

A DNA/RNA Oligonucleotide Synthesis

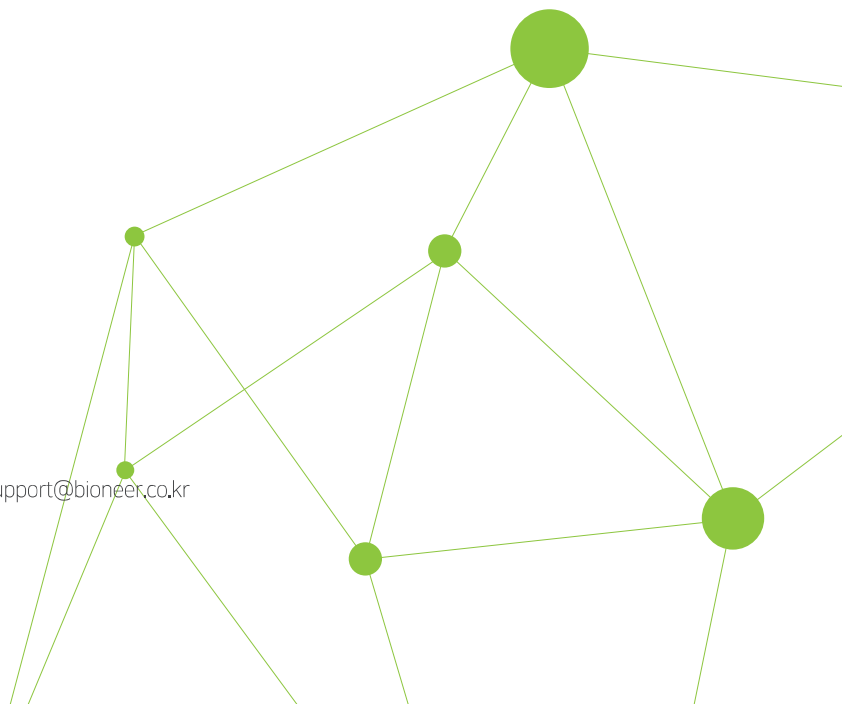
01. Oligonucleotide Synthesis Service

○ DNA/RNA Oligonucleotide Synthesis

☎ Phone: 합성 관련 - 042-930-8574

학술 관련 - 042-930-8577

✉ E-mail: Oligo-support@bioneer.co.kr



Oligonucleotide FAQs

취급 및 보관

1. 올리고는 어떻게 보관하며 얼마나 오래 가나요?

일반적으로 올리고는 -20°C에서 1년 이상 안정합니다. 올리고를 받으신 후에 장기간 사용하시려면 clean bench에서 공기 중의 bio-particle이 들어가지 않도록 주의하여 여러 개의 DNase-free tube에 분주하여 보관하시며 하나씩 꺼내어 사용하시어야 합니다. 특히 RNA Oligo는 공기 중의 bio-particle에 의해 더 쉽게 분해되므로 사용 시에 clean bench에서 뚜껑을 열고 사용하시기 바랍니다. 참고로, 바이오니아의 모든 올리고는 clean room에서 제조되기 때문에 실험실의 bio-particle에 의한 오염이 되지 않으면 장기간 보존이 가능합니다. 일반적으로 DNA는 Fe 이온 같은 미량의 중금속 이온에 의해서도 서서히 분해와 침전이 일어나기 때문에 멸균 증류수에 녹이는 것보다 TE(10 mM Tri-HCl(pH 8.0), 0.1 mM EDTA) Buffer에 녹여두시면 더 오래 보관할 수 있습니다.

올리고 형상 및 보관 방법에 따른 저장 수명

Storage Condition	Shelf Life (Month)
at RT in water	2
at 4°C in water	9
at -20°C in water	18
at -20°C (Dry)	24

2. 올리고는 어떻게 용해시키나요?

Oligo는 일반적으로 건조된 형태로 공급됩니다. 건조된 올리고는 물에 잘 녹지만 올리고의 특이한 sequence에 의해 형성된 구조로 인해 간혹 잘 녹지 않는 경우가 있습니다. 그럴 때는 60~70°C water bath에 10~15분간 incubation 시킨 후 vortex하여 centrifuge후 사용합니다.

3. 올리고 용액을 상온에서 일주일 이상 방치했는데 괜찮을까요?

앞서 언급하였듯이 공기 중의 bio-particle에 오염되지 않았다면 큰 문제는 없습니다. 오염으로 인한 가수분해가 의심이 되는 경우에는 당사에 MALDI-TOF 분석을 의뢰할 수 있습니다.

4. Fluorescent dye modified 올리고는 어떻게 보관해야 하나요?

유기 형광염료는 빛에 노출되면 서서히 분해가 됩니다. 올리고에 붙인 형광염료도 일반적인 실험실의 빛에 의해서도 서서히 분해가 되므로, 차광이 되는 용기에 넣어서 빛이 들어오지 않는 장소에 보관하시길 권장합니다.

Preferred TE Buffer for Reconstitution & Storage pH for Fluorescent Probes	
6-FAM, HEX, TET, ROX, and TAMRA	TE Buffer pH 7.5 or 8.0
Cyanine 3, Cyanine 3.5, Cyanine 5, and Cyanine 5.5	TE Buffer pH 7.0 or 7.5
Cyanine dyes rapidly degrade in acidic pH	

정량, 농도 및 Tm

1. 올리고의 O.D. 값은 무엇을 의미하나요?

합성된 올리고는 sequence에 따라 올리고가 가지고 있는 고유의 흡광 계수를 이용하여 빛의 흡광도를 측정하여 정량을 하게 되는데 이때 빛의 흡수량을 O.D. (Optical density) 값으로 표시합니다.

2. 합성 올리고의 양을 O.D. 값으로부터 어떻게 얻어내나요?

합성 올리고를 파장 260 nm의 UV Light에서 O.D. 값을 측정한 뒤 다음과 같은 수식을 이용하여 합성된 올리고의 양을 얻어냅니다.

$$O.D. = \epsilon C$$

수식에서 ϵ (Extinction Coefficient)은 물질이 빛을 흡수하는 정도를 나타내는 상수로 물질에 따라 고유한 값을 가지며 C는 올리고의 농도를 의미합니다. 올리고는 sequence에 따른 고유의 ϵ 값을 계산할 수 있는 수식이 알려져 있어서 각각의 올리고에 해당하는 ϵ 값을 구할 수 있습니다. 그러므로 O.D. 값을 측정하면 상기의 수식에 적용하여 용액의 Concentration, 즉 올리고의 몰농도를 알 수 있게 됩니다.

올리고의 ϵ 값은 260 nm UV Light에서 각 base의 Extinction Coefficient 값의 (Table 1) 합으로 계산하는 방법과 base 간의 sequence 간섭에 의한 차이를 고려한 Extinction Coefficient 값의 (Table 2) 합으로 계산하는 방법이 있습니다.

Table 1. (Unit: L/mole cm)

dA	15,400
dC	7,400
dG	11,500
dT	8,700

Table 2. (Unit: L/mole cm)

5' → 3'	dA	dC	dG	dT
dA	27,400	21,200	25,000	22,800
dC	21,200	14,600	18,000	15,200
dG	25,200	17,600	21,600	20,000
dT	23,400	16,200	19,000	16,800

3. 다음과 같이 올리고 (3G, 4C, 5A, 6T / GGGCCCCAAAATTTTT) 18 mer의 전체 O.D. 값이 0.7이었다면 올리고의 양은 얼마나 되나요?

올리고의 양은 흡광 계수(Extinction Coefficient)를 구하는 방법에 따라 다음과 같이 계산됩니다.

- 위 문항의 (Table 1)에 의한 흡광 계수 (Extinction Coefficient)

$$= G \text{의 염기개수} \times 11500 + C \text{의 염기개수} \times 7,400 + A \text{의 염기개수} \times 15,400 + T \text{의 염기개수} \times 8,700$$

$$= 11,500 \times 3 + 7,400 \times 4 + 15,400 \times 5 + 8,700 \times 6 = 193.3 \text{ (mL/mole)}$$

따라서 O.D. = ϵC 에 대입하여 계산하면

$$C = 0.7 / 193.3 = 0.003621 \text{ (mmole/mL)} = 3.6 \text{ (nmole/mL)이 된다.}$$

Oligonucleotide FAQs

- 위 문항의 (Table 2)에 의한 흡광 계수 (Extinction Coefficient)

$$= (GG + GG + GC + CC + CC + CC + CA + AA + AA + AA + AT + TT + TT + TT + TT) - (G + G + C + C + C + C + A + A + A + A + A + T + T + T + T + T)$$

$$= (21600 + 21600 + 17600 + 14600 + 14600 + 14600 + 21200 + 27400 + 27400 + 27400 + 27400 + 22800 + 16800 + 16800 + 16800 + 16800) - (11500 + 11500 + 7400 + 7400 + 7400 + 7400 + 15400 + 15400 + 15400 + 15400 + 15400 + 8700 + 8700 + 8700 + 8700)$$

$$= (342,200) - (173,100)$$

$$= 169,100 \text{ (mL/mole)}$$
 따라서 O.D. = εC에 대입하여 계산하면

$$C = 0.7 / 169.1 = 0.004139562 \text{ (mmole/mL)} = 4.14 \text{ (nmole/mL)}$$
가 된다.

자사에서는 (Table 2)에 의한 방법을 도입하여 적용하고 있으며, 이 결과는 Oligo Q.C Report 상의 'Total nmole' 수치로 나타냅니다.

4. 합성 올리고의 분자량 (Molecular Weight) 측정은 어떻게 하나요?

다음의 수식에 각 base의 수를 대입하여 계산합니다.

$$M.W. = (NA \times 249.2) + (NC \times 225.2) + (NG \times 265.2) + (NT \times 240.2) + (\text{oligolength} - 1) \times 63.98 + 2.02$$

- NA = Total number of A
- NC = Total number of C
- NG = Total number of G
- NT = Total number of T

5. 합성 Scale의 µg 단위로 변환하는 방법은 어떻게 되나요?

일반적으로 올리고의 합성 scale은 µmole 단위로 신청되며 합성된 결과도 보통 nmole 단위로 report됩니다. 하지만, 사용하고자 하실 때 ng 또는 µg 단위로 하신다면 mole을 g으로 환산하시면 됩니다. Report에 올리고의 분자량이 표시되기 때문에 쉽게 바꿀 수 있습니다.

$$\text{분자량 M.W (g)} \times \text{mole 수 (nmole)} = \text{올리고의 양 (ng)}$$

6. 합성 올리고의 농도 맞추는 방법에 대한 설명

올리고 QC 리포트의 'volume for 100 pmole/µl'의 의미는, 건조된 올리고를 녹일 때 농도를 100 pmole/µl의 농도로 맞추기 위해 첨가해야 할 TE buffer나 D.W의 양을 의미합니다.

예를 들어,
 첨부된 올리고 QC 리포트에 189 라고 적혀 있다면, oligo tube에 D.W or TE-Buffer를 189 µl 첨가했을 때 농도가 100 pmole/µl가 된다는 것입니다. 이때 tube에 들어있는 oligo의 mole 수는 189.0 µl x 100 pmole/µl = 18,900 pmole = 18.9 nmole 입니다.
 사용하시는 목적에 따라 primer의 농도를 알맞게 설정하여야 하지만, 일반적으로 PCR이나 sequencing의 경우 많은 실험 protocol 들이 100 pmole/µl 농도를 사용하기 때문에, 당사에서는 100 pmole/µl 농도로 만들기 위한 volume을 제공하고 있습니다.

7. 50 nmole scale로 주문했는데 합성량이 그 보다 적은 이유는 무엇 인가요?

50 nmole scale 합성의 의미는 합성 출발 물질의 양을 50 nmole로 하여 합성을 시작한다는 것을 의미합니다. 따라서 합성 및 정제된 최종 올리고의 양은 항상 50 nmole 보다 적은 양이 얻어집니다. 올리고의 길이가 30 mer이고 한 염기를 붙이는 합성 효율(coupling efficiency)이 평균 98%일 때 $0.9829 = 0.56$ 이고 탈보호기 반응과 정제 과정에서 약 50% 이하의 수율로 얻어지므로 최종 수율은 28%인 14 nmole 정도로 얻어집니다.
 염기서열이 길어질수록 base coupling 및 deprotection, purification 수율이 급격히 떨어지므로 길이가 긴 올리고의 경우 최종 올리고는 5 nmole 이하로 얻어집니다.

8. 긴 올리고는 정량 하기가 어려운데 어떻게 정확하게 측정할 수 있을까요?

긴 올리고는 self-hybridization으로 인한 hypochromicity로 base의 extinction coefficient를 기반으로 계산한 값보다 낮은 흡광도를 가지게 됩니다. 온도를 올려서 OD를 측정하면 이러한 현상을 줄일 수 있지만 강한 self-hybridization을 하고 있는 경우에는 측정값이 실제 농도보다 적을 수 있습니다. 이 경우 temperature scanning spectrophotometer를 사용하면 정확한 농도와 더불어 Melting temperature 도 측정할 수 있습니다. 당사에서는 유료로 분석 서비스를 제공하고 있으니 문의하시기 바랍니다.

9. Molarity와 mole의 단위변환

농도의 단위는 M(mole/L)을 사용합니다. 유전자 실험에서 아주 적은 양의 올리고를 합성해서 사용하므로, µ (micro), n (nano), p (pico) 등의 저농도의 단위들을 주로 사용합니다. 이 단위들에 대해서는 다음을 참조하시기 바랍니다.

- 10⁻¹ = deci [d]
- 10⁻² = centi [c]
- 10⁻³ = milli [m]
- 10⁻⁶ = micro [µ]
- 10⁻⁹ = nano [n]
- 10⁻¹² = pico [p]
- 10⁻¹⁵ = femto [f]

$$1 \text{ pmole/}\mu\text{l} = 1 \times 10^{-12} \text{ mole} / 1 \times 10^{-6} \text{ L} = 1 \times 10^{-6} \text{ mole} / \text{L} = 1 \mu\text{mole} / \text{L} = 1 \mu\text{M}$$

이므로, µM과 pmole/µl는 같은 단위가 됩니다. 그러므로 저희가 제공하는 올리고 QC 시트에 적힌 양으로 올리고를 녹였을 때, 올리고 농도는 100 µM입니다.

Oligonucleotide FAQs

10. 본인이 계산한 올리고의 Tm 값과 바이오니아에서 제공한 Tm 값이 차이가 나는 이유는 무엇인가요?

바이오니아에서 사용하는 Tm calculator는 일반적으로 A, G, C, T의 개수에 일정 값을 곱하기하는 단순한 계산 방식과는 다른 것으로서 A, G, C, T의 배열 순서에 따라서 Tm 값은 차이가 나게 됩니다. 왜냐하면 한 염기의 앞뒤로 인접한 염기들에 따라 hybridization 강도가 영향을 받기 때문입니다. 그러므로 전체 염기서열의 A, G, T, C 각각의 염기 수가 같은 2개의 올리고도, sequence가 다르면 Tm은 다르게 됩니다. 올리고 이종나선의 안정성은 pH와 salt 농도에 의해서도 크게 영향을 받습니다. 특정 pH와 salt 농도에서의 정확한 Tm 값은 temperature scanning spectrophotometer를 사용하여 측정할 수 있습니다. 당사에서는 유료로 분석 서비스를 제공하고 있으니 문의하시기 바랍니다.

11. Degenerated primer와 universal primer의 정의에 대해 알고 싶습니다.

Degenerated primer는 primer의 특정 base 위치에 한 개 이상의 염기서열을 가지고 있는 primer를 의미합니다. 예를 들어, A라는 종(species)에서 a라는 gene의 sequence가 5'-gga ttc ggg ccc gag tct-3' 이고, B라는 종에서는 5'-ggc ttc ggg ccc gaa tct-3'이라고 가정한다면, 2개의 gene을 모두 포함하는 sequence는 5'-gg(a/c) ttc ggg ccc ga(g/a) tct-3'이라고 예측할 수 있습니다. (즉, 3번째 염기는 adenine 이나 cytosine, 15번째 염기는 guanine이나 adenine) 이와 같은 경우, 이 유전자에 해당하는 degenerate primer는 5'-ggM ttc ggg ccc gaR tct-3' 가 됩니다. 즉, degenerated primer는 sequence의 변이를 고려하여 모든 sequence에 binding할 수 있도록 하나의 위치에 두 가지 이상의 base가 섞여 있는 primer를 말합니다. 이때 합성된 올리고가 포함하고 있는 올리고의 종류 수는 mixed base가 여러 군데 들어가는 경우 각각의 mixed base의 곱하기가 됩니다. 상기 예의 경우는, 두 위치에 각각 두 가지의 base가 있으므로 모두 4종류의 sequence가 섞여 있는 primer 혼합물이 됩니다.

Universal primer는 plasmid등에 공통적으로 들어 있는 sequence를 의미합니다. Cloning작업에서 많이 사용되는 plasmid들은 대부분 pBR322 계열을 기반으로 하여 M13 bacteriophage의 sequence를 이용하여 조금씩 변형된 것들입니다. 예를 들면, T7 promoter나 SP6 promoter, T7 terminator, 혹은 M13 forward/reverse 등입니다. 이런 공통된 sequence에 binding할 수 있도록 design된 것들이 universal primer입니다. 보통 universal primer를 이용하여 vector에 삽입된 DNA fragment를 sequencing합니다.

Modified Oligo

1. Modified Oligo의 종류와 구조를 알고 싶습니다.

올리고의 다양한 응용을 위해서는, 자연계의 DNA, RNA 구조와 다른 modified된 올리고가 필요합니다. 올리고를 modification하기 위해서는 (deoxy)ribose ring을 변형하는 것, base를 변형하는 것, phosphodiester 결합을 바꾸는 것, 5'이나 3' 말단에 conjugate를 붙이는 여러 가지 방법이 가능합니다. 이러한 모든 변형 방법은 phosphoramidite 방법을 이용하여 올리고 합성기를 통해 변형 올리고를 합성할 수 있습니다. 올리고의 5' 위치에 modification이 필요한 경우는 정해진 염기배열의 올리고 합성이 완료된 후 label phosphoramidite를 사용하여 5' 위치에 결합시킴으로써 올리고의 5' 위치에 label이 부착됩니다.

3'-Modification의 경우는 label이 미리 부착된 고품지체로부터 올리고의 합성을 수행하여 3' 위치에 label이 부착된 올리고를 합성할 수 있게 됩니다.

Deoxyuridine base의 5번 탄소 위치에 label을 도입한 phosphoramidite를 이용하면 올리고 합성 시 원하는 sequence 중간에 label을 도입할 수 있어 결과적으로 internal modified 올리고의 합성이 가능하게 됩니다. Modification oligo 종류와 구조는 당사 홈페이지를 참고하시기 바랍니다.

합성 방법

1. 합성된 올리고에는 5' 또는 3' 위치에 phosphate가 붙어있습니까?

주문하실 때 별도로 지시하지 않으면 5' 과 3' 위치에는 -OH 기가 붙어 있습니다. 따라서 5' phosphate가 부착된 올리고를 원하시면 5' phosphorylation modification된 올리고를 주문하셔야 합니다.

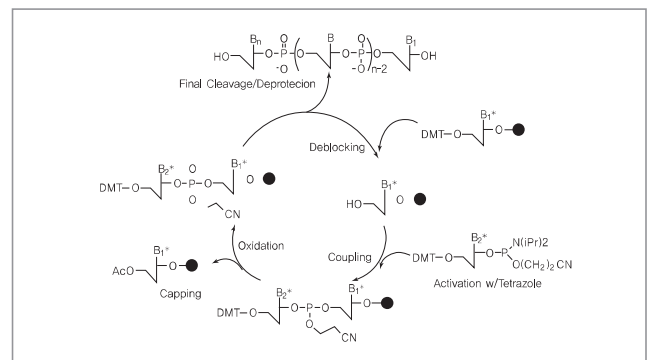
2. G가 여러 개 반복되는 올리고를 합성할 수 있을까요?

G가 여러 개 반복되는 올리고는 합성에 상당히 어려움이 있습니다. G가 4개 이상 반복되면 guanine tetraplex (Poon and MacGregor (198) Biopolymers 45:427-434)형태로 aggregation되기 쉽기 때문입니다. 이때는 Inosine을 몇 개의 G 대신 첨가하여 aggregation을 방지할 수 있습니다. 저희 바이오니아는 오랜 합성 경험을 통해 얻은 기술로 10 연속 G가 포함된 올리고도 큰 어려움 없이 합성해 오고 있습니다.

3. 올리고는 어떻게 합성되는지 알고 싶습니다.

Oligonucleotide 합성기에서 가장 보편적으로 사용되는 합성 방법은 Koster에 의해 개발된-cyanoethyl phosphoramidite를 이용하여 DNA 구조의 골격을 이루는 phosphodiester 결합을 연결해가는 'phosphite triester' 방법입니다(Nucl. Acids Res. 1984, 12, 4539; Tetrahedron Lett. 1983, 24,5843). 이를 통해 짧은 시간에 Oligonucleotide를 높은 효율로 합성할 수 있으며(합성 효율: >98%) 합성 시 사용되는 phosphoramidite monomer는 coupling을 위해 활성화되기 전에는 상당히 안정되어 있어 장기 보관도 가능합니다.

합성 과정은 nucleoside가 부착된 고품지체로부터 시작하여 de-blocking, coupling, oxidation, capping 과정으로 이루어지는 cycle을 반복함으로써 원하는 염기서열의 Oligonucleotide를 얻게 됩니다 (Figure 1).



<Figure 1>

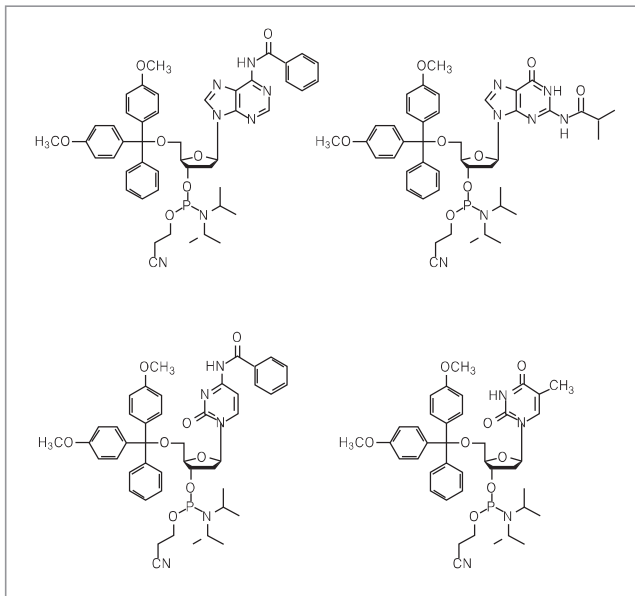
Oligonucleotide FAQs

A. Deblocking

합성 cycle의 첫 단계인 deblocking 과정은 고형지지체에 붙어 있는 염기의 5'OH의 보호기인 DMT기를 떼어내는 반응으로, 산성 조건이 요구되어 보통 3% trichloroacetic acid 를 사용합니다. 한편 산성 조건 하에서는 purine 계열 염기와 sugar ring 사이의 결합이 끊어지는 depurination 반응이 일어날 수 있으며 특히 염기가 adenosine 인 경우에는 그 경향이 더 심할 수 있다고 보고되었습니다. Trichloroacetic acid는 매우 강한 산으로 (pKa: ~1.5) deblocking에 사용할 때 depurination 시킬 가능성이 있어 너무 오랫동안 deblocking 반응을 하지 않도록 주의가 요구됩니다. 상기의 문제점을 최소화하기 위해 trichloroacetic acid 대신 약한 산인 dichloroacetic acid 가 쓰이기도 합니다. Deblocking 시 고형지지체로부터 떨어져 나가는 DMT 양이온은 진한 주황색을 띠는데 이의 흡광도를 통해 올리고 합성 시의 결합효율을 측정하는 데에 이용할 수 있습니다.

B. Coupling

Deblocking 과정을 통해 생성된 고형지지체내의 5'-hydroxyl 기는 가해 주는 nucleoside phosphoramidite monomer 와 coupling 반응을 통해 원하는 염기서열의 Oligonucleotide를 합성하게 됩니다. 이때 사용되는 nucleoside phosphoramidite monomer는 Figure 2에서 보듯이 염기 부분의 amine 기는 보통 benzoyl 기(adenosine, cytidine 경우) 또는 isobutyryl 기로(guanosine 경우) 보호되어 있으며 모든 monomer는 5'-hydroxyl 기가 DMT로 보호되어 있어 계속되는 결합 반응의 연결 부분 역할을 하게 됩니다(Figure 2).



<Figure 2>

사용되는 phosphoramidite 구조 그 자체로는 상당히 안정되어 있으므로 고형지지체의 5'-hydroxyl 기와 결합하기 위해서는 활성화 과정이 필요합니다.

보편적으로 사용되는 activator로는 tetrazole 로서 phosphoramidite 와 반응하여 nitrogen 부분을 protonation 시킨 뒤 diisopropyl amino 기를 치환시켜 매우 반응성이 강한 tetrazolide 구조로 변환시킵니다.

결과적으로 반응성이 강한 tetrazolide와 고형지지체의 5'-hydroxyl기 간의 결합 반응을 통해 Oligonucleotide의 phosphite triester 결합이 되는데 이때 약간의 수분이라도 존재하면 반응성이 강한 tetrazolide와 반응하여 원하지 않는 부산물을 생성하여 합성수율을 저하시키기 때문에 coupling 과정에서는 무수 조건이 필수적입니다.

C. Oxidation

Phosphoramidite 와 5'-hydroxyl 기의 coupling 과정을 거쳐 생성된 phosphite triester 구조는 더 안정된 phosphate triester로 변환시키는 과정이 필요하게 됩니다. 이를 위해서는 iodine을 사용한 oxidation 반응이 사용되며 결과적으로 phosphite는 phosphate로 바뀌게 됩니다.

D. Capping

Coupling 반응은 정량적으로는 일어나지는 않기 때문에 (보통 >98%) coupling 후 고형지지체에는 반응하지 않은 5'-hydroxyl기가 남아있게 되는데 이런 올리고가 다음 cycle의 coupling 과정에 반응하게 되면, 한 개의 염기가 deletion 된 배열을 갖는 (N-1) mer 를 생성하는 원인이 됩니다.

이렇게 deletion된 올리고들은 합성 완료 후 원하는 Oligonucleotide의 정제를 어렵게 만들기 때문에 이를 제거하는 것이 중요합니다. 그래서 coupling 과정 후 반응하지 않은 올리고의 5'-hydroxyl기를 더 이상 반응하지 않게 'capping' 할 필요가 있습니다. 이를 위해 acetic anhydride와 N-methylimidazole을 사용하여 acetylation시킴으로써 반응하지 않고 남아있는 고형지지체 내의 5'-hydroxyl기를 capping 시키게 됩니다. 원하는 길이의 Oligonucleotide의 합성은 상기의 과정들을 반복하여 실시함으로써 이루어지며 합성이 완료되면 최종적으로 ammonia 처리를 하여 합성된 Oligonucleotide를 고형지지체로부터 떼어낸 뒤 정제과정을 거쳐 순수한 Oligonucleotide로 얻게 됩니다.