA) is more rapidly internalized in cultured neurons when coupled to a *retro-inverso* delivery peptide. The antisense activity Depresses the target mRNA and protein in magnocellular oxytocin neurons. *Nucleic Acids Res.* 1998, 26: 4910–4916.
- 89 G. Cutrona, E. M. Carpaneto, M. Ulivi, S. Roncella, O. Landt, M. Ferrarini, Effects in live cells of a c-myc anti-gene PNA linked to a nuclear localization signal. *Nature Biotechnol.* 2000, 18: 300–303.
- 90 S. E. Hamilton, C. G. Simmons, I. S. Kathiriya, D. R. Corey, Cellular delivery of peptide nucleic acids and inhibition of human telomerase. *Chem. Biol.* 1999, 6: 343–351.
- 91 T. Ljungstr, H. Knudsen, P. E. Nielsen, Cellular uptake of adamantyl conjugated peptide nucleic acids. *Bioconjug. Chem.* 1999, 10: 965–972.
- 92 J. G. Karras, M. A. Maier, T. Lu, A. Watt, M. Manoharan, Peptide nucleic acids are potent modulators of endogenous pre-mRNA splicing of the murine interleukin-5 receptor-alpha chain. *Biochemistry*. 2001, 40: 7853–7859.
- 93 A. F. Faruqi, M. Egholm, P. M. Glazer, Peptide nucleic acid-targeted mutagenesis of a chromosomal gene in mouse cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95: 1398–1403.
- 94 B. S. Herbert, A. E. Pitts, S. I. Baker, S. E. Hamilton, W. E. Wright, J. W. Shay, Inhibition of human telomerase in immortal human cells leads to progressive telomere shortening and cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 96: 4276–14281.
- 95 M. A. Shammash, C. G. Simmons, D. R. Corey, R. J. S. Reis, Telomerase inhibition by peptide nucleic acids reverses “immortality” of transformed human cells. *Oncogene* 199, 918: 6191–6200.
- 96 D. F. Doyle, D. A. Braasch, C. G. Simmons, B. A. Janowski, D. R. Corey, Inhibition of gene expression inside cells by peptide nucleic acids: effect of mRNA target sequence, mismatched bases, and PNA length. *Biochemistry*. 2001, 40: 53–64.
- 97 L. Mologni, E. Marchesi, P. E. Nielsen, C. Gambacorti-Passerini, Inhibition of promyelocytic

- leukemia (PML)/retinoic acid receptor- α and PML expression in acute promyelocytic leukemia cells by anti-PML peptide nucleic acid. *Cancer Res.* 2001, 61: 5468-5473.
- 98 H. Knudsen, P. E. Nielsen, Antisense properties of duplex- and triplex-forming PNAs. *Nucleic Acids Res.* 1996, 24: 494-500.
- 99 L. Mologni, P. Lecoutre, P. E. Nielsen, C. Gambacorti-Passerini, Additive antisense effects of different PNAs on the in vitro translation of the PML/RAR. α gene. *Nucleic Acids Res.* 1998, 26: 1934-1938.
- 100 J. C. Hanvey, N. J. Peffer, J. E. Bisi, S. A. Thomson, R. Cadilla, J. A. Josey, Antisense and antigen properties of peptide nucleic acids. *Science.* 1992, 258: 1481-1485.
- 101 J. Summerton, Morpholino antisense oligomers: the case for an RNase H-independent structural type. *Biochim. Biophys. Acta* 1999, 1489: 141-158.
- 102 N. Dias, S. Dheur, P. E. Nielsen, S. Gryaznov, A. V. Aerschot, P. Herdewijn, Antisense PNA tridecamers targeted to the coding region of Ha-ras mRNA arrest polypeptide chain elongation. *J. Mol. Biol.* 1999, 294: 403-416.
- 103 H. Knudsen, P. E. Nielsen, Antisense properties of duplex- and triplex-forming PNAs. *Nucleic Acids Res.* 1996, 24: 494-500.
- 104 P. Sazani, S.-H. Kang, M. A. Maier, C. Wei, J. Dillman, J. Summerton, M. Manoharan, R. Kole, Nuclear antisense effects of neutral, anionic and cationic oligonucleotide analogs. *Nucleic Acids Res.* 2001, 29: 3965-3974.
- 105 J. Lohse, O. Dahl, P. E. Nielsen, Double duplex invasion by peptide nucleic acid: a general principle for sequencespecific targeting of double-stranded DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 96: 11804-11808.
- 106 P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, Sequence specific inhibition of DNA restriction enzyme cleavage by PNA. *Nucleic Acids Res.* 1993, 21: 197-200.
- 107 T. A. Vickers, M. C. Griffity, K. Ramasamy, L. M. Risen, S. M. Freier, Inhibition of NF- κ B specific transcriptional activation by PNA strand invasion. *Nucleic Acids Res.* 1995, 23: 3003-3008.
- 108 V. V. Demidov, M. V. Yavnilovich, B. P. Belotserkovskii, M. D. Frank-Kamenetskii, P. E. Nielsen, Kinetics and mechanism of polyamide ("peptide") nucleic acid binding to duplex DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, 92: 2637-2641.
- 109 T. Bentin, P. E. Nielsen, Enhanced peptide nucleic acid binding to supercoiled DNA: possible implications for DNA "Breathing" dynamics. *Biochemistry* 1996, 35: 8863-8869.
- 110 H. Kuhn, V. V. Demidov, M. D. Frank-Kamenetskii, P. E. Nielsen, Kinetic sequence discrimination of cationic bis-PNAs upon targeting of double-stranded DNA. *Nucleic Acids Res.* 1998, 26: 582-587.
- 111 X. Zhang, T. Ishihara, R. C. David, Strand invasion by mixed base PNAs and a PNA-peptide chimera, *Nucleic Acids Res.* 2000, 28: 3332-3338.

- 112 P. M. Lansdorp, N. P. Verwoerd, F. M. Van de Rijke, V. Dragowska, M.-T. Little, R. W. Dirks, Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Human Mol. Gen.* 1996, 5: 685-691.
- 113 M. J. M. Zijlmans, U. M. Martens, S. S. S. Poon, A. K. Raap, H. J. Tanke, R. K. Ward, P. M. Lansdorp, Telomeres in the mouse have large inter-chromosomal variations in the number of T2AG3 repeats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 94: 7423-7428.
- 114 G. Mathioudakis, R. Storb, P. A. McSweeney, B. Torok-Storb, P. M. Lansdorp, T. H. Brummendorf, Polyclonal hematopoiesis with variable telomere shortening in human longterm allogeneic marrow graft recipients. *Blood*. 2000, 96: 3991-3994.
- 115 C. Chen, B. Wu, T. Wie, M. Egholm, W. M. Strauss, Unique chromosome identification and sequence-specific structural analysis with short PNA oligomers. *Mamm. Genome*. 2000, 11: 384-391.
- 116 P. Hongmanee, H. Stender, O. F. Rasmussen, Evaluation of a fluorescence *in situ* hybridization assay for differentiation between tuberculous and nontuberculous Mycobacterium species in smears of Lowenstein-Jensen and mycobacteria growth indicator tube cultures using peptide nucleic acid probes. *J. Clin. Microbiol.* 2001, 39: 1032-1035.
- 117 F. A. Drobniewski, P. G. More, G. S. Harris, Differentiation of Mycobacterium tuberculosis complex and nontuberculous mycobacterial liquid cultures by using peptide nucleic acid-fluorescence *in situ* hybridization probes. *J. Clin. Microbiol.* 2000, 38: 444-447.
- 118 H. Stender, T. A. Mollerup, K. Lund, K. H. Petersen, P. Hongmanee, S. E. Godtfredsen, Direct detection and identification of Mycobacterium tuberculosis in smear-positive sputum samples by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) using peptide nucleic acid (PNA) probes. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 1999, 3: 830-837.
- 119 H., Perry-O'Keefe, H. Stender, A. Broomer, K. Oliveira, J. Coull, J. J. Hyldig-Nielsen, Filter-based PNA *in situ* hybridization for rapid detection, identification and enumeration of specific micro-organisms. *J. Appl. Microbiol.* 2001, 90: 180-189.
- 120 H. Stender, K. Oliveira, S. Rigby, F. Bargoot, J. Coull, Rapid detection, identification, and enumeration of *Escherichia coli* by fluorescence *in situ* hybridization using an array scanner. *J. Microbiol. Methods* 2001, 45: 31-39.
- 121 H. Stender, A. Sage, K. Oliveira, A. J. Broomer, B. Young, J. Coull, Combination of ATP-bioluminescence and PNA probes allows rapid total counts and identification of specific microorganisms in mixed populations. *J. Microbiol. Methods*. 2001, 46: 69-75.
- 122 H. Stender, C. Kurtzman, J. J. Hyldig-Nielsen, D. Sensen, A. Broomer, K. Oliveira, Identification of *Dekkera bruxellensis* (Brettanomyces) from wine by fluorescence *in situ* hybridization using peptide nucleic acid probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001, 67: 938-941.
- 123 A. Z. Worden, S. W. Chisholm, B. J. Binder, *In situ* hybridization of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* (Marine cyanobacteria) spp. with rRNA-targeted peptide nucleic acid probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000, 66: 284-289.

- 124 H. Ørum, P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, C. Stanley, Single base pair mutation analysis by PNA directed PCR clamping. *Nucleic Acids Res.* 1993, 21: 5332-5336.
- 125 E. Ortiz, G. Estrada, P. M. Lizardi, PNA molecular beacons for rapid detection of PCR amplicons. *Mol. and Cell. Probes* 1998, 12: 219-226.
- 126 H. Kuhn, V. V. Demidov, B. D. Gildea, M. J. Fiandaca, J. C. Coull, M. D. Frank-Kamenetskii, PNA beacons for duplex DNA. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 2001, 11: 265-270.
- 127 J. Isacsson, H. Cao, L. Ohlsson, S. Nordgren, N. vanvik, G. Westman, Rapid and specific detection of PCR products using light-up probes. *Mol. Cell. Probes* 2000, 14: 321-328.
- 128 N. Svanvik, G. Westman, D. Wang, M. Kubista, Lightup probes: thiazole orange-conjugated peptide nucleic acid for detection of target nucleic acid in homogeneous solution. *Anal. Biochem.* 2000, 281: 26-35.
- 129 N. Svanvik, J. Nygren, G. Westman, M. Kubista, Free-probe fluorescence of light-up probes. *J. Am. Chem. Soc.* 2001, 123: 803-809.
- 130 R. Frank, Spot-synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron.* 1992, 48: 9217-9232.
- 131 M. C. Pirrung, Spatially Addressable Combinatorial Libraries. *Chem. Rev.* 1997, 97: 473-488.
- 132 S. R. Mikkelsen, Electrochemical biosensors for DNA sequence detection *Electroanalysis.* 1996, 8: 15-19.
- 133 M. Yang, M. E. McGovern, Michael, Thompson Genosensor technology and the detection of interfacial nucleic acid chemistry. *Anal. Chim. Acta.* 1997, 346: 259-275.
- 134 J. Wang, G. Rivas, X. Cai, E. Palecek, P. Nielsen, H. Shiraishi, N. Dontha, D. Luo, C. Parrado, M. Chicharro, P. A. M. Farias, F. S. Valera, D. H. Grant, M. Ozsoz, M. N. Flair, DNA electrochemical biosensors for environmental monitoring. A review *Anal. Chim. Acta.* 1997, 347: 1-8.
- 135 J. Wang, E. Palecek, P. E. Nielsen, G. Rivas, Xi. Cai, H. Shiraishi, N. Dontha, D. Luo, P. A. M. Farias, Peptide Nucleic Acid Probes for Sequence-Specific DNA Biosensors. *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118: 7667-7670.
- 136 J. Wang, P. E. Nielsen, M. Jiang, X. Cai, J. R. Fernandes, D. H. Grant, M. Ozsoz, A. Beglieter, M. Mowat, Mismatch-Sensitive Hybridization Detection by Peptide Nucleic Acids Immobilized on a Quartz Crystal Microbalance. *Anal. Chem.* 1997, 69: 5200-5202.
- 137 H. F. Arlinghaus, M. N. Kwoka, K. B. Jacobson, Analysis of biosensor chips for identification of nucleic acids. *Anal. Chem.* 1997, 69: 3747-3753.
- 138 T. Uno, H. Tabata, T. Kawai, Peptide-nucleic acid-modified ion-sensitive field-effect transistor-based biosensor for direct detection of DNA hybridization. *Anal. Chem.* 2007, 79: 52-59.

-
- 139 H. Ørum, P. E. Nielsen, M. Jorgensen, et al. Sequence-specific purification of nucleic acids by PNA-controlled hybrid selection. *BioTechniques*. 1995,19: 472-480.
- 140 A. G. Veselkov, V. V. Demidov, P. E. Nielson, M. D. Frank-Kamenetskii, A new class of genome rare cutters. *Nucleic Acids Res.* 1996, 24: 2483-2487.
- 141 S. Sei, Q. E. Yang, D. O'Neill, et al. Identification of a key target sequence to block human immunodeficiency virus type 1 replication within the gag-pol transframe domain. *J. Virology*. 74: 4621-4633.

第二章 PNA 单体的合成

2.1 概述

由于 PNA 具有诸多优点^[1-5], 各种各样的 PNA 构建模块被广泛合成并用于合成 PNA 寡聚体, 但是 Nielsen 最初设计的经典 PNA 单体仍是最为主要和应用最为广泛的。它们的结构见图 2-1, 我们可以看到它主要有三部分组成: 骨架, 连接分子, 碱基。由于这类单体最早被应用, 因而它们的合成也研究的最为广泛和详细。

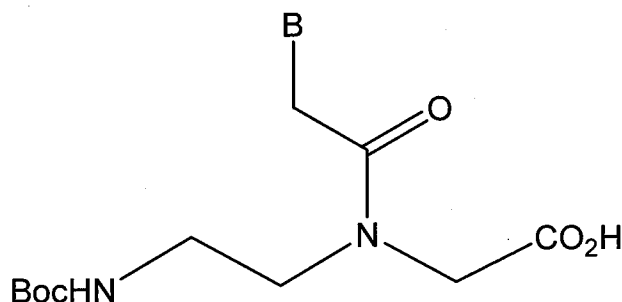


图 2-1 PNA 单体的结构(B 为碱基: T、C、A、G)

Figure 2-1 The structure of PNA monomers (B is nucleobases: T、C、A、G)

在合成 PNA 寡聚体时, 几乎全部采用多肽固相合成的方法, 而且由于骨架和碱基都包含氨基, 因此在固相合成中为了防止副反应的发生, 就像在多肽合成时需要保护氨基酸的氨基那样, 它们也都需要保护^[6]。氨基酸的氨基保护已经被深入研究了数十年, 保护基多种多样, 但归纳起来, 可以分为烷氧羰基、酰基和烷基三大类, 其中烷氧羰基是使用的最多的一种保护基。因而在保护 PNA 单体时, 人们首先就是利用氨基酸最为经常用的保护基团, 由于骨架和核碱基都存在氨基, 因此需要遵循一个原则: 两个氨基的保护基团在被脱除时的条件一种是正交脱除, 比如一个酸性脱除, 另一个碱性脱除, 另一种是有一定梯度的脱除, 比如一个是强酸脱除, 另一个是弱酸脱除^[7-9]。表 2-1 和表 2-2 分别列举了在 PNA 合成过程中经常用到的部分氨基保护基团和羧基保护基团及其脱除条件。本章首先介绍标准骨架合成, 然后再介绍碱基环外氨基的保护和乙酰化, 最后介绍单体的合成。

表 2-1 PNA 常用氨基保护基团,保护试剂及脱除条件

Table 2-1 The protective groups, protective reagent and deprotection of PNA amido

保护基	保护试剂	脱除条件	参考文献
Ac	乙酰氯, 乙酸酐	10%TFMSA	[10]
An	Anisoyl chloride	浓氨水	[11, 12]
Boc	(Boc) ₂ O, BocN ₃	50%TFA	[13, 14]
i-Bu	i-Bu-Cl	浓氨水	[11]
Cbz	Cbz-Cl, Cbz-ONSu, Rapoport 试剂	TFMSA	[15, 16]
Dpc	Dpc-Cl	TFA	[10]
Fmoc	Fmoc-ONSu	20%哌啶	[15]
Mmt	Mmt-Cl	30%TFA	[17, 18]

表 2-2 PNA 常用羧基保护基团,保护试剂及脱除条件

Table 2-2 The protective groups, protective reagent and deprotection of carboxyl

保护基	脱除条件	参考文献
Me	NaOH	[1, 14, 19]
Et	NaOH	[14]
t-Bu	HCl	[15]

2.2 经典骨架的合成

PNA经典的骨架有N-(2-氨基乙基)甘氨酸组成, 它的二级胺基团用于和碱基乙酸化的衍生物反应, 因此它的伯氨基和羧基都需要保护。由于保护基团的多种多样以及合成骨架的合成子的不同, 因此骨架的合成路线灵活多变^[2, 20]。但是, 常用的合成方法主要分为以下三类。

2.2.1 烷基化反应

这类合成方法由于原料易得, 价格便宜, 合成步骤短而成为首选的方法, 我们在实验室中就采取此种方法。这种方法基本上都以乙二胺或氨基乙腈为原料, 与卤代乙酸衍生物进行烷基化反应。适用的氨基保护基团主要有: Boc, Fmoc, Mmt 等, 羧基的主要有: Me, Et, t-Bu 等。下面列举几条最为重要的合成路线。表 2-3 列举了所用的保护基团和实验条件以及参考文献。

a. 以乙二胺为原料先保护其中的一个氨基，再与卤代乙酸或其衍生物反应。

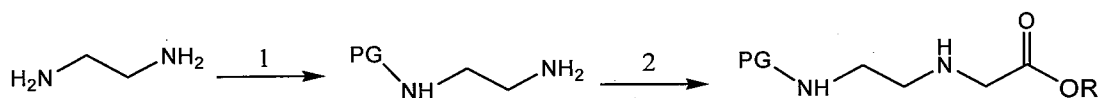


图 2-2 骨架合成路线1

Figure 2-2 Synthetic route 1 of backbone

b. 以乙二胺为原料先与卤代乙酸或其衍生物反应，再与保护试剂反应。

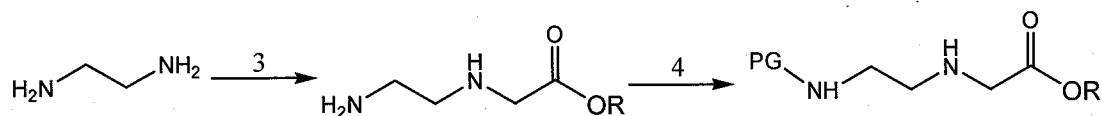


图 2-3 骨架合成路线2

Figure 2-3 Synthetic route 2 of backbone

c. 以氨基乙腈为原料先保护氨基，然后还原氰基为氨基，最后与卤代乙酸或其衍生物反应。

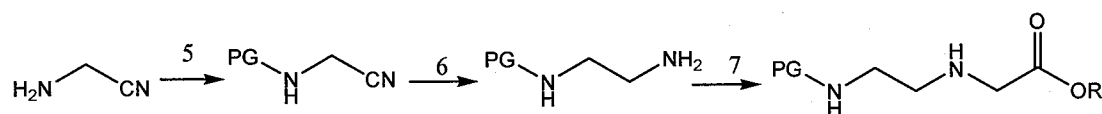


图 2-4 骨架合成路线3

Figure 2-4 Synthetic route 3 of backbone

表 2-3 合成骨架的试剂 1

Table 2-3 The reagent 1 of synthetic backbone

路线	PG	R	反应试剂	参考文献
a	Boc	tBu	1. (Boc) ₂ O, NEt ₃ , DCM. 2. ClCH ₂ COOtBu, NEt ₃ , DCM	[13]
b	Boc	Me	3. ClCH ₂ COOH, MeOH/HCl. 4. (Boc) ₂ O, dioxane/H ₂ O	[21]
b	Fmoc	tBu	3. BrCH ₂ COOtBu, DCM. 4. Fmoc-ONSu, DIEA	[15]
b	Mmt	Et	3. ClCH ₂ COOH, EtOH/HCl. 4. Mmt-Cl, NEt ₃ , DCM	[17]
c	Boc	Et	5. (Boc) ₂ O, DCM. 6. Raney-Ni, H ₂ , 10% NH ₃ /EtOH. 7. BrCH ₂ COOEt, KF/Celite, CH ₃ CN	[20]

此类路线简单，原料易得，产率高操作相对容易，因此，在实际合成中我们尝试采用 a 和 b 合成路线，由于 a 合成路线相对经济一些，产率高一些，最后路线 a 被确定为固定的合成路线。我们向含有过量乙二胺的 DCM 中，滴加溶有 (Boc)₂O 的

DCM 溶液 $[n(\text{Boc})_2\text{O}/n_{\text{乙二醇}}=1/10]$ ，反应后经过处理，得到单保护的乙二醇，再和溴乙酸乙酯或氯乙酸乙酯反应便得到产物。氯乙酸乙酯和溴乙酸乙酯的区别是：溴乙酸乙酯反应活性高，因此反应温度低，时间短，但是毒性大，对眼睛刺激性大，而氯乙酸乙酯反应活性低，要求反应温度比溴乙酸乙酯高，但是其毒性低，价格相对便宜。

2.2.2 席夫碱的还原反应

此类方法也应用较为广泛，因为实验所涉及的反应是常见反应比较成熟。由于醛基的形成路线是多种多样的，加之与保护基团相组合，反应合成路线也就多种多样。主要可以分以下几类：

- a. 此类涉及到甘氨酸酯与保护氨基乙醛反应，然后，还原甘氨酸酯与保护的氨基乙醛形成的席夫碱。

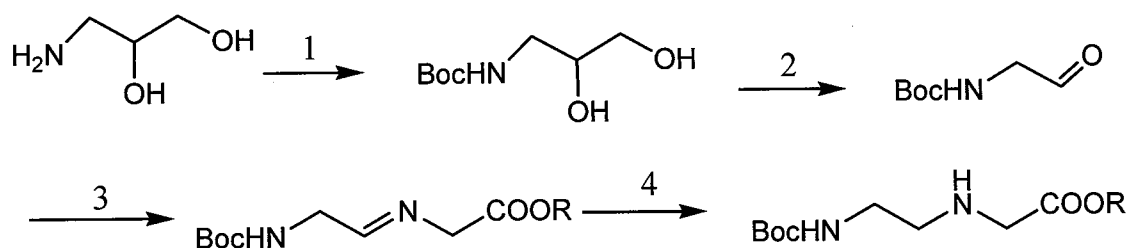


图 2-5 骨架合成路线4

Figure 2-5 Synthetic 4 route of backbone

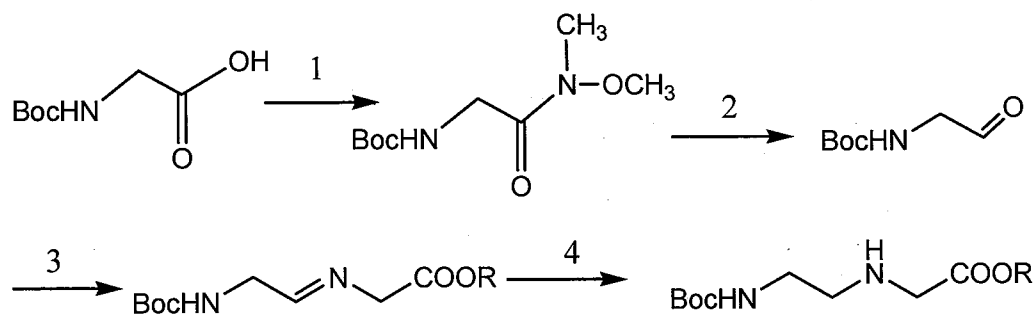
此类方法虽然只适用于Boc 保护基，但该方法稍加修改即可用于合成各种有侧链的PNA单体。表2-4列出了此类方法的应用实例。

表 2-4 合成骨架的试剂 2

Table. 2-4 The reagent 2 of synthetic backbone

PG	R	反应试剂和条件	Ref.
Boc	Me	1. $(\text{Boc})_2\text{O}$, NaOH, H_2O . 2. KIO_4 , H_2O . 3. $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{COOMe}\cdot\text{HCl}$, NaAc. 3. H_2 , Pd/C	[19]
Boc	Et	1. $(\text{Boc})_2\text{O}$, NaOH, H_2O . 2. KIO_4 , H_2O . 3. $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{COOEt}\cdot\text{HCl}$, NaAc. 3. H_2 , Pd/C	[19]
Boc	Et	1. $(\text{Boc})_2\text{O}$, NaOH, H_2O . 2. NaIO_4 , H_2O . 3. $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{COOMe}\cdot\text{HCl}$, NaAc. 3. NaBH_3CN , MeOH	[14]

还有不用3-氨基-1,2-丙二醇为原料合成保护的氨基乙醛的例子,例如下面的合成路线^[22]。

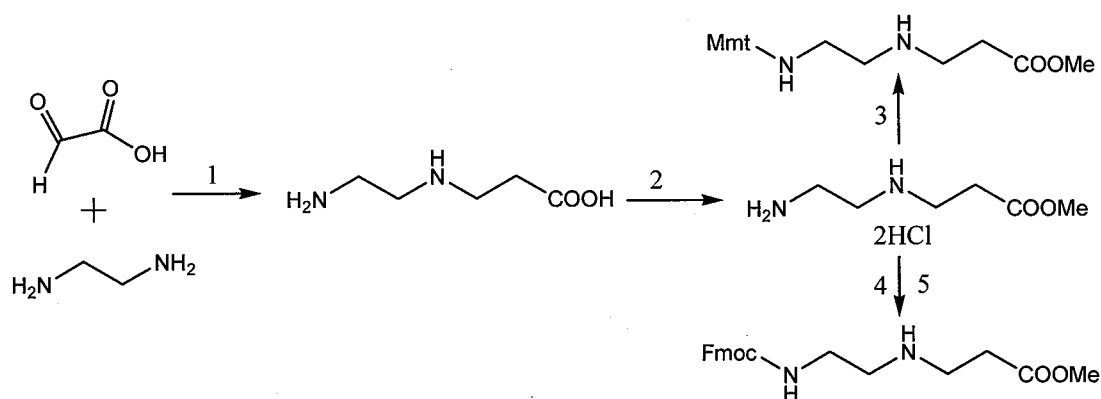


1. $\text{HN}(\text{OCH}_3)\text{CH}_3$, TEA, TBTU/TEA; 2. LiAlH_4 , 10% Citric acid; 3. $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{COOMe} \cdot \text{HCl}$; 4. NaBH_3CN , MeOH.

图 2-6 骨架合成路线5

Figure 2-5 Synthetic route 5 of backbone

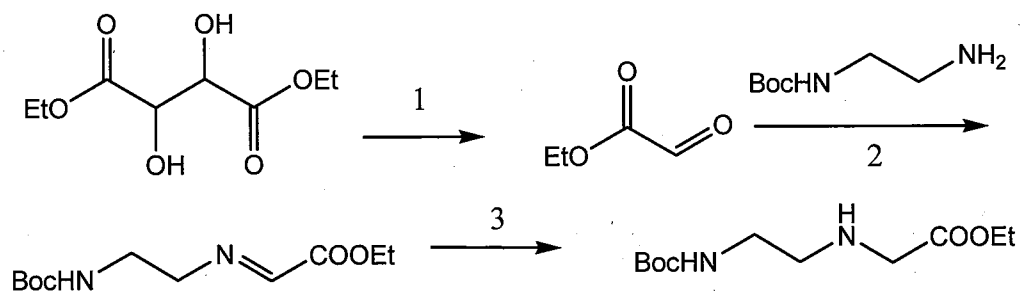
b. 此类反应涉及到醛基乙酸或其衍生物与乙二胺或单保护的乙二胺反应。例如以下2种合成路线^[11,18,23]。



1. $\text{H}_2/\text{Pd/C}$, H_2O ; 2. MeOH/HCl ; 3. Mmt-Cl , DMF, NEt_3 ; 4. $\text{Fmoc}-(\text{ONSu})$, dioxane/ H_2O ; 5. MeOH/HCl .

图 2-7 骨架合成路线6

Figure 2-7 Synthetic route 6 of backbone



1. NaIO_4 , DCM/ H_2O . 2. 3Å MS, DCM. 3. 10% Pd/C , H_2 , DCM

图 2-8 骨架合成路线7

Figure 2-8 Synthetic route 7 of backbone

2.2.3 Mitsunobu反应

利用氨基乙醇与对硝基苯基甲磺酰基保护的甘氨酸甲酯进行Mitsunobu反应制备骨架^[24]。

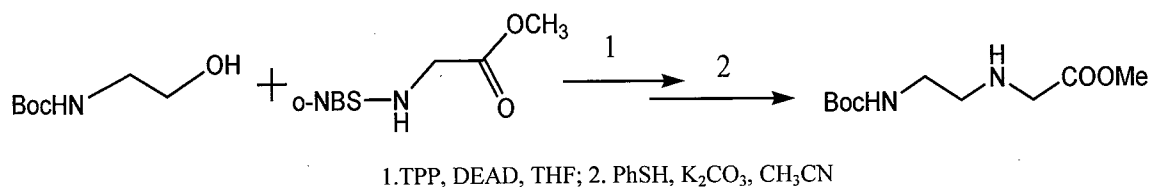
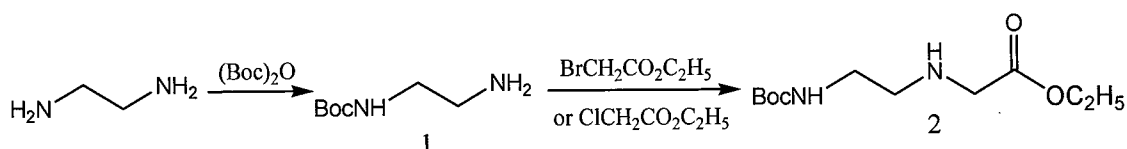


图 2-9 骨架合成路线8

Figure 2-9 Synthetic route 8 of backbone

2.2.4 实验部分

第一种路线:



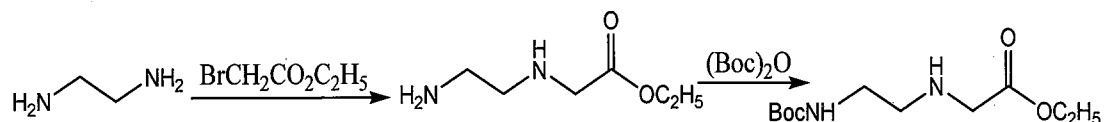
烷基化试剂为溴乙酸乙酯

取 240 ml 乙二胺溶于 500 ml 二氯甲烷中,冰浴搅拌下,滴加溶有 98.5 g (Boc)₂O 的二氯甲烷 225ml,滴加所用时间不少于 3 h。搅拌反应 20 h 后,加入 450 ml 水,并剧烈搅拌,分液,取有机层,水相各用 225 ml 二氯甲烷萃取 2 次,合并有机相,用半饱和的氯化钠溶液 300 ml 洗涤,无水硫酸钠干燥后过滤,浓缩有机相得到化合物 1,1 溶于 400 ml DCM 中,加入 62 ml 三乙胺和 0.25 g 碘化钾,滴加 48.2 ml 溴乙酸乙酯和 225 ml 二氯甲烷混合液。35℃下搅拌回流反应 50 h,加入 250 ml 水并剧烈搅拌。分离出有机相,无水硫酸钠干燥后过滤,减压蒸出溶剂得淡黄色的油状粗产品,硅胶柱色谱分离(洗脱剂:乙酸乙酯, R_f = 0.396)得骨架 2 粘稠黄色液体 44.5 g 克,产率 40%。FT-IR: V_{N-H}: 3351 (酰胺), 3230 (胺); V_{C-H}: 2977, 2933, 2921; V_{C=O}: 1738 (酯), 1712 (Boc); δ_{甲基}: 1517; δ_{叔丁基}: 1392, 1365; 叔丁基的骨架振动: 1250, 1192; V_{C-O}: 1172; δ_{叔丁基氧}: 863; FAB-MS: [M+H]⁺ = 247.0, [M-(CH₃)₃C+H]⁺ = 190.0, [M-(CH₃)₃CO]⁺ = 172.9, [M-(CH₃)₃C-EtO]⁺ = 128.8, [M-(CH₃)₃C-Et+H]⁺ = 115.8; ¹H NMR(CDCl₃): δ: 5.038 (s, 1H), 4.141 (q, 2H), 3.358 (s, 2H), 3.168 (d, 2H), 2.705 (t, 2H), 1.690 (s, 1H), 1.401 (s, 9H), 1.237 (t, 3H)。

烷基化试剂为氯乙酸乙酯

合成操作步骤与用溴乙酸乙酯的基本相同,不同之处就是滴加完氯乙酸乙酯后,45 °C 回流 50 h。原因是氯乙酸乙酯活性比溴乙酸乙酯低。产率 38%。

第二种路线:



冰水浴剧烈搅拌下,将 6.0 ml 溴乙酸乙酯与 40 ml 二氯甲烷混合液滴加到 30 ml 乙二胺与 200 ml 二氯甲烷混合液中,滴加所用时间不少于 5 h。撤去冰水浴,搅拌过夜。混合物各用 50 ml 水洗涤 3 次,再用 50 ml 二氯甲烷萃取水相。合并有机相,无水硫酸钠干燥后过滤,往该溶液中加入 300 ml 二氯甲烷,搅拌下加入 3.5 ml 吡啶(或 4.4 ml 二乙胺),滴加溶有 9.4 g (Boc)₂O 的 30 ml 二氯甲烷,滴加所用时间不少于 5 h。加完后,继续搅拌反应 12 h。各用 50 ml 1 mol/L 盐酸洗涤 5 次,50 ml 盐水洗涤。有机相用无水硫酸钠干燥后过滤,真空中蒸干的粗产物,硅胶柱色谱分离(洗脱剂:乙酸乙酯, R_f = 0.396)得粘稠黄色液体 4.49 g,产率 35%。表征结果同上。

2.3 天然核碱基的保护和乙酰化

DNA 中包含的 4 种天然核碱基即胸腺嘧啶、胞嘧啶、腺嘌呤、鸟嘌呤,除了胸腺嘧啶外都包含了环外氨基。如果不进行保护这将在后续合成中导致副反应以至于合成失败,因此它们都需要进行保护。碱基环外氨基保护后再乙酰化得到产物,才能与骨架反应得到单体。

2.3.1 保护基

在氨基酸的氨基保护中已经使用过的保护基已经很多了,但归纳起来,可以主要分为烷氧羰基、酰基、烷基三大类^[7]。表 2-5 列举了在氨基酸保护中常用保护基团。除了表 2-5 列举的常用保护基之外,当然还有很少一部分也能用到,例如还有 Dipmoc, Voc 等等有时在一些特殊情况下使用。常用的氨基酸保护试剂首先被尝试应用到 PNA 的合成中去,考虑到要与骨架氨基的保护有一定梯度或正交,以及考虑到后来固相合成完成后需要从树脂上解离寡聚体,在众多的保护试剂中仅有少量

的保护基用于保护碱基环外的氨基: Cbz, Mmt, tBuBz, An, iBu, Ac, Bhoc 等几种。然而, 应用最为广泛的就是 Cbz 与骨架氨基保护基 Boc 的梯度搭配, 其次就是 Bhoc 与骨架氨基保护基 Fmoc 的正交搭配, 因为这两种搭配方式最容易在固相合成中操作。这两种方式各有优缺点, Boc 化学最大的优势是能够手工合成高质量的 PNA 寡聚体, 其次原料价格比较低。Fmoc 化学避免了强酸试剂的使用, 降低了毒性, 易于直接用于 DNA 合成仪。我们在实际操作中考虑到成本和可操作性等因素便选用了 Boc 和 Cbz 搭配^[4]。

表 2-5 常用氨基保护基团, 保护试剂及脱除条件

Table 2-5 The protective groups, protective reagent and deprotection of amido

类型	名称	保护试剂	脱除条件
烷氧羰基	Cbz	Cbz-Cl	TFMSA, Na/NH ₃ (液)
	Bhoc	Bhoc-N ₃	1.7M HCl
	Fmoc	Fmoc-ONSu	50%哌啶/DCM
	Boc	(Boc) ₂ O, Boc-N ₃	50%TFA/DCM
	Bpoc	Bpoc-OPh, Bpoc-N ₃	TFA, 0.1M HCl/CHCl ₃ , HBr
	Mz	Mz-Cl, Mz-N ₃ , Mz-ONp	HBr/AOAc, TFA, HCl/有机溶剂
酰基	tBuBz	tBuBz-Cl	浓氨水
	An	Anisoyl chloride/Py	浓氨水
	Ac	Ac ₂ O, Ac-Cl	1.2M HCl, 85%胂,
	甲酰基	HCOOH/Ac ₂ O	HCl/H ₂ O, HCl/ROH
	Tfa	三氟醋酐	1M 哌啶
	Pht	邻苯二甲酸酐	胂/乙醇
	Tos	Tos-Cl	Na/NH ₃ (液)
烷基	Mmt	Mmt-Cl	80% AcH, 3%三氯乙酸
	iBu	iBu-Cl	TFA
	Trt	Trt-Cl	HCl, AcOH, Pd/C

Boc 基团的导入试剂最初采用的是合成的 BocN_3 ，合成路线如图 2-10，后来是用直接购买的 $(\text{Boc})_2\text{O}$ 。

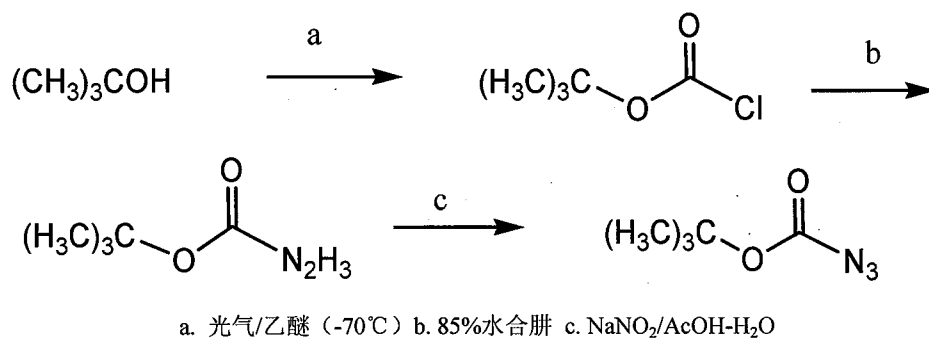


图 2-10 BocN_3 的合成路线

Figure 2-10 Synthetic route of BocN_3

Cbz 基团的导入试剂是 Cbz-Cl 。最初实验是采用原料易得的发烟硫酸，四氯化碳，苄醇制备导入试剂 Cbz-Cl ，合成路线图见图 2-11 A。由于光气毒性大，操作极不方便，我们采用了固体光气作原料一步合成了导入试剂 Cbz-Cl （图 2-11 B）。合成的 Cbz-Cl 浓度是通过 Cbz-Cl 与氨水反应产生的沉淀质量来确定。

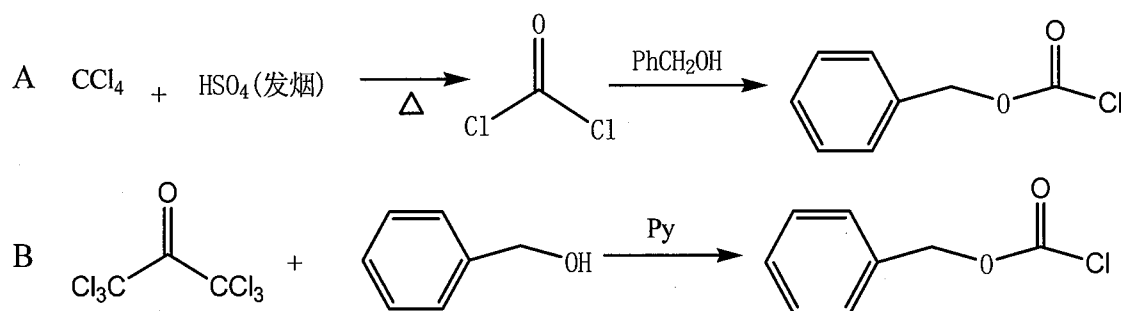


图 2-11 Boc-Cl 的合成路线

Figure 2-11 Synthetic route of Boc-Cl

2.3.2 碱基的保护和乙酰化

这一小节综述了四种天然碱基的保护与乙酰化，虽然在氨基酸保护中运用的保护基种类繁多，但是适合在 PNA 合成中的却不多。经典的 PNA 单体符合“6+3”规则，碱基到骨架的距离是三个化学键的长度，因此所用烷基乙酰化试剂都是卤代乙酸和卤代乙酸酯。下面分别讨论他们的合成。

I. 胸腺嘧啶 (T) 的乙酰化

胸腺嘧啶没有环外氨基，因此不需要保护，合成相对简单，合成路线见图 2-12。

从图中可以看到基本有两条路线，一条是和卤代乙酸酯烷基化反应，然后皂化便得到产物，另一条是直接和卤代乙酸反应。由于 R 和卤代试剂的不同，也有不同的实验方法，表 2-6 列举了已经用过的方法。

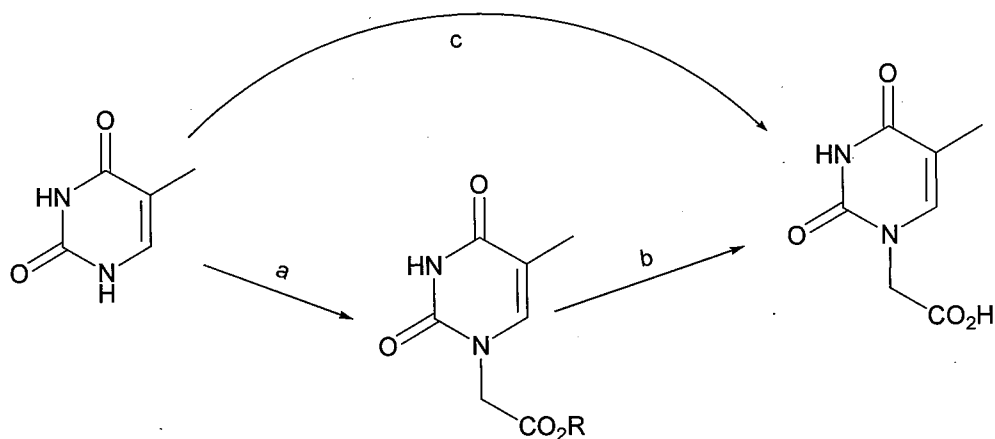


图 2-12 合成胸腺嘧啶乙酸

Figure 2-12 Synthesis of thymine acetic acid.

表 2-6 合成胸腺嘧啶乙酸的试剂

Table 2-6 The reagent for the synthesis of thymine acetic acid

R	反应试剂和条件	参考文献
Me	a.BrCH ₂ COOMe,K ₂ CO ₃ ,DMF;b.NaOH,H ₂ O	[1]
H	c. BrCH ₂ COOH,KOH,H ₂ O	[25]
Et	a. BrCH ₂ COOEt,K ₂ CO ₃ ,DMF;b.NaOH,H ₂ O	我们实验室 中运用
Et	a. ClCH ₂ COOEt,K ₂ CO ₃ ,DMF;b.NaOH,H ₂ O	

我们利用实验室现有的试剂，运用 BrCH₂COOEt，ClCH₂COOEt 做为原料合成了酰基化的胸腺嘧啶，产率能达到 65%。

II. 胞嘧啶 (C) 的保护及乙酰化

胞嘧啶有环外氨基，因此需要保护，防止副反应发生。在已经成熟的合成方法中基本全都是先用保护试剂保护环外氨基，然后卤代乙酸酯烷基酰化，最后皂化便得到产物。合成路线见图 2-13。

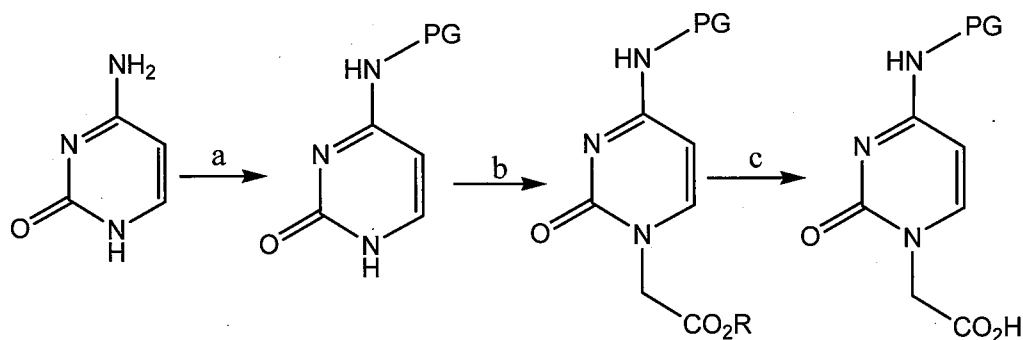


图 2-13 合成胞嘧啶乙酸衍生物

Figure 2-13 Synthesis of cytosyl acetic acid derivatives.

表 2-7 合成胞嘧啶乙酸衍生物的试剂

Table 2-7 The reagent for the synthesis of cytosyl acetic acid derivatives

PG	R	a	b	c	Ref.
Cbz	Me	Cbz-Cl/Py	BrCH ₂ COOMe, K ₂ CO ₃ , DMF	NaOH, H ₂ O	[1]
Cbz	tBu	Cbz-Cl, DMAP, Py	BrCH ₂ COOtBu, K ₂ CO ₃ , Cs ₂ CO ₃ , DMF	HCl/dioxane, DMF	[15]
Mmt	Me	Mmt-Cl, Py, NEM	BrCH ₂ COOMe, NaH,DMF	NaOH, H ₂ O/dioxane	[18]
tBuBz	Me	tBuBz-Cl Py	BrCH ₂ COOMe, NaH,DMF	NaOH, H ₂ O/dioxane	[11]
An	Me	Anisoyl chloride/Py	BrCH ₂ COOMe, NaH,DMF	NaOH, H ₂ O/dioxane	[12]
Cbz	Et	Cbz-ONSu DMF	BrCH ₂ COOEt, K ₂ CO ₃ ,DMF	NaOH, H ₂ O	我们实验 室中运用

我们在实验中首先选用的是表 2-7 中第一种方法进行尝试性的合成。在进行氨基保护合成过程中发现产率非常低，后处理麻烦，经过多次尝试调节反应温度，调换反应溶剂，但仍未获得成功，因此我们尝试了用 Cbz-ONSu 作导入试剂。此试剂是固体易于保存，反应不产生 HCl，而且避免使用刺鼻的有难闻气味的 Py，因此 DMF 作为了首选溶剂，并且获得了成功。为了提高产率，探讨温度对产率的影响，我们发现温度升高产率也随着升高，当温度升高到 65℃ 时产率达到最高 86%，比文献报道用 Cbz-Cl 产率高 30%^[1]。

随后 Cbz 保护的胞嘧啶进行烷基乙酰化，我们用现有原料 BrCH₂COOEt 取代了

文献报道用的 $\text{BrCH}_2\text{COOMe}$ ，处理方法沿用了文献已采取的方法，产率却由文献报道的 40% 提高到 50%。

III. 腺嘌呤 (A) 的保护及乙酰化

腺嘌呤 (A) 的保护及乙酰化文献中报道两种路线，合成路线见图 2-14。表 2-8 显示了在文献中合成所用的试剂及条件。

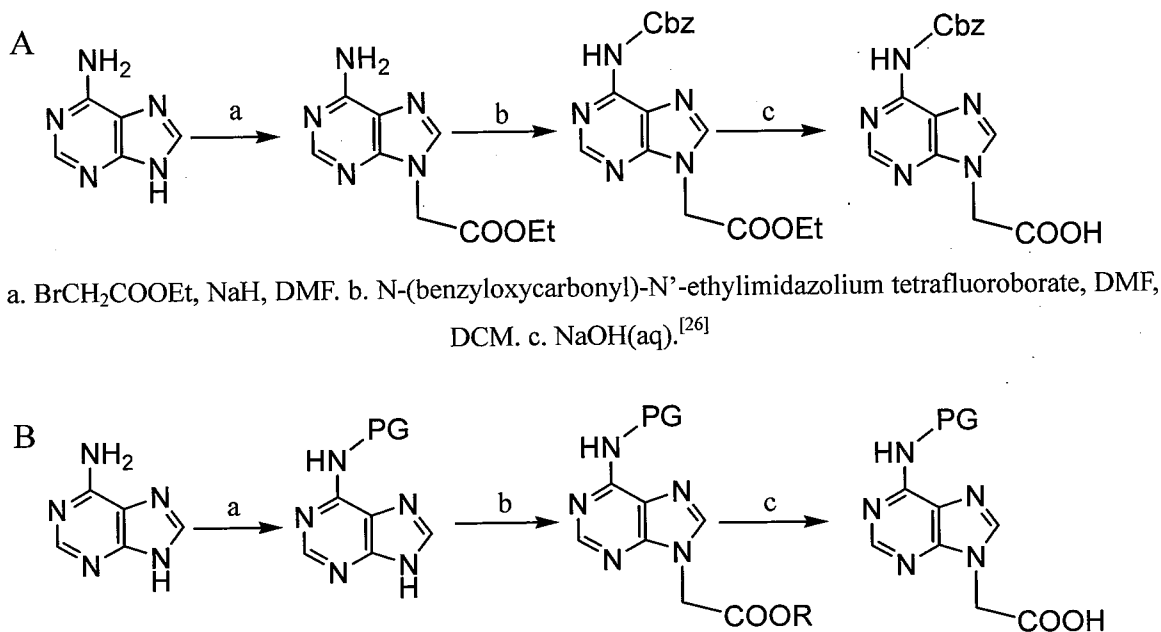


图 2-14 合成腺嘌呤乙酸衍生物

Figure 2-14 Synthesis of adenylic acid derivatives.

表 2-8 合成腺嘌呤乙酸衍生物的试剂

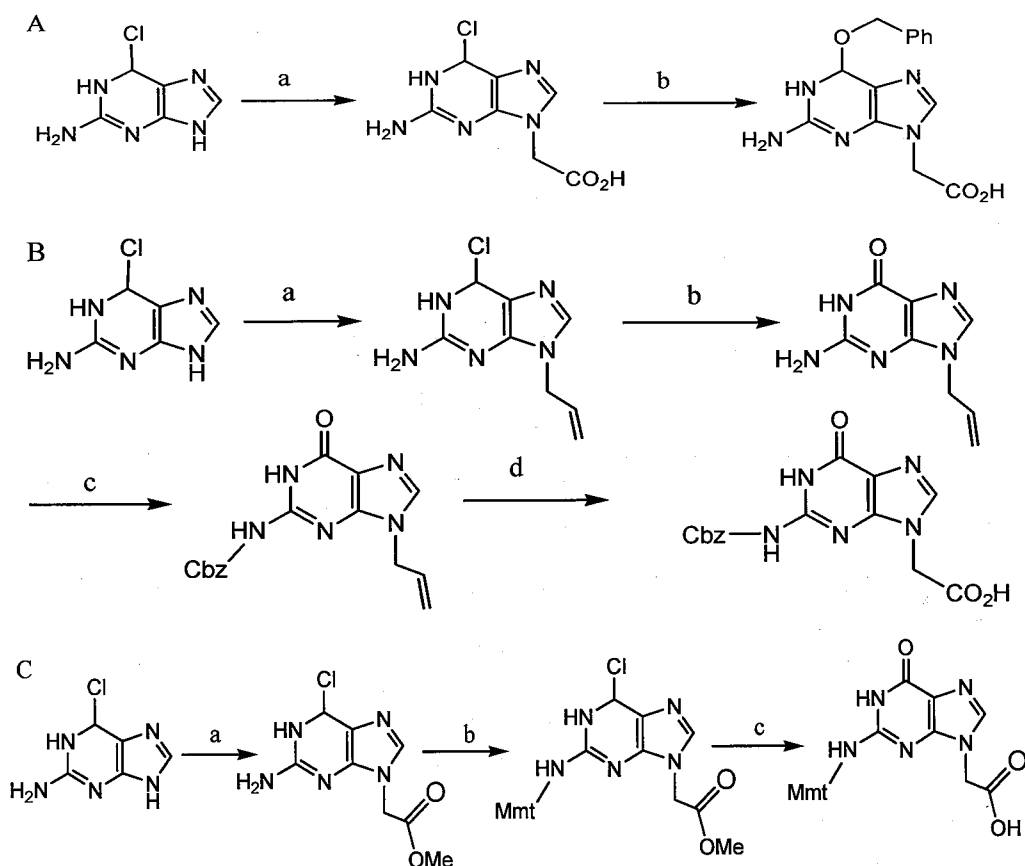
Table 2-8 The reagent for the synthesis of adenylic acid derivatives

PG	R	a	b	c	Ref.
Cbz	tBu	NaH, Cbz-Cl, DMF	$\text{BrCH}_2\text{COOtBu}$, K_2CO_3 , Cs_2CO_3 , DMF	TFA, DCM, Et_3SiH	[15]
Mmt	Me	Mmt-Cl, Py, NEM	$\text{BrCH}_2\text{COOMe}$, NaH, DMF	NaOH, H_2O /dioxane	[18]
An	Me	Anisoyl chloride Py	$\text{BrCH}_2\text{COOMe}$, NaH, DMF	NaOH, H_2O /dioxane	[11]
Cbz	Et	NaH, Cbz-Cl, DMF	$\text{BrCH}_2\text{COOEt}$, K_2CO_3 , Cs_2CO_3 , DMF	NaOH, MeOH/ H_2O	我们实验室中运用

路线 A 是 Egholm, M. 较早设计应用的一条经典路线, 但它在保护时要用 $\text{Cbz-Im}^+\text{EtBF}_4$ 作导入试剂, 然而 $\text{Cbz-Im}^+\text{EtBF}_4$ 比较活泼, 只能现用现合成, 比较麻烦, 因此我们尝试直接用 Cbz-Cl 作为保护试剂, 但它的活性低, 通过加入 NaH 先和胸腺嘧啶乙酸乙酯反应生成其铵盐, 用以提高腺嘌呤乙酸乙酯的亲核活性, 或许能够获得成功。虽然我们成功的合成了腺嘌呤乙酸乙酯, 但在尝试用 Cbz-Cl 保护时加入 NaH 并未成功, 虽然通过调整温度, 更换反应溶剂等方法, 花费了大量时间也未能成功。因此我们采用 B 路线, 并且把文献用的烷基酰化试剂换用低价格的 $\text{BrCH}_2\text{COOEt}$, 获得了成功, 从而又丰富了一种合成方法。

IV. 鸟嘌呤的保护与乙酰化

鸟嘌呤由于共轭程度的提高, 其氨基反应活性比其它碱基低, 因此在采取比较温和的固相相合成步骤时, 氨基有时候不需要保护^[1]。但在大多数情况下还是需要保护, 由于鸟嘌呤有六位的羰基它可以由其它形式非常容易转化而来, 因此在有些情况下可以不用鸟嘌呤为起始原料, 而是用 6-氯鸟嘌呤为起始原料, 因此它的合成路线是比较多的。图 2-15 是综述了文献中已经报道过的合成路线, 表 2-9 显示了文献中所用的试剂及反应条件。



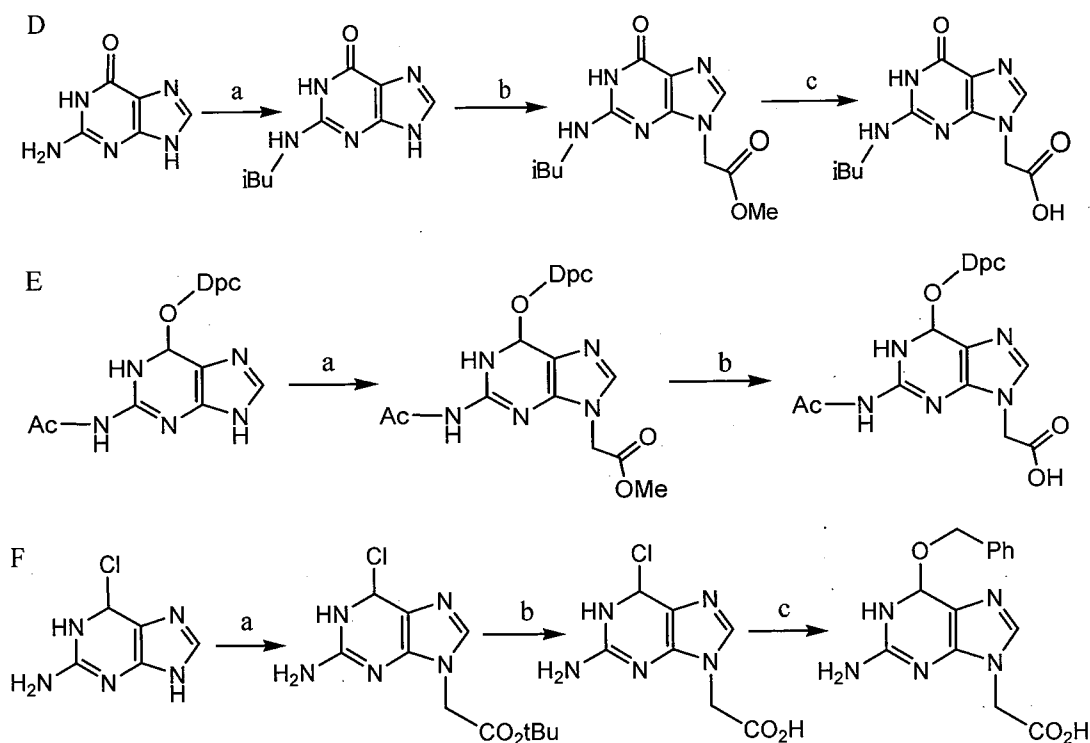


图 2-15 合成鸟嘌呤乙酸衍生物

Figure 2-15 Synthesis of guanyl acetic acid derivatives.

表 2-9 合成鸟嘌呤乙酸衍生物的试剂

Table 2-9 The reagent for the synthesis of guanyl acetic acid derivatives

路线	反应试剂及条件	Ref.
A	a. BrCH_2COOH ; b. PhCH_2ONa , DMF.	[1]
B	a. $\text{BrCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$, K_2CO_3 , DMF; b. 1M HCl, reflux; c. Cbz-imidazole, [18]crown-6, KH, THF; d. 1. O_3 , DCM, MeOH; 2. Me_2S ; 3. NaClO_2 , NaH_2PO_4 , H_2O , THF, tBuOH, 2-methyl-2-butene.	[15]
C	a. $\text{BrCH}_2\text{COOMe}$, NaH/DMF; b. Mmt-Cl, pyridine, NEt_3 ; c. 10%NaOH(aq), reflux	[18]
D	a. Isobutyryl chloride, NEt_3 /DMF; b. $\text{BrCH}_2\text{COOMe}$, NaH/DMF; c. NaOH, H_2O /dioxane.	[11]
E	a. $\text{BrCH}_2\text{COOMe}$, DMF, DIEA; b. NaOH/ MeOH/ dioxane/ H_2O .	[13]
F	a. BrCH_2COOH , K_2CO_3 , DMF; b. $\text{BrCH}_2\text{COOtBu}$, K_2CO_3 , Cs_2CO_3 , DMF; c. TFA, DCM, Et_3SiH ; d. Na, PhCH_2OH , DMF, THF.	[11]

由于图 2-15 A 路线相对简单, 且合成操作简单, 试剂易得, 因此我们在实际合成中便采用了这条路线。2-氨基-6-氯嘌呤首先用溴乙酸 9 位烷基化, 但是同时也有小部分 7 位被烷基化, 需要分离除去, 然后再和苄醇钠反应就得到产物。

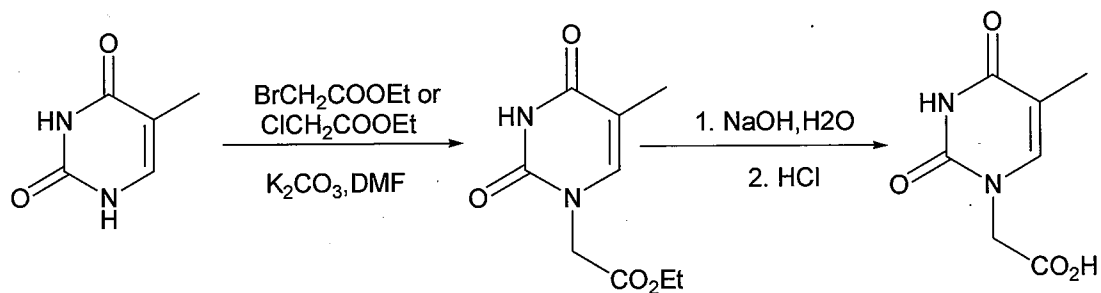
2.3.4 实验

2.3.4.1 保护试剂 Cbz-Cl 的合成

反应路线见图 2-11

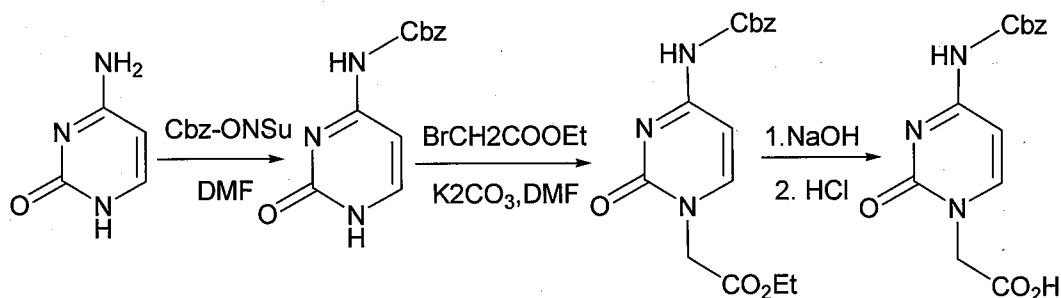
100 ml 苯甲醇中加入 1.85 ml 吡啶，冰浴，剧烈搅拌下，分批加入研细的固体光气，并接尾气回收装置，0℃下反应 3 天，减压除去残余光气和 HCl，最后剩余接近 100 ml，分液漏斗分去上层少量水珠，加入无水硫酸钠干燥，得到 140 克 Cbz-Cl，产率 85%，密封放入冰箱保存。

2.3.4.2 胸腺嘧啶乙酰化



称取已研磨成粉末状的胸腺嘧啶 (T) 50.0 g 与无水碳酸钾 54.8 g 悬浮于 1.2 L DMF 中，加入溴乙酸乙酯 37.5 ml (或氯乙酸乙酯)。氮气保护下，反应 24 h 后 (或回流)，过滤，减压蒸出 DMF。剩余物中加入 375 ml 水，冰浴下用浓盐酸调节 pH=2，搅拌半小时，溶液过滤并各用 200 ml 冰水洗涤沉淀 3 次。向沉淀中加入 400 ml 水和 200 ml 2 mol/L 氢氧化钠，加热煮 10 min 后，冷却，不断搅拌下，用浓盐酸调节 pH 值 1-2，过滤，干燥，即得白色固体产物 47.5 克，产率 65%。FT-IR: $\nu_{\text{N-H}}$: 3405, $\nu_{\text{O-H}}$: 3178 (缔合) $\nu_{\text{C-H}}$: 3026 ν_{CH_3} : 2962, $\nu_{\text{C=O}}$ 1739(羧基) 1706, 1681 (杂环)，杂环骨架: 1663, 1631, δ_{CH_2} :1419(as), δ_{CH_3} :1356, $\nu_{\text{C-N}}$: 1259, $\nu_{\text{C-O}}$: 1203, $\gamma_{\text{O-H}}$: 927; ESI-MS: $[\text{M-H}]^- = 183.01$, $[\text{M-H-C}_2\text{H}_2\text{O}_2]^- = 125.01$; $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6): δ : 13.098 (s, 1H), 11.346 (s, 1H), 7.485 (s, 1H), 4.354 (s, 2H), 1.739 (d, 3H).

2.3.4.3 胞嘧啶的保护及乙酰化



C^Z 合成:

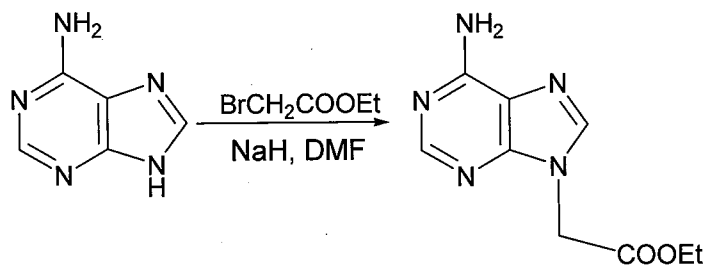
称取胞嘧啶 10 g(91 mmol), 溶于 350 ml 干燥 DMF, 10 分钟后加入苯甲氧羰酰琥珀酰亚氨 25 g(100 mmol), 65°C 反应过夜, 减压蒸除溶剂, 加水 150 ml, 用 4M HCl 调 $\text{pH}=1$, 抽滤, 水洗 2 次, 得白色微黄色固体, 加入乙醇 300 ml, 回流 15 分钟, 过滤, 乙醇洗两次, 乙醚洗两次, 得白色固体 19.03 g, 产率 85.57%。FT-IR: $\nu_{\text{C-H}}$: 2964 $\nu_{\text{C=O}}$: 1745, 1693, $\nu_{\text{C-O}}$: 1203; ESI-MS: $[\text{M}+\text{H}]^+=246.25$; 不能溶于一般氘代试剂, 未作 NMR.

$C^Z\text{CH}_2\text{COOH}$ 合成:

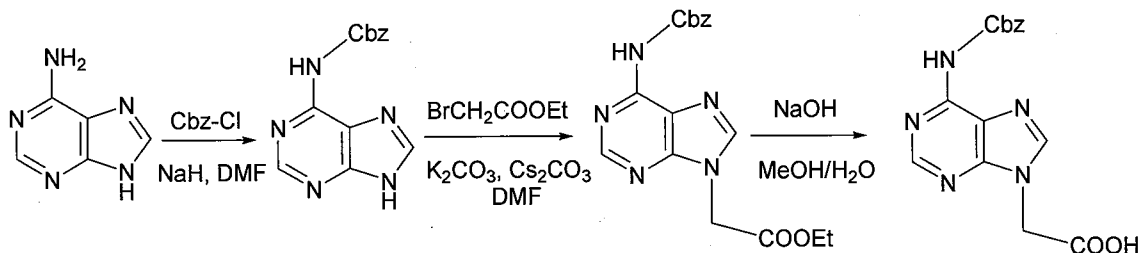
10 g C^Z 和 4.8 g 无水 K_2CO_3 悬浮在 150 ml 干燥的 DMF 中, 剧烈搅拌下, 加入 4.6 ml 溴乙酸乙酯, 氮气保护下, 反应过夜。混合物被过滤, 减压蒸干, 残留物中加入 80 ml 水和 3 ml 2M HCl, 冰浴下搅拌 0.5 小时, 过滤, 水洗 (2×30 ml) 得 $C^Z\text{CH}_2\text{COOEt}$; ESI-MS: $[\text{M}]^+=331.05$ 。 $C^Z\text{CH}_2\text{COOEt}$ 悬浮在 80 ml 水中, 加入 2M NaOH 的 30 ml, 搅拌 1 小时, 混合液冷却到 0°C , 过滤除去不溶物, 滤液 0°C 下, 用盐酸调节 $\text{pH}=1-2$ 左右, 过滤所得沉淀, 水洗, 甲醇重结晶, 乙醚洗涤, 干燥得产物 6.1 克, 产率 45%。ESI-MS: $[\text{M}]^+=301.96$; $\nu_{\text{O-H}}$: 3453, $\nu_{\text{C=O}}$: 1758, 1708; ^1H NMR (DMSO- d_6): δ : 13.062 (s, 1H), 10.852 (s, 1H), 8.03 (d, 1H), 7.353 (m, 5H), 7.02 (d, 2H), 5.180 (s, 2H), 4.513 (s, 2H).

2.3.4.4 腺嘌呤 (A) 的保护及乙酰化

ACH_2COOEt 的合成



25 g A 溶于 375 ml DMF 中, 然后 8.46 g NaH 分批加入其中, 在氮气保护下, 搅拌反应 2 小时, 3 小时内滴加 41.25 ml 溴乙酸乙酯, 室温搅拌反应过夜, 过滤, 沉淀水洗三次, 干燥得产物 25.4 克, 产率 62%。FT-IR: $\nu_{\text{C-H}}$: 3297, 3112, $\nu_{\text{C-H}}$: 2923 $\nu_{\text{C=O}}$: 1754, $\nu_{\text{C-O}}$: 1220; ^1H NMR(DMSO- d_6): δ : 8.11 (d, 2H), 7.275 (s, 2H), 5.052 (d, 2H), 4.15 (q, 2H), 1.199 (t, 3H)。



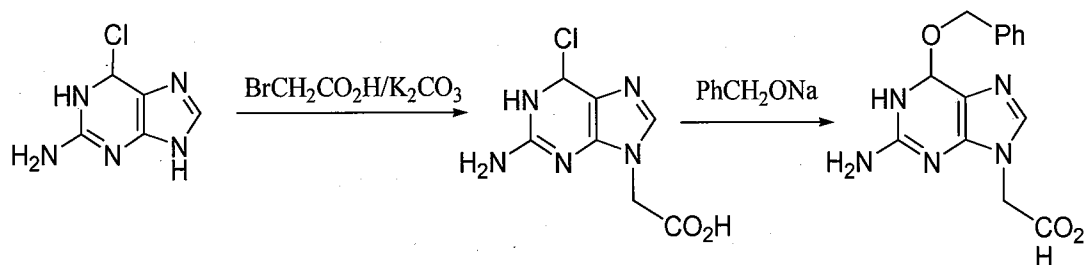
A^Z 的合成:

NaH (6.07 g, 152 mmol, 60/5 dispersion in oil) 加入到冰冷的 150 ml DMF 中, 剧烈搅拌下, 分批加入 5 g 腺嘌呤 (37 mmol), 悬浮物被剧烈搅拌 3 min, 然后滴加 11.6 ml 的 Cbz-Cl, 搅拌 4 小时后, 倒入 300 ml 冰水中, 再用 1M HCl 调 pH=7, 过滤, 沉淀水洗, 最后甲醇和三氯甲烷混合液重结晶, 冰箱过夜, 过滤的白色产物 2.61 克, 产率 20%。FT-IR: $\nu_{\text{N-H}}$: 3374, $\nu_{\text{C-H}}$: 2965, $\nu_{\text{C=O}}$: 1745, 杂环骨架: 1581; ESI-MS: $[\text{M}+\text{H}]^+=270.14$; ^1H NMR(DMSO- d_6): δ : 12.256 (s, 1H), 11.065 (s, 1H), 8.585 (s, 1H), 8.433 (s, 1H), 7.389 (m, 5H), 5.281 (s, 2H).

$A^Z\text{CH}_2\text{COOH}$ 的合成:

5.0 g A^Z , 2.6 g K_2CO_3 和 0.6 g Cs_2CO_3 悬浮于 40 ml 干燥的 DMF 中, 搅拌下滴加 2.3 ml 溴乙酸乙酯, 搅拌反应 1 天, 混合物被减压蒸干, 残留物溶在 350 ml 乙酸乙酯, 水洗 (100 ml), 盐水洗 (100 ml), 无水硫酸钠干燥, 减压蒸干, 乙酸乙酯/环己烷重结晶得到 $A^Z\text{CH}_2\text{COOEt}$, 0°C 下, 加入 40 ml 1M NaOH, 反应 1 小时后, 加入 40 ml 水, 室温反应过夜, 过滤除去不溶物, 0°C 下用盐酸调 pH=2, 过滤, 水洗, P_2O_5 真空干燥得产物 1.22 g, 产率 20%。FT-IR: $\nu_{\text{C=O}}$: 1760, 1724; ESI-MS: $[\text{M}-\text{H}]^-=326.07$, $[\text{M}-\text{H}-\text{CO}_2]^-=281.98$; ^1H NMR(DMSO- d_6): δ : 10.701 (s, 1H), 8.608 (s, 1H), 8.418 (s, 1H), 7.388 (m, 5H), 5.208 (s, 2H), 5.061 (s, 2H).

2.3.4.5 鸟嘌呤的保护与乙酰化



Cl-G-CH₂COOH 的合成:

5.02 g 6-氯-嘌呤和 12.91 g K₂CO₃ 悬浮在 50 ml DMF 中, 4.70 g BrCH₂COOH 加入其中, 氮气保护下, 剧烈搅拌反应一天, 加入 150 ml 水, 过滤, 溶液调酸到 pH=2, 过滤, P₂O₅ 干燥得产物 3.49 克, 产率 52%。ESI-MS: [M-H]⁻=226.01, [M-H-CO₂]⁻=182.08。

Bn-G-CH₂COOH 的合成:

2.0 g 钠加入到 20 ml 苯甲醇中, 加热到 130 °C 反应两小时, 冷到室温后, 把溶有 4.05 g Cl-G-CH₂COOH 冰冷的 DMF 85 ml 加入其中, 室温下, 溶液被搅拌反应过夜, 100 ml 1M NaOH 溶液加入到反应溶液中, 得到透明的溶液后, 用乙酸乙酯洗涤 (2×200 ml), 水相用 4M 的 HCl 调节 pH=3, 沉淀用乙酸乙酯萃取, 有机相用盐水洗, 干燥, 减压蒸干, 粗产物用乙醇重结晶, 得 2.73 g, 产率 46.32%。ESI-MS: [M-H]⁻=298.11, [M-H-CO₂]⁻=254.17; ¹H NMR(DMSO-d₆): δ: 13.215 (s, 1H), 7.822 (s, 1H), 7.355 (m, 5H), 6.512 (s, 2H), 5.487 (s, 2H), 4.808 (s, 2H)。

2.4 经典 PNA 单体的合成

经典 PNA 单体的合成已经被广泛研究, 但能够比较好的, 在后来固相合成中应用的主要分为两类: 一类是单体氮端是酸性脱除保护基, 另一类是单体氮端是碱性脱除保护基^[2]。

2.4.1 单体氮端是酸性脱除保护基

PNA 第一次被报道时, 氮端便是 TFA 易于脱除的 Boc 作保护基, 碱基环外氨基保护基 Cbz 或 Bz, 而 Cbz 或 Bz 可以用强酸液态 HF 或 TFMSA 脱除^[27, 28]。这种单体的合成路线见图 2-16。

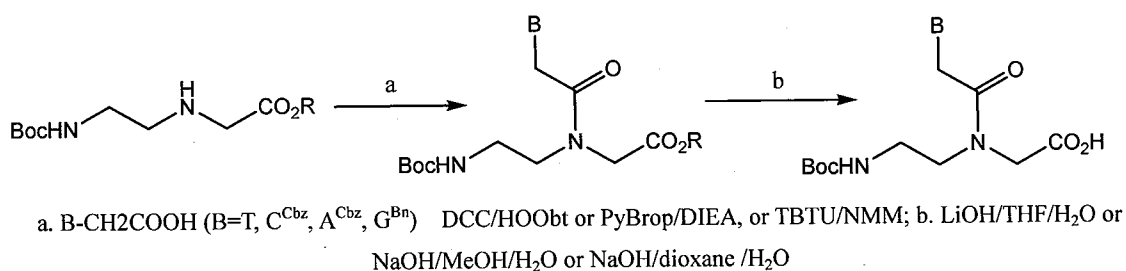


图 2-16 Boc 单体的合成

Figure 2-16 Synthesis of Boc monomers

这种单体比较适合手工合成 PNA 寡聚体, 手工合成投资低, 启动快因而具有优势, 经过不断的研究, 现在合成条件也已比较固定。合成方法就是碱基乙酸与 Boc 保护的氨乙基甘氨酸酯骨架偶联, 偶联试剂都是标准肽合成中所用的偶联试剂 DCC/HOObt 或 PyBrop 或 TBTU。我们实验室为了方便手工合成 PNA 和降低成本, 因此也选用这种单体。

随着 PNA 研究的深入, PNA 在应用方面也有一些不容忽视的缺点, 比如不能被核酸修饰酶识别 (虽然在许多情况下这也是优点), 溶解度低, 透过细胞膜的能力差等, 然而 PNA/DNA 嵌合体却能克服这些缺点, 因此 PNA/DNA 嵌合体的合成便具有十分重要的意义。现有的 Boc 化学在脱除保护基时要用到强酸 (TFA, HF, TFMSA), 当他们被用于合成 PNA/DNA 嵌合体时, 将造成脱嘌呤现象, 因此这种单体是和合成 DNA 不兼容的。因此单体氮端和碱基环外氨基的保护基都需要更加温和的保护基团。图 2-17 综述了在合成嵌合体中已经被应用的 PNA 单体的合成方法路线, 表 2-10 显示了各种方法所用的试剂。

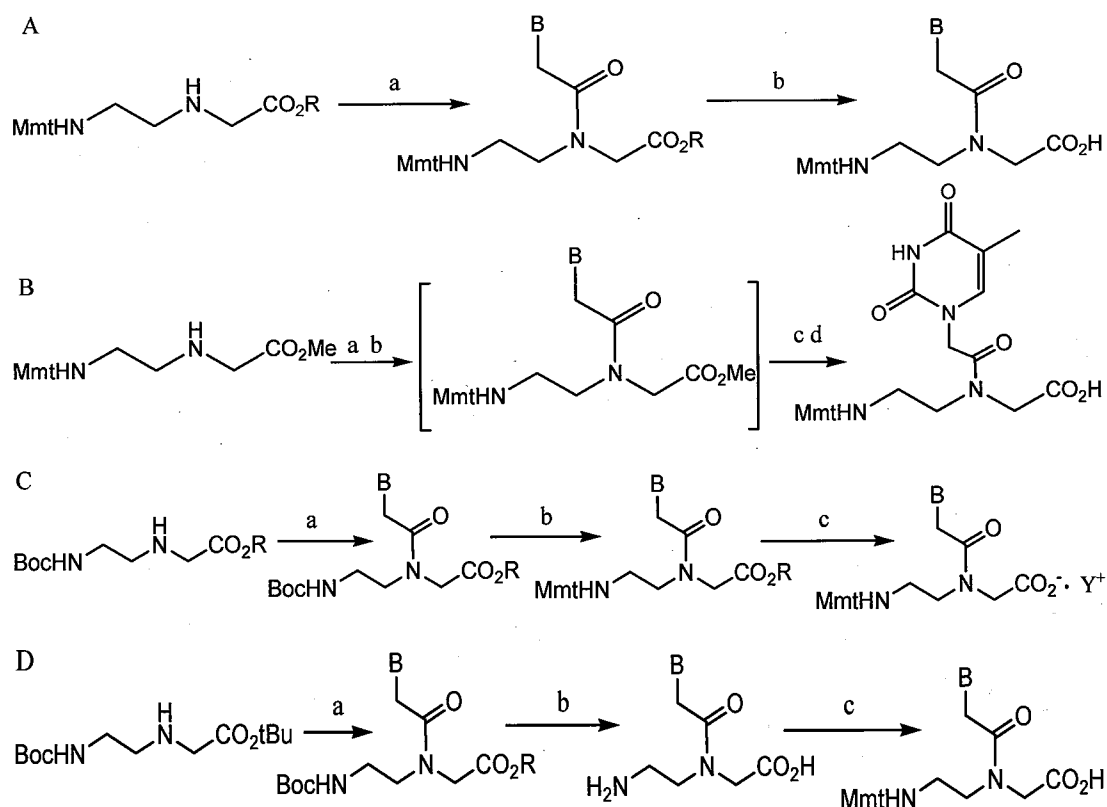


图 2-17 Boc-和 Mmt-PNA 单体的合成

Figure 2-17 Synthesis of Boc- and Mmt-PNA monomers

表 2-10 合成 PNA 单体的试剂 1

Table 2-10 The reagent 1 for the synthesis of PNA monomers

路线	R/ Y ⁺	反应条件及试剂	Ref.
A	Me	a. B-CH ₂ COOH (B=T, tBuBz-C, An-C, An-A, iBu-G), TOTU, NEM/DMF; b. NaOH, H ₂ O/dioxane.	[11]
A	Et	a. B-CH ₂ COOpfp (B=T, U), Et ₃ N, acetonitrile ; b. 1. NaOH, H ₂ O/dioxane, 2. nBu ₄ NHSO ₄ .	[29]
B		a. ClCH ₂ COCl, NEt ₃ , THF; b. DMF, THF; c. thymine, K ₂ CO ₃ , DMF; d. NaOH, H ₂ O/dioxane.	[12]
C	Me/Bu ₄ N ⁺	a. T-CH ₂ COOH; b. 1. 6%HCl/AcOH, 2. Mmt-Cl, NEt ₃ , DCM ; c. Bu ₄ NOH, dioxane	[30]
C	Et/Py ⁺	a. B-CH ₂ COOH (B=T, Bz-C, Bz-A); b. 1.TFA 2.Mmt-Cl, Py. c. 1.2 M NaOH, MeOH, 2. Dowex py ⁺	[31]
D		a. B-CH ₂ COOH (B=T, An-C, An-A, iBu-G, Ac-O6-Dpc-G), TOTU, NEM/DMF or propylphosphonic anhydride, EtOAc, NEt ₃ ; b. 95% TFA, c. Mmt-Cl, NEt ₃ , DMF.	[13]

由于Boc-PNA单体不适合PNA/DNA嵌合体的合成,所以E. Uhlmann等^[29-32]合成了脱除条件更为温和的Mmt-PNA单体,它可以用三氯乙酸脱去Mmt,而碱基环外氨基保护基用碱脱除,这样在DNA合成中建立的苯甲酰基、甲氧苯甲酰基、叔丁苯甲酰基等就可以和Mmt-PNA相兼容了。这些Mmt-PNA单体基本都是利用偶联剂TOTU使碱基乙酸与Mmt-Aeg-OEt骨架偶联,而为了合成方便,简化提纯步骤图2-15中C, D路线将是不错的选择。

2.4.2 单体氮端是碱性脱除保护基

虽然Boc化学有许多优点,但是也有一些局限性,最大的问题就是脱除保护基时的强酸条件,这将导致不能直接用于商业DNA合成仪,而Fmoc方案却是在吡啶/DMF的温和弱碱的条件下脱除,因此可以直接用于自动合成仪,因此Fmoc保护氮端的PNA单体也被广泛应用。图2-18显示Fmoc-PNA单体的合成,表2-11显示了合成条件及试剂。Fmoc可以用弱碱脱除,因此碱基环外氨基保护基可以使强酸脱除的Cbz,也可以使弱酸脱除的Mmt或Bhoc。若是Fmoc与Cbz组合,由于

Cbz 仍需强酸脱除, 因此比较适合在多肽合成仪上合成 PNA 寡聚体, 当然也可以手工合成 PNA 寡聚体。Fmoc 与 Bhoc 组合可谓是最好的组合, 因为 Bhoc 将使 PNA 单体有较大的溶解度, 而且在 0.2 mol/l 的 NMP 中保存数周, 而且在市场上容易买到。

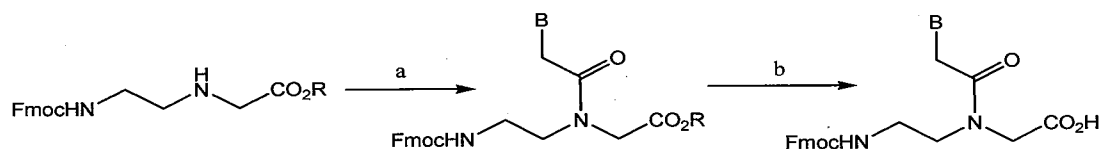


图 2-18 Fmoc-PNA 单体的合成

Figure 2-18 Synthesis of Fmoc-PNA monomers

表 2-11 合成 PNA 单体的试剂 2.

Table 2-11 The reagent 2 for the synthesis of PNA monomers.

R	反应条件及试剂	Ref.
tBu	a. B-CH ₂ COOH (B=T, CBz-C, Cbz-A, Cbz-G), EDC, DMF or BOP, HOBT, DMF; b. HCl/dioxane or TFA, DCM, Et ₃ SiH.	[15]
Me	a. B-CH ₂ COOH (B=T, Mmt-C, Mmt-A, Mmt-G), TOTU or PyBOP/DMF/NEt ₃ ; b. NaOH, H ₂ O/dioxane.	[18]
	B-CH ₂ COOH (B=T, Bhoc-C, Bhoc -A, Bhoc -G), 未提到合成方法	[3, 5]

2.4.3 实验

辅助缩合剂 (HOObt) 合成

合成 PNA 单体就是碱基乙酸衍生物和骨架之间的缩合反应, 为了提高产率, 一般需要辅助缩合剂, 我们在合成中用的是 HOObt, 图 2-19 是其合成方法^[33]。

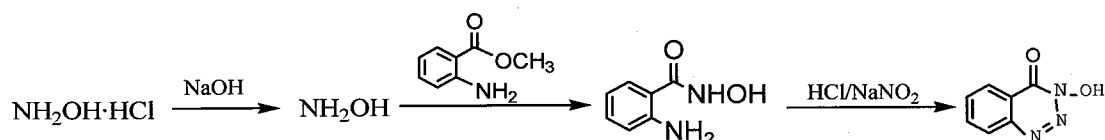


图 2-19 HOObt 的合成

Figure 2-19 Synthesis of HOObt

取 32 g 氢氧化钠溶于 200 ml 水中, 冷却至室温, 搅拌下分批加入盐酸羟胺共 27.7 g, 滴加 25.8 ml 2-氨基苯甲酸甲酯与 20 ml 甲醇混合液。室温下反应 3 天。减压蒸馏至出现白色的钠盐沉淀 (此时约有 65 ml 母液)。冷却后抽滤, 沉淀用石油醚洗涤, 干燥得白色固体共 25.3 g。将所制得白色固体 (1) 溶于 40 ml 浓盐酸中, 用

500 ml 水稀释。在控温 0-5 °C 搅拌下, 滴加亚硝酸钠溶液 (11 g 亚硝酸钠溶于 350 ml 水中), 重氮化。溶液在室温下继续搅拌反应 45 min。溶液过滤, 烘干沉淀得白色固体 HOObt 共 15.2 g。FT-IR: $\nu_{\text{O-H}}$: 3440, $\nu_{\text{C-H}}$: 3035, $\gamma_{\text{合频}}$: 1674, $\nu_{\text{C=O}}$: 1637, 骨架振动: 1272, $\delta_{\text{C-H}}$: 1068, $\gamma_{\text{C-H}}$: 777, 684(苯环相邻四个氢); FAB-MS: $[M]^+ = 162.9$; ^1H NMR(DMSO- d_6): δ : 12.923 (s, 1H), 8.271 (m, 1H), 8.192 (m, 1H), 8.072 (m, 1H), 7.910 (m, 1H).

胸腺嘧啶单体的合成(BTH)

取 2.556 g TCH_2COOH 溶于 24 ml DMF 中, 置于冰浴中, 加入 2.487 g HOObt, 用 48 ml DCM 溶解骨架 3.34 g, 加入到上述 DMF 溶液中, 再加入 3.408 g DCC 冰浴搅拌一小时, 然后室温搅拌 3 小时, 过滤, 沉淀用 DCM 洗涤 (3×15 ml), 合并有机相, 再加入 20 ml DCM, 用 4% 的 NaHCO_3 水溶液洗涤 (3×30 ml), 4% 的 NaHSO_4 水溶液洗涤 (2×30 ml), 用半饱和盐水洗涤 (1×30 ml), 有机相先过滤除去沉淀, 再用无水硫酸钠干燥, 减压蒸出溶剂。将残留物溶于 20 ml DCM 中, 冰浴下加入 50 ml 石油醚, 搅拌半小时, 得沉淀, 再将沉淀溶于 15 ml DCM 中, 冰浴下再加入 50 ml 石油醚, 搅拌半小时, 得白色沉淀 BTOEt。FT-IR: $\nu_{\text{N-H}}$: 3448 $\nu_{\text{C-H}}$: 3170, $\nu_{\text{C=O}}$: 1734, 1697; FAB-MS: $[M+H]^+ = 413.4$ 。

BTOEt 溶于 35 ml THF 中, 加入 1 mol/L 的 LiOH 30 ml, 室温下反应 45 min, 过滤, 水溶液用 50 ml DCM 洗涤, 水相在冰浴中用 4 M HCl 调节 pH=2 后, 用乙酸乙酯萃取 (9×20 ml), 有机相用无水硫酸钠干燥, 减压蒸干溶剂, 得固体 2.75 g, 产率 52.3%。m.p. 121-123 °C; FT-IR: $\nu_{\text{N-H}}$: 3367, $\nu_{\text{O-H}}$: 3165 (缔合), $\nu_{\text{C-H}}$: 2981, $\nu_{\text{C=O}}$: 1736(羧基), 1687 (杂环), $\delta_{\text{叔丁基}}$: 1390, 1365, 叔丁基的骨架振动: 1250, 1195, $\nu_{\text{C-N}}$: 1283; ESI-MS: $[M-H]^- = 383.4$; FAB-MS: $[M]^+ = 384.1$, $[M-\text{Boc}+H]^+ = 284.1$, $[M-\text{Boc}-OH]^+ = 266.1$, $[\text{TCH}_2\text{CO}]^+ = 166.9$, $[\text{TCH}_2]^+ = 139.0$; ^1H NMR(DMSO- d_6): δ : 12.76 (s, 1H), 11.298/11.279 (2×s, 1H), 7.295/7.257 (2×s, 1H), 6.393/6.754 (2×t, 1H), 4.628/4.455 (2×s, 2H), 4.180/3.955 (2×s, 2H), 3.369/3.286 (2×m, 2H+ H_2O), 3.155/3.104 (m, 2H), 1.976 (s, 3H), 1.365 (s, 9H). ^{13}C NMR(DMSO- d_6): 172.733 和 172.641, 170.108 和 169.673, 166.987, 158.419, 152.978, 143.616, 110.935, 80.574 和 80.231, 50.885, 49.878, 49.641, 48.359, 39.386 和 39.703, 28.742 和 28.696, 12.252.

胞嘧啶单体的合成(BC^ZH)

称取骨架 6 g, HOObt 4.32 g, C^ZH 8 g 悬浮于 120 ml DMF 中, 加入 120 ml DCM, 冰浴冷至 0 °C 后, 加入 6 g DCC, 冰浴搅拌 4 小时, 室温搅拌 1 小时, 减压蒸干溶剂, 加入 350 ml 三氯甲烷, 过滤, 滤液用水洗涤 (3×80 ml), NaHCO_3 溶液洗涤 (120 ml, 0.1M), 再水洗 (120 ml), 有机相用无水硫酸钠干燥, 蒸干得黄色固体, 用 120 ml 甲醇重结晶, 得白色固体 BC^ZOEt 。m.p. 198-201 °C; FT-IR: $\text{V}_{\text{N-H}}$: 3353, $\text{V}_{\text{C-H}}$: 2927, $\text{V}_{\text{C=O}}$: 1747, 1698; ESI-MS: $[\text{M}+\text{H}]^+=532.13$; ^1H NMR(DMSO- d_6): $\delta=10.795$ (s, 1H), 7.899 (d, 1H), 7.397 (m, 5H), 7.01 (d, 1H), 6.943/6.744 (2×t, 1H), 5.178 (s, 2H), 4.808/4.622 (2×s, 2H), 4.325/4.308 (2×s, 2H), 3.421/3.327 (2×m, 2H+ H_2O), 3.186/3.009 (2×m, 2H), 1.335 (s, 9H), 1.216 (q, 2H), 1.038 (t, 3H)。

BC^ZOEt 溶于 120 ml THF 中, 加入 1M LiOH 60 ml 搅拌 20 min, 冷却到 0 °C, 用 1M HCl 调 pH=2, 出现沉淀, 过滤, 沉淀溶于 80 ml DCM, 0 °C 搅拌下, 加入 80 ml 石油醚, 过滤得白色产物。FT-IR: $\text{V}_{\text{N-H}}$: 3251, $\text{V}_{\text{C-H}}$: 2977, $\text{V}_{\text{C=O}}$: 1754, 1735, 1693; ESI-MS: $[\text{M}-\text{H}]^-=502.04$; ^1H NMR(DMSO- d_6): $\delta=10.80$ (s, 1H), 7.888 (t, 1H), 7.396 (m, 5H), 7.017 (t, 1H), 6.947/6.764 (2×t, 1H), 5.178 (s, 2H), 4.803/4.616 (2×s, 2H), 4.178/4.366 (2×s, 2H), 3.401/3.301 (2×m, 2H+ H_2O), 1.363 (s, 9H)。

腺嘌呤单体的合成(BA^ZH)

称取骨架 2.0 g, HOObt 1.46 g, A^ZH 2.92 g 悬浮于 15 ml DMF 中, 加入 15 ml DCM, 冰浴冷至 0 °C 后, 加入 2.01 g DCC, 冰浴搅拌 2.5 小时, 然后室温搅拌 3 小时, 过滤, DMF (15 ml) 洗涤, DCM (15 ml) 洗涤, 合并有机相, 再向有机相中补加 100 ml DCM, 依次用 NaHCO_3 洗涤 (3×100 ml), KHSO_4 洗涤 (2×100 ml), 盐水洗 (1×100 ml), 有机相用无水硫酸钠干燥, 蒸干得黄色油状体, 溶于 50 ml 乙醇, 加入活性炭, 加热搅拌 10 min, 过滤, 加水 30 ml, 充分搅拌, 冰箱放置过夜, 过滤, 干燥得白色沉淀 BA^ZOEt 。FT-IR: $\text{V}_{\text{N-H}}$: 3414, $\text{V}_{\text{C-H}}$: 2933, $\text{V}_{\text{C=O}}$: 1751, 1708, 1672; ESI-MS: $[\text{M}]^+=556.29$; ^1H NMR(CDCl_3): $\delta=8.710/8.701$ (2×s, 1H), 8.059/8.008 (2×s, 1H), 7.363 (m, 5H), 5.562 (t, 1H), 5.265 (s, 2H), 5.111/4.951 (2×s, 1H), 4.248/4.167 (2×q, 2H), 4.027 (s, 1H), 3.610/3.526 (2×m, 2H), 3.373/3.22 (2×m, 2H+ H_2O), 2.141 (s, 9H), 1.229 (t, 3H)。

1.48g AC^ZOEt 溶于 13 ml THF 中, 冰浴, 加入 1M LiOH 8 ml 搅拌 20 min, 加入 25 ml 水, 用 DCM 洗涤 (2×20 ml), 水溶液用 1M HCl 调 pH=2, 出现沉淀, 过滤, DCM/石油醚重结晶, 过滤, 干燥得白色产物。m. p. 118-119°C; FT-IR: $\nu_{\text{N-H}}$: 3251, $\nu_{\text{C-H}}$: 2977, $\nu_{\text{C=O}}$: 1754, 1735, 1693; ESI-MS: $[\text{M-H}]^-$ =526.14; $^1\text{H NMR}(\text{DMSO-d}_6)$: δ =12.783 (s, 1H), 10.687/10.675 (2×s, 1H), 8.600/8.590 (2×s, 1H), 8.320/8.310 (2×s, 1H), 7.401 (m, 5H), 7.058/6.782 (2×t, 1H), 5.355/5.155 (2×s, 2H), 5.221 (s, 2H), 4.331/3.990 (2×s, 2H), 3.517/3.341 (2×t, 2H), 3.261/3.047 (2×t, 2H), 1.385 (s, 9H)。

鸟嘌呤单体的合成:

称取 $\text{G}^{\text{P}}\text{H}$ 2.15 g 和 TBTU 2.42 g 溶解在 30 ml DMF 中, 加入到含有骨架 1.83 g 的 10 ml DMF 中, 立即加入 1.1 ml NMM, 在氮气保护下, 搅拌过夜, 减压蒸干溶剂, 加入 250 ml CHCl_3 , 水洗涤 (3×50 ml), 有机相用无水硫酸钠干燥, 蒸干溶剂, 残留物用乙酸乙酯/正己烷重结晶的白色固体 $\text{BG}^{\text{P}}\text{OEt}$ (m. p. 169-170 °C), 把 $\text{BG}^{\text{P}}\text{OEt}$ 悬浮在 10 ml 水中, 冰至 0°C 后, 加入 1M NaOH 3.2 ml, 再加入 18ml 乙醇, 搅拌 3 小时, 过滤除去不溶物, 用 4M HCl 调节 pH=3, 用乙酸乙酯萃取 (5×20 ml), 干燥, 蒸干得白色产物 0.813 g, 产率 22.7%。; FT-IR: $\nu_{\text{O-H}}$: 3413, $\nu_{\text{C-H}}$: 2977, $\nu_{\text{C=O}}$: 1710; ESI-MS: $[\text{M-H}]^-$ =498.21; $^1\text{H NMR}(\text{DMSO-d}_6)$: δ =7.697/7.504 (2×d, 1H), 7.392 (m, 5H), 7.020/6.781 (2×t, 1H), 6.452 (s, 2H),), 5.488 (s, 2H), 5.035/4.870 (2×s, 2H), 4.292/3.975 (2×s, 2H), 3.473/3.339 (2×t, 2H+ H_2O), 3.233/3.100 (2×m, 2H), 1.363/1.353 (2×s, 9H)。

参考文献

1. K. L. Dueholm, M. Egholm, C. Behrens, L. Christensen, H. F. Hansen, T. Vulpius, K. H. Petersen, R. H. Berg, P. E. Nielsen, O. Buchardt, Synthesis of Peptide Nucleic Acid Monomers Containing the Four Natural Nucleobases: Thymine, Cytosine, Adenine, and Guanine and Their Oligomerization *J. Org. Chem.* 1994, 59: 5767-5773.
2. E. Uhlmann, A. Peyman, G. Breipohl, D. W. Will, Synthetic Polyamide Nucleic Acids with Unusual Binding Properties. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1998, 37: 2796-2823.
3. P. E. Nielsen, peptide nucleic acids methods and protocols, *Methods in Molecular Biology*, V208, 2002.

4. 何为 马立人主编, 肽核酸, 化学工业出版社, 2003.
5. P. E. Nielsen, *Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications* 2nd Ed. 2004.
6. B. Hyrup, P. E. Nielsen, *Peptide Nucleic Acids (PNA): Synthesis, Properties and Potential Applications Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 1996, 4: 5-23.
7. 黄惟德, 陈常庆著, 多肽合成, 科学出版社, 1985.
8. S. A. Kates. A. Fernando, *Solid-Phase Synthesis A Practical Guide* 2000 Marcel Dekker, Inc. 270 Madison Avenue, New York, NY.
9. 王德心主编, 固相有机合成-原理及应用指南, 化学工业出版社, 2004.
10. G. Breipohl, D. W. Will, A. Peyman, E. Uhlmann, Novel synthetic routes to PNA monomers and PNA-DNA linker molecules, *Tetrahedron*. 1997, 53: 14671-14686.
11. D. W. Will, G. Breipohl, D. Langner, J. Knolle, E. Uhlmann, The synthesis of polyamide nucleic acids using a novel monomethoxytrityl protecting-group strategy, *Tetrahedron* 1995, 51: 12069-12082.
12. G. Breipohl, D. W. Will, D. Langner, J. Knolle, E. Uhlmann, Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis (Ed.: R. Epton), Mayflower, Birmingham, UK, 1996, S. 61- 64.
13. 13 G. Breipohl, D. W. Will, A. Peyman, E. Uhlmann, Novel synthetic routes to PNA monomers and PNA-DNA linker molecules, *Tetrahedron*, 1997, 53: 14671-14686.
14. P. J. Finn, N. J. Gibson, R. Fallon, A. Hamilton, T. Brown, Synthesis and properties of DNA-PNA chimeric oligomers, *Nucleic Acids Res.* 1996, 24: 3357-3363.
15. S. A. Thomson, J. A. Josey, R. Cadilla, M. D. Gaul, C. F. Hassman, M. J. Luzzio, A. J. Pipe, K. L. Reed, D. J. Ricca, R. W. Wiethe, S. A. Noble, Fmoc mediated synthesis of Peptide Nucleic Acids. *Tetrahedron*. 1995, 51: 6179-6194.
16. G. Aldrian-Herrada, A. Rabié, R. Wintersteiger, J. Brugidou, Solid-phase Synthesis of Peptide Nucleic Acid (PNA) Monomers and Their Oligomerization Using Disulphide Anchoring Linkers, *J. Peptide Sci.* 1998, 4: 266-281.
17. D. A. Stetsenko, E. N. Lubyako, V. K. Potapov, T. L. Azhikina, E. D. Sverdlov, New approach to solid phase synthesis of polyamide nucleic acids analogues (PNA) and PNA-DNA conjugates, *Tetrahedron Lett.* 1996, 37: 3571-3574.
18. G. Breipohl, J. Knolle, D. Langner, G. OMalley, E. Uhlmann, Synthesis of polyamide nucleic acids (PNAs) using a novel Fmoc/Mmt protecting-group combination, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1996, 6: 665-670.
19. K. L. Dueholm, M. Egholm, O. Buchardt, An efficient synthesis of Boc-aminoacetaldehyde and its application to the synthesis of N-(2-Boc-aminoethyl)glycine esters, *Org. Prep. Proced. Int.* 1993, 25: 457-461.
20. 褚 征, 刘克良, 肽核酸的合成、修饰和应用, *有机化学*, 2005, 25: 254-263.
21. E. P. Heimer, H. E. Gallo-Torres, A. M. Felix, M. Ahmad, T. J. Lambros, F. Scheidl, J. Meienhofer, Synthesis of analogs and oligomers of N-(2-aminoethyl)glycine and their

- gastrointestinal absorption in the rat, *Int. J. Pept. Protein Res.* 1984, 23, 203-211.
22. B. Falkiewicz, W. Wisniowski, A. S. Kolodziejczyk, K. Wisniewski, Synthesis of new chiral peptide nucleic acid (PNA) monomers, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2001, 20: 1393-1397.
 23. R. D. Viirre, R. H. Hudson, A convenient and scalable synthesis of ethyl N-[(2-Boc-amino)ethyl]glycinate and its hydrochloride. Key intermediates for peptide nucleic acid synthesis. *J Org Chem*. 2003, 68: 1630-1632.
 24. Meltzer, P. C.; Liang, A. Y.; Matsudaira, P. Peptide Nucleic Acids: Synthesis of Thymine, Adenine, Guanine, and Cytosine Nucleobases, *J. Org. Chem.* 1995, 60: 4305-4308.
 25. L. Kosynkina, W. Wang, T. C. Liang, A convenient synthesis of chiral peptide nucleic acid (PNA) monomers, *Tetrahedron Lett.* 1994, 35: 5173-5176.
 26. K. L. Dueholm, M. Egholm, C. Behrens, L. Christensen, H. F. Hansen, T. Vulpius, K. H. Petersen, R. H. Berg, P. E. Nielsen, O. Buchardt, Synthesis of Peptide Nucleic Acid Monomers Containing the Four Natural Nucleobases: Thymine, Cytosine, Adenine, and Guanine and Their Oligomerization, *J. Org. Chem.* 1994, 59: 5767-5773.
 27. M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, R. H. Berg, Peptide nucleic acids (PNA). Oligonucleotide analogs with an achiral peptide backbone, *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114: 1895-1897.
 28. M. Egholm, C. Behrens, L. Christensen, R. H. Berg, P. E. Nielsen, O. Buchardt, Peptide nucleic acids containing adenine or guanine recognize thymine and cytosine in complementary DNA sequences, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1993, 800-801.
 29. D. A. Stetsenko, E. N. Lubyako, V. K. Potapov, T. L. Azhikina, E. D. Sverdlov, New approach to solid-phase synthesis of polyamide nucleic acids analogs (PNA) and PNA-DNA conjugates, *Tetrahedron Lett.* 1996, 37: 3571-3574.
 30. A. C. van der Laan, N. J. Meeuwenoord, E. Kuyl-Yeheskiely, R. S. Oosting, R. Brands, J. H. van Boom, Solid support synthesis of a PNA-DNA hybrid, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*. 1995, 114: 295-297.
 31. P. J. Finn, N. J. Gibson, R. Fallon, A. Hamilton, T. Brown, Synthesis and properties of DNA-PNA chimeric oligomers, *Nucleic Acids Res.* 1996, 24: 3357-3363.
 32. A. C. van der Laan, R. Brill, R. Kuimelis, E. Kuyl-Yeheskiely, J. H. van Boom, A. Andrus, R. Vinayak, A convenient automated solid-phase synthesis of PNA-(5')-DNA-(3')-PNA chimera, *Tetrahedron Lett.* 1997, 38: 2249-2252.
 33. T. Patrick Ahern, Thomas Navratil, and Keith Vaughan A study of 3-hydroxy-1,2,3-benzotriazin-4-one and its O-methyl and O-acyl derivatives. *Can. J. Chem.* 1977, 55: 630-639.

第三章 二茂铁标记 PNA 单体的合成及性质

3.1 引言

PNA是人工合成的DNA类似物,因为它具有非常好的特性,比如高的生物稳定性,对DNA、RNA有高的序列选择性,更重要的是PNA/DNA双螺旋结构比DNA/DNA双螺旋结构对错配有更高的灵敏度,所以PNA已经在基因治疗药物开发,基因诊断,生物传感器以及分子生物学等方面得到了广泛应用^[1-6]。为了高效的研究核酸以及核酸和肽等的相互作用,这就要求发展灵敏度高的方法来对它们进行识别和定量。分光光度技术,放射自显影技术,电化学技术已经在对核酸分析方面广为应用,它们一般都要求插入信号报告基团,报告基团的插入有利于提高检测分析的灵敏度并且不影响它们的结构和功能。由于PNA比DNA有诸多优势,其中PNA一端是氨基,一端是羧基更加容易进行标记引入报告基团,因此PNA的标记也引起了科学家们的极大兴趣。PNA的标记研究较多的是放射性标记、荧光标记、电化学标记等。本章着重讲电化学标记,主要是二茂铁衍生物标记分子的合成,以及它们对PNA单体标记的合成和它们电化学性质的研究^[7-9]。

3.2 放射性标记

放射性标记寡核苷酸有着广泛的应用,尤其是在对灵敏度和立体分辨率要求较高的应用中。虽然标记可采用化学方法完成,但大多数方法还是用酶,如聚合酶和激酶等,然而PNA不是已知的DNA酶的底物,因此这些方法都不会与PNA发生作用^[8]。由于PNA的合成、DNA的合成和肽的合成具有一致性,因此,PNA/DNA嵌合体和PNA-肽嵌合体是容易合成的。然而嵌合体既是酶底物有保留了PNA的杂交特性,所以可以对嵌合体进行放射性标记。放射性标记最多的就是³²P, ³⁵S, ¹²⁵I,当然还有放射性金属等^[10-12]。

3.3 荧光标记

荧光标记已经被广泛应用到核酸检测方面,由于PNA两端包含活性功能团很容易用荧光分子标记。荧光标记的PNA探针主要分两种:一种是LightUp探针,另一

其中环序列是与靶核酸互补的探针；茎的一端连接上一个荧光分子，另一端连上一个淬灭分子。当靶序列不存在时，分子信标呈茎环结构，茎部的荧光分子与淬灭分子非常接近(7~10 nm)，可发生 FRET，即荧光分子发出的荧光被淬灭分子吸收并以热的形式散发，此时检测不到荧光信号；当有靶序列存在时，分子信标的环序列与靶序列特异性结合形成稳定的双链体，比分子信标的茎环结构更稳定，荧光分子与淬灭分子分开，此时荧光分子发出的荧光不能被淬灭分子吸收，可检测到荧光。例如 Oliver Seitz 等人合成了这类双标记的 PNA 用于实时监测杂交。LightSpeed PNA 探针发光原理与分子信标是相同的，但是它的荧光分子和淬灭分子的靠近可能不是通过空间结构上的茎环结构，可能是由于 PNA 的疏水性质致使其二级结构利于荧光分子和淬灭分子的靠近造成荧光淬灭，当杂交时单链二级结构被破坏，荧光分子和淬灭分子彼此分离从而产生荧光^[17, 18]。

3.4 电化学标记

电化学方法检测核酸有诸多优势，高的灵敏度、低的费用、简便快速，更重要的是容易微型化设计成芯片，因此，电化学方法检测核酸引起了人们的极大兴趣^[19-22]。各种电化学检测方法也相继诞生，其中为了设计电化学核酸传感器，各种金属复合物修饰的核苷酸及其寡聚体也被合成，其中二茂铁是常用电活性标记分子，已被广泛应用到标记 DNA^[19, 23-28]，由于二茂铁小的体积，高的可逆性，高的氧化还原反应速率，高的生物稳定性，因此，二茂铁的衍生物也首先被应用到标记 PNA。为了利用本实验室在电化学方面的优势，我们也从二茂铁标记 PNA 作为起点，通过电化学来研究 PNA 与 DNA 杂交。

由于二茂铁非常容易功能化，因此用于标记的二茂铁衍生物也较多，常用的二茂铁衍生物标记分子，见图 3-3^[29, 30]。由于 PNA 包含了多个活性位点，因此二茂铁衍生物在标记 PNA 时，标记位置就灵活多变。

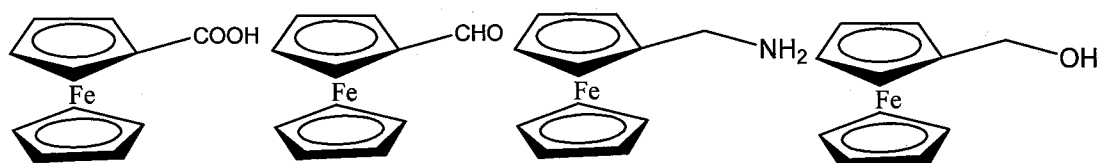


图 3-3 用于标记的二茂铁分子

Figure 3-3 The ferrocene derivatives used to label

3.4.1 标记在氮端

因为氮端存在氨基活性基团，其次在固相合成中氨基是自由裸露在外面的，所以标记在氮端是最为方便的。二茂铁标记在氮端的PNA单体以及寡聚体已经被 Metzler-Nolte, Clara Baldoli等小组合成^[31-34]。为了增加电化学信号，Clara Baldoli还把多个二茂铁标记在PNA单体上。图3-4是已经合成二茂铁标记的PNA单体和PNA寡聚体。

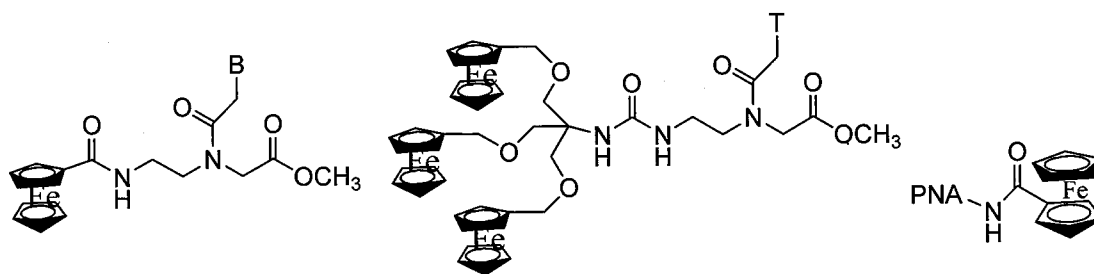


图3-4 二茂铁标记的PNA 1

Figure 3-4 The ferrocene labelled PNA 1

3.4.2 标记在碳端

在固相合成PNA寡聚体时，一般是碳端挂在树脂上，因此标记碳端就不是那么方便。碳端的标记一般是在液相中进行，文献报道用二茂铁标记在碳端的仅有很少例子，而且是标记PNA单体或二聚体（见图3-5）。^[35, 36]

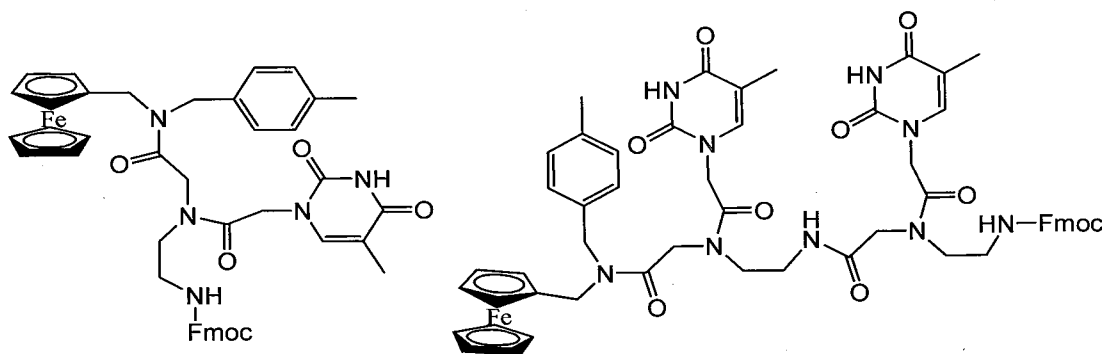


图3-5 二茂铁标记的PNA 2

Figure 3-5 The ferrocene labelled PNA 2

3.4.3 标记在骨架上

PNA的骨架可以有多种氨基酸来取代其甘氨酸骨架，从而出现了侧链活性基团，进行二茂铁的功能化。这种方式的标记基本都是Clara Baldoli小组尝试标记PNA胸腺嘧啶单体（见图3-6）^[33, 37-39]。

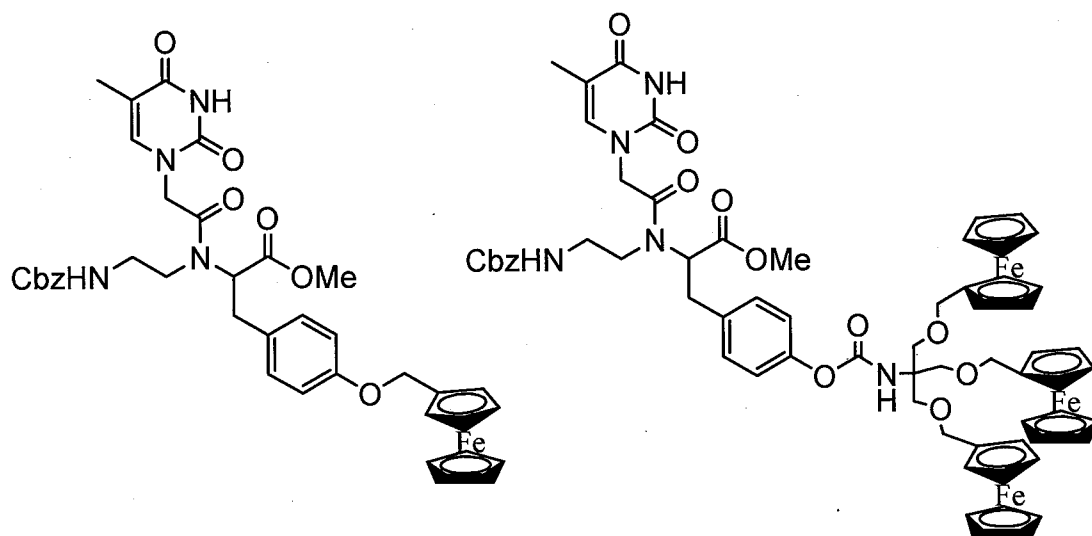


图3-6 二茂铁标记的PNA 3

Figure 3-6 The ferrocene labelled PNA 3

3.4.4 标记在碱基上

在DNA中,二茂铁标记在核苷酸碱基上的合成已经十分成熟,但是对二茂铁修饰PNA碱基的报道还相对较少。最为容易修饰的核碱基是胸腺嘧啶和尿嘧啶(见图3-7)^[40, 41]。

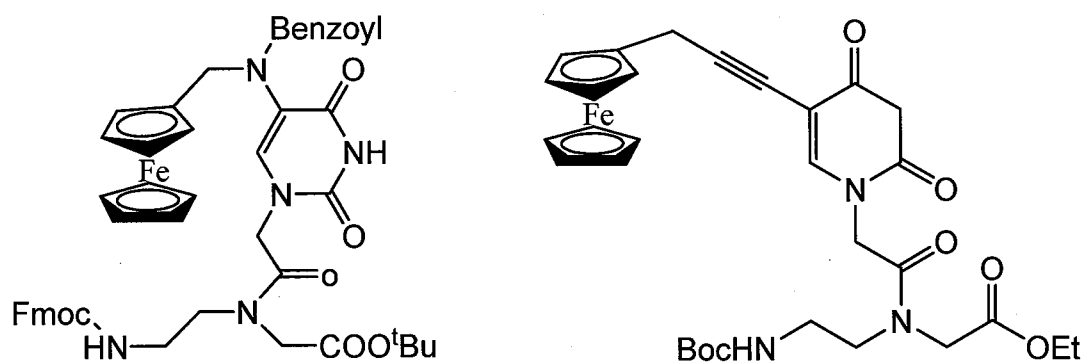


图3-7 二茂铁标记的PNA 4

Figure 3-7 The ferrocene labelled PNA 4

3.5 新的标记分子合成及其对PNA单体的标记和性质研究

3.5.1 新标记分子的合成

由于标记在氮端容易在固相合成上应用,因此我们也选择在氮端标记。我首先选择了在实验室易于合成的3-茂铁基-2-丁烯酸作为标记分子。它的合成非常容易,合成路线图3-8^[42]。

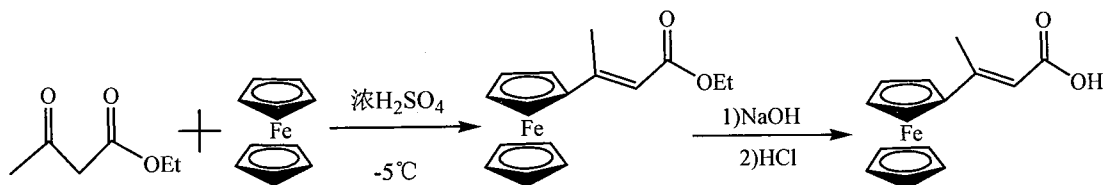


图3-8 3-茂铁基-2-丁烯酸的合成路线

Figure 3-8 Synthetic route of 3-ferrocenyl-2-butenic acid

为了使标记分子具有崭新的物理化学性质，我们又合成了茂铁基偶氮苯甲酸作标记分子^[43,45]。偶氮苯是一类光致变色分子，在紫外光和可见光照射下，它的结构和颜色可以可逆的发生变化，同时因为偶氮苯或许可以作为分子开关，所以对它的研究已经吸引了科学家们的注意力^[46-48]。

组合偶氮苯和二茂铁是非常有吸引力的，这或许使它们呈现新的性能^[49-53]。我们合成茂铁基偶氮苯甲酸作标记分子的目的，最初是当标记PNA寡聚体后，在研究与DNA杂交，偶氮苯可逆的顺反异构或许能够可逆的调节二茂铁的氧化还原性质，用来研究电子在PNA/DNA双链之间的传递，这对研究电子在双螺旋结构中的传输有重要意义。二茂铁基偶氮苯甲酸的合成路线见图3-9。

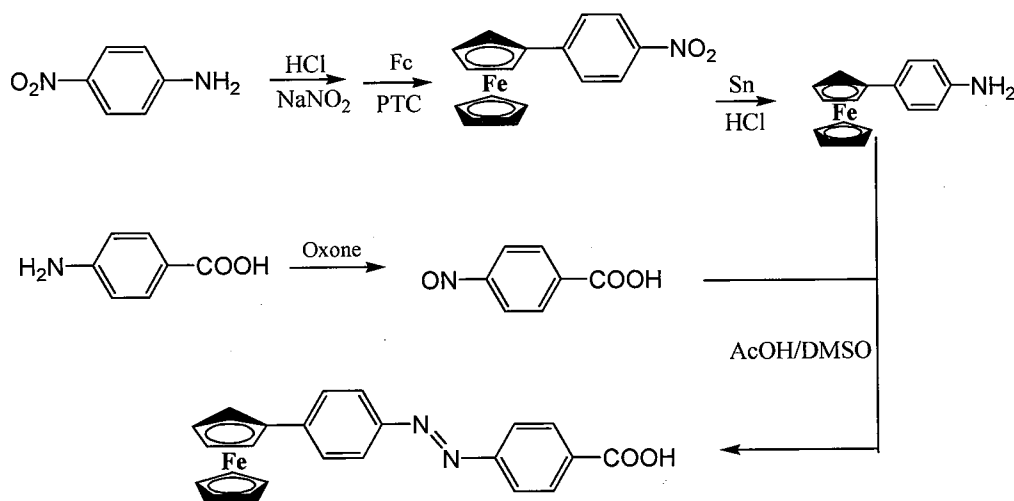


图3-9 对茂铁偶氮苯甲酸的合成

Figure 3-9 Synthesis of 4-ferrocenyl-azobenzene carboxylic acid

3.5.2 茂铁偶氮苯甲酸对PNA单体的标记

为了标记在PNA寡聚体上，我们首先合成了茂铁偶氮苯甲酸标记的PNA单体。它们的合成是比较简单的，就是标记分子与氮端脱保护的单体在缩合剂的作用下缩合，合成路线见图3-10。

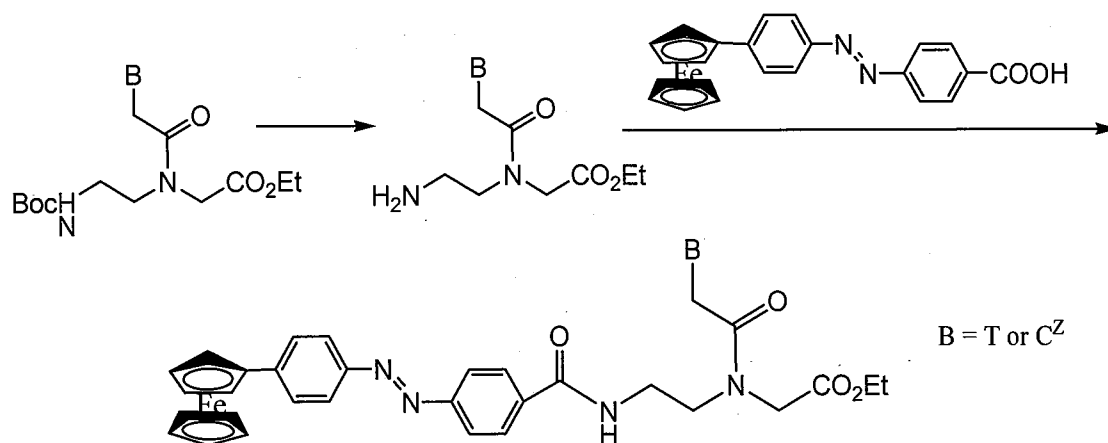
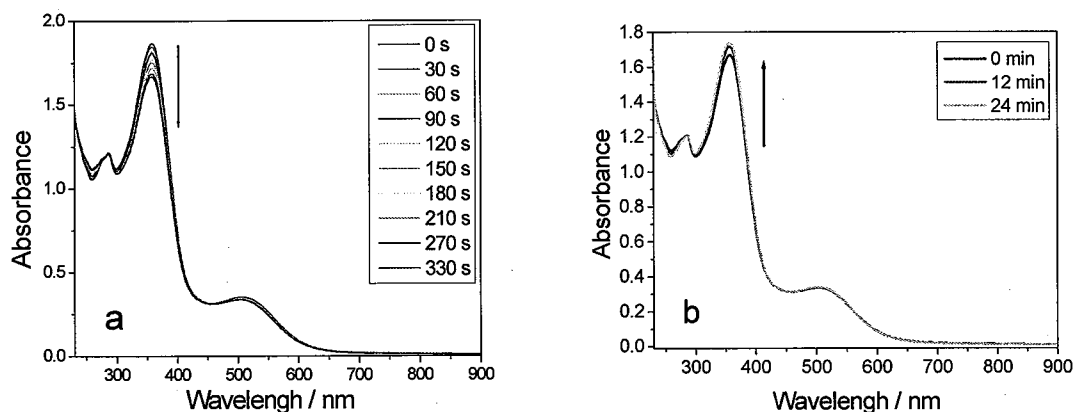


图3-10 Fc-Azo-B-OEt的合成

Figure 3-10 Synthesis of Fc-Azo-B-OEt

3.5.3 标记分子 (Fc-Azo-COOH) 和标记单体的性质

Fc-Azo-COOH的光学和电化学性质



(a) and (b) correspond to Fc-AZO-COOH by photoirradiating 366nm and 546nm respectively

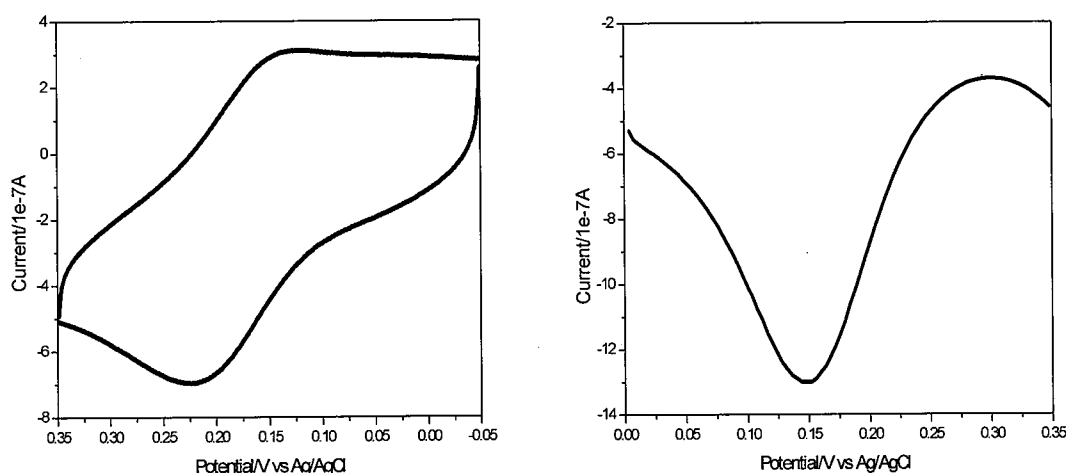
图3-11 Fc-AZO-COOH的紫外可见吸收光谱

Figure 3-11 UV-vis absorption spectral change of Fc-Azo-COOH in ethanol

Fc-Azo-COOH分子包含了偶氮苯基团和二茂铁基团，它的光化学和电化学性质分别被显示在图3-11和3-12中。有Bouguer-Lambert定律： $A = \epsilon Cl$ 可以得到在乙醇中的消光系数， $\epsilon = 22592 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 。从图3-11 a中可以看出偶氮部分 $\pi-\pi^*$ 跃迁的吸收峰对应于 $\lambda_{\text{max}} = 340\text{nm}$ ，当在紫外光（366nm）辐照时，吸收峰强度逐渐下降，这来自于反式偶氮苯转变为顺式偶氮苯的原因；图3-11 b中可以看出随后用可见光（546nm）

辐照时, 偶氮 $\pi-\pi^*$ 跃迁吸收峰的强度又升高, 这或许是可见光照射激发了顺式偶氮苯的偶氮部分 $n-\pi^*$ 电子的跃迁, 使偶氮 $\pi-\pi^*$ 跃迁吸收峰的强度返回。这就证明了Fc-Azo-COOH在紫外光和可见光照射下可以经历可逆的顺反异构的转变, 从而才有可能标记PNA后可逆的调节电子的传输^[53]。

图3-12显示了反式Fc-Azo-COOH在乙醇的CV和DPV的电化学行为。从CV图中可以得到 E_{pa} 和 E_{pc} 分别是0.195 V和0.150 V (参比电极为饱和氯化银电极), $\Delta E_p=45$ mV, 显示了很好的可逆电化学行为。从DPV中我们可以看到在0.114 V时茂铁的被氧化。Fc-Azo-COOH良好的光化学和电化学行为, 使我们相信会在PNA的标记中得到应用并且可逆的顺反异构或许能够调节电子的传输。



Bu_4NPF_6 $C=1.74 \times 10^{-2}$ Fc-Azo-COOH $C=1.1 \times 10^{-4}$

图3-12 Fc-AZO-COOH 的CV和DPV电化学行为

Figure 3-12 CV and DPV behavior of compound Fc-AZO-COOH in ethanol

Fc-Azo-T-OEt的光化学和电化学性质

Fc-Azo-COOH与胸腺嘧啶单体缩合后生成Fc-Azo-T-OEt, 虽然增大了分子的体积, 但是它仍然保留着偶氮苯的顺反异构特性 (见图3-13), 这一点同样可以从它的光化学性质上看出。图3-14显示了Fc-Azo-T-OEt在乙醇中, 光照下的紫外光谱图的变化。从图中我们可以看到主要来自偶氮部分的 $\pi-\pi^*$ 跃迁吸收峰 ($\lambda_{\max}=362$ nm) 强度在紫外光 (366 nm) 照射下逐渐降低, 随后用可见光 (546nm) 辐照或许激发了顺式偶氮的 $n-\pi^*$ 跃迁使吸收峰强度返回。这充分证明了Fc-Azo-T-OEt在外界光照下

可以经历可逆的顺反异构。图3-15显示了Fc-Azo-T-OEt在乙醇中的紫外检测限, 从图中可以看出检测线可以达到 10^{-7} M, 这或许使标记分子有潜在的应用。

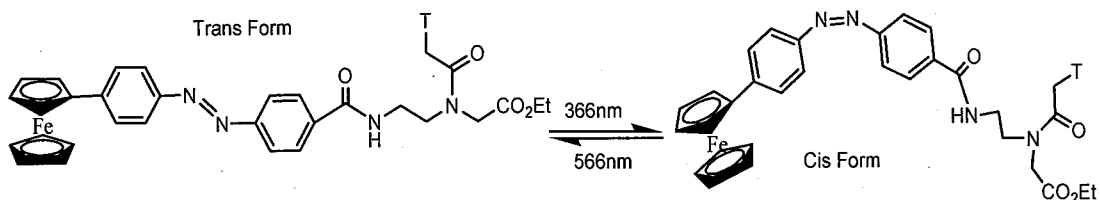
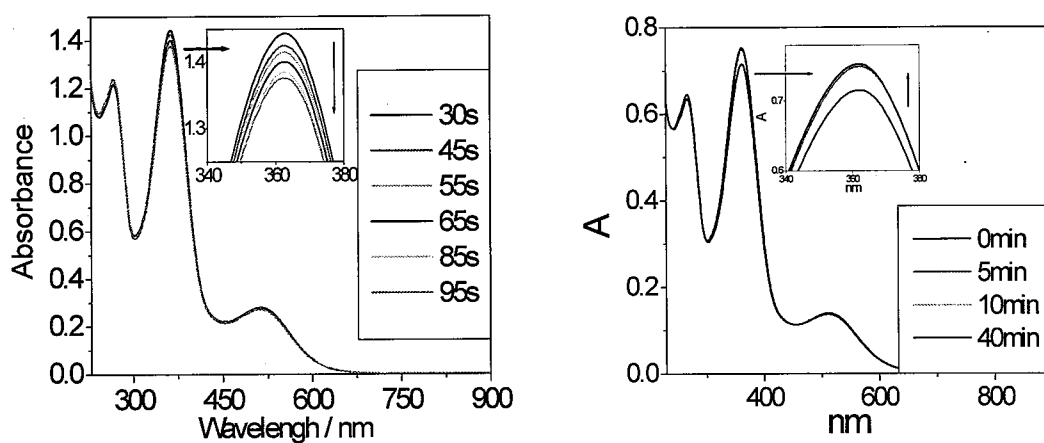


图3-13 Fc-AZO-T-OEt的光致异构

Figure 3-13 The photoisomerization of Fc-AZO-T-OEt



(a) and (b) correspond to Fc-AZO-T-OEt by photoirradiating 366nm and 546nm respectively

图3-14 Fc-AZO-T-OEt的紫外可见吸收光谱

Figure 3-14 UV-vis absorption spectral change of Fc-AZO-T-OEt in ethanol

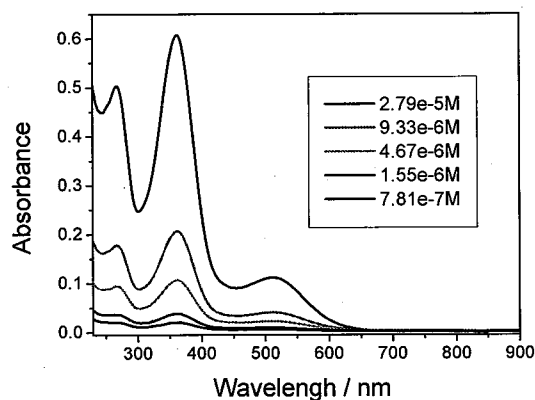
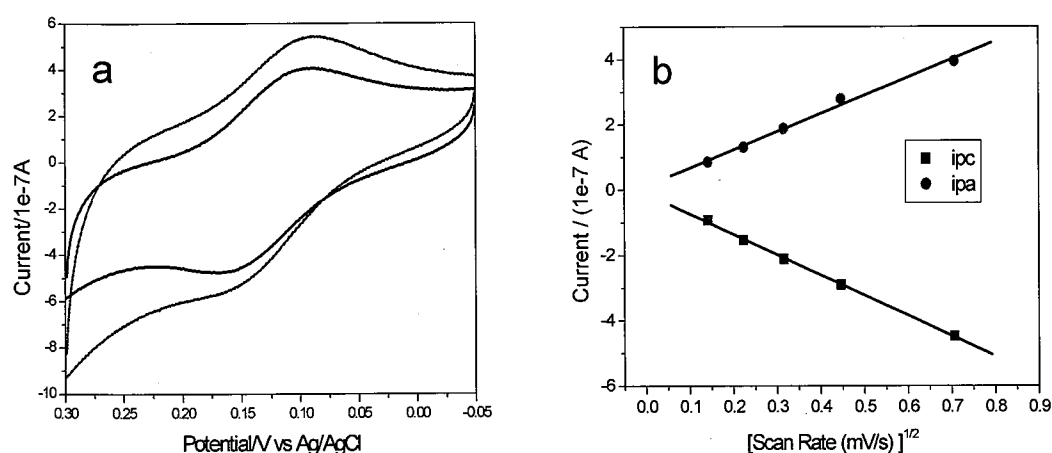


图3-15 Fc-AZO-T-OEt在不同浓度时的紫外可见吸收光谱

Figure 3-15 UV-Vis spectra of Fc-AZO-T-OEt at different concentration in ethanol

图3-16显示了Fc-Azo-T-OEt光照前后在乙醇中的CV特性。当扫速是100 mV/s时, Fc和Fc⁺的氧化峰和还原峰分别对应于168 mV和110 mV。在CV图中峰的分离度反映了电子传输速率的不同^[54], Fc-Azo-T-OEt光照前后的峰电势没有明显的变化, $\Delta E_p = 58$ mV, 而且随着扫速改变并没有明显的变化。当扫速从20 mV/s增加到500 mV/s时, 我们从图2.34中可以看出无论是阳极峰电流还是阴极峰电流都和扫速的平方根成线性关系, 这说明了Fc-Azo-T-OEt氧化还原过程是一步、单电子的可逆过程。紫外光照射后, Fc-Azo-T-OEt氧化还原峰电流的变化是非常明显的, 这或许是来自顺式和反式的扩散系数的不同, 另一个原因或许是顺式Fc-Azo-T-OEt的共轭程度降低, 导致茂铁部分电子云密度增大的原因。我们在乙腈体系中获得了相似的结果, 但是由于在乙腈中扩散系数的增大导致了氧化还原电流的增加。

当我们用DPV检测时, Fc-Azo-T-OEt的检测限可以达到 10^{-6} M (图3-17)。它可以和紫外检测形成相互验证的检测方法。为了观察对不同单体标记物的差异, 我们同时也合成了Fc-Azo-C^Z-OEt, 它的电化学和光化学性质正在研究中。Fc-Azo-T-OEt显示了非常好的电化学和光化学性质这就给了我们合成Fc-Azo-COOH标记的PNA寡聚体的动力。



a CV behavior of compound Fc-Azo-T before (black line) and after (red) photoirradiating (366nm). b Anodic and cathodic peak current obtained for compound Fc-Azo-T before photoirradiating at different scan rates

图3-16 Fc-Azo-T-OEt电化学行为

Figure 3-16 The electrochemical behavior of Fc-Azo-T-OEt

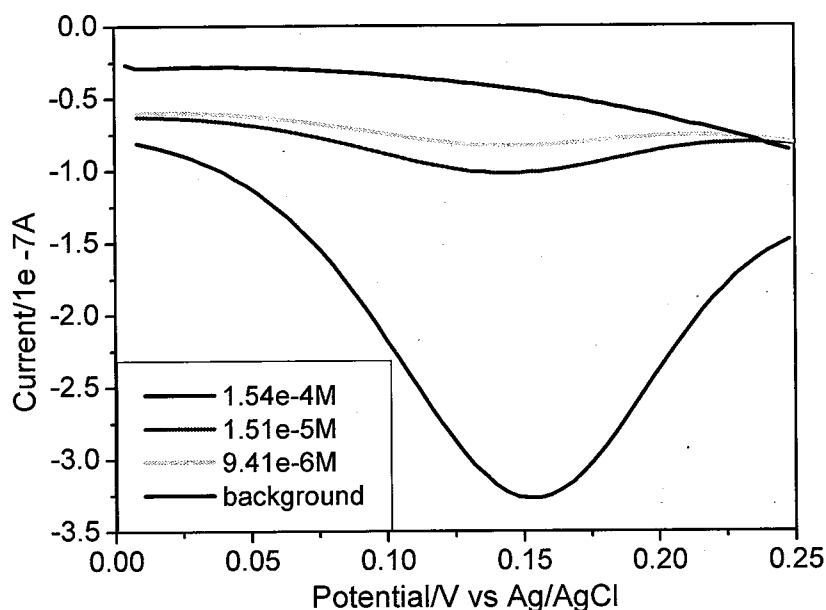
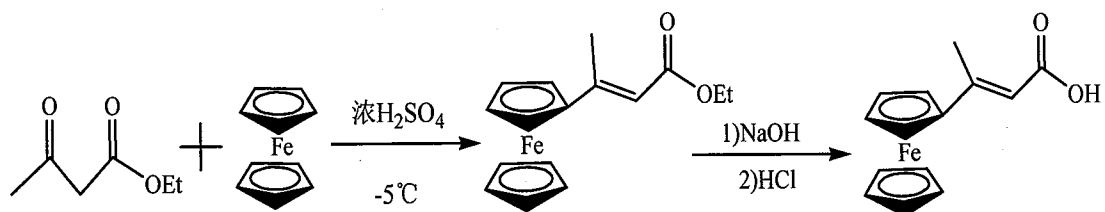


图3-17 Fc-Azo-T-OEt在不同浓度时的DPV行为

Figure 3-17 DPV behavior of Fc-Azo-T-Et at different concentration

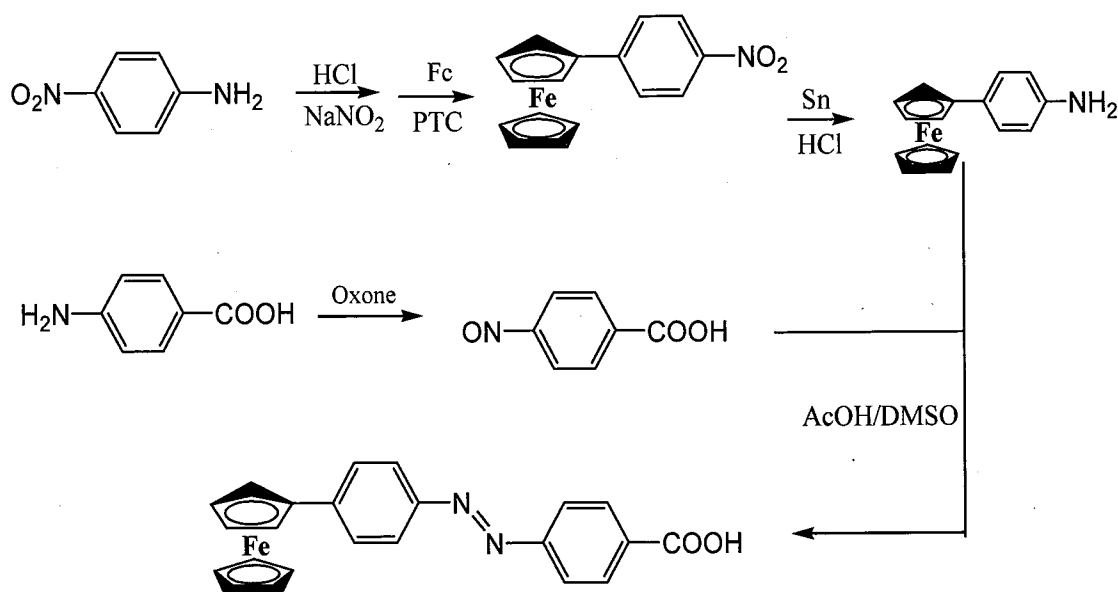
3.6 实验

3.6.1 3-茂铁基-2-丁烯酸的合成



20 ml浓硫酸用冰盐浴冷却至 -5°C ，搅拌下滴加3.8 ml乙酰乙酸乙酯(0.03 mol)，立即加入0.03 mol 5.58 g二茂铁，搅拌5 min，加入碳酸钠中和，同时加入冰控制温度，过滤，水洗(5×250 ml)，加入1M的氢氧化钠溶液60 ml，回流2小时，过滤，滤液用盐酸调节pH=2，过滤，得橙红色产物6.1 g，产率75%。m.p. $179-181^{\circ}\text{C}$ ；FT-IR: $\nu_{\text{O-H}}$: 3431, $\nu_{\text{C-H}}$: 3092, $\nu_{\text{C-H}}$: 2927 $\nu_{\text{C=O}}$: 1618 $\nu_{\text{C=C}}$: 1598 $\delta_{\text{O-H}}$: 1438 $\nu_{\text{C-O}}$: 1226; $^1\text{H NMR}(\text{DMSO-d}_6)$: δ =11.926 (s, 1H), 6.027 (s, 1H), 4.700 (s, 2H), 4.475 (s, 2H), 4.221 (s, 5H), 2.490 (s, 3H)。

3.6.2 Fc-Azo-COOH的合成



4-茂铁基硝基苯的合成

取对硝基苯胺14 g (0.1mol)，依次加入30 ml水和浓盐酸30 ml，加热使其全部溶解后在冰水浴上冷至5℃，然后滴加溶有7 g亚硝酸钠的水溶液20 ml，搅拌反应1 h，加少量尿素分解过量的亚硝酸，得到黄色重氮盐溶液备用。

取二茂铁 9.5 g (0.05 mol) 溶于 100 ml 乙醚中，加入十六烷基三甲基溴化铵 1 g，搅拌下滴加入上述重氮盐溶液，加毕，室温下搅拌反应 3 h，蒸去乙醚，过滤，用大量水洗涤，固体用水蒸气蒸馏除去未反应的二茂铁，残留物用石油醚重结晶，得紫色产物 13.5 g，产率 75%。m.p. 159-160℃； FT-IR: $\nu_{\text{C-H}}$: 3428, 3104, 2920, 骨架振动: 1594, ν_{NO_2} : 1506(as), ν_{NO_2} : 1340(s); ESI-MS: $[\text{M}+\text{H}]^+ = 308.30$; ^1H NMR(CDCl_3): $\delta = 8.12$ (d, 2H), 7.53 (d, 2H), 4.723 (s, 2H), 4.455 (s, 2H), 4.036 (s, 5H)。

4-茂铁基苯胺的合成

取 4.1g 4-茂铁基硝基苯，加入浓盐酸 50 ml 和乙醇 80 ml，再加入锡粒 9 g，90℃ 回流 7 小时，冷至室温，DCM 萃取 (3×300 ml)，有机相用硫酸钠干燥，蒸干 DCM，石油醚重结晶，得橙红色固体 3.2 g，产率 88.3%。m.p. 157-159℃； FT-IR: $\nu_{\text{N-H}}$: 3546(as), $\nu_{\text{N-H}}$: 3463(s), $\nu_{\text{C-H}}$: 3041, 骨架振动: 1610, 1527; ESI-MS: $[\text{M}+\text{H}]^+ = 278.95$; ^1H NMR(DMSO-d_6): $\delta = 7.340$ (t, 2H), 6.761 (t, 2H), 4.643 (t, 2H), 4.258 (t, 2H), 3.978 (s, 5H), 2.072 (s, 2H)。

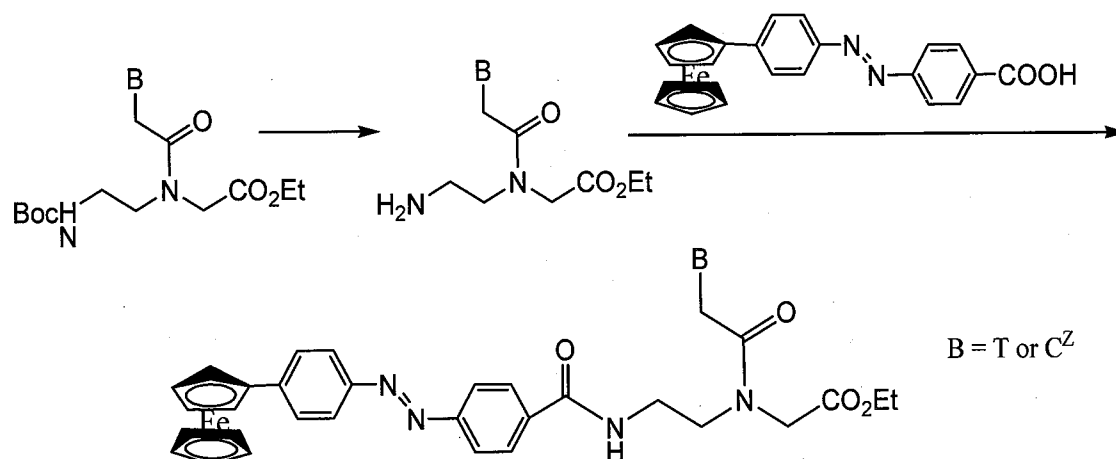
对亚硝基苯甲酸的合成

取 9.99 g 对氨基苯甲酸溶解在 112 ml DCM 中, Oxone 89.8 g 溶解在 450 ml 水中加入到上述 DCM 中。氮气保护下室温搅拌一天, 过滤, 水洗两次, P_2O_5 干燥, 得黄色产物 11 g, 产率 99%。m.p. 368-369°C; FT-IR: ν_{O-H} : 3399, ν_{C-H} : 3058, $\nu_{C=O}$: 1697, $\gamma_{N=O}$: 1428 (二聚体); ESI-MS: $[M-H]^- = 150.11$; 1H NMR(DMSO- d_6): δ =13.544 (s, 1H), 8.24 (d, 2H), 8.03 (d, 2H)。

Fc-Azo-COOH 的合成

取 1.7 g 对亚硝基苯甲酸超声溶于 152 ml AcOH/DMSO=1/1 的溶剂中, 加入 1.55 g 对茂铁基苯胺 (5.6 mmol) 室温反应, TLC 检测 (约反应 36 h), 仔细加入水沉淀通过过滤分离, 水洗, 丙酮和水重结晶的产物 1.7g, 产率 74%。m.p. 365-367°C; FT-IR: $\nu_{C=O} = 1689\text{ cm}^{-1}$, $\nu_{N=N} = 1421\text{ cm}^{-1}$; ESI-MS: $[M-H]^- = 409.11$; 1H -NMR (d_6 -DMSO): δ =13.16 (s, br., 1H), 8.123(d, 2H), 7.959 (d, 2H), 7.874 (d, 2H), 7.764 (d, 2H), 4.942(s, 2H), 4.469 (s, 2H), 4.050 (s, 5H)。

3.6.3 Fc-Azo-T-OEt 的合成



H_2N -T-OEt 的合成

T-PNA 单体 (12.5 mmol, 5.15 g) 溶解在 25 ml DCM 中, 滴加入 6.5 ml CF_3COOH , 室温搅拌 2 h, 减压蒸干 DCM, 残留的 CF_3COOH 通过加入甲苯减压蒸除, 剩余物用乙醚研细, 过滤得白色产物 3.03 g, 产率 99%。m.p. 110-113°C; ESI-MS: $[M+H]^+ = 313.34$; 1H -NMR (d_6 -DMSO): δ =11.354/11.315 ($2 \times$ s, 1H), 7.885/7.721 ($2 \times$ s,

3H), 7.375/7.263(2×s, 1H), 4.673/4.498 (2×s, 2H), 4.330/4.083(2×s, 2H), 3.612/3.496 (2×t, 2H), 3.099/2.952 (2×q, 2H), 1.739(2H, d), 1.25-1.01 (5H, m).

Fc-Azo-T-OEt的合成

0.205 g Fc-Azo-COOH (0.5 mmol) 溶解在5 ml DMF, 溶液被冷至-5℃, 然后加入156 μ l DIC (1 mmol) 和163 mg DhBtOH (1 mmol), 搅拌15 min; 在0℃下, 溶有327 mg H₂N-T-OEt (0.6 mmol)的3 ml DMF, 加入到上述溶液中, 然后加入140 μ l DIEA(0.8 mmol) 室温搅拌48 h., 蒸干DMF, 粘稠液体溶解在50 ml DCM, 用饱和的 NaHCO₃洗涤(2×15 ml), 水洗涤 (2×15 ml), 有机相用 Na₂SO₄干燥, 过滤, 减压蒸干, 产物柱色谱分离(洗脱剂: 石油醚/EtOAc = 4:6 并逐渐增加极性), 得到紫色产物0.299 g, 产率85%。FT-IR: $\nu_{\text{N-H}}$: 3386, $\nu_{\text{C-H}}$: 2925; $\nu_{\text{C=O}}$ =1740, 1673 cm^{-1} , $\nu_{\text{N=N}}$ =1459 cm^{-1} ; ESI-MS: $[\text{M}+\text{H}]^+ = 705.21$; ^1H NMR (d_6 -DMSO): δ =11.334/11.310 (2×s, 1H), 7.762-8.088 (m, 8H), 7.240 (s, 1H), 6.565/6.471 (2×s, 1H), 4.956 (s, 2H), 4.747/4.528 (2×s, 2H), 4.485 (s, 2H), 4.069-4.191 (m, 5H), 3.353-3.721 (m, 4H), 2.2091 (s, 2H), 1.712 (d, 3H), 0.855-1.383 (m, 5H).

3.6.4 紫外可见吸收光谱实验

Fc-Azo-COOH和Fc-Azo-T-OEt 溶于乙醇浓度分别为 $8.32 \times 10^{-5}\text{M}$ 和 $6.65 \times 10^{-5}\text{M}$, 它们的紫外可见光谱随光照时间变化图在analytikjena specord 50在外分光光度计上被获得。紫外光源为高压汞灯 (160 W) 366 nm和546 nm的光是通过窄带滤光片获得。

3.6.5 电化学实验

电极处理:

金电极依次用直径为 1.0, 0.3 和 0.05 μm 氧化铝抛光, 然后在热的 piranha 溶液(30% H₂O₂ / 98% H₂SO₄ 1:3, v/v)中浸泡 2min, 大量水冲洗, 最后电极电化学抛光。电化学抛光方法: 三电极系统, 工作电极 (金电极), 对电极 (铂丝), 参比电极 (Ag || AgCl 饱和 KCl); 电极在 1 M H₂SO₄ 水溶液中, 电势从-0.3 到 1.5 伏 CV 扫描, 扫速 100 mV/s, 直到重复的 CV 图出现为止。

CV, DPV 实验

Fc-Azo-COOH 和 Fc-Azo-T-OEt 溶于乙醇浓度分别为 1.1×10^{-4} M 和 6.65×10^{-5} M, Bu_4NPF_6 的浓度分别是 1.74×10^{-2} M 和 1.72×10^{-2} M。三电极系统: 工作电极 (金电极), 对电极 (铂丝), 参比电极 ($\text{Ag} \parallel \text{AgCl}$ 0.1M, AgNO_3 in CH_3CN)。

参考文献

1. P. E. Nielsen, M. Egholm, O. Buchardt, Peptide Nucleic Acid (PNA) A DNA Mimic with a Peptide Backbone, *Bioconjugate Chem.* 1994, 5: 3-7.
2. B. Hyrup, P. E. Nielsen, Peptide Nucleic Acids (PNA): Synthesis, Properties and Potential Applications, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 1996, 4: 5-23.
3. P. E. Nielsen, G. Haairn, Peptide nucleic acid (PNA). A DNA mimic with a pseudopeptide backbone, *Chemical Society Reviews*, 1997 73-78
4. E. Uhlmann, A. Peyman, G. Breipohl, D. Will, PNA: Synthetic Polyamide Nucleic Acids with Unusual Binding Properties, *Angew. Chem. Int. Ed.* 1998, 37: 2796-2823.
5. S. Shakeel, S. Karim, A. Ali, Peptide nucleic acid (PNA) - a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 2006, 81: 892-899.
6. K. E. Lundin, L. Good, R. Strömberg, A. Gräslund, C. I. Edvard Smith, Biological Activity and Biotechnological Aspects of Peptide Nucleic Acid, *Advances in Genetics*, 2006, 56: 1-56.
7. P. E. Nielsen, Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications, 1st Ed. 1999.
8. 何为, 马立人主编, 肽核酸, 化学工业出版社, 2003。
9. P. E. Nielsen, Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications, 2nd Ed. 2004.
10. I. A. Kozlov, P. E. Nielsen, L. E. Orgel, A Method for the ^{32}P Labeling of Peptides or Peptide Nucleic Acid Oligomers, *Bioconjugate Chem.* 1998, 9: 415-417.
11. A. Tovar-Salazar, J. Dhawan, A. Lovejoy, A. Liu, A. N. GiVord, Preparation of radioiodinated peptide nucleic acids with high specific activity, *Analytical Biochemistry*, 2007, 360: 92-98.
12. M. R. Lewis, F. Jia, F. Gallazzi, Y. Wang, J. Zhang, N. Shenoy, S. Z. Lever, M. Hannink, Radiometal-Labeled Peptide-PNA Conjugates for Targeting *bcl-2* Expression: Preparation, Characterization, and in Vitro mRNA Binding, *Bioconjugate Chem.* 2002, 13: 1176-1180.
13. N. Svanvik, J. Nygren, G. Westman, M. Kubista, Free-Probe Fluorescence of Light-up Probes, *J. Am. Chem. Soc.* 2001. 123: 803-809.
14. N. Svanvik, G. Westman, D. Wang, M. Kubista, Light-Up Probes: Thiazole Orange-Conjugated

- Peptide Nucleic Acid for Detection of Target Nucleic Acid in Homogeneous Solution, *Analytical Biochemistry*. 2000, 281: 26-35.
15. X. Liu, S. Balasubramanian, Strategies for the synthesis of fluorescently labelled PNA, *Tetrahedron Lett.* 2000, 41: 6153-6156.
 16. K. L. Robertson, L. Yu, B. A. Armitage, A. J. Lopez, L. A. Peteanu, Fluorescent PNA Probes as Hybridization Labels for Biological RNA, *Biochemistry*. 2006, 45: 6066-6074.
 17. D. Amsallem, H. Gornitzka, A. Baceiredo, G. Bertrand, New Types of Stable Aldehydes: Formylphosphane and Formylphosphane Oxide, *Angew. Chem. Int. Ed.* 1999, 38: 2201-2203.
 18. O. Seitz, Solid-phase synthesis of doubly labeled peptide nucleic acids as probes for the real-time detection of hybridization. *Angewandte Chemie, Int Ed Engl* 2000, 39: 3249-3252.
 19. T. S. Zatsepin, S. Y. Andreev, T. Hianik, T. S. Oretskaya, Ferrocene-containing nucleic acids. Synthesis and electrochemical properties, *Russian Chemical Reviews*. 2003, 72: 537-554.
 20. J. Wang. Towards Genoelectronics: Electrochemical Biosensing of DNA Hybridization, *Chem. Eur. J.* 1999, 5: 1681-1685.
 21. K. Kerman, Y. Matsubara, Y. Morita, Y. Takamura, E. I. Tamiya, Peptide nucleic acid modified magnetic beads for intercalator based electrochemical detection of DNA hybridization, *Science and Technology of Advanced Materials*. 2004, 5: 351-357.
 22. S. Takenaka, K. Yamashita, M. Takagi, Y. Uto, H. Kondo. DNA sensing on a DNA probe-modified electrode using ferrocenylnaphthalene dimide as the electrochemically active ligand, *Anal. Chem.* 2000, 72: 1334-1341.
 23. Y. T. Long, C. Z. Li, T. C. Sutherland, M. Chahma, J. S. Lee, H. B. Kraatz, A Comparison of Electron-Transfer Rates of Ferrocenoyl-Linked DNA. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125: 8724-8725.
 24. A. Anne, A. Bouchardon, J. Moiroux, 3-Ferrocene-Labeled Oligonucleotide Chains End-Tethered to Gold Electrode Surfaces: Novel Model Systems for Exploring Flexibility of Short DNA Using Cyclic Voltammetry, *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125: 1112-1113.
 25. A.-E. Navarro, N. Spinelli, C. Moustrou, C. Chaix, B. Mandrand, H. Brisset, Automated synthesis of new ferrocenyl-modified oligonucleotides: study of their properties in solution, *Nucleic Acids Res.* 2004, 32: 5310-5319.
 26. M. Chahma, J. S. Lee, H.-B. Kraatz, Fc-ssDNA conjugate: electrochemical properties in a borate buffer and adsorption on gold electrode surfaces, *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2004, 567: 283-287.
 27. D. A. D. Giusto, W. A. Wlassoff, S. Giesebrecht, J. J. Gooding, G. C. King, Multipotential Electrochemical Detection of Primer Extension Reactions on DNA Self-Assembled Monolayers, *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126: 4120-4121.
 28. A.-E. Navarro, N. Spinelli, C. Chaix, C. Moustrou, B. Mandrand, H. Brisseta, Supported synthesis of ferrocene modified oligonucleotides as new electroactive DNA probes, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Lett.* 2004, 14: 2439-2441.

29. D. R. v. Staveren, N. Metzler-Nolte, Bioorganometallic Chemistry of Ferrocene, *Chem. Rev.* 2004; 104: 5931-5985.
30. K. Osakada, T. Sakano, M. Horie, Y. Suzuki, Functionalized ferrocenes Unique properties based on electronic communication between amino group of the ligand and Fe center Coordination, *Chem. Rev.* 2006, 250: 1012-1022.
31. J. C. Verheijen, G. A. van der Marel, Ja. H. van Boom, N. Metzler-Nolte, Transition Metal Derivatives of Peptide Nucleic Acid (PNA) ligomerssSynthesis, Characterization, and DNA Binding *Bioconjugate Chem.*, 2000, 11: 741-743.
32. A. Hess, N. Metzler-Nolte, Transition metal labels on peptide nucleic acid (PNA) monomers, *Chem. Commun.* 1999, 885 – 886.
33. C. Baldoli, C. Rigamonti, S. Maiorana, E. Licandro, L. Falciola, P. R. Mussini, A New Triferrocenyl-tris(hydroxymethyl)aminomethane Derivative as a Highly Sensitive Electrochemical Marker of Biomolecules: Application to the Labelling of PNA Monomers and Their Electrochemical Characterization, *Chem. Eur. J.* 2006, 12: 4091-4100.
34. A. Maurer, K. Heinz-Bernhard, N. Metzler-Nolte, Synthesis and Electrochemical Characterization of Metallocene-PNA Oligomers, *Eur. J. Inorg. Chem.* 2005, 3207-3210.
35. G. Jaouen, Bioorganometallics, Published 2006, Wiley-VCH.
36. A. Hess, *PhD Thesis*, Ruhr-Universit, Bochum, 1999.
37. C. Baldoli, L. Falciola, E. Licandro, S. Maiorana, P. Mussini, P. Ramani, C. Rigamonti, G. Zinzalla, A new ferrocene conjugate of a tyrosine PNA monomer: synthesis and electrochemical properties *J. Organomet. Chem.* 2004, 689: 4791-4802.
38. C. Baldoli, E. Licandro, S. Maiorana, D. Resemini, C. Rigamonti, L. Falciola, M. Longhi, P. R. Mussini, Electrochemical activity of new ferrocene-labelled PNA monomers to be applied for DNA detection: Effects of the molecular structure and of the solvent, *J. Electroanal. Chem.* 2005, 585: 197-205.
39. C. Baldoli, C. Oldani, E. Licandro, P. R. Valerio, P. Ferruti, L. Falciola, P. Mussini, Ferrocene derivatives supported on poly(N-vinylpyrrolidin-2-one) (PVP): Synthesis of new water-soluble electrochemically active probes for biomolecules, *J. Organomet. Chem.* 2007, 692: 1363-1371.
40. G. Gasser, M. J. Belousoff, A. M. Bond, L. Spiccia, Facile Synthesis and Detailed Characterization of a New Ferrocenyl Uracil Peptide Nucleic Acid Monomer, *J. Org. Chem.* 2006, 71: 7565-7573.
41. R. H. E. Hudson, G. Li, J. Tse, The use of Sonogashira coupling for the synthesis of modified uracil peptide nucleic acid, *Tetrahedron Lett.* 2002, 43: 1381-1386.
42. 尹荣望, 张成如, 周耀坤, 祝英, 3-二茂铁基-2-丁烯酸乙酯的一步合成及该羧酸晶体和分子结构的研究, *化学试剂*, 1991, 02: 76-78.
43. 吴红飞, 含二茂铁基 Schiff 碱及其配合物的合成、表征及性质研究, 硕士论文.
44. 宋海峰, 具有 SAMs 性质的二茂铁席夫碱衍生物的合成和表征, 硕士论文.

45. B. Priewisch, K. Ruck-Braun, Efficient Preparation of Nitrosoarenes for the Synthesis of Azobenzenes, *J. Org. Chem.* 2005, 70: 2350-2352.
46. T. Ikeda, O. Tsutsumi, Optical Switching and Image Storage by Means of Azobenzene Liquid-Crystal Films, *Science* 1995, 268, 1873-1875.
47. Z. F. Liu, A. Fujishima, K. Hashimoto, Photoelectrochemical information storage using an azobenzene derivative, *Nature* 1990, 347: 658-660.
48. P. M. Blanchard, G. R. Mitchell, A comparison of photoinduced poling and thermal poling of azo-dye-doped polymer films for second order nonlinear optical applications, *Appl. Phys. Lett.* 1993, 63: 2038-2040.
49. S. Barlow, S. R. Marder, Electronic and optical properties of conjugated group 8 metallocene derivatives, Electronic and optical properties of conjugated group 8 metallocene derivatives, *Chem. Commun.* 2000, 1555-1562
50. S. Tsuchiya, Intramolecular Electron Transfer of Diporphyrins Comprised of Electron-Deficient Porphyrin and Electron-Rich Porphyrin with Photocontrolled Isomerization, *J. Am. Chem. Soc.* 1999, 121: 48-53.
51. V. W. W. Yam, Y. Yang, J. Zhang, B.W. K. Chu, N. Zhu, Synthesis, Characterization, and Photoisomerization Studies of Azo- and Stilbene-Containing Surfactant Rhenium(I) Complexes, *Organometallics*. 2001, 20: 4911-4918.
52. T. Muraoka, K. Kinbara, Y. Kobayashi, T. Aida, Light-Driven Open-Close Motion of Chiral Molecular Scissors. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125: 5612-5613.
53. A. Sakamoto, A. Hirooka, K. Namiki, M. Kurihara, M. Murata, M. Sugimoto, H. Nishihara, Photon-, Electron-, and Proton-Induced Isomerization Behavior of Ferrocenylazobenzenes, *Inorg. Chem.* 2005, 44: 7547-7558.
54. E. Laviron, General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems, *J. Electroanal. Chem.* 1979, 101: 19-28.

第四章：新型偶氮类 PNA 单体的合成及性质

4.1 引言

PNA是一类人工合成的DNA类似物,以高亲和力、高序列特异性的与互补DNA或RNA杂交,在反义、抗基因药物方面有潜在的应用,因此对PNA的研究引起了人们的广泛注意^[1-5]。然而,PNA本身也具有一定的弱点却严重限制了它的应用,比如水溶性差、细胞渗透性差、生物利用度低、与DNA或RNA能以平行和反平行的方式杂交识别等^[6, 7]。为了改善PNA的本身缺点,以及探讨结构改变对识别DNA或RNA的影响,各种改造的PNA类似物被广泛合成^[8, 9]。例如为了提高PNA的溶解度,PNA可以接上赖氨酸,骨架修饰上胍盐、羧酸等;为了改变PNA以平行和反平行的方式同时与靶DNA或RNA结合,可以改变PNA骨架,引入手性中心,以期望改变杂交结合方向^[10-13]。为了使PNA具有新的性质和新的应用,例如具有光活性的PNA等,各种具有新活性的PNA单体也相继被合成。这些新改造的PNA单体和经典的PNA单体,混合制备的PNA寡聚体仍保持对DNA或RNA的杂交特性,而且还改善了PNA本身的一些缺点。科学家看到PNA结构的改变,在很大空间上仍有可能改善提高PNA的性能,因此对PNA的合成及改造仍吸引了科学家的关注^[14-16]。

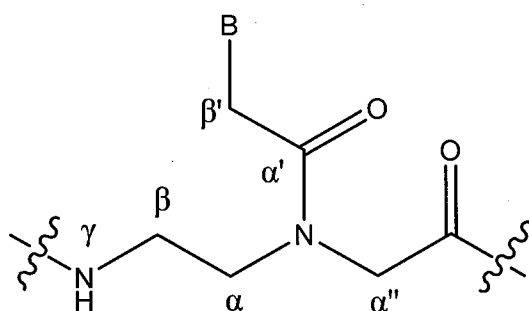


图4-1 PNA单体原子的编号

Figure 4-1 The atomic serial number of PNA monomers

前文已经提到，PNA单体的结构主要分为三部分：骨架、连接分子、碱基，因此对PNA单体的改造就是对这三部分的改造。我们可以借鉴文献对单体的组成原子进行编号，编号结果见图4-1。对单体的改造可以只对其中一部分进行改造，也可同时对几部分进行改造。这三部分的改造有时是密不可分的，不可能确切的归为某一

类，在这里我们把同时改造几部分的，试情况归为其中一类。

4.2 PNA骨架的改造

目前，PNA合成的研究主要集中在对骨架的修饰改造，对骨架的改造有利于研究PNA与DNA或RNA的相互作用，而且有利于寻找更好的单体，同时可以优化PNA的特性，使PNA具有新的性质。对骨架的修饰改造已经作了大量的尝试，在这三部分改造中也最为重要，下面分几个方面来讨论^[8]。

4.2.1 在骨架上引入支链

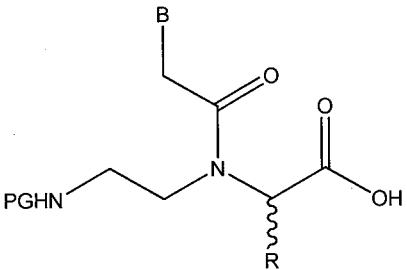
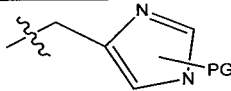
引入支链可使单体成为手性分子，而杂交性质则影响很小^[17]，并且还可以提高其在水中溶解和更佳的透细胞膜性等。引入的方法是多种多样的：包括对单体合成方法的改进，利用天然氨基酸引入支链^[18, 19]，不对称催化氢化反应^[20]，Ugi 4CC反应等^[21]。

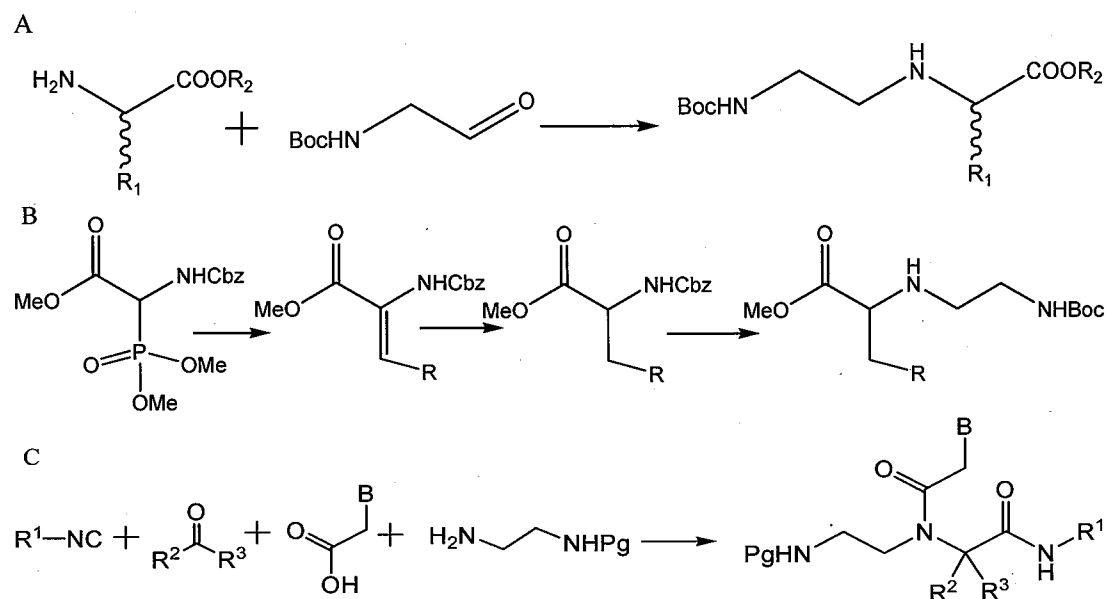
在 α'' 位引入支链

在 α'' 位引入支链的方法主要有三种方法，见图4-2。表4-1列举了部分已经合成的 α'' 引入支链的PNA单体。

表4-1 α'' 具有支链的PNA单体

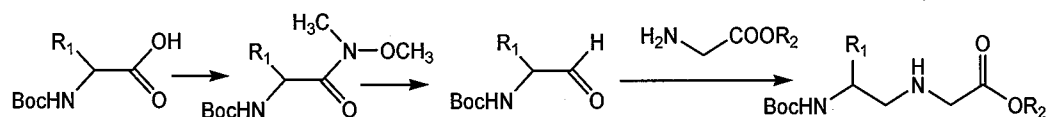
Table 4-1 PNA monomers with R in α''

结构式	R	Ref.
	CH ₃	[22]
	CH ₂ Ph	
	(CH ₂) ₄ NH ₃	
	CH ₂ CH ₂ COOH	[23]
		[24]
	Valine	[25]
	Leucine	
	Arginine	
	Asparagine	
	Histidine	

图4-2 α "具有支链的PNA单体的合成Figure 4-2 Synthesis of PNA monomers with R in α "

在 β 位引入支链

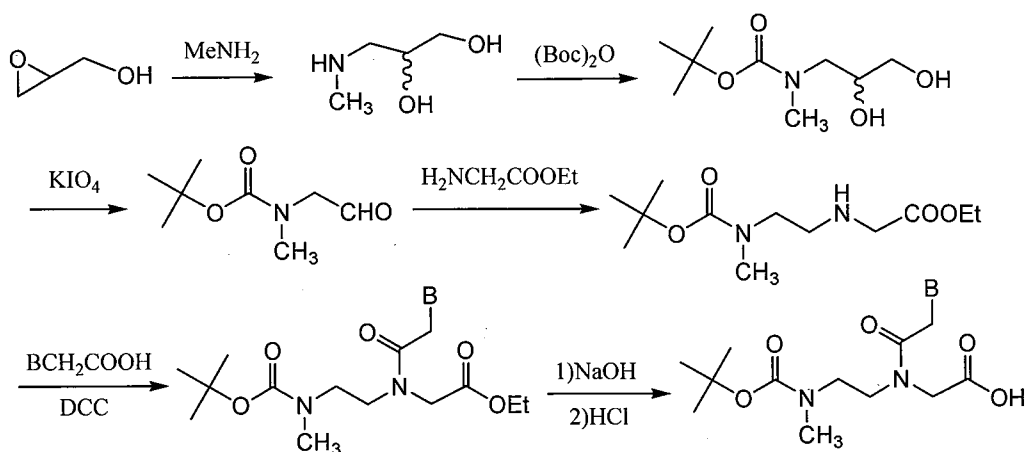
同样人们也合成了在 β 位含支链的PNA单体, 合成路线见图4-3, 表4-2列举了已经合成的部分例子。

图4-3 β 具有支链的PNA单体的合成Figure 4-3 Synthesis of PNA monomers with R in β 表4-1 α "具有支链的PNA单体Table 4-1 PNA monomers with R in α "

结构式	R	Ref.
	Gly	[26]
	Val	
	Ile	
	Ser(Bzl)	
	Pro	
	Trp	
	CH ₂ OH	[27]

在 γ 位引入支链

不像在 α "、 β 位引入支链那样容易, 因为它们的引入可以用现成的天然氨基酸作为原料, 所以在 γ 位引入支链报道较少。图4-4描述了在 γ 位引入上引入甲基的合成路线^[28]。

图4-4 γ 具有甲基的PNA单体的合成Figure 4-4 Synthesis of PNA monomers with methyl in γ

4.2.2 在骨架上引入环状结构

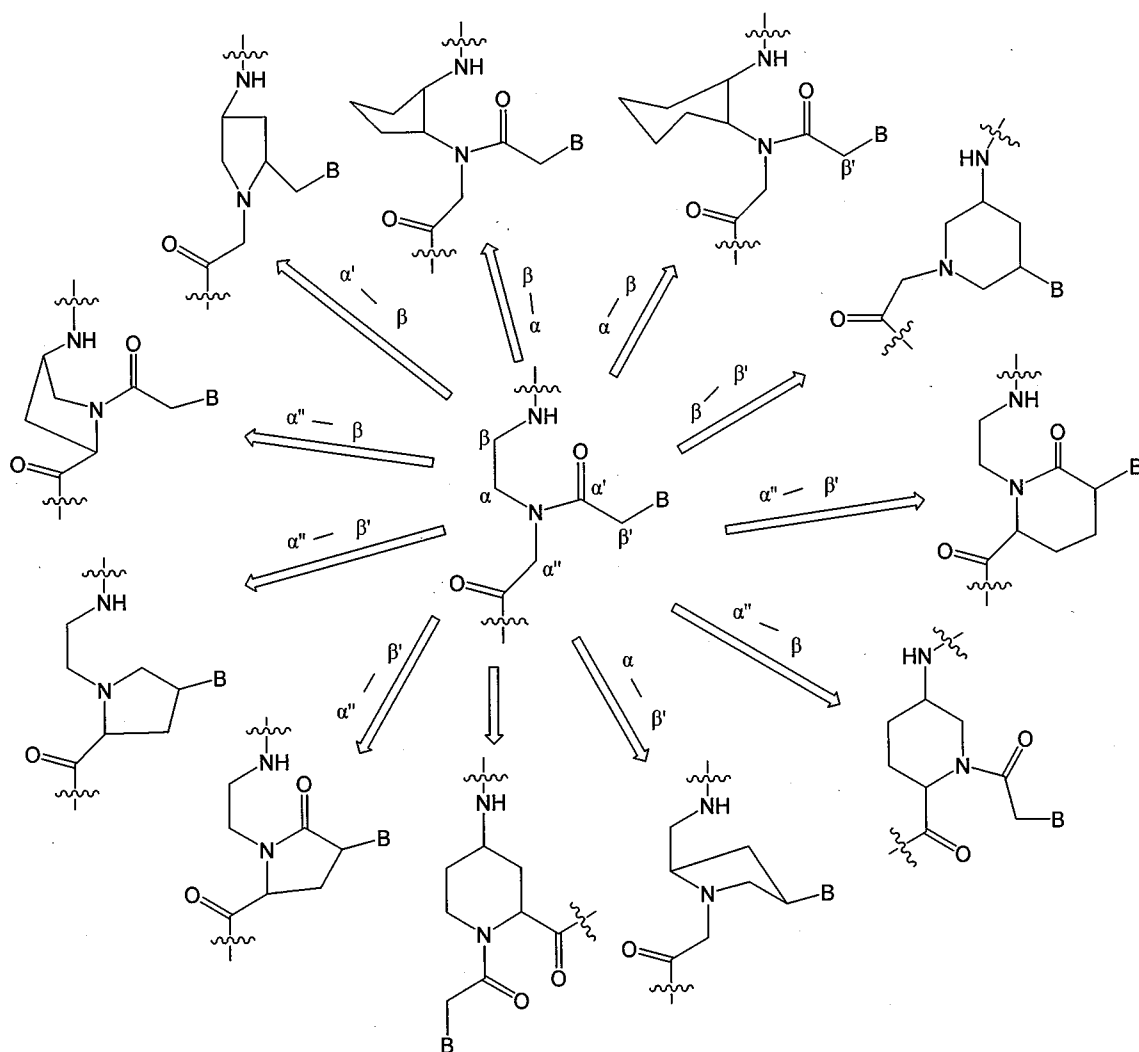
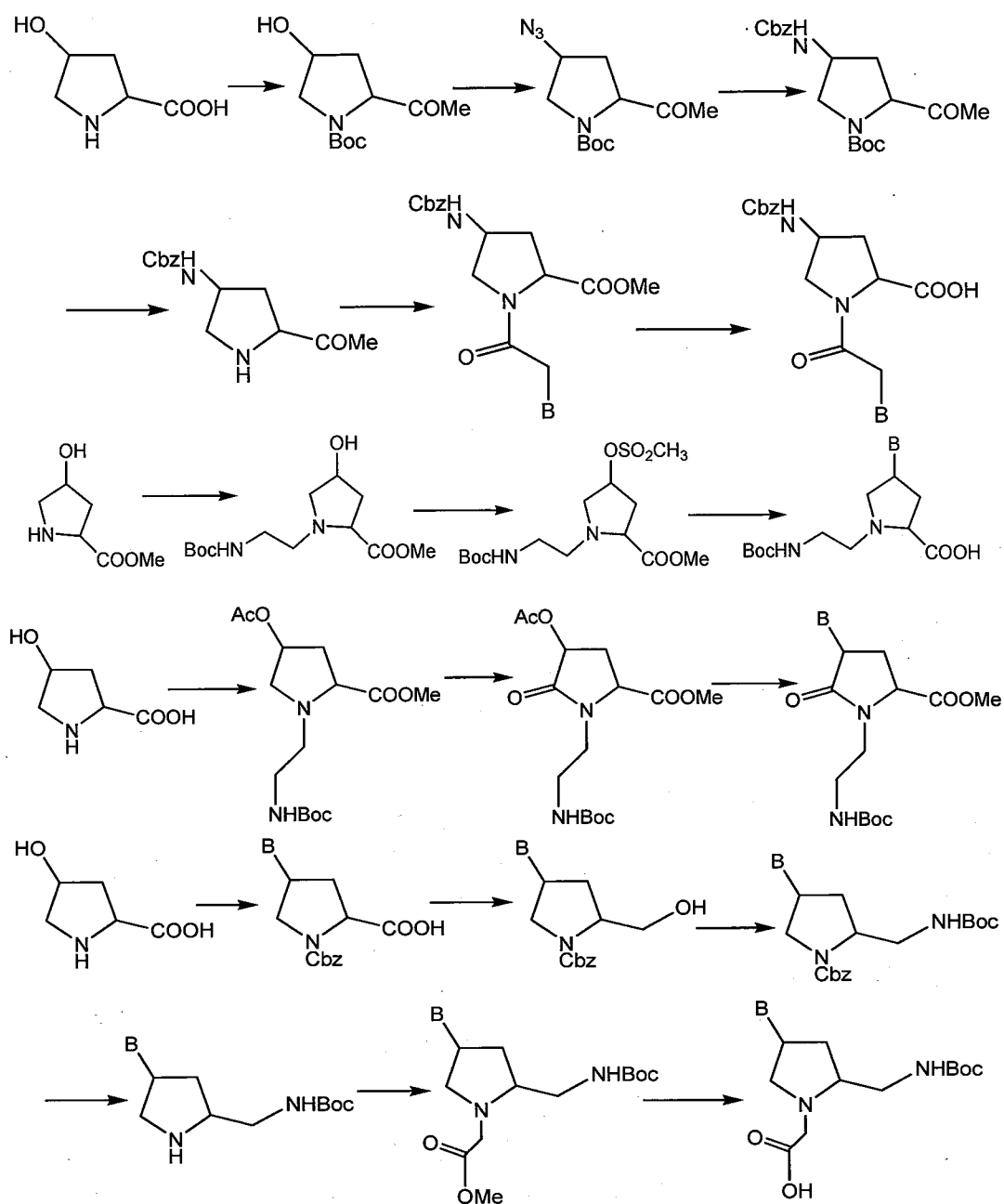


图4-5 包含环状结构的PNA单体

Figure 4-5 The PNA monomers with ring structure

引入结构固定因素,使PNA的结构提前有序化,以便利于杂交,这在DNA类似物LNA中已取得成功。经典的PNA骨架有一定的柔性,因此人们也想通过预先在PNA单体中引入环状结构来固定其构象以便利于杂交。图4-5显示了在骨架上引入环状结构各种情况^[8]。

由图4-5可以看出带有环状结构的PNA多种多样,所以它们的合成路线也多种多样,而脯氨酸由于其天然结构包含五元环,因此它作为原料成为合成的热点。图4-6列举几种以脯氨酸为原料合成包含五元环的PNA单体^[29-32]。



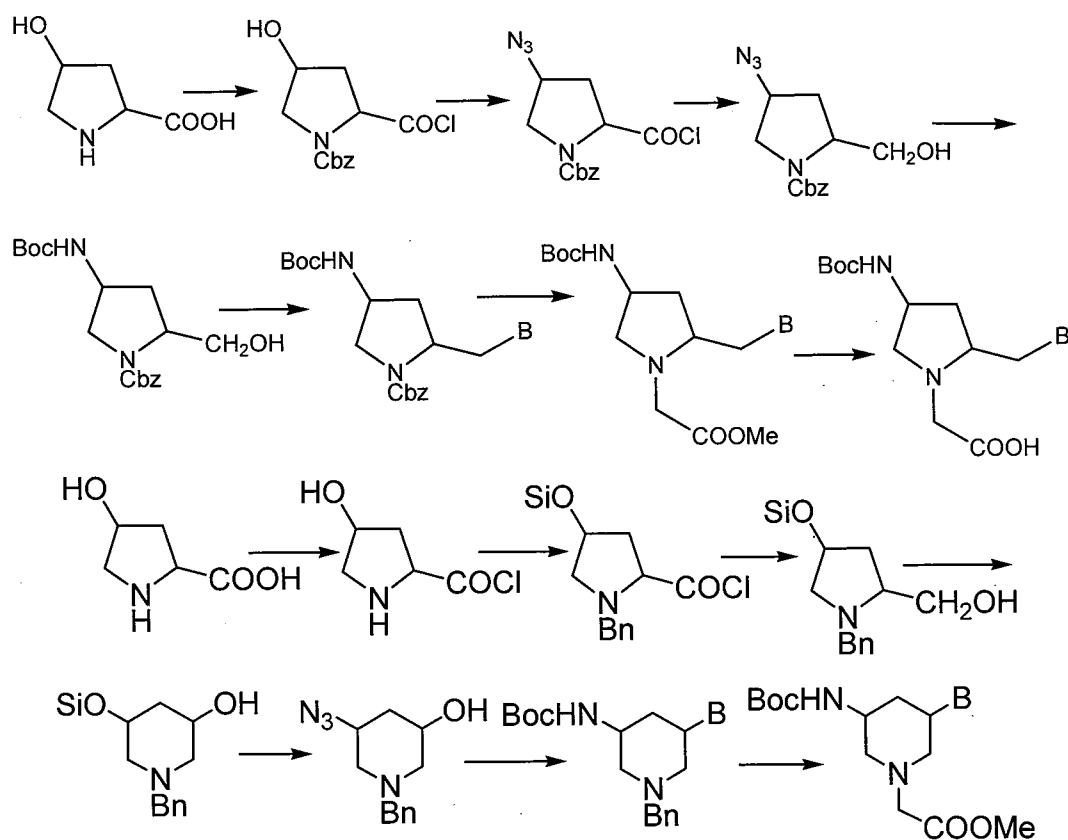


图4-6 以脯氨酸为原料合成PNA单体

Figure 4-6 Synthesis of PNA monomers starting from pyrrolidine-2-carboxylic acid

除了大部分以脯氨酸为原料合成带有环状结构的PNA外, 还有不是以脯氨酸为原料的合成方法, 例如图4-7显示了其他合成方法。

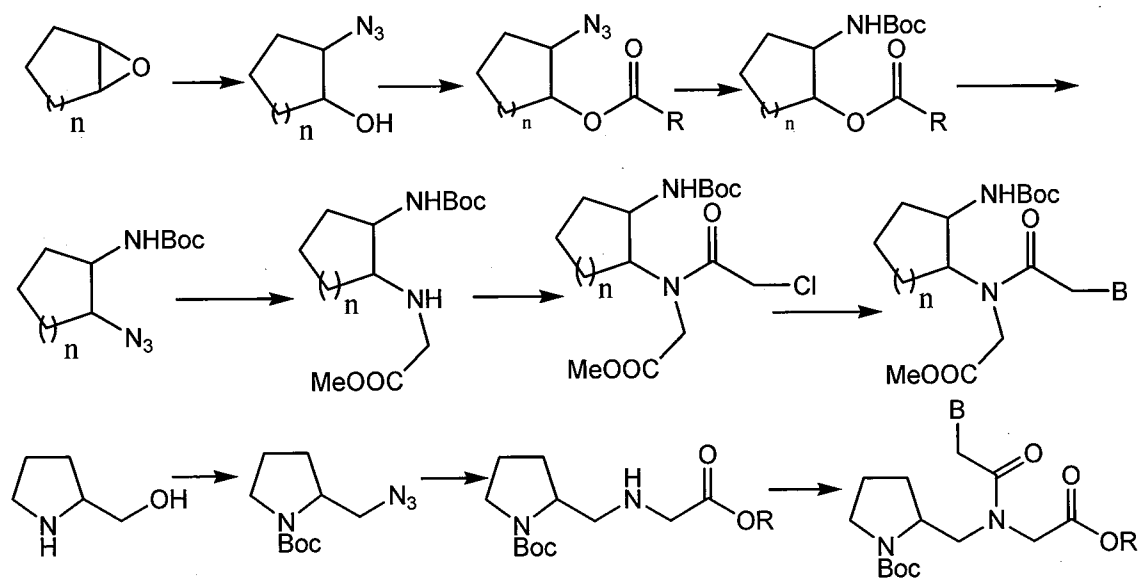


图4-7 合成具有环状结构的PNA单体

Figure 4-7 Synthesis of PNA monomers with ring structure

人们还合成了一些特殊的包含环状结构的单体, 例如下图4-8所示的单体, 有含多个环的、有含杂原子的PNA单体等^[33]。

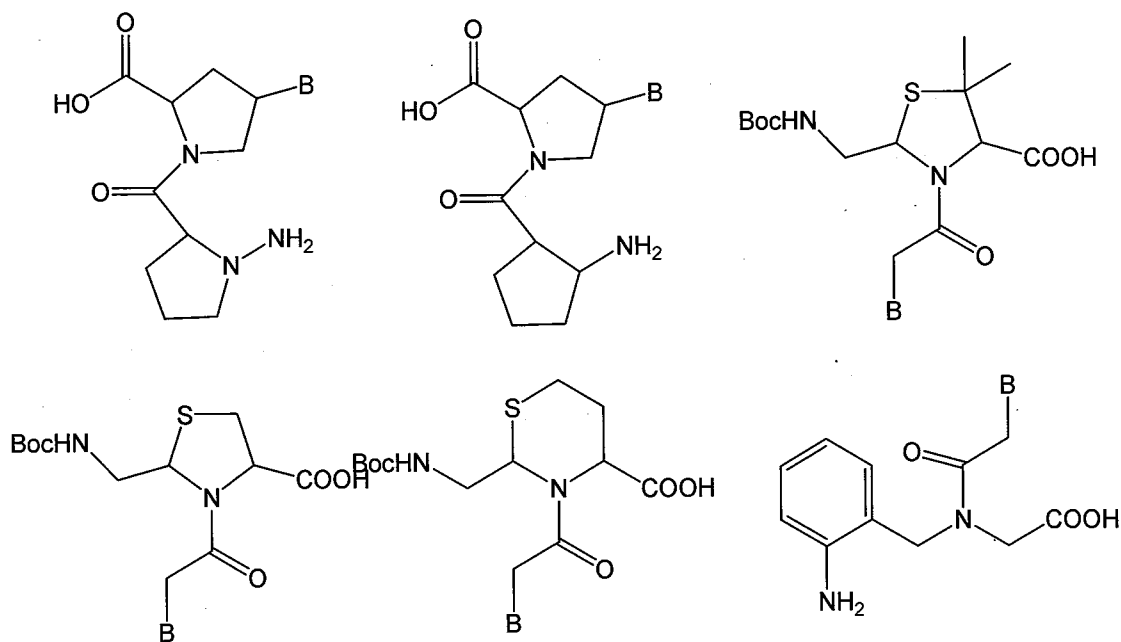


图4-8 特殊的PNA单体 1

Figure 4-8 The peculiar PNA monomers 1

4.2.3 不符合“6+3”规则的骨架改造

这类就是在骨架长度上变化, 但是这种变化是有限的, 过长或过短都会严重影响杂交结果, 因此, 他们的情况较少。图4-9列举了几种情况^[34-36]。

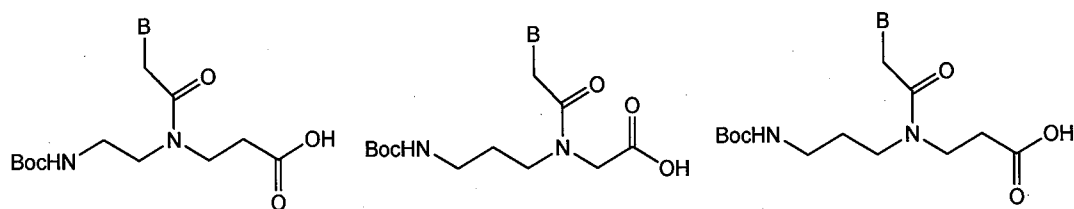


图4-9 特殊的PNA单体 2

Figure 4-9 The peculiar PNA monomers 2

4.3 连接分子的变化

正常的连接分子是亚甲羰基, 它是通过酰胺键与骨架连接的, 随着研究的不断深入, 文献还报道了许多其它方式的连接。例如下图4-10所示的情况, 有碳碳单键相连, 烯键相连, 环状相连等^[37, 39]。

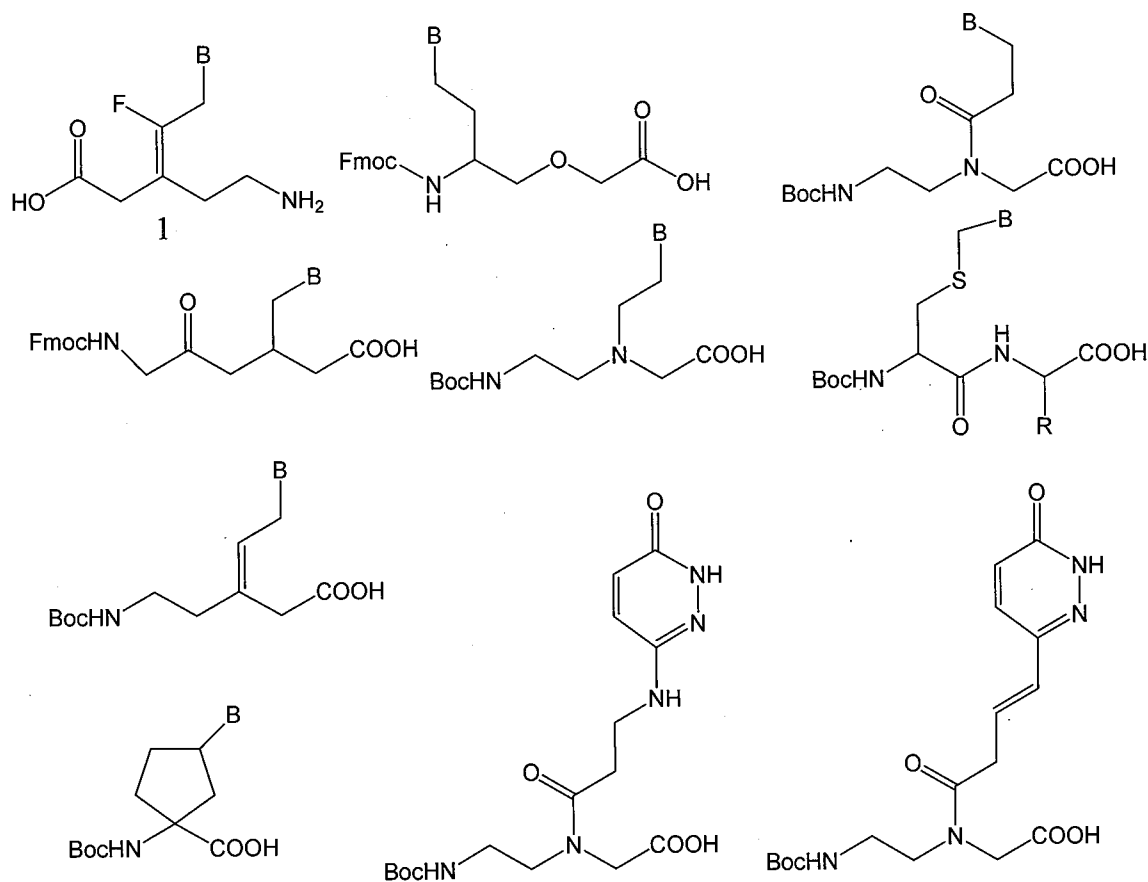


图4-10 特殊的PNA单体 3

Figure 4-10 The peculiar PNA monomers 3

连接分子的变化将会给PNA的结构带来比较大的变化，又时会给杂交带来负面影响。例如Marcel Hollenstein等对单体1研究发现，包含1单体的PNA是以反平行的方式与DNA杂交，它们的解链温度强烈的依赖于新单体在PNA的位置，与没有插入新单体的PNA相比解链温度相差从+2.4℃到-8.1℃。

4.4 碱基的变化

PNA是DNA的类似物，由于PNA非常好的杂交特性，特别是对碱基错配灵敏度高的特性，已经在研究与DNA的相互作用中广为应用。PNA与DNA的相互作用依然主要是通过碱基之间的氢键作用，堆积作用和疏水作用。碱基的变化一定程度的改变了它们之间的氢键作用，堆积作用和疏水作用，因而可以改变PNA与DNA之间的相互作用。其次，通过改变单体碱基，可以使新单体具有新的性质，新单体插入到PNA寡聚体中从而可以使PNA具有新的性质，拓宽PNA的应用，例如探测局部结构，检测杂交等。碱基的变化也是千变万化，但是无论怎样变化都应遵循一个原则：取

代的碱基一般是平面分子,不能严重影响与DNA的杂交,如果严重影响了杂交,导致PNA和DNA杂交亲和力严重下降也就失去了意义。我们对碱基的变化主要分三类来讲:第一类,仍与DNA包含氢键作用的碱基替代;第二类,通过堆积作用保持杂交功能;第三类,具有新功能的碱基替代。虽然我们分为三类,但是有时碱基替代分子会同时有几种性质。它们的合成和经典PNA单体的合成类似,基本上都是碱基取代分子先乙酰化,然后在缩合剂的作用下与骨架缩合,这里着重讲一下它们的应用效果。

4.4.1 仍与DNA包含氢键作用的碱基替代

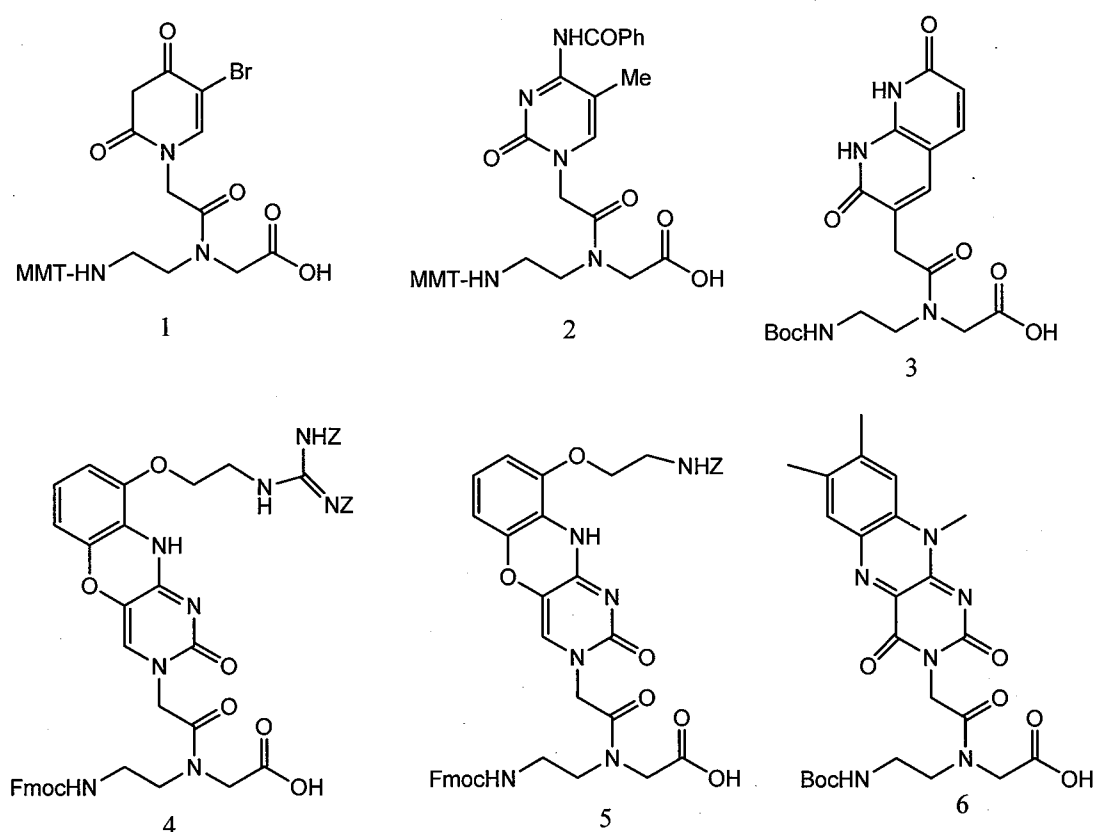


图4-11 特殊的PNA单体 4

Figure 4-11 The peculiar PNA monomers 4

因为PNA既能与DNA单链高亲和力的形成双链体又能与其双链形成三链体,所以PNA有作为反义抗基因药物潜在的应用。这类碱基取代很大一部分都是为了使其具有更高的亲和力。例如图4-11是文献中已经尝试过的这类情况的碱基取代。1, 2两种单体只是对原有的天然核碱基的少量变化,它们是为了制备PNA和DNA嵌合体而合成的,通过Tm实验研究发现1单体插入寡聚体后降低了杂交稳定性,然而2却提

高了杂交亲和力^[40]。我们可以看到单体3是双环碱基取代分子，它是为了通过Hoogsteen氢键（见图4-12）识别鸟嘌呤碱基形成三螺旋而设计的，研究发现3插入到PNA中后能大大提高杂交形成三螺旋的稳定性（与碱基C相比大约每一个高6.7℃）^[41]。4和5是Cristina Ausín等人设计的胞嘧啶取代分子，它可以和鸟嘌呤形成更多的氢键^[42]。通过对单体6的研究发现，当其在PNA中的位置不同，对PNA/DNA双螺旋的稳定性影响不同，当插入到PNA的氨基端时稳定性增强，而其它情况则相反^[43]。

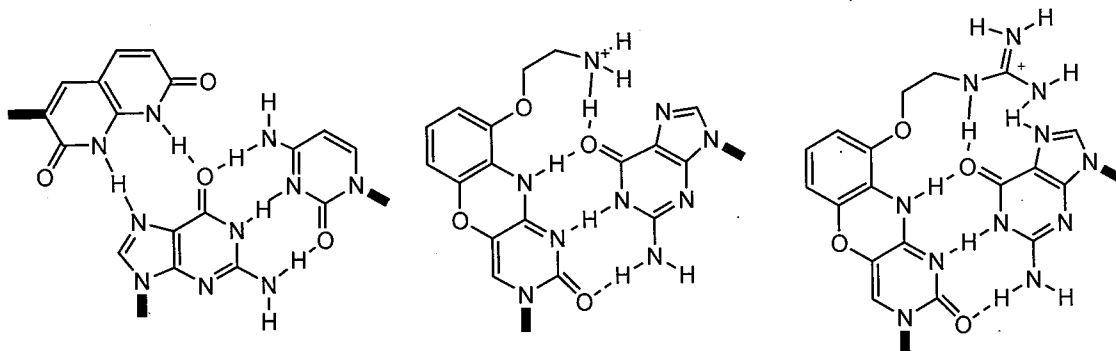


图4-12 新PNA单体与DNA形成的氢键

Figure 4-12 The hydrogen bonds of new PNA monomers with DNA

4.4.2 通过堆积作用保持杂交功能

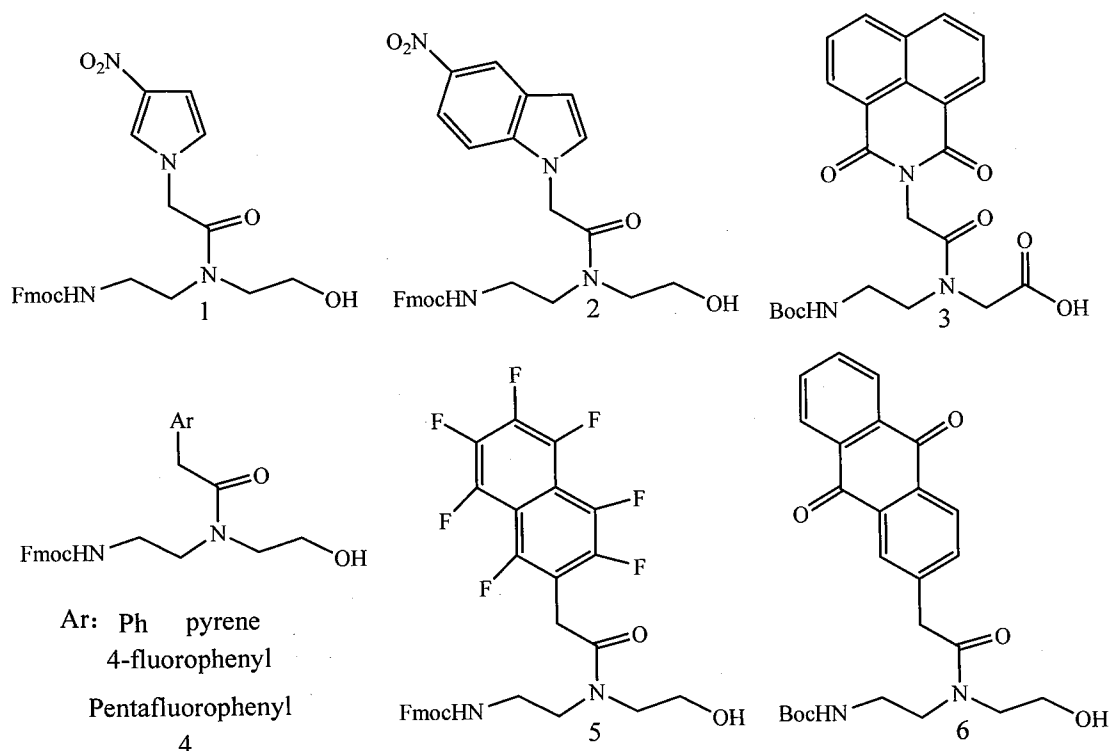


图4-13 特殊的PNA单体 5

Figure 4-13 The peculiar PNA monomers 5

在DNA中碱基被苯或多环稠环化合物取代已经被广泛研究,它们可以通过 π 电子堆积来提高其杂交能力。同样人们也想到把它应用在PNA作尝试。图4-13显示了已经合成的部分单体并应用到杂交研究中。Stephen A. Woski 合成了单体1和2,当包含单体1和2的PNA与DNA杂交后, T_m 实验发现 T_m 变化很小 $\leq 1.5^\circ\text{C}$, 并不因为1和2的位置变化而有明显的变化^[44]。Isao Saitob合成了单体3, T_m 实验发现 T_m 值受到3在PNA中的位置影响严重,当3在PNA氨基端时能显著提高杂交稳定性,而在其它位置时却起到了相反的作用^[45]。4, 5和6都是稠环芳烃的的衍生物,对它们的研究也比较广泛,但研究发现他们虽然能够在杂交时插入到相邻碱基对之间,但仅有很少的碱基识别能力^[46-48]。

4.4.3 具有新功能的碱基替代

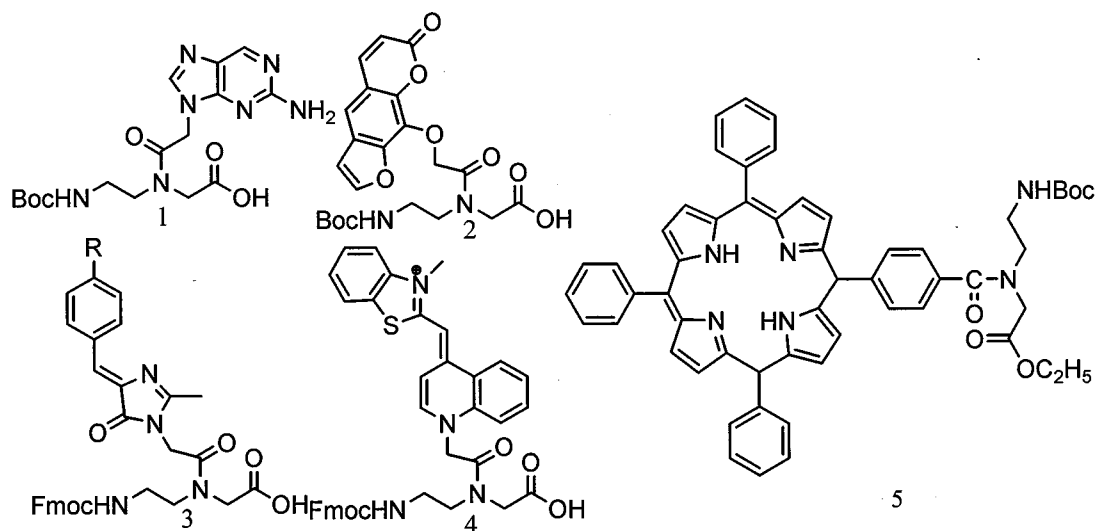


图4-14 特殊的PNA单体 6

Figure 4-14 The peculiar PNA monomers 6

为了使PNA有更为广泛的应用,各种具有新功能的碱基取代分子用于合成PNA单体,例如图4-14列出了部分已经合成的新单体,它们的合成都符合经典的PNA单体合成路线,碱基取代分子烷基乙酰化后再与骨架缩合产生新单体。然而在所研究的新单体中,因为荧光光谱的方法在分子生物学中已得到广泛应用,所以绝大部分是具有荧光性质的分子用于取代碱基。Krishna N. Ganesh 等人合成单体1,他们用具有荧光性质6-氨基嘌呤取代了非荧光的天然碱基用以识别鸟嘌呤。因为包含6-氨基嘌呤的PNA具有了荧光性质,所以可以作为荧光探针,用来研究PNA-DNA之间的相互作用^[49]。同样, Isao Saito等人合成补骨脂素取代碱基的具有荧光性质的单

体2, 包含2的PNA与DNA的杂交亲和力依赖于2单体在PNA中的位置, 当2单体在PNA的两端时将明显增加杂交亲和力, 并且研究发现当PNA和DNA杂交后, 它的荧光强度明显降低^[50]。绿色荧光发色团取代碱基分子的单体3, 以及噻唑橙取代的单体4被合成, 它们同样具有荧光性质, 研究发现4能够区分完全匹配和单碱基错配^[51, 52]。单体5是李早英等人合成的, 他们把卟啉键合到PNA骨架上, 但未作进一步研究, 有可能是卟啉分子体积太大, 如果插入到PNA中会严重影响杂交^[53]。

4.5 偶氮类PNA单体的合成和性质

前面几节综述了各种改造的 PNA 单体的合成和部分应用。具有新功能的单体合成将是最有吸引力的, 因为新的功能可以拓宽 PNA 的应用, 因此我们也寻求具有新功能的 PNA 单体。

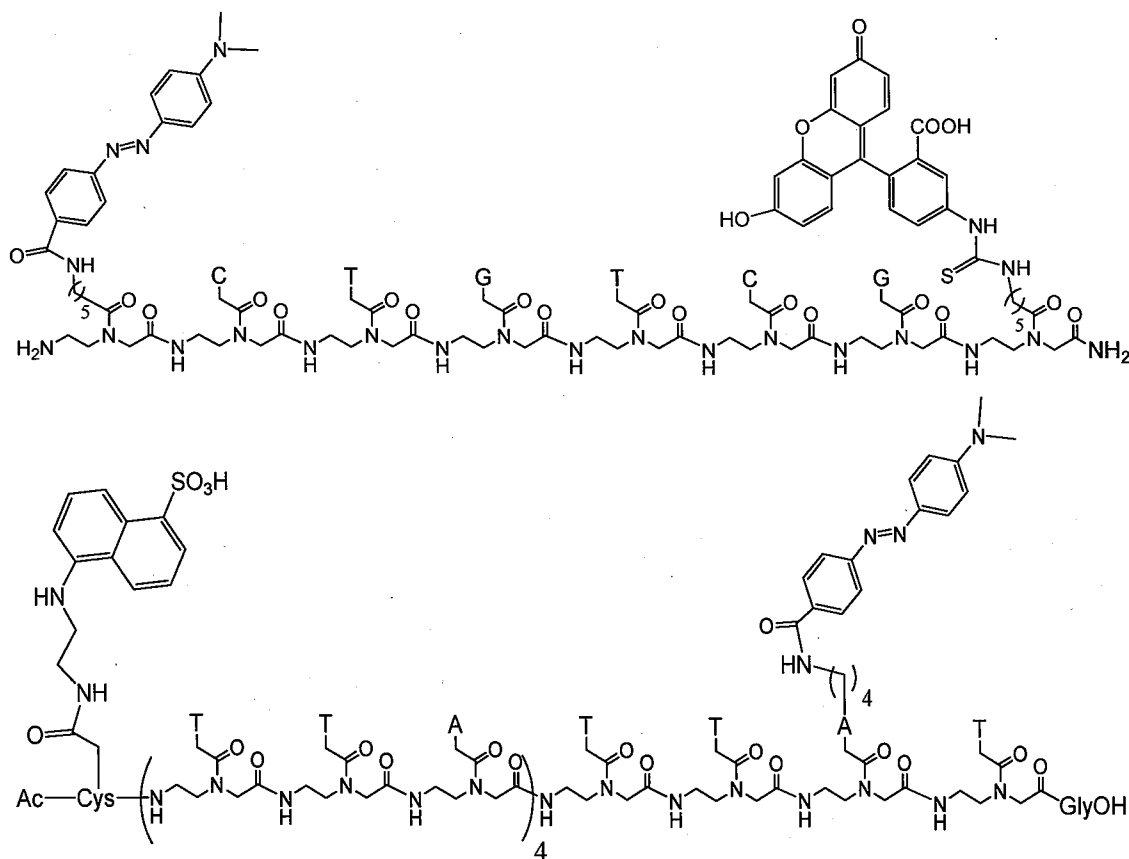


图4-15 包含偶氮苯PNA

Figure 4-15 PNA containing azobenzene

通过外部刺激来调节生物反应一直是一个有吸引力的研究课题, Makoto Komiyama 等已经合成和广泛研究了包含偶氮苯基团的 DNA, 用来调节 DNA 之间

的杂交^[54-60]。包含反式偶氮苯的 DNA 与互补的 DNA 杂交时,平面的反式偶氮苯插入到相邻碱基对之间,然而,非平面的顺式偶氮苯则不能插入到相邻碱基对之间,这将使双链稳定性下降,因此,通过外部紫外光和可见光的辐照,偶氮苯可以可逆的调节 DNA 双链的活性。平面反式偶氮苯插入到相邻的碱基对之间后,通过碱基堆积作用和疏水作用来稳定双螺旋的稳定性,而非平面的偶氮苯将导致部分双螺旋畸变 Tm 降低(这些结果可以从热力学参数上得到,反式结构有一个有利的熵变),因此我们想到了合成偶氮类分子取代碱基的肽核酸单体。包含偶氮苯类化合物作为荧光淬灭分子已经应用到 PNA 中。Yushin Nakamura 和 Oliver Seitz 两小组都把偶氮苯作为荧光淬灭分子接在 PNA 的末端,而另一端接荧光分子(见图 4-15),类似于 DNA 技术中的分子信标技术,他们把偶氮苯连接在 PNA 上的方式虽然不同,但目的是相同的^[61, 62]。

虽然偶氮苯已作为荧光淬灭分子应用在 PNA 中,但还没有人把它作为新的单体或结构单元插入到 PNA 中。因此,我们想首先合成偶氮苯取代碱基的 PNA 单体作为我们的目标。

4.5.1 偶氮苯取代碱基的 PNA 单体的合成和性质

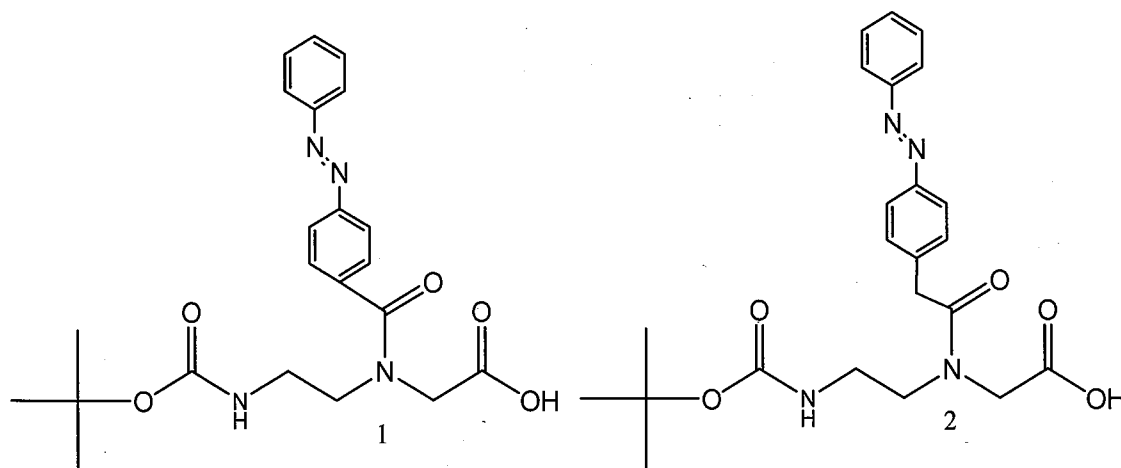


图4-16 偶氮苯PNA单体

Figure 4-16 azobenzene PNA monomers

偶氮苯类化合物是一种光致变色分子,而且有望可以作为分子开关,因此已作了大量研究,而且它们的合成也广为研究。偶氮苯类化合物的合成方法主要有两类:第一类,通过重氮化反应;第二类,通过亚硝基和氨基偶联反应。偶氮苯分子的长度比碱基的长,如果连接分子过长有可能不利于插入到相邻碱基对之间,因此,我

们首先合成了两种连接分子长度不同的偶氮苯取代的单体(图4-16)。它们的紫外光谱性质也被研究,显示了理想的结果。

4.5.1.1 单体1的合成和性质

合成单体1首先合成偶氮苯甲酸,我们采用氨基与亚硝基的偶联来形成偶氮功能团,因此它就有两种方法(图4-17)。路线1先用单一过硫酸氢钾试剂氧化对氨基苯甲酸以定量的产率生成亚硝基苯甲酸,然后再和苯胺偶联以91%的产率得到偶氮苯甲酸^[63]。路线2先用三氧化钨氧化苯胺以65%的产率得到亚硝基苯,然后再与对氨基苯甲酸偶联95%的产率得到偶氮苯甲酸^[64]。虽然两条路线长度一样,处理方法相似,但是我们不难发现路线1的产率高,其次亚硝基苯在空气中没有亚硝基苯甲酸稳定存放时间长,因此我们在合成中采用路线1。

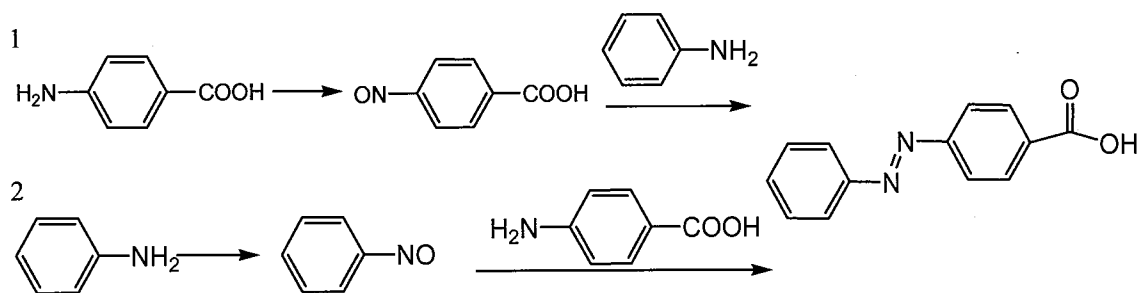


图4-17 偶氮苯甲酸的合成

Figure 4-17 Synthesis of azobenzene carboxylic acid

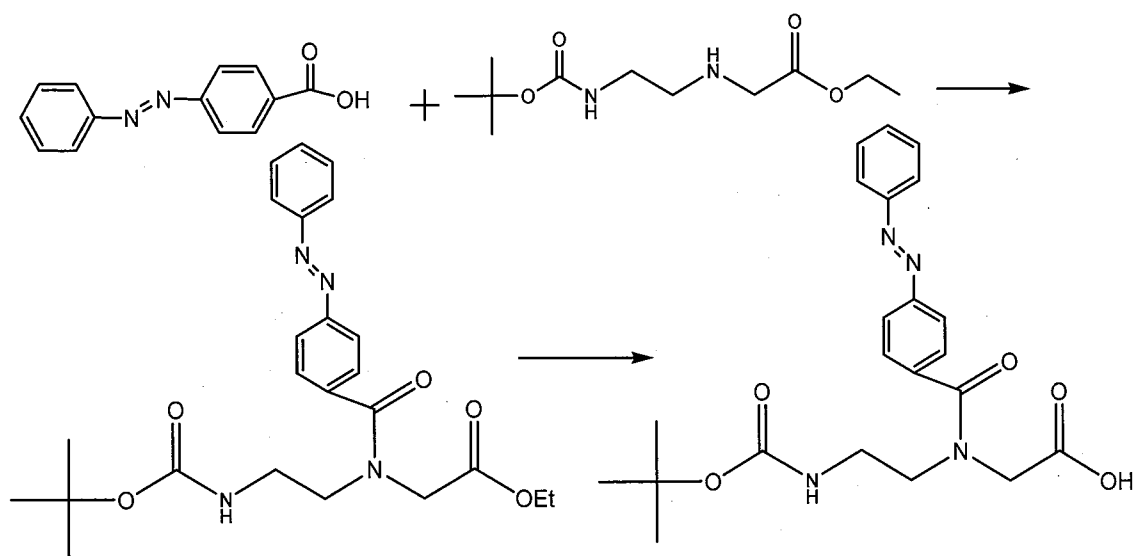


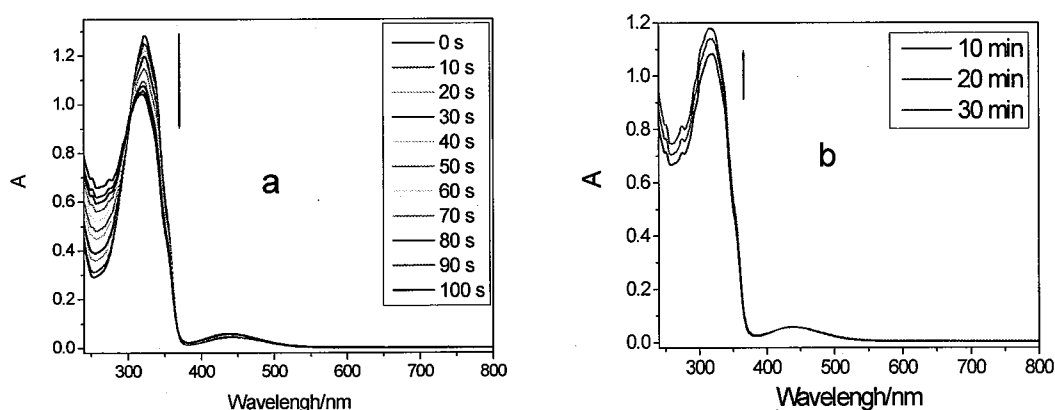
图4-18 PNA单体1的合成

Figure 4-18 Synthesis of PNA monomer 1

偶氮苯甲酸和骨架在缩合剂DCC和辅助缩合剂HOObt的作用下缩合得到单体的乙酯，然后皂化，得到产物1，产率71%（图4-18）。

偶氮苯甲酸的紫外可见光谱性质

偶氮苯甲酸溶在乙醇中，浓度为 $5.66 \times 10^{-5} \text{ M}$ ，在紫外光（366 nm）照射下测其紫外可见吸收光谱的变化，显示在图4-19。其最大吸收峰在323 nm处，有Bouguer-Lambert定律可以得到消光系数 $\epsilon_{323} = 25963 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 。我们从图4.78中a图可以发现323nm处吸收峰在366nm的紫外光照射下峰强度逐渐降低，并且有两个等吸收点分别在302 nm和367 nm处，这主要来源于偶氮部分 $\pi-\pi^*$ 的跃迁吸收，随着紫外光照反式偶氮苯变为顺式吸收下降，随后用546 nm的可见光照（图4-19中b图），偶氮 $\pi-\pi^*$ 跃迁吸收峰的强度又升高，这或许是可见光照射激发了顺式偶氮苯的偶氮部分 $n-\pi^*$ 电子的跃迁，使偶氮 $\pi-\pi^*$ 跃迁吸收峰的强度返回。这就证明了偶氮苯甲酸在外界光刺激下可以经历可逆的顺反异构变化。



(a) and (b) correspond to azobenzene carboxylic acid by photoirradiating 366nm and 546nm respectively

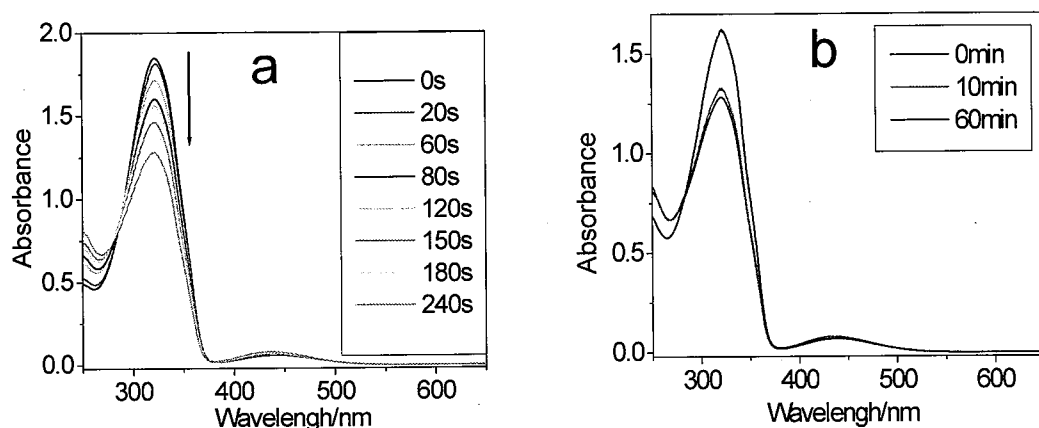
图4-19 偶氮苯甲酸的紫外可见吸收光谱

Figure 4-19 UV-vis absorption spectral change of azobenzene carboxylic acid in ethanol

单体1的紫外光谱性质

单体溶在乙腈中，浓度为 $8.29 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ ，在紫外光（366 nm）照射下测其紫外可见吸收光谱的变化，显示在图4-20。可以看出偶氮基团的 $\pi-\pi^*$ 跃迁的吸收峰在322 nm处，有Beer-Lambert公式可以得到 $\epsilon_{322} = 22285 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 。偶氮基团的 $\pi-\pi^*$ 跃迁吸

收峰强度随着紫外光 (366 nm) 的照射逐渐降低, 而且具有两个等吸收点分别是 284 nm 和 374 nm, 这正是反式偶氮苯转变为顺式偶氮苯的特征。从图 4.78 b 中可以看出, 随后用可见光 (546 nm) 照或许激发了单体中顺式偶氮苯中偶氮基团的 $n-\pi^*$ 跃迁, 使顺式偶氮苯转变为反式偶氮苯, $\pi-\pi^*$ 跃迁吸收峰强度升高。由此可见, 偶氮苯基肽核酸单元在紫外光和可见光辐照下也可以非常容易的进行可逆的顺反异构, 与偶氮苯甲酸相似。



(a) and (b) correspond to PNA monomer 1 by photoirradiating 366nm and 546nm respectively

图4-19 PNA单体1的紫外可见吸收光谱

Figure 4-19 UV-vis absorption spectral change of PNA monomer 1

4.5.1.2 单体2的合成和性质

首先合成偶氮苯乙酸, 和合成单体1一样是亚硝基和氨基反应, 由于文献报道氧化对氨基苯乙酸时产率非常低, 绝大部分直接氧化到硝基, 因此合成偶氮苯乙酸不能像合成偶氮苯甲酸那样有两条路线, 只能是氧化苯胺到亚硝基苯, 然后和对氨基苯乙酸偶联以86%的产率得到产物偶氮苯乙酸 (图4-20)。

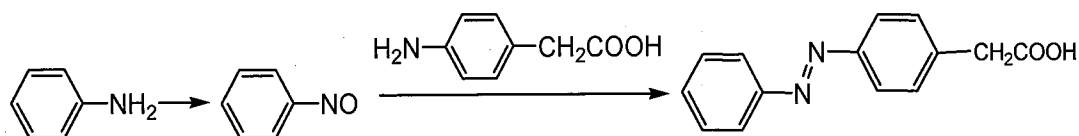


图4-20 偶氮苯乙酸的合成

Figure 4-20 Synthesis of azobenzene acetic acid

偶氮苯乙酸和骨架在缩合剂DCC和辅助缩合剂HOOBT的作用下缩合得到单体的乙酯，然后碱解调酸，得到产物2，产率87%（图4-21）。这些新单体插入到PNA寡聚体中，将在后面介绍。

偶氮苯乙酸的紫外可见光谱性质

偶氮苯乙酸溶在乙醇中，浓度为 $6.667 \times 10^{-5} \text{ M}$ ，在紫外光（366 nm）照射下测其紫外可见光谱的变化，显示在图4-22。其最大吸收峰在322 nm处，有Bouguer-Lambert定律可以得到消光系数 $\epsilon_{323} = 25453 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 。它的紫外光谱性质和偶氮苯甲酸相似，两个等吸收点分别在297 nm和367 nm处。

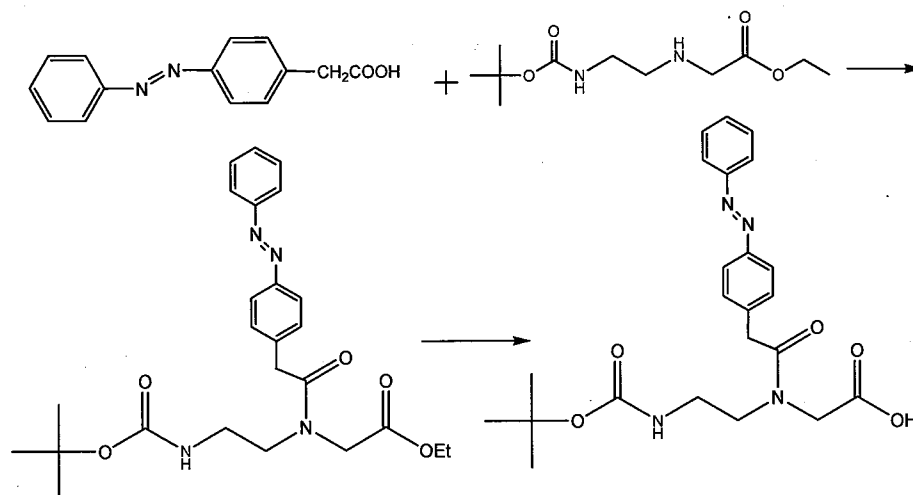
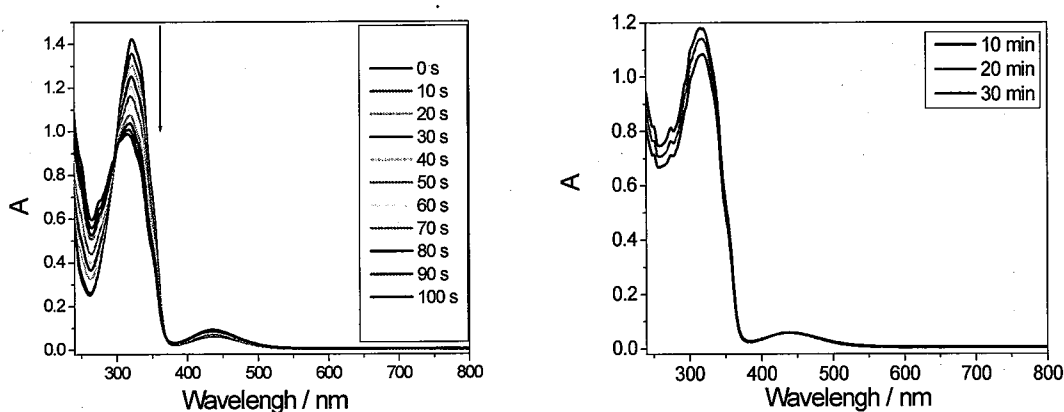


图4-21 PNA单体2的合成

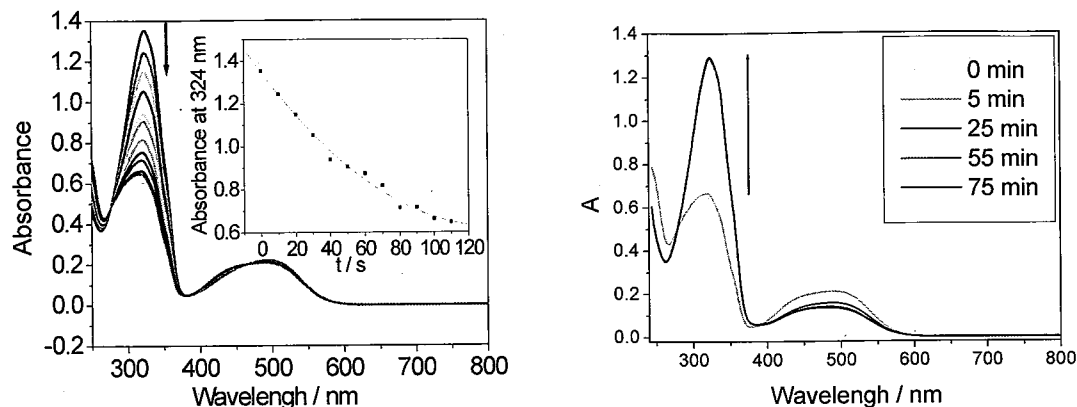
Figure 4-21 Synthesis of PNA monomers 2



(a) and (b) correspond to azobenzene acetic acid by photoirradiating 366nm and 546nm respectively

图4-22 偶氮苯乙酸的紫外可见吸收光谱

Figure 4-22 UV-vis absorption spectral change of azobenzene acetic acid



(a) and (b) correspond to PNA monomer 1 by photoirradiating 366nm and 546nm respectively

图4-23 PNA单体2的紫外可见吸收光谱

Figure 4-23 UV-vis absorption spectral change of PNA monomer 2

单体2的紫外光谱性质

单体2溶在乙腈中，浓度为 $9.32 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ ，在紫外光（366nm）照射下测其紫外可见光谱的变化，显示在图4-23， $\epsilon_{323} = 18040 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 。同样它的紫外光谱变化图，也显示了它的可逆顺反异构，两个等吸收点分别是275 nm和379 nm。

4.5.2 萘偶氮苯取代碱基的单体合成与性质

偶氮苯通过顺反异构来调节双螺旋活性，这种调节来自于顺式和反式不同的空间位阻体积，如果换用更大体积的偶氮分子或许更加有效。因此我们尝试合成了萘偶氮苯取代碱基的PNA单体，同样为了调节插入到相邻碱基对之间的深度，也合成了两种单体3和4（图4-24）。同样它们的紫外可见吸收光谱也显示了它们的可逆顺反异构。其次由于萘环的存在使其具有了荧光性质，并且荧光光谱也显示了可逆的变化，它可以作为荧光探针，来研究PNA与DNA之间的相互作用。

4.5.2.1 萘偶氮苯单体的合成

单体3和4的合成路线见图4-25。它们的合成我们首先尝试采用亚硝基和氨基的反应，但是未获成功，因此又采用了合成偶氮化合物的另一种常用方法，通过重氮化反应。首先使对氨基苯甲酸或对氨基苯乙酸在盐酸和亚硝酸钠的存在下重氮化，然后利用氨基的定位效应和 α -萘胺反应得到4-氨基萘偶氮苯甲酸或4-氨基萘偶氮苯乙酸，然后用次磷酸去氨基化反应，得到萘偶氮苯甲酸或乙酸，再在缩合剂DCC和

辅助缩合剂 HOOBt作用下与骨架缩合得到新单体3和4^[65, 66]。

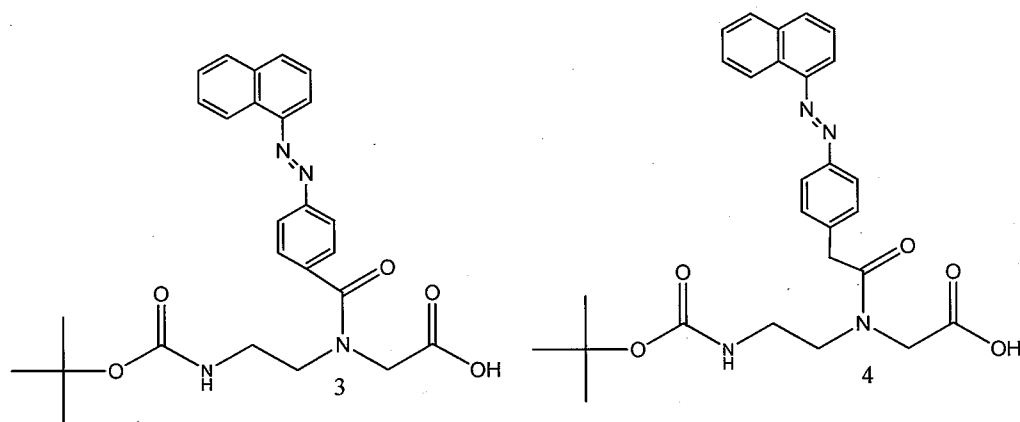


图4-24 萘基偶氮苯PNA单体

Figure 4-24 Naphthylazobenzene PNA monomers

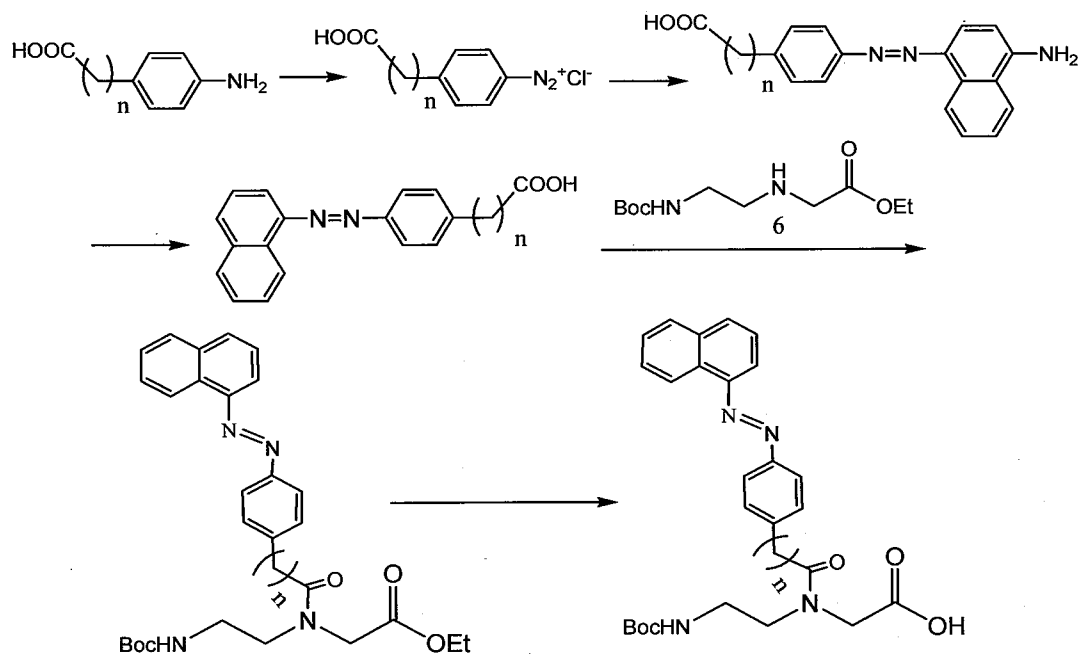


图4-25 萘基偶氮苯PNA单体的合成

Figure 4-25 Synthesis of naphthylazobenzene PNA monomers

4.5.2.2 萘偶氮苯PNA单体的性质

紫外可见吸收光谱

我们同样研究了它们在紫外光和可见光照射下的紫外可见光谱的变化。图4-25显示了它们可逆异构的结构图，图4-26和4-27分别显示了单体3和4的紫外可见光谱的变化。

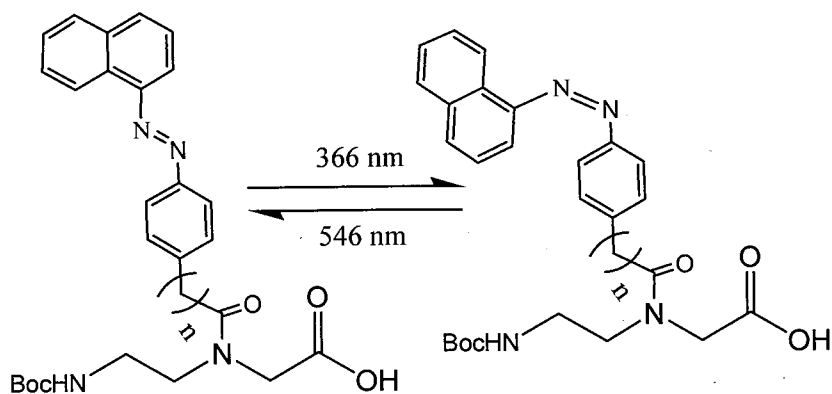
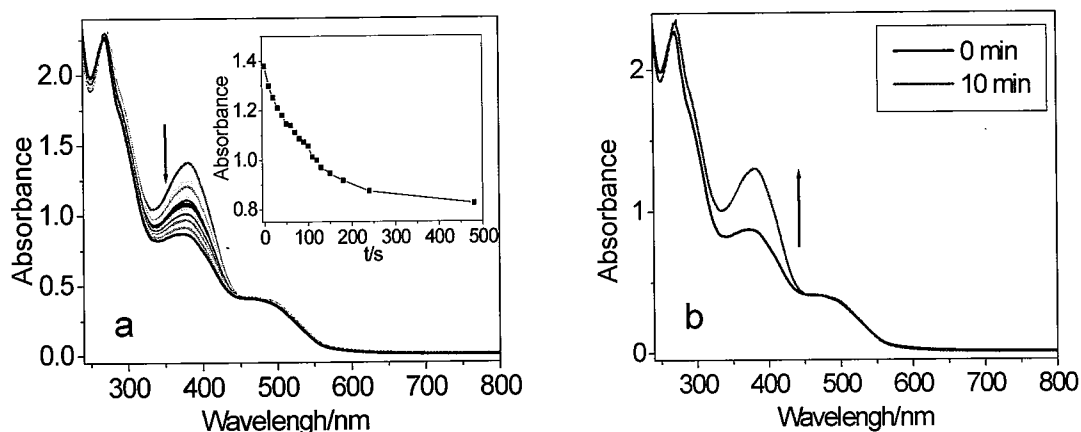


图4-25 萘基偶氮苯PNA单体的的光致异构

Figure 4-25 The photoisomerization of naphthylazobenzene PNA monomers

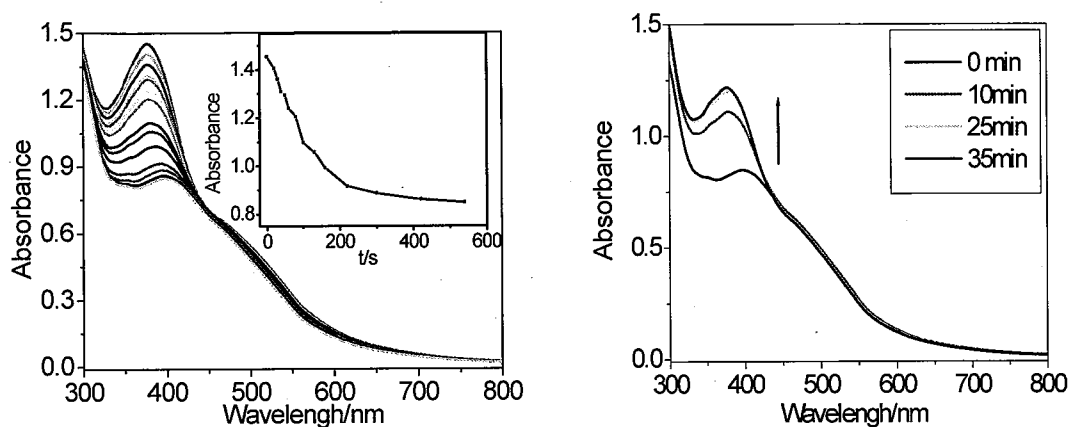


(a) and (b) correspond to PNA monomer 3 by photoirradiating 366nm and 546nm respectively

图4-26 PNA单体3的紫外可见吸收光谱

Figure 4-26 UV-vis absorption spectral change of PNA monomer 3

我们可以从图中发现单体3在380 nm处的吸收峰强度在紫外光照射下逐渐降低,这主要是来自偶氮部分的 $\pi-\pi^*$ 的电子跃迁吸收,在紫外光照射下,顺式的氮氮双键转变为反式,吸收峰强度的下降。偶氮部分的 $\pi-\pi^*$ 的电子跃迁吸收峰由偶氮苯 $\lambda_{\max} = 324 \text{ nm}$ 红移到 $\lambda_{\max} = 380 \text{ nm}$,这主要是由于共轭体系的增大。随后用可见光照射,同样吸收峰的强度返回,这说明顺式又返回到反式,这就实现了可逆光致顺反异构。同样的结果在单体4的紫外可见光谱图中可以得到,我们还发现单体3在270 nm处有一吸收峰,然而在单体4的谱图上却未发现(图4-27 a中未给出),这可能由于单体3的连接分子上的羰基也参与了共轭,致使此羰基的 $\pi-\pi^*$ 的电子跃迁吸收峰红移至270 nm。



(a) and (b) correspond to PNA monomer 4 by photoirradiating 366nm and 546nm respectively

图4-27 PNA单体4的紫外可见吸收光谱

Figure 4-27 UV-vis absorption spectral change of PNA monomer 3

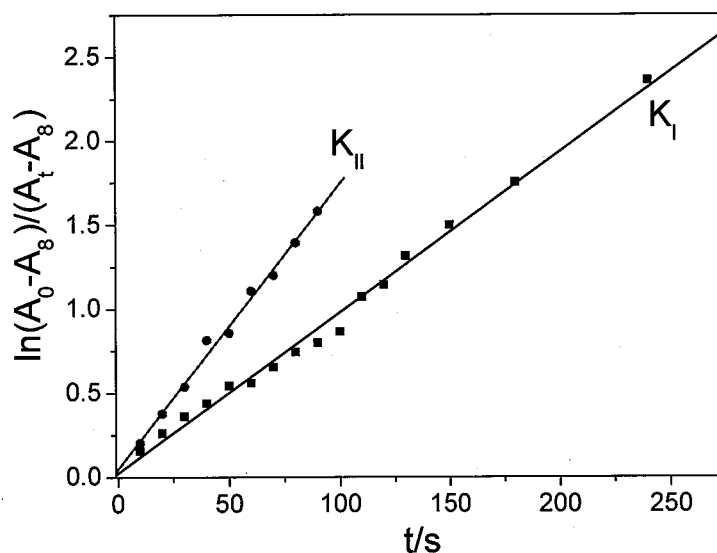


图4-28 萘基偶氮苯单体的 $\ln(A_0-A_\infty)/(A_t-A_\infty)$ 对时间 t 作图

Figure 4-28 Time course change the value of $\ln(A_0-A_\infty)/(A_t-A_\infty)$ when samples were irradiated at 366 nm. These lines were obtained by fitting original data. The slope of line denotes the value of photoisomerization rate constant. A_0 denotes the absorption of 0 second, A_t denotes the absorption of t second, A_∞ denotes the absorption of infinitude second.

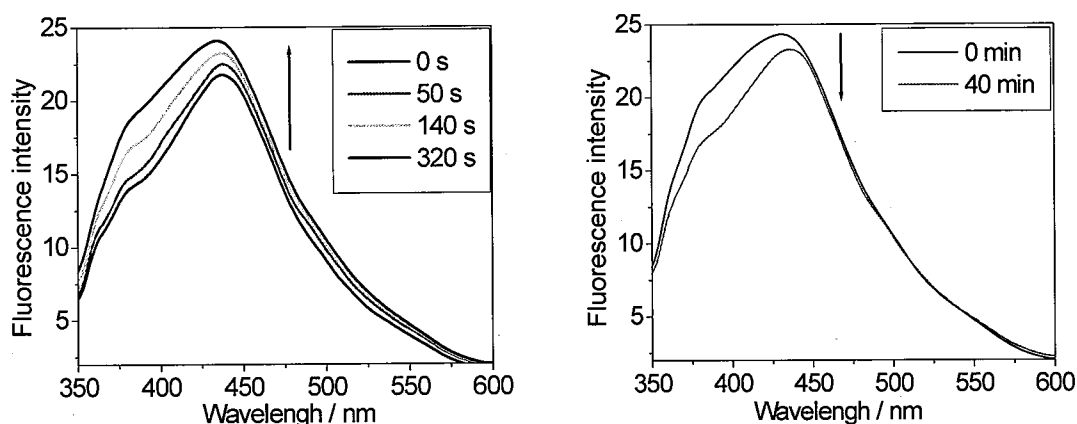
由公式4.1我们可以求出顺反异构的转换速率常数, 通过 $\ln[(A_0-A_\infty)/(A_t-A_\infty)]$ 对辐照时间作图(见图4-28), 我们可以获得单体3和4的转换速率常数分别是 0.0095 s^{-1}

和 0.0169 s^{-1} 。3的顺反异构速率常数明显小于4的,这或许还是因为3的共轭程度高,致使异构变得困难。

$$\ln(A_0 - A_\infty)/(A_t - A_\infty) = K t \quad 4.1$$

荧光光谱

由于荧光检测的高灵敏度、检测方便,所以荧光检测在化学跟踪监测,基因研究和诊断方面扮演了重要的角色,也被广泛应用。脱氧核苷酸的碱基可以被稠环芳烃取代,从而使他们具有荧光性质,并且也得到了研究。同样,PNA的碱基被苯基偶氮萘取代后,由于萘的存在也具有了一定荧光性质,并且荧光强度在紫外光和可见光照射下也发生了可逆的变化。图4-29和图4-30分别显示了单体3和4在光照下的荧光光谱的变化^[66, 67]。



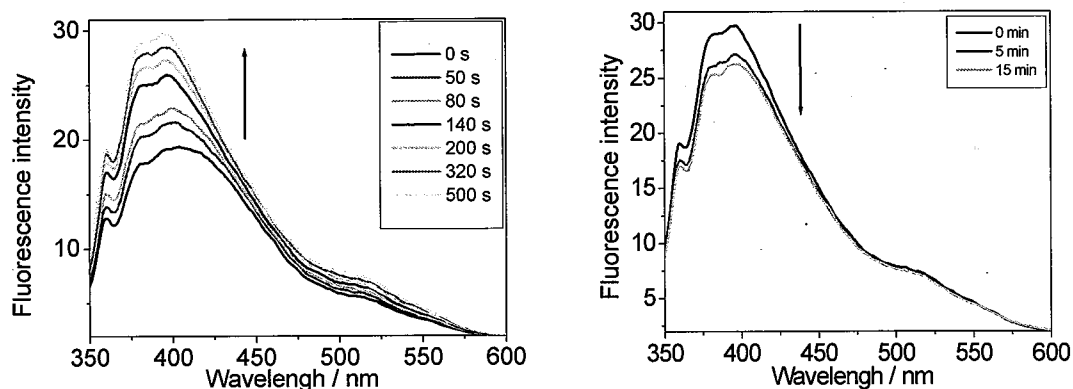
(a) Fluorescent emission changes of 3 in ethanol upon photoirradiation with a monochromatic light at 366nm and (b) subsequent irradiation with a monochromatic light at 546nm.

图4-29 单体3的荧光光谱变化

Figure 4-29 Fluorescence change of PNA monomer 3

单体3和4在波长为290 nm的激发光激发下,它们的发射波长分别为437 nm和403 nm。单体3和4在在紫外光(366 nm)照射下,它们的荧光光谱的变化趋势正好与它们的紫外可见光谱的变化相反,随着紫外光照荧光强度增强,3和4的不同在于4变化更加明显。同样,随后用可见光照(546 nm),荧光强度又降低,也实现了可逆的变化。随着紫外光光照,荧光强度随之增加,我们认为这是由于自身荧光淬灭降低导致的。随着紫外光光照,反式的萘偶氮苯异构为顺式的萘偶氮苯,从紫外可

见光谱图(图4-26和4-27)上可以看出,顺式萘基偶氮苯对波长400nm左右的光吸收降低,而萘核发出的荧光正好在此波长范围,因此自身荧光淬灭降低,荧光强度增加。反之,可见光照后,荧光强度降低,这也充分说明了单体的可逆的顺反异构。单体3和4的荧光性质或许使他们在探测PNA和DNA相互作用方面得到广泛应用。



(a) Fluorescent emission changes of 4 in ethanol upon photoirradiation with a monochromatic light at 366nm and (b) subsequent irradiation with a monochromatic light at 546nm.

图4-30 单体4的荧光光谱变化

Figure 4-30 Fluorescence change of PNA monomer 4

4.6 实验

4.6.1 偶氮苯单体1的合成

对亚硝基苯甲酸

对氨基苯甲酸 9.99 g (72.8 mmol) 溶于 112 ml DCM 中, 然后加入溶有单一过硫酸氢钾试剂 89.8 g (146 mmol) 的水 450 ml, 溶液在氮气保护下搅拌, 用 TLC 实时检测反应进程(约 1 天), 过滤, 沉淀用水洗涤, 然后氮气保护下, 五氧化二磷干燥, 得黄色产物 10.99 g, 产率 99.8%。m. p. 179–181°C; FT-IR: $\nu_{\text{O-H}}$: 3399, $\nu_{\text{C-H}}$: 3058, $\nu_{\text{N=O(倍频)}}$: 2555, $\nu_{\text{C=O}}$: 1697, 骨架振动: 1600 $\nu_{\text{N=O}}$: 1428(二聚体); ESI-MS: $[\text{M-H}]^- = 150.11$; $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6): $\delta = 13.554$ (s, 1H), 8.24 (d, 2H), 8.01 (d, 2H)。

偶氮苯甲酸的合成

对亚硝基苯甲酸 3.00 g (19.8 mmol) 悬浮在 300 ml 冰醋酸和二甲亚砜混合溶液 (1/1 v/v) 中, 超声直到完全溶解, 加入新蒸的苯胺 1.8 ml (20 mmol), 混合物室温搅拌 3 天, 然后加入适量水, 过滤, 用水洗涤两次, 干燥, 得产物 4.25 g, 产率 95%。

FT-IR: V_{O-H} : 3434, $V_{C=O}$: 1679, $V_{N=N}$: 1428, V_{C-N} : 1290, γ_{C-H} : 781(Ph1.4 取代) ; ESI-MS: $[M-H]^-$ =225.09 ; 1H NMR (DMSO- d_6): δ =13.27(s,1H), 8.13(m,2H),7.94(m,5H), 7.61(m,2H)。

单体 1 的合成:

偶氮苯甲酸 1.13 g (5 mmol) 的 DMF (20 ml) 溶液中加入 0.90 g (5.5 mmol) HOObt, 冰浴下加入 DCC 1.13 g (5.5 mmol), 搅拌 40 min, 再加入骨架(3) 1.23 g (5 mmol) 反应 2 小时后移走冰浴, 室温反应过夜。减压蒸除 N,N-二甲基甲酰胺, 加入 50 ml DCM, 过滤, 25 ml DCM 洗涤, 合并有机相, 依次用碳酸氢钠 (10 ml $\times$ 3), 硫酸氢钾(10 ml $\times$ 2)和氯化钠(10 mL $\times$ 1)水溶液洗涤, 用硫酸镁干燥, 浓缩, 然后溶在 20 mL THF 中, 加入 40 ml 氢氧化钠(1 mol/l), 搅拌 4 小时后加入 50 ml 二氯甲烷洗涤, 水相用 4 mol/l 的盐酸调 pH=2, 放置过夜, 过滤, 沉淀水洗, 干燥, 得橙色产物 1.51 g, 产率 71%。 m.p.159-161 $^{\circ}C$; FT-IR: V_{O-H} : 3322, V_{C-H} : 2977, $V_{C=O}$: 1718, $V_{N=N}$: 1432; ESI-MS: $[M-H]^-$ =425.22; 1H NMR (DMSO), δ :12.91 (s,1H), 7.92(m,4H), 7.51(m,5H), 6.86 和 6.81(t,1H), 4.13 和 3.97(s,2H), 3.48 和 3.33(m,2H), 3.19 和 3.05(m,2H), 1.34(d,9H)。

4.6.2 偶氮苯单体2的合成

亚硝基苯的合成:

5.5 ml H_2O_2 (40 mmol) 和 4.5 ml H_2O 加入到溶有 0.9 ml 苯胺 (10 mmol) 的 3 ml 甲醇中, 然后在 0 $^{\circ}C$ 下, 加入 0.144 g MoO_3 (1 mmol), 再加入氢氧化钾水溶液 1 ml (1 mmol), 冰浴搅拌反应 1 天, 溶液 pH 调到 3 左右, 加入 15 ml 水, 过滤得沉淀, 水洗, 冰甲醇洗涤, P_2O_5 干燥, 得 7.0 mg 产物, 产率 65%。FT-IR: V_{C-H} : 3060, 苯环骨架振动: 1485 1458, $\gamma_{N=O}$:1428(二聚体); ESI-MS: $[M+H]^+$ =108.41。

偶氮苯乙酸合成:

取 6.3 g 亚硝基苯 (58.8 mmol) 溶于 150 ml 冰醋酸中, 加入 4.53 g 对氨基苯乙酸 (30 mmol), 室温搅拌反应 2 天, 过滤, 水洗 2 次, 干燥得产物 6.19 g 产物, 产率 86%。FT-IR: V_{O-H} : 3444, V_{C-H} : 3043, $V_{C=O}$: 1697, $V_{N=N}$: 1425, V_{C-N} : 1255, γ_{O-H} : 919, γ_{C-H} : 769, 686; MS: $[M+H]^+$ =241.24 ; 1H NMR (DMSO- d_6) δ : 12.472 (s, 1H), 7.830-7.923 (m, 4H), 7.507-7.643 (m, 5H), 3.715 (s,2H)。

单体 2 的合成:

2.011 g 偶氮苯乙酸(8.4 mmol)溶于 60 ml DMF, 然后冰浴下加入 1.646 g HOObt (10.1 mmol) 和 2.081 g DCC (10.1 mmol), 溶液搅拌 40 min 后, 再加入 2.214 g 骨架(9 mmol), 冰浴 2 h 后, 室温搅拌过夜, 减压蒸干, 剩余物用 DCM 洗涤(2×50 ml), 合并滤液后, 再加入 150 ml DCM, 依次用碳酸氢钠(200 ml×3), 硫酸氢钾(200 ml×2) 和氯化钠(200 ml×1)水溶液洗涤, 用硫酸镁干燥, 蒸干, 柱色谱分离 (SiO₂, 10% methanol/DCM) 得到 3.223 g 单体的乙酯, 产率 82%。FT-IR: $\nu_{\text{N-H}}$: 3349, $\nu_{\text{C-H}}$: 2979, $\nu_{\text{C=O}}$: 1744, 1708, 苯环骨架振动: 1504, $\nu_{\text{N=N}}$: 1446, $\delta_{\text{叔丁基}}$: 1392, 1365, 叔丁基的骨架振动: 1250, 1190, $\nu_{\text{C-O}}$: 1168, $\gamma_{\text{C-H}}$: 757, 689; ESI-MS: $[\text{M}+\text{H}]^+ = 469.22$; ¹H NMR (CDCl₃) δ : 7.871 (t, 4H), 7.344-7.508 (m, 5H), 5.449 (t, 1H), 4.183 (m, 2H), 4.063 and 3.992 (s-2, 2H), 3.822 and 3.778 (s-2, 2H), 3.547 and 3.491 (m-2, 2H), 3.282 and 3.240 (t-2, 2H), 1.437 (s, 9H), 1.264 (t, 3H)。

2.998 g 单体的乙酯悬浮于 20 ml THF 中, 加入 40 ml 氢氧化钠(1 mol/l), 搅拌 45 min, 蒸出 THF, 水相用 2 mol/l 的盐酸调 pH=2, 放置过夜, 过滤, 沉淀水洗, P₂O₅ 干燥, 得橙色产物 2.453 g, 产率 87%。m.p. 95-97°C; FT-IR: $\nu_{\text{N-H}}$: 3328, $\nu_{\text{C-H}}$: 2977, 2931, $\nu_{\text{C=O}}$: 1708, 苯环骨架振动: 1508, $\nu_{\text{N=N}}$: 1453, $\delta_{\text{叔丁基}}$: 1392, 1367, $\nu_{\text{C-O}}$: 1166, $\gamma_{\text{C-H}}$: 767, 688; ESI-MS: $[\text{M}-\text{H}]^- = 439.18$; $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{H}]^- = 421.44$; ¹H NMR (DMSO-d₆) δ : 7.803-7.902 (m, 5H), 7.403-7.624 (m, 4H), 6.997 和 6.780 (t-2, 1H), 4.215 和 3.969 (s-2, 2H), 3.861 和 3.428 (s-2, 2H), 3.413 和 3.337 (m-2, 2H+H₂O), 3.148 和 3.068 (m-2, 2H), 1.372 (s, 9H)。

4.6.3 单体 3 的合成

4-(4-氨基-萘基偶氮)苯甲酸合成:

5.48 g 对氨基苯甲酸(40 mmol) 悬浮于 60 ml 水中, 室温搅拌下滴加 1 M 的氢氧化钠调节 pH=8, 冰浴下, 7 ml 浓盐酸(37% w/w)加入到溶液中, 然后逐渐加入 2.90 g 亚硝酸钠 (42 mmol), 溶液在 5 °C 搅拌 1 h, 加入 0.12 g 尿素(2 mmol)去除过量的亚硝酸。

5.72 g α 萘胺 (40 mmol) 悬浮于 60 ml 水中, 加入 6 ml 浓盐酸(37% w/w), 搅拌至 α 萘胺溶解, 加入到上述重氮盐溶液中, 碳酸钠溶液(20% w/w)调节 pH=8, 溶

液在 10℃ 搅拌 2 h, 过滤, 氯化钠溶液洗涤(10%, 40 ml), 产物悬浮于 80 ml 甲醇中回流几小时, 得到产物 8.84g, 产率 76%。FT-IR: V_{N-H} : 3382, V_{C-H} : 3054, $V_{C=O}$: 1693, $V_{N=N}$: 1417; ESI-MS: $[M+H]^+ = 292.32$.

4-萘基偶氮苯甲酸

5.82 g 4-(4-氨基-萘基偶氮)苯甲酸(20 mmol) 悬浮于 60 ml 水中, 用 2 M 氢氧化钠调节 pH=9, 加入 1.52 g 亚硝酸钠(22 mmol), 搅拌 5 min, 再加入 16 ml 浓盐酸(37%, w/w) 和一些冰块搅拌 1 h, 39.6 g 次磷酸(50%, 0.3 mol) 加入到上述溶液, 5℃ 搅拌 0.5 h, 然后室温搅拌过夜, 沉淀过滤, 水洗, 干燥得 4.30 g 产物, 产率 78%。FT-IR: V_{C-H} : 2977, $V_{C=O}$: 1729, $V_{N=N}$: 1446; ESI-MS: $[M-H]^- = 275.07$. 1H NMR (DMSO- d_6): δ : 8.82-8.91 (m, 1H), 8.30-8.36 (m, 1H), 7.80-8.23 (m, 5H), 7.59-7.56 (m, 4H)。

单体 3 合成:

2.32 g 4-萘基偶氮苯甲酸 (8.4 mmol) 溶于 60 ml DMF, 在 0℃ 下, 加入 1.646 g HOObt (10.1 mmol) 和 2.081 g DCC (10.1 mmol), 搅拌 40 min, 再加入 2.214 g 骨架(9 mmol), 搅拌反应 2 h 后, 室温搅拌过夜, 减压蒸干, 残留物用 DCM 洗涤(2×50 ml), 洗涤液中再加入 150 ml DCM, 依次用碳酸氢钠(200 ml×3), 硫酸氢钾(200 ml×2) 和氯化钠(200 ml×1) 水溶液洗涤, 有机相中的沉淀过滤除去, 用硫酸镁干燥, 蒸干, 柱色谱分离 (SiO₂, 洗脱剂: 石油醚/乙酸乙酯=4/6, 并逐渐增加极性), 得到 3.223g 单体的乙酯 (MS: $[M+H]^+ = 505.48$), 然后悬浮于 15 ml THF 中, 加入 10 ml 2 M NaOH 溶液, 室温搅拌 45 min, 蒸去 THF, 水溶液温度降到 0℃, 用 2 M HCl 把 pH 调到 2, 过滤, 沉淀水洗, P₂O₅ 干燥得 1.84 g, 产率 46%。FT-IR: V_{O-H} : 3446, $V_{C=O}$: 1697, $V_{N=N}$: 1423; ESI-MS: $[M-H]^- = 475.19$; 1H NMR (DMSO- d_6) δ : 8.90 (d, 2H), 8.09-8.24 (m, 4H), 7.68-7.87 (m, 4H), 4.02-4.26 (m, 4H), 3.12-3.2 (m, 2H), 1.35 (s, 9H.)。

4.6.4 单体 4 的合成

4-(4-氨基-萘基偶氮)苯乙酸合成

合成方法同 4-(4-氨基-萘基偶氮)苯甲酸, 产率 70%。FT-IR: V_{N-H} : 3455, $V_{C=O}$: 1718; ESI-MS: $[M+H]^+ = 306.53$ 。

4-萘基偶氮苯乙酸

合成方法同 4-(萘基偶氮)苯甲酸, 产率 80%。FT-IR: V_{O-H} : 3415, $V_{C=O}$: 1702; ESI-MS: $[M]^+ = 290.50$; 1H NMR (DMSO- d_6): δ : 8.81-8.86 (m, 1H), 8.32-8.42 (m, 1H), 7.62-8.27 (m, 5H), 7.34-7.58 (m, 4H), 3.62-3.80 (m, 2H)。

单体 4 的合成

合成方法同单体 3 的合成, 产率 48%。FT-IR: V_{O-H} : 3328, $V_{C=O}$: 1706; ESI-MS: $[M-H]^- = 489.18$; 1H NMR (DMSO- d_6) δ : 12.70 (s, 1H), 8.85 (d, 1H), 7.97-8.21 (m, 4H), 7.21-7.90 (m, 6H), 6.95 (t, 1H), 5.55 (d, 2H), 3.58-3.96 (m, 4H), 3.13-3.32 (m, 2H), 1.37 (s, 9H)。

参考文献

1. B. Hyrup, P. E. Nielsen, Peptide Nucleic Acids (PNA): Synthesis, Properties and Potential Applications, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 1996, 4: 5-23.
2. E. Uhlmann, A. Peyman, G. Breipohl, D. Will, PNA: Synthetic Polyamide Nucleic Acids with Unusual Binding Properties, *Angew. Chem. Int. Ed.* 1998, 37: 2796-2823.
3. F. Pellestor, P. Paulasova, The peptide nucleic acids, efficient tools for molecular diagnosis (Review). *Int J Mol Med.* 2004, 13: 521-525.
4. K. E. Lundin, Liam Good, Roger Strömberg, Astrid Gräslund, C. I. Edvard Smith, Biological Activity and Biotechnological Aspects of Peptide Nucleic Acid, *Advances in Genetics.* 2006, 56: 1-51.
5. S. Shakeel, S. Karim, A. Ali, Peptide nucleic acid (PNA) – a review, *Chem Technol Biotechnol.* 2006, 81: 892-99.
6. P. E. Nielsen, peptide nucleic acids methods and protocols, *Methods in Molecular Biology.* 208. 2002.
7. P. E. Nielsen, Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications, 2nd Ed. 2004.
8. V. A. Kumar, K. N. Ganesh, Conformationally Constrained PNA Analogues: Structural Evolution toward DNA/RNA Binding Selectivity. *Acc. Chem. Res.* 2005, 38: 404-412.
9. G. Haaima, H. Rasmussen, G. Schmidt, D. K. Jensen, J. S. Kastrup, P. W. Stafshede, B. Norden, O. Buchardt, P. E. Nielsen, Peptide nucleic acids (PNA) derived from

- N*-(*N*-methylaminoethyl)glycine. Synthesis, hybridization and structural properties, *New J. Chem.* 1999, 23: 833-840.
10. W. Maison, I. Schlemminger, O. Westerho, Multicomponent Synthesis of Novel Amino Acid±Nucleobase Chimeras: a Versatile Approach to PNA-Monomers, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2000, 8: 1343-1360.
 11. T. Tedeschi, Ro. Corradini, R. Marchelli, A. Pushlb, P. E. Nielsen, Racemization of chiral PNAs during solid-phase synthesis: effect of the coupling conditions on enantiomeric purity, *Tetrahedron: Asymmetry*. 2002, 13: 1629-1636.
 12. J. K. Pokorski, M. A. Witschi, B. L. Purnell, D. H. Appella, (S,S)-trans-Cyclopentane-Constrained Peptide Nucleic Acids. A General Backbone Modification that Improves Binding Affinity and Sequence Specificity, *J. A. Chem. Soc.* 2004, 126: 15067-15073.
 13. T. Govindaraju, R. G. Gonnade, M. M. Bhadbhade, V. A. Kumar, K. N. Ganesh, (1*S*,2*R*/1*R*,2*S*)-Aminocyclohexyl Glycyl Thymine PNA: Synthesis, Monomer Crystal Structures, and DNA/RNA Hybridization Studies, *Org. Lett.* 2003, 5: 3013-3016.
 14. K. A. Frey, S. A. Woski, Fluoroaromatic universal bases in peptide nucleic acids, *Chem. Commun.* 2002, 2206-2207.
 15. A. Okamoto, K. Tanabe, I. Saito, Synthesis and Properties of Peptide Nucleic Acids Containing a Psoralen Unit, *Org. Lett.* 2001, 3: 925-927.
 16. T. Stafforst, U. Diederichsen, Synthesis of Alaninyl and *N*-(2-Aminoethyl)glycinyl Amino Acid Derivatives Containing the Green Fluorescent Protein Chromophore in Their Side Chains for Incorporation into Peptides and Peptide Nucleic Acids, *European Journal of Organic Chemistry*. 2007, 899-911.
 17. A. Püschl, S. Sforza, G. Haaima, O. Dahl, P. E. Nielsen, Peptide nucleic acids (PNAs) with a functional backbone. *Tetrahedron Letters* 1998, 39: 4707-4710.
 18. G. Haaima, A. Lohse, O. Buchardt, P. E. Nielsen, Peptide nucleic acids (PNAs) containing thymine monomers derived from chiral amino acids: hybridization and solubility properties of D-lysine PNA. *Angewandte Chemie, Int Ed Eng.* 1996, 35: 1939-1941.
 19. P. C Meltzer, A. Y Liang, P. Matsudaira, Peptide Nucleic Acids: Synthesis of Thymine, Adenine, Guanine, and Cytosine nucleobases. *J. Org. Chem.* 1995, 60: 4305-4308.
 20. T. A Stammers, M. J Burk, Synthesis of enantiomerically pure backbone alkyl substituted peptide nucleic acids utilizing the Et-DuPHOS-Rh hydrogenation of enamido esters. *Tetrahedron Lett.* 1999, 40: 3325-3328.
 21. W. Maison, I. Schlemminger, O. Westerhoff, J. Martens, Modified PNAs: a simple method for the synthesis of monomeric building blocks. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1999, 9: 581-584.
 22. T. Tedeschi, R. Corradini, R. Marchelli, A. Püschl, P. E. Nielsen, Racemization of chiral PNAs

- during solid-phase synthesis: effect of the coupling conditions on enantiomeric purity. *Tetrahedron: Asymmetry* 2002, 13: 1629-1636.
23. D. I. Prokhorov, Yu. G. Kirillova, N. P. Boyarskaya, A. N. Tevyashova, O. V. Esipova, E. N. Zvonkova, V. I. Shvets, Synthesis of Thymine-Containing Monomers of Negatively Charged Peptide Nucleic Acids, *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2005, 39: 323-328.
 24. 孟庆国, 许笑宇, 梁远军, 刘克良, 含羟基和咪唑基团新手性肽核酸的设计与合成, *有机化学*, 2006, 26: 845-847.
 25. A. Ptischl, S. Sforza, G. Haaima, O. Dahl, P. E. Nielsen, Peptide Nucleic Acids (PNAs) with a Functional Backbone, *Tetrahedron Lett.* 1998, 39: 4707-4710.
 26. B. Falkiewicz, W. Wisniowski, A. S. Kolodziejczyk, K. Wisniewski, Synthesis of new chiral peptide nucleic acid (PNA) monomers, *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* 2001, 20: 1393-1397.
 27. A. Dragulescu-Andrasi, S. Rapireddy, B. M. Frezza, C. Gayathri, R. R. Gil, D. H. Ly, A Simple gamma-Backbone Modification Preorganizes Peptide Nucleic Acid into a Helical Structure, *J Am Chem Soc.* 2006, 128: 10258-10267.
 28. V. Kumar, P. S. Pallan, K. N. Ganesh, Pyrrolidine Nucleic Acids: DNA/PNA Oligomers with 2-Hydroxy/Aminomethyl- 4-(thymine-1-yl)pyrrolidine-*N*-acetic acid. *Org. Lett.* 2001, 3: 1269-1272.
 29. Y. Li, T. Jin, K. Liu, Synthesis and binding affinity of a chiral PNA analogue. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids*. 2001, 20: 1705-1721.
 30. B. P. Gangamani, V. A. Kumar, K. N. Ganesh, Synthesis of N.alpha.-(purinyl/pyrimidinyl acetyl)-4-aminoproline diastereomers with potential use in PNA synthesis, *Tetrahedron* 1996, 52: 15017-15030.
 31. A. Slaitas, E. Yeheskiely, Synthesis and hybridization of novel chiral pyrrolidine based PNA analogue, *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* 2001, 20: 1377-1379.
 32. S. Bregant, F. Burlina, G. Chassaing, New thiazane and thiazolidine PNA monomers: synthesis, incorporation into PNAs and hybridization studies, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2002, 12: 1047-1050
 33. B. Hyrup, M. Egholm, M. Rolland, P. E. Nielsen, R. H. Berg, O. Buchardt, Modification of the binding affinity of peptide nucleic acids (PNA). PNA with extended backbones consisting of 2-aminoethyl-.beta.-alanine or 3-aminopropylglycine units. *J Chem Soc, Chem Commun* 1993, 518-519.
 34. B. Hyrup, M. Egholm, P. E. Nielsen, P. Wittung, B. Nordén, O. Buchardt, Structure-Activity Studies of the Binding of Modified Peptide Nucleic Acids (PNAs) to DNA. *J Am Chem Soc* 1994, 116: 7964-7970.
 35. B. Hyrup, M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, A flexible and positively charged PNA analog

- with an ethylene-linker to the nucleobase: synthesis and hybridization properties, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1996, 6: 1083-1088.
36. M. Abdel-Aziz, T. Yamasaki, M. Otsuka, Synthesis and hybridization property of novel 2',5'-isoDNA mimic chiral peptide nucleic acids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2003, 13: 1041-1043.
37. M. Cantin, R. Schütz, C. J. Leumann, Synthesis of the monomeric building blocks of Z-olefinic PNA (Z-OPA) containing the bases adenine and thymine. *Tetrahedron Lett.* 1997, 38: 4211-4214.
38. N. M. Howarth, L. P. G. Wakelin, D. M. Walker, Synthesis of the four diastereoisomers of 3-thymine-1-(tbutoxycarbonyl)aminocyclopentane-1-carboxylic acid. *Tetrahedron Lett.* 2003, 44: 695-698.
39. E. Ferrer, A. Shevchenko, R. Eritja, Synthesis and Hybridization Properties of DNA-PNA Chimeras Carrying 5-Bromouracil and 5-Methylcytosine, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2000, 8: 291-297.
40. C. Christensen, A.B. Eldrup, G. Haaima, P.E. Nielsen, 1,8-Naphthyridin-2,7-(1,8H)-dione is an effective mimic of protonated cytosine in peptide nucleic acid triplex recognition systems, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2002, 12: 3121-3124.
41. C. Ausín, J-A. Ortega, J. Robles, A. Grandas, E. Pedroso, Synthesis of Amino- and Guanidino-G-Clamp PNA Monomers, *Org. Lett.* 2002, 4: 4073-4075.
42. H. Ikeda, K. Yoshida, M. Ozeki, I. Saito, Synthesis and characterization of flavin-tethered peptide nucleic acid, *Tetrahedron Lett.* 2001, 42: 2529-2531.
43. H. Challa, M. L. Styers, S. A. Woski, Nitroazole Universal Bases in Peptide Nucleic Acids, *Org. Lett.* 1999, 1: 1639-1641.
44. C. Christensen, A. B. Eldrup, G. Haaima, P. E. Nielsen, 1,8-Naphthyridin-2,7-(1,8H)-dione is an effective mimic of protonated cytosine in peptide nucleic acid triplex recognition systems, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2002, 12: 3121-3124.
45. N. Shibata, B. K. Das, H. Honjo, Y. Takeuchi, Synthesis of nonpolar peptide nucleic acid monomers containing fluoroaromatics, *Journal of Chemical Society, Perkin Trans 1* 2001, (2001): 1605-1611.
46. K. A. Frey, S. A. Woski, Fluoroaromatic universal bases in peptide nucleic acids. *Chem. Commun.* 2002, 2206-2207.
47. B. Armitage, D. Ly, T. Koch, H. Frydenlund, H. Ørum, G. B. Schuster, Hairpin-forming Peptide nucleic Acid Oligomers. *Biochemistry.* 1998, 37: 9417-9425.
48. B. P. Gangamani, V. A. Kumar, K. N. Ganesh, 2-Aminopurine peptide nucleic acids (2-apPNA): intrinsically fluorescent PNA analogs for probing PNA-DNA interaction dynamics, *Chem. Commun.* 1997, 1997: 1913-1914.

49. A. Okamoto, K. Tanabe, I. Saito, Synthesis and Properties of Peptide Nucleic Acids Containing a Psoralen Unit, *Org. Lett.* 2001, 3: 925-927.
50. T. Stafforst, U. Diederichsen, Synthesis of Alaninyl and *N*-(2-Aminoethyl)glycinyl Amino Acid Derivatives Containing the Green Fluorescent Protein Chromophore in Their Side Chains for Incorporation into Peptides and Peptide Nucleic Acids, *European Journal of Organic Chemistry.* 2007. 899-911.
51. O. Köhler, O. Seitz, Thiazole orange as fluorescent universal base in peptide nucleic acids, *Chem. Commun.* 2003, 2938-2939.
52. 贾涛, 姜中兴, 石闯, 李早英, 肽核酸骨架分子键联卟啉的合成及结构表征, *有机化学*, 2006, 26: 223-227.
53. A. Yamazawa, X. Liang, H. Asanuma, M. Komiyama, Photoregulation of the DNA Polymerase Reaction by Oligonucleotides Bearing an Azobenzene, *Angew. Chem.* 2000, 112: 2446-2447.
54. H. Asanuma, T. Ito, M. Komiyama. Photo-responsive oligonucleotides carrying azobenzene in the side-chains, *Tetrahedron Lett.* 1998, 39: 9015-9018.
55. H. Asanuma, T. Yoshida, T. Ito, M. Komiyama, Photo-responsive oligonucleotides carrying azobenzene at the 2'-position of uridine, *Tetrahedron lett.* 1999, 40: 7995-7998.
56. H. Asanuma, T. Ito, T. Yoshida, X. Liang, M. Komiyama, Photoregulation of the Formation and Dissociation of a DNA Duplex by Using the *cis-trans* Isomerization of Azobenzene, *Angew. Chem. Int. Ed.* 1999, 38: 2393-2395.
57. X. Liang, H. Asanuma, M. Komiyama, Photoregulation of DNA Triplex Formation by Azobenzene, *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124: 1877-1883.
58. X. Liang, H. Asanuma, H. Kashida, A. Takasu, T. Sakamoto, G. Kawai, M. Komiyama, NMR Study on the Photoresponsive DNA Tethering an Azobenzene. Assignment of the Absolute Configuration of Two Diastereomers and Structure Determination of Their Duplexes in the *trans*-Form, *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125: 16408-16415.
59. D. Matsunaga, H. Asanuma, M. Komiyama, Photoregulation of RNA Digestion by RNase H with Azobenzene-Tethered DNA, *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126: 11452-11453
60. H. Ikeda, F. Kitagawa, Y. Nakamura, Efficient functional molecule incorporation method to functionalized peptide nucleic acid (PNA): use in synthesis of labeled PNA oligomers, *Tetrahedron*, 2007, 63: 5677-5689.
61. O. Seitz, Solid-Phase Synthesis of Doubly Labeled Peptide Nucleic Acids as Probes for the Real-Time Detection of Hybridization, *Angew Chem Int Ed Engl.* 2000, 39: 3249-3252.
62. B. Priewisch, K. Ruck-Braun, Efficient Preparation of Nitrosoarenes for the Synthesis of Azobenzenes, *J. Org. Chem.* 2005, 70: 2350-2352.
63. A. Defoin, Simple preparation of nitroso benzenes and nitro benzenes by oxidation of anilines with H₂O₂ catalysed with molybdenum salts, *Synthesis-Stuttgart.* 2004, 5: 706-710.

64. C. yoon, J. Choi, B. Koob, Y Jeong, Synthesis of new black dyes for ink-jek inks, *Coloration Technology*. 2005, 121: 13-17.
65. X. Liang, H. Asanuma, M. Komiyama, Phenylazonaphthalene as a superb photo-regulator for DNA-triplex formation, *Tetrahedron Lett.* 2001, 42: 6723-6725.
66. S. G. Schulman, *Molecular Luminescence Spectroscopy*, Wiley, New York, 1990, pp 1-27.
67. J. Slavik, *Fluorescent Probes in Cellular and Molecular Biology*, CRC Press, Boca Raton, 1990, p 1-36.

第五章：固相合成 PNA 寡聚体

5.1 引言

20世纪60年代Merrifield创建了固相肽合成(solid-phase peptide synthesis, 简称SPPS)^[1]。由于SPPS方法与液相合成方法相比有特有的优越性, 用简单的洗滤操作代替了经典方式的每步分离、重结晶、板层或柱层的纯化操作, 使合成效率大大提高。由于SPPS方法的广泛应用, 各国科学家已成功地完成了大量复杂的活性肽的合成, 有力的促进了生命科学的发展, 因此Merrifield也获得了1984年度的诺贝尔化学奖^[2]。由于SPPS方法的不断成熟与发展, 还促进了自动化合成仪及其组合化学的问世。由于SPPS方法的优越性, 因此在1991年Nielsen P. E.首先发现PNA时, 合成的T₁₀寡聚体所使用的方法就是SPPS方法^[3]。此后人们在合成PNA寡聚体时, 都沿用了SPPS方法, 在PNA寡聚体合成研究中, 人们逐渐找到了适合合成PNA寡聚体的SPPS树脂、保护试剂、缩合剂、溶剂等等, 建立了两种应用广泛的PNA合成策略^[4,5]。

5.2 基本原理

固相肽合成的主流方式为C→N(3'→5')的组装顺序。合成的第一步是把氨基酸的羧基端键连到功能化的载体上, 随后进行各个氨基酸的组装, 又称缩合循环(coupling cycle)。进行下一个缩合循环时, 首先脱除氨基端的临时保护基团, 然后再和第二个氨基酸缩合, 因此每个缩合循环至少都包含脱保护和缩合两步反应。为了监测每步缩合反应的完全程度, 一般用茚三酮监测是否氨基完全反应, 如果显浅蓝色说明仍有少量氨基未反应, 这种情况下需要重复缩合, 如果仍不能完全则需要盖帽(这是不得已而为之); 若显浅黄色说明缩合完全, 再转入下一个循环。当目标产物组装完成后, 再脱除侧链保护基团以及切除载体(即cleavage)。基本合成示意图见图5-1^[6]。

从合成示意图上我们可以看到N端的保护基PG₁需要脱去, 然后和第二氨基酸缩合, 此时PG_Y却不能脱去, 否则将导致下一个氨基酸有可能偶联到侧链上的副反应, 因此PG₁脱除条件要和PG_Y的脱除条件是正交的或者有一定梯度, 比如一个用酸脱另一个用碱脱, 或者一个用强酸另一个用弱酸等。人们借鉴多肽合成中氨基酸的

保护策略, 经过不断尝试, 仅有两种合成保护策略被广泛应用到合成PNA上, 即PG₁一种是Boc策略, 另一种是Fmoc策略, 当然还有一种是Mmt很少应用。表5-1列举了这几方法^[4, 5, 7-13]。

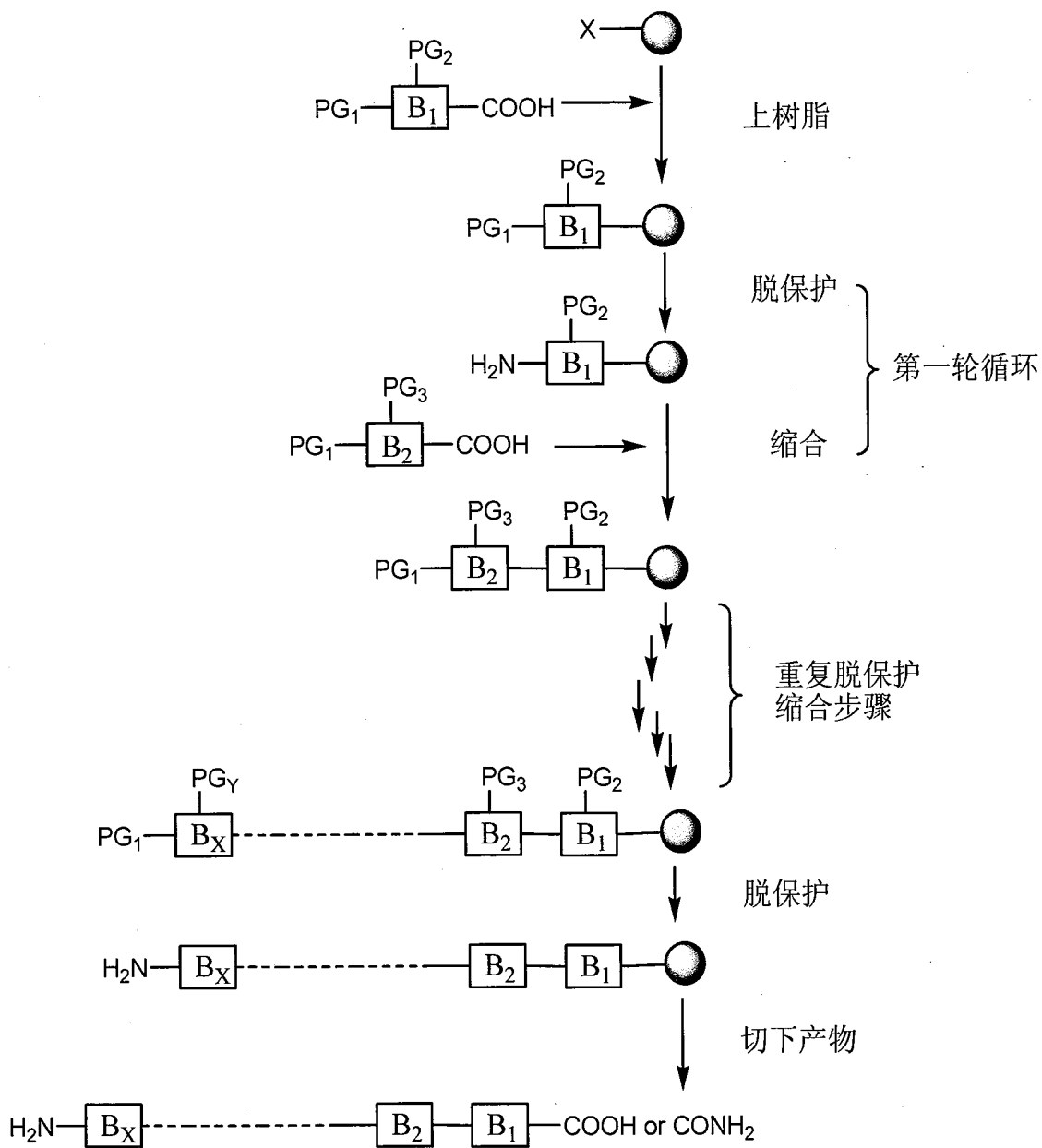


图 5-1 固相合成

Figure 5-1 Solid phase synthesis

下面几节主要就我们实验室 Boc 策略讨论固相合成 PNA 寡聚体, 优选出我们在实验中所用的条件。

表 5-1 固相合成策略

Table 5-1 The strategy of Solid phase synthesis

PG _I	B-PG _Y	Solid support	Coupling	caping	Cleavage	Ref.
Boc	Cbz	MBHA	HBTU DECA DMF/Py	N ₁ -benzyloxycarbonyl- N ₃ -methylimidazole triflate	TFA/ TFMSA	[11]
Boc	Cbz	MBHA	HATU DIEA NMP/Py	acetic anhydride/NMP/ pyridine, piperidine	TFA/ TFMSA	[10]
Fmoc	Cbz	MBHA or Rink-resin	Pentafluoro phenyl	acetic anhydride/DIEA in NMP	HF/anisole	[14]
Fmoc	Mmt	Breipohl linker	PyBOP, NEM,DMF		TFA or NH ₃	[15]
Fmoc	C-Bz; A-Bz, G-iBu	Hydroxydo decanoic acid-CPG	HATU DIEA DMF	acetic anhydride in DMF	NH ₃ / EtOH	[16]
Mmt	C-tBuBz, A-An, G-iBu	Aminohexy lsuccinyl-C PG or Tentagel	HATU or PyBOP, NEM or DIEA,DMF	acetic anhydride/lutidine/ N-methylimidazole in THF	NH ₃ /H ₂ O	[17]

5.3 Boc/Cbz 策略合成 PNA

自从 1991 年 Nielsen P. E. 首先发现 PNA, 首次合成 PNA 使用 Boc 化学以来, 人们不断地对 Boc 策略合成 PNA 的各个细节进行研究和改善, 逐渐形成了比较稳定的合成步骤, 包括试剂, 溶剂, 反应时间等等 (图 5-2)。人们之所以不断研究和用 Boc 策略合成 PNA 是因为 Boc 化学合成 PNA 有诸多优势, 首先是非常适合手工合成, 这就省却了购买自动合成仪的一次性大量投入, 其次是提供最好质量的粗产品, 最后 Boc 合成的原料费用远比 Fmoc 的低。因此在我们实验室也采用 Boc 策略来合成 PNA 寡聚体^[18]。

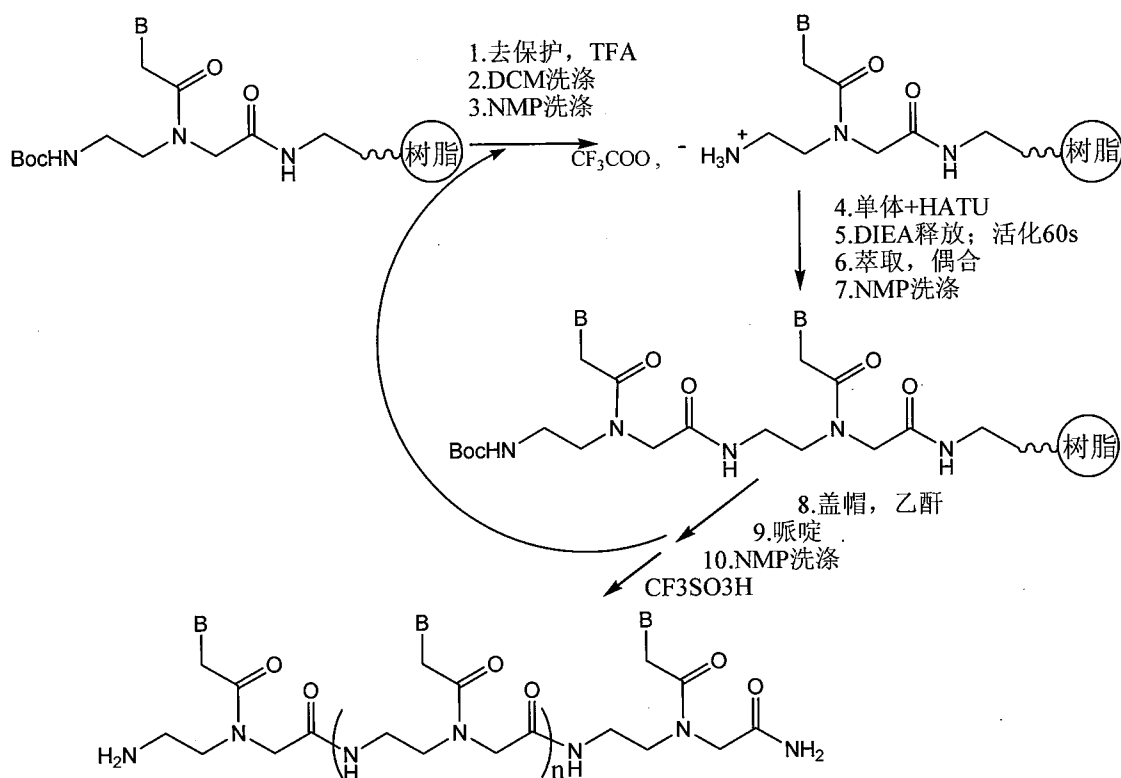


图 5-2 PNA 固相合成

Figure 5-2 The solid phase synthesis of PNA

5.3.1 树脂选择

表 5-2 固相合成载体

Table 5-2 The solid support

名称	材料	性能及用途	Ref.
白球树脂	聚苯乙烯 (PS)	强度好、廉价, 适用于各种有机溶剂	[1]
Sheppard 树脂	聚丙烯酰胺	廉价、稳定性差, 适用于水及有机溶剂	[22]
Tenta-gel	PS-PEG	适用于各种极性非极性溶剂, 价贵	[23]
Poly-pins	聚乙烯	基本无溶胀性, 适合平行多重合成	[24]
纸片	纤维素	用于平行多重合成, 合成量小, 无制备意义	[25]
玻璃片	无机硅	用于光印合成肽库, 无制备意义	[26]

固相合成首先就是选用固相合成载体, 已被应用的见表 5-2。然而应用最为广泛的的就是聚苯乙烯共聚 1%~2% 苯二乙烯的树脂球 (俗称白球, PS 球), 因此 PNA 的合成基本全是用 PS 球作为固相载体, 当然也有少量在 PEPS 膜、硅片上合成的, 但合成量低、偶联效果不好^[2 19-21]。

5.3.1.1 树脂的功能化 (Linker)

PS 球是不含化学活性功能基的高分子基质, 因此它们不能直接用于各种反应。必须把各种化学活性功能基键合到 PS 球上, 才能用于接 PNA。例如 PS 树脂经过不同化学反应可以衍生出不同的功能化载体 (图 5-3)。衍生出的这部分也就是连接载体与目标化合物之间的结构片段就是 Linker, Linker 的种类是繁多的。Linker 的不同就导致了合成所用的树脂种类繁多, 但是在 PNA 合成中应用效果好的却不是很多, 在 Boc 策略中应用最多的是 MBHA 树脂、Merrifield 树脂^[2,7,8]。

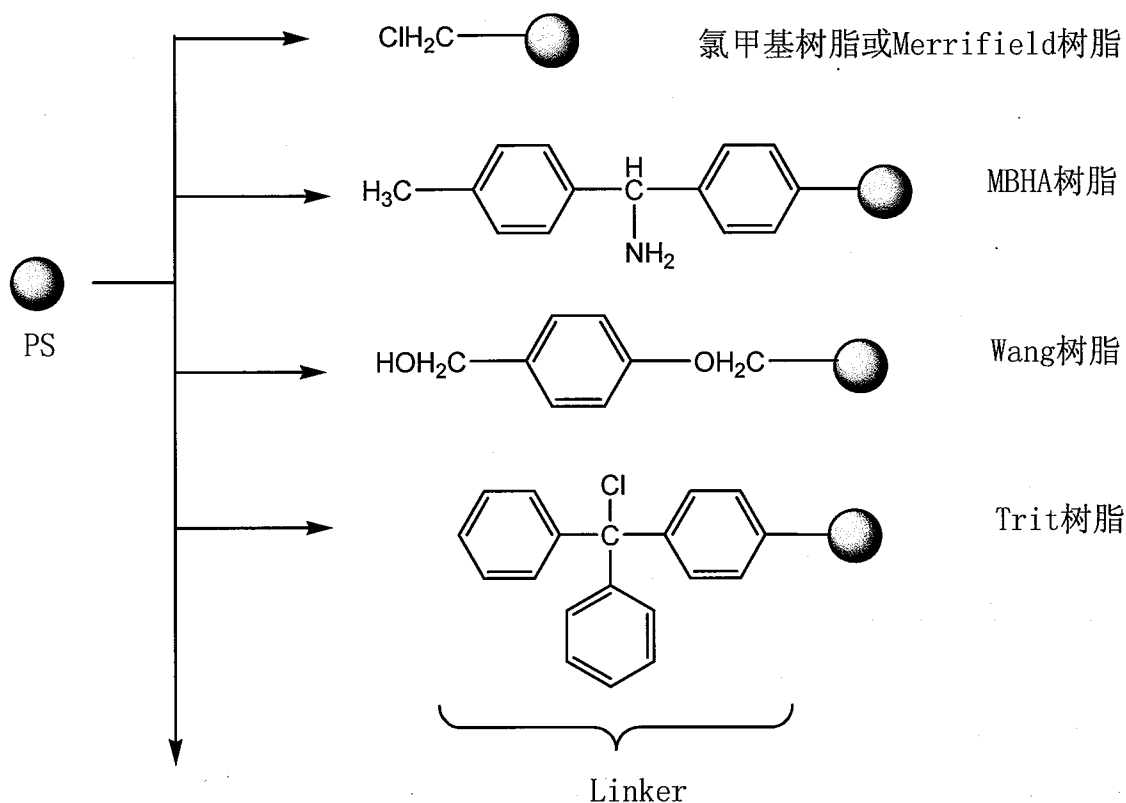


图 5-3 树脂功能化

Figure 5-3 Functionalition of the resin

5.3.2.2 树脂的取代量 (substituting degree, SD)

树脂功能化后, 我们可以看到 PS 球体上有了反应活性基团, 然而每克干树脂含这些活性基团的毫摩尔数 (mmol/g) 即取代量, 对固相合成时十分重要的, 因此合成之前选好树脂的取代量是十分重要的。根据以往的研究发现合成目标化合物的分子量与取代量有一定关系, 见表 5-3, 但也不绝对受限于此。

表 5-3 目标产物分子量和树脂取代度的关系

Table 5-3 The relation between substituting degree and molecular weight of product

目标化合物分子量	树脂 SD
<700	1.0~1.2mmol/g
800~1000	0.7~0.8mmol/g
>1500	<0.5mmol/g

商业上买到的树脂取代量一般比较大, 而合成寡聚 PNA 的分子量一般都是比较大的, 加之 PNA 本身在合成中容易聚集, 因此买来的树脂都需要降低活性基团的取代量, 即从 0.6 mmol/g 降到 0.05~0.20 mmol/g。卸载后的树脂取代量的确定可以有多种方法, 例如增重法、卤元素分析法、氮元素分析法、游离氨基含量测定、Fmoc 基的含量测定等等。增重法、氮元素分析法和 Fmoc 基的含量测定法是容易实现的, 但是增重法误差太大。实现合适的取代量都是通过反应时间来控制的。

表 5-4 元素分析结果

Table 5-4 The results of elemental analysis

	0 h		1 h		2 h		4 h	
	1	2	1	2	1	2	1	2
N/%	0	0	0.81	0.76	1.21	1.24	2.21	2.14
C/%	88.62	88.81	85.86	86.29	85.70	84.94	83.45	81.42
H/%	7.09	7.89	7.16	7.56	7.84	7.50	8.09	6.64

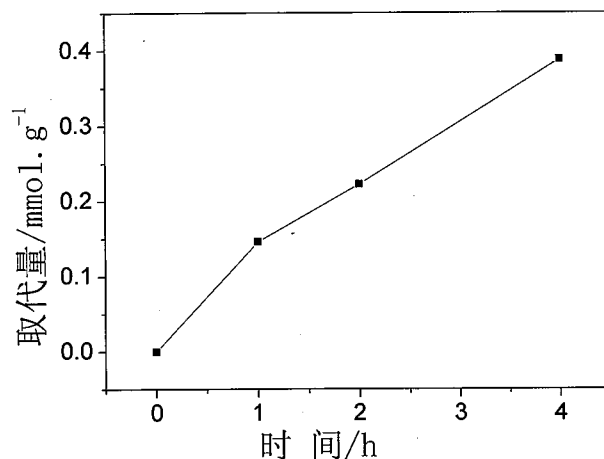


图 5-4 取代量随反应时间变化

Figure 5-4 The change of substituting degree along with time

我们在实验室合成 PNA 寡聚体时用到了 Merrifield 树脂, 由于 Merrifield 树脂最初不含氮元素, 当第一个单体接上树脂后, 我们通过氮元素分析确定第一个单体的取代量, 然后根据这个取代量来计算随后合成循环所用的物质的物质量。表 5-4 是元素分析结果, 图 5-4 是根据表 5-4 计算出的反应时间与取代量关系图。由图 5-4 我们可以看出当反应时间在半小时是比较合适的 (0.1mmol/g), 然后再把未反应的苄基氯用醋酸钠封盖。

在用到 MBHA 树脂时我们通过 Fmoc-Gly-OH 和 MBHA 树脂反应, 然后脱除 Fmoc, Fmoc 在 290 nm 处有紫外吸收峰, 通过紫外测定 Fmoc 的量来确定取代量, 当然首先需要做一条 Fmoc 浓度工作曲线。工作曲线图见图 5-9。由于 PNA 寡聚体的溶解度低, 为了增加其溶解度, 我们就在寡聚体碳端连一赖氨酸, 同时通过赖氨酸来卸载树脂取代量, 发现当加入过量 BocLys(2-Cl-Z) 反应半小时, 取代量约为 0.15mmol/g 。后来我们发现加入过量的 BocLys(2-Cl-Z) 是比较浪费的, 我们所幸加入取代量约为 0.2 mmol/g BocLys(2-Cl-Z) 让其充分反应, 这样假设完全反应, 取代量最多是 0.2 mmol/g 。我们在实际操作中按 0.15 mmol/g 计算, 因为固相合成为了保证每一步的偶联完全, 每个循环所用的单体是远过量的, 我们在实际操作中是 10 倍量的单体加入, 因此即便取代量是 0.2 mmol/g 也不影响^[27]。

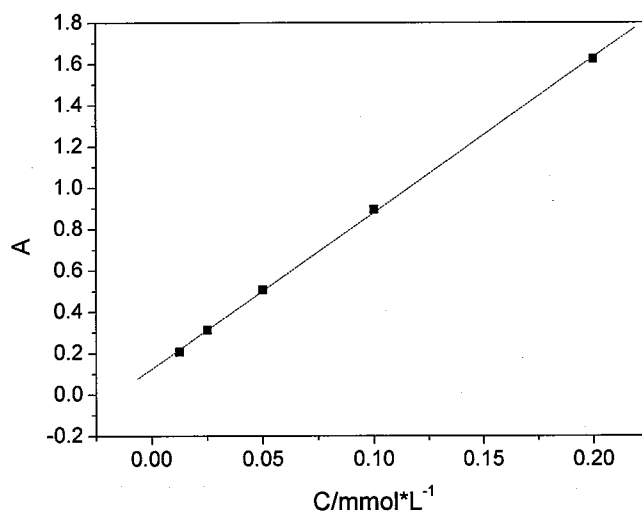


图 5-9 Fmoc 浓度工作曲线

Figure 5-9 The working curve of the concentration of Fmoc

5.3.2 上树脂和洗涤

5.3.2.1 上树脂

树脂选好之后就是第一个单体或赖氨酸上到树脂上。在传统的多肽固相合成中,不同的树脂具有不同的活性基团,在上第一个保护的氨基酸时,方式是多种多样的,在这里仅限讨论我们用到的树脂。当用 Merrifield 树脂时(活性基团是苄基氯),上第一个氨基酸的方法是多种所样的,比如叔铵盐法、钠盐法、钾盐法、铯盐法等等。叔铵盐法是应用最多的,它的传统步骤是保护的氨基酸的三乙胺盐同 Merrifield 树脂在乙酸乙酯或乙醇中回流 24-65 小时,大多数氨基酸都能得到固定,产率 35-50%。我们在实验室中便是用叔铵盐法,但是传统的试剂有可能存在不利的反应,见图 5-10。因此,我们在接第一个单体上树脂时,用 DIEA 代替三乙胺,分子体积增大亲核性降低,碱性却差不多,有利于降低副反应。而且所用溶剂为使 Merrifield 树脂溶胀大的 DMF 代替乙酸乙酯,更加利于反应。当用 MBHA 树脂时,由于活性基团是氨基,因此第一个单体或氨基酸上树脂就是氨基和羧基在缩合剂作用下缩合。由于缩合产率一般在 97%以上,因此第一个单体或氨基酸加入量一般正好调整到使树脂达到合适的取代量^[6]。

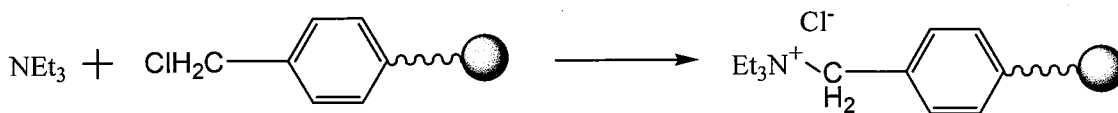


图 5-10 上 Merrifield 树脂时的幅反应

Figure 5-10 Side reaction of anchoring to Merrifield resin

5.3.2.2 洗涤

固相合成优势之一就是通过洗涤,过滤除去过量反应底物以及一些副产物。一般来说,不同性质的溶剂组合使用时,可得到最有效的洗涤效果^[9]。因为各种树脂在不同的溶剂中有不同的溶胀系数,即使同一树脂随着合成状态的不同溶胀系数也不同,例如树脂接上一个单体和接上三个单体在同一溶剂中溶胀系数也是不同的,所以选用溶胀系数不同的试剂作溶剂,交替使用会产生挤压效应(树脂一膨胀一收缩),使过量的试剂及副产物有效的排除。前人已经作了大量实验,探讨了不同树脂在不同溶剂中的溶胀系数。表 5-5 列举了在 PNA 合成中经常使用的树脂在不同溶剂中的溶胀系数^[2]。

表 5-5 树脂的溶胀系数/(ml/g)

Table 5-5 Swelling coefficient of resin in different solvent

树脂	NMP	Py	EtOH	THF	DCM	DMF	DMSO	CH ₃ CN	CH ₃ OH
Merrifield	6.0	7.0	1.7	7.7	8.5	7.2	1.8	1.8	1.7
MBHA	8.6	7.0	2.0	7.2	7.6	5.6	2.2	2.8	1.2

经过人们的大量实验,发现在合成 PNA 时 DCM 和极性质子溶剂(如 NMP、DMF)组合比较理想,而且 DCM、DMF、NMP 对各种物质都有较好的溶解度,加之挤压效应有利于除杂质。

5.3.3 脱保护

氮端 Boc 基团的脱除一般用 TFA,而且脱除速度是比较快的,一般 3 min 足够完全脱除。由于在脱除 Boc 后生成叔丁基阳离子会和核碱基发生亲电反应,导致核碱基烷基化,因此需要加入阳离子清除剂间甲酚, TFA/间甲酚=95/5。可能有些功能化的树脂对浓度大的 TFA 不稳定,需要稀释,一般是加入 DCM 使 TFA 浓度在 50-100%都可以,脱除速度也不慢。我们在实验室尝试过用 50%的 TFA,以及 1M 盐酸的醋酸溶液都能较好的脱除 Boc。脱除 Boc 后形成质子化的末端氨基,它是不活泼的,能够降低副反应的发生(见下文)。TFA 的使用还有一个好处是能够预先破坏 PNA 形成二级结构,降低树脂键合的寡聚体形成分子内聚集的危险。

5.3.4 偶联

偶联就是氨基和羧基的缩合形成肽键,是整个循环中最为重要的,因为它直接决定了产物的产率和纯度。例如假设每次偶联产率 99.9%,当偶联 10 次实际收率 95.5%,当 20 次时就降到 80%,当 30 次时仅有 51.4%,因此高的偶联产率是必需的。决定偶联产率的因素是多方面的,例如缩合方法的不同,缩合剂的不同,溶剂的不同等等^[10, 11, 14, 19-21, 28, 29]。

5.3.4.1 缩合剂

能生成酰胺键的缩合方式有许多,例如活泼酯法、混合酸酐法、对称酸酐法、叠氮物法、N-羧基内酸酐(NCA)法及酶促合成法。其中,适用于固相合成的应以活泼酯法及对称酸酐法为主。在 PNA 合成中常用的也是活泼酯法,无论哪种方式缩合,其关键是选择合适的缩合剂。

a. 碳二亚胺型

虽然固相合成已发展几十年, 各种缩合剂相继出现, 但是碳二亚胺型仍然应用广泛。其中 DCC 是应用最早、最广泛的一种经典试剂, 至今仍被广泛应用。其反应机理如图 5-11 所示。

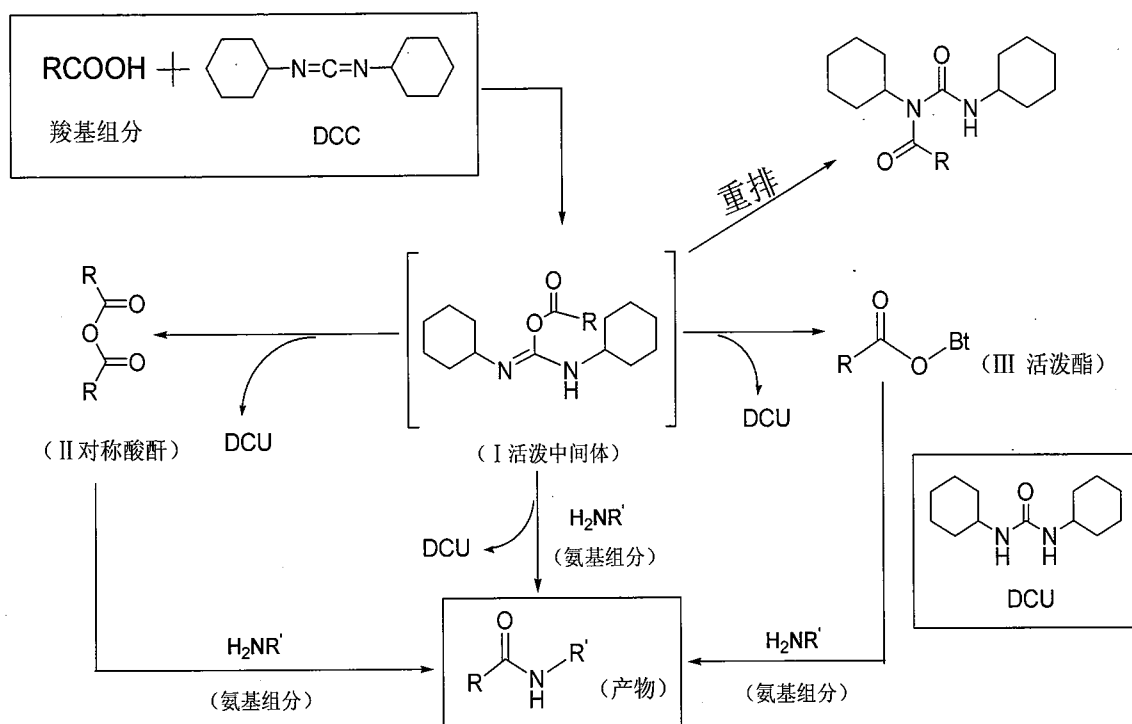


图 5-11 DCC 反应机理

Figure 5-11 Mechanism of DCC reaction

从图 5-11 的反应机理中可以看出, 羧基组分与 DCC 首先生成的活泼中间体 I 实际上也是一种活泼酯结构, 其活性很高, 可以与氨基组分直接发生氨解反应, 生成肽键型产物。如果有过量的羧基组分存在, I 还可以与另一分子羧基组分反应生成对称酸酐 II, 后者很容易与氨基组分反应, 生成肽键。如果在缩合剂中加入 HOBt (称复合缩合剂), I 还可以衍生为 OBt 型活泼酯, 后者经氨组分氨解, 也可生成肽键。多数情况下, 液相合成是以 I→产物的途径为主。固相方式中, 由于氨基组分连在固相树脂上, 与活泼中间体 I 碰撞的机会不多, 因此 I→对称酸酐→产物及 I→活泼酯→产物两种途径是固相合成中的主要机理。在 DCC 的缩合反应中主要的副产物是由 I 重排生成的 N-酰基脲 (IV), 虽然此副产物没有进一步衍生的活性, 但它的生成要消耗一部分活泼中间体, 因而要影响产物的收率。单独使用缩合剂往往

会伴随着一些副反应, 因此加入复合缩合剂是一种有效的方法, 有时还可以提高偶联产率, 当合成手性寡聚体时还可以抑制消旋。常用的复合缩合剂是 N-羟基化合物, 例如 HOSu、HONb、HOBt、HOAt、HOObt 等等。最初我们尝试过用 DCC 和 HOObt 组合合成 PNA 寡聚体, 但是较适合合成短链的 PNA。除了 DCC 以外, 还有 DIC、EDC 等, 它们也应用较多。DIC 虽然应用历史较短, 但它反应后生成的 DIU 在许多溶剂中是可溶的, 相比 DCC 反应后生成极难溶的 DCU 具有极大的优势。然而 EDC 是唯一水溶性的碳二亚胺型缩合剂, 它在水中比其它两种应用更为广泛。

b. 苯并三唑啶盐型 (BOP 族)

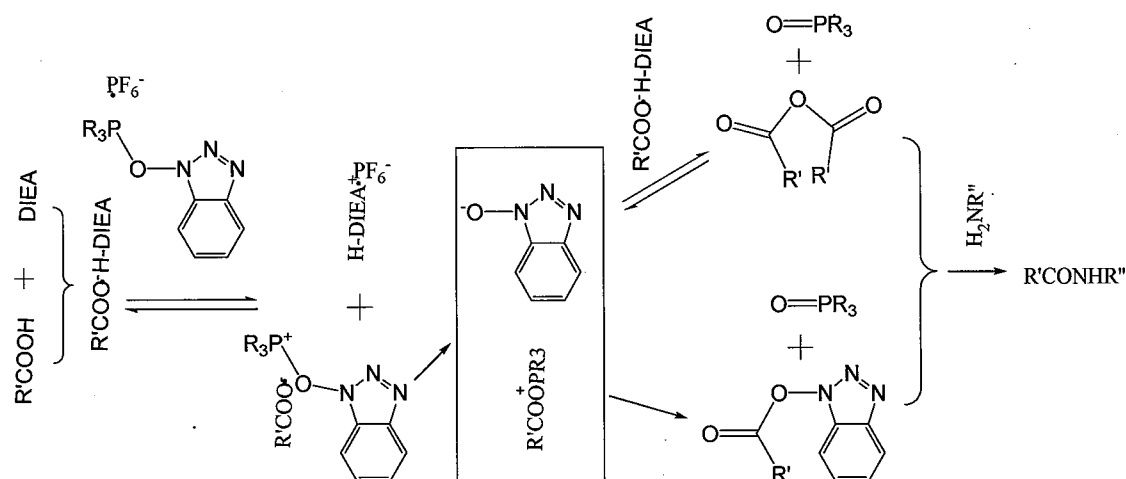


图 5-12 BOP 反应机理

Figure 5-12 Mechanism of BOP reaction

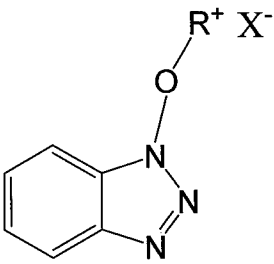
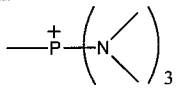
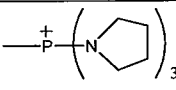
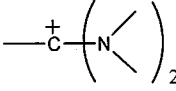
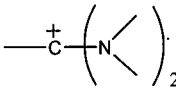
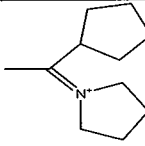
BOP 的出现使缩合剂发生了重大变革。首先, 从结构上看, 彻底摆脱了由碳二亚胺与水加成生成脬的缩合反应模式; 其次, 从缩合效率上看, 缩合速度远远超过 DCC。缩合反应机理如图 5-12 所示。

由于 BOP 经反应后生成副产物 HMPA (六甲基磷酸三酰胺) 具有致癌性, 因此随后又出现了许多代替 BOP 的同类型的缩合剂 (表 5-6), 它们的反应活性方面均优于 BOP。

在最初的 PNA 合成中, 单体的活化是用羰基二咪唑或五氟苯酯活化 PNA 单体来进行的。由于 BOP 族缩合剂偶联速度快, 平均偶联产率高, 因此在 PNA 合成得到了应用, 例如 PyBOP、HBTU, 其中经过人们的研究发现 HBTU 平均偶联产率能达到 97%, 是这类缩合剂中最适合在 PNA 合成中应用的。

表 5-6 BOP 族缩合剂

Table 5-6 Condensation reagent of BOP

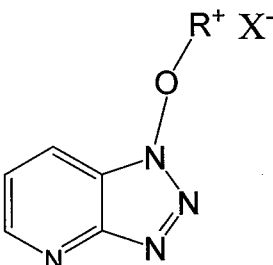
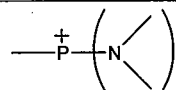
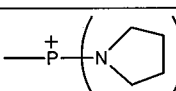
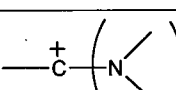
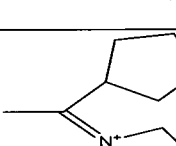
基本结构	名称	R^+	X^-
	BOP		PF_6^-
	PyBOP		PF_6^-
	HBTU		PF_6^-
	TBTU		PF_4^-
	HBPYU		PF_6^-

c. 吡啶并三唑啉盐型 (AOP 族)

此类缩合剂是由 BOP 族缩合剂改进的, 因此基本结构仅是吡啶环取代了 BOP 族中苯环, 反应机理是相同的, 但 AOP 型的反应活性比 BOP 型更强。肽合成中应用较多的列于表 5-7。

表 5-6 AOP 族缩合剂

Table 5-6 Condensation reagent of AOP

基本结构	名称	R^+	X^-
	AOP		PF_6^-
	PyAOP		PF_6^-
	HATU		PF_6^-
	HAPYU		PF_6^-

这类缩合剂中 HATU 在 PNA 合成得到最为广泛的应用,因为它能在所有的缩合剂中可以得到最高的平均偶联产率。现在虽然 HATU 能得到最高的偶联产率,应用最为广泛,但是由于它的价格比较高,而且 HBTU 也可得到满意的结果,因此 HBTU 也是不错的选择。当然还有其它类型的缩合剂例如 DPPA、DEPBT、FDPP、CMPI、TOTU 等等,但这些并未在 PNA 合成中得到应用。

5.3.4.2 其他影响因素

除了缩合剂对缩合有重要影响外,还有许多其他因素。在偶联反应中所使用的溶剂对合成来说是至关重要的,研究表明具有高电子供给容量的各种极性质子溶剂的组合,是 PNA 合成的最佳选择。人们尝试了许多溶剂体系,其中 DMF, NMP/DCM, DMF/Py, NMP/Py 是较常用的,其中 DMF/Py, NMP/Py 这两种组合是应用最为广泛的,因为他们的平均偶联产率高于 99%。

在脱保护完成后,我们可以看到末端为质子化的氨基,它不具有反应活性,因此必须把它中和转化成具有反应活性的氨基,然后再偶联。这种中和后偶联的方式将有一定的时间暴露活性氨基基团,这将增加发生副反应的几率(这将在下文介绍)。因此现在都是采用原位中和偶联,即中和和偶联同时进行,这样就减小了发生副反应的几率。从 BOP 族和 AOP 族的反应机理来看,它本身也需要一分子的叔胺,再加上中和质子化的氨,还有中和辅助缩合剂释放出的 HOBt,因此至少用三倍量的叔胺。而现在叔胺应用最广的是 DIEA,但是在用 DIEA 时,单体的浓度最大只能到 0.05 M,因为当大于此浓度将会生成单体的叔胺盐沉淀,但当用 DECA 时单体的浓度可以达到 0.2 M 而不会有沉淀。但是 DECA 价格远比 DIEA 贵,而 DIEA 在绝大多数情况下也能满足要求,所以 DIEA 仍被广泛应用。

虽然各个单体之间在缩合剂的作用下偶联时的速度是比较快的,但是它们之间还是有区别的,偶联在 A 残基上比其它三种慢,而且偶联在 A 残基的产率也比其它三种低,因此在做固相合成 PNA 时,每个偶联循环并不是简单的机械重复,有可能要根据实际情况作出一定变化。

我们在实验中采用的是 10 倍过量的单体,9.8 倍过量的 HBTU,10 倍过量的 HOBt,30 倍的 DIEA,溶剂是 1/1 的 NMP/Py,单体浓度在 0.05 M 左右。

5.3.5 盖帽

由于氨基不可能百分百的反应,为了防止下一步的反应造成缺失的 PNA 片断,因此在偶联完后一般都需要把氨基封闭,即盖帽。较好的盖帽试剂是乙酸酐和“Rapoports reagent”。在盖帽之前,一般要用茚三酮检测是否有自由氨基存在,如果显浅黄色证明反应完全,如果显浅蓝色证明有氨基,需要重新偶联,若还不能反应完全就需要乙酸酐盖帽。乙酸酐是很强的酰化试剂,与吡啶组合可使其与核碱基中环氮位置反应。盖帽期间形成的乙酰化-核碱基片断在酸性介质中是稳定,因此这些片断能够在脱保护过程中稳定的存在;而在 PNA 合成的中和阶段,增长的 PNA 链的酰化(“自身盖帽”)是常见的副反应,为了防止这种自身盖帽,一般在盖帽之后加入吡啶洗涤。

5.3.6 PNA 解离、纯化和 PNA 副反应

5.3.6.1 解离

目标序列合成成功后,就需要从树脂上切下产物。解离方法主要有酸解、皂化、氨解、酯交换等等,然而最为常用的是酸解。用强酸可以把 PNA 寡聚物从树脂上解离下来。HF 有高的解离效率和最小的副反应,因此在第一次报道 PNA 时就用的 HF,但是由于 HF 具有很高的毒性,因此,后来都用 TFMSA 代替 HF。由于树脂的不同,用酸解离下来的寡聚物也有区别,例如当用 Merrifield 树脂时切下来的寡聚物末端是羧基,而 MBHA 树脂切下来的末端是酰胺。在解离 PNA 之前一般先把核碱基环外氨基保护基 Cbz 用低浓度的 TFMSA 和 TFA 脱除,并且加入离子清除剂。当我们用 MBHA 树脂合成包含偶氮新单体的 PNA 寡聚物时,用 TFMSA/TFA/间甲酚=2/8/1 切 PNA 时,我们发现新单体的氮氮双键大部分被破坏,但是对于 MBHA 树脂却不能用氨解的办法解离 PNA。为了避免新单体被破坏,后来我们在 Merrifield 树脂上合成包含新单体的寡聚物,然后用氨解的方法得到了碳端是酰胺的 PNA 寡聚物(详细条件见实验部分)。解离液倒入冰乙醚中,离心,得白色沉淀,乙醚洗涤,离心,真空干燥,粗 PNA 保存在-20℃。

5.3.6.2 纯化

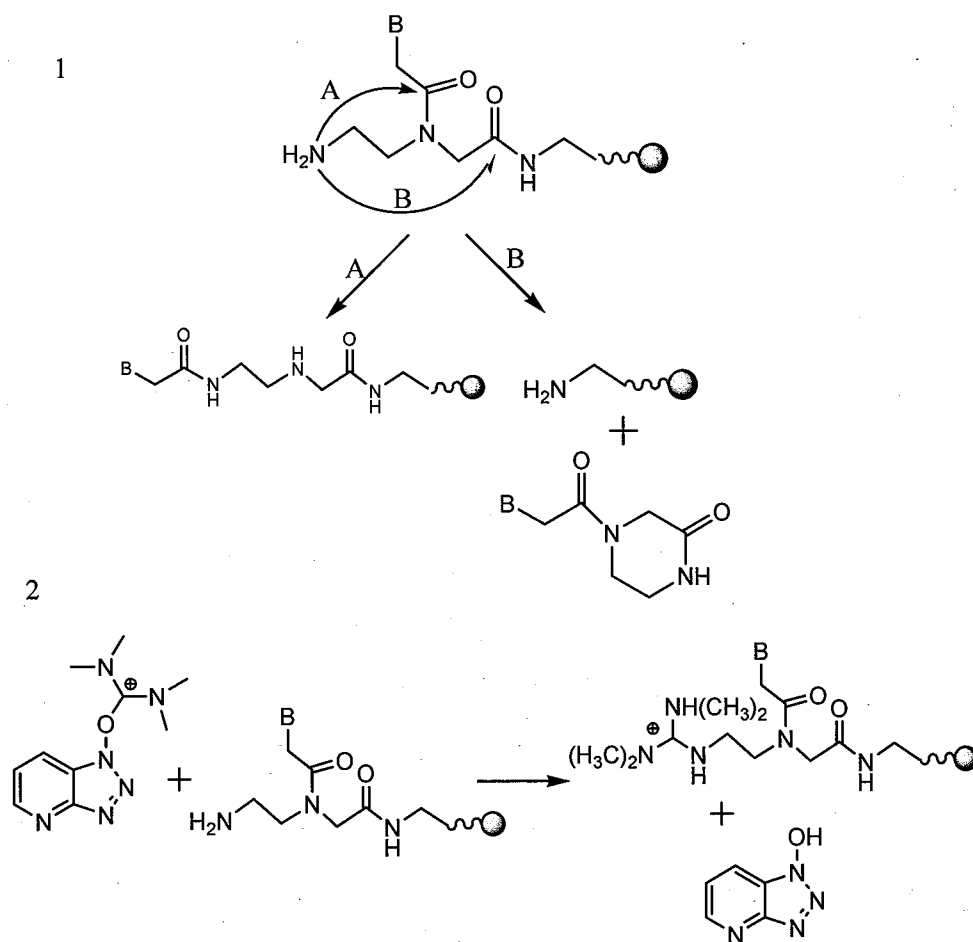
PNA 粗产物溶在 0.1% TFA 的水中,然后用 RP-HPLC 分析分离。分析是在 LCQ Advange MAX 液质联用仪上进行,Phenomenex 色谱柱(C18, 300 Å, 5 μm, 4.6×250mm),

半制备是在 Gilson HPLC 系统上进行, Phenomenex 色谱柱(C18, 300 Å, 5 μm, 10×250mm)。使用了两种流动相分别是 0.1% TFA 的水溶液和 0.1% TFA 的乙腈溶液, 采用了线性梯度; 流速: 分析柱是 0.6 ml/min; 半制备柱是 3 ml/min。梯度条件见实验部分。

5.3.6.3 质谱

MALDI-TOF 质谱非常适用于 PNA 寡聚物的分析, 我们质谱数据由 AXIMA-CFR TM plus 质谱仪获得。基质为 100 mM 芥子酸 (溶剂: 乙腈/甲醇/水=60/32/8), PNA 与基质 1/1 混合。ESI-MS 也能满足对 PNA 分析, 因而一部分在 LCQ Advange MAX 液质联用仪获得。

5.3.6.4 PNA 合成中的副反应^[5]



1. Trans amidations derived from the primary amine; A. Acyl migration of the base acetyl segment; B. N-terminal detachment of the monomer. 2. N-capping by uronium salts (HATU).

图 5-12 PNA 合成中的副反应

Figure 5-12 Side reaction in PNA synthesis

在 PNA 中氮端的氨基的 PKa 值接近 10~11, 而氨基酸中的 α 氨基的 PKa 值是 9~10。PNA 中的 2-乙基氨的碱性增强以及较小的空间位阻, 使这个氨基的活性远比氨基酸中 α 氨基更加活泼, 因此也容易发生副反应。

由于碱性的增强以及有利于重排的几何结构构象, 使得核碱基乙酰部分向 N-末端位置的酰基迁移成为一种常见的副反应。酰基迁移使得中间仲氨可以进行偶联反应, 将导致合成失败。另一个分子内的副反应是位于 N-末端的伯氨进攻单元内的酰胺键的羰基基团, 导致 N-末端单元丢失并且以酮哌嗪衍生物的形式被剪切掉。(见图 5-13)

在 PNA 合成中的另一类副反应是, 当使用脲盐 HBTU 或 HATU 虽然可获得高产率, 然而却和伯胺反应生成过脲盐, 导致盖帽不能进行下一循环。这些副反应的发生都与氮端氨基活性高有关, 所以都是通过原位中和进行偶联, 以减少氨基暴露的时间, 再就是单体的量少多于脲盐缩合剂, 提前进行活化, 可有效避免副反应发生。

5.4 实验

5.4.1 上树脂

a) MBHA 树脂: 0.51 mmol/g, 100-200 目, 1% DVB

1. 称取 500 mg MBHA 树脂, 在 15ml DCM 中浸泡过夜, 转移至多肽固相合成管中 (见图 5-13), 过滤。
2. 树脂依次用 DCM 洗涤 (2×3 min), DIEA/DCM 洗涤 (5/95, 2×3 min), DMF 洗涤 (2×3 min)。
3. 称取 32 mg Boc-Lys(2-Cl-Z)-OH (0.05 mmol), 19mg HBTU (0.05 mmol), 6.8 mg HOBt (0.01 mmol) 溶于 1.5 ml NMP/Py (2/1) 溶液中, 再加入 90 μl DIEA 活化 1 min, 加入到上述固相合成管中, 搅拌下反应 5 h。
4. 树脂依次用 DMF 洗涤 (2×1 min), DCM 洗涤 (4×1 min), DIEA/DCM 洗涤 (5/95, 2×3 min), DCM 洗涤 (4×1 min)。
5. 树脂用 Ac_2O /NMP/Py (1/2/2) 盖帽过夜。
6. 树脂依次用 DMF 洗涤 (2×1 min), DCM 洗涤 (5×1 min), 充分抽干。
7. 茚三酮检测树脂为阴性。(0.2 g 茚三酮溶于 50 ml 乙醇)
8. 用 Fmoc 方法确定 MBHA 树脂的取代量约为 0.1 mmol。
9. 树脂干燥保存。树脂简写 MBHA-(2-Cl-Z)-Lys-Boc。

b) Merrifield 树脂: 0.6mmol/g, 100-200 目, 1% DVB

1. 称取 500 mg 树脂在 15 ml DCM 中浸泡过夜, 过滤。
2. 树脂依次用 DCM 洗涤 (2×3 min), DIEA/DCM 洗涤 (5/95, 2×3 min), DMF 洗涤 (2×3 min)。
3. 称取 770 mg BTH (或 BN2H 880 mg)溶于 50 ml DMF 中, 再加入 250 μ l DIEA 室温反应 40 min, 上述树脂加入到溶液中 75 $^{\circ}$ C 回流半小时。
4. 树脂依次用 DMF 洗涤 (2×1 min), DCM 洗涤 (4×1 min), DIEA/DCM 洗涤 (5/95, 2×3 min), DCM 洗涤 (4×1 min)。
5. 树脂用 0.1 M 的 NaAc 的 DMF 溶液盖帽过夜。
6. 树脂依次用 DMF 洗涤 (2×1 min), DCM 洗涤 (5×1 min), 充分抽干。
7. 由元素分析工作曲线 (见图 5-4) 知取代量约为 0.1 mmol/g; 树脂干燥保存。树脂简写 Merrifield-T-Boc 或 Merrifield-N-Boc。

5.4.2 固相合成

合成的 PNA 寡聚体:

在 MBHA-(2-Cl-Z)-Lys-Boc 树脂上合成的 PNA 寡聚体有:

- 1) $\text{H}_2\text{N-Lys-TTTTTT}$
- 2) $\text{H}_2\text{N-Lys-TTTTTT-Fc}$
- 3) $\text{H}_2\text{N-Lys-TTTTTTTTTT}$
- 4) $\text{H}_2\text{N-Lys-TTTTTTTTTT-Fc}$
- 5) $\text{H}_2\text{N-Lys-GCACCCACGTGTCCT}$
- 6) $\text{H}_2\text{N-Lys-GCTCAGTTTACT-Fc}$

在树脂 Merrifield-T-Boc 上合成的 PNA 寡聚体有:

- 1) $\text{H}_2\text{N-TNTTTT}$
- 2) $\text{H}_2\text{N-TTNTTT}$
- 3) $\text{H}_2\text{N-TTTNTT}$
- 4) $\text{H}_2\text{N-TTTTNT}$
- 5) $\text{H}_2\text{N-TTTTTN}$
- 6) $\text{H}_2\text{N-TTNTTT-Fc}$
- 7) $\text{H}_2\text{N-TNTNTT}$

在树脂 Merrifield-N-Boc 上合成的 PNA 寡聚体为 $\text{H}_2\text{N-NTTTTTT}$

注: 在这里 Fc 标记分子用的是 Fc-COOH

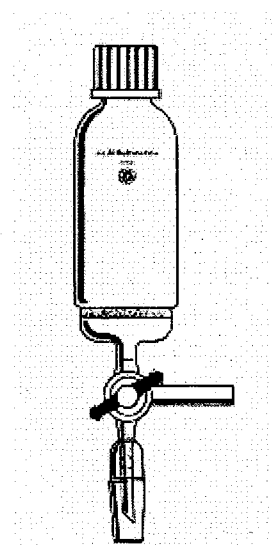


图 5-13 多肽固相合成管

Figure 5-13 Reaction vessel SPPS

实验步骤:

1. 取 50 mg PNA(5 μ mol)树脂在氯甲烷中搅拌过夜, 充分膨胀。
2. 树脂依次用 DMF 洗涤 (2 $\times$ 1 min), DCM 洗涤 (2 $\times$ 1 min), DMF 洗涤 (2 $\times$ 1 min), DCM 洗涤 (2 $\times$ 1 min)
3. 然后按表 5-7 步骤合成寡聚体

表 5-7 Boc/Z PNA 合成循环的实验步骤

Figure 5-7 Experimental procedure of the Boc/Z PNA synthesis cycle

序列 (C 端到 N 端)	1	2	3		n
TFA/m-Cresol (95/5) (2 $\times$ 3min)					
DCM 洗涤 (2ml $\times$ 30s $\times$ 2) 对 G 时需要洗涤四次					
DMF 洗涤 (2ml $\times$ 30s $\times$ 2)					
Kaiser (茚三酮) 实验 阳性 (深蓝)					
单体 (10eq) HBTU (9.8eq) HOBt (10eq) DIEA 39.19 μ l (30eq)的 NMP/Py (2/1)最终单 体浓度 0.05M-0.08M 溶剂 0.9375- 1.5ml 搅拌 1min					
活化的单体加入到树脂中反 应 10-15min					
DMF 洗涤 (2ml $\times$ 30s $\times$ 2)					
DCM 洗涤 (2ml $\times$ 30s $\times$ 2)					
单体 (10eq) DCC (9.8eq) HOBt (10eq) DIEA 39.19 μ l (30eq)的 DMF 最终单体浓度 0.05M-0.08M 溶剂 0.9375- 1.5ml 搅拌 1min					
活化的单体加入到树脂中反					

应 20-30min					
DMF 洗涤 (2ml×30s×2)					
DCM 洗涤 (2ml×30s×2)					
Kaiser (茚三酮) 实验阴性 (树脂不变深蓝色)					
(Ac ₂ O/DMF/Py=1/2/2) 2ml, 盖帽, 2min×2					
DCM 洗涤 (2ml×30s×2)					
DMF 洗涤 (2ml×30s×2)					
哌啶洗涤 (哌啶/NMP=1/9) (2ml×30s×2)					
DMF 洗涤 (2ml×30s×2)					
DCM 洗涤 (2ml×30s×2)					

注: 1) 为了偶联完全, 进行了二次偶联, 并且二次偶联缩合剂改用 DCC, 溶剂改用 DMF, 这样效果比简单的重复一遍偶联好。2) 偶联第一个 G 后, 就不再盖帽和哌啶洗涤。

PNA 的解离:

MBHA 树脂解离

1. 用甲醇洗涤两次
2. 3-4 ml TFA/DCM/Anisol (50/45/5) 洗涤树脂。(脱去最后单体上的 Boc)。
3. 加入等量 1 ml 下面两种溶液, 搅拌 1 h。 (脱去 Cbz)
 - a TFA/二甲硫醚/间甲酚 (1/3/1)
 - b TFA/TFMSA (9/1)
4. TFA/DCM/间甲酚 (50/45/5) 1ml×30s 洗涤树脂。
5. TFMSA /TFA/m-cresol(2/8/1 1 ml) 搅拌 1.5 小时。
6. TFA 1ml 洗涤树脂, 合并滤液。
7. 滤液加入到 8 ml 乙醚中, 离心 20 min 3000 转 -4℃。
8. 乙醚洗涤, 再离心。
9. 产物留在管里减压除去乙醚。
10. 粗产物储存在 -20℃。

在树脂 Merrifield

1. 用甲醇洗涤两次。
2. 3-4 ml TFA/DCM/间甲酚 (50/45/5) 洗涤树脂。
3. TFA/DCM/间甲酚 (50/45/5) 1 ml×30s 洗涤树脂。
4. 氨水/甲醇 (1/1) 2 ml, 室温搅拌 3 天。
5. 减压蒸干, 加入 TFA /间甲酚 (95/5) 1 ml 洗涤树脂。
6. TFA 1 ml 洗涤树脂, 合并滤液。
7. 滤液加入到 8 ml 乙醚中, -4℃ 3000 转 离心 20 min。
8. 乙醚洗涤, 离心。
9. 产物留在管里减压除去乙醚。
10. 粗产物储存在-20℃。

5.4.3 HPLC 分离和质谱表征

HPLC 分离:

洗脱剂: A 0.1% TFA 的 H₂O 溶液

B 0.1% TFA 的乙腈溶液

分析和制备型 HPLC 都使用了线性梯度洗脱 (表 5-8)。

检测波长: 260 nm

表 5-8 HPLC 分析和制备线性梯度

Figure 5-8 The linear gradient of analytical and preparative HPLC

时间/min	洗脱剂 B/%	时间/min	洗脱剂 B/%
0	10	49	100
25	25	50	10
32	35	60	10
44	100		

在这里我们只列举和分析了 H₂N-Lys-TTTTTT。

H₂N-Lys-TTTTTT 的粗产品的色谱图和质谱图分别在图 5-13 和 5-14 中, 表 5-9 分析了质谱峰的归属。

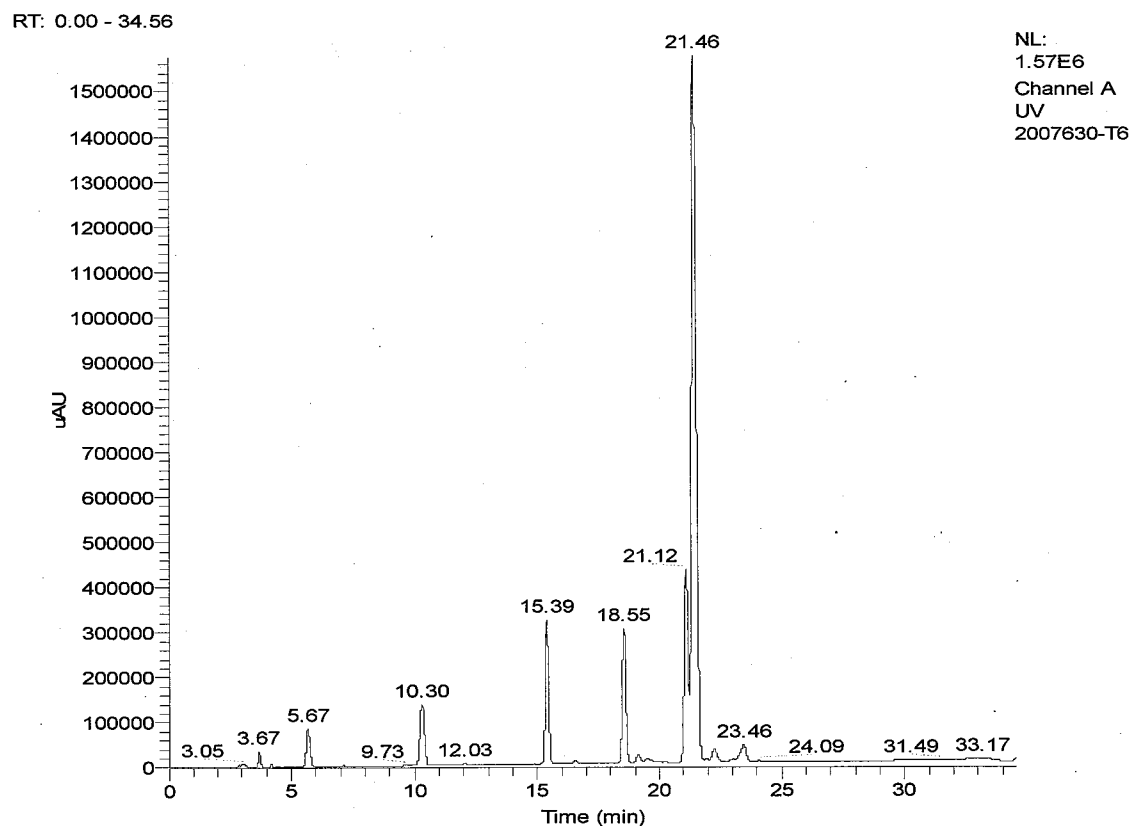
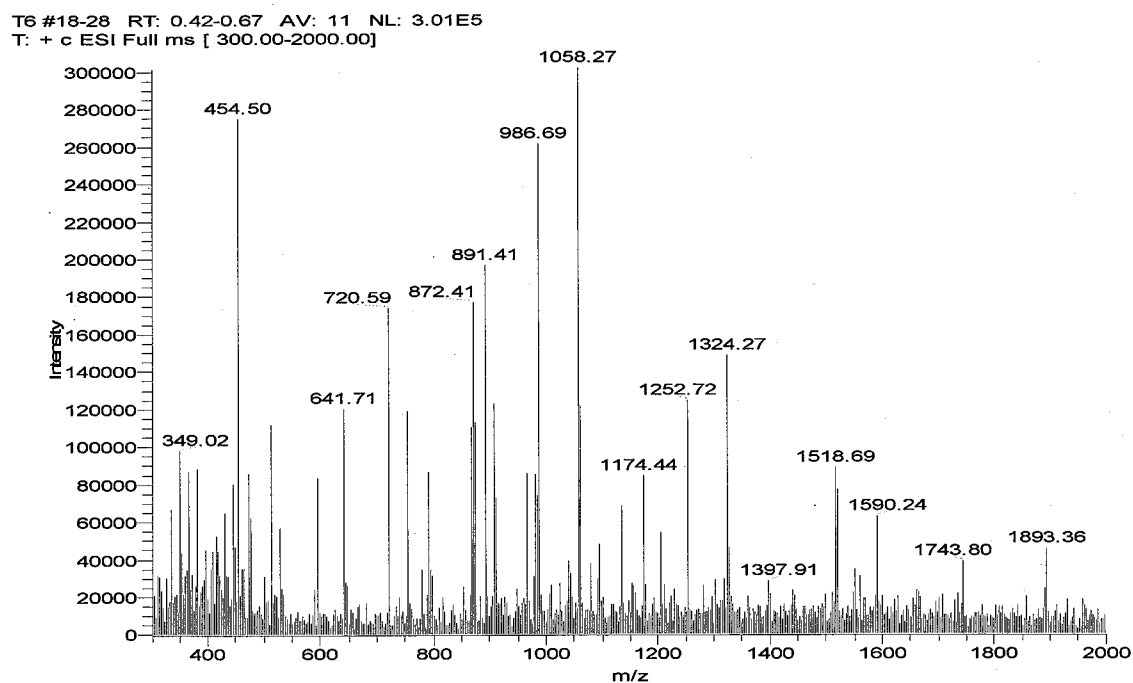
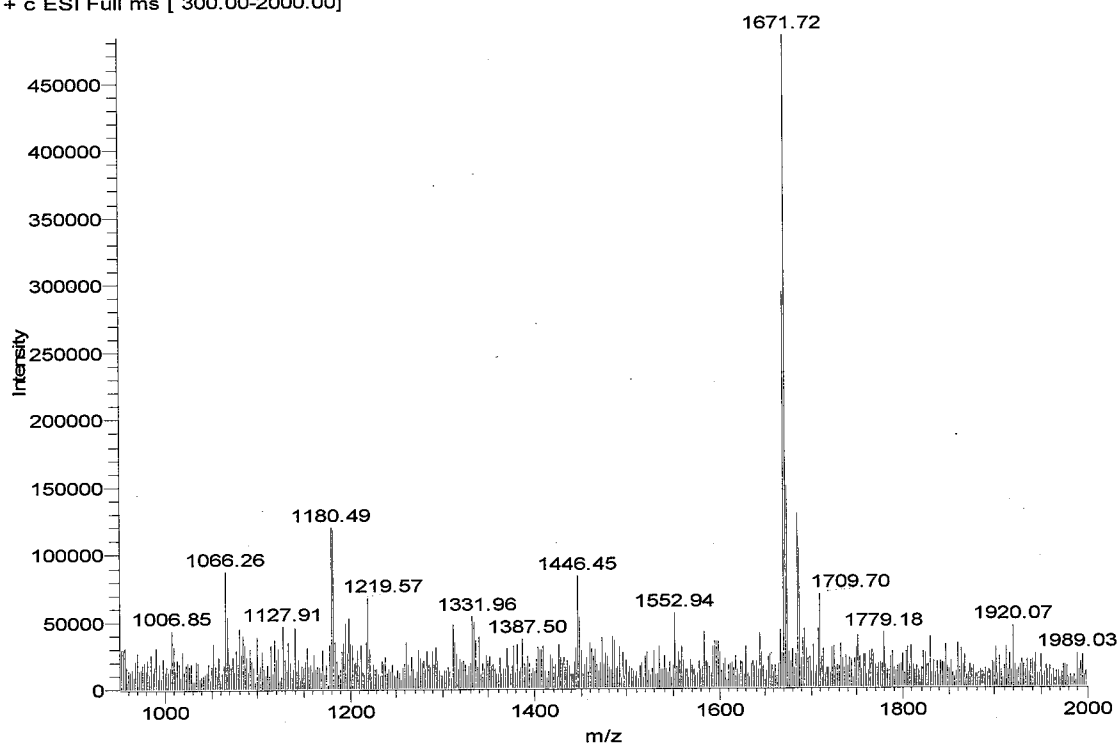
图 5-13 $\text{H}_2\text{N-Lys-TTTTTT}$ 的粗产品的反相 HPLC 色谱图Figure 5-13 The reversed phase HPLC chromatogram of a crude $\text{H}_2\text{N-Lys-TTTTTT}$ 图 5-14 $\text{H}_2\text{N-Lys-TTTTTT}$ 的粗产品 ESI-MSFigure 5-14 ESI-MS of a crude $\text{H}_2\text{N-Lys-TTTTTT}$

表 5-9 H₂N-Lys-TTTTTT 质谱分析Figure 5-9 The ESI-MS analysis of H₂N-Lys-TTTTTT

计算	测量	离子	简写
1893	1893.38	T6+CF ₃ SO ₃ H	[M+H] ⁺
1856	1856.39	T6+TFA	[M+H] ⁺
1743.74	1743.76	T6+H	[M+H] ⁺
1590.724	1590.2	T5+TFA	[M+H] ⁺
1518.639	1518.73	Ac-T5	[M+H] ⁺
1324.516	1324.7	T4+TFA	[M+H] ⁺
1252.535	1252.75	Ac-T4	[M+H] ⁺
986.431	986.66	Ac-T3	[M+H] ⁺
872.374	872.42	T6+2H/2	[M+2H] ⁺ /2

在例如 H₂N-TTTNTT (分子量 1670) 的质谱图:

N3-20-LOW #9-22 RT: 0.19-0.52 AV: 14 NL: 4.84E5
T: + c ESI Full ms [300.00-2000.00]

图 5-14 H₂N-TTTNTT 的 ESI-MSFigure 5-14 ESI-MS of H₂N-TTTNTT

质谱结果: H ₂ N-Lys-TTTTTT-Fc	1955.3
H ₂ N-Lys-TTTTTTTTTT-Fc	2755.0
H ₂ N-Lys-TTTTTTTTTTTTTT-Fc	3551.0
H ₂ N-TNTNTT	1726.3

参考文献

1. R. B. Merrifield, Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide, *J. Am. Chem. Soc.* 1963, 85: 2149-2154.
2. 王德心, 固相有机合成—原理及应用指南, 化学工业出版社, 2004。
3. P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science* 1991, 254: 1497-1500.
4. P. E. Nielsen, Peptide Nucleic Acids Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, 2002, Volume 208.
5. P. E. Nielsen, Peptide Nucleic Acids-Protocols and Applications, 2nd Ed. 2004, Horizon Bioscience.
6. 黄惟德, 陈常庆, 多肽合成, 科学出版社, 1985。
7. E. Uhlmann, A. Peyman, G. Breipohl, D. W. Will, Synthetic Polyamide Nucleic Acids with Unusual Binding Properties. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1998, 37: 2796-2823.
8. S. A. Kates. A. Fernando, Solid-Phase Synthesis A Practical Guide 2000 Marcel Dekker, Inc. 270 Madison Avenue, New York, NY .
9. J. Christopher, Vearing1 & John V. Fecondo. A rapid coupling protocol for the synthesis of peptide nucleic acids *Letters in Peptide Science*, 2002, 9: 211-219.
10. T. Koch, H. F. Hansen, P. Andersen, T. Larsen, H. G. Batz, K. Otteson, H. Ørum, Improvements in automated PNA synthesis using Boc/Z monomers. *J. Pept. Res.* 1997, 49: 80-88.
11. L. Christensen, R. Fitzpatrick, B. Gildea, Solid-phase synthesis of peptide nucleic acids. *J. Pept. Sci.* 1995, 1: 175-183.
12. D. A. Braasch, D. R. Corey, Synthesis, Analysis, Purification, and Intracellular Delivery of Peptide Nucleic Acids, *Methods (Orlando, Fla)* 2001, 23: 97-107.
13. D. A. Braasch, J. N. Christopher, R. C. David, Synthesis and Purification of Peptide Nucleic Acids *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry* 2002, 4.11.1-4.11.18
14. S. A. Thomson, J. A. Josey, R. Cadilla, M.D. Gaul, C. F. Hassman, M. J. Luzzio, A. J. Pipe, K. L.

- Reed, D. J. Ricca, R. W. Wiethe, S. A. Noble, Fmoc Mediated Synthesis of Peptide Nucleic Acids. *Tetrahedron* 1995, 51: 6179-6194.
15. G. Breipohl, J. Knolle, D. Langner, G. O'Malley, E. Uhlmann, Synthesis of polyamide nucleic acids (PNAs) using a novel Fmoc/Mmt protecting-group combination, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1996, 6: 665-670.
16. F. Bergmann, W. Bannwarth, S. Tam, Solid phase synthesis of directly linked PNA-DNA-hybrids. *Tetrahedron Lett.* 1995, 36: 6823-6826.
17. D. W. Will, G. Breipohl, D. Langner, J. Knolle, E. Uhlmann, The synthesis of polyamide nucleic acids using a novel monomethoxytrityl protecting-group strategy, *Tetrahedron* 1995, 51: 12069-12082.
18. P. E. Nielsen, Peptide Nucleic Acids-Protocols and Applications, first Edition, 199.
19. J. Weiler, H. Gausepohl, N. Hauser, O. N. Jensen, J. D. Hoheisel. Hybridisation based DNA screening on peptide nucleic acid (PNA) oligomer arrays. *Nucleic Acids Res.* 1997, 25: 2792-2799.
20. L. Christen, P. E. Nielsen, O. Buchardt, M. Egholm, R. H. Berg, Film-supported PNA synthesis. (Eds.) ESCOM, Leiden. 1995, 283-284.
21. H. Fukuda, T. Takao, J. Coull, Y. Shimonishi, Synthesis and mass spectrometric analysis of PNA oligomers, (Eds) Osaka. 1994, 45-48.
22. E. Atherton, M. J. Gait, R. C. Sheppard, B. J. Williams, The polyamide method of solid phase peptide and oligonucleotide synthesis, *Bioorg. Chem.* 1979, 8: 351-370.
23. H. Becker, H. W. Lucas, J. Maul, *Makromol. Chem. Rapid. Commun* 1982, 3: 217.
24. H. M. Geysen, R. H. Meloen, S. J. Barteling, Use of Peptide Synthesis to Probe Viral Antigens for Epitopes to a Resolution of a Single Amino Acid, *PNAS.* 1984, 81: 3998-4002.
25. R. Frank, R. Döring, Simultaneous multiple peptide synthesis under continuous flow conditions on cellulose paper discs as segmental solid supports, *Tetrahedron.* 1988, 44: 6031-6040.
26. S. P. Fodor, J. L. Read, M. C. Pirrung, L. Stryer, A. T. Lu, D. Solas, Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis, *Science.* 1991, 251: 767-773.
27. 陈向明, 陈河如, 苄烯—嘧啶加合物的紫外光谱研究及其应用, *中山大学学报(自然科学版)*, 2005, 44: 61-63.
28. M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, R. H. Berg, Peptide nucleic acids (PNA). Oligonucleotide analogs with an achiral peptide backbone. *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114: 1895-1897.
29. H. Gausepohl, U. Pies, Schiff base analog formation during in situ activation by HBTU and TBTU, (Eds) ESCOM, Leiden. 1992, 523-5234.

第六章 PNA 与 DNA 杂交研究

6.1 引言

由于PNA骨架是电中性的,因此与DNA的杂交减少了静电斥力,杂交亲和力提高,而且特异性强,又不易水解和酶切,所以对PNA的应用研究吸引了科学家们的广泛兴趣^[1-4]。一类崭新的物质被设计发明后,科学家们总是对他们的性质和应用作大量研究,PNA的出现也不例外。首先人们为了弄清和改善PNA在不同场合中的行为并预测PNA-NA复合物的热力学性质,因此需要对PNA-NA作用的热力学进行了研究^[5]。人们最为常用的是通过紫外吸收溶解曲线来测复合物的 T_m ^[6,7],通过 T_m 的信息来计算它们的热力学参数^[8,9];当然随着发展人们研究其热力学性质的方法和手段也越来越多,例如等温滴定量热法(ITC),差示扫描量热法(DSC)等^[3,10-13]。而在本章中我们利用紫外光谱研究了N-PNA与DNA的杂交,以期望偶氮苯能够实现杂交的调节。

随着人们对PNA的广泛研究,PNA已经在基因治疗药物开发、基因诊断、生物传感器以及作为分子生物学和生物技术的分子工具等方面得到广泛应用。其中,基因检测是当前生物化学极具吸引力的研究课题,由于PNA比DNA有诸多的优势,因此PNA在这方面的应用研究也已广泛进行。目前的对基因的检测多集中在利用DNA生物传感器来对基因的检测,因此本章意在研究PNA与DNA的杂交以期望发展PNA生物传感器。对PNA与DNA的杂交研究,人们已经进行了大量研究,研究方法也多种多样,例如:电化学方法,荧光检测法,SPR方法,XPS方法等等。

6.2 N-PNA与DNA杂交的紫外光谱研究

通过外部刺激来调节生物反应一直是一个有吸引力和急需解决的课题。包含偶氮苯的DNA已经被Makoto Komiyama等合成和广泛研究^[14-20]。在外界刺激下,包含偶氮苯的DNA可以可逆的调节DNA双螺旋的活性。包含反式偶氮苯的寡聚核苷酸与互补的DNA杂交后,反式平面偶氮苯插入到相邻碱基对之间,通过碱基堆积作用提高杂交稳定性,然而非平面的顺式偶氮苯却因为立体位阻的原因不能插

入到相邻碱基对之间,从而降低了杂交稳定性。因此,通过紫外光和可见光的外部照射可以实现对杂交的调节,这种调节来自于顺式和反式偶氮苯的立体位阻的不同^[21]。为了利用 PNA 的优势,我们借鉴了他们的工作在实验室中已经合成包含偶氮苯的 PNA,也希望偶氮苯对 N-PNA 与 DNA 杂交实现调节。

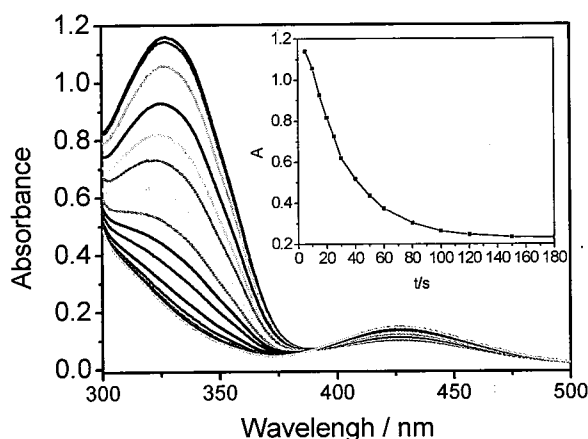
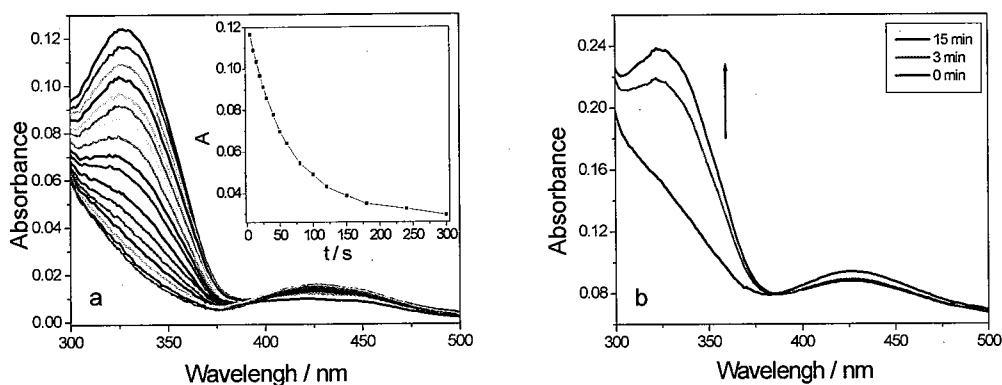


图 6-1 N5-PNA 紫外可见吸收光谱变化; (内部)在 324nm 处吸收随光照时间的变化
Figure 6-1 UV-vis absorption spectral change of N5-PNA upon photoirradiation with a monochromatic light at 366nm; (inset) time course change in absorbance at 324nm.



a. UV-vis absorption spectral change of N5-PNA/DNA double strand upon photoirradiation with a monochromatic light at 366nm; (inset) time course change in absorbance at 324nm. B. UV-vis absorption spectral change of N5-PNA/DNA double strand (25 μ M) upon photoirradiation with a monochromatic light at 546nm.

图 6-2 N5-PNA/DNA 双链紫外可见吸收光谱变化。

Figure 6-2 UV-vis absorption spectral change of N5-PNA/DNA double strand

偶氮苯乙酸 PNA 单体的紫外可见吸收光谱在外可见光照射下的变化已在前文中讨论,在偶氮苯单体插入到 PNA 序列后它拥有同样的变化,图 6-1 就显示了

N5-PNA 单链在 366 nm 单色光照射下的紫外光谱图变化。我们可以发现偶氮 $\pi-\pi^*$ 跃迁吸收峰随着偶氮苯反式变顺式而降低, 同样当 N-PNA 与 DNA 杂交后形成双链体后仍然包含有此种性质, 图 6-2 显示了双链体的紫外光谱变化图。无论单链还是双链, 同样他们在随后用可见光照射 (546 nm) 时, 吸收峰强度又返回 (图 6.5 b)。

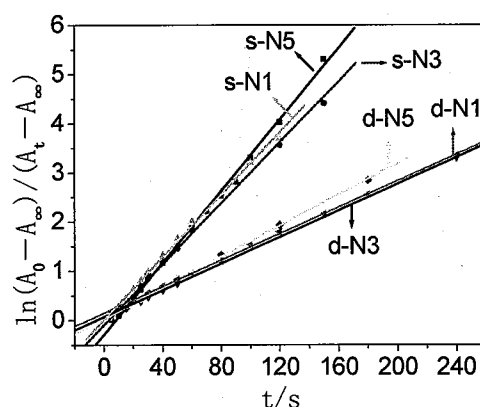
虽然 N-PNA 单链以及和 DNA 杂交后的双链有着同样的变化趋势, 但是既然杂交后偶氮苯所处的环境发生了变化, 他们必然存在着不同。我们通过研究偶氮苯顺反异构的速率常数发现了他们的不同, 速率常数可以有公式 6-1 得到。图 6-3 和表 6-1 显示了几种 N-PNA 单双链中偶氮苯的速率常数。

$$\ln(A_0 - A_\infty)/(A_t - A_\infty) = K t \quad 6-1$$

表 6-1 N-PNA 光致异构速率常数
Table 6-1 Photoisomerization rate constant of N-PNA.

N-PNA oligomer ^a	K_s / s^{-1} ^b	K_d / s^{-1} ^c
H-TTTTNT-NH ₂ (N5)	0.0364	0.0158
H-TTNTTT-NH ₂ (N3)	0.0309	0.0135
H-NTTTTT-NH ₂ (N1)	0.0317	0.0134

^a“H” denotes a free amine end, “NH₂” denotes carboxamide end, and “N” denotes azobenzene unit. ^b“K_s” denotes photoisomerization rate constant of PNA single strand. ^c“K_d” denotes photoisomerization rate constant of PNA/DNA(5'-AAAAA-3') double strands.



These lines were obtained by fitting original data. A_0 denotes the absorption of 0 second, A_t denotes the absorption of t second, A_∞ denotes the absorption of infinitude second.

图6-3 N-PNA的 $\ln(A_0 - A_\infty)/(A_t - A_\infty)$ 对辐照时间 t 作图

Figure 6-5 Irradiating time course change the value of $\ln(A_0 - A_\infty)/(A_t - A_\infty)$

从表 6-1 和图 6-3 中我们可以明显的发现 K_s 值远大于 K_d 值。这是由于当 N-PNA 与互补的靶 DNA 杂交后, 反式的平面偶氮苯插入到相邻的碱基对之间, 平面偶氮

苯与相邻碱基对之间存在相互堆积作用, 偶氮苯再由反式变为顺式需要克服这种作用力, 因而顺反异构变得困难, 双链中 K_d 变小。由于平面反式偶氮苯存在这种相互作用力相对于非平面顺式偶氮苯来说将使双链体的稳定性提高, 因此必然导致反式偶氮苯存在时双链 T_m 大于顺式存在时的 T_m , 从而实现顺反异构对杂交活性的调节。

6.3 PNA 与 DNA 杂交的电化学研究

传统的检测 DNA 杂交的方法, 比如凝胶电泳法、印迹膜法等, 速度慢, 劳动强度大, 因此许多不同的检测方法被提出。由于电化学设备可以提供检测迅速, 低费用, 简便, 易于微型化, 因此电化学方法在众多的检测方法中显示了独特的优势, 所以运用 PNA 通过电化学方法检测 DNA 研究最为广泛^[22, 23]。

6.3.1 用指示剂研究 PNA 与 DNA 的杂交

最初的电化学方法检测 DNA 大多是运用电活性杂交指示剂。电活性杂交指示剂一般是小的电活性 DNA 嵌入剂或者是沟槽绑定剂, 与单链的 DNA 相比, 它们对杂交后的双链体有高的亲和力^[24, 25], 因此, PNA 与 DNA 杂交研究也首先运用了指示剂。Wang J 在这方面作了大量工作, 例如用 Co(phen)_3^{3+} 作为指示剂检测 DNA^[26]。

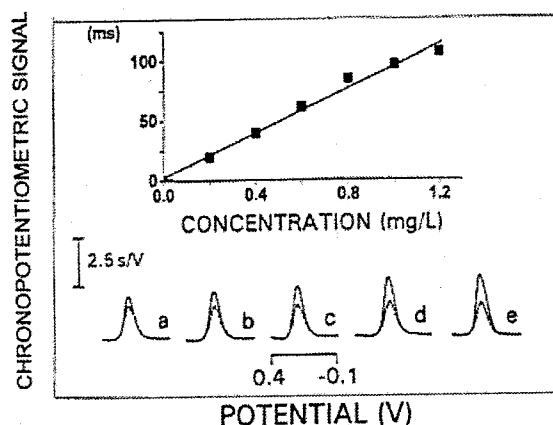


图6-4 Co(phen)_3^{3+} 作为指示剂时的计时电位曲线, 当 PNA 修饰的碳糊电极与 DNA 杂交时

Figure 6-4 Chronopotentiograms for Co(phen)_3^{3+} indicator obtained at the PNA-modified carbon paste electrode following a 5-min hybridization in solutions containing levels of the complementary DNA target in 0.2 ppm steps.

图6-4就显示了15聚体的PNA在碳糊电极表面对寡聚靶核苷酸检测的即时电位信号, 我们可以发现随着靶DNA的浓度增大, 指示剂响应的峰面积线性增大。随后它们利用PNA碳糊生物传感器检测了p53基因的突变, 这些突变正好对应于各种癌

症类型。

Eiichi Tamiya等用 $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ 作为指示剂研究了PNA与DNA之间的杂交^[27],如图6-5所示。

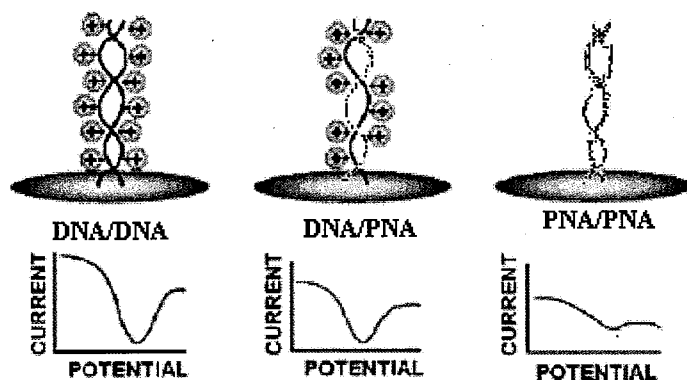


图6-5 当 $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ 作指示剂时PNA与DNA相互作用的电化学响应

Figure 6-5 Schematic representation of electrostatic interactions of DNA and PNA molecules with a redox-active metal cation $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$

Dilsat O等用亚甲基兰 (MB) 作为指示剂, 在金表面用DPV方法检测基因的点突变获得了比较好的结果, 而且它们还在各种电极上作了研究, 例如HMDE, GCE, CPE等通过各种电化学方法例如AdTSV, DPV, ACV等技术作了研究, 同时Lawrence M. F等用电化学阻抗对PNA与DNA的杂交作了研究^[28, 29]。

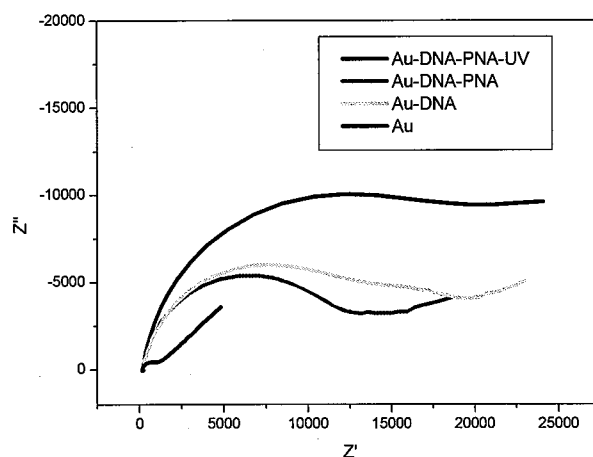


图6-6 当 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 为指示剂时不同金表面的Nyquist图

Figure 6-6 Nyquist plots of Au, Au-DNA, Au-DNA-PNA, Au-DNA-PNA-UV, with 5mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ mixture as redox probe in PB buffer.

Juhyoun Kwak等用 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ 作为指示剂在金电极表面通过CV, EIS方法检测DNA^[30]。我们在实验室中合成了包含偶氮苯乙酸PNA单体的PNA六聚体, 我们用 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ 作为指示剂在金电极上研究了N-PNA与DNA的杂交, 并观察了偶氮对杂交的影响。例如图6-6是DNA($\text{HS}-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_3\text{-AAAAAA}$)组装在金电极表面然后与N-PNA(TTTNTT)杂交研究的Nyquist图。

EIS 已经被证明是研究界面反应机理的强有力的工具, 近几年已经被广泛用于在电极表面研究核酸^[31-34]。对氧化还原电子通过电极表面的自组装单分子层的描述通常被形象的建立在 Randles 等效电路基础上。等效电路通常由电阻和电容组成, 例如 R_s (溶液电阻), R_{ct} (电子传输电阻), R_x (单分子层缺陷电阻), C (理想电容)等^[35-38]。 R_{ct} 在阻抗图上可近似的认为是半圆弧在 X 轴上的截距。表 6-2 是 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ 的氧化还原电子在不同表面上传输电阻 R_{ct} 。

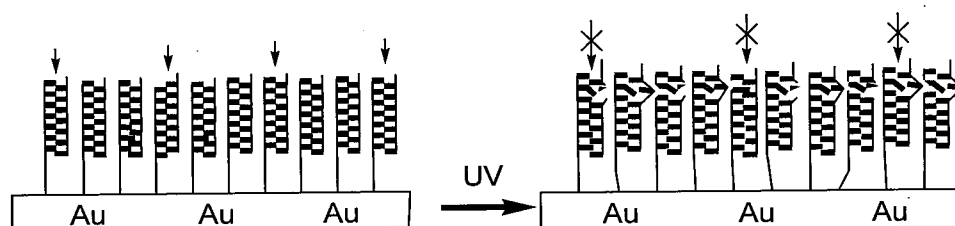


图6-7 在组装有N-PNA/DNA双螺旋的金表面电子传输示意图

Figure 6-7 Schematic figure of the transfer of electron on the Au surface

表6-2 在不表面的 R_{ct}

Table 6-2 R_{ct} on the different surface

表面	Au	Au-DNA	Au-DNA-PNA	Au-DNA-PNA-UV
R_{ct}/Ω	1100	15750	13500	26000

从表6-2我们可以看出在裸金表面组装DNA后的电子传输电阻远大于裸金表面, 这是因为组装DNA后, 表面形成DNA聚阴离子表面, 对 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ 有静电排斥作用, 所以 R_{ct} 增大。然而当与N-PNA杂交后, 由于表面变得拥挤, 且PNA不带电, 理论上应该 R_{ct} 增大, 但是却有少量减小, 这或许是因为杂交后形成双链体, 电子容易在碱基对之间传输的原因。紫外光照射表面后, 原先插入到碱基对之间的反式偶氮苯变为非平面的顺式, 破坏了双链体, 阻碍了电子在碱基对之间的传输导致 R_{ct} 增大(如图6-7所示)。

6.3.2 电化学标记的PNA与DNA的电化学检测

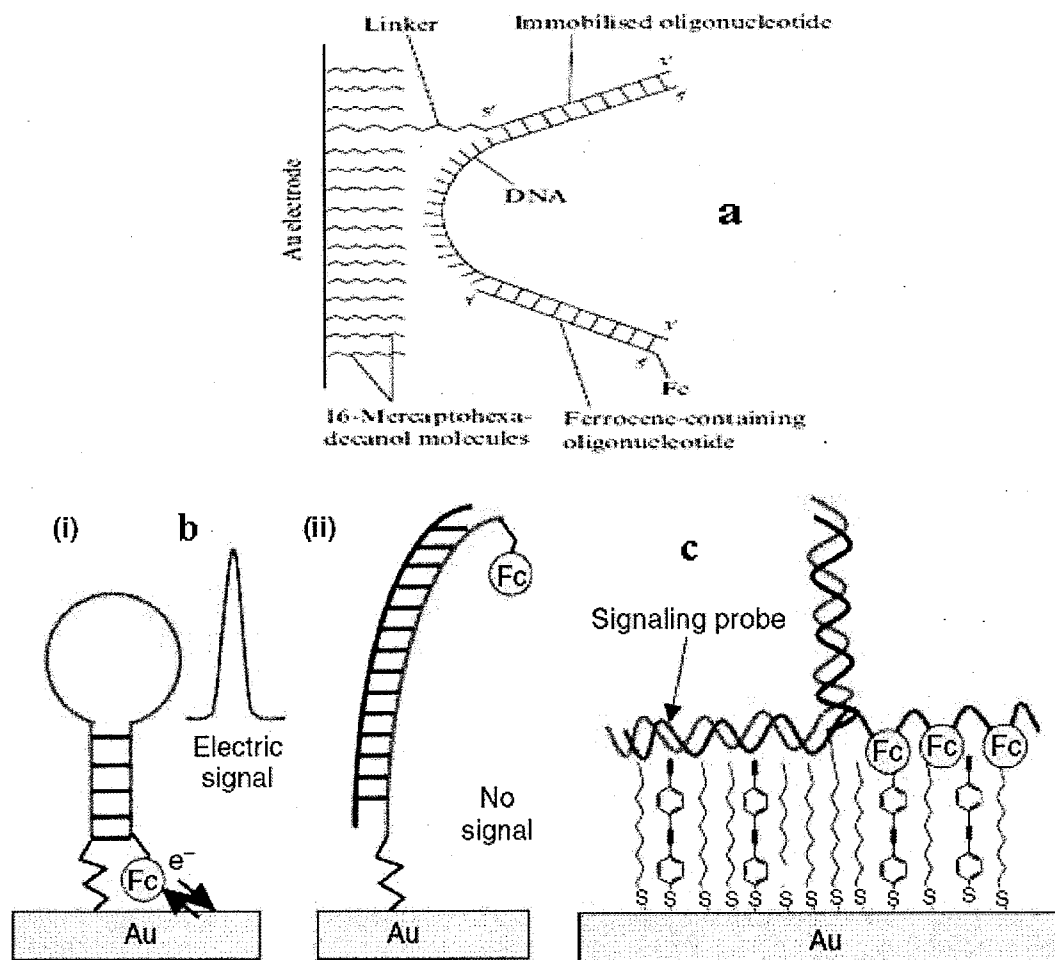


图6-8 通过Fc标记DNA的方法电化学检测杂交

Figure 6-8 The detection of hybridization by electrochemical methods used Fc labelled DNA

电化学方法检测核酸有诸多优势，高的灵敏度、低的花费、简便快速，更重要的是容易微型化设计成芯片，因此，利用PNA电化学方法检测核酸引起了人们的极大兴趣^[22, 23, 25, 39]。在电化学检测杂交方面的研究，部分力量集中在提高杂交信号灵敏度。因此，当前的一个策略是用电化学活性体标记DNA，通过检测电活性基团的信号变化来检测杂交。Fc呈现了良好的氧化还原可逆性，化学稳定性以及电化学稳定性，因此Fc是最为常用的电活性标记分子。Fc标记DNA用来检测杂交以及研究电子在双链体之间的传输已被广泛研究。例如C. J. Yu等人通过图6-8 a所示的方式来检测单核多晶现象^[40]；Chunhai Fan小组利用杂交构象的变化来检测DNA(图6-8 b)^[41]；Robert M小组利用Fc与苯乙烯接触产生通讯信号来检测DNA (图6-8 c)^[42]。

虽然在第三章中谈到Fc标记PNA，但大多是标记其PNA单体，还很少标记PNA寡聚体，通过Fc标记的PNA来检测DNA更不多见，仅有Hiroshi Aoki小组通过Fc-PNA与DNA杂交前后构象刚性程度的不同，导致电信号的不同来检测与DNA的杂交（图6-9）^[43]。

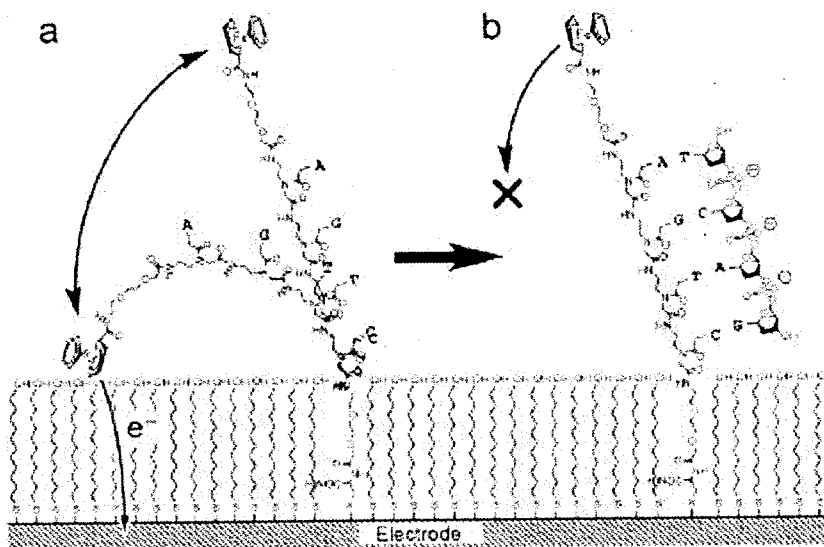


图6-9 通过Fc标记的PNA的构象变化来检测杂交

Figure 6-9 The detection of hybridization by the conformational flexibility change of Fc labelled PNA

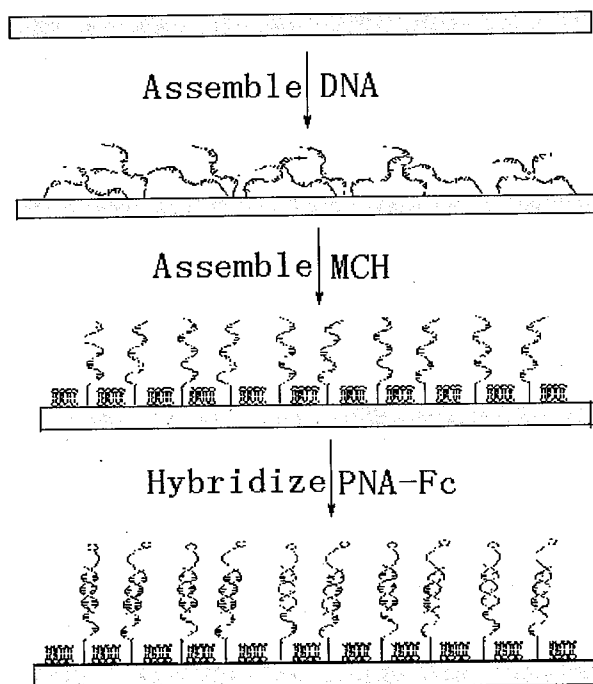


图 6-10 实验步骤示意图

Figure 6-10 Schematic figure of experimental steps

我们采用了相反的方式检测Fc-PNA与DNA的杂交。首先把HS-DNA [HS-(CH₂CH₂)₃-AAAAAA]固定在金电极上然后与Fc-PNA(T6-Fc)杂交,通过产生电信号来检测杂交(实验过程如图6-10所示)。

6.3.2.1 电极表面DNA量的确定

电极表面的DNA覆盖度对于杂交是非常重要的,因此杂交之前要确定表面DNA的量。通过电化学的方法确定表面DNA的量已经广泛应用,其中通过即时库仑法确定DNA的量较为方便。即时库仑法的完成是用[Ru(NH₃)₆]³⁺通过Cottrell实验来完成的^[44, 45]。表面DNA的覆盖度是通过表面[Ru(NH₃)₆]³⁺的量来确定的;因为[Ru(NH₃)₆]³⁺带三个正电荷它和表面的带负电荷的DNA存在强的静电相互引力,表面每三个DNA碱基相当于静电吸引一个[Ru(NH₃)₆]³⁺,因此很容易通过确定[Ru(NH₃)₆]³⁺的量来确定表面的DNA。在即时库仑实验中总的电荷Q可以作为时间的函数通过Cottrell方程获的。

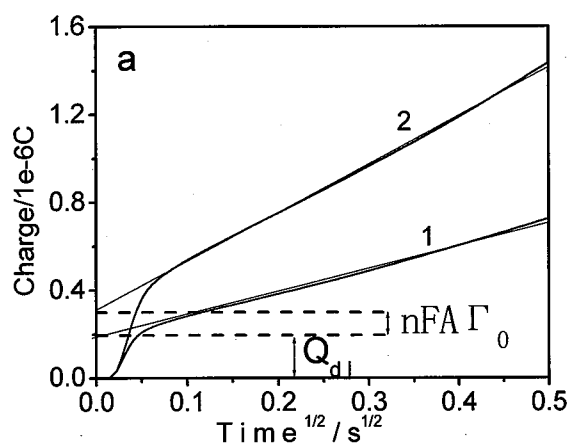


图 6-11 对于DNA修饰金电极的计时库仑响应曲线, 1为无[Ru(NH₃)₆]³⁺, 2为有[Ru(NH₃)₆]³⁺

Figure 6-11 CC response curve for the DNA modified Au electrode in without (1) and with (2) [Ru(NH₃)₆]³⁺

$$Q = \frac{2nFAD_0^{1/2}C_0^*}{\pi^{1/2}} t^{1/2} + Q_{dl} + nFA\Gamma_0$$

6-2

这里的n是每分子氧化还原所需的电子数, F是法拉第常数 (C/equiv), A是电极的面积 (cm²), D₀是扩散系数 (cm²/s), C₀^{*}是氧化还原分子的电极表面浓度,

Q_{dl} 是双电层电容电荷 (C), $nFA\Gamma_0$ 是来自于吸附分子的氧化还原电荷 (C), Γ_0 是电极表面氧化还原分子的量。求得 Γ_0 后可以通过方程6-3求得表面DNA的覆盖度。

$$\Gamma_{DNA} = \Gamma_0(Z/m)(N_A) \quad 6-3$$

这里 Γ_{DNA} 是表面DNA的表面密度 (molecules/cm²), m 是DNA序列的碱基数, Z 是氧化还原分子带的电荷, N_A 是阿夫加德罗常数。

从图6-11中我们求得y轴截距, 求得DNA表面浓度 1.2×10^{-11} mol/cm²。

6.3.2.2 PNA浓度的确定

确定PNA的浓度最常用的方法是分光光度法, 浓度由朗伯-比尔定律 $A = \epsilon C l$ 计算, 式中的 A 为吸收度, ϵ 为消光系数、单位 M^{-1}/cm^{-2} , C 为浓度、mol/l, l 为光程长度、单位cm。当测定PNA浓度时多数情况下消光系数是未知的, 但是4种PNA单体的消光系数已经测定, A、C、G、T的 ϵ_{260} 分别为13.7、6.6、11.7、8.6, 单位为 $ml/(\mu mol \times cm)$, 在一般情况下可以直接运用各个单体消光系数之和来求PNA的消光系数。如果要比较准确地确定PNA的消光系数, 要考虑相邻碱基间的堆积作用而造成的减色效应。我们可以借鉴Puglisi和Tinoco描述的计算DNA和RNA寡聚物消光系数的近似方法来计算, 而且Peter E. Nielsen小组也成功的把这种方法运用到PNA浓度的确定。

6.3.2.3 电化学检测

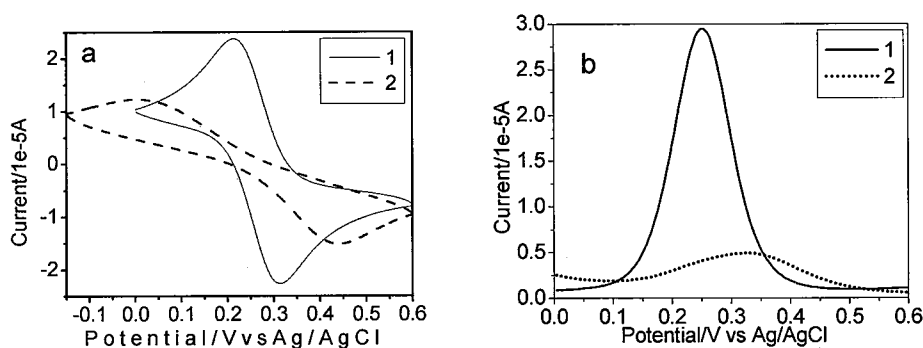


图6-12当 $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ 作指示剂时在电极Au (1)和Au-DNA (2)上的(a)CV, (b)DPV性质
Figure 6-12 (a) CV and (b) baseline-DPV behavior of ferricyanide(3-/4-). The data correspond to electrode of Au (1), Au-DNA (2).

通过Cottrell实验我们可以定量的确定表面DNA的量, 同时我们可以通过CV实验定性的看到表面的DNA分子层, 图6-12是用 $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ 作指示剂在金电极表面以

及组装了DNA的金电极表面的CV和DPV图。我们可以从CV图看到 ΔE_p 从裸金表面的77 mV到组装DNA后的391 mV,而DPV图中峰电流 I_p 从29 μ A到5 μ A,这是因为 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 带负电荷,当组装DNA后金电极表面有一层聚阴离子层,对 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 有排斥作用使指示剂难以到达表面, ΔE_p 增大, I_p 减小。

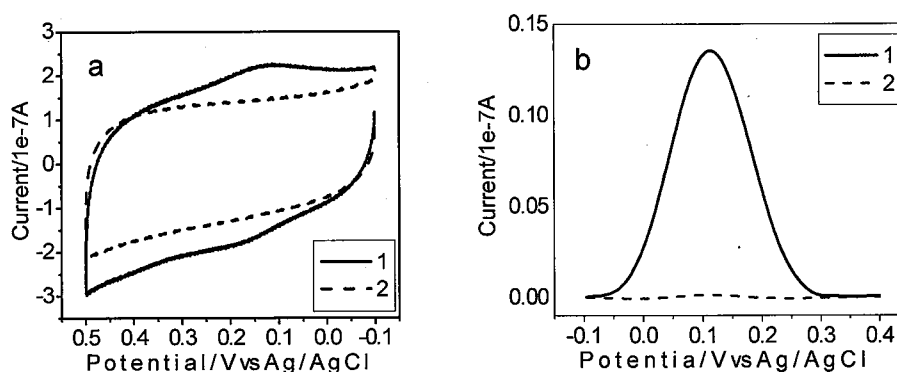


图6-13 DNA与PNA和Fc-PNA杂交的CV(a)和DPV(b)行为

Figure 6-13 The CV (a) and baseline-corrected DPV (b) of DNA hybridization with PNA oligomers. The data correspond to electrode of Au-DNA-PNA-Fc (1), Au-DNA-PNA (2).

当金表面组装DNA后与PNA-Fc(Lys-TTTTTT-Fc)杂交,我们通过CV, DPV检测了它们的杂交信号,图6-13所示。二茂铁是非常好的氧化还原分子,因此它的氧化还原峰可以非常容易从它们的CV, DPV图上观察到,我们可以图6-13得到 $\Delta E_p = 170 - 132 = 38$ mV, 而DPV响应是 $E = 0.114$ V。

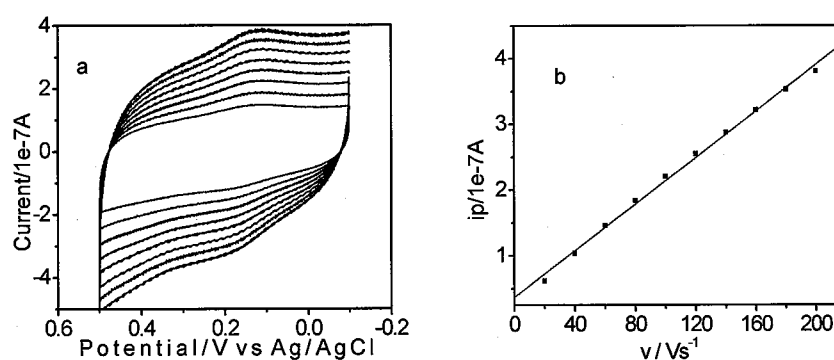


图 6-14 (a)扫速对DNA/PNA-Fc修饰的金电极CV的影响,扫速从内向外分别是20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200 mV/s; (b)扫速与峰电流的关系

Figure 6-14 (a) Cyclic voltammograms of Au-DNA-PNA-Fc measured in PB buffer with different scan rates. From inside to outside 20 40 60 80 100 120 140 160 180 and 200mV/s, respectively. (b) shows the linear relationship between the peak currents and the scan rates.

图6-14显示了扫速对CV图的影响,我们从图a中可以看到峰电流随扫速的增加而增加,而图b却显示了这种增加呈线性关系,这就说明了PNA-Fc是通过杂交固定在表面,并且是单电子的可逆的氧化还原电化学反应。这些电化行为表明了PNA-Fc有可能作为电化学DNA传感器的信号探针。

电化学阻抗检测

前文我们通过EIS方法研究了用 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ 作指示剂来研究PNA与DNA的杂交,在这里同样我们用EIS方法通过等效电路研究了PNA-Fc与DNA。我们把HS-DNA $[\text{HS}-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_3\text{-TTTAAA}]$ 组装在金表面,为了便于杂交然后组装MCH,最后与PNA-Fc(TTT-Fc)杂交,通过ESI等效电路的方法研究了电子在表面的传输。表6-3和图6-15是金表面和组装DNA和MCH后的电化学结果比较,我们可以得到和上文相同的结果,当组装DNA和MCH后 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ 氧化还原变得困难, R_{ct} 由190.6 Ω 增加到858.8 Ω , 并且等效电路中加入 R_x 元件等效电路模拟值更加合乎实际测量值。

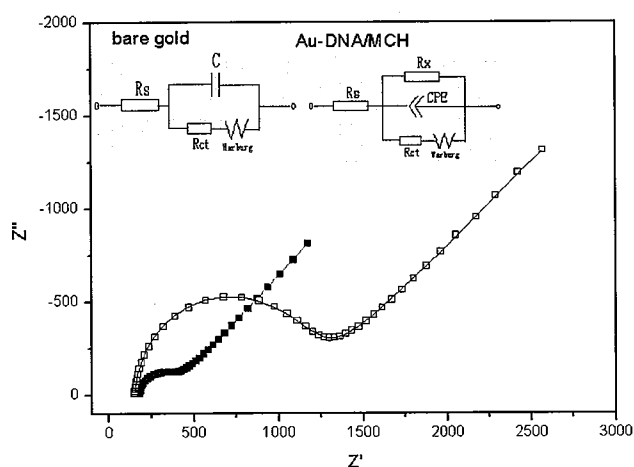


图 6-15 Nyquist图以 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 为指示剂, 分别在Au和Au-DNA/MCH 电极上
Figure 6-15 Nyquist plots (Z' versus Z'') of Au (■), Au-DNA/MCH (□) with 5mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ (1:1) mixture as redox probe in PB buffer. In all cases the measured data points are shown as symbols with the calculated fit to the equivalent circuit as solid lines.

表6-3 阻抗数据 1

Table 3. The date of impedance at Au and DNA/MCH

	R_s	R_{ct}	W	CPE	R_x
Au	181.7	190.6	8.022	6.69E-7	
Au-DNA/MCH	155.2	858.8	664.2	4.52E-7	41457

当与PNA-Fc杂交后由于Fc的存在，我们没有添加指示剂，它们的ESI结果被显示在表6-4和图6-1617中。

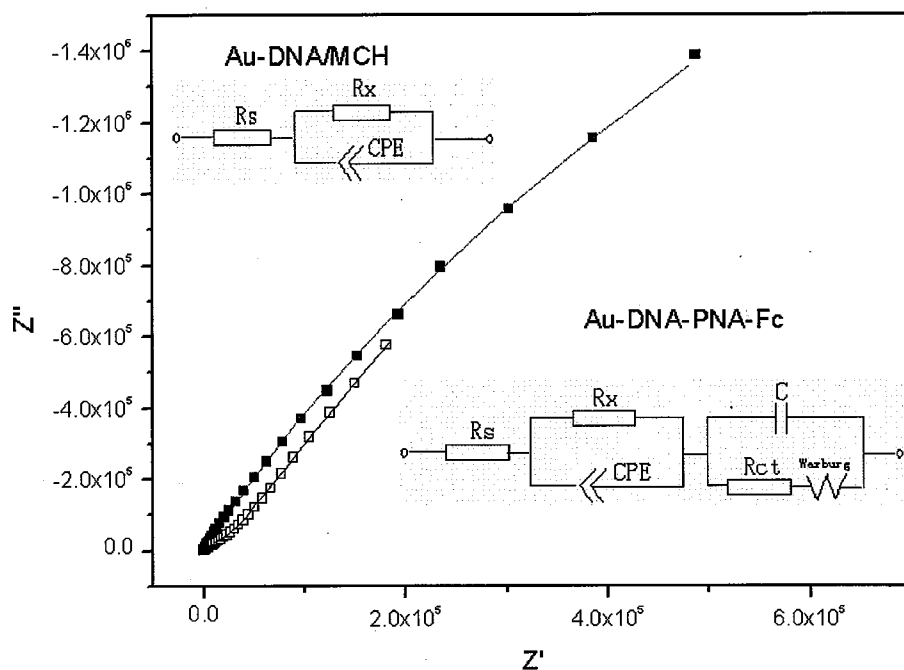


图 6-16 Nyquist图，分别在Au和Au-DNA/MCH 电极上

Figure -6-16. Nyquist plots (Z'' versus Z') of Au-DNA/MCH (■), Au-DNA-PNA-Fc (□) in PB buffer. In all cases the measured data points are shown as symbols with the calculated fit to the equivalent circuit as solid lines.

表6-4 阻抗数据 2

Table 6-4 The date of impedance at DNA-PNA and DNA-PNA-Fc

	R_s	R_{ct}	W	CPE	R_x
Au-DNA/MCH	178.9		211980	5.49E-7	2.24E+7
Au-DNA-PNA-Fc	208.3	9.94E+8	98472	5.62E-7	2.71E+9

结果显示了杂交信号，从等效电路中我们可以发现杂交后，Fc电子传输电阻 R_{ct} 元件的存在。

6.4 PNA与DNA杂交的AFM研究

扫描隧道显微镜 (scanning tunneling microscope, STM), 是1982年G.Binnig和H.Rohrer根据量子力学原理中的隧道效应而设计发明的一种新型表面分析工具^[46]。STM为研究表面结构提供了崭新的方法，吸引了人们的注意力，自从那以后AFM，

SMM, FFM, SThM的出现使扫描探针显微镜家族(Scanning Probe Microscopes, SPMs)逐渐壮大,也被逐渐应用到生物领域。而AFM更为广泛的应用于研究固定在表面的生物分子,特别是TM(tapping-mode)模式,它对于研究柔韧性好的生物分子远比接触模式好^[47-50]。AFM已广泛应用于表面DNA结构和功能的研究,但还很少用于研究PNA。因此在本小节我们首先通过TM模式研究了DNA组装、与PNA杂交等过程的金表面形貌变化,然后又运用金纳米颗粒标记的DNA放大检测信号,来研究N-PNA与DNA的杂交,并且研究了偶氮苯顺反异构对杂交的影响。

6.4.1 金表面DNA与PNA-Fc杂交的变化

我们把HS-DNA[HS-(CH₂CH₂)₃-TTTAAA]和MCH组装在金表面,然后再与PNA-Fc(TTT-Fc)杂交,用AFM研究了各个阶段的形貌变化。相图是显示不同表面的机械特征和黏附力特征,在组装和杂交的各个阶段表面都发生了变化,因此它们的表面特征也随着变化。图6-17显示了各个阶段的相图变化,我们可以清楚地看出不同阶段的形貌变化。

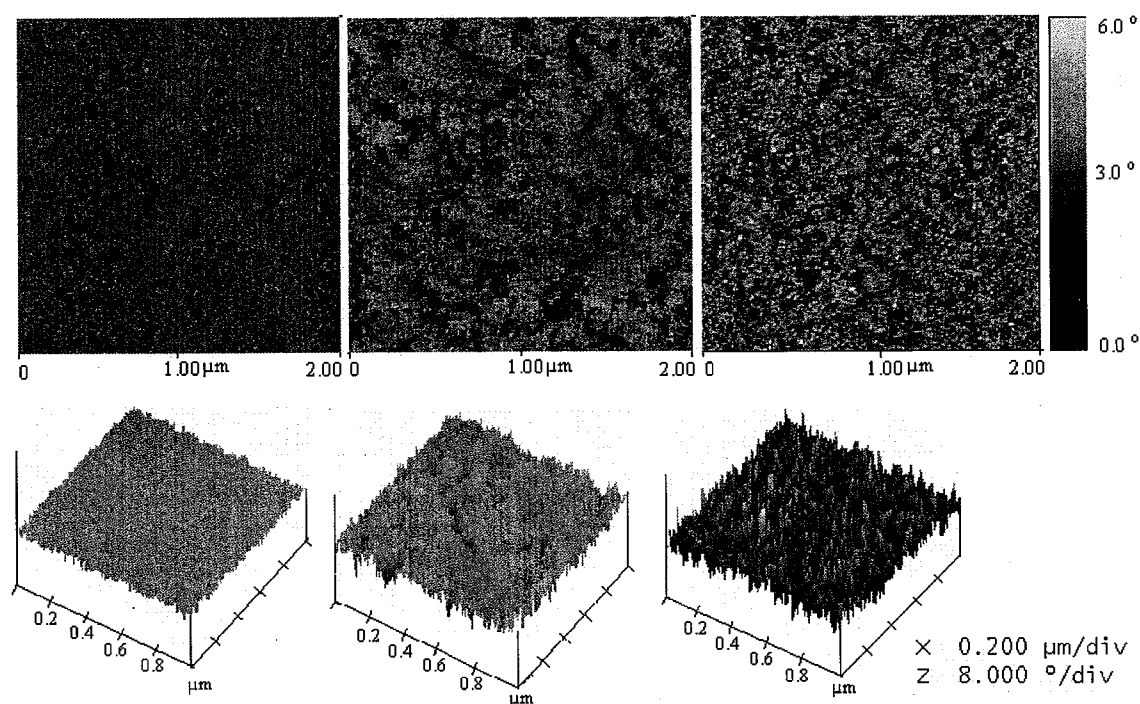


图6-17 TM-AFM相图, 从左到右分别是Au, Au-DNA/MCH, Au-DNA-PNA-Fc表面

Figure 6-17 TM-AFM phase images at different surfaces. The TM-AFM images from left to right are Au, Au-DNA/MCH, Au-DNA-PNA-Fc.

由于我们运用的DNA和PNA碱基数目相对较少,因此很难检测到形貌有明显的变化,但可以看到各个阶段的均方根粗糙度的变化(图6-18)。

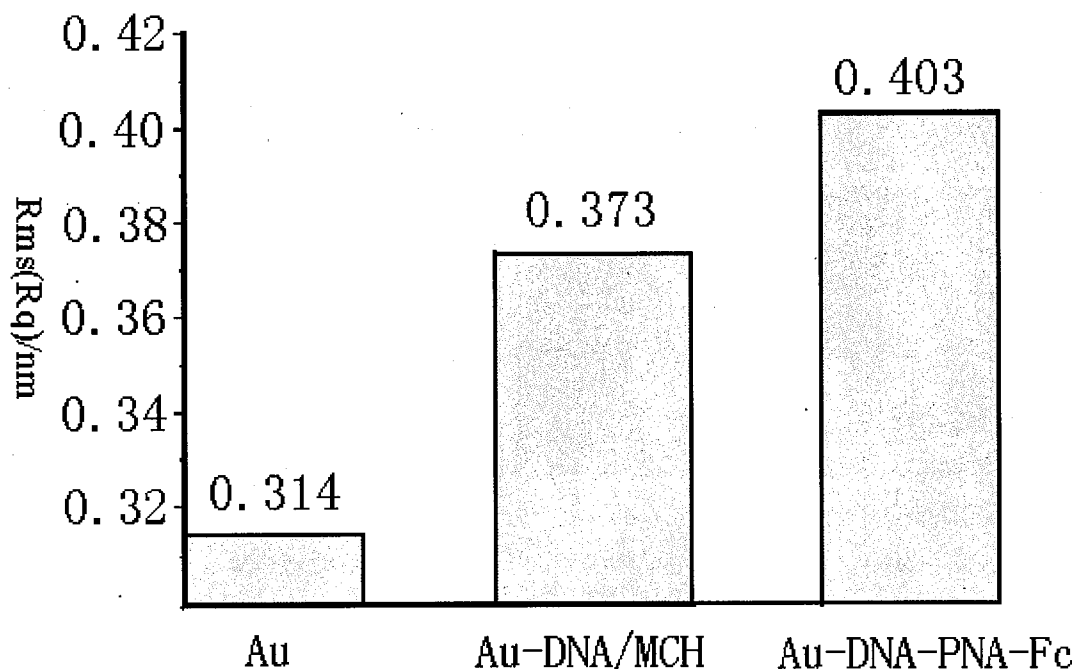


图 6-18 在不同表面均方根粗糙度的比较

Figure 6-18 The compare of the Root Mean Square roughness at different surfaces.

从图6.18中我们明显地看到均方根粗糙度的不断增加,这从实验过程示意图6-10中不难理解这种变化。

6.4.2 N-PNA与DNA杂交AFM研究

AFM具有高的横向分辨率,原则上可以直接检测单个DNA在表面的杂交,但是,由于它自身的分辨率低于表面粗糙度,这就限制了AFM应用^[51]。但是,纳米颗粒标记DNA的出现,成为新的极具潜力的DNA检测方法。我们已经合成了N-PNA,因此我们想通过金纳米颗粒标记的DNA与表面组装的N-PNA杂交,通过形貌的方法研究偶氮苯单元位置对杂交的影响以及偶氮苯顺反异构对杂交的影响。

处理干净的硅片浸泡在GPTS溶液中, N-PNAs溶液滴到硅片上,反应后形成N-PNAs单分子层,然后进行一组对比试验。一是直接与金纳米颗粒标记的DNA杂交,另一组是N-PNAs单分子层经过紫外光照后与金纳米颗粒标记的DNA杂交。所用的N-PNAs见图6-19,实验示意图见图6-20。

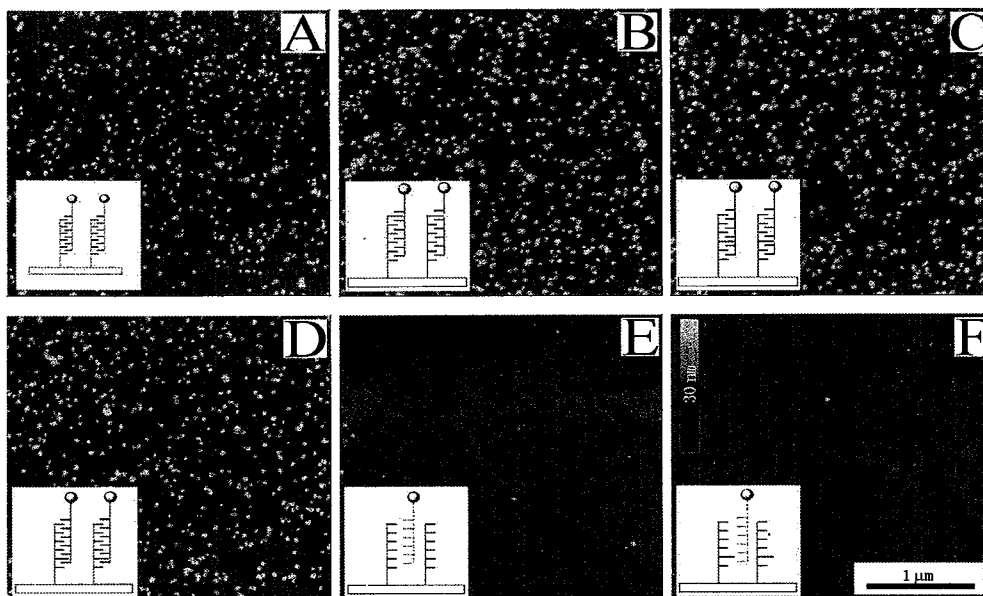


图 6-21 杂交后的AFM形貌图；(A-D)是互补的TC-DNA分别与修饰在Si/SiO₂表面的T6-PNA, N6-PNA, N3-PNA 和 N2-PNA 杂交；(E) 和 (F) 分别是N6-PNA 和 N2-PNA 与非互补的 TN-DNA杂交

Figure 6-21 AFM images of hybridizations on various surfaces. Height and lateral scale according to the bars in (F). (A)-(D) are TC-DNA hybridized with different sequences of T6-PNA, N6-PNA, N3-PNA and N2-PNA assembled on the Si/SiO₂ surface, respectively. (E) and (F) are N6-PNA and N2-PNA hybridized with TN-DNA

未紫外光照的PNA和N-PNA与金纳米颗粒标记的靶DNA的杂交结果被显示在图6.21(A-D)中，可以清楚地看出所有表面金颗粒密度大约是110 particles/ μm^2 ，并且由于DNA之间的相互排斥力，金颗粒基本是相互分离，比较均匀的分布在表面。而与非互补的DNA杂交后，表面金颗粒密度小于2 particle/ μm^2 ，这就说明前者的金颗粒并非是吸附在表面的，而是通过杂交而固定在表面的。我们可以得出：N-PNA可以像PNA那样和DNA杂交，并且偶氮苯单元的位置并不显著的影响它们的杂交。

紫外光照后的 N-PNA 与 DNA 杂交结果显示在图 6-22 中。从图 6-22(A, C)中我们可以发现，N6-和 N2-PNA 与互补的靶 DNA 杂交后，金颗粒的表面密度由原来的 ~ 110 to ~ 50 particle/ μm^2 。这是因为当 N-PNA 被紫外光照射后，反式平面的偶氮苯转变为顺式非平面的偶氮苯，这将导致两方面的影响：(1) 非平面的顺式偶氮苯导致表面空间拥挤，这不利于杂交；(2) 非平面的顺式偶氮苯不能插入到相邻碱基对之间，这也不利于杂交。这两个方面使金颗粒表面密度数下降。

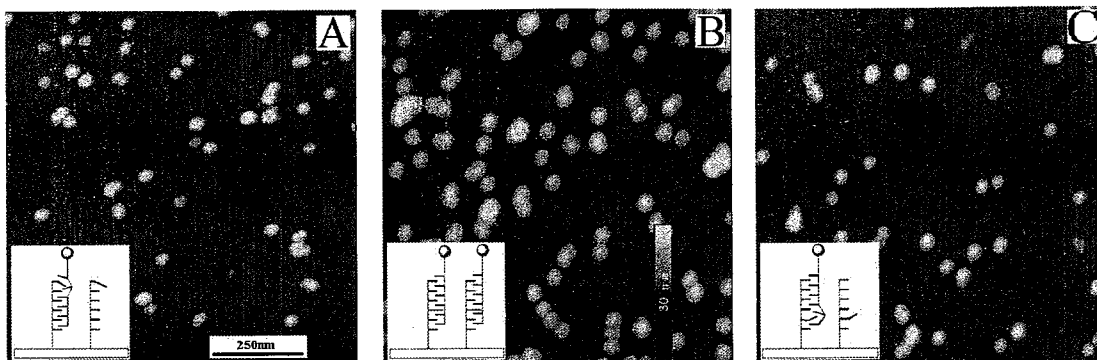


图 6-22 N-PNA 修饰的硅片紫外光照后与互补的 TC DNA 杂交后的 AFM 形貌图：(A)、(B)、(C)分别是 N2-PNA N3-PNA N6-PNA 修饰表面后的杂交形貌图

Figure 3. AFM imaging of the chip surface. Lateral scale and height according to the bars in (A) and (B), respectively. TC DNA hybridized with N-PNA irradiated with UV light; N2-PNA (A), N3-PNA (B), N6-PNA (C).

然而，在检测光照后的 N3-PNA 时却没发现金纳米颗粒数的下降，仍然是 ~ 110 particle/ μm^2 。这或许是来自下面两个至关重要的原因：(1) 在 N3-PNA 中偶氮苯的返回异构速率常数比在 N2 和 N6-PNA 大，大部分顺式偶氮苯在杂交过程中逐渐变为反式；(2) N3-PNA 中顺式的偶氮苯对杂交的影响小，或是因为 N3-PNA 不能更加明显的降低 N-PNA/DNA 双链的稳定性。这就说明了偶氮苯单元的位置对光调节杂交有重要的影响。

总之 N-PNAs 偶氮苯单元的位置并不影响与 DNA 的杂交，但是却可以影响光调节 PNA 与 DNA 之间的杂交，N-PNAs 非常有希望成为光调节 PNA 与 DNA 杂交的有力工具。

6.5 实验

实验试剂：

5'-HS-(CH₂)₆-DNA-3'从 BIOASIA 公司购买，被储存在三次水中，保持冷冻。PNA 和 PNA-Fc 被溶在 0.2 M PB 缓冲液中 (pH=7.0)，保持冷冻。1 mM MCH, 0.2 M PB 缓冲液, 0.5 mM K₃Fe(CN)₆ 在 0.2 M PB 缓冲液中, 2.5 mM K₃Fe(CN)₆ 和 2.5 mM K₄Fe(CN)₆ 在 0.2 M PB 缓冲液中, 10 mM TBS 缓冲液, 10 mM TBS 缓冲液包含 50 μM Ru(NH₃)Cl₃。

实验仪器:

CHI 660, 电化学阻抗仪 1260+273A, 高真空镀膜机 (DZS-500), SPM (Nanoscopy IIIa, Digital Instrument)

6.5.1 电化学实验

金电极处理:

金电极依次用1.0, 0.3 and 0.05 μm 氧化铝糊打磨平, 然后浸在热的piranha溶液中(30% H_2O_2 / 98% H_2SO_4 1:3, v/v) 2分钟。(注意: piranha溶液能与绝大多数有机材料剧烈反应, 必须十分小心的处理) 最后, 电极在1 M H_2SO_4 溶液中用CV方法电化学抛光, 扫描范围-0.3到1.5V, 扫速100 mV/s 直到重复的伏安图出现。

巯基修饰的DNA组装:

HS-(CH_2CH_2)₃-TTTAAA或HS-(CH_2CH_2)₃-AAAAAA (80 μM , 25 μl) 滴到清洗过的金电极上, 过夜, 充分清洗, 氮气吹干, 电极浸入到1 mM的MCH 10 min。

N-PNA的组装:

把电极浸入到20mM的MUA乙醇溶液中约1小时, 水和乙醇充分洗涤。把电极浸入到50mM PB buffer中 (pH=7.4), 包含2 mM EDC和5 mM NHS中1小时, 50 mM的缓冲液充分洗涤。N-PNA溶液4 μM 在0.2M乙酸缓冲液中(pH=4.8), 滴到电极表面1小时, 充分洗涤。

杂交

巯基DNA组装的金电极表面, 滴加上与之互补的PNA或PNA-Fc或N-PNA。

CV, DPV, ESI实验

CV, DPV, ESI实验都是在PB缓冲液中进行, 使用三电极系统, 金盘电极为工作电极, 饱和Ag || AgCl 参比电极, 铂丝为对电极。

6.5.2 AFM实验

金表面的AFM实验

金(99.99%)在高真空镀膜机上沉积到新的云母片上, 通过双面胶把金膜被反剥到硅片上, 就得到复制了云母平整度的新鲜的金表面。然后HS-(CH_2CH_2)₃-T3A3组

装, PNA或PNA-Fc (TTT或TTT-Fc) 杂交。各个阶段用AFM检测。

硅片表面的AFM实验

1) 硅片在piranha溶液中(30% H_2O_2 / 98% H_2SO_4 1:3, v/v) 煮30分钟, 乙醇和水充分冲洗, 氮气吹干, 浸入到GPTS溶液(ethanol 23.5 water 1.25 DIEA 0.25 GPTS 0.25)中, 在烘箱中30℃, 4小时后, 浸入到异丙醇中超声5分钟, 然后水和乙醇交替洗三次, 氮气吹干。

2) 金纳米颗粒的制备

所有的玻璃器皿用3:1 HCl/HNO_3 清洗, 三次水洗干净。在1L的圆底烧瓶中加入500 ml HAuCl_4 (1 mM), 剧烈搅拌下煮沸, 迅速加入50 ml 柠檬酸钠 (38.8 mM), 溶液变紫后, 再煮10分钟, 停止加热, 继续搅拌15分钟, 0.45 μm 过滤膜过滤, 金纳米颗粒直径15nm左右, 避光保存备用。通过朗伯毕尔定律求得金纳米颗粒的密度约8.5 nM。

3) 金纳米粒子标记DNA:

浓的 $\text{HS}-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_3\text{-AAAAAA}$ 滴加到一定量金纳米颗粒溶液中, 最终 DNA 浓度为 3 μM , 室温放置 24 h 后, 用 PB 缓冲液调节 pH=7, 再用 NaCl 调节离子强度为 0.1 M, 放置 40 h, 14000 rpm 离心 25 min, 除去过量 DNA, 红色油状沉淀用 0.3 M PBS 洗涤 2 次, 然后溶于 0.3 M PBS 备用。

4) PNA 固定

取 25 μl PNA 或 N-PNA (4 μM)滴在 GPTS 修饰的硅片上, 烘箱 30℃反应 3 小时, 充分洗涤, 除去非特异吸附的 PNA。

5) 杂交

a: 金纳米颗粒标记的DNA 20 μl 滴到PNA或N-PNA组装的硅片上, 黑暗中室温孵化4 h。充分洗涤, 除去未杂交的DNA。

b: N-PNA修饰的硅片光照10min后, 金纳米颗粒标记的DNA 20 μl 滴到PNA或N-PNA组装的硅片上, 黑暗中室温孵化4 h。充分洗涤, 除去未杂交的DNA。

6) 通过AFM检测表面形貌和相图变化。

参考文献

1. Hyrup, B; Nielsen, PE Peptide nucleic acids (PNA): Synthesis, properties and potential applications *Bioorg. Med. Chem.* 1996, 4: 5-23.
2. E. Uhlmann, A. Peyman, G. Breipohl, D. W. Will, Synthetic Polyamide Nucleic Acids with Unusual Binding Properties. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1998, 37: 2796-2823.
3. P. E. Nielsen, Peptide Nucleic Acids-Protocols and Applications, 2nd Ed. 2004, Horizon Bioscience.
4. K. E. Lundin, L. Good, R. Strömberg, A. Gräslund, C. I. Edvard Smith, Biological Activity and Biotechnological Aspects of Peptide Nucleic Acid, *Advances in Genetics*, 2006, 56: 1-56.
5. 何为 马立人主编, 肽核酸, 化学工业出版社, 2003.
6. M. Eriksson, P. E. Nielsen, PNA-nucleic acid complexes. structure, stability and dynamics. *Quart. Rev. Biophys.* 1996, 29: 369-394.
7. U. Giesen, W. Kleider, C. Berding, A. Geiger, H. Ørum, P. E. Nielsen, A formula for thermal stability (T_m) prediction of PNA/DNA duplexes. *Nucl. Acids. Res.* 1998, 26: 5004-5006.
8. L. A. Marky, K. J. Breslauer, Calculating thermodynamic data for transitions of any molecularity from equilibrium melting curves, *Biopolymers*. 1987, 26: 1601-1620.
9. J. D. Puglisi, J. I. Tinoco, Absorbance melting curves of RNA, *Methods Enzymol.* 1989, 180: 304-325.
10. C. R. Cantor, P. R. Schimmel, Biophysical Chemistry part 3: The behaviour of biological macromolecules, W. H. Freeman, New York. 1980.
11. S. Sen, L. Nilsson, MD simulations of homomorphous PNA, DNA, and RNA single strands: Characterization and comparison of conformations and dynamics, *J. Am. Chem. Soc.* 2001, 123: 7414-7422.
12. M. C. Chakrabarti, F. P. Schwarz, Thermal stability of PNA/DNA and DNA/DNA duplexes by differential scanning calorimetry. *Nucl. Acids. Res.* 1999, 27: 4801-4806.
13. D. T. Haynie, Biocalorimetry: applications of calorimetry in the biological sciences, J. E. Ladbury, B. Z. Chowdhry, Eds. 1998, pp 183-205, John Wiley and Sons, Chichester.
14. A. Yamazawa, X. Liang, H. Asanuma, M. Komiyama, Photocontrol of triple-helix formation by using azobenzene-bearing oligo(thymidine). *Angew. Chem.* 2000, 112: 2446-2447.
15. H. Asanuma, T. Ito, M. Komiyama. Photo-responsive oligonucleotides carrying azobenzene in the side-chains, *Tetrahedron Lett.* 1998, 39: 9015-9018.
16. H. Asanuma, T. Yoshida, T. Ito, M. Komiyama, Photo-responsive oligonucleotides carrying azobenzene at the 2'-position of uridine, *Tetrahedron lett.* 1999, 40: 7995-7998.
17. H. Asanuma, T. Ito, T. Yoshida, X. Liang, M. Komiyama, Photoregulation of the formation and dissociation of a DNA duplex by using the cis-trans isomerization of azobenzene. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1999, 38: 2393-2395.

18. X. Liang, H. Asanuma, M. Komiyama, Photoregulation of DNA Triplex Formation by Azobenzene, *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 24: 1877-1883.
19. X. Liang, H. Asanuma, H. Kashida, A. Takasu, T. Sakamoto, G. Kawai, M. Komiyama, NMR study on the photoresponsive DNA tethering an azobenzene. Assignment of the absolute configuration of two diastereomers and structure determination of their duplexes in the trans-form. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125: 16408-16415
20. D. Matsunaga, H. Asanuma, M. Komiyama, Photoregulation of RNA digestion by RNase H with azobenzene-tethered DNA. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126: 11452-11453.
21. H. Asanuma, X. Liang, T. Yoshida, M. Komiyama, Photocontrol of DNA Duplex Formation by Using Azobenzene-Bearing Oligonucleotides, *ChemBiochem.* 2001, 2: 39-44.
22. J. Wang, Towards Genoelectronics: Electrochemical Biosensing of DNA Hybridization, *Chem. Eur. J.* 1999, 5: 1681-1685.
23. K. Kerman, Y. Matsubara, Y. Morita, Y. Takamura, E. Tamiya, Peptide nucleic acid modified magnetic beads for intercalator based electrochemical detection of DNA hybridization, *Science and Technology of Advanced Materials.* 2004, 5: 351-357.
24. J. Wang, Electrochemical nucleic acid biosensors. *Analytica Chimica Acta.* 2002, 469: 63-71.
25. S. Takenaka, K. Yamashita, M. Takagi, Y. Uto, H. Kondo, DNA sensing on a DNA probe-modified electrode using ferrocenylnaphthalene dimide as the electrochemically active ligand, *Anal. Chem.* 2000, 72: 1334-1341.
26. J. Wang, E. Palecek, P. E. Nielsen, G. Rivas, Xi. Cai, H. Shiraishi, N. Dontha, D. Luo, P. A. M. Farias, Peptide Nucleic Acid Probes for Sequence-Specific DNA Biosensors. *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118: 7667-7670.
27. K. Kerman, M. Vestergaard, N. Nagatani, Y. Takamura, E. Tamiya, Electrochemical Genosensor Based on Peptide Nucleic Acid-Mediated PCR and Asymmetric PCR Techniques: Electrostatic Interactions with a Metal Cation. *Anal. Chem.* 2006, 78: 2182-2189.
28. D. Ozkan, P. Kara, K. Kerman, B. Meric, A. Erdem, F. Jelen, P. E. Nielsen, M. Ozsoz, DNA and PNA sensing on mercury and carbon electrodes by using methylene blue as an electrochemical label. *Bioelectrochemistry* 2002, 58: 119-126.
29. A. Macanovic, C. Marquette, C. Polychronakos, M. F. Lawrence, Impedance-based detection of DNA sequences using a silicon transducer with PNA as the probe layer, *Nucl. Acids. Res.* 2004, 32: e20.
30. T. H. Degefa, J. Kwak, Electrochemical impedance sensing of DNA at PNA self assembled monolayer, *J. Electroanal. Chem.* 2008, 612: 37-41.
31. F. Yan, O. A. Sadik, Enzyme-Modulated Cleavage of dsDNA for Studying Interfacial Biomolecular Interactions, *J. Am. Chem. Soc.* 2001, 123: 11335-11340.
32. C.-Z. Li, Y.-T. Long, H.-B. Kraatz, J. S. Lee, Electrochemical Investigations of M-DNA Self-Assembled Monolayers on Gold Electrodes, *J. Phys. Chem. B.* 2003, 107: 2291-2296.

33. R. P. Janek, W. R. Fawcett, A. Ulman, Impedance Spectroscopy of Self-Assembled Monolayers on Au(111): Sodium Ferrocyanide Charge Transfer at Modified Electrodes, *Langmuir*. 1998, 14: 3011-3018.
34. C.-Z. Li, Y. Liu, J. H. T. Luong, Impedance sensing of DNA binding drugs using gold substrates modified with gold nanoparticles, *Anal. Chem.* 2005, 77: 478-485.
35. Y.-T. Long, C.-Z. Li, T. C. Sutherland, H.-B. Kraaz, J. S. Lee, Electrochemical detection of sing-nucleotide mismatches: application of M-DNA, *Anal. Chem.* 2004, 76: 4059-4065.
36. Yi-Tao Long, Chen-Zhong Li, Heinz-Bernhard Kraaz, and Jeremy S. Lee. (2003) AC impedance spectroscopy of native DNA and M-DNA. *Biophys. J.*, 84, 3218-3225.
37. S. Pan, L. Rothberg, Chemical control of electrode functionalization for detection of DNA hybridization by electrochemical impedance spectroscopy, *Langmuir*. 2005, 21: 1022-1027.
38. J. E. B. Randles, Kinetics of rapid electrode reactions, *Discussions Discuss. Faraday Soc.* 1947, 1: 11-19.
39. T. S. Zatsepin, S. Y. Andreev, T. Hianik, T. S. Oretskaya, Ferrocene-containing nucleic acids. Synthesis and electrochemical properties, *Russian Chemical Reviews*. 2003, 72: 537-554.
40. C. J. Yu, Y. Wan, H. Yowanto, J. Li, C. Tao, M. D. James, C. L. Tan, G. F. Blackburn, T. J. Meade, Electronic Detection of Single-Base Mismatches in DNA with Ferrocene-Modified Probes, *J. Am. Chem. Soc.* 2001, 123: 11155-11161.
41. C. Fan, K. W. Plaxco, A. J. Heeger, Electrochemical interrogation of conformational changes as a reagentless method for the sequence-specific detection of DNA, *PNAS*. 2003, 9134-9137.
42. R. M. Umek, S. W. Lin, J. Vielmetter, R. H. Terbrueggen, B. Irvine, C. J. Yu, J. F. Kayyem, H. Yowanto, G. F. Blackburn, D. H. Farkas, Y.-P. Chen, Electronic Detection of Nucleic Acids: A Versatile Platform for Molecular Diagnostics, *J. Mol. Diagn.* 2001, 3: 74-84.
43. H. Aoki, H. Tao, Label- and marker-free gene detection based on hybridization-induced conformational flexibility changes in a ferrocene-PNA conjugate probe, *Analyst*. 2007, 132: 784-791.
44. A. B. Steel, T. M. Herne, M. J. Tarlov, Electrochemical quantitation of DNA immobilized on gold, *Anal. Chem.* 1997, 70: 4670-4677.
45. S. Moses, S. H. Brewer, L. B. Lowe, S. E. Lappi, L. B. G. Gilvey, M. Sauthier, R. C. Tenent, D. L. Feldheim, S. Franzen, Characterization of single- and double-stranded DNA on gold surfaces, *Langmuir*. 2004, 20: 11134-11140.
46. S. O. Vansteenkiste, M. C. Davies, C. J. Roberts, S. J. B. Tendler, P. M. Williams, Scanning probe microscopy of biomedical interfaces, *Progress in Surface Science*. 1998, 7: 95-136.
47. S. O. Kelley, J. K. Barton, N. M. Jackson, L. D. McPherson, A. B. Potter, E. M. Spain, M. J. Allen, M. G. Hill. Orienting DNA Helices on Gold Using Applied Electric Fields. *Langmuir*. 1998, 14: 6781-6784.
48. S. Danielsen, K. M. Varum, B. T. Stokke. Structural Analysis of Chitosan Mediated DNA

- Condensation by AFM: Influence of Chitosan Molecular Parameters, *Biomacromolecules*. 2004, 5: 928-936.
49. D. Zhou, K. Sinniah, C. Abell, T. Rayment, Use of atomic force microscopy for making addresses in DNA coatings, *Langmuir*. 2002, 18: 8278-8281.
50. D. Ertz, B. Polyakov, H. Olin, E. Tuite, Spatial and Mechanical Properties of Dilute DNA Monolayers on Gold Imaged by AFM, *J. Phys. Chem. B*. 2003, 107: 3591-3597.
51. R. Möller, A. Csáki, J. M. Köhler, W. Fritzsche, Signal amplification through nucleotide extension and excision on a dendritic DNA platform, *Nucleic Acids Research*, 2000, 28: e91.

第七章 结束语

自从1991年PNA被发现以来, 由于PNA优越的杂交性质, 引起了科学家们的广泛注意, 经过十多年的研究PNA已经被广泛应用于分子生物学和医学领域。但是PNA本身仍有一些缺点, 为了克服PNA本身具有的缺点, 因此, 一些现在新的PNA修饰物仍然不断出现, 使PNA的应用范围不断拓宽。

7.1 主要研究内容和结论

1. 对已有合成 PNA 单体的经典步骤的修改, 我们合成了 PNA 四种天然核碱基的单体, 并通过固相合成的方法合成了 PNA 寡聚体, 用 HPLC 成功分离了 PNA 粗产品, 并用质谱进行了表征。
2. 通过外界刺激来调节生物反应, 一直是一个研究热点, 我们首次成功的合成了具有偶氮官能团的 PNA 单体。通过研究它们在光照下的紫外可见光谱的变化, 可以发现他们具有可逆的光致异构特性。
3. 我们通过修改 PNA 固相合成步骤, 成功地把偶氮类 PNA 单体插入到 PNA 序列中。并且研究了 N-PNA 单链和 N-PNA/DNA 双链中偶氮苯基团的顺反异构性质; 通过它们的紫外可见光谱在光照下的变化, 以及光致异构速率常数, 我们可以从一个侧面看到 N-PNA 有可能实现通过光照来调节 PNA 与 DNA 的杂交。至于这一点同样我们可以通过 AFM 来研究 N-PNA 与金标记的 DNA 在硅表面的杂交来验证, 可以从表面金颗粒密度上观察到顺反异构对 PNA 与 DNA 杂交的调节。
4. 电化学是检测 DNA 的一种较为方便和快捷的好方法, 然而通过二茂铁标记 PNA 来检测 DNA 还少见报道。我们通过标准的 PNA 固相合成方法, 成功的合成了二茂铁标记的 PNA, 并且通过电化学的方法成功的检测了与 DNA 的杂交, 这就使二茂铁标记的 PNA 可用于电化学 DNA 生物传感器中。

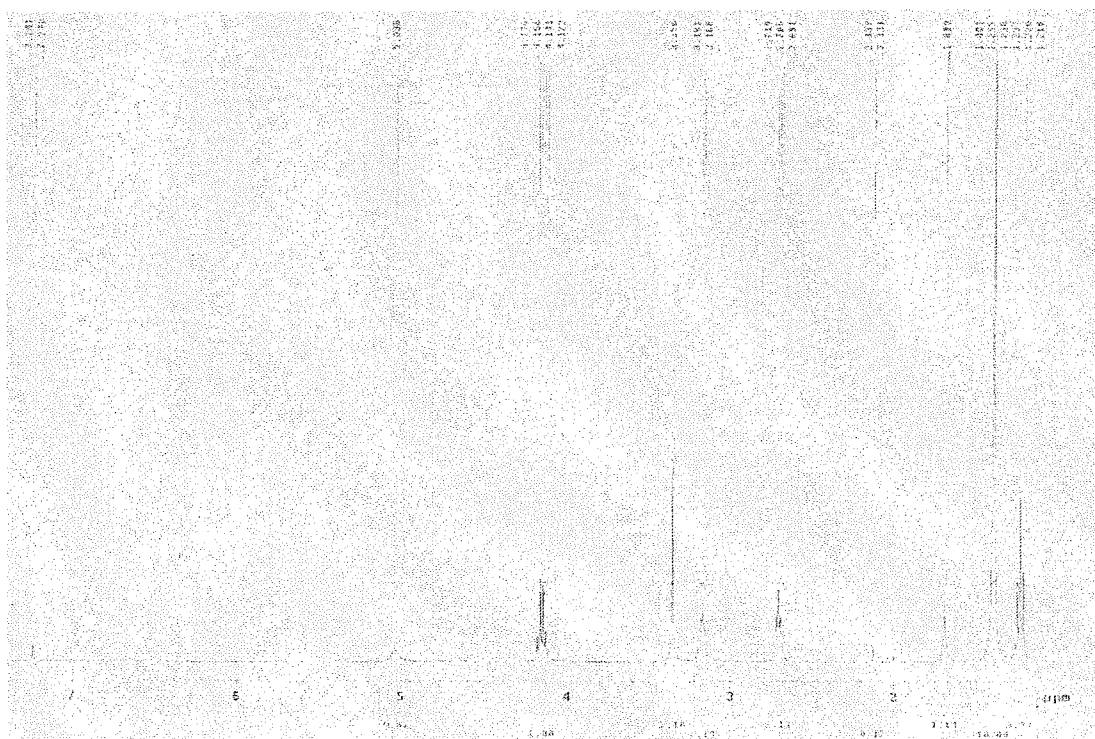
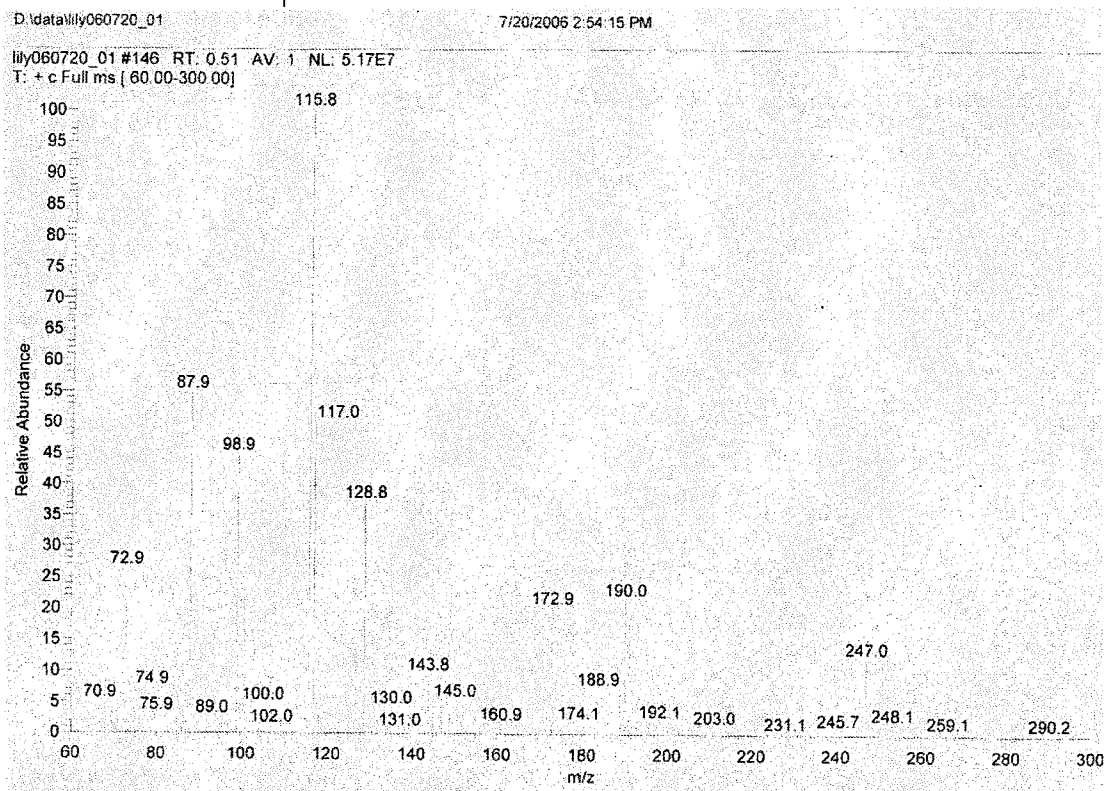
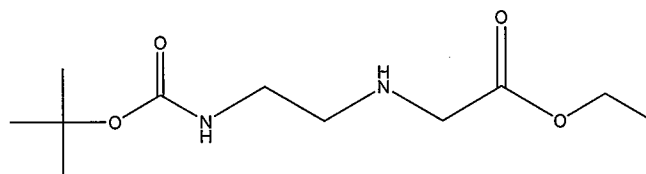
7.2 存在的问题和今后的研究设想

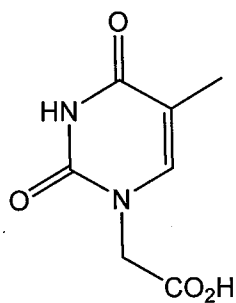
我们虽然工作取得了一定进展,但在实验过程中仍然存在一定的问题。在本论文中,合成的 PNA 的纯度还不是很高;通过 N-PNA 调节来 PNA/DNA 的双螺旋活性,还需要充分研究,由于偶氮类 PNA 单体的构象有一定的柔韧性,有可能使其调节作用受到影响;电化学方法研究电子在 PNA/DNA 双螺旋中的传输还不清楚;再就是大量工作仅仅刚起步,工作仍需要完善和继续。

因此,建立在本文所研究的进展基础上,综合上面的考虑,我们下一步的工作计划有以下几方面:

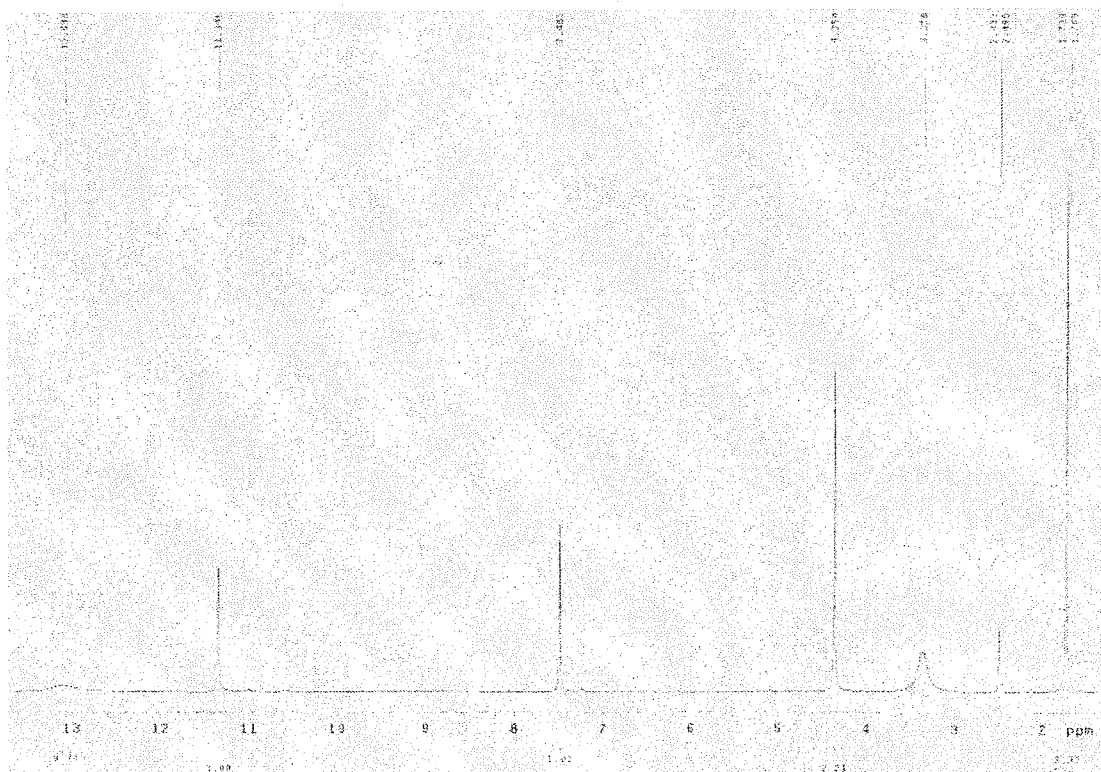
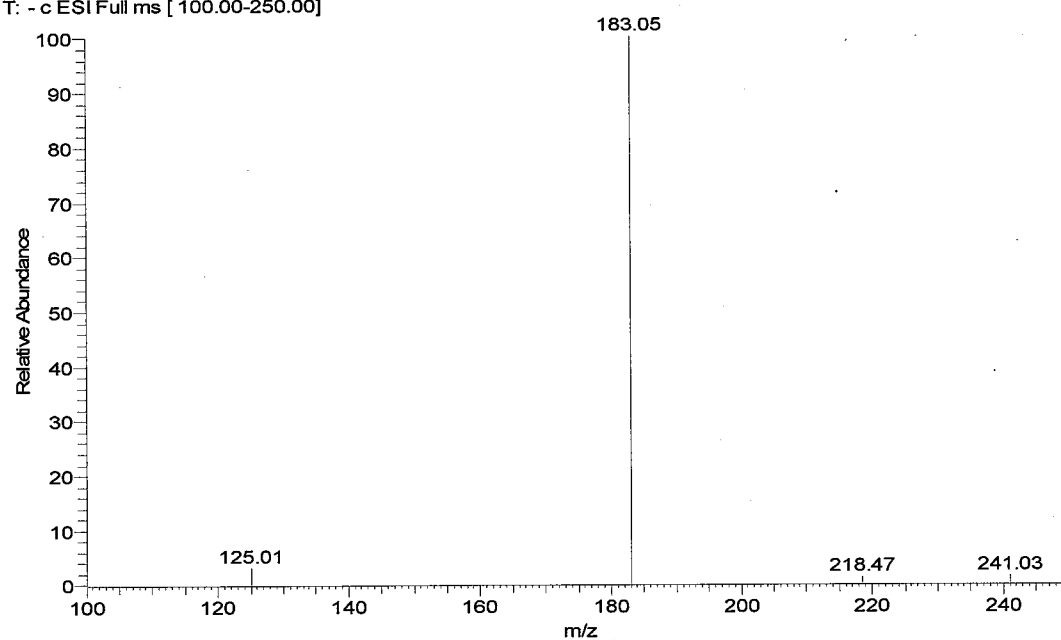
1. 继续优化 PNA 固相合成步骤,提高 PNA 合成的纯度,减少 HPLC 分离工作的压力。
2. 继续合成构象固定的偶氮类 PNA 单体,并插入到 PNA 寡聚体中。
3. 通过热力学的方法,例如 DSC 方法研究 N-PNA 与 DNA 的杂交,直接得出偶氮基团对杂交调节的热力学数据。
4. 通过茂铁标记的 N-PNA 来研究电子在双螺旋中的传输,以期望通过 N-PNA 来调节电子在生物体系中的传输。

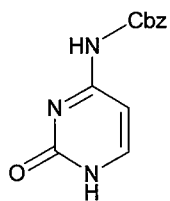
附录



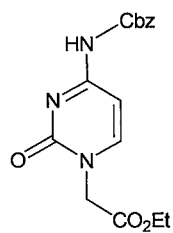
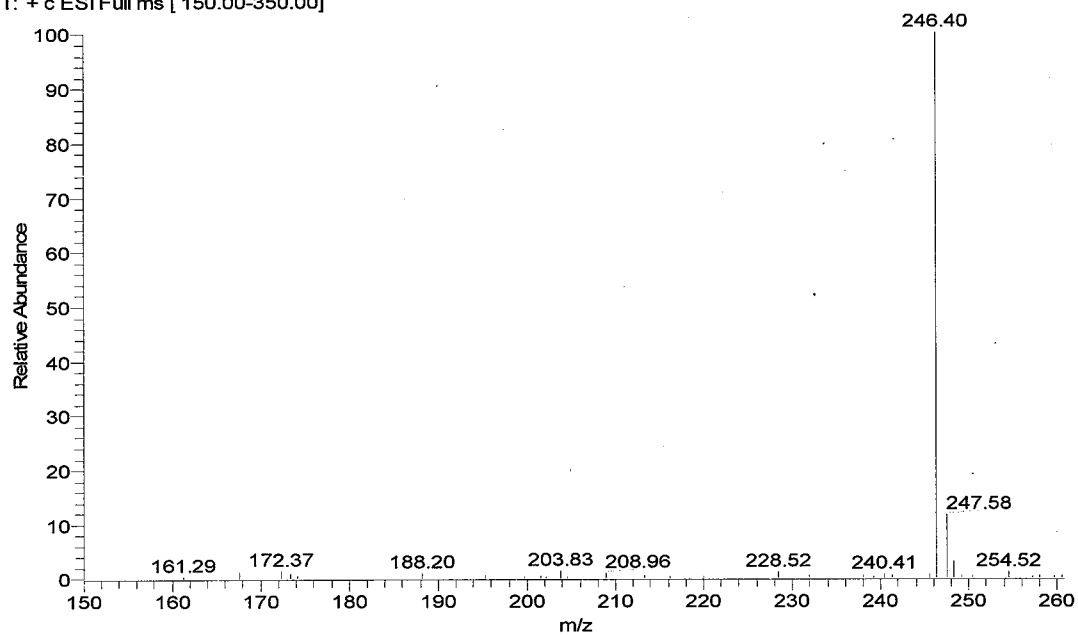


TCH2COOH #58-115 RT: 0.48-0.94 AV: 58 NL: 5.61E3
T: - c ESI Full ms [100.00-250.00]

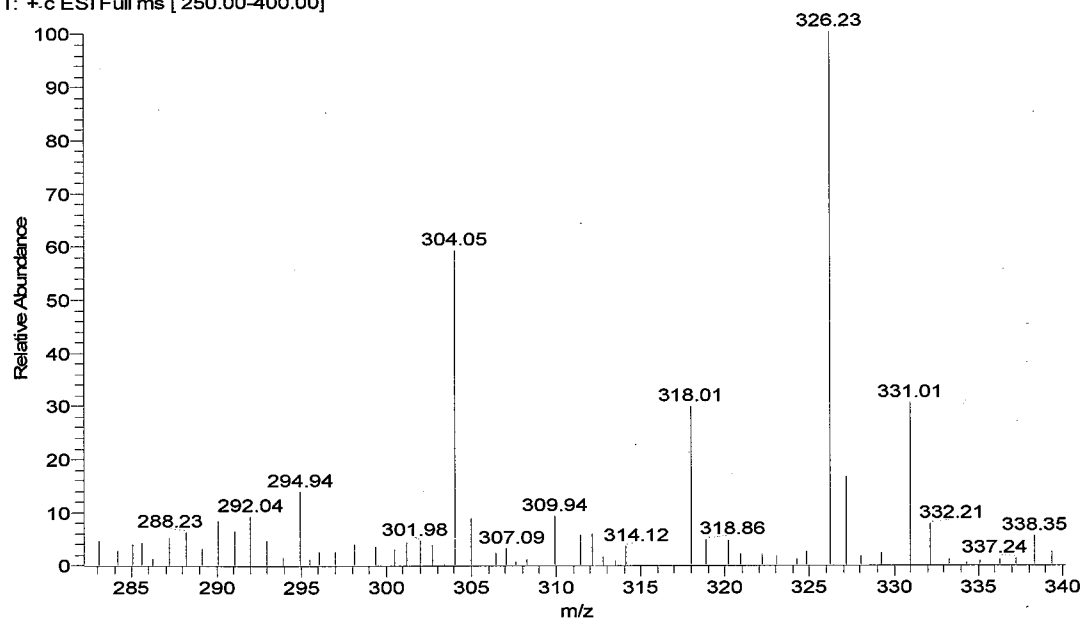


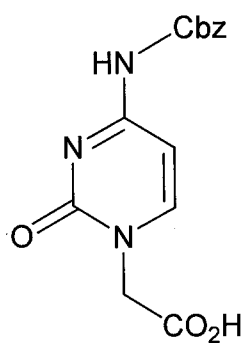


C(Z) #31 RT: 0.27 AV: 1 NL: 1.07E6
T: +c ESI Full ms [150.00-350.00]

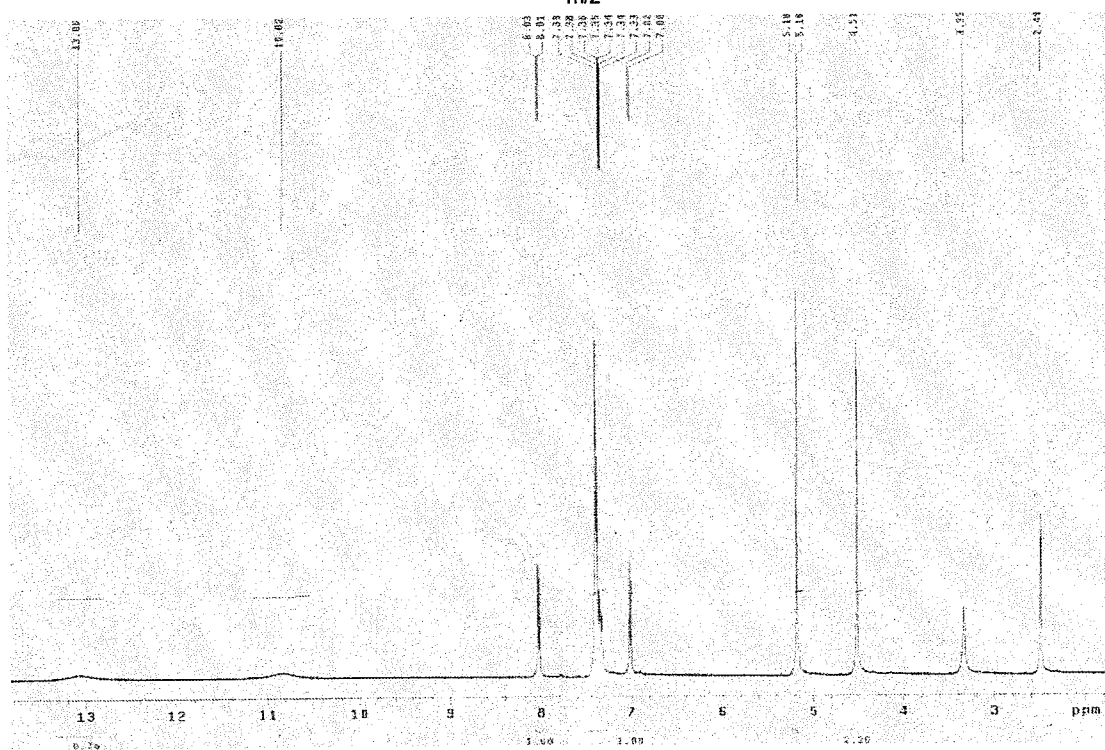
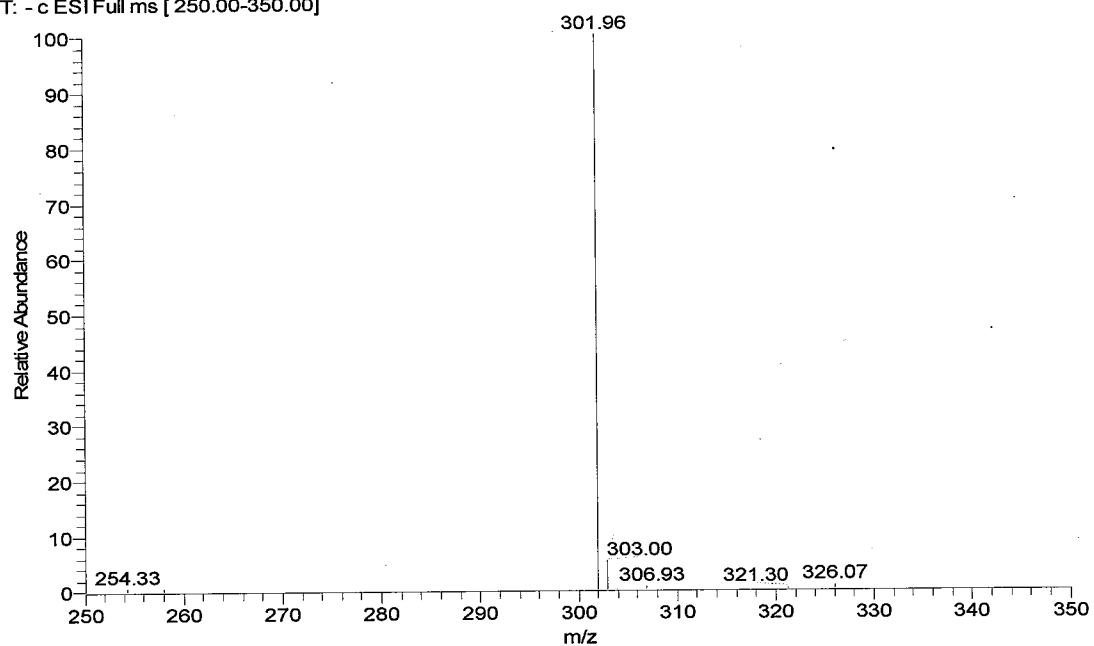


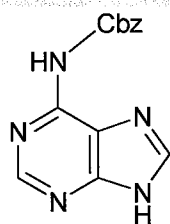
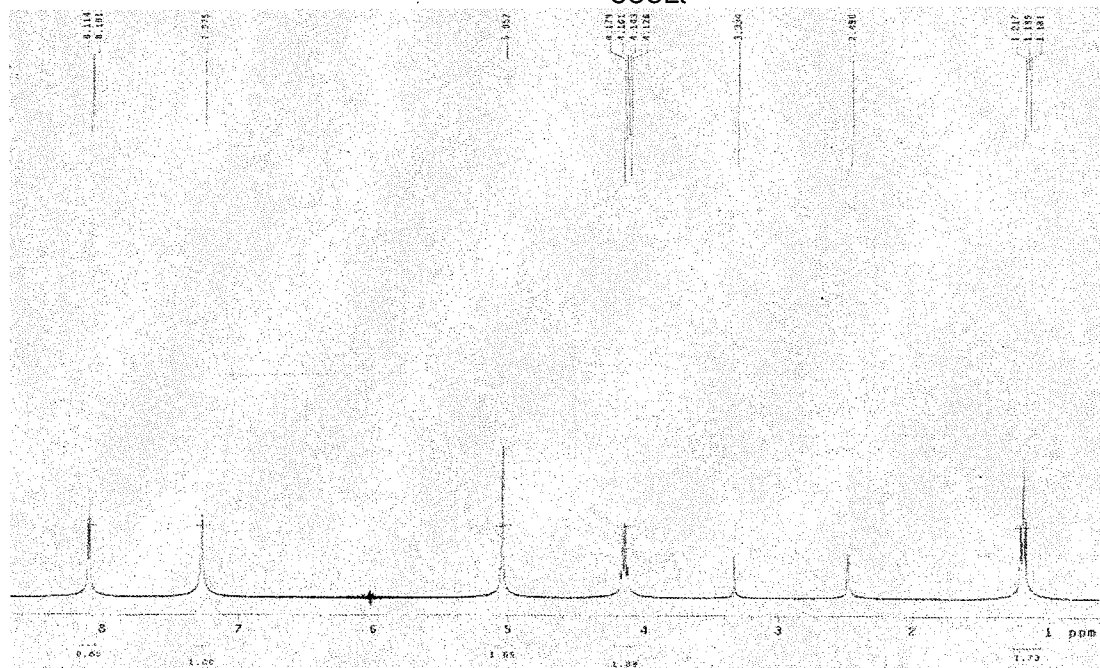
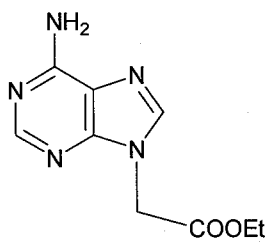
C(Z)OEt #61-90 RT: 0.48-0.71 AV: 30 NL: 1.76E4
T: +c ESI Full ms [250.00-400.00]



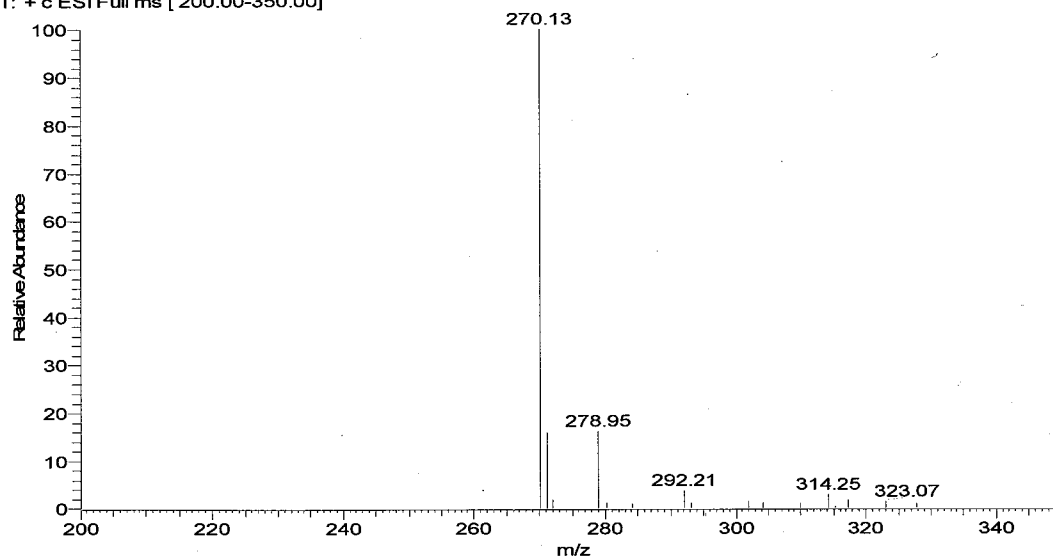


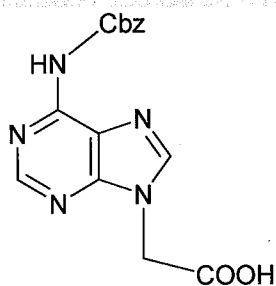
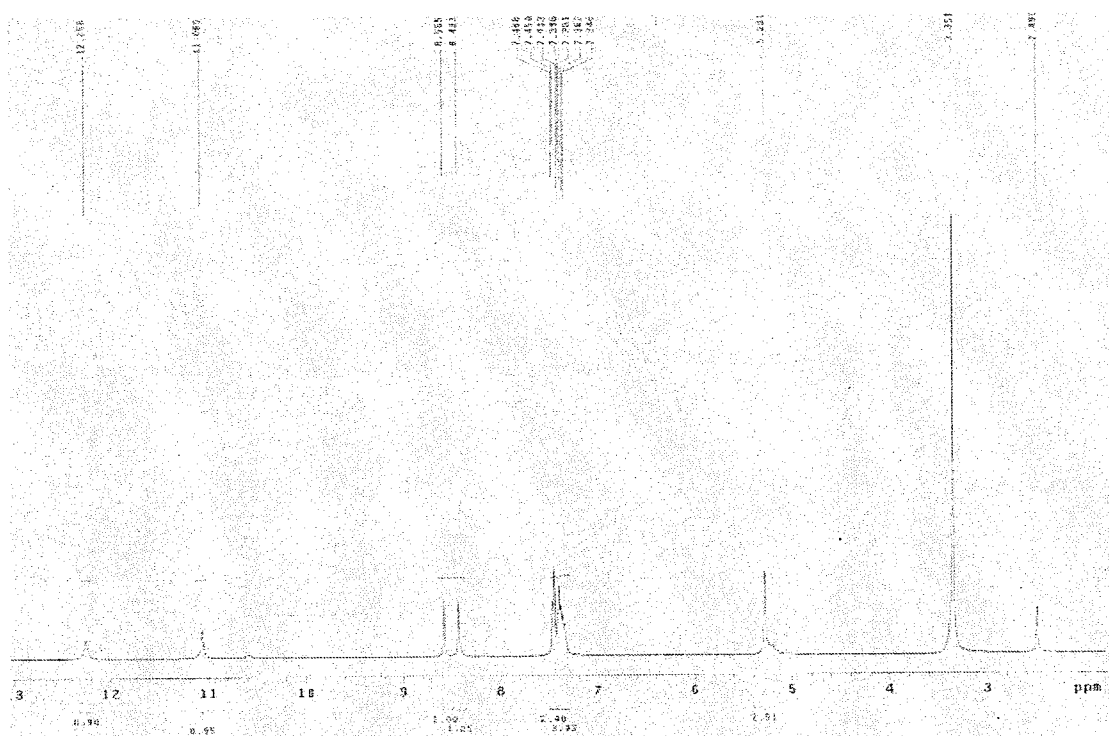
C(Z)CH₂COOH #9-129 RT: 0.09-0.98 AV: 121 NL: 9.71E3
T: -c ESI Full ms [250.00-350.00]



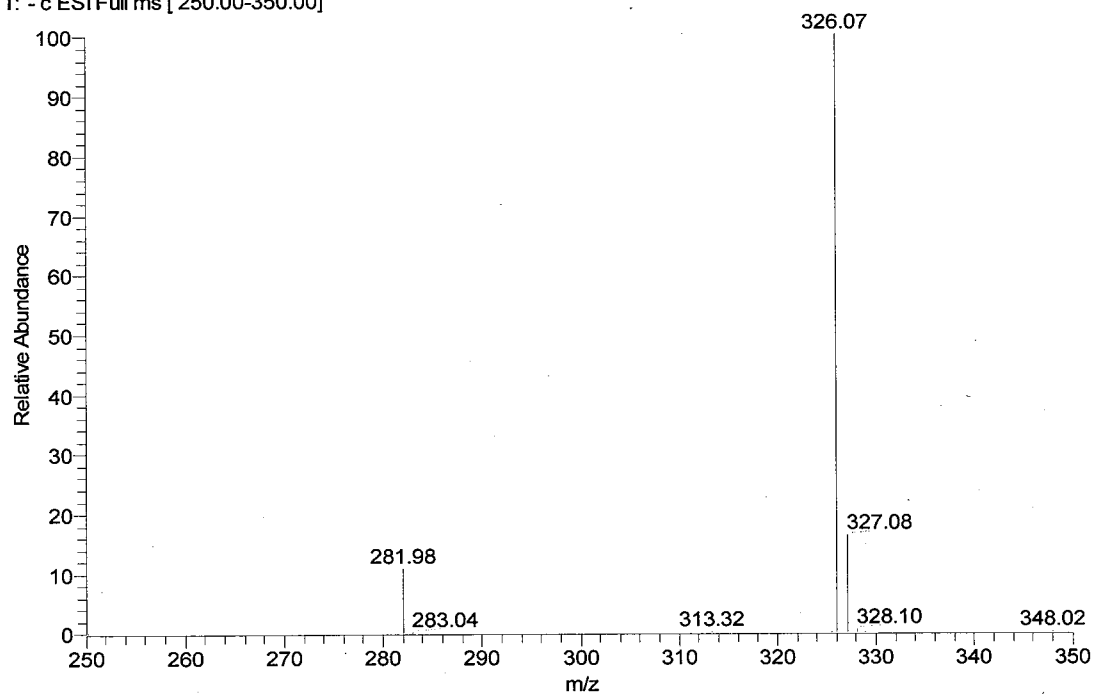


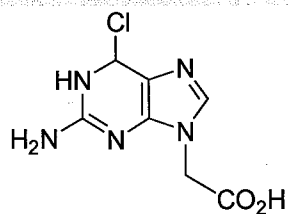
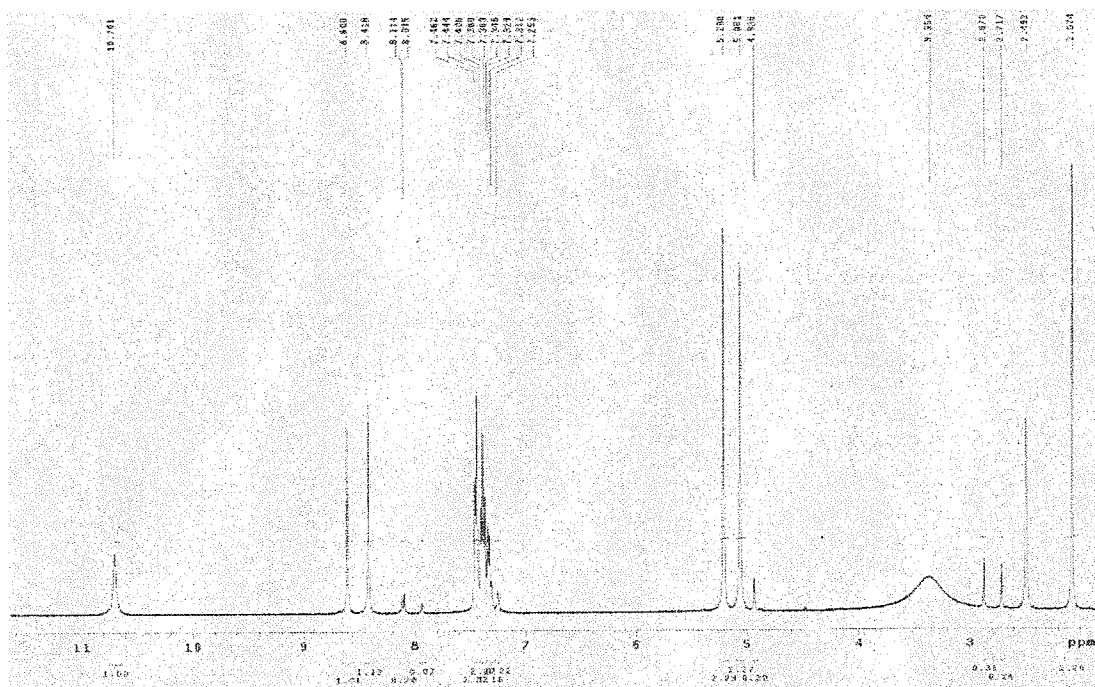
A(Z) #86 RT: 0.68 AV: 1 NL: 4.60E5
T: + c ESI Full ms [200.00-350.00]



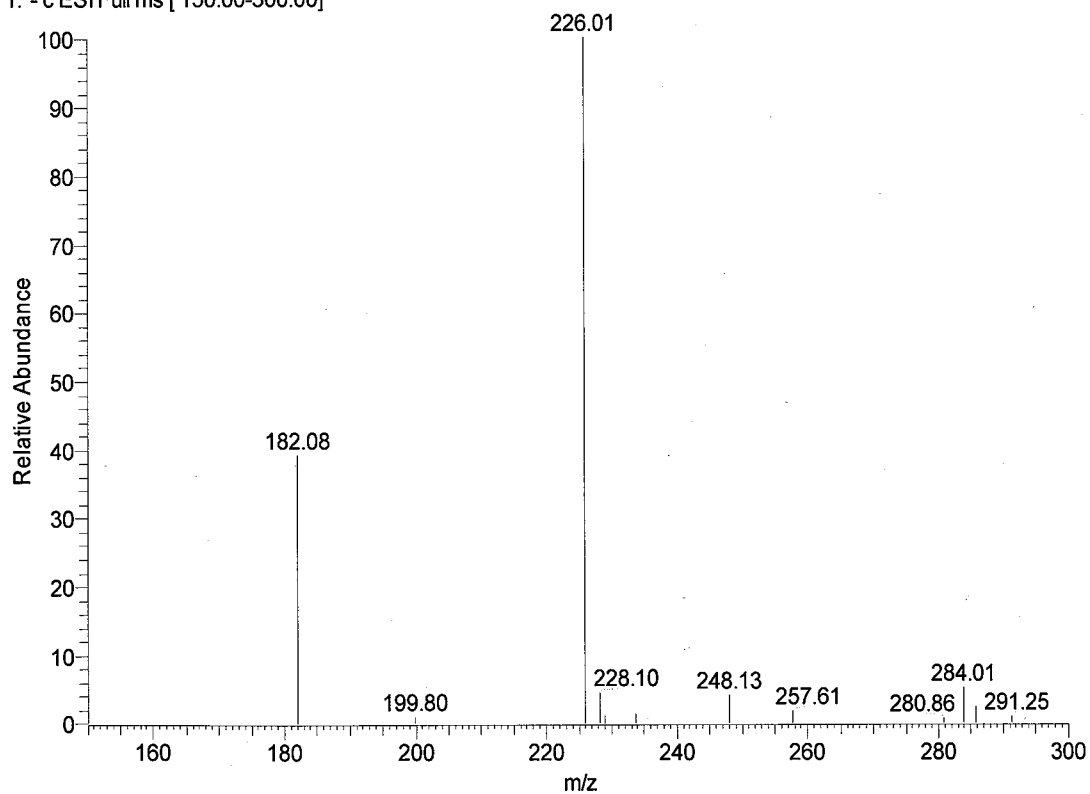


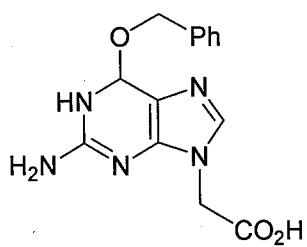
A(Z)CH₂COOH #52-131 RT: 0.41-1.00 AV: 80 NL: 5.17E5
T: - c ESI Full ms [250.00-350.00]



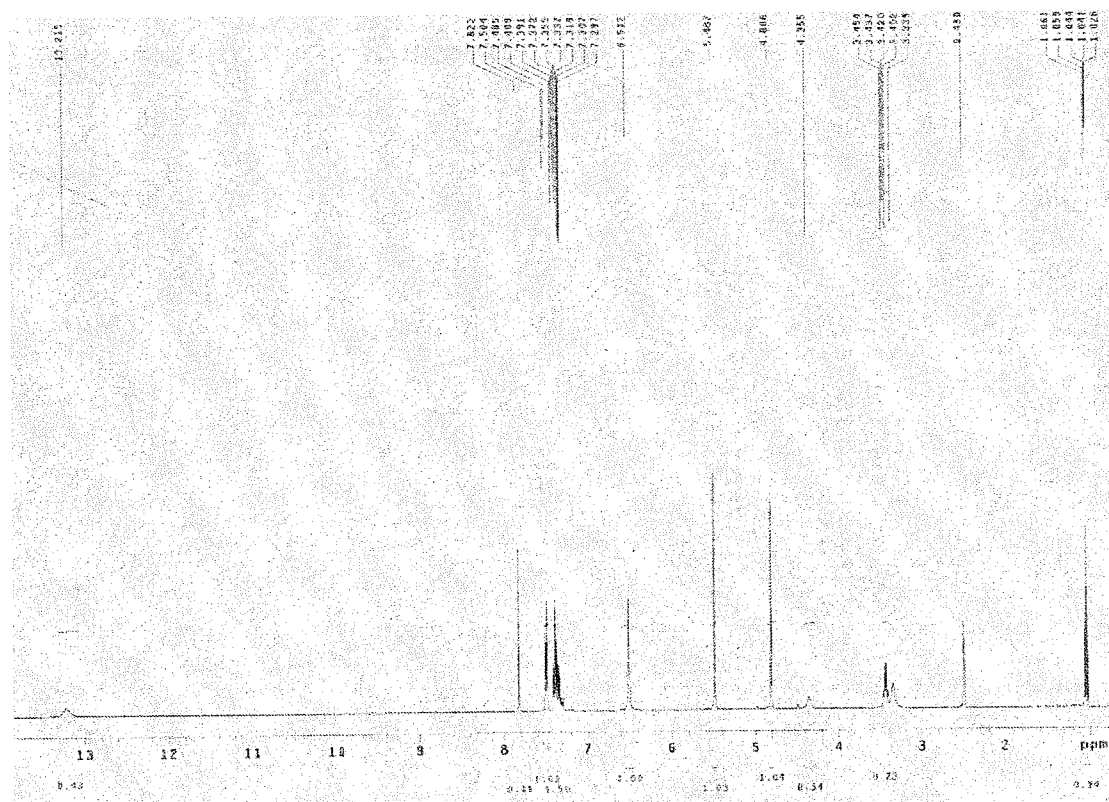
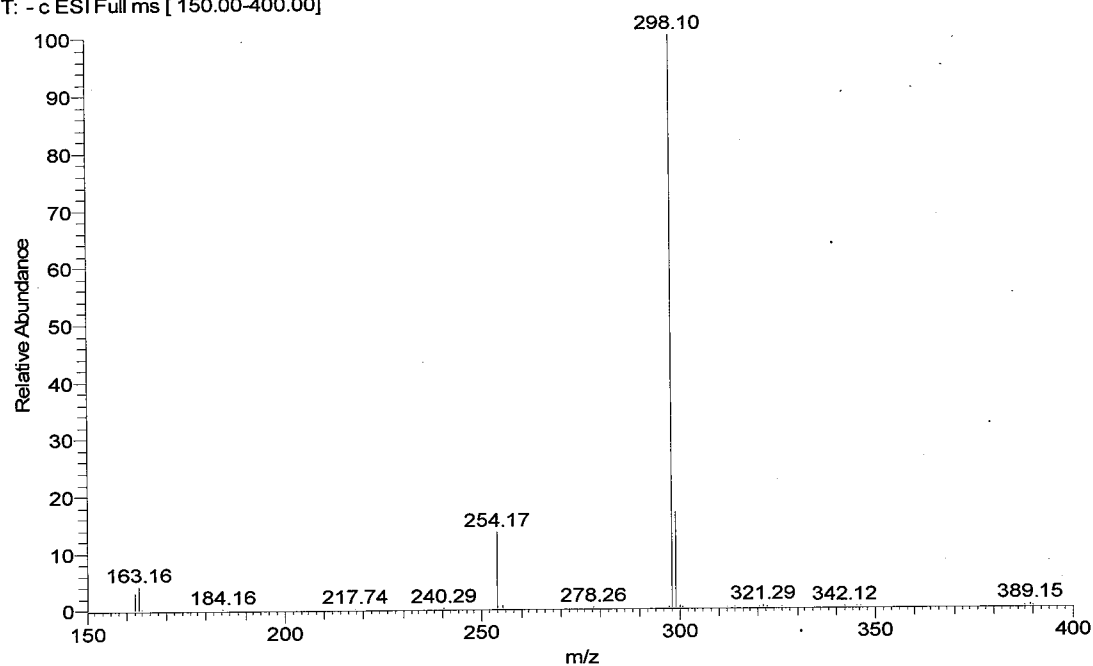


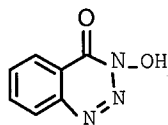
GCH2COOH #30-120 RT: 0.26-0.98 AV: 91 NL: 5.38E3
T: -c ESIFull ms [150.00-300.00]



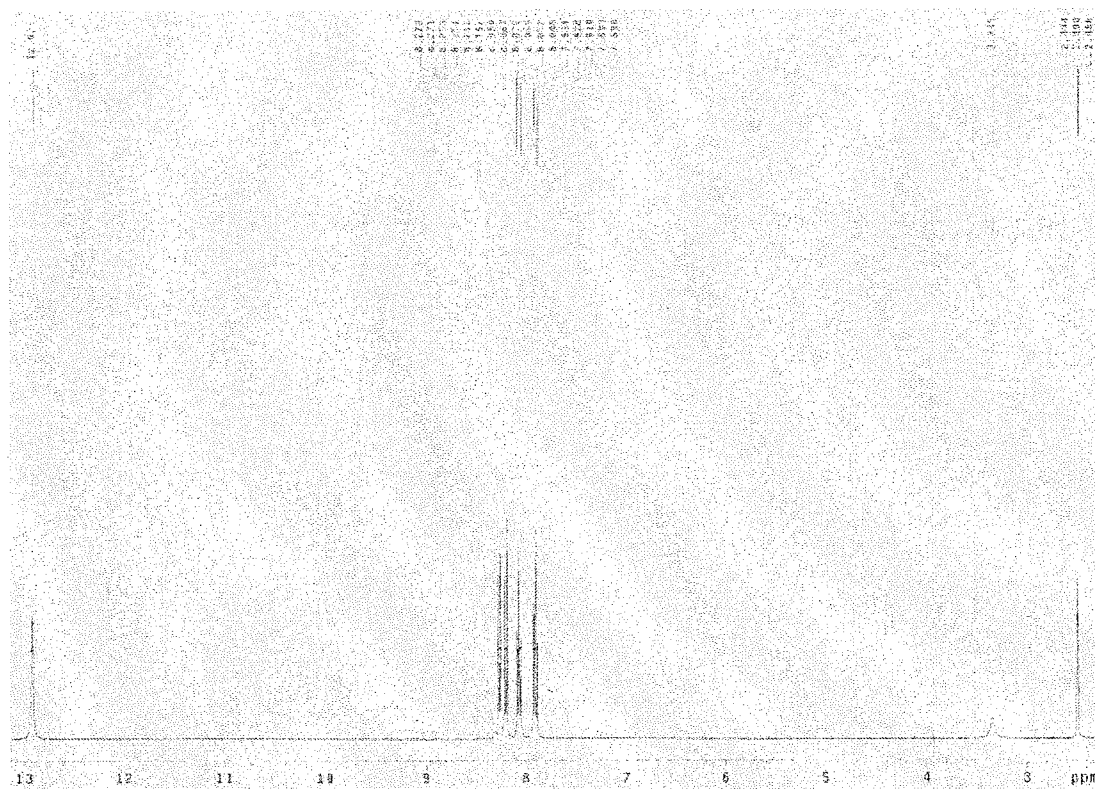
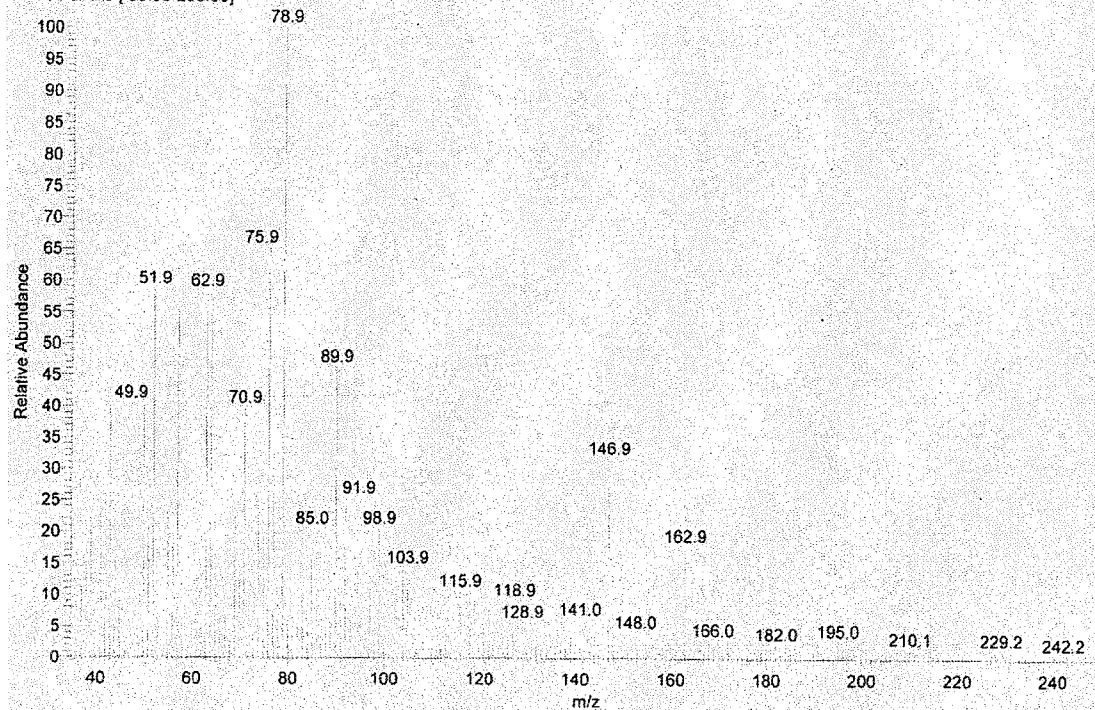


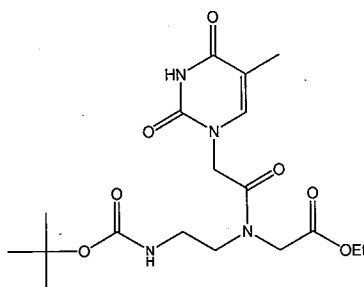
P-GCH₂COOH #48-107 RT: 0.45-1.00 AV: 60 NL: 1.20E6
T: -c ESI Full ms [150.00-400.00]



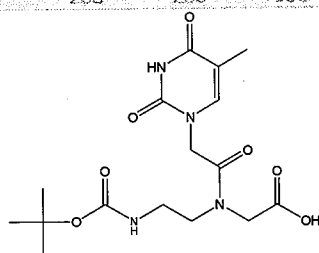
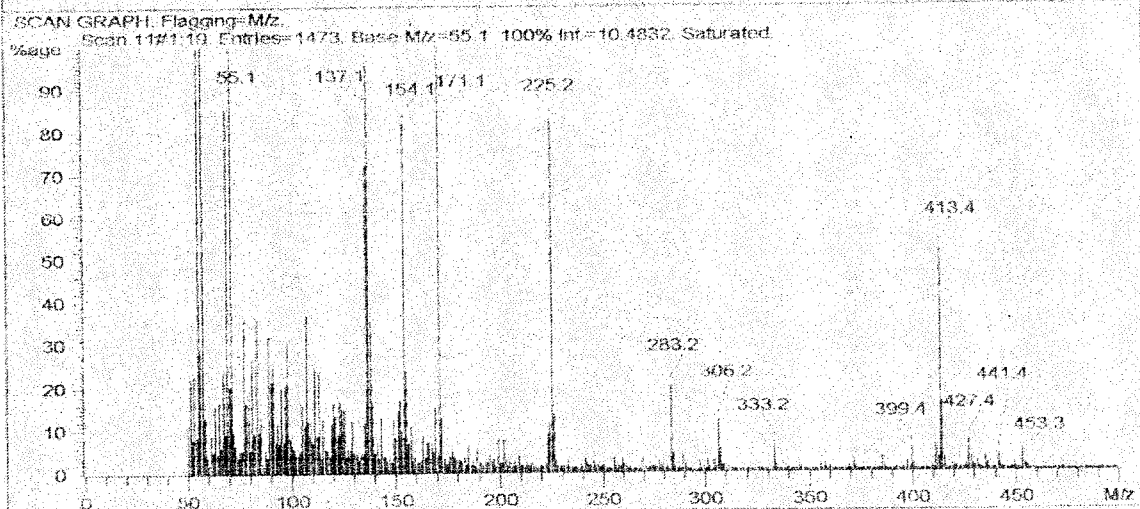


ility060720_03 #228 RT: 0.80 AV: 1 NL: 2.30E6
T: + c Full ms [30.00-250.00]

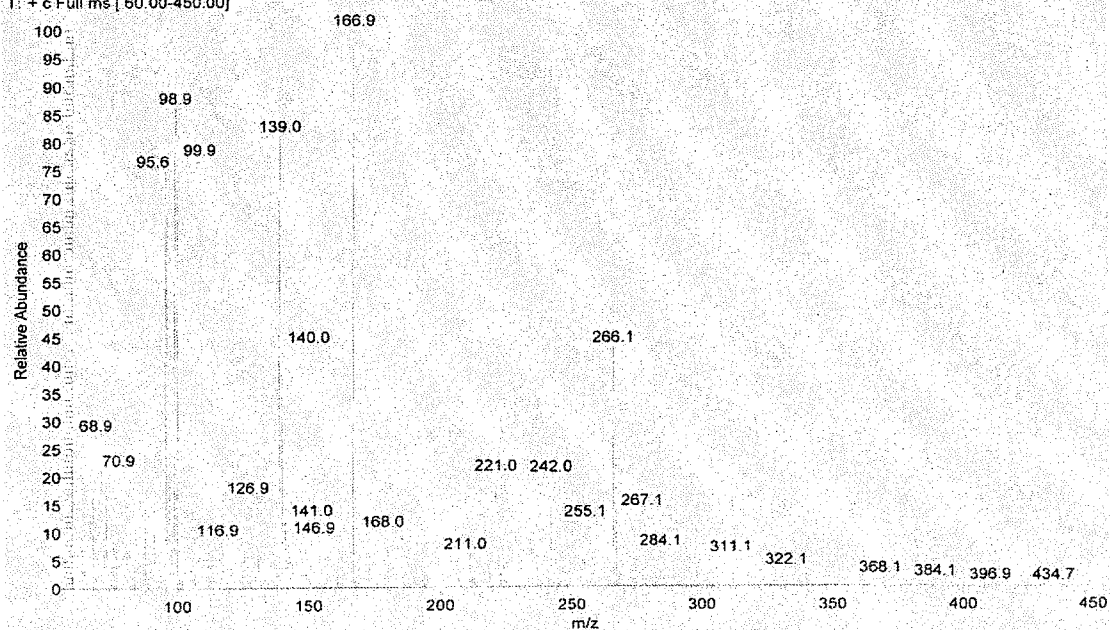




File Name C:\MASPEC\Data\mag-80-05-0kv-FAB-03-25-3nba-M412.ms2
Creation Date/Time 03-3-25 at 15:18:35
File Type Lo-Res Data - Ctd (Magnet)
File Source Acquired on MASPEC II system [1132/9951]
File Title 3NBA 77,136,154,279,289,307



lily060720_04 #465 RT: 1.75 AV: 1 NL: 1.85E6
T: + e Full ms [60.00-450.00]

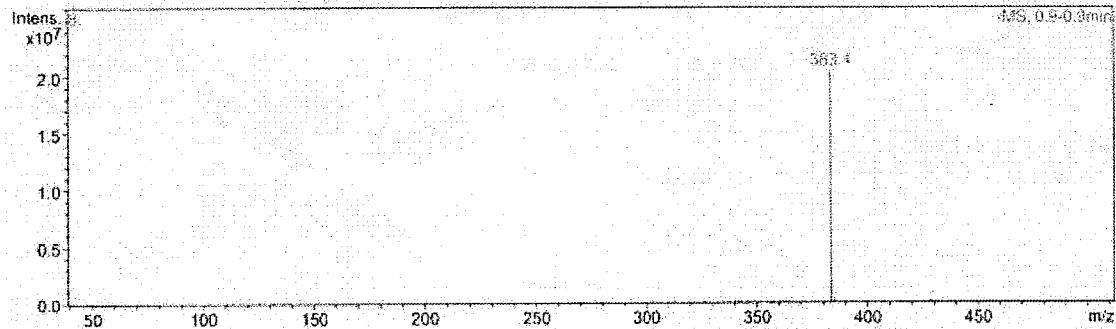
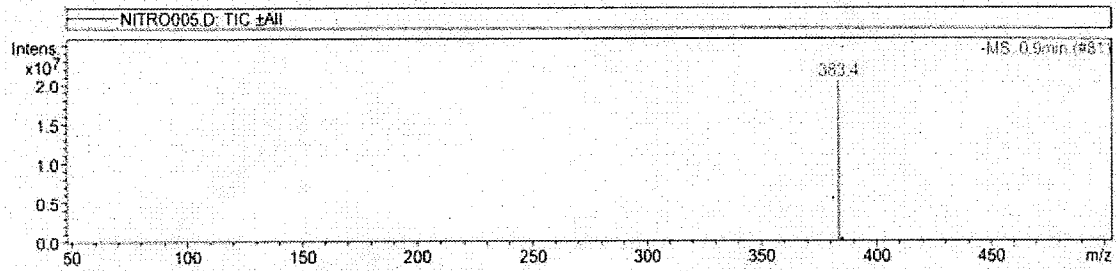
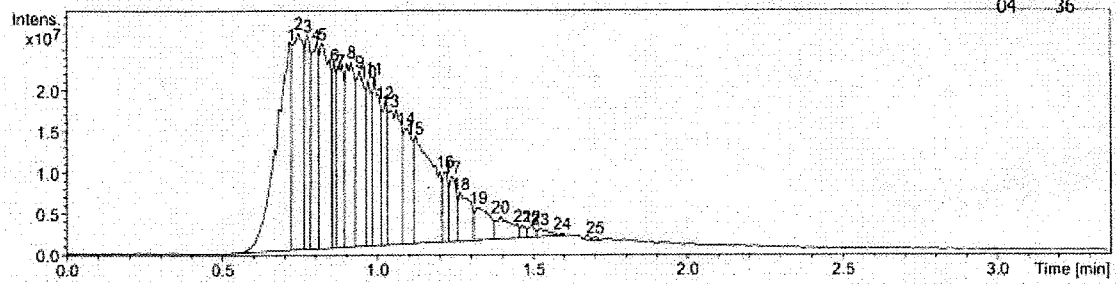
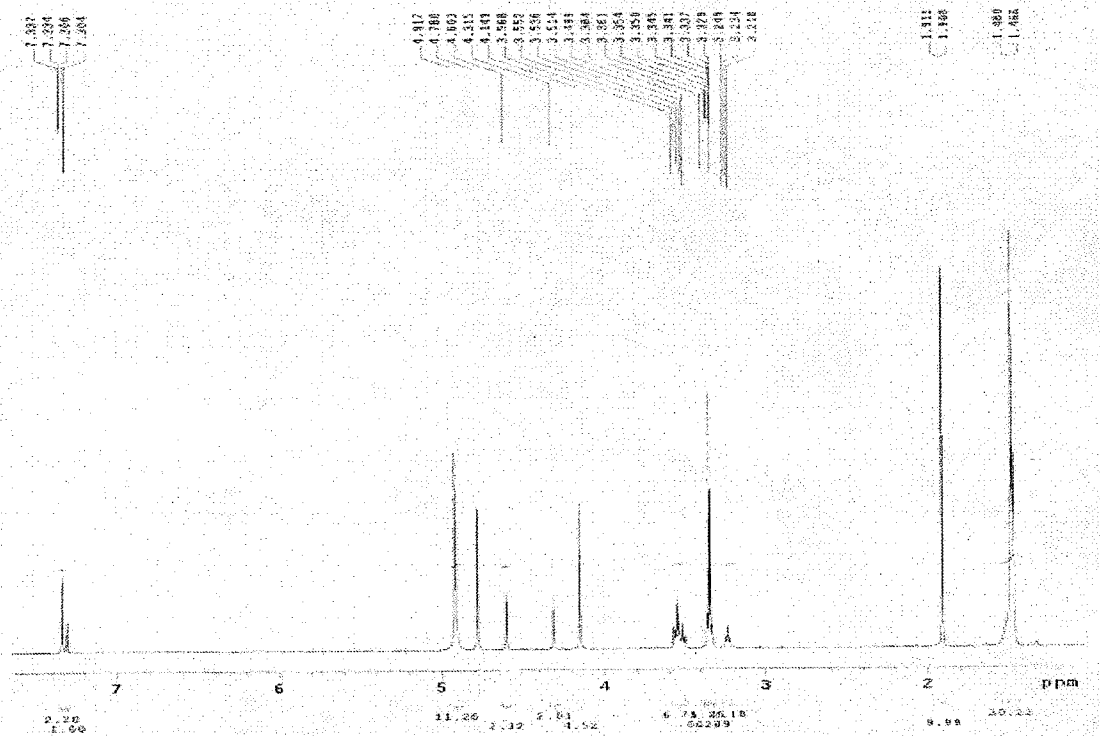


Operator Administrator

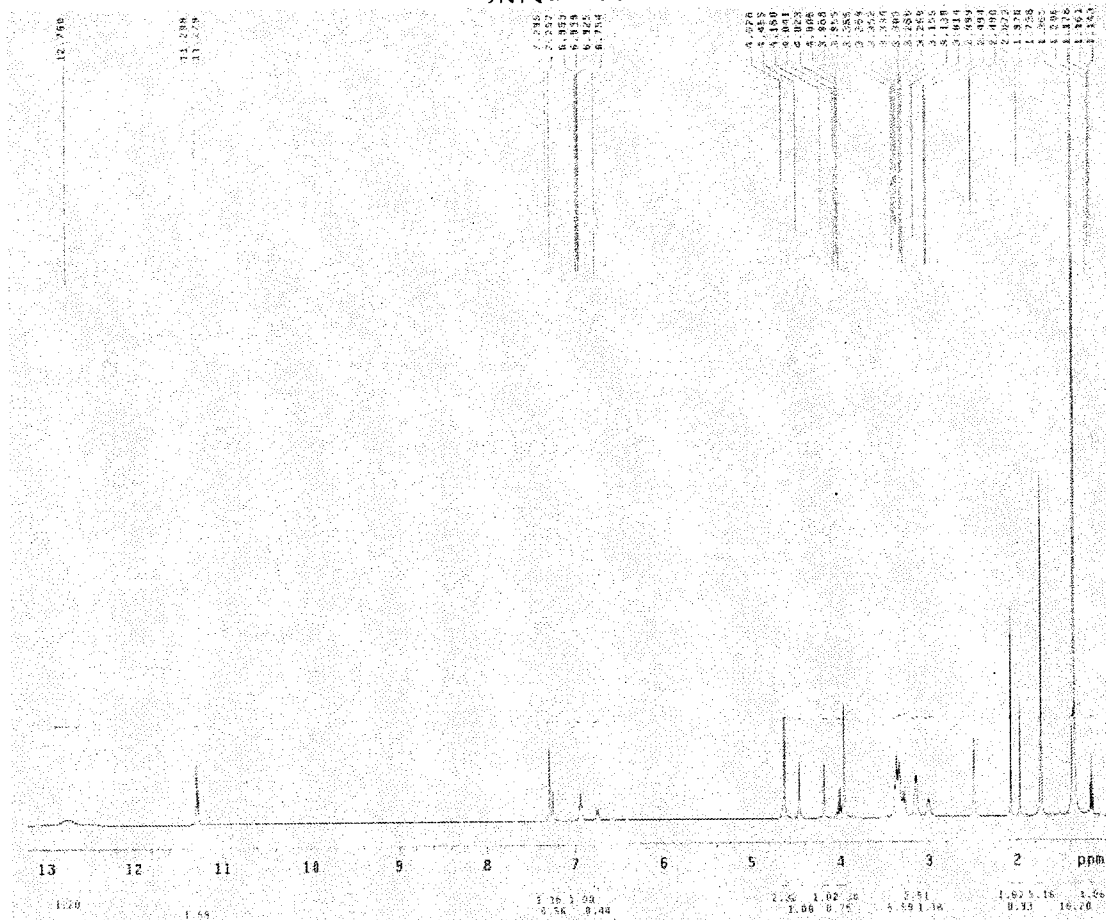
Instrument LC-MSD-Trap-VL

Print Date 12/06/16:05:

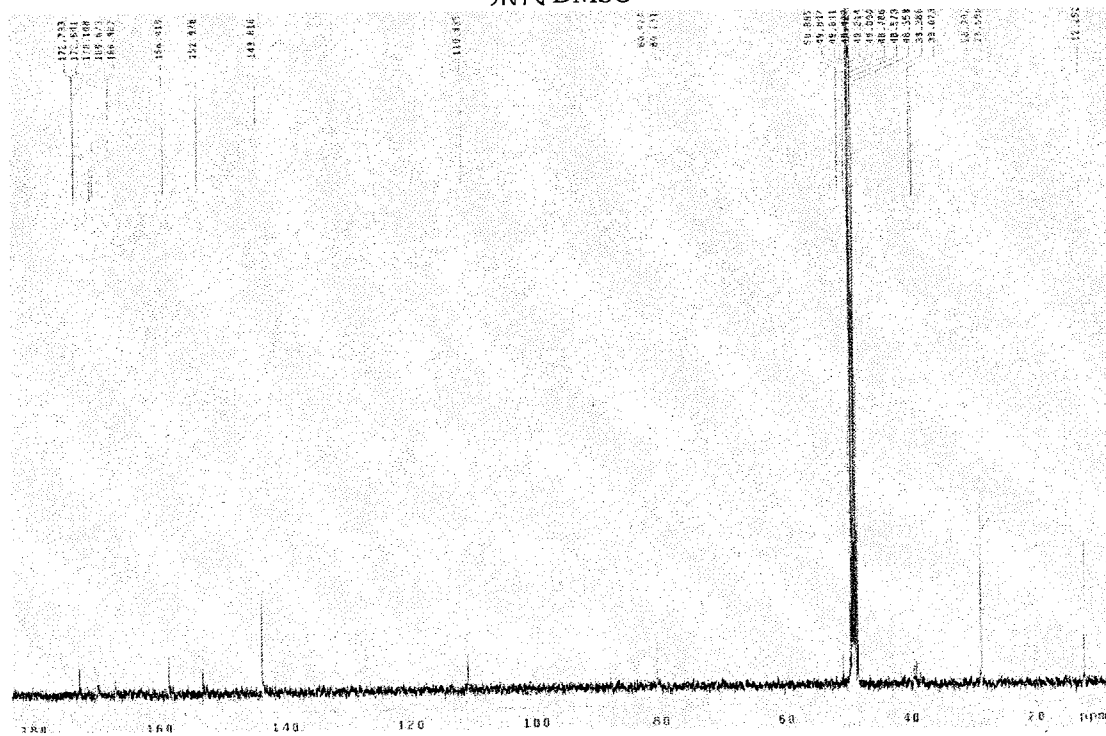
04 36

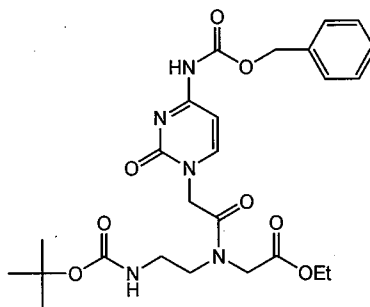
 CD_3OD 

氘代 DMSO

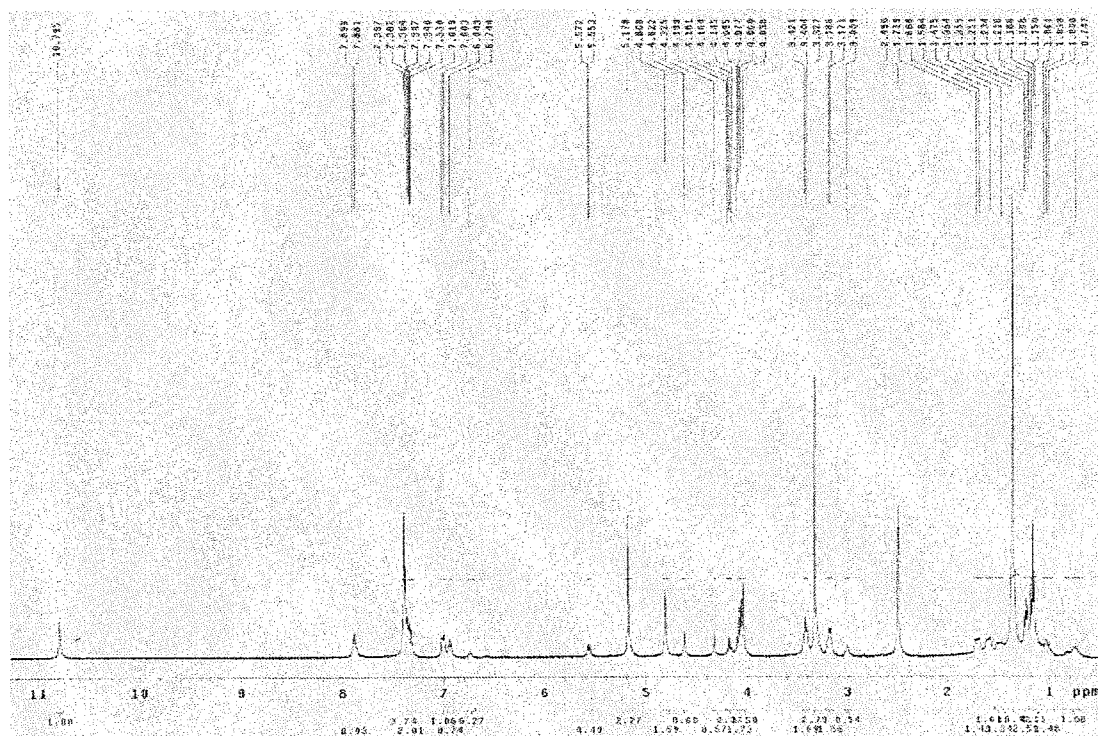
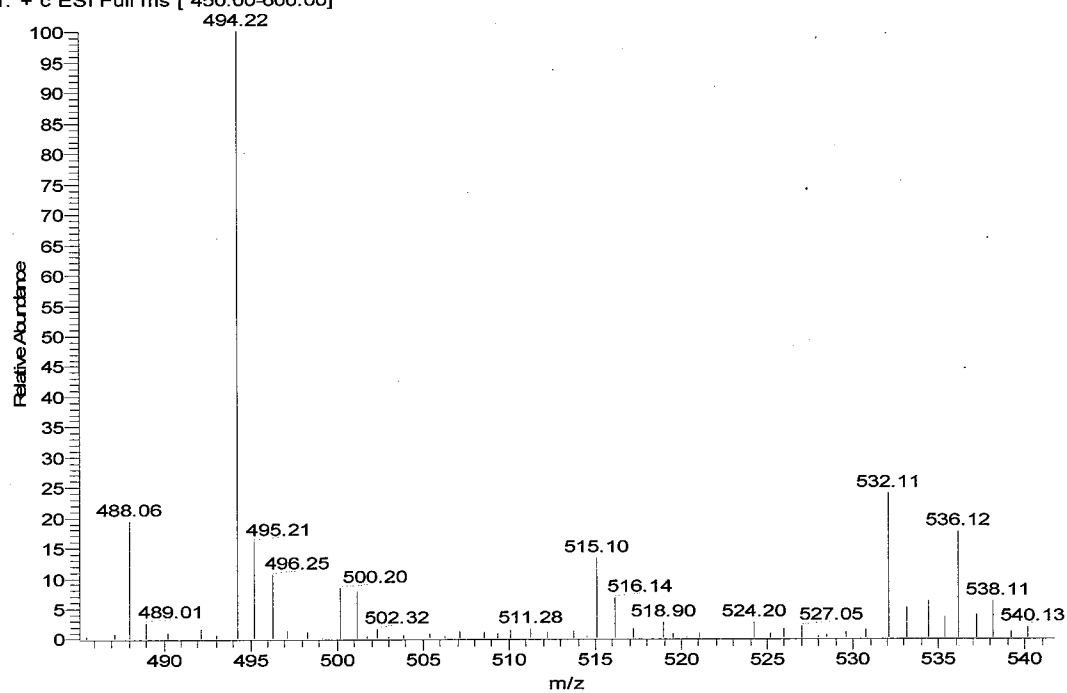


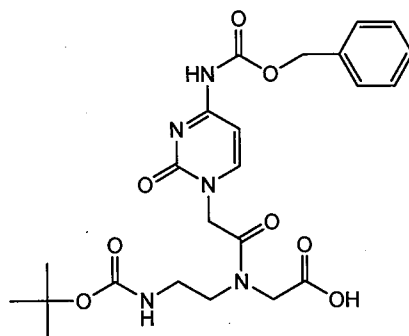
氘代 DMSO



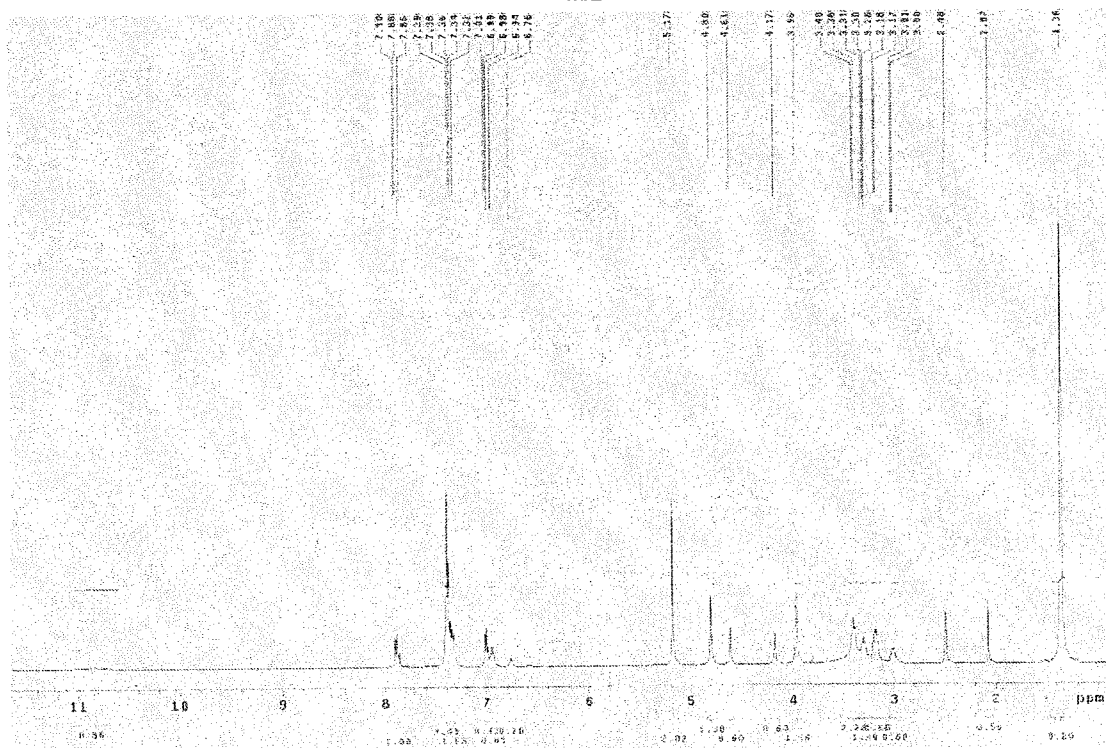
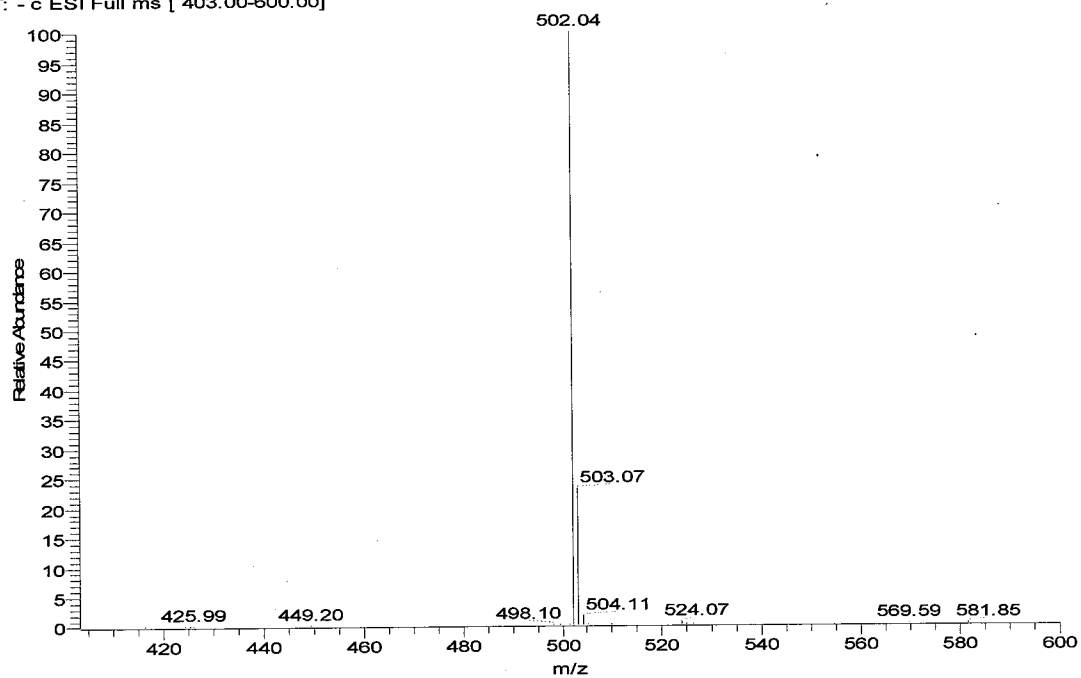


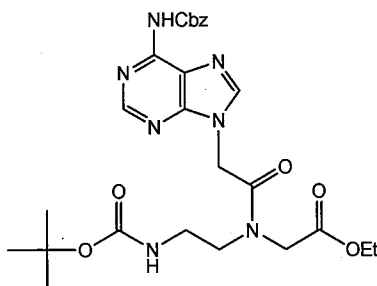
BC(Z)OEt #85-127 RT: 0.66-0.99 AV: 43 NL: 3.96E4
T: + c ESI Full ms [450.00-600.00]



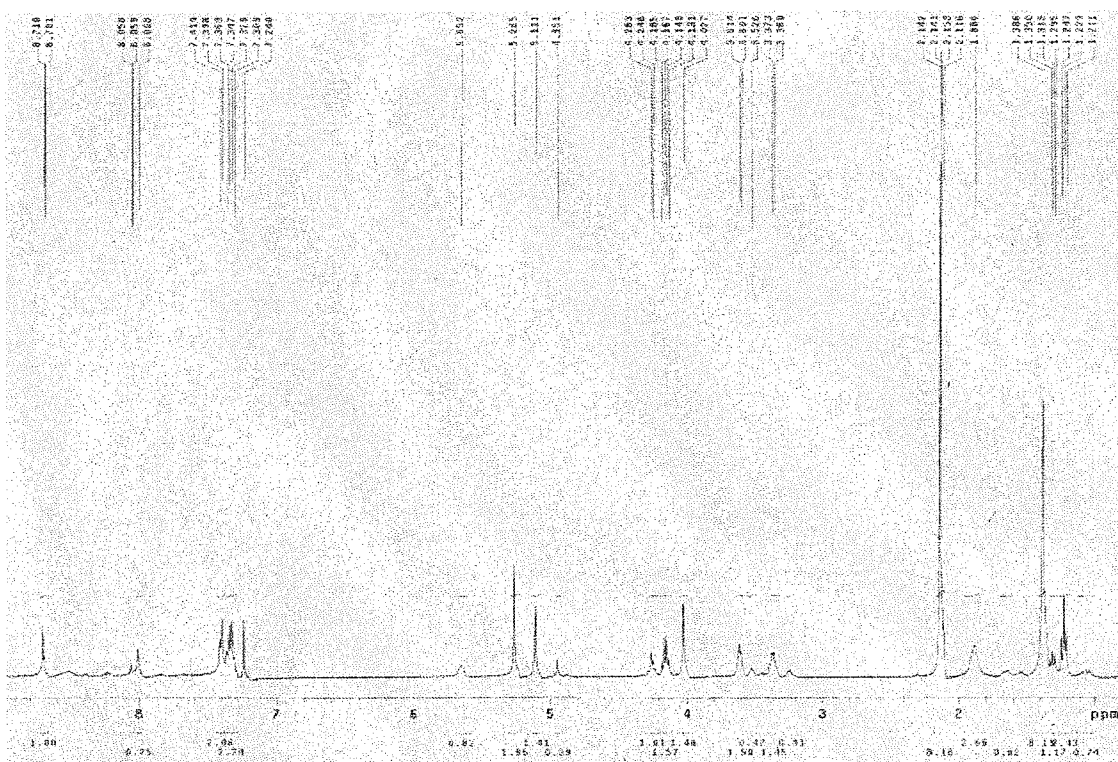
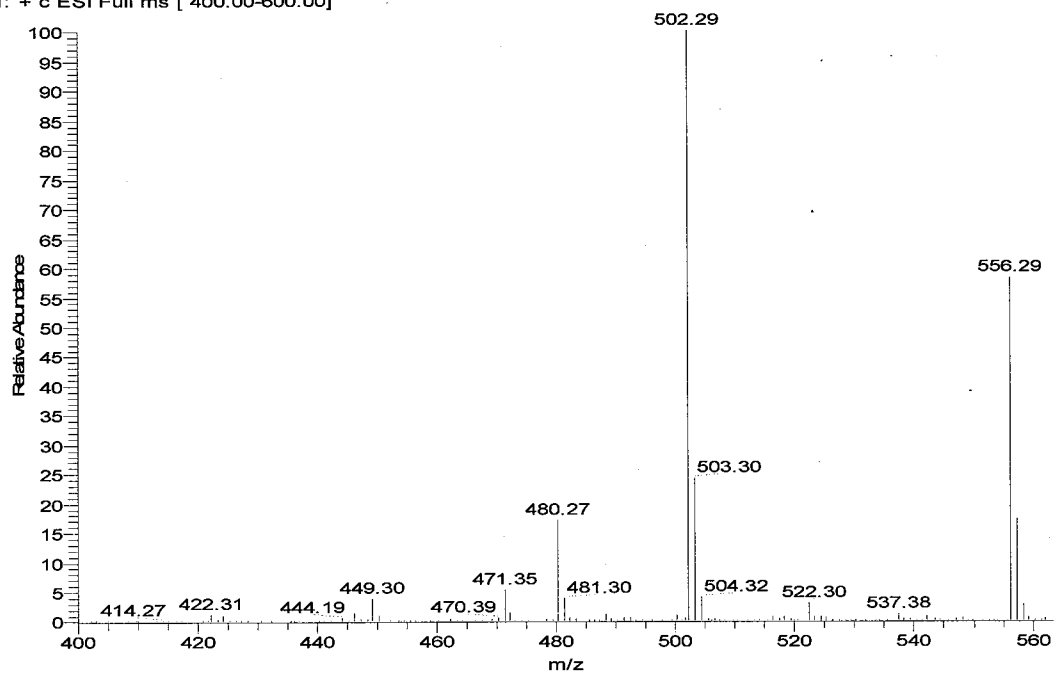


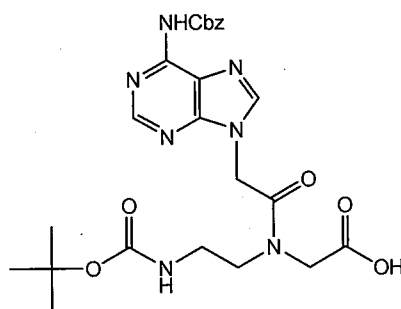
BC(Z)H #63-117 RT: 0.53-0.98 AV: 55 NL: 3.52E5
T: - c ESI Full ms [403.00-600.00]



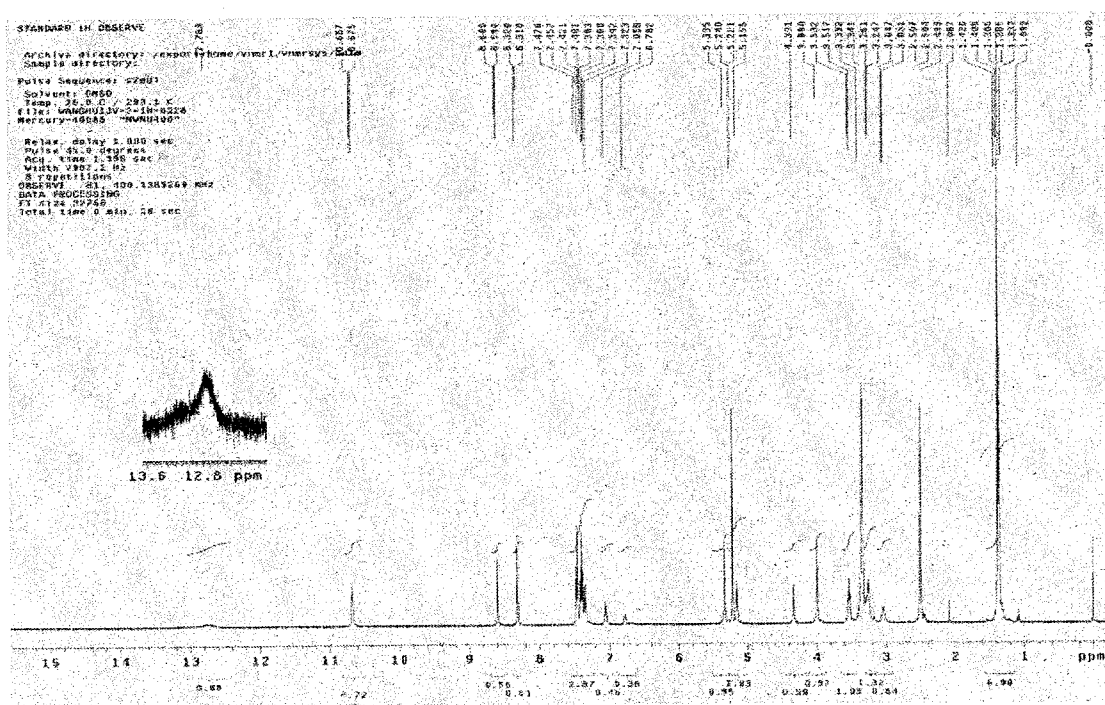
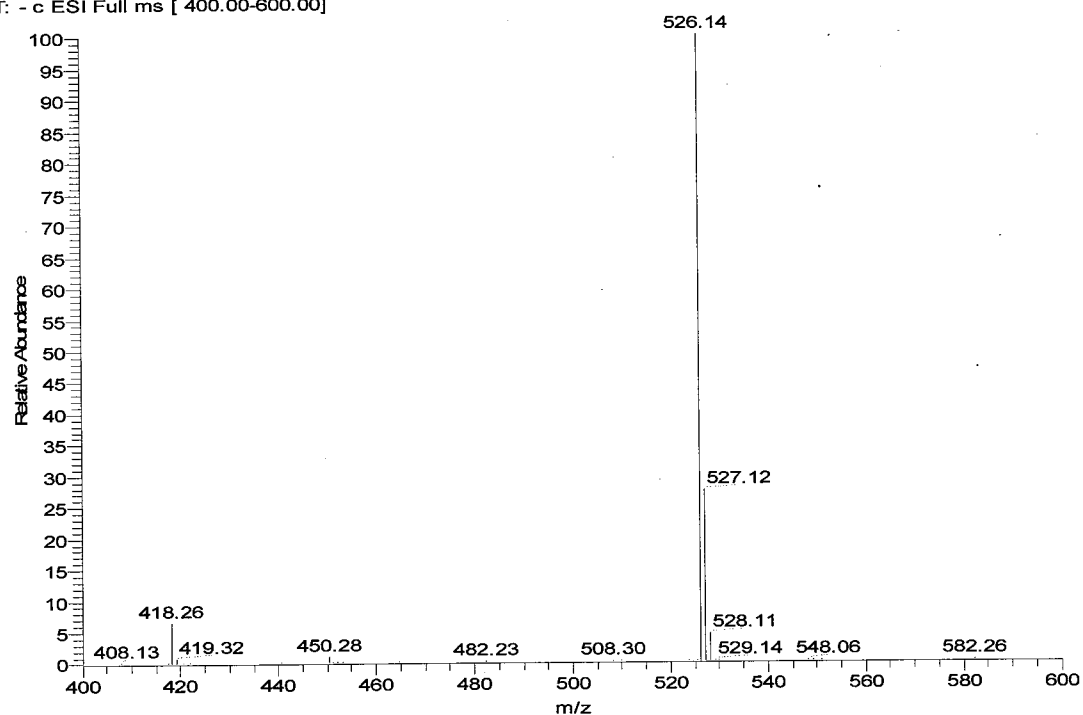


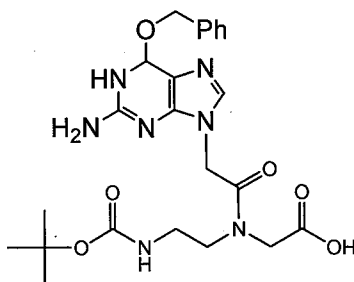
BA(Z)OEt-甲酸 #84-116 RT: 0.71-0.98 AV: 33 NL: 9.44E5
T: + c ESI Full ms [400.00-600.00]



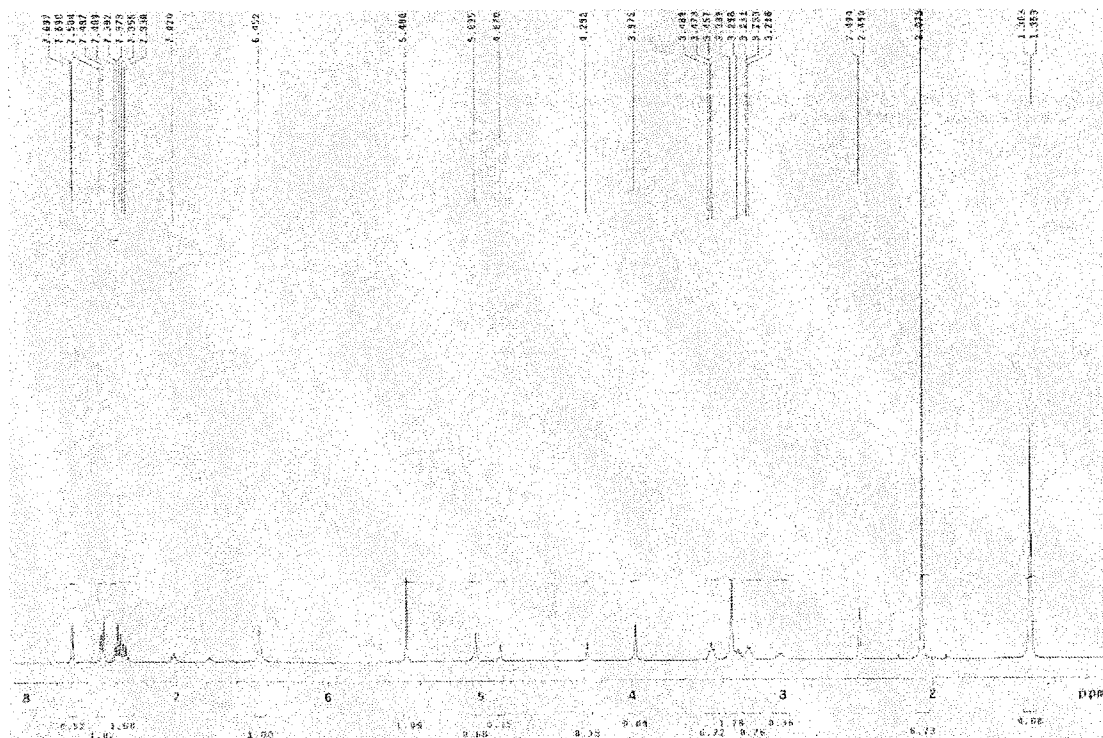
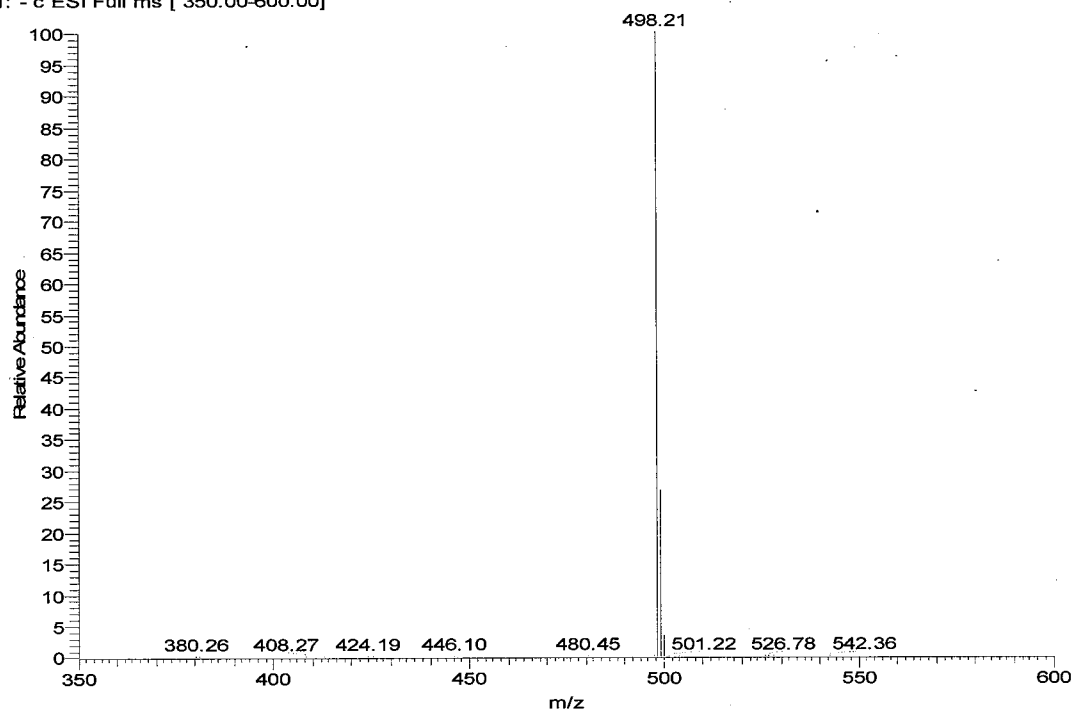


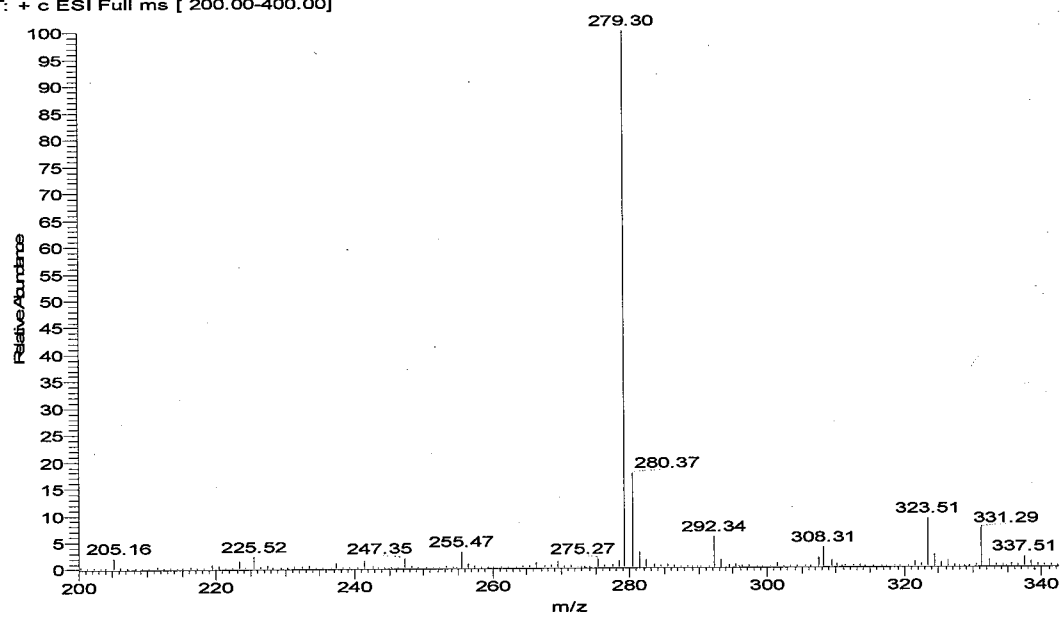
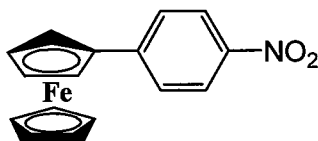
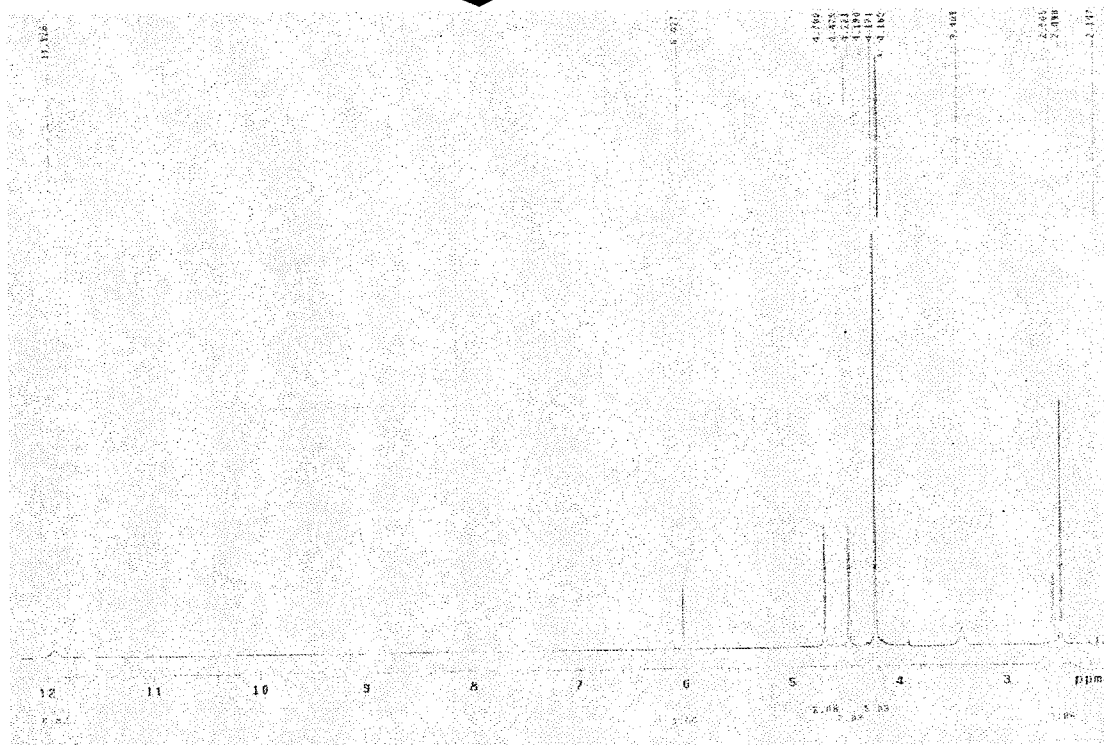
BA(Z)H #46-113 RT: 0.39-0.95 AV: 68 NL: 2.18E6
T: - c ESI Full ms [400.00-600.00]

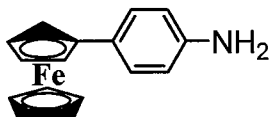
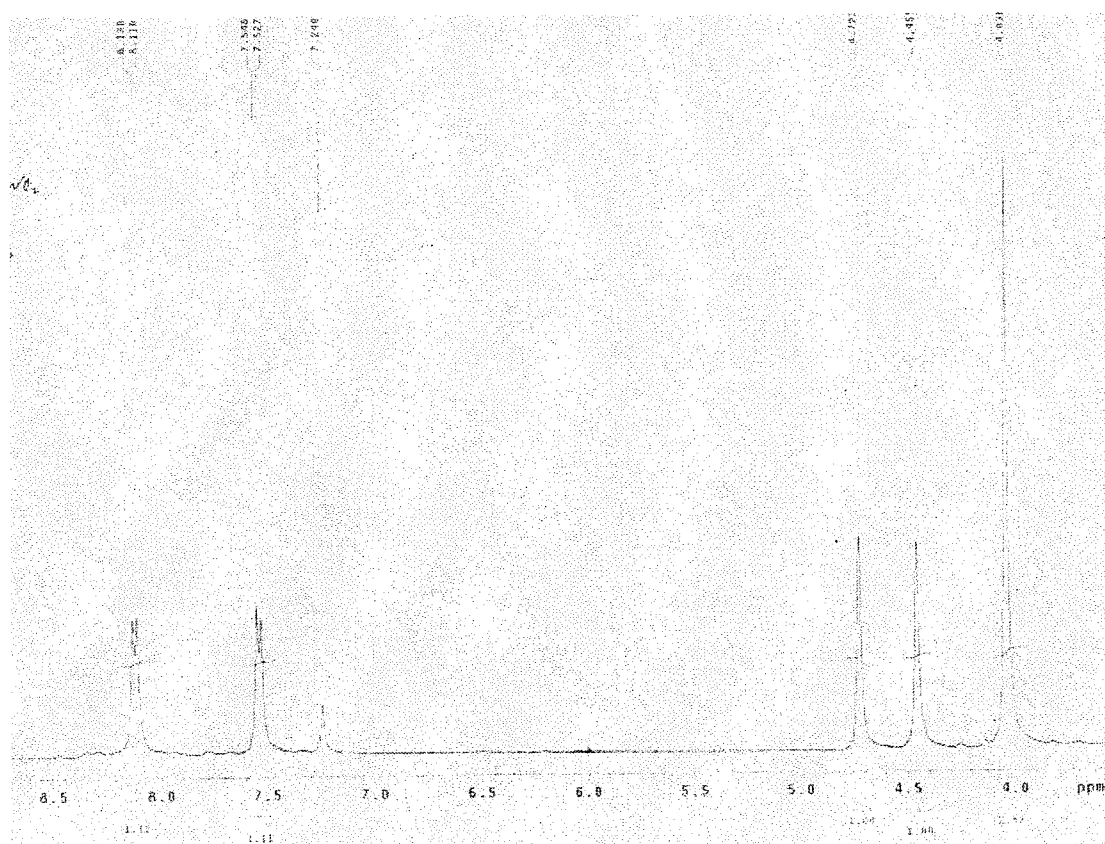




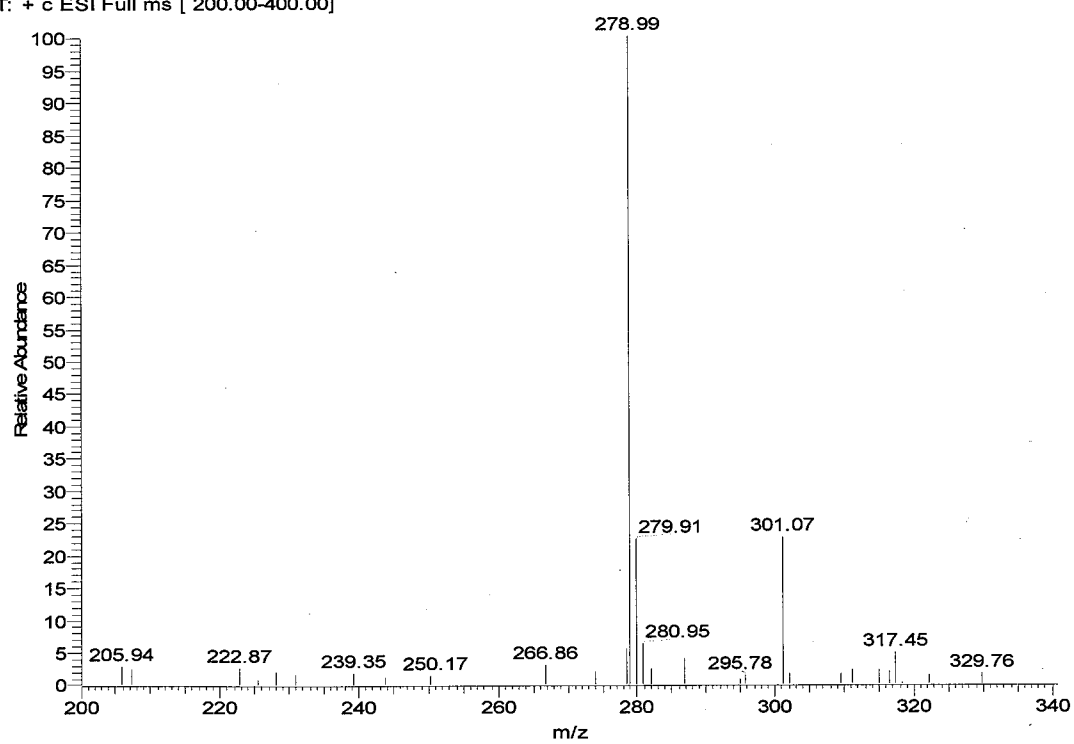
BG(P)H #47-108 RT: 0.44-0.99 AV: 62 NL: 1.28E6
T: - c ESI Full ms [350.00-600.00]

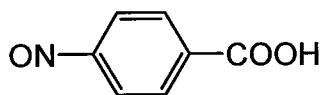
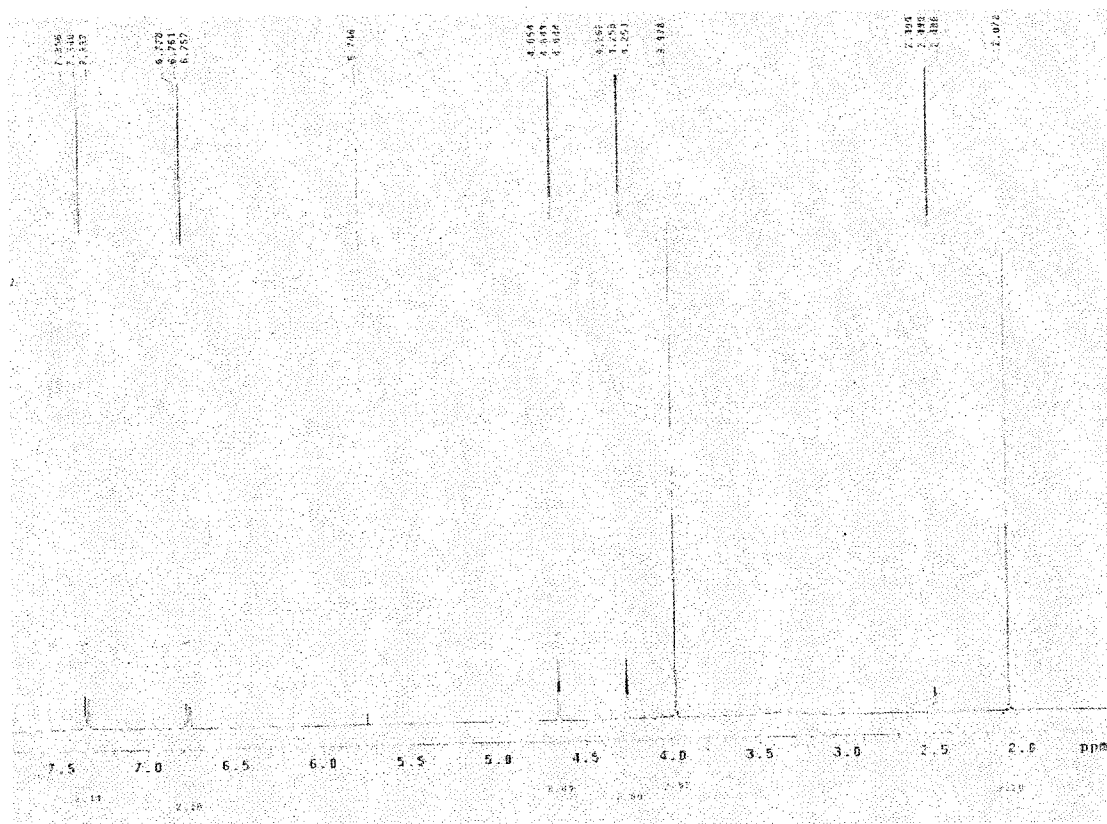




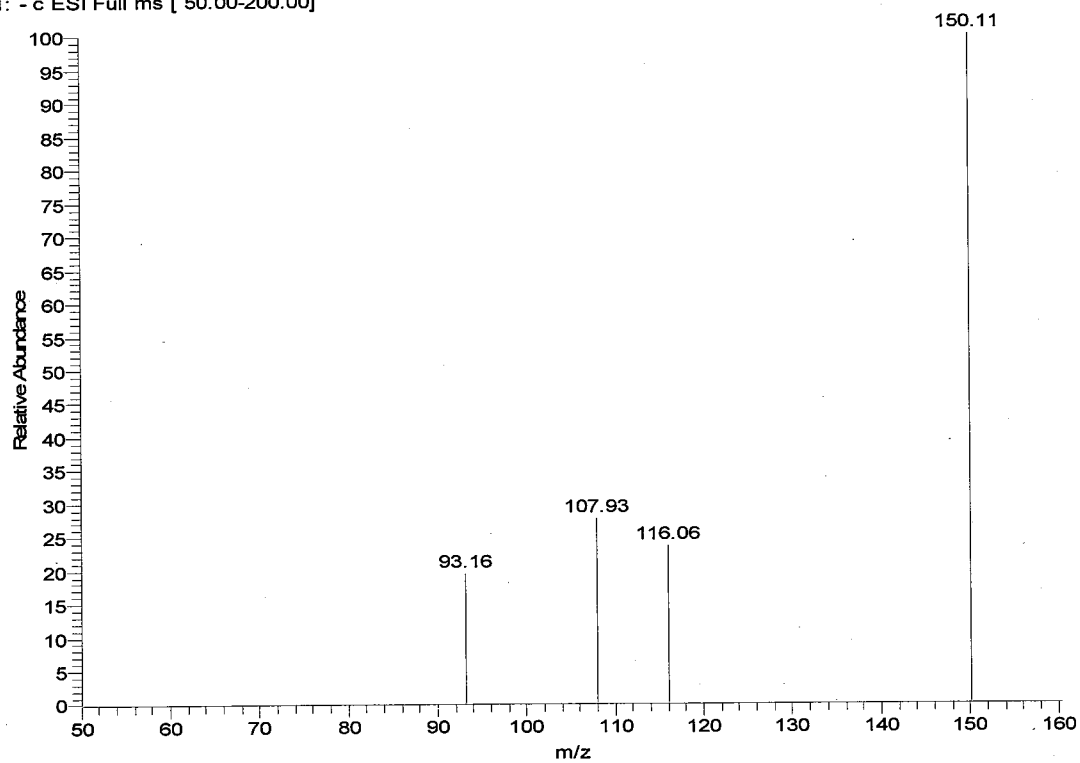


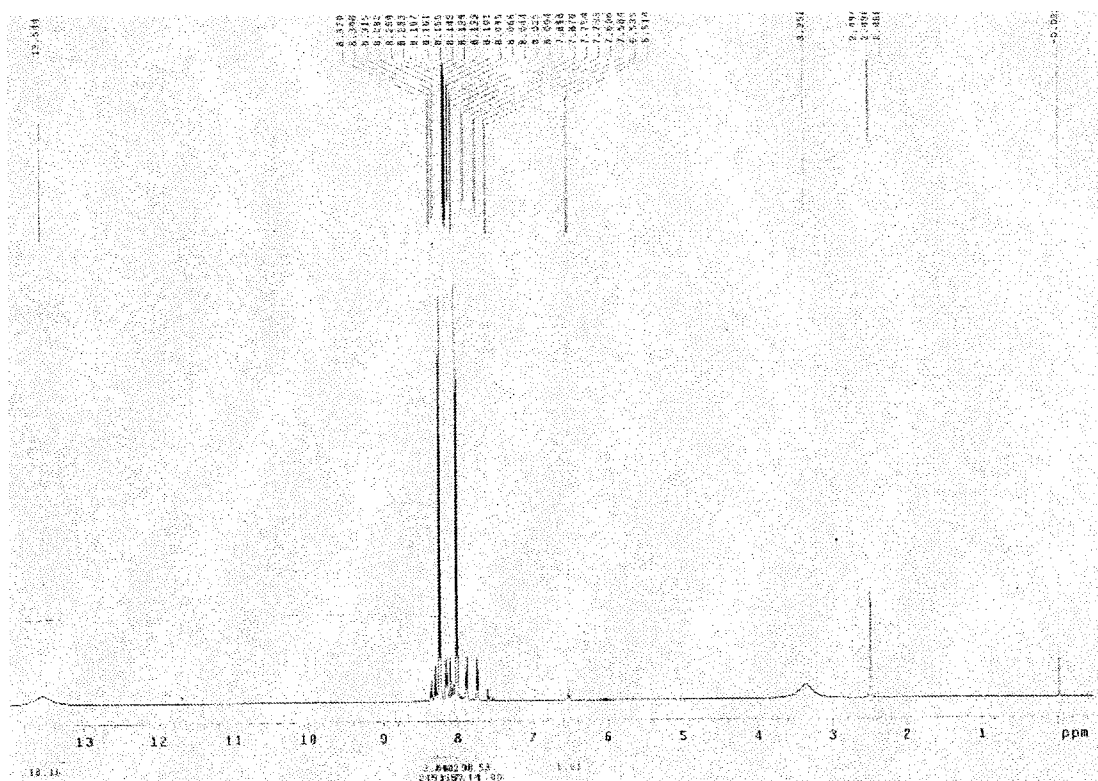
Fc-Ph-NH₂ #113 RT: 1.00 AV: 1 NL: 3.14E5
T: + c ESI Full ms [200.00-400.00]

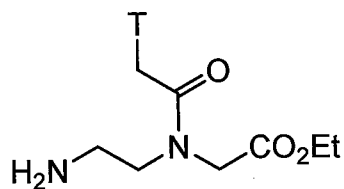




ON-Ph-COOH #50-121 RT: 0.42-0.99 AV: 72 NL: 3.71E2
T: - c ESI Full ms [50.00-200.00]



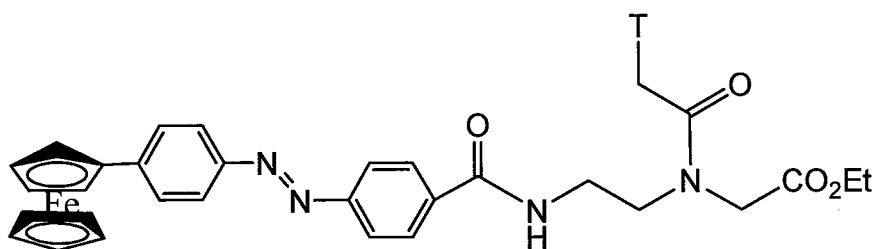
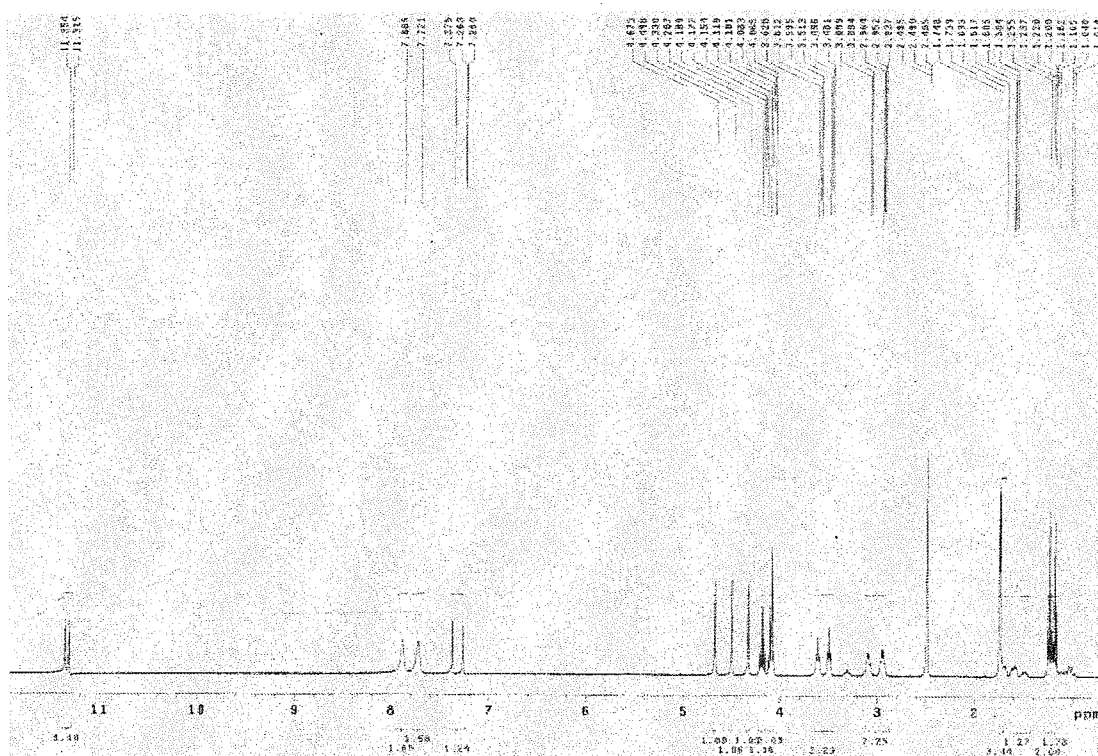




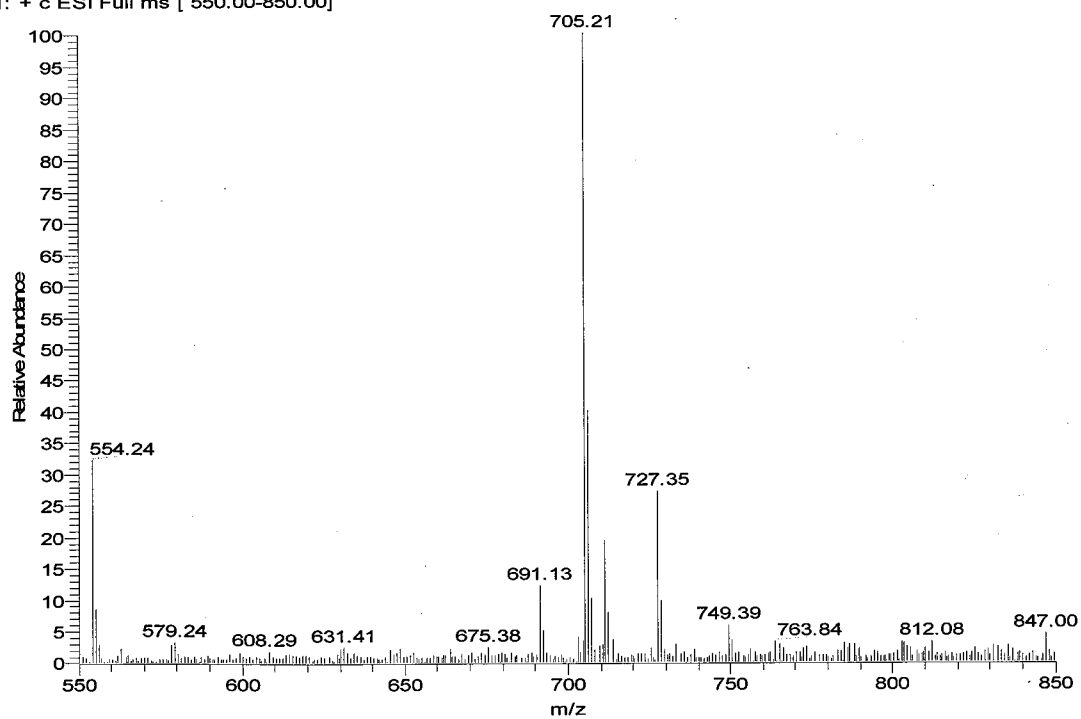
+ 6 ESI Full ms [250.00-500.00]

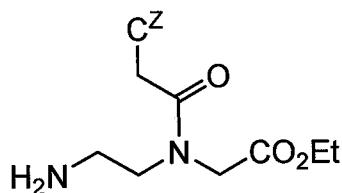
Mass spectrum showing Relative Abundance (Y-axis, 0 to 100) versus m/z (X-axis, 250.00 to 500.00). The base peak is at m/z 313.35. Other labeled peaks include:

m/z	Relative Abundance (approx)
268.59	2
276.42	2
296.52	2
313.35	100
314.37	15
315.34	5
335.34	22
336.35	5
364.45	5
372.29	5
379.33	5
400.53	5



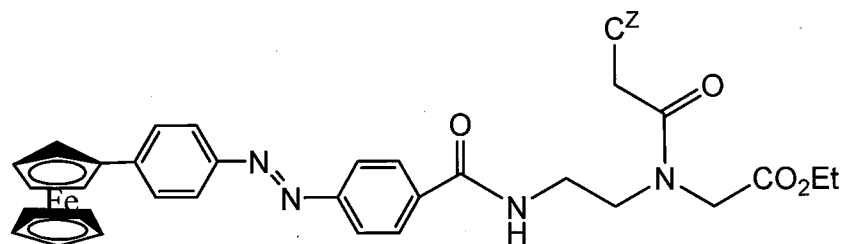
Fc-Azo-TOEt (第一点) #39-100 RT: 0.37-0.96 AV: 62 NL: 1.78E5
T: + c ESI Full ms [550.00-850.00]



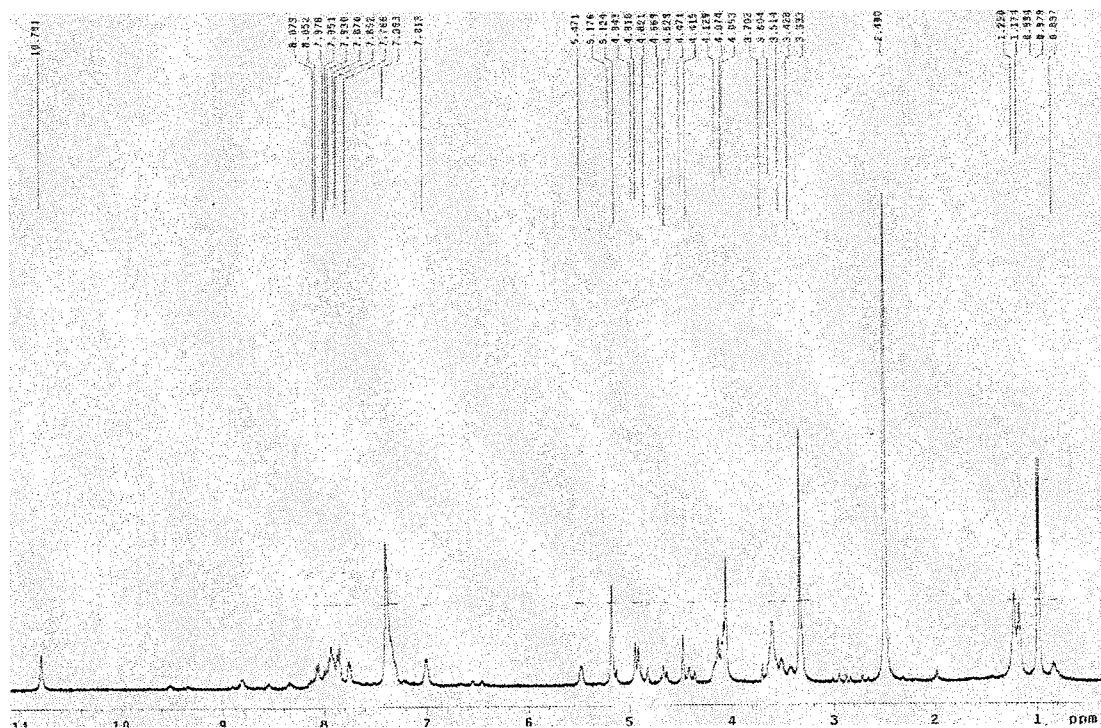
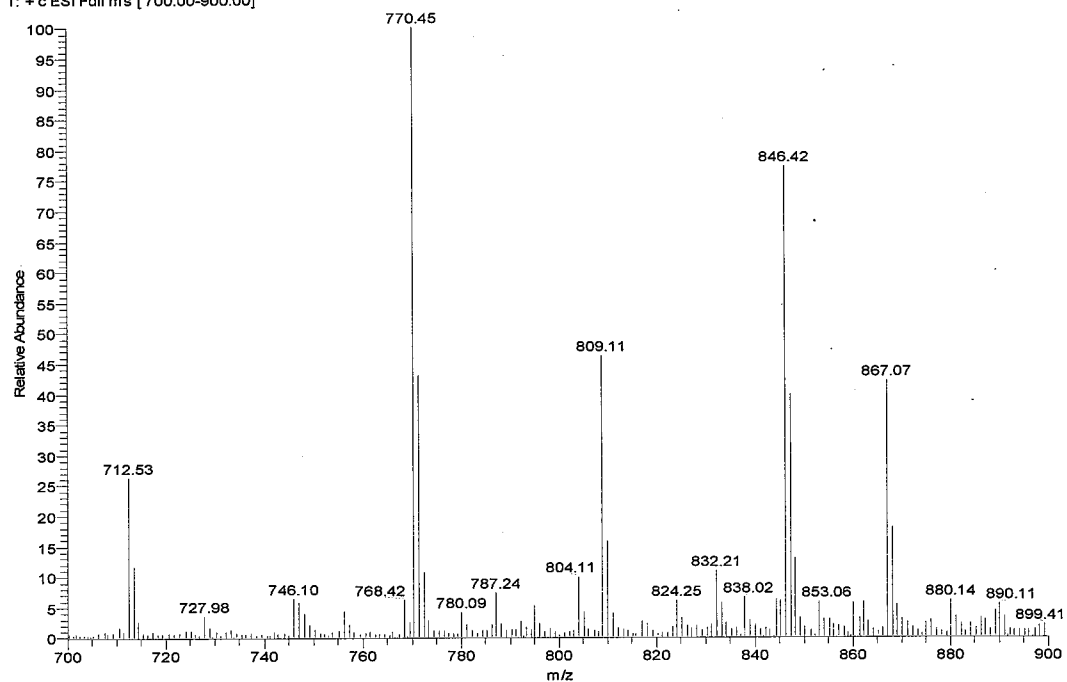


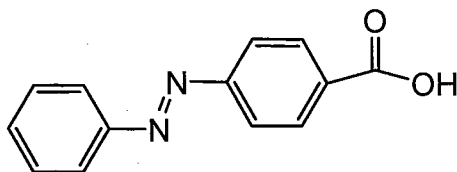
Mass spectrum of compound 10b. The x-axis represents the mass-to-charge ratio (m/z) from 350 to 600, and the y-axis represents the relative abundance from 0 to 100. The base peak is at m/z 432.33.

m/z	Relative Abundance (approx.)
353.24	2
388.44	2
414.52	2
432.33	100
433.34	25
454.41	35
455.40	10
482.73	2
498.56	2
514.66	2
559.16	2
584.23	5
590.08	10

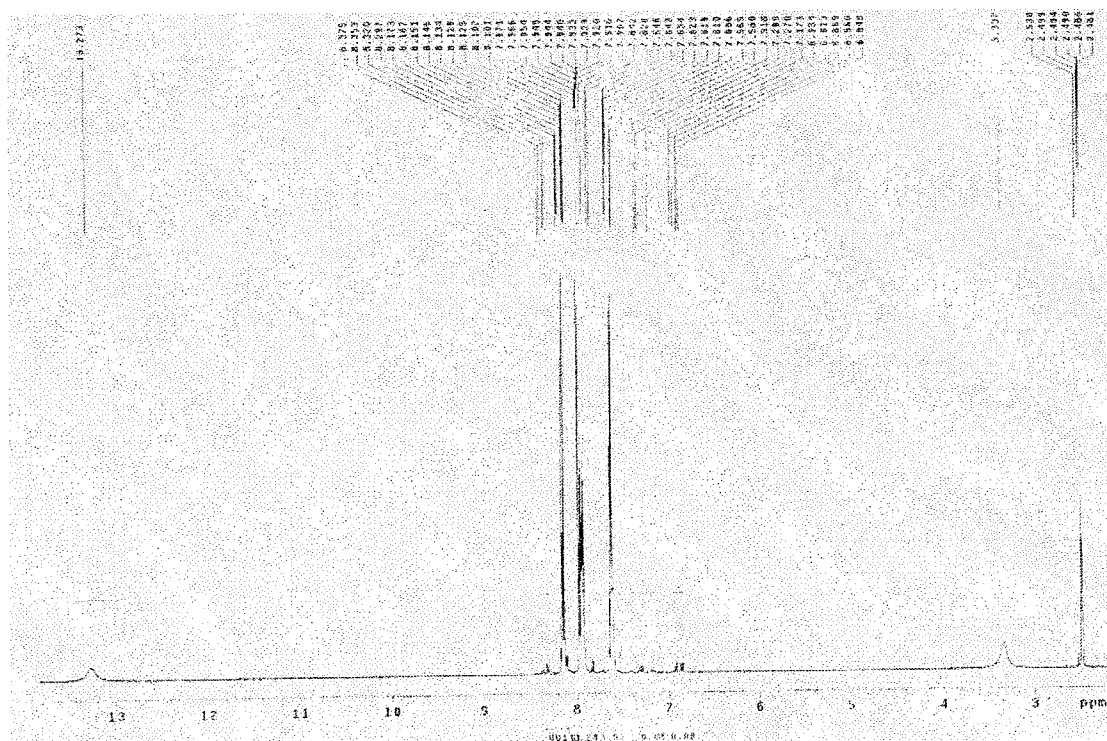
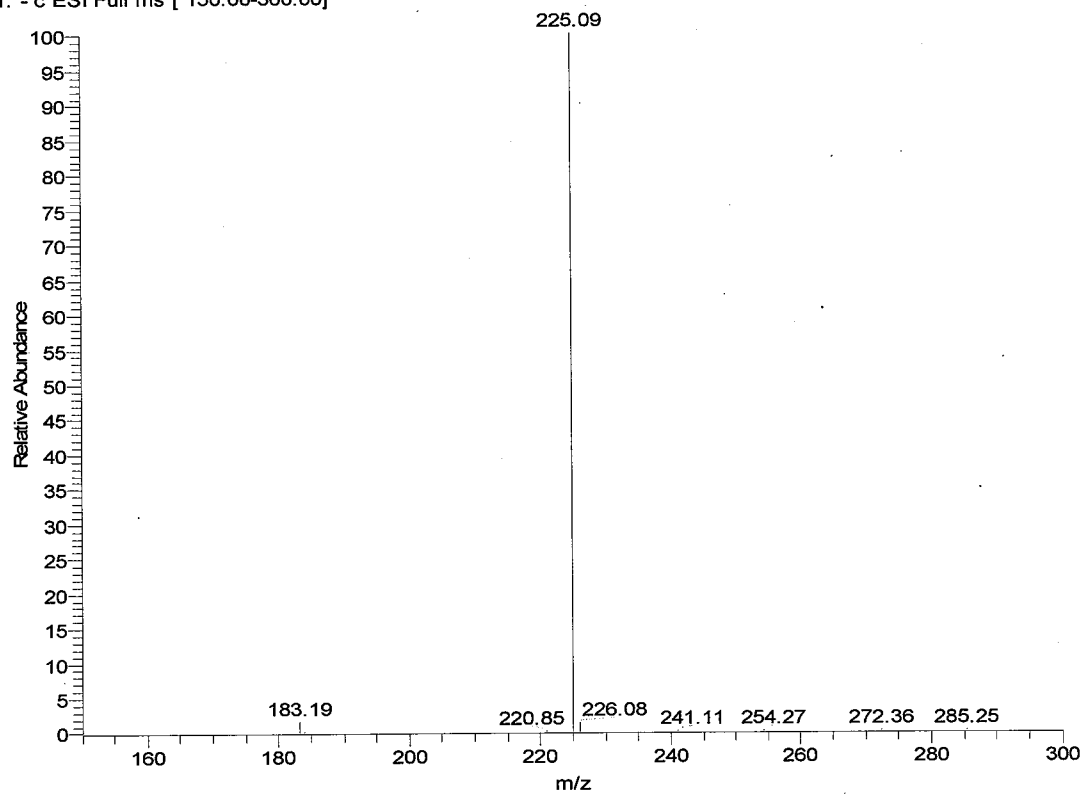


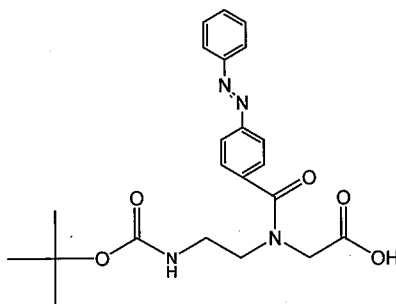
200752916-FcAZOC(Z)OEt#51-117 RT: 0.42-0.97 AV: 67 NL: 4.33E5
T: + c ESI Full ms [700.00-900.00]



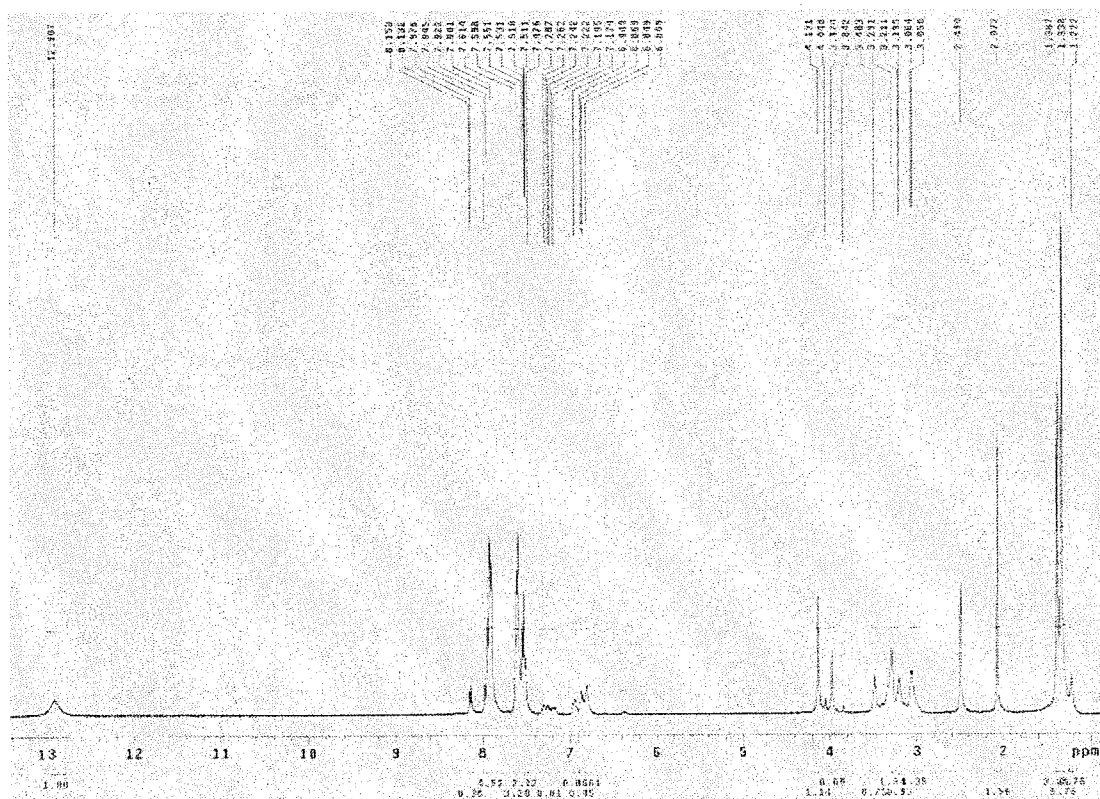
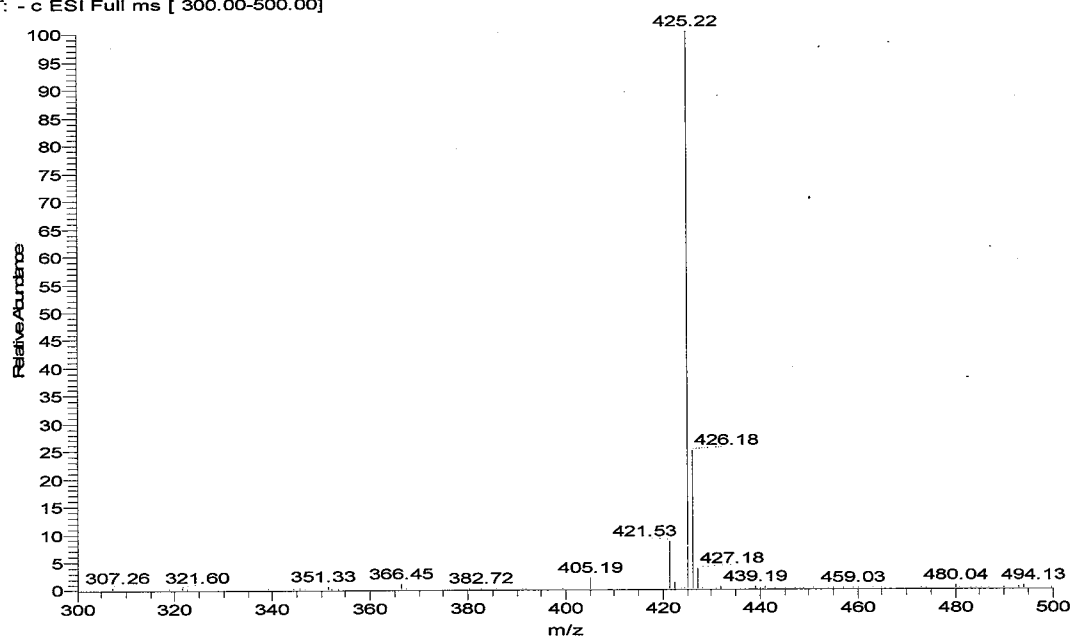


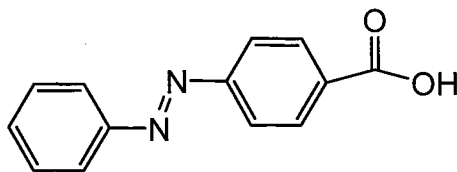
PhNNPhCOOH #60-123 RT: 0.49-1.00 AV: 64 NL: 7.13E4
T: - c ESI Full ms [150.00-300.00]



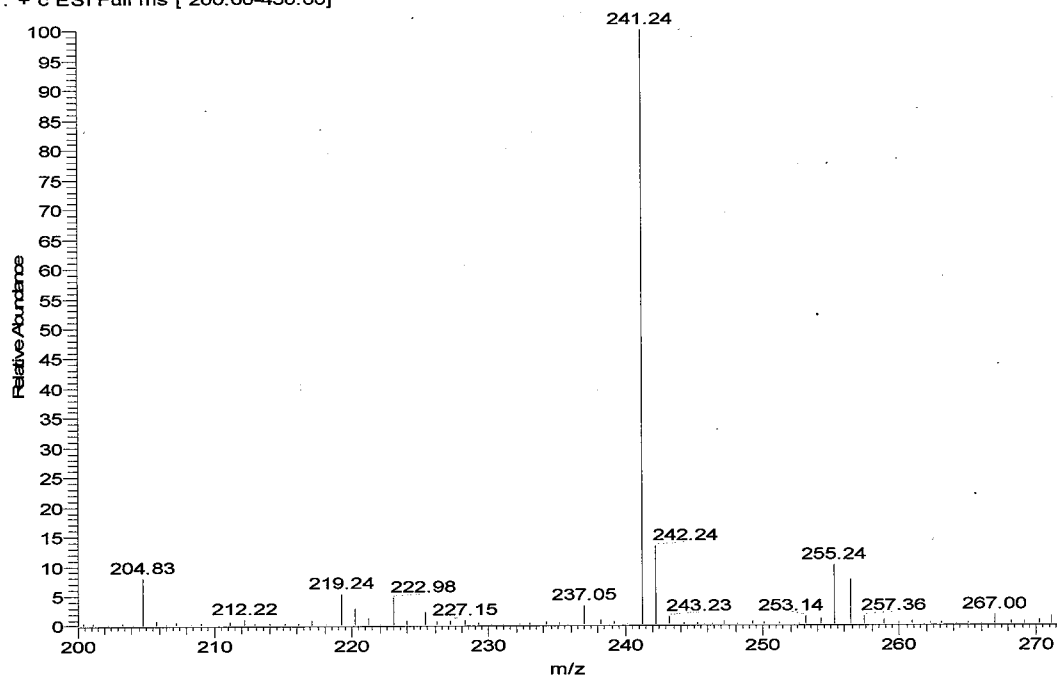


偶氮苯甲酸单体负模式 #7-27 RT: 0.07-0.24 AV: 21 NL: 1.50E6
T: - c ESI Full ms [300.00-500.00]

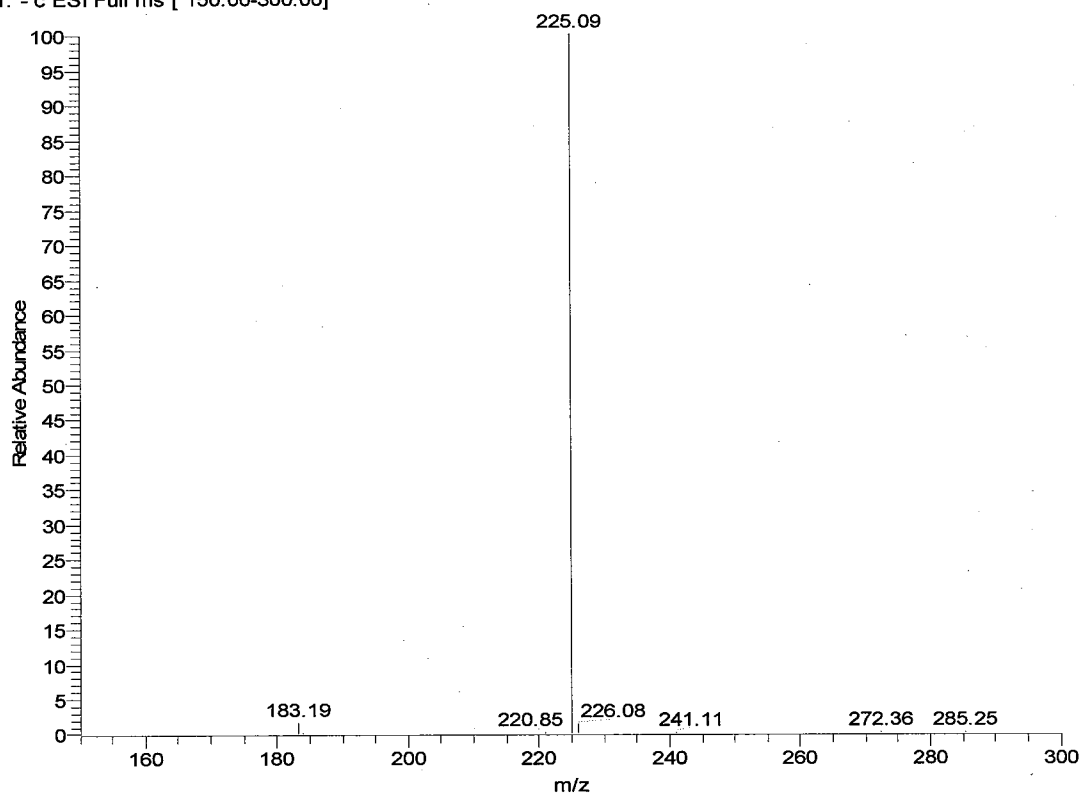


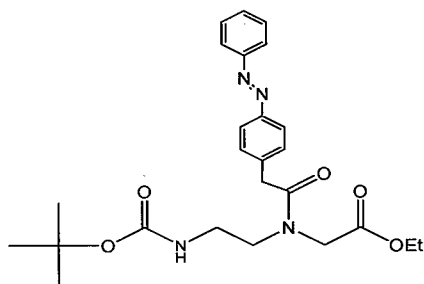
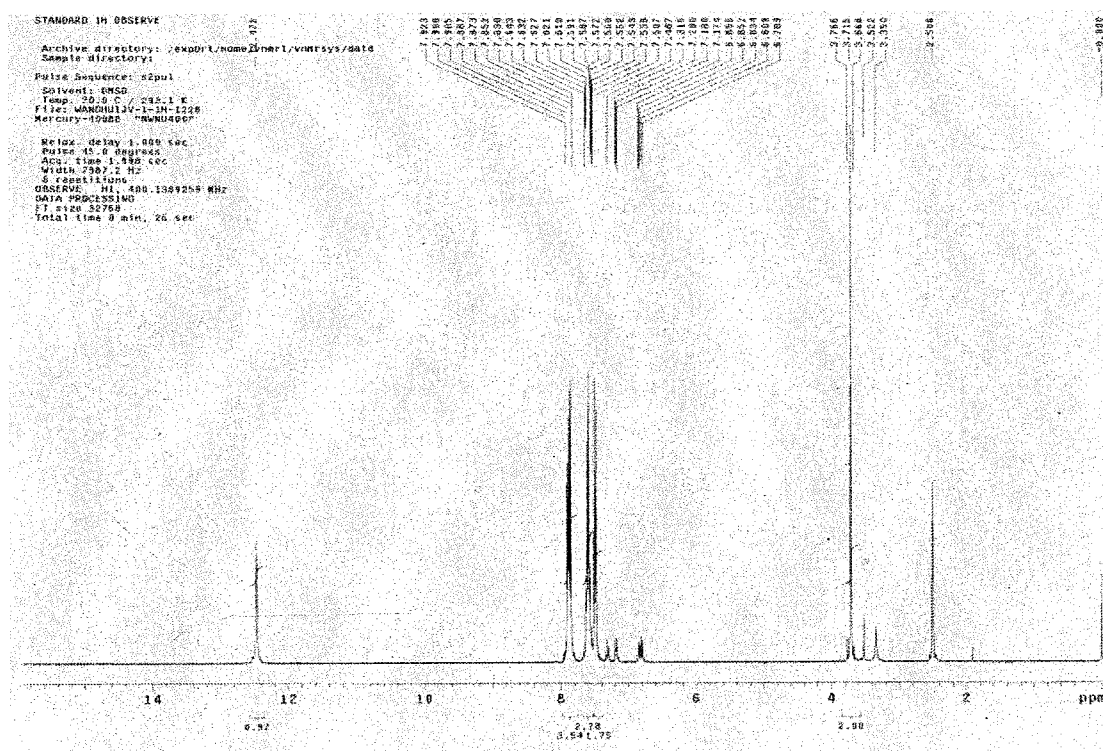


PhNNPhCH₂COOH-正模式 #1-105 RT: 0.01-0.98 AV: 105 NL: 2.10E5
T: + c ESI Full ms [200.00-450.00]

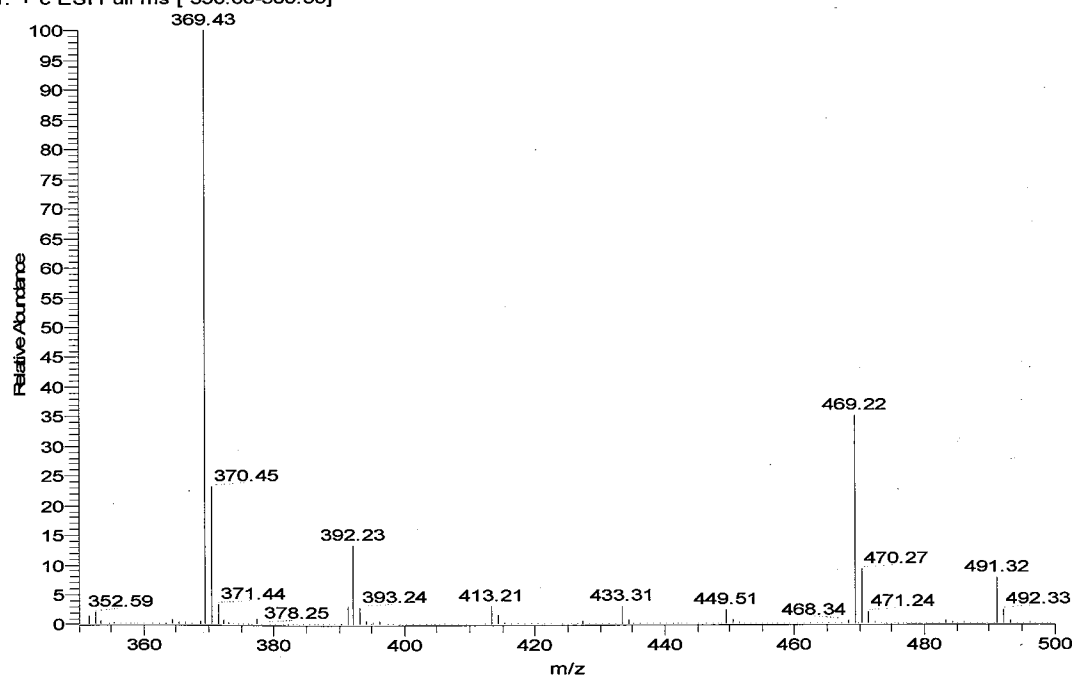


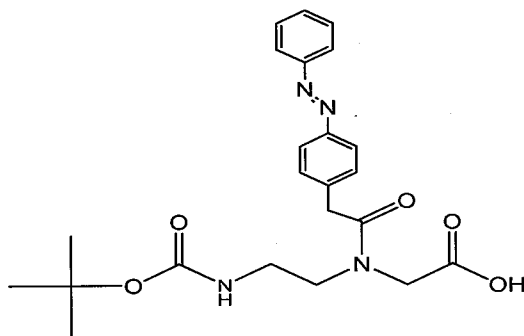
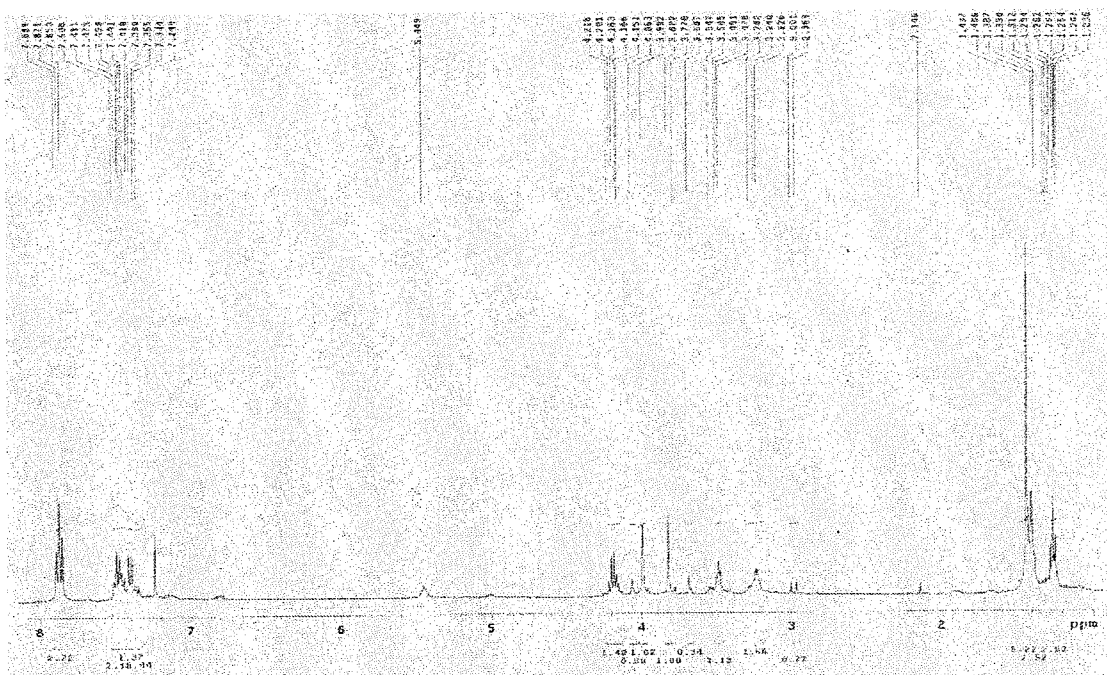
PhNNPhCOOH #60-121 RT: 0.49-0.98 AV: 62 NL: 7.26E4
T: - c ESI Full ms [150.00-300.00]



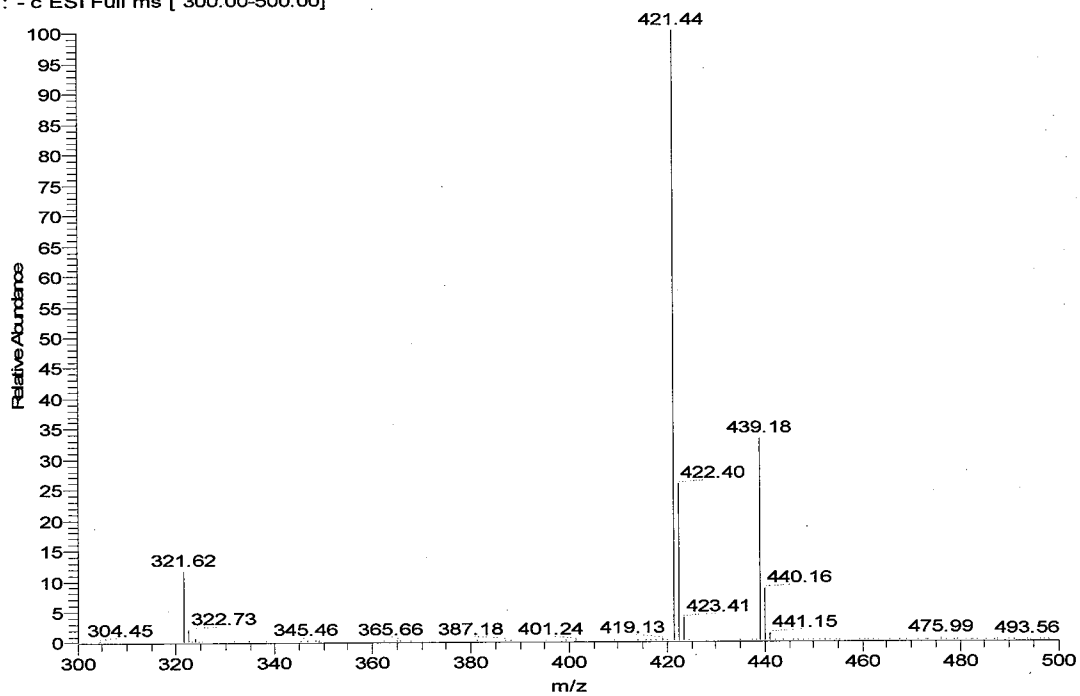


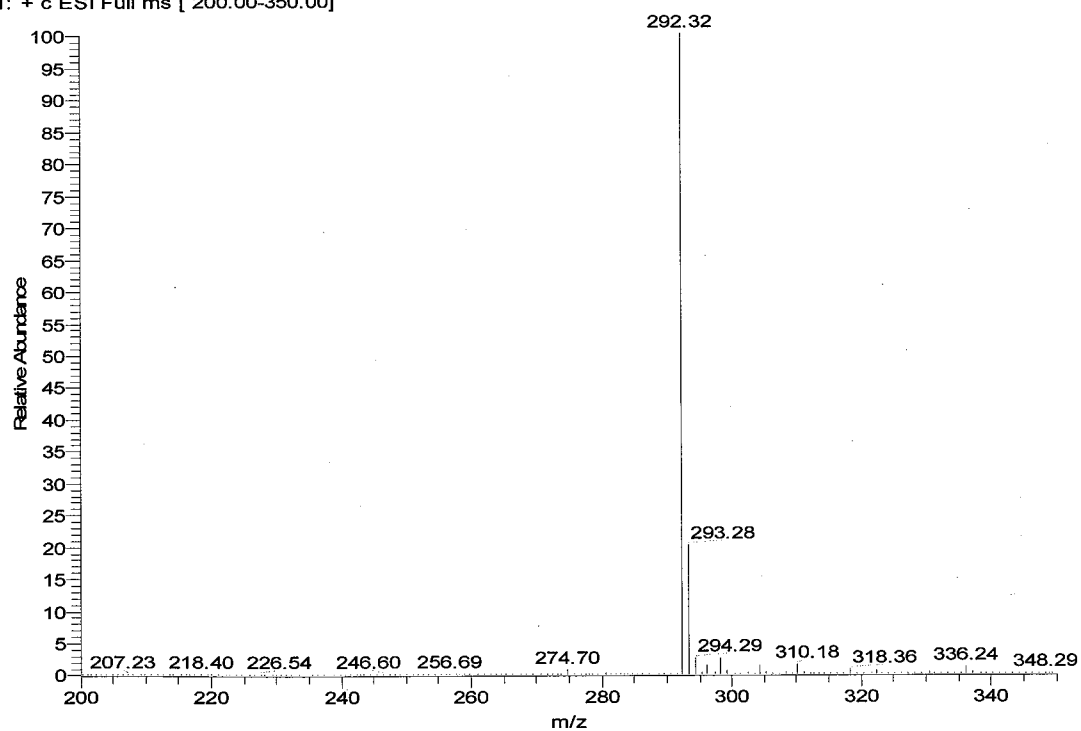
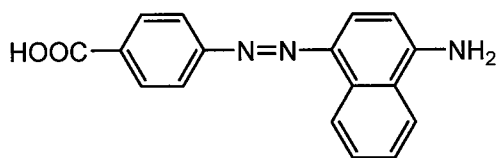
偶氮苯乙酸单体乙酯正模式-甲酸 #46-137 RT: 0.37-0.98 AV: 92 NL: 1.36E7
T: + c ESI Full ms [350.00-500.00]

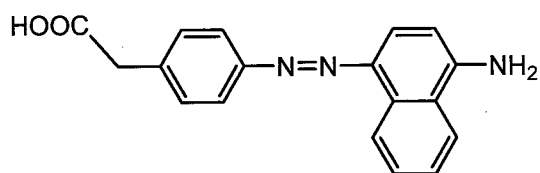




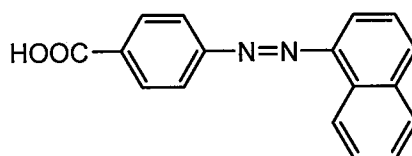
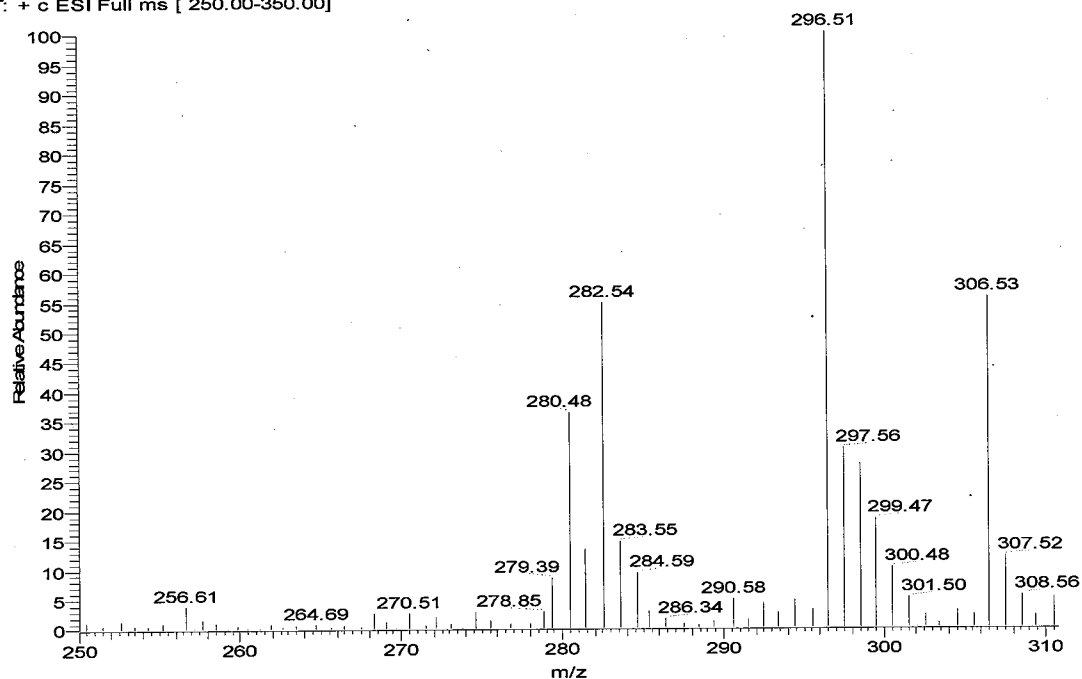
偶氮苯乙酸单体负模式 #7-39 RT: 0.08-0.34 AV: 33 NL: 3.30E6
T: - c ESI Full ms [300.00-500.00]



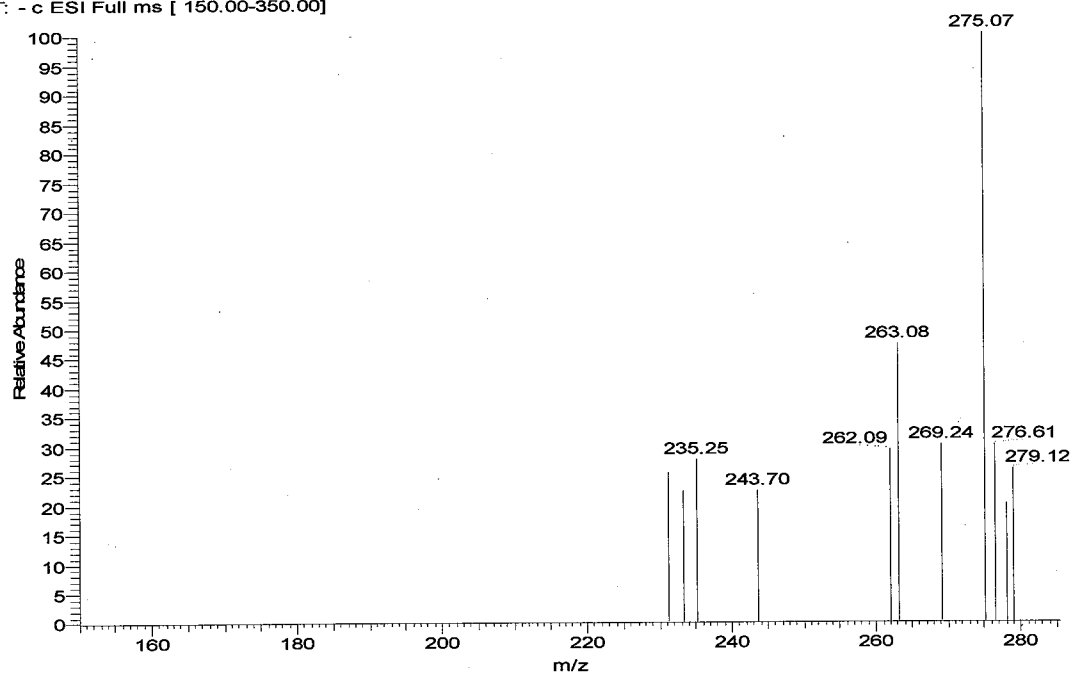


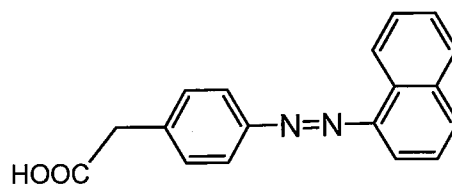
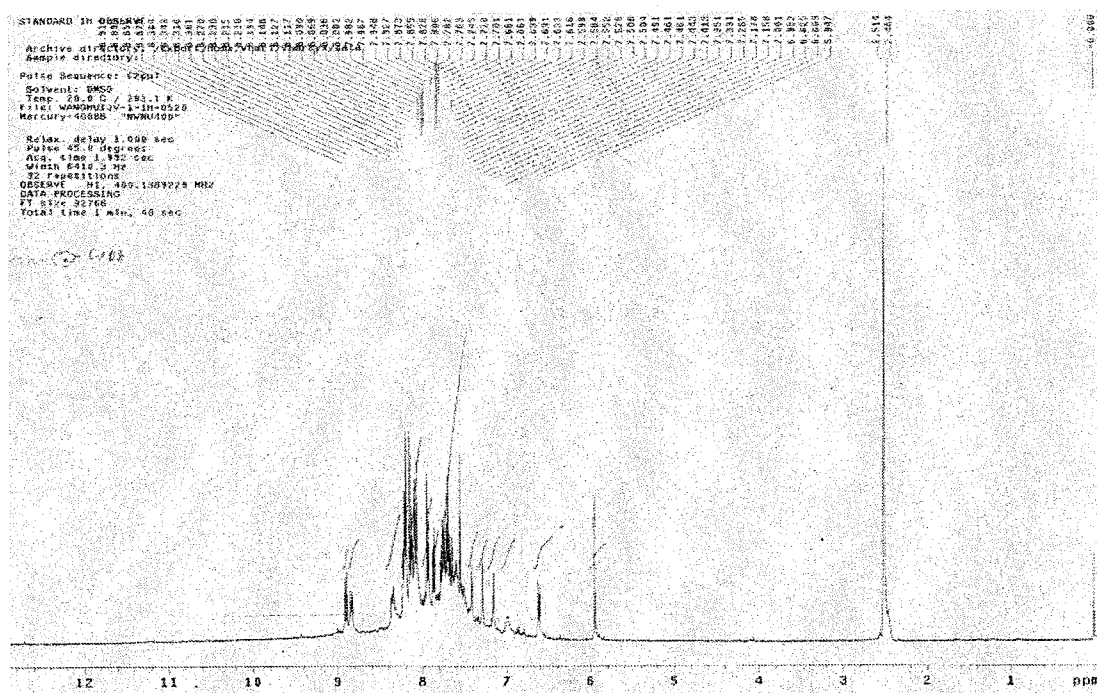


氨基萘偶氮苯乙酸 #23-60 RT: 0.18-0.43 AV: 38 NL: 9.36E5
T: + c ESI Full ms [250.00-350.00]

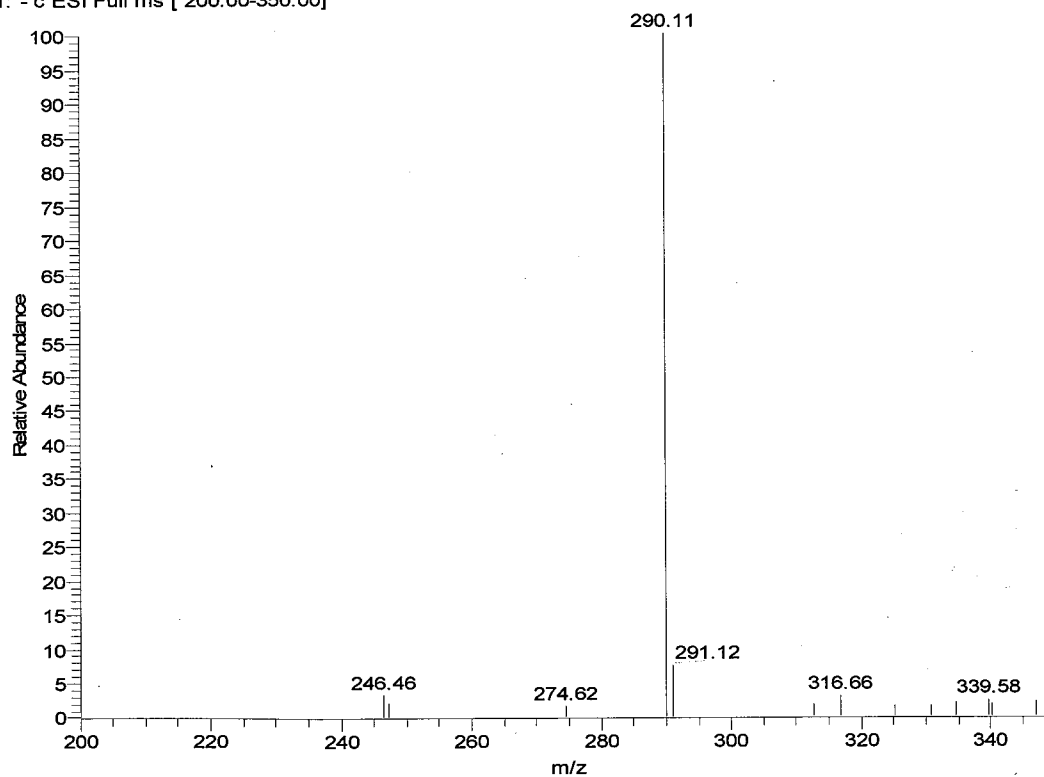


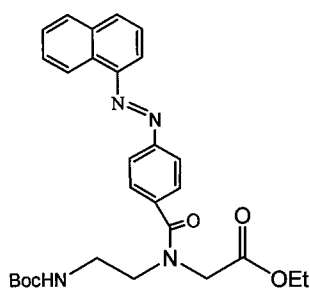
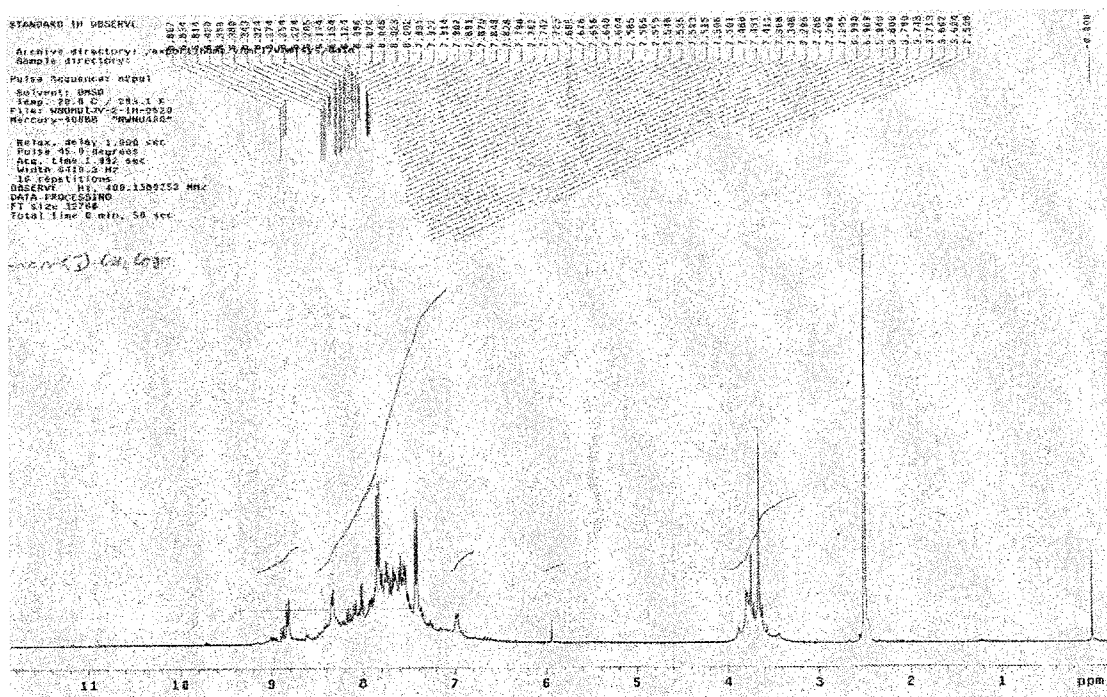
萘偶氮苯甲酸 #13-169 RT: 0.13-1.50 AV: 157 NL: 1.58E2
T: - c ESI Full ms [150.00-350.00]



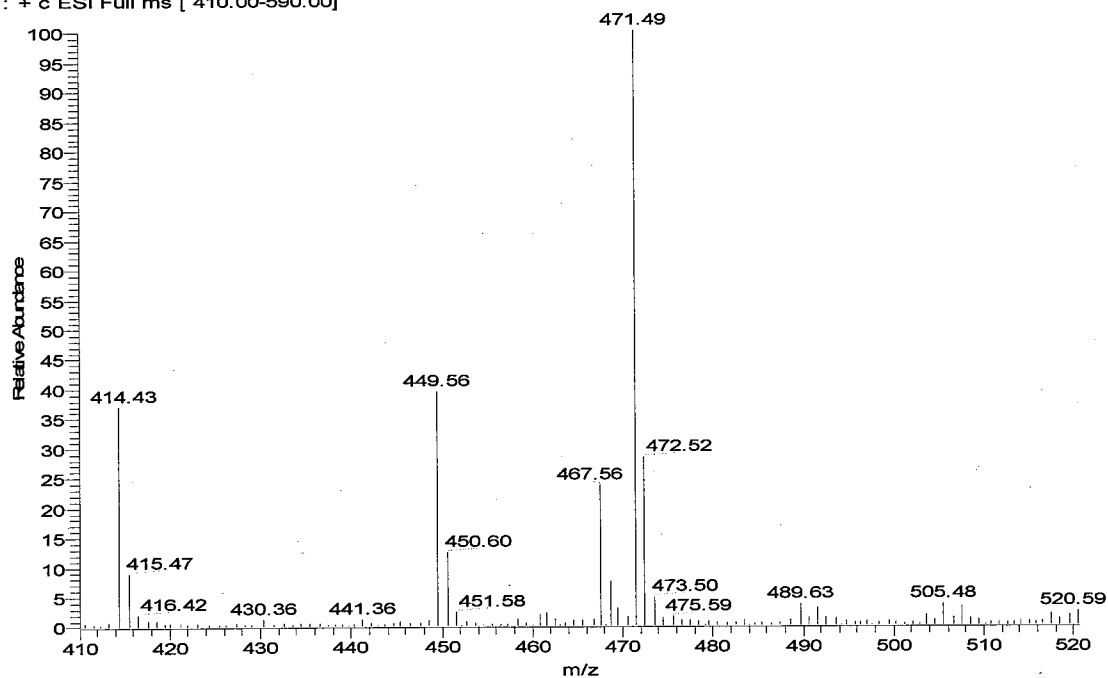


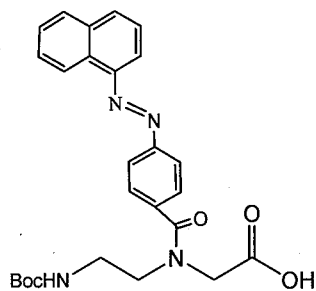
萘偶氮苯乙酸-负模式 #2-123 RT: 0.03-0.99 AV: 122 NL: 1.90E3
T: - c ESI Full ms [200.00-350.00]



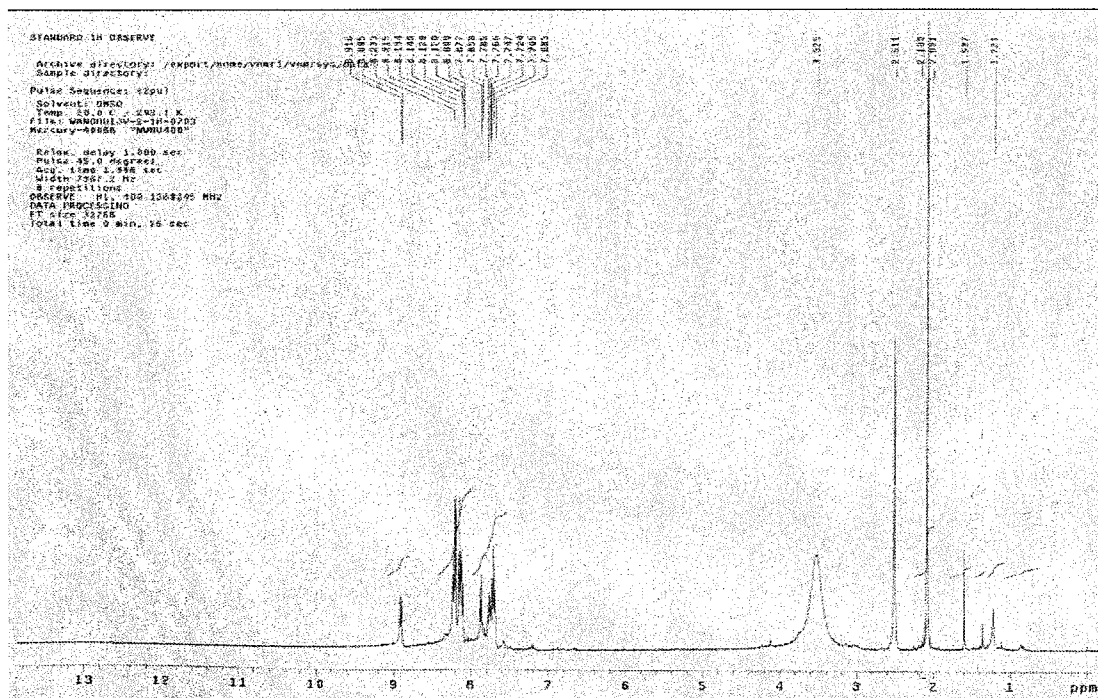
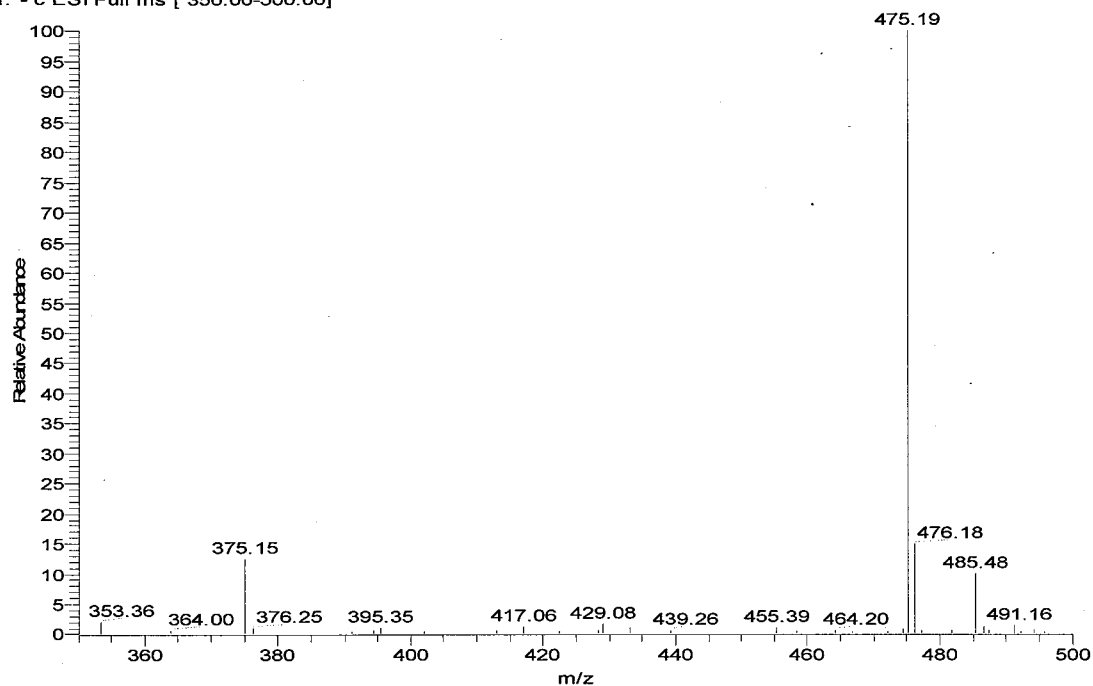


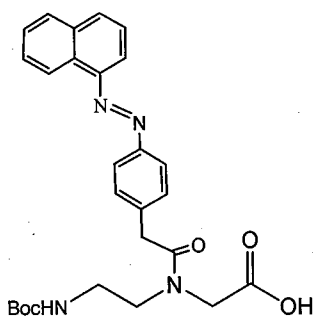
萘偶氮苯甲酸单体乙酯 #18-59 RT: 0.15-0.47 AV: 42 NL: 3.08E6
T: + c ESI Full ms [410.00-590.00]



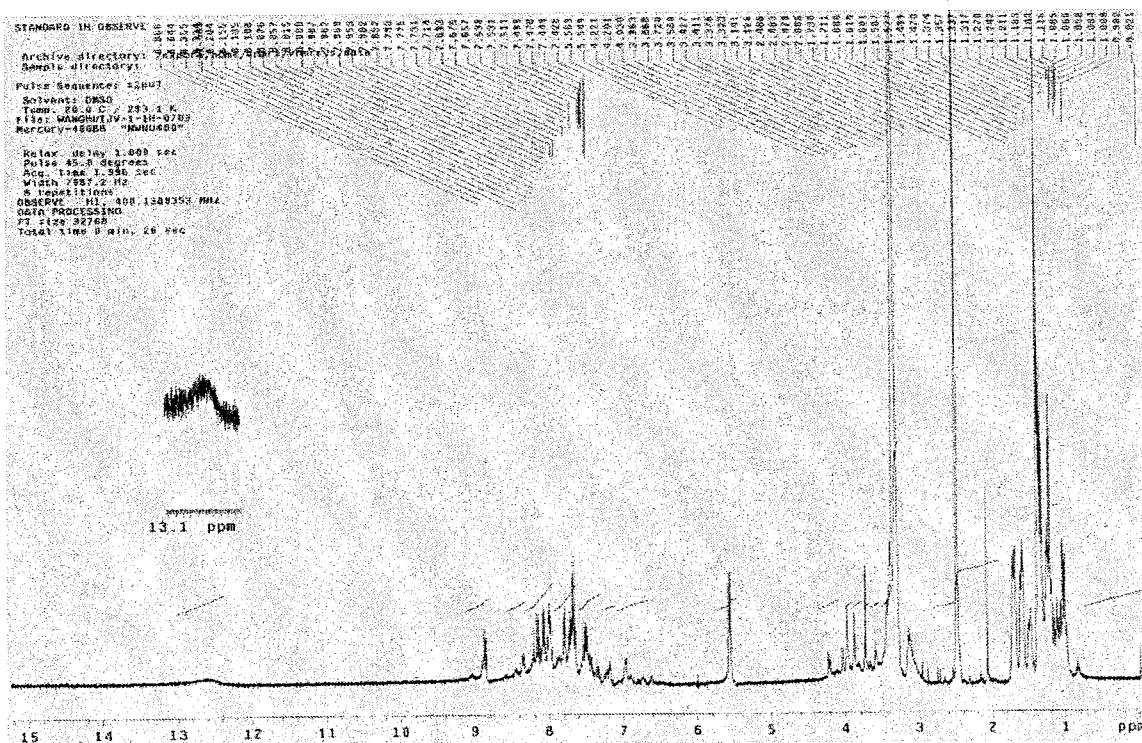
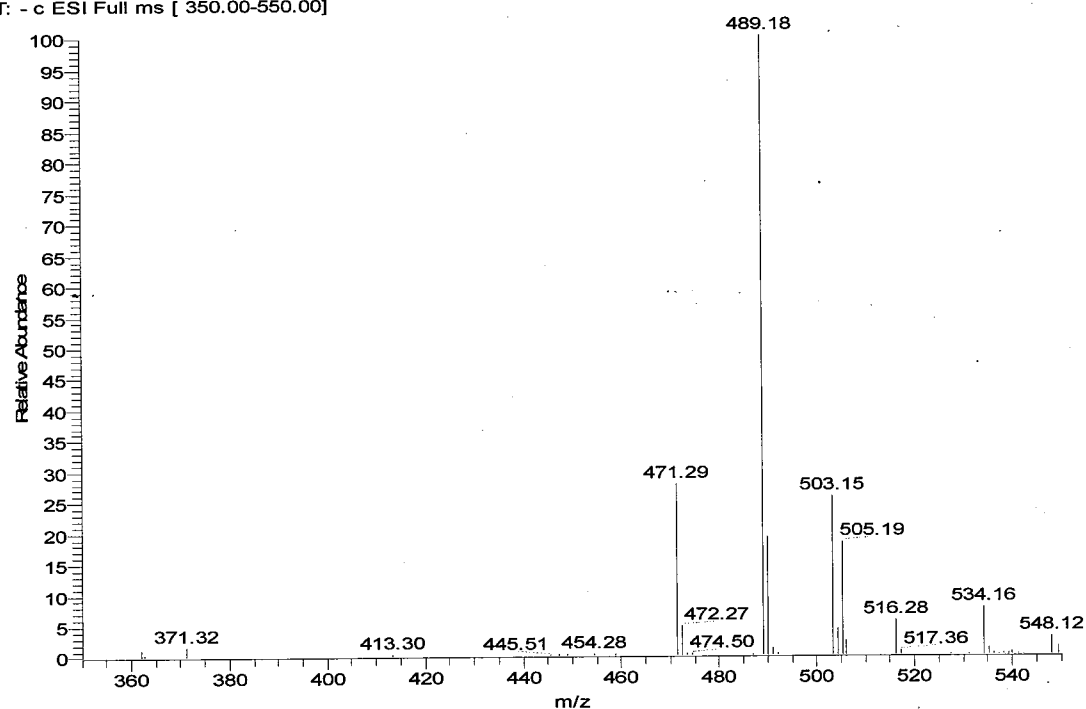


蔡偶氮苯甲酸单体 #22-45 RT: 0.19-0.37 AV: 24 NL: 5.54E4
T: -c ESI Full ms [350.00-500.00]





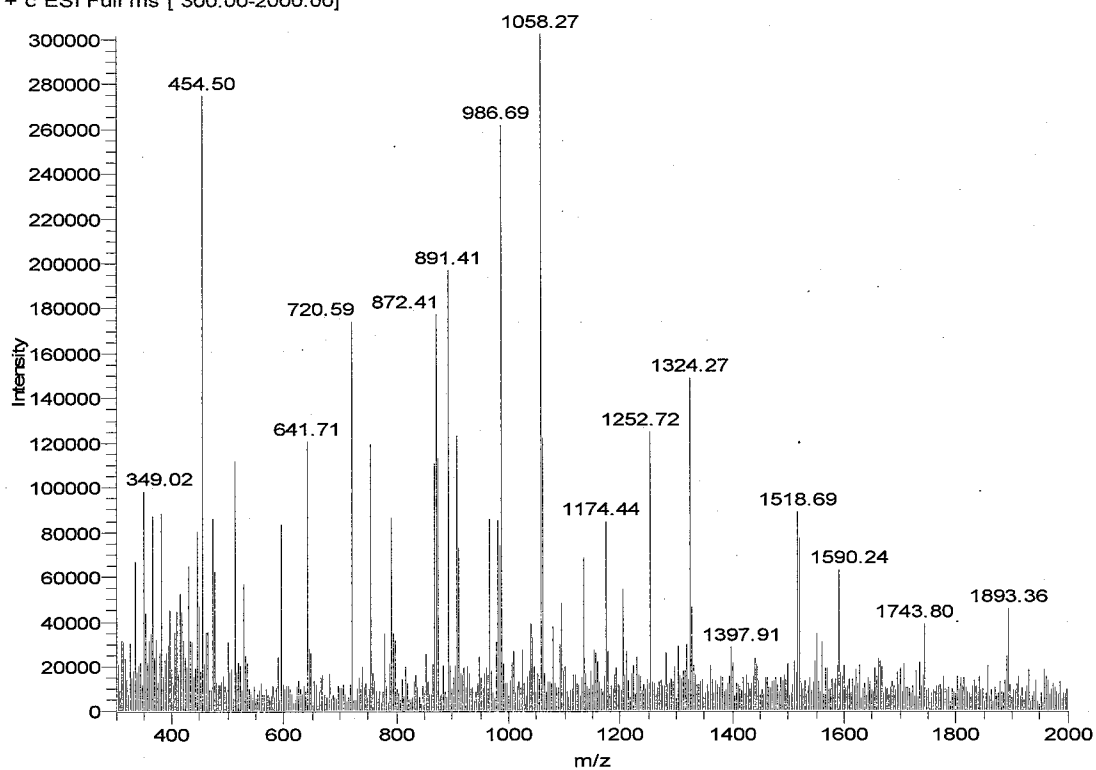
萘偶氮苯乙酸单体 #22-46 RT: 0.20-0.40 AV: 25 NL: 8.31E4
T: - c ESI Full ms [350.00-550.00]



H₂N-Lys-TTTTTT (粗产物)

T6 #18-28 RT: 0.42-0.67 AV: 11 NL: 3.01E5

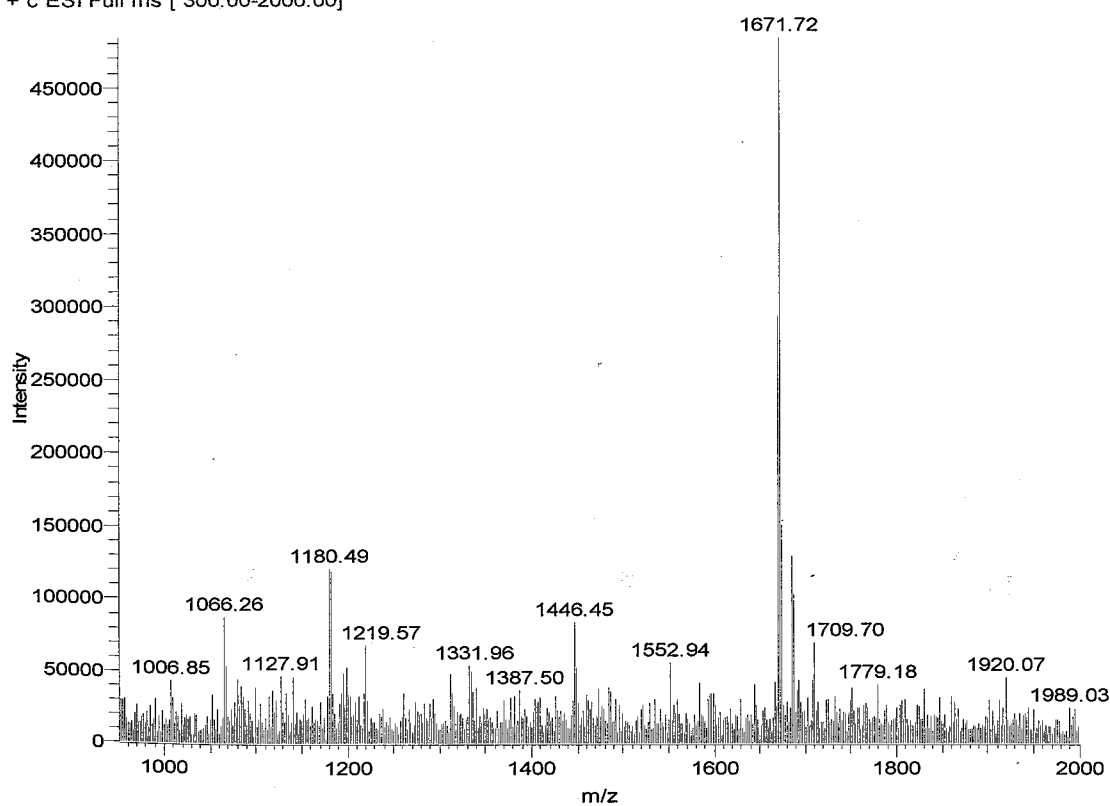
T: + c ESI Full ms [300.00-2000.00]

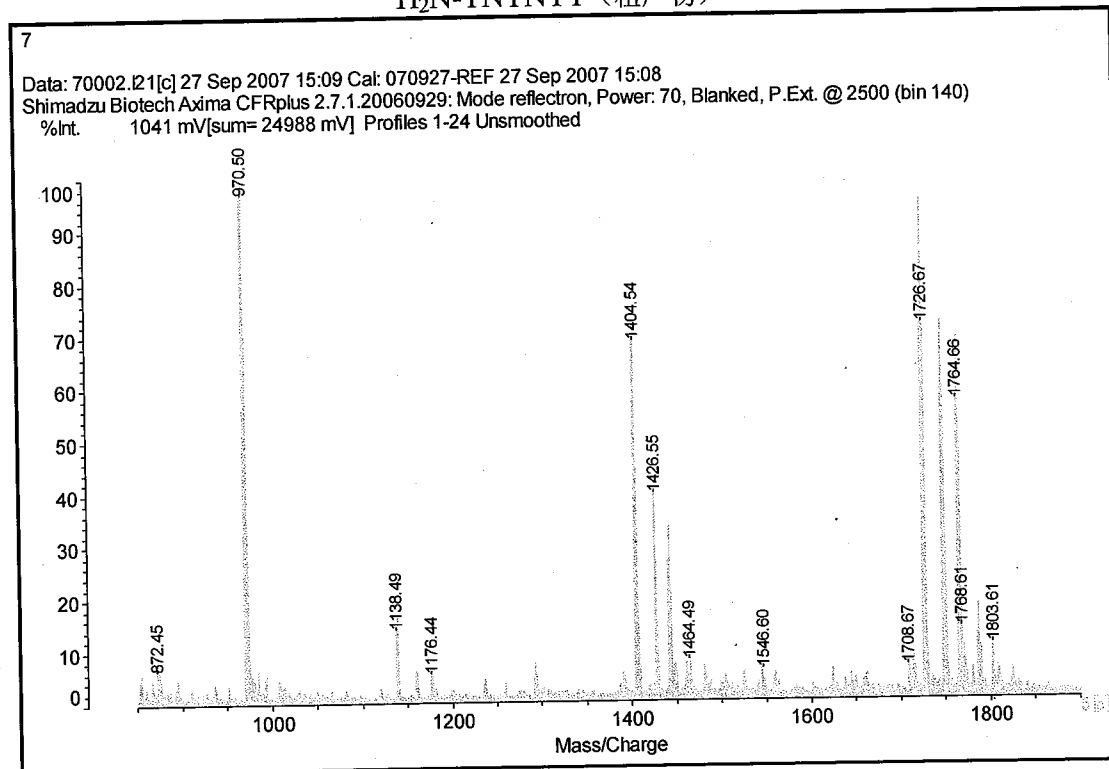


H₂N-TTTNTT (粗产物)

N3-20-LOW #9-22 RT: 0.19-0.52 AV: 14 NL: 4.84E5

T: + c ESI Full ms [300.00-2000.00]



H₂N-TNTNTT (粗产物)H₂N-Lys-TTTTTTTTTTTT-Fc (粗产物)