

01' 춘계 학술 발표회 논문집

한국원자력학회

## PCR용 2-deoxyUridine 5-triphosphate의 $^{125}\text{I}$ 표지 및 활용

Iodination and application of 2-deoxyUridine 5-triphosphate using PCR

이수진, 안순혁, 우광선, 정위섭, 이태섭, 임수정, 최창운, 임상무

원자력병원

서울시 노원구 공릉동 215-4

### 요약

5-Iodo deoxyuridine은 박테리아나 동물의 세포에 있는 DNA와 효과적으로 결합하는 것으로 알려져있다. 하지만 nucleotide의 직접적인 Iodine표지반응은 pyrimidine hydrates를 생성하여 in vitro의 합성에서 매우 제한적으로 이용되고 있다.<sup>1)</sup> 따라서 중간매개물로 mercuri-nucleotide를 이용하여 Iodine을 표지 한다면 그 반응조건이 완화하여 안정된 5-Iodo deoxyuridine을 합성할 수 있다. 또한 nucleotide와 mercury atom의 공유결합은 nucleotide의 구조와 nuclease나 polymerase같은 단백질과의 상호작용에 변화를 주지 않는 것으로 알려져 있다.<sup>2)</sup> 따라서 Taq DNA polymerase를 사용하는 PCR과정에서 iodine을 표지한 dUTP는 안정성을 유지하여 DNA의 복제과정에서 dTTP와 경쟁적으로 작용할 수 있다.

### Abstract

5-Iodo-2'-deoxyuridine (IUdR) is a thymidine(TdR) analog in which the 5-methyl group of TdR is replaced by iodine. Since the 5-methyl group and the iodine atom have similar van der Waals' radii this substitution gives a compound that behaves remarkably like TdR. Within the cell, both TdR and IUdR are phosphorylated in a stepwise fashion and incorporated into DNA. However, unlike direct iodination, mercuriation proceeds with equal facility on both U and C base. In addition, whereas extensive uracil hydrate formation occurs in the iodination reaction no hydration of the 5-6 double bond occurs during mercuriation. Since mercurated nucleotides can be rapidly converted to iodonucleotides in high yields, iodination via mercuri intermediates may offer some advantage in the preparation of iodinated nucleotide and polynucleotides. The reaction through 5-mercurated derivatives did minimize single-strand breakage under mild condition and high radiolabeling yield of iodine on the c-5 ring position was obtained and covalently bound mercury atoms did not alter the polynucleotide structure or the interaction of the polynucleotides with proteins and enzymes. Accordingly, iodine labeled dUTP in the process of PCR using Taq DNA polymerase could be competitively activated with dTTP maintaining stability.

## 1. 서론

5-Iodo-2'-deoxyUridine TriPhosphate(dUTP)는 thymidine의 5-methyl group대신 Iodine으로 치환된 thymidine analog이다. 5-methyl group과 iodine atom은 비슷한 van der waal's력을 가지므로 이 치환된 5-Iodo-2'-deoxy Uridine TriPhosphate는 thymidine과 비슷한 compound로 작용한다. 따라서 세포 내에서 thymidine과 <sup>125</sup>I-dUTP는 단계적으로 phosphorylation되어 DNA내로 incorporation할 수 있다.<sup>3-5)</sup>

RNA의 normal base인 Uracil은 2가지 mechanism에 의해 DNA의 이중 stranded에서 볼 수 있다.<sup>6)</sup> 첫째는 DNA의 replication과 repairing과정에서 DNA polymerase에 의해 dNTP대신 dUTP의 misincorporation에 의해 U:A base pair가 생기는 경우이고 둘째는 Cytosin의 탈아미노작용의 결과로 DNA내에 uracil이 생겨 U:G mismatched base pair가 생길 수 있다. 따라서 Taq DNA polymerase를 사용하는 PCR과정에서 iodine을 표지한 dUTP는 안정성을 유지하여 DNA의 복제과정에서 dTTP와 경쟁적으로 작용할 수 있다.

본 연구에서는 HCV RNA검출법에서 PCR수행 시 <sup>125</sup>I으로 표지된 2'-deoxyUridine TriPhosphate가 dTTP와 경쟁적으로 반응되는 지를 확인하여 HCV RNA를 방사성 동위원소를 이용한 검출할 수 있는 새로운 방법을 개발하고자 하였다.

## 2. 방법

### 1. PCR용 2'-deoxyUridine TriPhosphate의 <sup>125</sup>I표지

5-mercuration된 유도체는 Langer등의 방법을 이용하였다.<sup>7)</sup> 0.484g(1.0mmol)의 dUTP(2'-deoxyUridine 5' -Triphosphate)를 0.1M acetate buffer 100ml에 넣고 Hg(II) acetate 1.59g(5.0 mmol)을 넣은 후 50°C에서 3시간 동안 교반시켰다. 이 혼합물을 상온으로 식힌 후, 0.392g(9.25 mmol)의 LiCl를 넣고 반응 시킨 후 과량의 HgCl<sub>2</sub>는 동량의 ethyl acetate를 넣어 추출하여 제거하였다. 5번 반복 후 mercuration된 nucleotide가 녹아있는 수용액에 3배량의 cold ethanol을 넣어 목적물을 침전시킨 후 원심분리로 모았다. 모은 생성물을 cold ethanol으로 씻고 aceton으로 씻은 후 진공 건조시켜 흰색 powder상태의 5-mercuriuridine Triphosphate를 얻고 <sup>1</sup>H-NMR(Machine: 200MHz, solvent: D<sub>2</sub>O, D<sub>2</sub>O+ Mercaptoethanol)로 확인하였다. Iodination방법은<sup>8)</sup> reaction vial에 magnetic bar와 Iodo bead를 준비한 후 <sup>125</sup>I와 합성한 5-mercuri 2'-deoxyUridine TriPhosphate(dUTP)을 넣고 40°C에서 10분간 stirring하였다. 최종 생성물은 HPLC( $\mu$  Bondpack C18 column, methanol/distrilled water (20:80 by volume), 0.5ml/min)로 표지수율을 확인하였다.<sup>9)</sup>

### 2. HCV의 RNA검출법 개발

#### (1) 혈청으로부터 HCV의 RNA 추출과 cDNA합성

원자력병원 내과에 의뢰한 환자의 혈액을 채취한 후 원심분리로 혈청을 분리하여 GTC(Guanidine Thiocyanate)와 phenol extraction법으로 RNA extraction을 하였다. RNA sample과 reverse transcriptase, reverse primer, dNTP's등을 넣어 complementary DNA를 합성하였다.<sup>10)</sup>

#### (2) DNA 증폭

합성된 cDNA를 95°C에서 5분간 denature시킨 후 outer primer, Taq DNA polymerase와 dNTP를 넣고 automatic thermocycler를 이용하여 30cycler(94°C/30sec, 45°C/30sec, 72°C/45sec and 72°C/10min)의 1st PCR을 시행하였다. 증폭된 1st PCR product에 inner primer를 넣고 Taq DNA polymerase와 dNTP와 Langer등의 방법을 참고하여 합성한 <sup>125</sup>I-dUTP를 넣고 2nd PCR(30 cycle, 94°C/30sec, 55°C/30sec, 72°C/45sec and 72°C/10min)을 시행하였다.

#### (3)증폭된 DNA의 검출

PCR 생성물을 1.5% agarose gel에 전기영동하여 Ethidium bromide염색으로 band를 확인하고 nylon-membrane에 transfer한 후 X-ray film에 감광하여  $^{125}\text{I}$ -dUTP의 방사능을 확인하였다.

### 3. 결과

Langer등의 방법으로 합성한 5-mercuri-2'-deoxyUridine TriPhosphate를  $^1\text{H}$ -NMR로 분석한 결과 5-mercuri-2'-deoxyUridine TriPhosphate base의 6번수소가 singlet으로 나타나 5번위치의 수소가 mercuri로 치환된 것을 확인하였다.(Fig3)

5-mercuri-2'-deoxyUridine TriPhosphate를  $^{125}\text{I}$ 로 표지한 후 HPLC로 확인한 결과 free Iodine은 4.5분에서  $^{125}\text{I}$ -dUTP는 6.4분에서 radio activity를 확인할 수 있었고 Iodine의 표지 수율은 약 98%이상이었다.

$^{125}\text{I}$ -dUTP를 이용하여 PCR로 증폭된 HCV DNA를 전기영동 후 자가방사기록 영상을 얻은 결과  $^{125}\text{I}$ -dUTP의 여러 농도로 PCR한 생성물 중 0.1mM의  $^{125}\text{I}$ -dUTP를 넣었을 때 가장 높은 radio activity를 얻을 수 있었다. (Fig 5)

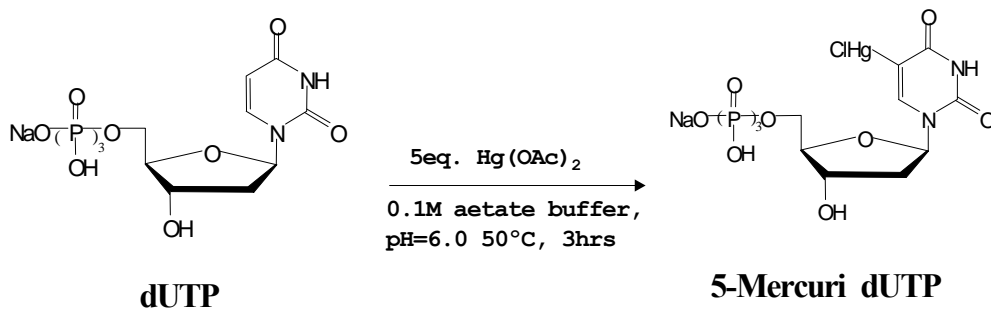


Fig 1. Mercuration of 2'-deoxyUridine TriPhosphate(dUTP)

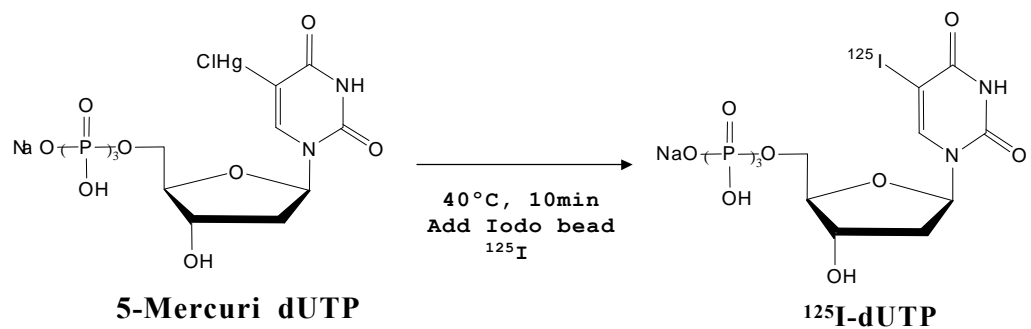


Fig 2. Iodination of 5-mercuri-2'-deoxyUridine TriPhosphate(dUTP)

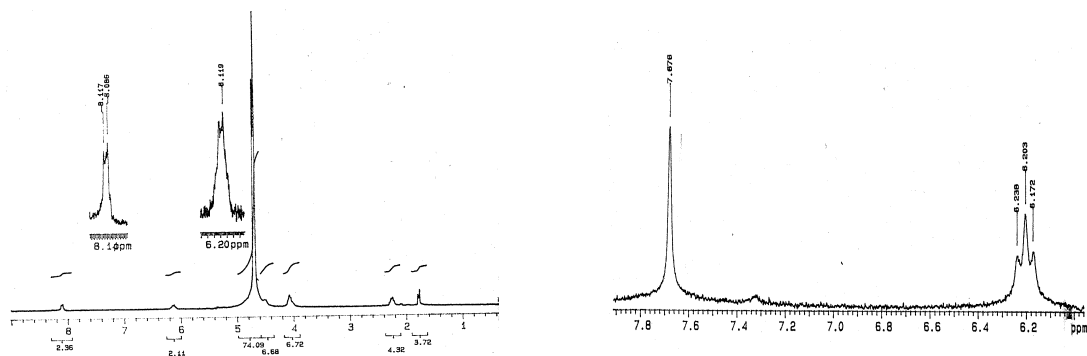


Fig 3. <sup>1</sup>H-NMR spectrum of 5-mercuri-2'-deoxyUridine TriPhosphate in the absence and presence of 2-mercaptoethanol

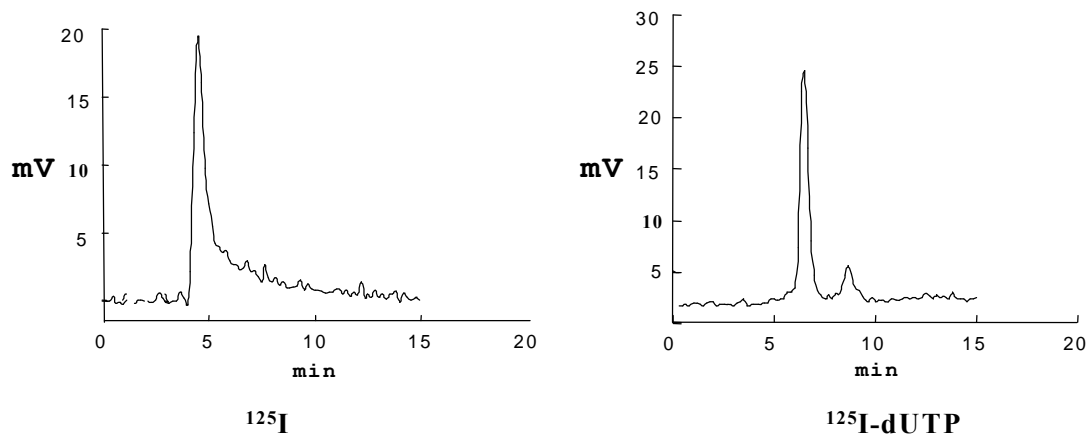


Fig 4. HPLC chromatogram of <sup>125</sup>I-deoxyUridine TriPhosphate

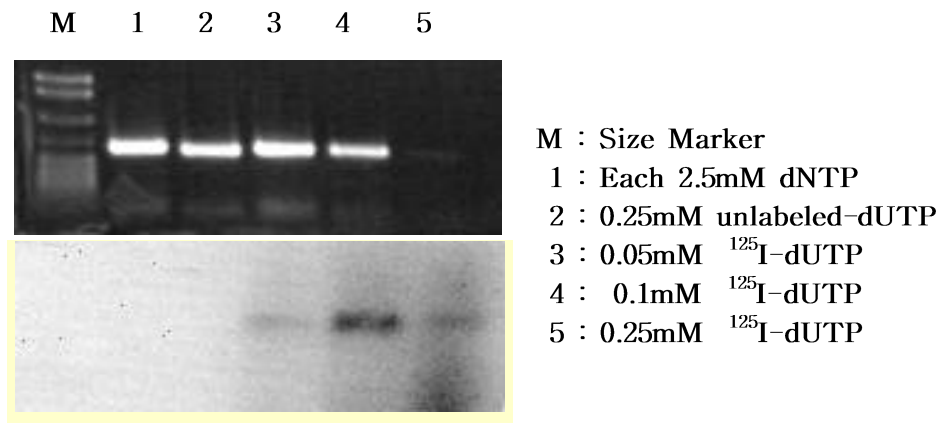


Fig 5. Amplified HCV cDNA and autoradiography

#### 4. 결론

Pyrimidine의 직접 iodination 반응은 pyrimidine hydrate가 생기기 때문에 많은 제한이 있었으나 mercuri 전구체를 이용하면 pyrimidine 5-6 double bond의 hydration이 발생하지 않고 mercucy 전구체 합성 및 분리 정제법이 매우 간편하여 반복사용이 실용적이라 생각된다.<sup>1)</sup> Mercuri 전구체를 거친 반응은 온화한 조건으로 단일나선의 breakage를 최소화하며<sup>1)</sup> pyrimidine ring의 5번 수소위치에 iodine의 높은 표지수율을 얻을 수 있고 표지 후 triphosphate가 안정되게 남아있어 PCR수행시 dTTP와 경쟁적으로 반응하여 다양한 연구에 이용되리라고 생각된다.

#### 5. 참고문헌

1. Dale RMK, Martin E, Livingston DC, Ward DC. Direct Covalent Mercuration of Nucleotides and Polynucleotides. *Biochemistry*; 1975; 14; p2447-2457.
2. Gregory J W, James QC. Electrochemistry of Covalently Mercurated Uridine Nucleotides. Diffusion and Surface-Confined Pathways for the Two-Electron Reduction of the Carbon-Mercury Bond. *American Chemical Society*; 1997; 13; p3529-3541
3. Chan PC, Lisco E, Lisco H, Adelstein SJ. The radiotoxicity of iodine-125 in mammalian cells. II. A comparative study on cell survival and cytogenetic responses to 125IUdR, 131IUdR and 3HTdR. *Radiat. Res*; 1976; 67; p332-343.
4. Kassis AI, Van den Abbeele AD, Wen PYC, Baranowska-Kortylewicz J, Aaronson RA, DeSisto WC, Lampson LA, Black PM, Adelstein SJ. Specific uptake of Auger electro-emitting thymidine analogue 5-[<sup>123</sup>I/<sup>125</sup>I]Iodo-2'-Deoxyuridine in rat brain tumors; diagnostic and therapeutic implication in humans; *Cancer Res*; 1990; 50; p5199-5203.
5. Makrigiorgos GM, Kassis AI, Baranowska-Kortylewicz J, McElvany KD, Welch MJ, Sastry KSR, Adelstein SJ. Radiotoxicity of 5-[<sup>123</sup>I]Iodo-2'-Deoxyuridine in V79 cells : a comparison with 5-[<sup>125</sup>I]Iodo-2'-Deoxyuridine; *Radiat Res*; 1989; 118; p532-544
6. Verri A, Mazzaretto P, Spadari s, Focher F. Uricil-DNA glycosylases preferentially excise mispaired uricil; *Biochem. J*; 1992; 287; p1007-1010.
7. Langer RP, Waldrop AA, Wald DC. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 1981; 78; p6633.
8. Janina BK, Berma MK, Warren WL, Amin IK. Radioiododemercuration: a Simple Synthesis of 5-[<sup>123/125/127</sup>I]Iodo-2'-Deoxyuridine. *Appl. Radiat. Isot*; 1988; 39; 4; p335-341.
9. Sambrook J, Fritsch EF, Masiatis T. *Molecular cloning. Extraction and purification*; p7.3-7.29
10. Sambrook J, Fritsch EF, Masiatis T. *Molecular cloning. Reverse transcriptase*; p5.52-5.57