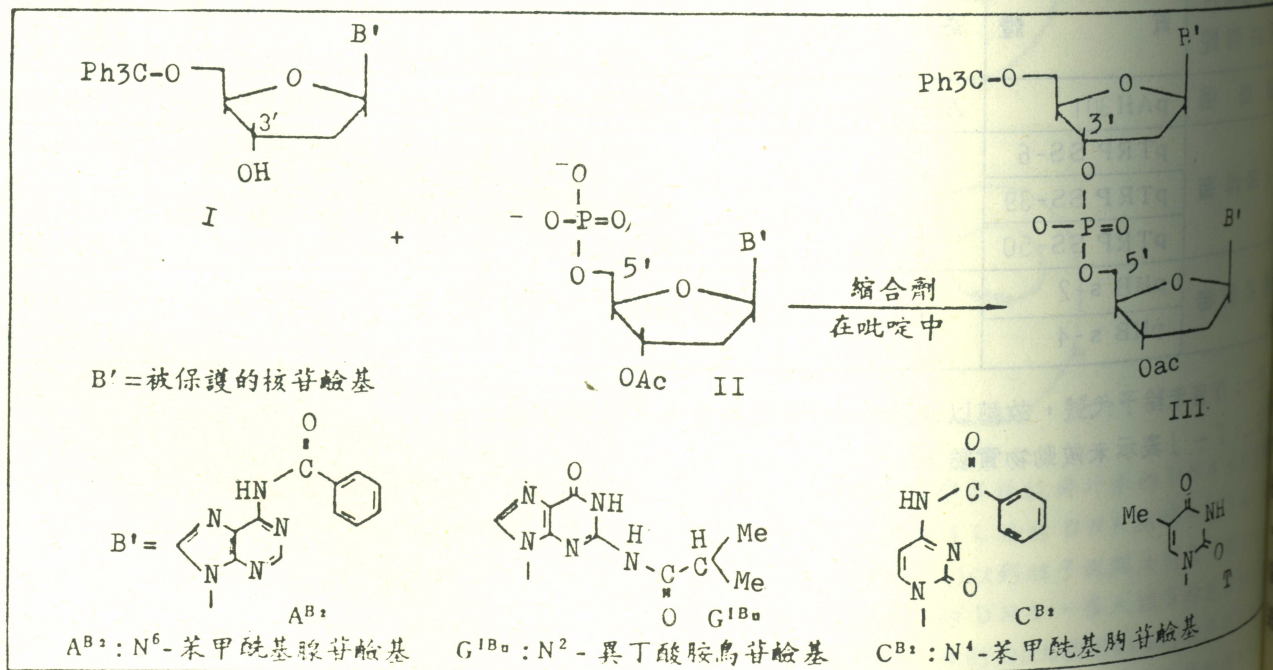


人造基因 又一章

寡去氧核苷酸 之化學合成

甘魯生



圖一：柯羅那磷酸雙酯合成法。

自三十年前去氧核酸 (DNA) 的構造被發現來，化學和生物學家們就夢想著在實驗中把一個核苷酸連起來變成聚核苷酸。此合成之主要困難在於生產高率的核苷鏈之 3' 到 5' 磷酸雙酯 (見圖一，化合物 III)。因為核苷上可引起化學反應的基很多，因之反應之副產物太多。在 1960 年初期柯羅那 (G. Khorana) (註一) 首先推出一可之法，名之為磷酸雙酯法 (phosphodiester method)，因核苷鏈之增長是增加一個磷酸雙酯。柯羅那和那些同僚們有系統的將核苷上其他氫氧基被基一個個地保護起來，使它們在縮合 (co-ensation) 反應時不起作用。這些保護基 (見圖一) 可以在其他溫和的反應條件下除掉，如此才把辛苦得到的寡核苷鏈弄斷。吾人要感謝柯羅之成就，他使核苷酸之合成變成可能，而他所使之保護基也一直沿用至今。

去氧 核苷酸基、去氧鳥核苷酸基上的胺基可變成 amide 保護 (使之失去反應活性) 起來 (見圖一)。在戊糖上之第 5' 碳上的氫氧基在不需它 (磷酸化) 反應時，以三苯甲基醚 (tritylethers) 保護起來，特別是 (dimethoxytrityl ether) 常用，它們可用弱酸處理除去，不需要反應的基則由酯，如乙酸酯來保護，它可由弱酸處理除去 (見圖一)。

圖一扼要的說明了柯羅那磷酸雙酯合成法。將被保護的核苷磷酸 (II) 以縮合劑二環己基碳亞胺 (dicyclocarbodiimide 在吡啶中形成了兩有保護基的雙核苷磷酸 III)。

此生成物分離出來之後可再合成更長之去氧核苷酸。如以弱鹼處理，那麼在 3' 碳上的保護基被除去而呈現一可供反應之氫氧基，它可和另一核苷磷酸作用同樣之反應而成三核苷磷酸。若用弱酸處理則在 5' 碳上恢復了一個氫氧基，也可由這一方向延長。柯羅那以此方法製成更長的寡去氧核酸鏈詮釋了遺傳密碼，進而合

成了酵母及大腸菌的 t-RAN 基因。在基因合成過程中他也意外地發展了酶對聚核苷酸鏈的各種控制方法，這些技術都成了今日遺傳工程的基礎 (註一)。

但是磷酸雙酯法的缺點是費時，縮合作用需數天時間，產率也低，純化過程非常困難。於是在 1960 年代末期由 R. L. Leteinger 美國西北大學教授，推出了磷酸三酯法。他用酚基來保護磷酸上唯一在磷酸二酯法內未被保護而可供反應之基 (見圖一)，II 有兩個負號，III 仍有一個負號在磷酸上 (註二)。所以每個縮合作用之生成物是一個磷酸三酯。這種生成物是中性的，因此它們可溶於有機溶劑中以矽土膠 (silica gel) 之液相色析法純化。新的縮合劑也使縮合作用縮短成二至四個小時。於是這個方法用來生產大量之寡核酸鏈。

在 1975 年 R. L. Leteinger 又介紹了亞磷酸三酯法，這方法反應作用更快，因三價的磷比五價的磷要更具活性。這兩種方法將在下面分段討論之。

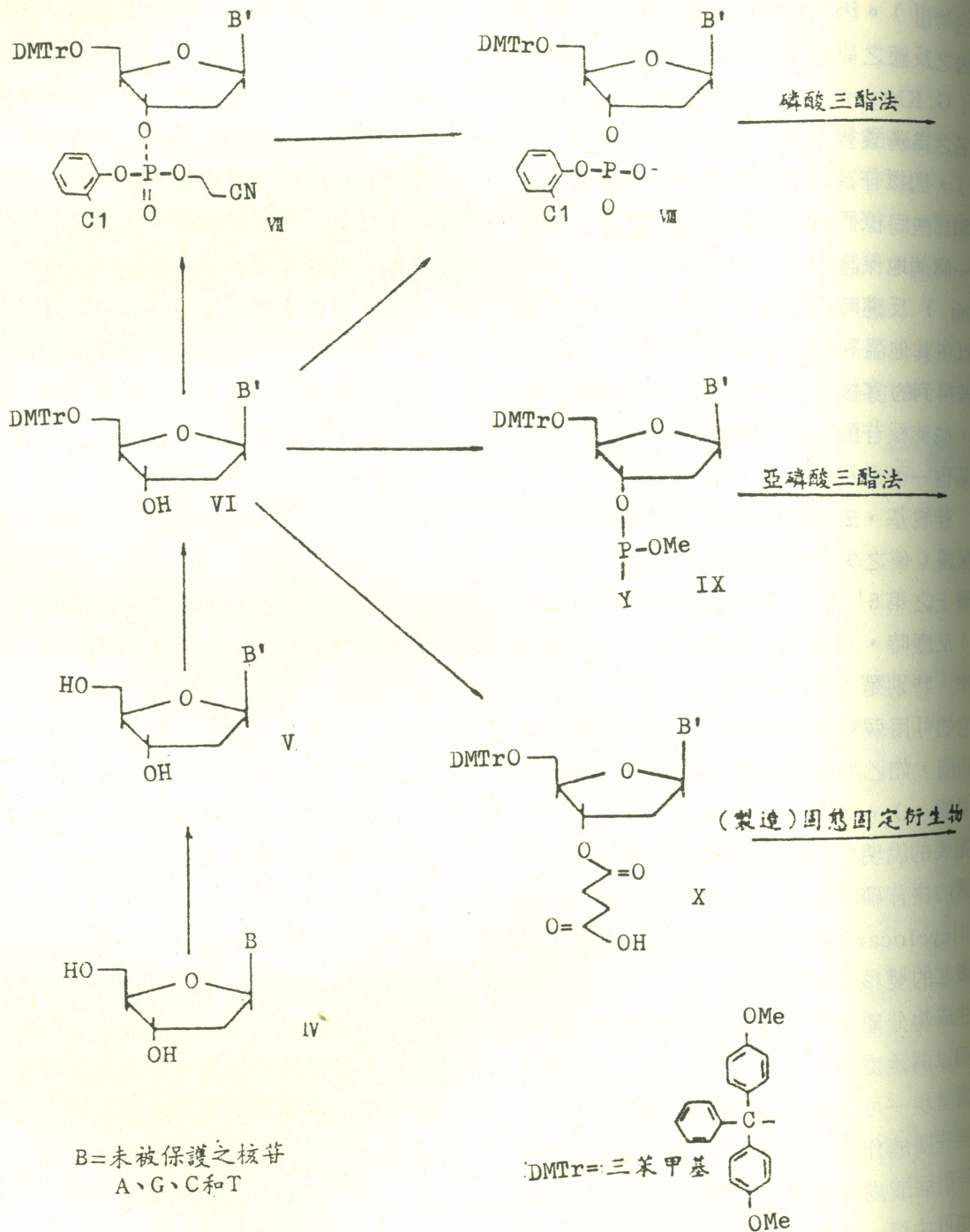
圖二簡單介紹了各種被保護的核苷及製作的途徑，最終原料是 2' - 去氧核苷 IV。在腺核苷及胸核苷上之外環胺基 (exocyclic amine) 可以化成鹽胺來保護 (見圖一及圖二 V)。下一步是製造在 3' 及 5' 上的衍生物。

因 5' 上 OH 基的構造比 3' 上的 OH 突出，所以當和龐大的雙甲基三苯甲基醚 (dimthoxytritylether) 作用時只有 5' 上之 OH 會起反應 (見圖二 VI)。化合物 VI 是一個非常有用之中間物，它可以被磷酸化之後成了磷酸三酯法的原料 (VII、VIII)，亞磷酸化之後成了亞磷酸三酯法的原料 IX。它也可以以琥珀酸結合而成化合物 X，X 再連接在矽土膠或玻璃細粒上而成為最新之固態固定法之要素。

儘管合成方法不斷革新，但 1979 年以前要合成一條生物學家看得上眼的寡去氧核酸鏈仍相當困難。而且合成工作必須得相當有經驗的人才能擔當

，需求去氧核糖孔急的生物學家勢必無法兼顧合成。柯拉索在1979年把亞磷酸三酯法改良，一端以固態固定才改變了整個情勢。化學合成去氧寡核酸鏈可以自動化了。如今分子生物學家們利用了四種

核苷的固態固定衍生物及四種被保護的核苷用機器或簡單之設備在實驗室中製造寡核酸。一個五核苷酸可以在一天內完成，而且每一步成本也大大地降低了。



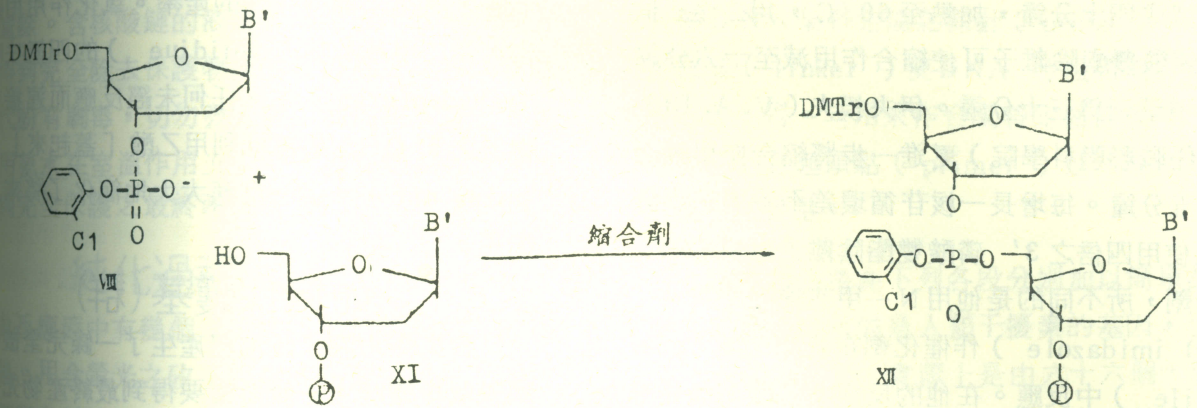
圖二：重要中間物一覽表。

溶液中磷酸三酯合成法

完全被保護的磷酸三酯 VII 是液相磷酸三酯法重縮合的中間產物，因為它可以生成實際參加縮合作用之核苷。如以弱鹼處理可以除去氘乙醇酯而成了 3' 磷酸二酯，以弱酸作用則 5' 上的三苯甲基被 OH 取代回來了。此兩種物質必須先純化才能使用。縮合作用通常在無水吡啶中進行，反應物質之比例是一比一，所有十六種雙核苷酸及六十四個三核苷酸就是由此法產生的（見圖三），這些產物可再用於固態支持法的起點。

六年前這是最實用的辦法來製造寡去氧核酸鏈。雖縮合作用時間只需三小時，但反應之後以色析

法來分離純化反應生成物確極費時。所以合成一個十二核苷酸鏈費時閱月。在這種情形下，板倉（Itakura）（註三）仍以此法合成了生長激素抑制因子（somatostatin）之基因。但以甲苯磺鹽硝基三唑（TSNT, toluene sulfonylnitrotriazole）來作縮合劑後，上述之合成法稍有改進，費時的色析法被抽取法取代。用水洗去磷酸二酯及水解 TSN T 只有含 5'—OH 之保護的核苷留在有機溶劑中。它可以接著作進步反應，如此一個六核苷鏈之合成需一天功夫。在溶液中之三磷酸酯法有大量生產的潛力。



圖三：固態支持磷酸三酯法。

固態支持合成法

馬克亨（A. F. markham，任職帝國化學工業）及給特（M. J. Gait 任職劍橋 MRC 分子生物實驗室）兩人合作，第一次成功地應用固態支持磷酸三酯法來成功地合成了寡去氧核酸。他倆將 3' 號核苷（見圖二中化合物 X）結在有自由氨基之聚丙烯酰胺（polyacrylamide）膠粒上（resin）。於是核苷就結合在不溶的固態支持物上，將此支持物放在可過濾的容器內，那麼反應物在作用一段時間後就可以濾掉，然後支持物也可再用溶劑洗幾次以備下一步反應之用。顯然地這方法在以免除每

一次核酸鏈增長之後色析分離純化的步驟。因為其他未曾反應物質都被洗掉了，只有連結在支持物上的核酸鏈尚留在容器之中。也正因如此，固態支持法最大困難是要把每一次縮合作用百分之百完成才好。假如每加一核苷之成功率是 90%，那麼在加二十次之後最後之產物只有百分之十的產量。那麼最後之純化分離也是夠困難的，如果成功率只有七、八成的話（在液相反應中已是相當成功的了），以固態支持法只能製成七、八核酸鏈，再長的話產量就極小了。改進法之一是用雙核酸作原料，也就

是減少縮合次數來增高產量，缺點是製造所有十六種雙核苷鏈極費時。另一改進法是選擇更好的縮合劑，找更佳之固態支持物，目前有種多孔的玻璃可用來在短時間內作出四十核苷鏈。

縮合作用是非常怕水的，所以合成用的反應物及溶劑都要不含一點水分。而且合成之處也要遠離水龍頭、水浴、高壓滅菌器以及水蒸氣出口等。合成的產量也和加入反應劑的濃度有關，所以加入之3' 磷酸雙酯比連在支持物上的5' 磷酸雙酯要多出三倍到五倍，這樣才能使反應趨向完全。當使用均三甲基硝基三唑（mesitylene nitrotriazole, MSNT）作縮合劑時需90分鐘才完成作用，不合乎自動化之要求，如把反應劑增加八至十倍，反應可縮減成四十分鐘，加熱至60°C，用二至三倍之3' 磷酸雙酯陰離子可使縮合作用減至十六分鐘，每一循環則為三十分鐘。伊夫模夫（V. A. Efimov，任職聯聯科學院）更進一步將縮合作用減至十至十五分鐘。每增長一核苷循環差不多得三十分鐘。他使用四倍之3' 磷酸雙酯陰離子以MSNT作縮合劑，所不同的是他用N-甲基咪唑（N-methyl imidazole）作催化劑在乙醯硝酸（acetonitrile）中反應。在他的反應中乙醯硝酸是唯一的溶劑。這個簡單的系統成功地應用在核酸合成的自動化上（註四）。

通常用固態合成法來製造少量之寡去氧核酸鏈。以一到十微克之固體支持核苷可製造出約二至二十纖克之寡去氧核酸鏈。若用來製造以克計算之核酸鏈是極不經濟的。因為在每一步之產量百分比需要大量之3' 磷酸三酯陰離子來推動，這些未反應之原料都被洗掉了（註五）。

亞磷酸三酯合成法

亞磷酸三酯合成法是專門用來在短時間內生產少量寡去氧核酸鏈用的，固態支持物也是用矽土膠，現在也用多孔玻璃。最先應用的是核苷磷酸單氯

酸（nucleoside phosphomonochloridite，見圖二IX，Y = Cl）。此化合物極易水解，能被空氣氧化，在吡啶溶液中也易分解，因之用它來作自動化的結果不理想。

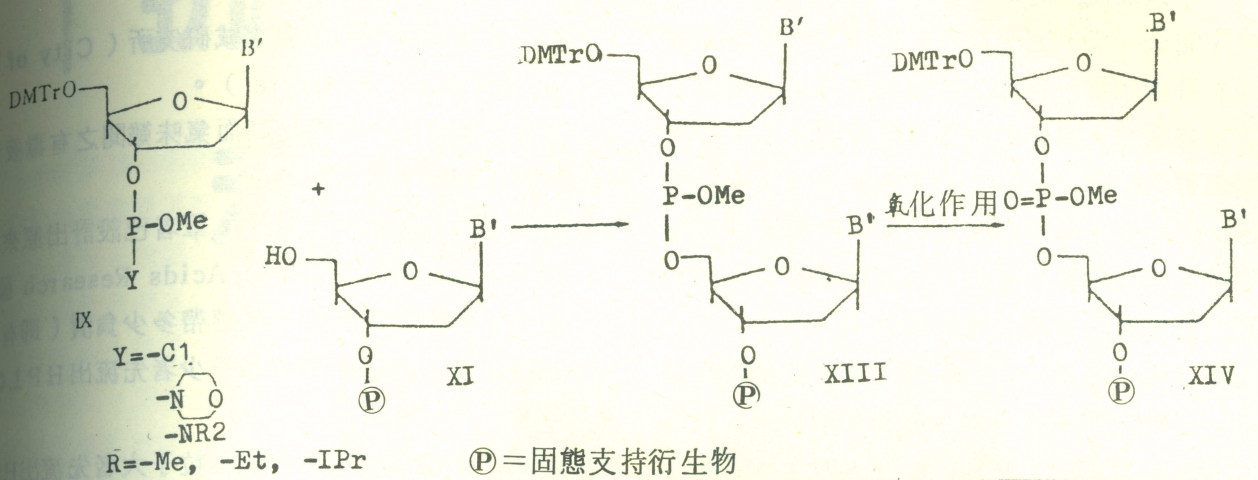
如圖四所示，柯拉索推出了磷酸胺作為反應原料（見圖二IX，Y = NR₂）。此物質比較安定所以容易處理，它不會被水解也不會為空氣氧化，溶於乙醯磷酸中在室溫下二十四小時不分解。它的嗎啉（morpholine）及雙異丙酸基之衍生物比雙甲基及雙乙基衍生物更易準備，所以成功地用於自動化合成上，當然也可以用手來操作。磷酸胺被四唑（tetrazole）在乾燥空氣中活化，反應可在五分鐘之內完成，但需十五至二十倍的磷酸胺及六十至十倍之四唑才能得到好的產率。氧化作用用碘鎓含水及二甲基吡啶（lutidie）的四氫呋喃（tetrahydrofuran）中。任何未經反應而連接在支持物上之5' OH基都可利用乙酸「蓋起來」（capping off）。這一反應大大地簡化了將來之縮合作用。

如何保護基(群)

合成作用到了此地已產生了一條完全被保護的寡去氧核酸鏈。一般而言要得到最終產物先需將保護基群們去掉。在程序上可將在5'上之雙甲基苯甲基最先去掉或最後除去。不論採取那一步，下一步是將在磷酸上的酚基及甲醇基除去，此時去氧核酸鏈可溶於水，再以五十度之氨水處理，在去氧腺苷、去氧鳥苷、去氧胸苷核酸上的保護基一併除去。

如果是經由磷酸三酯法合成，酚基之分離可用oximate作用二十四小時。同一作用也可使核酸和固態支持物分開。如果鳥苷酸可能在合成反應中被醯酸化了，這化合物也可以使之還原。

在亞磷酸三酯法通常以硫化酚作用九十分鐘將核苷間（磷酸上）之甲醇基除掉，然後在室溫三小時把3'端琥珀酸分解，於是核酸鏈和支持物



圖四：固態支持亞磷酸三酯法。

分離了。此時核酸鏈溶於氨水中，以過濾法把支持物濾除。含核酸鏈的液體加熱至五十度，一晚上就能得到完全除去保護物後的最終寡去氧核酸成品。硫代酚有劇毒，切勿吸入肺中和沾在皮膚上。也可以用氨水在室溫作用五小時，再加熱至五十度也能得到完全保護之最終產物。

純化過程

由反應液中有幾個方法來純化已製成之寡去氧核酸鏈。用含螢光之矽土膠塗敷在薄塑膠片上即所謂之薄層色析法 (thin layer chromatography) 分離相當經濟，但結果就不及以高壓液相色析法 (HPLC) 及電泳法來得精準。以陰離子變換 (註六) 或反轉相 (註七) HPLC 可以純化寡去氧核酸鏈達三十個核苷長。若在洗脫 (elute) 液中加螯合劑可以增進離子變換 HPLC 之解析能力，也能收得一些自補之核酸 (註八)，也能分離一些含高鳥嘌呤核苷成分之核酸鏈。用含百分之二十之聚丙烯酰胺長在含七莫耳濃度尿素的電泳中可分離八至五十核苷之核酸鏈。分離開的核酸可以在長波長紫外線照射下顯出，然後將膠切下來抽取之。

用途

合成之寡去氧核酸鏈可用於基因合成：一作為分離 DNA 某特定區之探針 (probe)。二製造連接核酸 (linker) 使 DNA 片段帶有特定之限制酶認定序列。三用來作合成特定核苷順序之 DNA 或 RNA 之起頭點 (primer) 以及四介入或分離出某一突變點。

這些用途將在下列各段分別加以簡單說明。化學合成最長之核酸是人類干擾素的基因，它含有五百十四個鹼基對。實際上是由六十六個十到二十一寡去氧核酸鏈連接起來的。這六十六個短鏈都是由雙核酸苷作原料，以磷酸三酯法合成。短鏈之間之連接是以激酶在每一段 5' 端加上一個磷酸根，再以連接酶和另一段在 3' 端 OH 基連接起來。近來發展改良之固態支持法可以製成四十個核苷之鏈，因此基因之合成可能會更省時 (註九)，更方便。

現在回到上述之用途。合成之 DNA 片段含有特定之核酸順序可以幫助鑑定複製的 DNA (cloned)。這技術在分離酵母菌細胞色素 C 的基因實驗第一次應用成功。用合成之去氧核酸鏈以混合配對方法在一大群重組的噬菌體中把酵母菌色素細胞 C 的基因找出來。合成核酸之順序係由已知蛋白質胺基酸之順序推知。由於每個胺基酸可能有多個遺

傳密碼，所以推測出之核苷順序不一定和細胞內 DNA 順序完全一樣，因此混合配對親和力可能減弱，甚至有可能找錯。克服之法是找遺傳基因密碼之較少胺基酸開始，製出數個寡核酸鏈概括了所有可能的基因密碼配對，在最後的混合物中一定有一個是對的。同時吾人可以在合成 DNA 時轉換核苷而造成突變。突變點的位置是可以被控制的，可用來研究蛋白質結構與功能之間的關係。

由聚合酶合成 DNA 一直要一模板但也要一個起頭點，合成之寡核酸可以隨意選擇起頭點。而且模板也不限於 DNA，RNA 也可。因之可用 DNA 之合成來探測在細胞中短暫存在之 mRNA。

合成核酸最大的用途可能是在特定的突變，帶有突變 I 如不配對與配錯對 (mismatch) I 之寡去氧核酸鏈由酶之作用嵌入雙股 DNA 之中。這含有一個或數個不配對之 DNA 再帶入細胞中，那麼突變之質體可由分化後再混合配對而產生，此時雙股 DNA 中包含原來合成之寡去氧核酸順序了。因此所有想做之突變都能迅速精確的作出來。

亞磷酸三酯法也用於 RNA 之合成上，不過要把單核苷酸上 2' 的 OH 基也保護起來才行。但合成之寡 RNA 之用途不多 (註十)，所以人們對它的興趣也不大。

以目前發展情形而言，這兩種合成方法各有其長處。雖然比磷酸三酯法多了一步氧化作用，亞磷酸三酯法仍比前者要省時。但亞磷酸三酯法之反應原料較難製造，價格較昂。以控制好的多孔玻璃來作支持物，兩個方法均能順利進行。最近兩種方法都能製成一個含有五十一個核苷的核苷鏈。核酸化學的合成法的進步無疑地將使重組 DNA 的技術更往前推進一大步。

註一：美國麻省理工學院教授，因合成核酸成就得到 1968 年諾貝爾醫學獎。

註二：此一負離子使核苷酸不僅溶於強極化之溶劑中 (如吡啶) 而且也參與縮合作用，因此副產物多

，產量減少而分離困難。

註三：現任職加州希望之城研究所 (City of Hope Research Institute)。

註四：吡啶是一個沸點高而氣味難聞之有毒液體，故操作較難，蒸發較慢。

註五：這句話已不正確了，筆者已設計出原來因程序，原文將在 Nucleic Acids Research 發表。

註六：分離之原理依核酸鏈帶多少負價 (即有多少個磷酸根) 而定，帶負離子少者先流出 HPLC 管子。

註七：依分子大小而分離，粒子大者先流出 HPLC 管子。

註八：即單一核酸鏈可形成配對之雙股 DNA 鏈。

註九：大阪大學的池原森男教授已成功地合成了類生長基因。

註十：RNA 極易被 RNA 分解酶分解，而 RNA 分解酶又是無所不在的。

(本文改寫自 T. C. Atkinson, BIOTECHNIQUES, Vol. 1)

甘魯生任教於美國約翰霍浦金斯大學公共衛生學院