

Paper Disk를 지지체로 이용한 Oligodeoxyribonucleotides 화학적 합성

魯鳳五* · 金成俊† · 申大鉉‡

조선대학교 사범대학 화학교육

†조선대학교 자연과학대학 유전공학과

‡충남대학교 자연과학대학 화학과

(1992. 8. 13 접수)

Chemical Synthesis of Oligodeoxyribonucleotides Using Paper Disk as a Support

Bong-Oh Ro*, Sung-Jun Kim†, and Dae-Hyun Shin‡

Department of Science Education(Chemistry), Chosun Univ., Kwangju 501-759, Korea

†Department of Genetic Engineering, Chosun Univ., Kwangju 501-759, Korea

‡Department of Chemistry, Chungnam National Univ., Daejeon 305-764, Korea

(Received August 13, 1992)

요 약. Whatmann chromatography paper(3MM)을 지지체로 사용하여 phosphite-triester법에 의해 미량의 염기가 부착된 5'-d(GAATTCGGCCA)와 5'-d(CGAGCTGTC)의 두 oligodeoxyribonucleotide를 합성하였다. Trityl yield 분석에 의하면 76.1%와 86.5%의 평균 coupling 수율을 각각 얻었다. 두 oligodeoxyribonucleotide들을 HPLC를 이용하여 분리 정제할 수 있었고 snake venom phosphodiesterase와 bacterial alkaline phosphatase에 의해 분리 정량화할 수 있었으며 이때의 염기의 수는 합성을 시도한 염기수와 일치했다. 이처럼 paper를 지지체로 이용한 oligodeoxyribonucleotide의 합성은 값싸고 동시에 많은 염기가 부착된 마량의 DNA를 빠르고 짧은 기간에 수행할 수 있는 장점이 있다.

ABSTRACT. The two deoxyribonucleotides, 5'-d(GAATTCGGCCA) and 5'-d(CGAGCTGTC), were synthesized on disks of Whatmann chromatography paper (3MM) by the phosphite-triester method. The average yield of the dodecamer and the nonamer that was measured by trityl analysis is 76.1% and 86.5% respectively. Separation of the synthesized oligodeoxyribonucleotides were purified by HPLC. The two oligodeoxymers' bases were quantified by HPLC with snake venom phosphodiesterase and bacterial alkaline phosphatase. The numbers of bases were equal to the designed ones. The advantage of using a paper disk as a support allows us to synthesize many different oligodeoxyribonucleotides during one synthesis. This method is the most convenient synthetic technique to synthesize oligodeoxyribonucleotides easily and inexpensively in a relatively short time.

서 론

Letsinger의 polystyrene을 이용한 최초의 oligodeoxyribonucleotide의 고상 합성의 시작은¹ 그 당시의 phosphodiester의 효과적인 활성화제의 부족으로 많이 사용되지 않다가 믿을만한 합성방법과 효율적인 정제방법이 개발됨으로써 많이 사용되고

있다. 이러한 고상방법으로 tetradecamer나 eicosamer까지 합성된 oligonucleotide들을 DNA ligase에 의해 514 염기쌍을 갖는 DNA duplex를 화학적으로 합성할 수 있으며² 최근에는 5'-phosphoramidite를 지지체로 연결하거나³ N-cytidine의 질소에 지지체를 부착시켜⁴ 효소적 방법이나⁵ chemical ligation^{6,7}에

의해서 두 가닥의 DNA 조각 합성에 성공하고 있다.

또한 핵산이 돌연변이성이나 암증을 유발할 수 있는 알킬화제로 처리된 알킬 phosphotriester⁸⁻¹⁰로 합성된 DNA, phosphorolytic enzyme의 mechanism 연구에 유용한 물질로 판명된 phosphorothioate와 유사하나 합성물질 등^{11,12} phosphate 골격을 변형시킨 합성물질 등이 있으며 유전자 발현의 조절에 성공적으로 사용된 기능기들의 합성 oligodeoxyribonucleotide 등이 있다^{14,15}.

이러한 합성 DNA는 유전자나 해당효소 또는 단백질과의 관계에 있어서 mechanism 연구, 유전자 자체의 구조결정과 기능에 관한 연구, 활성단백질의 active site와 구조-기능과의 관계 site-specific mutagenesis 분야 등 합성 DNA를 필요로 하고 있다.

본 실험은 nucleoside의 지지체로서 Whatmann chromatography paper(3MM)를 disk로 이용하여 nucleoside를 부착시킨 후 고상합성에 의해 3'에서 5'쪽으로 detritylation, coupling, oxidation, capping 단계를 반복하면서 원하는 염기 서열을 갖는 dodecamer와 nonamer의 두 oligodeoxyribonucleotides를 합성했다. 이렇게 phosphite-triester법에 의해서 oligomer를 합성한 후 지지체를 제거하여 deblocking시킴으로서, 시약과 시간이 절약될 수 있고 짧은 시간내에 미량의 많은 염기 서열을 갖는 oligodeoxyribonucleotides를 합성하여 HPLC를 이용하여 분리 정제 확인하고자 한다.

실 험

시약 및 기기. Monomer로는 N-blocked-5'-dimethoxytritylnucleoside-cyanoethylphosphoramidites(Sigma) 등을 정제된 pyridine으로 건조시킨 후 사용하였다. N-blocked-5'-dimethoxytrityl-2'-deoxyribonucleoside-3'-succinates는 합성된¹⁶ 것을 사용하였으며 1-mesitylenesulfonyl-3-nitro-1,2,4-triazole, acetonitrile, chloroform, dichloroacetic acid와 1,2-dichloroethane 등은 시판용 Aldrich 제품을 그대로 사용했다. 용매로 사용된 pyridine(Aldrich)은 정제 후 ninhydrin test로 일차 아민이 없는 것을 확인한 후 갈색병에 보관해 두었다가 사용하였다. 모든 초자기구는 argon으로 채운 vacuum dry oven에서

건조시켜 사용하였다. 특히 주사기는 물질이 다를 경우 다른 주사기로 사용하였다.

HPLC(Beckman), UV(Hewlett Paked 8452A)와 Column은 ODS-Hypersil을 각각 사용하였다.

염기서 support용 disk 제작. Oligodeoxyribonucleotide 합성에 사용될 disk들은 Whatman chromatography paper(3MM)를 10% glacial acetic acid로 24시간 세척 후 말려서 isopropanol : ammonia : water = 10 : 10 : 35(v/v/v) 혼합액에서 하루 동안 세척한 후 다시 하루 이상 담가두었다가 말렸다. 이때 반응 용기로 사용하는 column에 맞게 cork boror로 말려 두었던 Whatmann chromatography paper를 오려서 disk들을 만들어서 1,2-dichloroethane(DCE) 그리고 ether로 계속해서 각각 10분간 씻은 후 ether가 들어있는 beaker에서 휘저어 약간 부풀게한 후 공기중에 말렸다. 마지막으로 pyridine으로 세척 후 진공에서 건조시켜 4개의 병에 나누어 넣고 argon을 채워 잘 봉한 후 작은 비닐봉지에 넣어 사용할 때까지 -20°C에 보관했다.

Disk에 첫번째 염기 부착. 합성한 4-N-benzoyl-5'-dimethoxytrityl-2'-deoxycytidine-3'-succinate 50 mg와 6-N-benzoyl-5'-dimethoxy-2'-deoxyadenosine-3'-succinate 50 mg를 평량하여 작은 병에 각각 넣고 septum 고무 마개로 막고 주사기를 사용하여 정제된 pyridine 0.5 ml를 넣었다. 주사기 바늘을 꽂아서 argon을 넣은 후 speed vacuum concentrator에서 3시간 동안 건조시켰다. 두번 반복하여 argon을 충전시켜 vacuum desicator에 보관했다. -20°C에서 보관된 disk들을 꺼내서 0.7 ml의 pyridine, 0.46 ml의 1-mesitylenesulfonyl-3-nitro-1,2,4-triazole (MSNT) 용액 그리고 0.7 ml의 1-methylimidazole을 혼합했다. 이때 MSNT 용액은 사용직전 준비했다.

실온의 온도가 된 disk들을 5개씩 돌로 나누어 작은 flask에 넣고 desicator에 보관된 succinylation된 용액을 각각 넣었다. 각 disk들을 진공상태에서 pyridine으로 색깔이 없어질 때까지 씻고, 새로운 flask에 옮기고 argon으로 충전했다. 각 flask에 13 ml capping 시약[pyridine : acetic anhydride : 4-methyl aminopyridine = 4 : 1 : 0.5(v/v/v)]을 넣고 15분간 실온의 incubator에서 반응시켰다. 각각의 disk들을 진공상태에서 pyridine으로 5번 씻은 후

DCE, ether로 5번 씻었다. 이들을 ether가 들어있는 beaker에 옮기고 잘 씻은 후 공기중에 건조시켜 argon이 들어있는 flask에 넣어 -20°C 에 보관했다. 그 중 몇개는 trityl yield를 조사했다.

Monomer의 준비. 각 monomer 20 mg을 취해서 작은 병에 넣었다. 0.5 mg의 pyridine으로 녹인 후 주사기 바늘을 꽂아둔 후 speed vacuum하에서 1~2 시간 건조시켰다. 또 한번 반복하고 0.5 mg의 pyridine을 넣고 tin foil로 씌운 후 진공상태의 desiccator에 주사기 바늘을 빼지않고 보관했다. 사용 직전에는 drying tube를 통해서 argon을 desiccator에 넣은 후에 꺼내서 주사기 바늘을 뽑아내고 pyridine 0.5 ml에 녹여서 반응 용기로 사용되는 column에 넣기 전 계산된 MSNT 용액과 methylimidazole을 넣었다.

MSNT 용액 준비. MSNT 용액은 사용하기 직전에 준비했다. 500 ml의 flask에 1g의 MSNT를 넣고 2 ml의 pyridine을 넣어 argon으로 채운 후 rotary evaporator에서 건조시켰다. 두번 이상 반복한 후 고무 마개를 하고 argon을 채운 후 1 ml의 pyridine을 넣어 필요한 양을 사용했다.

Capping 용액. 10 ml의 acetic anhydride에 15 ml의 2,6-lutidine 용액과 6.5% 4-dimethylaminopyridine을 HPLC용 tetrahydrofuran 용액으로 조제해 두었다가 사용 직전에 두 용액을 0.75 ml, 0.25 ml씩 각각 혼합해서 사용했다.

Oxidation 용액. 2.6 g의 iodine, 80 ml의 tetrahydrofuran, 20 ml의 2,6-lutidine들을 2.0 ml의 물과 혼합해서 iodine 용액을 만들어 보관했다.

합성장치. 일정한 온도를 유지할 수 있는 물을 순환시킬 수 있도록 작은 condenser처럼 column (150 mm×12 mm)을 만들고 주사기 바늘을 사용할 수 있는 고무마개를 사용했다.

Oligodeoxyribonucleotides의 합성. -20°C 에 보관된 disk들을 핀셋으로 꺼내어 반응용기로 사용되는 두 개의 column에 넣고 정제된 pyridine으로 3번 이상 씻고 argon으로 씻은 후 40°C 의 일정한 온도의 물을 순환시키고 Table 1의 synthesis cycle 순서대로 진행했다.

원하는 염기 순서에 의한 monomer를 반응 순서 5에서 사용하여 반응 순서에 의해 1부터 반복했다.

Table 1. Synthesis cycle

Step	Operation	Time(min)
1	DCE wash	1
2	3% dichloroacetic acid/DCE wash	
3	DCE wash	1
4	pyridine wash	4
5	add monomer for 5 min and reaction	15
6	pyridine wash	3
7	add 1 ml-capping solution	2
8	add 1 ml-iodine solution	1
9	DCE wash	1
10	dry disk with argon gas	

마지막 cycle일 때는 disk를 작은 병에 넣고 argon 기체로 충전시켜 -20°C 에 보관했다.

Deblocking. Disk들이 들어있는 tube속에 진한 암모니아수를 넣고 한시간 이상 흔들어 준 후 원심분리 후 sintered glass funnel을 사용해서 여과 하면 3'-succinate가 가수분해되어 support가 분리되었다. 이때 색깔이 없어질 때까지 dioxane:water=1:1(v/v)로 씻었다. 여액에 진한 암모니아수를 넣고 55°C 물중탕에서 하룻밤 동안 방치했다가 다음날 낮은 진공으로부터 시작해서 건조시켰다. 여액을 살균된 물에 녹여서 원심분리 후 불용성 물질은 버리고 *n*-butanol에 녹여서 speed vacuum concentrator에서 이이 되게끔 건조시켰다.

장시간 보관시에는 진한 암모니아수를 넣어서 보관했다. 5'-trityl기만 남고 나머지는 모두 제거된다. 일부분의 용액을 UV, HPLC로 확인한 다음 산으로 처리했다.

결과 및 고찰

5'-d(GAATTCGGCCA)-3'와 5'-d(CGAGCT-GTC)-3' 두 oligodeoxyribonucleotides 합성. 본 실험의 고상합성은 5'-OH을 4,4'-dimethoxytriphenylmethylchloride(DMTr-Cl)로 protecting시키고 amino기를 benzoyl기로 protecting시킨 nucleotides를 다른 deoxyribonucleotides에 부착시키는 방법으로 dodecamer와 nonamer를 합성했다(Fig. 1). 여기서는 3'에서 5'으로 합성해 가기 때문에 dodecamer에서는 protected 2'-deoxyriboadenosine을, nonamer에서는 2'-deoxyribocytidine을 첫번째 염기로

서 disk들에 부착시켜 반응 용기로 사용되는 두 개의 column에 나누어 넣고 원하는 염기 순서에 의해 준비된 시약을 가지고 반응 cycle에 따라서 합성했다.

Detritylation에서는 protic acid보다 depurination이 적다는¹⁷⁻¹⁹ Lewis acid로 작용하는 zinc bromide를 사용하지 않고 3% dichloroacetic acid/DCE 용액을²⁰ 사용했다. 주황색이 없어질 때까지 사용했으며 depurination 때문에 많은 양은 사용하지 않았다. 또한 detritylation 용액으로는 acetic acid²¹, trichloroacetic acid²², phenylsulfuric acid²³, aluminium chloride²⁴ 등이 사용되고 있다.

5'에 붙어있는 trityl기를 coupling시키기 전에 제거시켜 trityl기의 양을 측정함으로써 단계별 합성 수율을 알 수 있다²⁵. Detritylation에서 얻어진 용액을 ethanol을 넣어 5 ml가 되게 한 후 perchlorate : ethanol = 3 : 2 (v/v) 용액에 녹여 500 nm에서 흡광도를 측정하는 것은 Table 2, 3과 같다.

Dodecamer에서는 7번째와 12번째에 흡광도가 낮은 것으로 보아서 6번째와 11번째에 capping이 잘못되었거나 coupling이 잘못되어 전체 수율이 76.1%였으며 단계별 수율은 96.6%로 양호한 편이었고 nonamer에서는 2번째와 8번째의 step yield가 100%가 넘는 것은 1번째와 7번째에서 capping이 잘못된 것으로 생각되며 평균 coupling 수율은 98.7%이며 capping이 잘못된 것을 제외한 수율은 86.5%였다.

Crea와 Horn^{26,27}에 의하여 cellulose가 oligodeoxyribonucleotide 합성의 support로 도입된 이래 Blocker²⁸ 등이 filter disk으로 합성하면서 cellulose disk 등을 활성화시켜 사용했으며 아주 미량을 필요로 하는 많은 염기가 부착된 합성에 많이 사용되고 있으며 Mattes²⁹ 등은 4개의 반응 column을 사용하여 254 bases가 부착된 oligomers를 합성하는데 성공했다.

보호기의 제거(deblocking). 본 실험에서는 진한 암모니아 용액에서 한시간 이상 흔들어서 여과시켜 disk들을 제거한 후 Sinha³⁰ 방법에 의해 진한 암모니아 용액에서 55°C의 온도로 하룻밤 동안 방치했다가 제거했다. 이때 DMTr을 제외한 모든 보호기들은 제거된다.

DMTr-oligodeoxyribonucleotide의 확인. 마지막

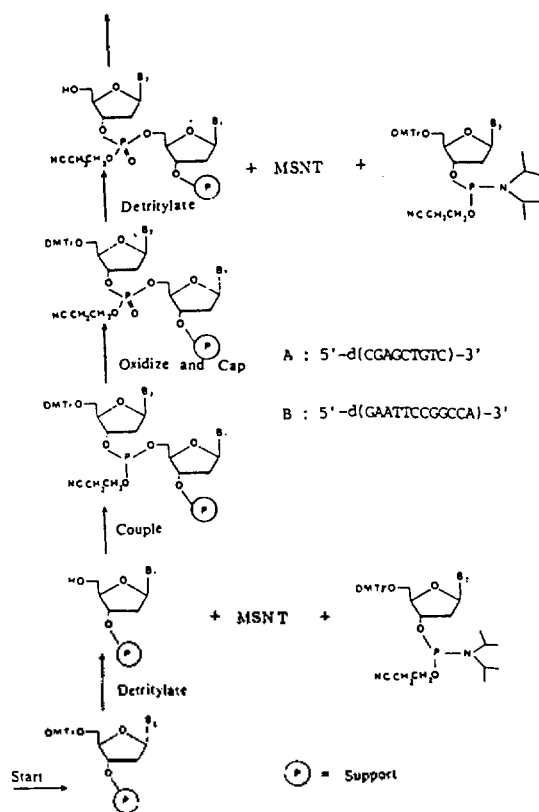


Fig. 1. Solid-phase oligodeoxyribonucleotides synthesis.

5'-DMTr를 제거하지 않고 HPLC를 사용해서 분리 정제하였다. Hydrophobicity에 의한 친화력의 차이를 이용하여 분리 정제하므로 DMTr기를 필수적으로 요구하고 있다. 이러한 chromatography에 의한 oligonucleotide의 정제방법은 Fritz³¹, Khorana³² 등이 처음으로 시도하였으며, Gait³³, Wickston³⁴ 등이 분리해냈다. 250 nm UV detector와 octadecylsilyl (ODS) column을 사용한 그 결과는 Fig. 2와 3이다. Nonamer(Fig. 2)는 12.14에서 주 peak를 나타내고 dodecamer(Fig. 3)는 13.57에서 주 peak를 나타내고 있다. 주 peak 앞의 작은 peak는 capping 단계에서 잘못으로 생긴 (n-1), (n-2) 등의 peak로 생각되어진다. 5'-DMTr oligomer는 강한 lipophilic이고 ODS 정지상과 강하게 작용할 수 있으므로 5'-O가 보호되어 있는 oligodeoxyribonucleotide가 5'-OH를 갖는 oligodeoxyribonucleotide보다 머무른 시간이

Table 2. Trityl yield of deocamer for each coupling

Base added	Absorbance(500 nm)	Step yield(%) *	Total yield(%)
Support + A	0.201		
Supprot + AC	0.201	100	100
Supprot + ACC	0.187	93	93
Supprot + ACCG	0.184	98	92
Supprot + ACCGG	0.178	96	89
Supprot + ACCGGC	0.186	104	93
Supprot + ACCGGCC	0.151	81	75
Supprot + ACCGGCCT	0.176	116	88
Supprot + ACCGGCCTT	0.179	98	89
Supprot + ACCGGCCTTA	0.187	104	93
Supprot + ACCGGCCTTAA	0.175	93	87
Supprot + ACCGGCCTTAAG	0.153	87	76

Av. = 97.2%. Without 104, 116 and 104 = 93.3%. Overall yield = $0.153/0.201 \times 100 = 76.1\%$. Stepwise yield = $0.763^{1/8} \times 100 = 96.6\%$.

Table 3. Trityl yield of nonamer for each coupling

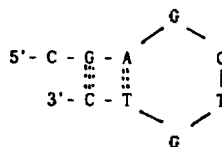
Base added	Absorbance(500 nm)	Step yield(%)	Total yield(%)
Support + C	0.207		
Support + CT	0.235	113	113
Support + CTG	0.215	91	104
Support + CTGC	0.167	77	81
Support + CTGCC	0.174	104	84
Support + CTGCCG	0.180	103	87
Support + CTGCCGA	0.160	88	78
Support + CTGCCGAG	0.203	126	98
Support + CTGCCGAGC	0.179	88	86

Av. = 98.7%. Without 113, 104, 103, and 126 = 86.0%. Overall yield = $0.179/0.207 \times 100 = 86.5\%$. Stepwise yield = $86.5^{1/9} \times 100 = 96.4\%$.

길다고³¹했으며, 일반적으로 염기배열 수가 적은 oligomer가 염기배열 수가 많은 oligomer보다 먼저 peak가 나타나고 phosphate 수가 작은 것부터 유출된다는³³ 이론과 본 실험의 결과가 일치하였다.

마지막 detritylation 후 oligodeoxyribonucleotide 분리 및 확인. HPLC로 확인 후 암모니아 성분을 완전히 날려보낸 후 80% acetic acid에 넣고 격렬하게 교반 후 건조시켜서 acetic acid의 잔기를 없애기 위해 ether로 두번 이상 증발시킨 후 HPLC로 확인 후 collection해서 다음 실험의 base 정량분석에 사용하였다. Nonamer에서는 Fig. 4, 5에서 볼 수 있는 바와 같이 7°C 이하의 낮은 온도에서 24.47의 peak보다 34.77의 peak가 최대 peak를 나타내고

시간이 지날수록 24.47의 peak가 최대로 뒀을 나타냈다. 이때의 온도는 20°C였다. 34.77 peak와 24.47 peak를 collection해서 UV 흡광을 조사하면(Fig. 6 (b)) 34.77 peak에서는 이상한 모양으로 나타났지만 24.47 peak에서는 정상적인 oligodeoxyribonucleotide의 peak를 나타냈다. Nonamer에서는 염기 서열 순서가 5'-d(CGAGCTGTC)-3'으로 되어 있어 아래와 같이 self-complementary로 hairpin 현상을 나타낼 수 있었다.



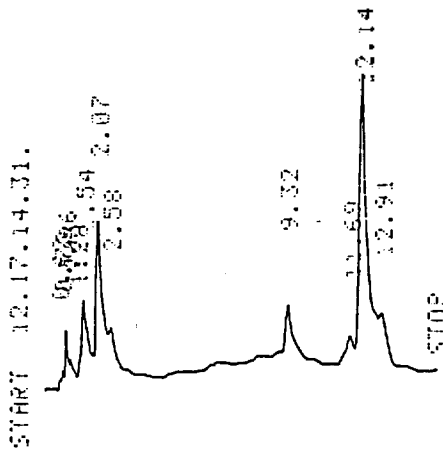


Fig. 2. Analysis of the crude 5'-O-DMTr-d(CGAGCTGTC) by HPLC. Column: ODS-Hypersil C_{18} , 25 cm \times 4.6 mm, Buffer A: 0.05 M-tetrabutylammonium phosphate in H_2O (pH=6.5), Buffer B: 0.05 M-tetrabutylammonium phosphate in 70% acetonitrile (pH=6.5), Gradient: 50~70% B, 15 min., flow rate: 1.5 ml/min., 20°C.

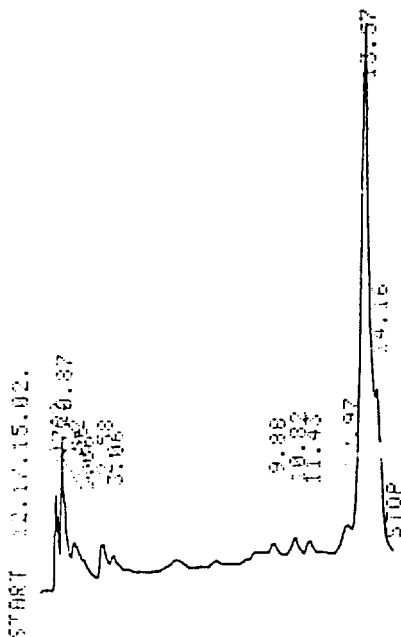


Fig. 3. Analysis of the crude 5'-O-DMTr-d(GAATTC-CGGCCA) by HPLC. Column: ODS-Hypersil C_{18} , 25 cm \times 4.6 mm, Buffer A: 0.05 M-tetrabutylammonium phosphate in H_2O (pH=6.5), Buffer B: 0.05 M-tetrabutylammonium phosphate in 70% acetonitrile (pH=6.5), Gradient: 50~70% B, 15 min., flow rate: 1.5 ml/min., 20°C.

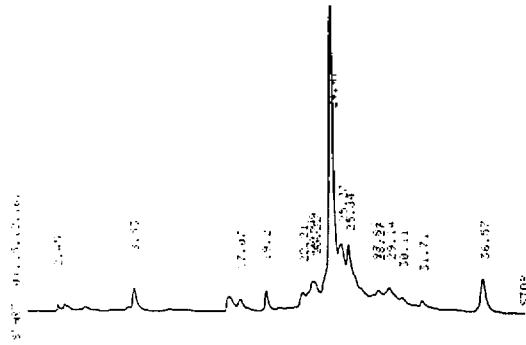


Fig. 4. Analysis of the crude 5'-d(CGAGCTGTC) after detritylation. Column: ODS-Hypersil C_{18} , 25 cm \times 4.6 mm, Buffer A: 0.05 M-tetrabutylammonium phosphate in H_2O (pH=5.9), Buffer B: 0.05 M-tetrabutylammonium phosphate in 25% MeOH (pH=5.9), Gradient: 0% B-60% B, 20 min., 60~100% B, 10 min., 100% B-10 min., Flow rate: 1 ml/min., 20°C.

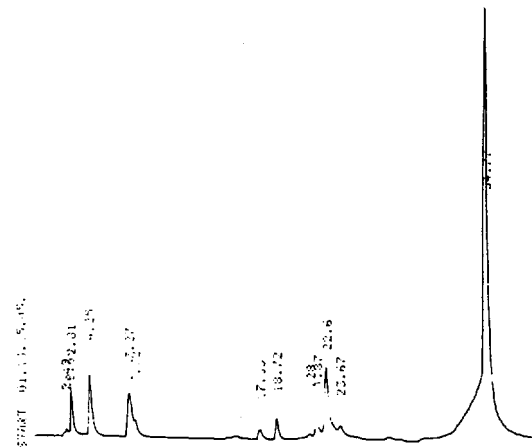


Fig. 5. Analysis of the crude 5'-d(CGAGCTGTC) after detritylation. Column: ODS-Hypersil C_{18} , 25 cm \times 4.6 mm, Buffer A: 0.05 M-tetrabutylammonium phosphate in H_2O (pH=5.9), Buffer B: 0.05 M-tetrabutylammonium phosphate in 25% MeOH (pH=5.9), Gradient: 0% B-60% B, 20 min., 60~100% B, 10 min., 100% B-10 min., Flow rate: 1 ml/min., 20°C.

그러나 낮은 온도에서 dodecamer(Fig는 제시 않 됨)를 조사했다니 nonamer에서와 같은 현상은 나타나지 않았다. Hairpin 현상은 Brosine³⁵, Scheffler³⁶, Hilbers 등도³⁷ 보고했으며 온도변화에 따른 조사는 하지 않았지만 수소 결합에 대한 에너지 때문에 낮은 온도에서 hairpin 현상이 이루어지는 것으로 생각

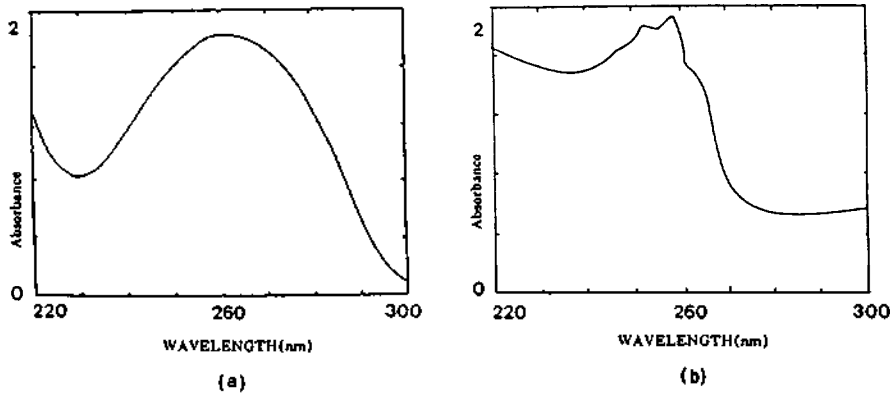


Fig. 6. UV peak of 5'-d(CGAGCTGTC). (a) collection of 24.47 in Fig. 4, (b) collection of 34.77 in Fig. 5.

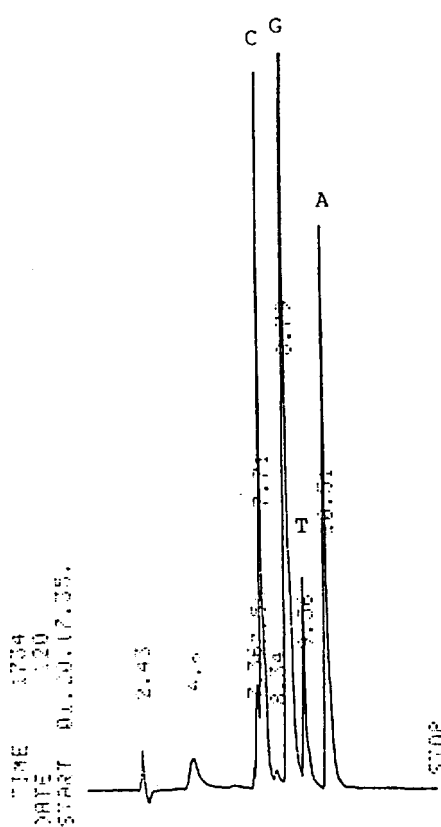


Fig. 7. Reversed phase HPLC tracing of product obtained from complete enzymatic digestion of the 5'-d(GAATTCGGCCA)-3' with snake venom phosphodiesterase and bacterial alkaline phosphatase. Column: ODS-Hypersil C₁₈, 15 cm×4.6 mm, Buffer A: 0.05 M-pi(HPO₄/H₂PO₄) pH=5.9, Buffer B: 0.05 M-pi 25% MeOH, Gradient: 0~60% B, 20 min., 60~100% B, 10 min.

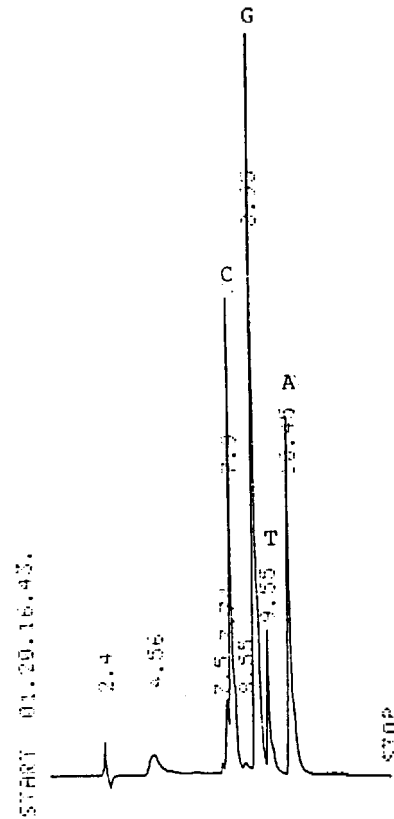


Fig. 8. Reversed phase HPLC tracing of product obtained from complete enzymatic digestion of the 5'-d(CGAGCTGTC)-3' with snake venom phosphodiesterase and bacterial alkaline phosphatase. Column: ODS-Hypersil C₁₈, 15 cm×4.6 mm, Buffer A: 0.05 M-pi(HPO₄/H₂PO₄) pH=5.9, Buffer B: 0.05 M-pi 25% MeOH, gradient: 0~60% B, 20 min., 60~100% B, 10 min.

Table 4. Quantitative evaluation of chromatogram shown in Fig. 7

Base	Elution	Correction factor	Normalize ^a	Peak area by HPLC	Corrected peak ^b	Peak area ^c
dC	7.71	6.3	0.9	39050	43388	3.63(4)
dG	8.79	12.9	1.843	79494	43203	3.67(4)
dT	9.56	7.0	1.000	13111	13111	1.09(2)
dA	10.51	13.7	1.957	38773	19782	1.65(2)

^aCorrection factor/7, ^bPeak area by HPLC/normalize, ^cCorrected peak/sum of correct peak, (): The base numbers which were the designed.

Table 5. Quantitative evaluation of chromatogram shown in Fig. 8

Base	Elution	Correction factor	Normalize ^a	Peak area by HPLC	Corrected peak ^b	Peak area ^c
dC	7.9	6.3	0.9	40452	44946	2.77(3)
dG	8.95	12.9	1.843	96138	52248	3.23(3)
dT	9.55	7.0	1.000	28276	28276	1.74(2)
dA	10.45	13.7	1.953	31723	16185	1.00(1)

^aCorrection factor/7, ^bPeak area by HPLC/normalize, ^cCorrected peak/sum of correct peak, (): The base numbers which were the designed.

되며 HPLC와 UV를 이용하여 hairpin 현상을 확인한 결과가 되었다.

Base의 정량분석. 본 실험에서는 snake venom phosphodiesterase 방법³⁸으로 두 개의 oligodeoxyribonucleotides를 분해시킨 후 HPLC에 의해 분석했다. HPLC에 의해 확인된 oligodeoxyribonucleotides를 collect해서 말린 후 snake venom phosphodiesterase에 의해 분해한 후 37°C에서 두시간 동안 incubator에 두었다가 95°C에서 2분 동안 가열 후 HPLC에 의해서 확인하였다.

그 결과는 Fig. 7, 8과 같다. peak의 순서는 C, G, T, A 순이며 normalize한 결과는 Table 4, 5와 같다. Dodecamer에서는 3.63(4), 3.67(4), 1.09(2), 1.65(2)이며 nonamer에서는 2.77(3), 3.23(3), 1.74(2), 1(1)로 나타났다. 괄호안은 반응시킨 base 수이다. Dodecamer에서나 nonamer에서나 thymine 양이 적은 것은 coupling상의 문제나 분해될 때의 잘못된 것으로 생각되며 HPLC의 다른 peak가 생긴 이유와 일치했다. 또한 coupling상의 잘못으로도 생각되나 대략적인 염기 수는 일치했다.

결 론

Whatmann chromatography paper(3MM)를 지지체로 사용하여 염기 부착용 disk를 만들고 nucleoside의 3'-OH 부분을 succinic anhydride로 succinylation시켜 disk에 부착시키고 phosphite-triester법에 의해 미량의 염기가 부착된 5'-d(GAATCCGGCCA)와 5'-d(CGAGCTGTC)의 두 oligodeoxyribonucleotide의 합성에 성공하였으며 trityl yield 분석에 의하면 76.1%와 86.5%의 평균 coupling 수율을 얻었다. 두 oligodeoxyribonucleotide들을 HPLC를 이용하여 분리 정제할 수 있었고 snake venom phosphodiesterase와 bacterial alkaline phosphatase에 의해 base들을 분리 정량화할 수 있으며 이때의 염기 수의 비율은 합성을 시도한 염기 수와 일치하였다. 이처럼 paper를 지지체로 이용한 oligodeoxyribonucleotide의 합성은 값싸고 간단하며 동시에 많은 염기 수가 부착된 미량의 oligomer들을 빠르고 짧은 시간에 수행할 수 있는 장점이 있다.

본 연구는 1991년도 교육부(유전공학) 학술연구 조성비에 의해 연구되었으며 이에 감사의 뜻을 표합니다.

인 용 문 헌

1. R. L. Letsinger and V. Mahadevan, *A. Am. Chem. Soc.*, **87**, 3526 (1965).
2. M. D. Edge, A. R. Green, G. R. Heatcliffe, P. A. Meacock, W. Schuch, D. B. Saclon, T. C. Atkinson, C. R. Newton, and A. F. Markham, *Nature*, **292**, 756 (1981).
3. R. Bischoff, J. M. Cull, and F. E. Regnier, *Anal. Biochem.*, **164**, 336 (1987).
4. S. Pochet, T. Huynh-Dinh, and J. Ongolen, *Tetrahedron*, **43**, 3481 (1987).
5. Z. A. Shabarova, N. G. Dolinnaya, S. I. Turkin, and E. S. Gromova, *Nucl. Acid. Res.*, **8**, 2413 (1980).
6. Z. A. Shabarova, N. G. Dolinnaya, V. L. Drutsa, N. P. Melnikova, and A. A. Purmal, *ibid.*, **9**, 5747 (1981).
7. Z. A. Zoltewicz, D. F. Clark, T. W. Sharples, and G. Grahe, *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 1741 (1970).
8. B. Singer and H. Fraenckl-Conrat, *Biochemistry*, **14**, 772 (1975).
9. L. Sun and B. Singer, *ibid.*, **14**, 1795 (1975).
10. W. J. Bodell, B. Singer, G. H. Thomas, and J. E. Cleaver, *Nucl. Acid. Res.*, **6**, 2819 (1975).
11. J. Thomasz and A. Simoncsits, *Tetrahedron Lett.*, **22**, 3905 (1981).
12. F. Eckstein, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **22**, 423 (1983).
13. B. A. Connolly, B. v. L. Potter, F. Eckstein, A. Pingoud, and L. Grotjahn, *Biochemistry*, **23**, 3443 (1984).
14. M. L. Stephenson and P. C. Zamecnik, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **75**, 285 (1978).
15. U. Asseline, N. T. Thuong, and C. Helene, *J. Biol. Chem.*, **260**, 8936 (1985).
16. B. O. Ro, J. H. Jo, and D. H. Shin, *Natural Sciences Research, Chosun Univ.*, **13**, 71 (1990).
17. E. Ohtsuka, M. Ikehara, and D. Soll, *Nucl. Acid. Res.*, **10**, 6553 (1982).
18. M. L. Duckworth, M. J. Gait, P. Goelet, G. H. Hong, and M. Singly, *ibid.*, **9**, 1691 (1981).
19. F. Chow, t. Kempe, and G. Palm, *ibid.*, **11**, 4365 (1983).
20. S. P. Adams, K. S. Kavka, E. J. Wykes, S. B. Hol-
der, and G. R. Galluppi, *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 661 (1983).
21. H. H. Goertz and H. Selinger, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **20**, 681 (1981).
22. T. Tanaka and R. L. Letsinger, *ibid.*, **10**, 3249 (1982).
23. E. Ohtsuka, H. Takashima, and M. Itehava, *Tetrahedron Lett.*, **23**, 3081 (1982).
24. M. d. Matteucci and M. H. Caruthers, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 3185 (1981).
25. M. J. Gait, Hansw, W. D. Mattes, M. Singh, B. S. Sproat, and R. C. Titamas, "Chemical and Enzymatic synthesis of gene fragments", H. G. Gassen and A. Lang Verlag, Chemie, Weinheim, p. 1 (1982).
26. R. Crea and T. Horn, *Nucl. Acid. Res.*, **8**, 2331 (1980).
27. B. Singer and H. Fraenckl-Conrat, *Biochemistry*, **14**, 772 (1975).
28. R. Frank, W. Heikens, G. Heisterberg-Moutsis, and H. Blocker, *ibid.*, **11**, 4365 (1983).
29. H. W. D. Mattes, W. H. Zenke, T. Grundstron, A. Saub, M. Wintzerith, and P. Chambon, *EMBO.*, **3**, 801 (1984).
30. N. D. Sinha, J. Biernat, J. McManus, and H. Koster, *Nucl. Acid. Res.*, **12**, 4539 (1984).
31. H. J. Fritz, R. Belaljoje, E. L. Brow, R. H. Fritz, R. A. Jones, R. G. Lees, and H. G. Khorana, *Biochemistry*, **17**, 1257 (1978).
32. R. A. Jones, H. J. Fritz, and H. G. Khorana, *ibid.*, **17**, 1268 (1978).
33. M. J. Gait, "Polymer-supported reaction in Organic synthesis", P. Modpe and D. C. Sherrington, John Wiley, p. 435 (1980).
34. R. W. Tyson and E. J. Wickstron, *Chromatog.*, **192**, 485 (1980).
35. J. Brosins, T. J. Dull, *Proc. Natl. Acad. Sic., USA.*, **75**, 4801 (1978).
36. I. E. Scheffler, E. L. Elson, and R. L. Baldwin, *J. Mol. Biol.*, **48**, 145 (1970).
37. C. W. Hilbers, C. A. G. Hassnoot, S. H. de Bruin, J. J. M. Joordens, G. A. VAn der Marel, and J. H. Van Boom, *Biochemie*, **67**, 685 (1985).
38. B. L. Gaggney, L. A. Marky, and R. A. Jones, *Tetrahedron*, **40**, 3 (1984).