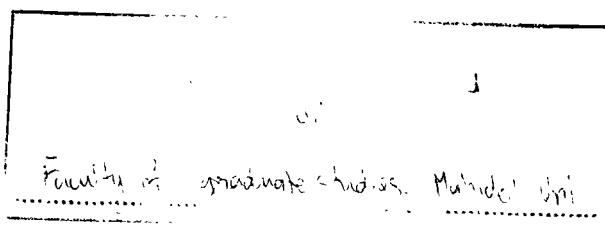




SYNTHESIS OF C⁵ (2,4 DINITROPHENYL-4-AMINOALLYL)
DEOXYURIDINE 5' TRIPHOSPHATE FOR NONISOTOPIC GENE
DETECTION

SOMPONG KLYNONGSURONG
✓

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



IN
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY

TH
5697/0
1996

1996

ชื่อวิทยานิพนธ์	การสังเคราะห์อนุพันธุ์ของดีออกซียูริดีนเพื่อใช้ในการตรวจวัดยีน
ผู้วิจัย	สมปอง คล้ายหนองสรวง
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต(ชีวเคมี)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์	
	พิชิต โดสุโขวงศ์ , Ph.D.
	ประหยัด โกมารทัต, Ph.D.
วันที่สำเร็จการศึกษา	26 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2539

บทคัดย่อ

การสังเคราะห์อนุพันธุ์ของดีออกซียูริดีนไตรฟอสเฟต(DNP-dUTP) เพื่อใช้ในการตรวจวัดยีนโดยไม่ใช้สารกัมมันตภาพรังสี เติมหุ้มปรอทเข้าในคาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ของ dUTP (merculated-dUTP) สารประกอบชนิดนี้จะทำปฏิกิริยากับ allylamine เพื่อสร้างสารประกอบ C⁵ (3-aminoallyl)dUTP(AA-dUTP) ซึ่งเป็น dUTP ที่มี linker arm สารประกอบที่ได้นำไปทำให้บริสุทธิ์ได้โดยวิธี DEAE cellulose column chromatography จากการศึกษาคุณสมบัติของ AA-dUTP พบว่ามี AA-dUTP 67% ปฏิกิริยา dinitrophenylation เป็นการเติมหมู่ไดไนโตรเฟนิล(dinitrophenyl) ที่หมู่อะมิโนของ AA-dUTP โดยใช้ FDNB อนุพันธุ์ของดีออกซียูริดีนไตรฟอสเฟต (DNP-dUTP) ที่สร้างได้นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี Sephadex G-10 column พบว่าสามารถสร้าง DNP-dUTP ได้ 40%

อนุพันธุ์ของ dUTP ที่สร้างขึ้นมาสามารถนำไปใช้ในการสร้างยีนที่มีส่วนประกอบของอนุพันธุ์นี้โดยอาศัยเทคนิค random prime synthesis พบว่า DNP-dUTP สามารถ incorporated เข้าไปใน DNA probe ได้ 39% เมื่อเทียบกับตัว dTTP control อัตราของการ incorporation จะสูงขึ้นเทียบเท่ากับ control เมื่อใช้ DNP-dUTP 50% หรือน้อยกว่าแทนที่ความเข้มข้นของ dTTP probe ที่สร้างขึ้นจาก 50%DNP-dUTPแทนที่ dTTP นำมา hybridized กับ BlueSEMBV target DNA สามารถตรวจวัด DNA เป้าหมายได้ 1 ng

สภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัดยีนคือ hybridized ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง ความเข้มข้นของ antibody ตัวแรก 1.3 $\mu\text{g/ml}$ ใช้ความเข้มข้นของ enzyme ใน antibody ตัวที่สอง 760 mU/ml และใช้ 35%DNP-dUTP แทนที่ dTTP ในการสร้าง probe สภาวะที่เหมาะสมนี้ใช้ในการตรวจวัด DNA เป้าหมายได้ 5 pg



Thesis Title Synthesis of C⁵ (2,4 dinitrophenyl-4-aminoallyl)
Deoxyuridine 5' Triphosphate for Nonisotopic
Gene Detection

Name Sompong Klynongsurong

Degree Master of science (biochemistry)

Thesis Supervisory Committee

 Pichit Tosukhowong, Ph.D.
 Prayad Komaratat, Ph.D.

Date of Graduation 26 February B.E 2539 (1996)

ABSTRACT

C⁵ (2,4dinitrophenyl-4-aminoallyl)dUTP was synthesized for nonisotopic gene detection. The natural nucleotide dUTP was mercurated at C⁵ position by mercuric acetate, and the mercurated dUTP intermediate was reacted with allylamine to yield the C⁵ (3-aminoallyl)dUTP (AA-dUTP). The reaction product was fractionated by DEAE cellulose column chromatography, and 67% yield identified as AA-dUTP was obtained. Dinitrophenylation reaction of amino end of AA-dUTP with FDNB gave dinitrophenyl derivative of dUTP. This reaction product was effectively purified by Sephadex G10 column, and 40% yield was obtained.

The rate of incorporation of DNP-dUTP by DNA polymerase I (Klenow enzyme) was 39% as effective as dTTP control in random primed

synthesis. With lower percentage of substitution of dTTP by DNP-dUTP analogue (50% or lower) the rate of incorporation of analogue was as effective as the control. Probe with 50% of the analogue substituted for dTTP was synthesized for BlueSEMBV, and target DNA of 1 ng could be detected.

Optimal conditions in detection procedure were determined: hybridized temperature was around 60°C, 16 hr, concentration of first antibody was 1.3 µg/ml and 760 mU/ml of enzyme in second antibody, and the percent substitution of the analogue in the probe was 35%. Target DNA of 5 pg could be detected.