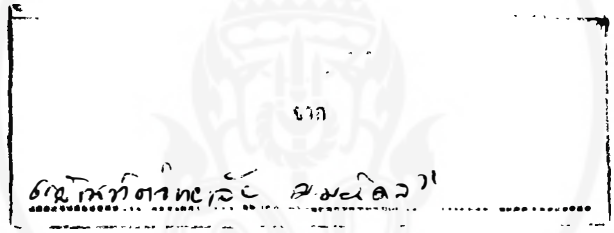
LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

5 APR 1994

DEVELOPMENT OF HAPTEN LABELED NUCLEOTIDE TRIPHOSPHATE FOR NONISOTOPIC GENE DETECTION

SUPAPORN WACHARAPLUESADEE



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE
OF MASTER OF SCIENCE
(BIOCHEMISTRY)

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1993

Copyright by Mahidol University

25761

ชื่อวิทยานิพนธ์ การพัฒนาระบบการตรวจวัดยีนโดยใช้ แฮบเทนนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต

ผู้วิจัย สุภาภรณ์ วัชรพฤษาดี

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

พิชิต โตสุโขวงศ์, Ph.D.

วิชัย บุญแสง , Ph.D.

ประหยัด โกมารทัต , Ph.D.

วันที่สำเร็จการศึกษา 24 มกราคม พ.ศ. 2537

บทคัดย่อ

การตรวจวัดยีนโดยใช้ DNA probe ที่มีความจำเพาะมาทำการไฮบริไดเซชั่นกับ DNA ที่ต้องการตรวจสอบนั้น มีความนิยมแพร่หลายในปัจจุบันทั้งในด้านงานวิจัย และการตรวจวินิจฉัยโรค การเลือกใช้สารที่จะนำมาติดฉลากกับ DNA probe เพื่อใช้ในการแสดงผลมีความสำคัญที่จะต้องพิจารณา การใช้สารรังสีในการติดฉลากแสดงประสิทธิภาพสูงในการตรวจวัด แต่การตรวจวัดยีนโดยวิธีนี้ไม่นิยมใช้อย่างกว้างขวางนัก เนื่องจากข้อจำกัดของการใช้สารก้มมันตภาพรังสี การติดฉลากโดยไม่ใช้สารรังสีจึงได้รับการพัฒนาขึ้นในปัจจุบัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้อนุพันธุ์ของนิวคลีโอไทด์ที่มีกลุ่มจำเพาะต่าง ๆ เช่น กลุ่มไบโอติน (biotin) กลุ่มดิกอ๊อกซิจินิน (digoxigenin) เป็นต้น ในการเป็นส่วนประกอบของ DNA probe เพื่อใช้ในการตรวจวัดยีน

ในการศึกษาครั้งนี้ มีจุดประสงค์ที่จะสังเคราะห์อนุพันธุ์ของนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธีง่าย ๆ และสะดวก จึงได้เลือกใช้กลุ่มไดไนโตรเฟนนิล (dinitrophenyl) เป็นกลุ่มจำเพาะในการสังเคราะห์อนุพันธุ์ของนิวคลีโอไทด์

อนุพันธุ์ของ dCTP 2 ชนิด ได้ถูกสังเคราะห์ขึ้น คือ N^4-(2,4 dinitrophenyl-6-aminohexyl) dCTP หรือ DNP-dCTP I และ N^4-[8 (2,4 dinitrophe-

Copyright by Mahidol University

nylamino)-1-aminooctyl-quinonyl-6-aminohexyl]dCTP หรือ DNP-dCTP II การสังเคราะห์ DNP-dCTP I ประกอบด้วย 2 ปฏิกิริยาคือ ปฏิกิริยาแลกเปลี่ยนหมู่อะมิโน (Transamination)ระหว่างหมู่อะมิโนของ dCTP กับ หมู่อะมิโนของ diaminohexane และปฏิกิริยาการเติมหมู่ไดไนโตเฟนนิล (dinitrophenylation) ที่หมู่อะมิโนโดยใช้ FDNB ส่วนการสังเคราะห์ DNP-dCTP II นั้นเป็นการเชื่อมกันระหว่างหมู่อะมิโนด้านปลายของ aminohexyl dCTP และ DNP-diaminooctaneโดยใช้ p-benzoquinone เป็นตัวเชื่อม

อนุพันธุ์ของ dCTP ทั้งสองนี้สามารถนำไปใช้ในการสร้างยีนที่มีส่วนประกอบของอนุพันธุ์เหล่านี้ได้โดยอาศัยเทคนิค random-primed synthesis และความสามารถของ DNP-dCTP I เพื่อใช้แทน dCTP ในการสังเคราะห์ DNA probe ที่มีหมู่จำเพาะได้รับการทดสอบ โดยมีความสามารถในการสร้าง probe 53 % เมื่อเปรียบเทียบกับ dCTP ประสิทธิภาพของ probe ที่ทำขึ้นโดยใช้ DNP-dCTP I ได้รับการทดสอบ โดยสามารถตรวจวัดยีนได้ถึงระดับ 10 pg ซึ่งแสดงประสิทธิภาพเท่ากันกับ probe ที่ทำขึ้นโดยใช้ DNP-dCTP II

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการตรวจวัดยีนโดยอาศัยอนุพันธุ์ของ dCTP นี้ ควรที่จะได้รับการปรับปรุง เพื่อที่จะสามารถแสดงผลที่ดีกว่าเท่าที่ศึกษามานี้

Copyright by Mahidol University

Thesis Title Development of hapten labeled nucleotide triphosphate for nonisotopic gene detection.

Name Supaporn Wacharapluesadee

Degree Master of Science (Biochemistry)

Thesis Supervisory Committee

Pichit Tosukhowong, Ph.D.

Vichai Boonsaeng , Ph.D.

Prayad Komaratat , Ph.D.

Date of Graduation 24 January B.E. 2537 (1994)

ABSTRACT

Gene detection by hybridization with specific DNA probe are now extensively use in research and in routine diagnostic work. An important aspect of nucleic acid hybridization assays is the choice of substance used to label a nucleic acid probe and its ability to generate the signal. Nonisotopic labels have been the focus of development because of the limitation of radioactive labels in general application. A sucessful approach is to synthesize specific DNA probe from nucleotide analogues labeled with haptens, such as biotin, digoxigenin. The objective of this study is to devise a simple, convenient method of synthesis and purification of modified nucleotide using dinitrophenyl group as hapten.

Copyright by Mahidol University

Two dCTP nucleotide analogues were synthesized. These were N^4-(2,4 dinitrophenyl-6-aminohexyl)-dCTP (DNP-dCTP I) and N^4- [8-(2,4 dinitrophenylamino)-1-aminooctyl-1-quinonyl-6-amino-hexyl]dCTP (DNP-dCTP II).DNP-dCTP I was synthesized by replacing the amino group of dCTP with diaminohexane by transamination reaction, and dinitrophenylation of the amino end with FDNB to give the product. DNP-dCTP II was synthesized by linking of aminohexyl dCTP and DNP-diaminooctane with p-benzoquinone.

The two dinitrophenyl modified dCTP analogues of different spacer lengths were incorporated into DNA probes by standard random-primed synthesis. The incorporation of DNP-dCTP I was 53 % as effective as dCTP control. The labeled DNA probe by these two analogues were capable of detecting the same level of DNA (10 pg).

The better signal could be obtained, if the optimal condition for DNA detection were further determined in more detail.

Copyright by Mahidol University