

การแยกประเภทของนิวคลีโอไทด์โดยใช้เซนเซอร์แอเรย์ ผ่านวิธีวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก

DISCRIMINATION OF NUCLEOTIDES IN AQUEOUS SOLUTION BY THE SENSOR ARRAYS VIA PCA METHOD

จิราภรณ์ ไชยแจ่ม, คณศ วังษ์วี, บุษยรัตน์ ธรรมพัฒน์กิจ*

*Chiraporn Chaicham, Kanet Wongrawee, Boosayarat Tomapatanget**

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Thailand.

*Corresponding author, E-mail: tboosayarat@gmail.com

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อการออกแบบและสังเคราะห์โมเลกุลเซนเซอร์ที่มีอนุพันธ์ของไพรีนและคูมารินเป็นองค์ประกอบ (Pydpa และ Es) สำหรับใช้ในการแยกประเภทของนิวคลีโอไทด์โดยใช้การวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (Principal Component Analysis, PCA) ในขั้นต้นได้เตรียมสารประกอบเชิงซ้อนของเซนเซอร์โมเลกุล Pydpa-Zn, Pydpa-Cu, Es-Zn และ Es-Cu เพื่อที่จะใช้จับกับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งหมู่ฟอสเฟตของนิวคลีโอไทด์ สามารถเกิดอันตรกิริยาทางไฟฟ้าสถิตกับสารประกอบเชิงซ้อนของเซนเซอร์โมเลกุลได้ จากนั้นได้ศึกษาความสามารถในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน โดยใช้เทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรโฟโตเมตรี พบว่า Pydpa-Zn, Es-Zn และ Es-Cu มีความจำเพาะต่อ PPI ได้ค่าคงที่การจับ ($\log K$) ของ Pydpa-Zn, Es-Zn และ Es-Cu กับ PPI เท่ากับ 8.83, 5.23 และ 4.64 ตามลำดับ นอกจากนี้ได้นำ PCA มาใช้แยกประเภทของนิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นที่น่าสนใจว่าข้อมูลที่ศึกษาได้จากการใช้เซนเซอร์แอเรย์ Pydpa-Zn / Es-Zn หรือ Es-Zn / Es-Cu พบว่า สามารถแยกแยะกลุ่มของนิวคลีโอไทด์ ATP, UTP, ADP, UDP และ GDP ได้อย่างชัดเจน

คำสำคัญ: การวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก นิวคลีโอไทด์ เซนเซอร์

Abstract

This research aims to design and synthesize sensors containing pyrene and coumarin derivatives (**Pydpa** and **Es**) and then apply the sensory molecule to discriminate various nucleotides in aqueous solution by Principle Component Analysis (PCA). Initially, the complexation of **Pydpa-Zn**, **Pydpa-Cu**, **Es-Zn**, and **Es-Cu** were prepared as the sensory molecules to coordinate the phosphate anion based nucleotides undergone the electrostatic interaction. The complexation studies of sensors were carried out by Fluorescence Spectrophotometry. It was found that **Pydpa-Zn**, **Es-Zn**, and **Es-Cu** showed selectively to PPI. The log *K* values of **Pydpa-Zn**, **Es-Zn**, and **Es-Cu** towards PPI were 8.83, 5.23 and 4.64, respectively. In addition, PCA analysis was applied to classify the types of nucleotides. Interestingly, the combinatorial data obtained by the sensor arrays of **Pydpa-Zn** / **Es-Zn** or **Es-Zn** / **Es-Cu** in the attribution of PCA method could obviously discriminate ATP, UTP, ADP, UDP and GDP.

Keywords: Pricipal Component Analysis (PCA), Nucleotide, Sensor

บทนำ

นิวคลีโอไทด์เป็นโครงสร้างพื้นฐานของดีเอ็นเอที่พบในสิ่งมีชีวิต และมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโต การทำงานของอวัยวะต่างๆ อีกทั้งมีหน้าที่ซ่อมแซมเซลล์ที่ถูกทำลาย รวมถึงการเผาผลาญพลังงานในระดับเซลล์ ดังนั้นการตรวจวัดโมเลกุลนิวคลีโอไทด์จึงเป็นกุญแจสำคัญสำหรับตรวจวินิจฉัยโรค [1] ในปัจจุบันการออกแบบและสังเคราะห์โมเลกุลเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดสารจำพวกนิวคลีโอไทด์นั้น จะพิจารณาจากโครงสร้างพื้นฐานของ นิวคลีโอไทด์ซึ่งประกอบด้วย 3 ส่วนหลักๆ คือ น้ำตาล เบส และหมู่ฟอสเฟต จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า หมู่ฟอสเฟตสามารถจับกับโลหะสังกะสี [2] และคอปเปอร์ [3] ได้ดี จึงนำเอาสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะคอปเปอร์ หรือสังกะสีมาใช้ตรวจวัดนิวคลีโอไทด์ แล้วติดตามการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย [4] หรือสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ [5-6] อย่างไรก็ตามการตรวจวัดนิวคลีโอไทด์ด้วยสารประกอบเชิงซ้อนของคอปเปอร์ หรือสังกะสีนั้น จะให้ความจำเพาะกับหมู่ฟอสเฟตเพียงหมู่เดียวส่งผลให้ไม่สามารถจำแนกชนิดของ

นิวคลีโอไทด์ได้ [4] เพื่อให้มีความจำเพาะเจาะจงต่อชนิดของนิวคลีโอไทด์เพิ่มขึ้น จึงได้มีการพัฒนาการตรวจวัดโดยใช้เซนเซอร์มากกว่าหนึ่งชนิดมาร่วมวิเคราะห์กลุ่มของสารตัวอย่าง [7] ซึ่งเทคนิคนี้เรียกว่า “เซนเซอร์แอเรย์” เพื่อความสะดวกในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้ ได้มีการนำเอากระบวนการทางคณิตศาสตร์มาช่วยวิเคราะห์ ซึ่งกระบวนการคณิตศาสตร์นี้คือ การวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (Principal Component Analysis, PCA)

ในปัจจุบันมีผู้ให้ความสนใจในกระบวนการนี้เป็นอย่างมาก เนื่องจากสามารถใช้แยกประเภทของสารที่มีลักษณะคล้ายคลึงกัน เช่น โลหะ [7-9] และโปรตีน [10] หรือแม้กระทั่งนิวคลีโอไทด์ ยกตัวอย่างเช่น ในงานวิจัยของ Severin [11] ได้ศึกษาการตรวจวัดนิวคลีโอไทด์โดยอาศัยการแทนที่อินดิเคเตอร์ (multicomponent indicators displacement assay, MIDA) อินดิเคเตอร์ที่ใช้จะต้องมีความสามารถในการจับกับสารประกอบเชิงซ้อนโรเดียมได้แตกต่างกัน ซึ่งให้ค่าการดูดกลืนแสงที่แตกต่างกันด้วย แต่อย่างไรก็ตามการ

วิเคราะห์ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลนั้น มีข้อจำกัดคือ สีของสารตัวอย่างจะมีผลต่อการวิเคราะห์ทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาการตรวจวัดนิวคลีโอไทด์ โดยใช้กระบวนการทางคณิตศาสตร์ เพื่อแยกประเภทของนิวคลีโอไทด์ โดยสร้างเป็นเซนเซอร์แอเรีย ซึ่งจะใช้ข้อมูลที่ได้จากผลการทดลองทางฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปี โดยใช้เซนเซอร์ **Pydpa-Zn**, **Pydpa-Cu**, **Es-Zn** และ **Es-Cu**

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อใช้ในการแยกแยะประเภทของนิวคลีโอไทด์ โดยสร้างเป็นเซนเซอร์แอเรีย ซึ่งจะอาศัยกระบวนการคำนวณทางคณิตศาสตร์ในการวิเคราะห์

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การสังเคราะห์เซนเซอร์ **Pydpa-Zn** และ **Pydpa-Cu**

1.1 การเตรียมสาร **Pydpa**

Pydpa สังเคราะห์ในทำนองเดียวกับงานวิจัยของ Lucy A. Mullice [12] โดยเริ่มจากละลาย pyrenecarboxaldehyde 0.23 g, dipicolylamine 0.20 g และ sodium tris(acetoxy) borohydride 0.28 g ในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน 10 mL คนสารละลายผสมภายใต้บรรยากาศไนโตรเจนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 ชั่วโมง เติม sodium hydrogen carbonate เพื่อปรับให้สารละลายเป็นกลาง และสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน 3 ครั้ง ครั้งละ 30 mL กำจัดน้ำด้วย anhydrous sodium sulfate และระเหยตัวทำละลายให้แห้ง ทำผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ 5% เมทานอลในไดคลอโรมีเทน จะได้ของเหลวสีเหลืองของ **Pydpa** (0.36 g, 88%)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) : δ (in ppm) = 8.50 (d, J = 4.0 Hz, 2H-pyridine), 8.37 (d, J = 8.8 Hz, 1H-phenanthrene),

8.27 (s, 1H-phenanthrene), 8.25-8.01 (m, 7H-phenanthrene), 7.70 (t, J = 7.8 Hz, 2H-pyridine), 7.48 (d, J = 8.0 Hz, 2H-pyridine), 7.21 (t, J = 10.0 Hz, 2H-pyridine), 4.35 (s, 2H-methylrine), 3.81 (s, 4H-methylrine). $^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) : δ (in ppm) = 120.9, 148.6, 136.2, 124.1, 156.1, 60.1, 58.1, 127.0, 126.0, 126.6, 125.7, 126.3, 128.3, 133.4, 124.8, 124.5, 124.2, 134.9, 132.8 ESI-HRMS: calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{23}\text{N}_3$ m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 414.2048, found 414.2022. UV-Visible (DMSO): 315, 330, 347 nm. Fluorescence (DMSO): 379, 398 nm. ESI-HRMS: calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{23}\text{N}_3$ m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 414.2048, found 414.2022.

1.2 การเตรียมสาร **Pydpa-Zn**

ละลาย Zn (ClO_4) $_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.171 g ในตัวทำละลายเมทานอล 5 mL เติมลงในสารละลาย **Pydpa** 0.112 g ในตัวทำละลายเมทานอล 5 mL คนสารละลายผสมภายใต้บรรยากาศไนโตรเจนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตะกอนสีเหลืองอ่อนตกออกมา จากนั้นกรองตะกอนและล้างตะกอนด้วยเมทานอลเย็น จะได้ **Pydpa-Zn** (0.21 g, 100%)

$^1\text{H-NMR}$ spectrum (400 MHz, DMSO- d_6) : δ (in ppm) = 8.71 (s, 2H-pyridine), 8.45-8.13 (m, 9H-phenanthrene), 7.94 (d, J = 9.2 Hz, 2H-pyridine), 7.68 (t, J = 6 Hz, 2H-pyridine), 7.56 (d, J = 6.4 Hz, 2H-pyridine), 4.55 (s, 2H-methylene), 4.35 (d, J = 15.2 Hz, 2H-methylene), 3.69 (d, J = 15.6 Hz, 2H-methylene). $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum (400 MHz, DMSO- d_6) : δ (in ppm) = 154.1, 147.6, 140.5, 130.9, 130.7, 130.6, 130.5, 129.9, 128.0, 127.9, 127.2, 126.4, 125.8, 125.7, 125.3, 124.8, 124.7, 124.6, 124.0, 123.7, 122.6, 55.6, 51.9 UV-Visible (DMSO): 315, 330, 347

nm. Fluorescence (DMSO): 379, 396 nm. ESI HRMS: calcd for $C_{29}H_{23}N_3Cl_3O_{12}Zn$ m/z $[M+(ClO_4)_3]^-$ 773.9639, found 773.9829.

1.3 การเตรียมสาร Pydpa-Cu

ละลาย $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.05 g ในตัวทำละลายเมทานอล 5 mL เติมลงในสารละลาย Pydpa 0.078 g ในตัวทำละลายเมทานอล 5 mL คนสารละลายผสมภายใต้บรรยากาศไนโตรเจนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตะกอนสีเขียวอ่อนจะตกออกมา จากนั้นกรองตะกอนและล้างตะกอนด้วยเมทานอลเย็น จะได้ **Pydpa-Cu** (0.90 g, 100%)

UV-Visible (DMSO): 320, 333, 350 nm. Fluorescence (DMSO): 384, 402, 475 nm. ESI-HRMS: calcd for $C_{29}H_{23}N_3$ m/z $[M+H]^+$ 569.1320, found 568.9213.

2. การศึกษาสมบัติการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของเซนเซอร์ **Esculetin** กับแคตไอออน (Zn^{2+} และ Cu^{2+}) โดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิล โทเทรชัน

ในการศึกษาจะเตรียมสารละลายตั้งต้นของสาร **Esculetin** ที่ความเข้มข้น 0.001 M ในขวดวัดปริมาตร 5 mL ใน DMSO และเจือจางสารละลายนี้ด้วยบัฟเฟอร์ HEPES ความเข้มข้น 0.01 M pH 7.4 สำหรับใช้ในการโทเทรต ให้มีความเข้มข้น 5×10^{-5} M เตรียมความเข้มข้นของ Zn^{2+} และ Cu^{2+} เท่ากับ 0.001M ในการบันทึกกราฟของยูวี-วิสิเบิล บันทึกความยาวคลื่นตั้งแต่ 200-800 nm ที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้คิวเวตต์ขนาดเซลล์เท่ากับ 1 cm จากนั้นจะเริ่มบันทึกกราฟของยูวีวิสิเบิลหลังจากเติมแคตไอออนลงไป 1 นาที

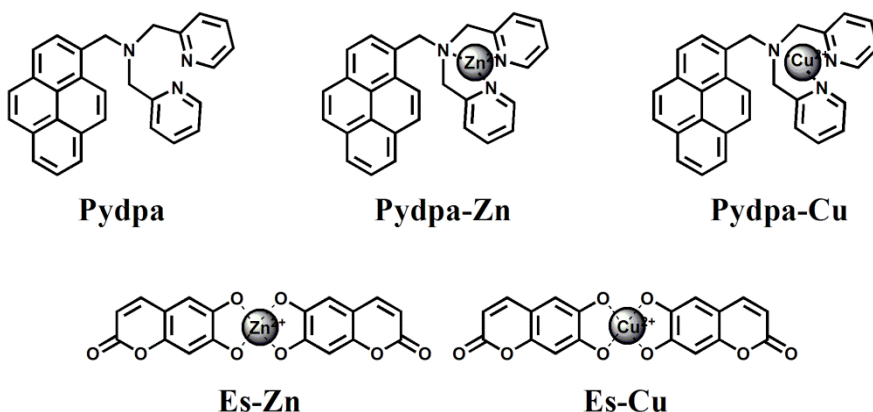
3. การศึกษาสมบัติการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของเซนเซอร์ **Pydpa-Zn, Pydpa-Cu, Es-Zn และ Es-Cu** กับ นิวคลีโอไทด์ ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ สเปกโตรโฟโตเมตรี

เตรียมสารละลายตั้งต้นของสาร **Pydpa-Zn** และ **Pydpa-Cu** เท่ากับ 0.001 M และ stock solution ของสาร **Es-Zn** และ **Es-Cu** ความเข้มข้น 5×10^{-4} M ในขวดวัดปริมาตร 5 mL เตรียม stock solution ของนิวคลีโอไทด์ (PPI, ATP, ADP, AMP, UTP, UDP, UMP, GDP, GMP, CMP) ความเข้มข้น 0.001 M ในสารละลายบัฟเฟอร์ HEPES ความเข้มข้น 0.01 M pH 7.4 ในการทดลองจะเตรียมสารละลายใส่ในคิวเวตต์ขนาดเซลล์เท่ากับ 1 cm ความเข้มข้นสุดท้ายของ **Pydpa-Zn, Pydpa-Cu, Es-Zn และ Es-Cu** เท่ากับ 1×10^{-5} M ปริมาตรรวม 2 mL เติมนิวคลีโอไทด์ลงไปเป็น 10 เท่าของ **Pydpa-Zn, Pydpa-Cu, Es-Zn และ Es-Cu** นำข้อมูลที่ได้มาหาค่าคงที่ของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน ($\log K$) ระหว่างเซนเซอร์กับ PPI โดยใช้โปรแกรม Solver

ผลการวิจัย

การออกแบบเซนเซอร์ **Pydpa-Zn, Pydpa-Cu, Es-Zn และ Es-Cu**

ในงานวิจัยนี้ได้ออกแบบเซนเซอร์ **Pydpa-Zn, Pydpa-Cu, Es-Zn และ Es-Cu** เพื่อใช้ในการตรวจวัดนิวคลีโอไทด์ แสดงดังภาพที่ 1 การสังเคราะห์ **Pydpa** สามารถสังเคราะห์ได้จากการนำโมเลกุลไพรีนอัลดีไฮด์ทำปฏิกิริยากับไดฟีโคลิลเอมีน จากนั้นนำ **Pydpa** ที่สังเคราะห์ได้มาเตรียมสารประกอบเชิงซ้อนกับซิงค์และคอปเปอร์ไอออน ได้ผลิตภัณฑ์ของ **Pydpa-Zn และ Pydpa-Cu** เป็นของแข็งสีเหลืองอ่อนและสีเขียวอ่อนตามลำดับ

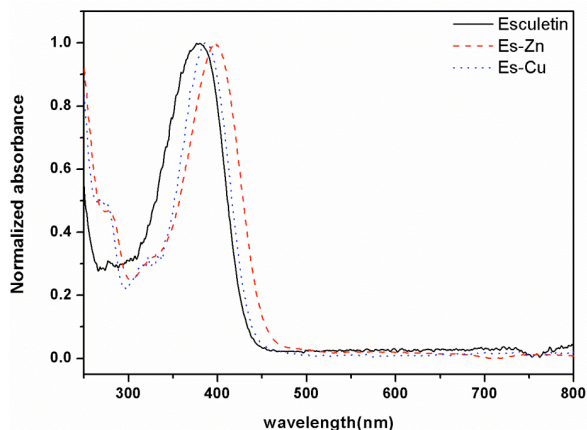


ภาพที่ 1 โมเลกุล **Pydpa**, **Pydpa-Zn**, **Pydpa-Cu**, **Es-Zn** และ **Es-Cu**

การศึกษาสมบัติการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของเซนเซอร์ **Esculetin** กับแคตไอออน (Zn^{2+} และ Cu^{2+}) โดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตเมทรี

Esculetin (Es) มีหมู่ไดโอรเป็นองค์ประกอบซึ่งสามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับไอออนของโลหะแทรนซิชันได้ ดังนั้นจึงได้ศึกษาสมบัติการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของ **Esculetin** กับซิงค์และคอปเปอร์ไอออน โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตเมทรี โดย **Esculetin** จะให้ค่าการดูด

กลืนแสงที่ความยาวคลื่น 380 nm จากผลการทดลองจะพบการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนคลื่นแสงเคลื่อนไปทางความยาวคลื่นสูงขึ้น (red shift) อย่างชัดเจนเมื่อเติมซิงค์และคอปเปอร์ไอออนลงไป ในสารละลาย **Esculetin** ซึ่งจะพบการดูดกลืนแสงของ **Es-Zn** และ **Es-Cu** ที่ความยาวคลื่น 398 nm และ 387 nm ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า **Esculetin** สามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับซิงค์และคอปเปอร์ไอออนได้

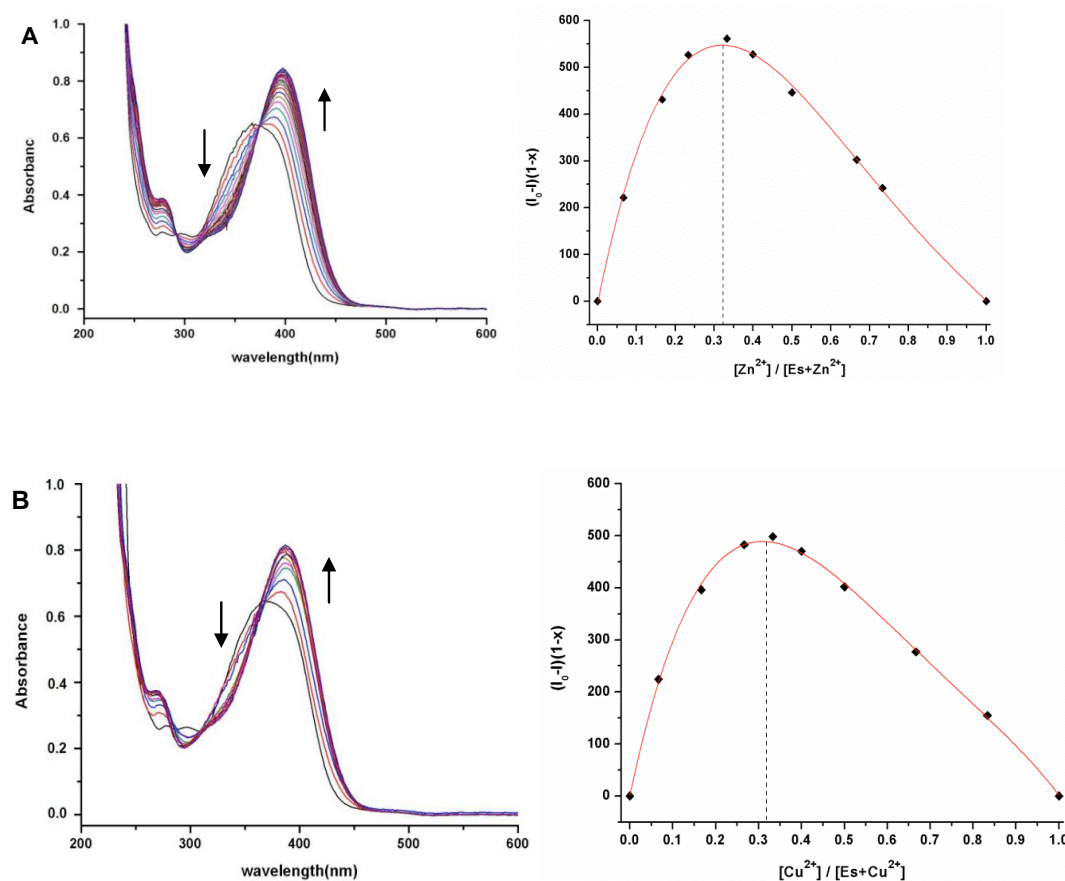


ภาพที่ 2 การดูดกลืนแสงของ **Es-Zn** และ **Es-Cu** (1×10^{-5} M) ที่ความยาวคลื่น 398 nm และ 387 nm ตามลำดับ ในสารละลายบัฟเฟอร์ HEPES 0.01 M pH 7.4

การศึกษาสมบัติการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของเซนเซอร์ **Esculetin** กับแคตไอออน (Zn^{2+} และ Cu^{2+}) โดยเทคนิค ยูวี-วิสิเบิล โทเทรชัน และศึกษาอัตราส่วนในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง **Esculetin** กับแคตไอออน

การไทเทรตระหว่าง **Esculetin** กับแคตไอออน (Zn^{2+} และ Cu^{2+}) ได้ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 3

พบการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงของ **Es-Zn** และ **Es-Cu** ที่ความยาวคลื่น 398 nm และ 387 nm ตามลำดับ นอกจากนี้อัตราส่วนในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง **Esculetin** กับแคตไอออน (Zn^{2+} และ Cu^{2+}) เท่ากับ 2 ต่อ 1 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมา [2]



ภาพที่ 3 การไทเทรตและอัตราส่วนในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง **Esculetin** กับซิงค์ (A) และ คอปเปอร์ไอออน (B) ในบัฟเฟอร์ HEPES 0.01 M pH 7.4

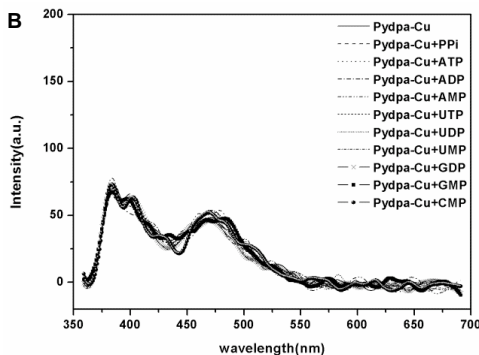
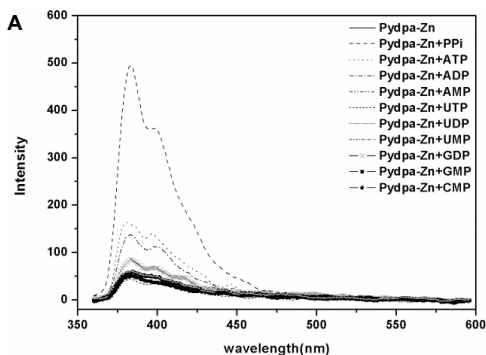
การศึกษาสมบัติการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของเซนเซอร์ Pydpa-Zn, Pydpa-Cu, Es-Zn และ Es-Cu กับนิวคลีโอไทด์ โดยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ สเปคโตรโฟโตเมทรี

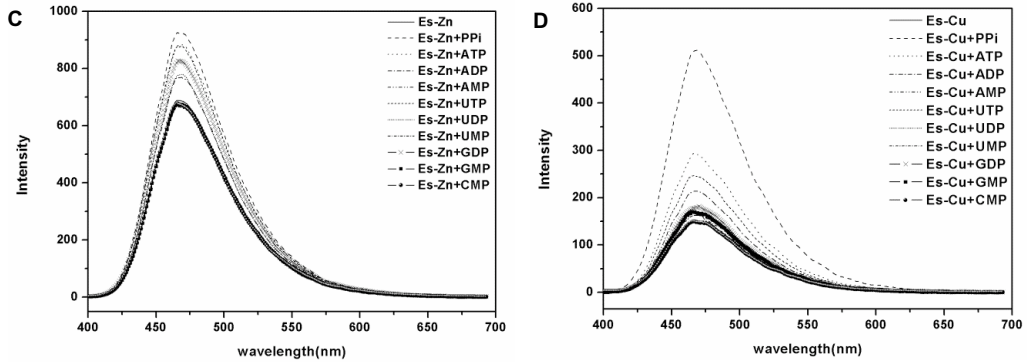
จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า ไอออนของโลหะแทรนซิชันโดยเฉพาะซิงค์และคอปเปอร์สามารถโคออร์ดิเนตกับหมู่ฟอสเฟตของนิวคลีโอไทด์ได้ [13] ดังนั้น การศึกษาสมบัติการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของเซนเซอร์ **Pydpa-Zn, Pydpa-Cu, Es-Zn และ Es-Cu** กับนิวคลีโอไทด์ แสดงดังภาพที่ 4

เซนเซอร์ **Pydpa-Zn** จะเกิดการคายแสงที่ความยาวคลื่น 384 nm และเมื่อเติม PPI ลงไปในสารละลายจะเห็นการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน นอกจากนี้ยังพบการเพิ่มขึ้นของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เล็กน้อย เมื่อเติม ATP, ADP และ GDP ตามลำดับ ในขณะที่นิวคลีโอไทด์อื่นๆ ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงซึ่งแสดงให้เห็นว่าเซนเซอร์ **Pydpa-Zn** มีความจำเพาะเจาะจงกับ PPI >> ATP > ADP > GDP แสดงดังภาพที่ 4A และค่าคงที่ในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน (log K) ระหว่าง **Pydpa-Zn** กับ PPI เท่ากับ 8.83 และอัตราส่วนในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง **Pydpa-Zn** กับ PPI เป็น 2 ต่อ 1 ในกรณีของเซนเซอร์ **Pydpa-Cu**

จะพบพีคที่ 475 nm ซึ่งเป็นตำแหน่ง excimer ของไพรีน และไม่สามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับนิวคลีโอไทด์ได้ เนื่องจาก Cu^{2+} ไม่มีออร์บิทัลว่างพอที่จะโคออร์ดิเนตกับนิวคลีโอไทด์แสดงดังภาพที่ 4B

สำหรับเซนเซอร์ **Es-Zn และ Es-Cu** จะเกิดการคายแสงที่ความยาวคลื่น 470 nm และ 468 nm ตามลำดับ ภาพที่ 4C แสดงการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของเซนเซอร์ **Es-Zn** เพิ่มขึ้นเมื่อเติมนิวคลีโอไทด์ลงไปในสารละลายจากการทดลองสามารถแยกนิวคลีโอไทด์ออกเป็นกลุ่มได้ดังนี้ PPI, ไตรฟอสเฟต (ATP, UTP), ไดฟอสเฟต (ADP, UDP, GDP) และมोनอฟอสเฟต (AMP, UMP, GMP, CMP) ในส่วนของเซนเซอร์ **Es-Cu** จะพบการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์อย่างชัดเจน เมื่อเติม PPI สำหรับ ATP, UTP และ ADP และมีการเพิ่มขึ้นของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เล็กน้อยแสดงดังภาพที่ 4D ค่าคงที่ในการจับ (log K) ระหว่าง **Es-Zn และ Es-Cu** กับ PPI เท่ากับ 5.23 และ 4.64 ตามลำดับ และอัตราส่วนในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง **Es-Zn และ Es-Cu** กับ PPI เป็น 1 ต่อ 1

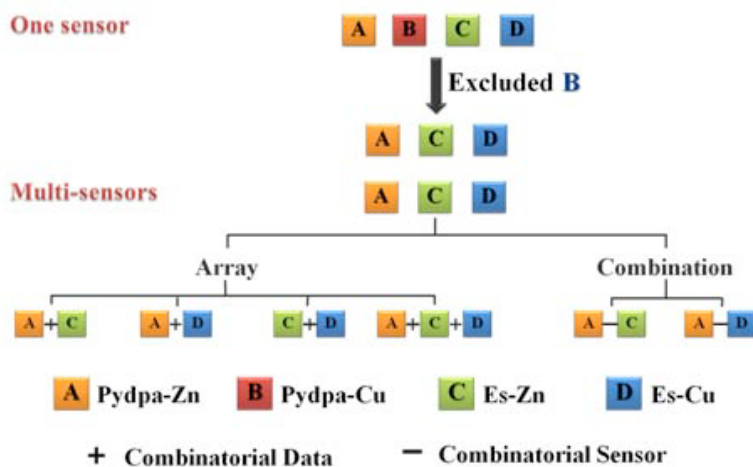




ภาพที่ 4 ฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัมเมื่อเติมนิวคลีโอไทด์เป็น 10 เท่า ของ A) **Pydpa-Zn**, B) **Pydpa-Cu**, C) **Es-Zn** และ D) **Es-Cu**

พิจารณาการตรวจวัดนิวคลีโอไทด์ด้วยเซนเซอร์ทั้งหมด (**Pydpa-Zn**, **Pydpa-Cu**, **Es-Zn** และ **Es-Cu**) พบว่าเซนเซอร์ส่วนใหญ่มีความจำเพาะเจาะจงกับ PPI ในขณะที่ **Pydpa-Cu** ไม่สามารถใช้เป็นเซนเซอร์ในการตรวจจับนิวคลีโอไทด์ได้ เนื่องจากไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เมื่อเติมนิวคลีโอไทด์ จากข้อมูลเหล่านี้เราสามารถตรวจวัดนิวคลีโอไทด์โดยแยก PPI ออกมาได้โดยใช้เทคนิคฟลูออเรสเซนซ์

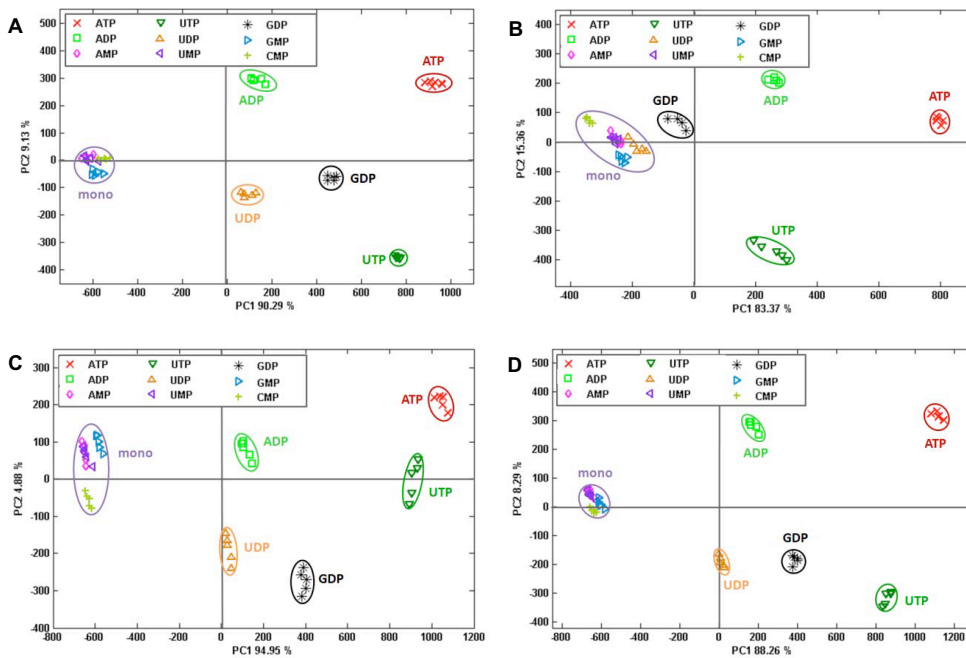
สเปกโทร สโกปี ในขณะที่นิวคลีโอไทด์ชนิดอื่นแยกได้ไม่ชัดเจน ดังนั้นจึงใช้เทคนิค Principal component analysis (PCA) เข้ามาช่วยในการจำแนกประเภทของนิวคลีโอไทด์ชนิดต่างๆ ซึ่ง PCA เป็นขั้นตอนทางคณิตศาสตร์ เพื่อใช้ในการลดจำนวนของข้อมูลในการวิเคราะห์ให้น้อยลง โดยยังคงข้อมูลเดิมทั้งหมด ซึ่งรูปแบบในการพิจารณาเป็นดังภาพที่ 5



ภาพที่ 5 ขั้นตอนในการจำแนกประเภทของนิวคลีโอไทด์ โดยใช้ Principal component analysis (PCA)

การนำหลักการทางสถิติมาประยุกต์ใช้ในการจำแนกนิวคลีโอไทด์ จะใช้ข้อมูลฟลูออเรสเซนซ์ที่ได้จากการศึกษาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเซนเซอร์ **Pydpa-Zn**, **Es-Zn** และ **Es-Cu** กับนิวคลีโอไทด์ จากการศึกษาข้างต้นพบว่าเซนเซอร์ส่วนใหญ่สามารถแยก **PPi** ออกจากนิวคลีโอไทด์อื่นๆ ได้อย่างชัดเจน แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์อื่นได้ ดังนั้นจึงใช้หลักการของ PCA เข้ามาช่วยในการแยกประเภทของนิวคลีโอไทด์ โดยจะไม่นำข้อมูลของ **PPi** มาพิจารณา ภาพที่ 6 แสดง PCA score plot

ของเซนเซอร์แอเรียรี **Pydpa-Zn / Es-Zn**, **Pydpa-Zn / Es-Cu**, **Es-Zn / Es-Cu** และ **Pydpa-Zn / Es-Zn / Es-Cu** จากผลของ PCA plot พบว่า **Pydpa-Zn / Es-Zn**, **Es-Zn / Es-Cu** และ **Pydpa-Zn / Es-Zn / Es-Cu** สามารถแยกนิวคลีโอไทด์ ATP, ADP, UTP, UDP และ GDP ได้อย่างชัดเจน ซึ่งจากผลของ PCA พบว่าการจำแนกประเภทนิวคลีโอไทด์ไม่จำเป็นต้องใช้เซนเซอร์ทั้งหมด เพียงแค่สองเซนเซอร์ก็สามารถแยกได้ โดยใช้เซนเซอร์แอเรียรี **Pydpa-Zn / Es-Zn** หรือ **Es-Zn / Es-Cu** ดังภาพที่ 6A และ 6C



ภาพที่ 6 PCA score plot ของเซนเซอร์แอเรียรี A) **Pydpa-Zn / Es-Zn**, B) **Pydpa-Zn / Es-Cu** C) **Es-Zn / Es-Cu** และ D) **Pydpa-Zn / Es-Zn / Es-Cu**

นอกจากนี้พบว่า เซนเซอร์ **Pydpa** และ **Es** ที่จับกับ Zn^{2+} และ Cu^{2+} มีความสามารถในการจับกับนิวคลีโอไทด์ได้แตกต่างกัน ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้สร้างเซนเซอร์ใหม่ขึ้น เพื่อศึกษาอัตราในการแข่งขันการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับนิวคลีโอไทด์ และใช้หลักการ PCA จำแนกประเภทนิวคลีโอไทด์

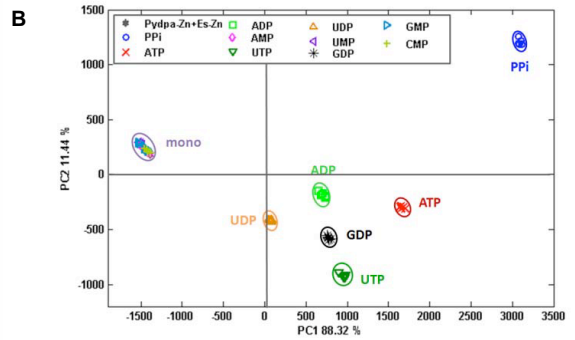
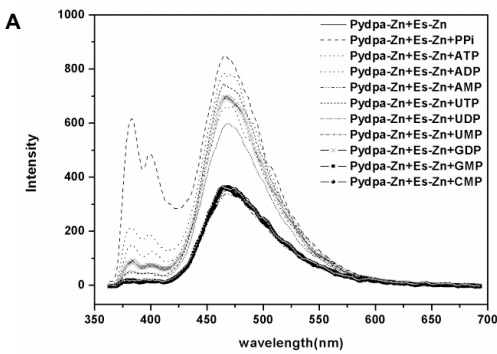
โดยนำเซนเซอร์ **Pydpa-Zn** ผสมกับ **Es-Zn** (**Pydpa-Zn+Es-Zn**) และ **Pydpa-Zn** ผสมกับ **Es-Cu** (**Pydpa-Zn+Es-Cu**)

สำหรับเซนเซอร์ **Pydpa-Zn+Es-Zn** ได้กระตุ้นที่ความยาวคลื่น 346 nm และให้สัญญาณการคายแสงที่ 383 nm และ 470 nm

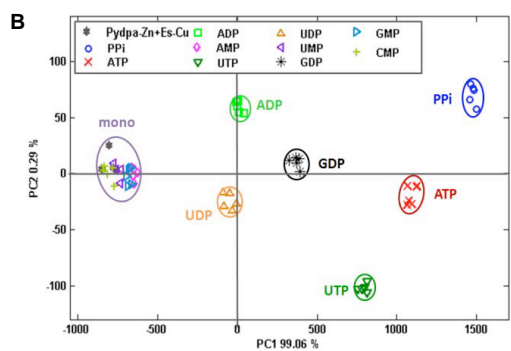
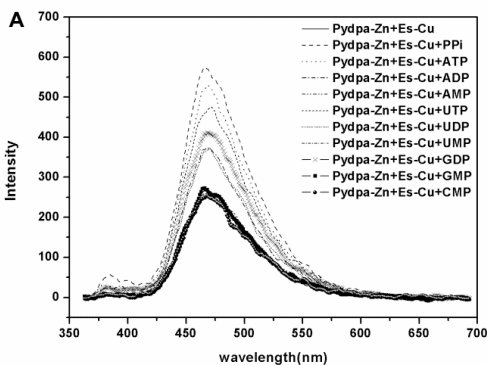
ซึ่งเป็นตำแหน่งของ **Pydpa-Zn** และ **Es-Zn** ตามลำดับ เมื่อเติมนิวคลีโอไทด์ลงไปพบว่า PPI จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของทั้งสองฟิคอย่างชัดเจน ในขณะที่นิวคลีโอไทด์อื่นๆ จะให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เล็กน้อยแสดงดังรูป 7A สำหรับเซนเซอร์ **Pydpa-Zn+Es-Cu** จะเกิดการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เฉพาะฟิคที่ 468 nm เมื่อเติมนิวคลีโอไทด์ลงไปในการละลาย ซึ่งเป็นตำแหน่งของ **Es-Cu** แสดงดังภาพที่ 8A

นอกจากนี้ผลจาก PCA plot ของ **Pydpa-Zn+Es-Zn** สามารถแยกประเภทของนิวคลีโอไทด์ได้

เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ PPI, ไต-ไตรฟอสเฟต (ATP, ADP, UTP, UDP และ GDP) และมอนอฟอสเฟต (AMP, UMP, GMP และ CMP) แสดงดังภาพที่ 7B สำหรับกรณีของ **Pydpa-Zn+Es-Cu** ผลจาก PCA plot สามารถแยกแยะประเภทของนิวคลีโอไทด์ได้อย่างชัดเจน ได้แก่ PPI, ATP, ADP, UTP, UDP และ GDP แสดงดังภาพที่ 8B จากผลการทดลองทั้งหมดพบว่า เซนเซอร์ทั้งหมดชอบที่จะจับกับฟอสเฟตตั้งแต่ 2 หน่วยขึ้นไป จึงทำให้เซนเซอร์ทุกตัวไม่สามารถจับกับกลุ่มของมอนอฟอสเฟตได้



ภาพที่ 7 A) ฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัมและ B) PCA plot ของ **Pydpa-Zn+Es-Zn**



ภาพที่ 8 A) ฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัมและ B) PCA score plot ของ **Pydpa-Zn+Es-Cu**

สรุปและอภิปรายผล

ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการสังเคราะห์ **Pydpa-Zn** และ **Pydpa-Cu** ในการศึกษาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง **Esculetin** กับโลหะแทรนซิชัน Zn^{2+} และ Cu^{2+} โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรสโกปีพบว่าอัตราส่วนในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนเป็น 2:1 ระหว่าง **Esculetin** กับ Zn^{2+} และ Cu^{2+} จากนั้นนำเซนเซอร์ **Pydpa-Zn**, **Pydpa-Cu**, **Es-Zn** และ **Es-Cu** ที่สังเคราะห์ได้มาศึกษาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับนิวคลีโอไทด์ชนิดต่างๆ ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าเซนเซอร์ **Pydpa-Zn**, **Es-Zn** และ **Es-Cu** มีความจำเพาะต่อ PPI แต่สำหรับนิวคลีโอไทด์อื่นๆ จะใช้การวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (Principal component analysis, PCA) ช่วยในการแยกประเภทของนิวคลีโอไทด์ โดยการสร้างเป็นเซนเซอร์แอรเรย์ ซึ่งจะใช้ข้อมูลในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของเซนเซอร์แต่ละชนิดกับนิวคลีโอไทด์ พบว่า เพียงสองเซนเซอร์ก็สามารถแยกนิวคลีโอไทด์อื่นๆ ออกจากกันได้อย่างชัดเจนคือ **Pydpa-Zn / Es-Zn** หรือ **Es-Zn / Es-Cu**

เอกสารอ้างอิง

- [1] K. Lee, H. Lee, K. H. Bae, T. G. Park. (2010). Heparin Immobilized Gold Nanoparticles for Targeted Detection and Apoptotic Death of Metastatic Cancer Cells, *Biomaterials*. 31: 6530-6536.
- [2] L. Zhang, S. Dong, L. Zh. (2007). Fluorescent Dyes of the Esculetin and Alizarin Families Respond to Zinc Ions Ratiometrically, *Chemical. Communication*: 1891-1893.
- [3] Z. Guo, W. Zhu, H. Tian. (2010). Hydrophilic Copolymer Bearing Dicyanomethylene-4H-pyran Moiety as Fluorescent Film Sensor for Cu^{2+} and Pyrophosphate Anion, *Macromolecules*. 43: 739-744.
- [4] S. Khatua, S. H. Choi, J. Lee, K. Kim, Y. Do, D. G. Churchill. (2009). Aqueous Fluorometric and Colorimetric Sensing of Phosphate Ions by a Fluorescent Dinuclear Zinc Complex, *Inorganic Chemistry*. 48: 2993-2999.
- [5] W. H. Chen, Y. Xing, Y. Pang. (2011). A Highly Selective Pyrophosphate Sensor Based on ES IPT Turn-On in Water, *Organic Letter*. 13: 1362-1365.

ส่วนกรณีของการสร้างเซนเซอร์ใหม่ระหว่าง **Pydpa-Zn** และ **Es-Cu** (**Pydpa-Zn+Es-Cu**) สามารถแยกแยะประเภทของนิวคลีโอไทด์ได้อย่างชัดเจนคือ PPI, ATP, ADP, UTP, UDP และ GDP นอกจากนี้ในการศึกษาค่าคงที่ในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเซนเซอร์กับ PPI ($\log K$) เท่ากับ 8.83, 5.23 และ 4.64 สำหรับ **Pydpa-Zn**, **Es-Zn** และ **Es-Cu** กับ PPI ตามลำดับ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณโครงการพัฒนากำลังคนด้านวิทยาศาสตร์

(ทุนเรียนดีวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย) ที่ให้ทุนการศึกษา และขอขอบคุณ สกว. และ สกอ. (RMU 5380003) ในการให้ทุนสนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบพระคุณหน่วยวิจัยเคมีซูปรา (Supramolecular Chemistry Research Unit) ภาควิชาเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้เอื้อเฟื้ออุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีที่จำเป็นต่างๆ ที่ทำให้การวิจัยสำเร็จไปได้ด้วยดี

- [6] Y. Kurishita, T. Kohira, A. Ojida, I. Hamachi. (2010). Rational Design of FRET-Based Ratiometric Chemosensors for in Vitro and in Cell Fluorescence Analyses of Nucleoside Polyphosphates. *Journal of American Chemical Society*. 132: 13290–13299.
- [7] M. A. Palacios, Z. Wang, V. A. Montes, G. V. Zyryanov, A. Jr. Pavel. (2008). Rational Design of a Minimal Size Sensor Array for Metal ion Detection. *Journal of American Chemical Society*. 130: 10307–10314.
- [8] S. S. Tan, S. J. Kim, E. T. Kool. (2011). Differentiating Between Fluorescence-Quenching Metal Ions with Polyfluorophore Sensors Built on a DNA Backbone. *Journal of American Chemical Society*. 133: 2664–2671.
- [9] S. Rochat, K. Severin. (2010). Pattern-Based Sensing with Metal-Dye Complexes: Sensor Arrays Versus Dynamic Combinatorial Libraries. *Journal of Combinatorial Chemistry*. 12: 595–599.
- [10] N. Niamnont, R. Mungkarndee, I. Techakriengkrai, P. Rashatasakhon, M. Sukwattanasinitt. (2010). Protein Discrimination by Fluorescent Sensor Array Constituted of Variously Charged Dendritic Phenylene-Ethynylene Fluorophores, Biosensors and Bioelectronics. 26: 863–867.
- [11] A. Buryak, A. Pozdnoukhov, K. Severin. (2007). Pattern-Based Sensing of Nucleotides in Aqueous Solution with a Multicomponent Indicator Displacement Assay, Chemical. Communication: 2366–2368.
- [12] L. A. Mullice, R. H. Laye, L. P. Harding, N. J. Buurm, S. J. A. Pope. (2008). Rhenium Complexes of Chromophore-Appended Dipicolylamine Ligands: Syntheses, Spectroscopic Properties, DNA Binding and X-ray Crystal Structure. *New Journal of Chemistry*. 32: 2140–2149.
- [13] A. Shin, K. Eiichi. (2000). Highly Selective Recognition of Thymidine Mono- and Diphosphate Nucleotides in Aqueous Solution by Ditopic Receptors Zinc(II)-Bis(cyclen) Complexes (Cyclen) 1,4,7,10-tetraazacyclododecane. *Journal of American Chemical Society*. 12: 4542–4548.