

Oligonucleotide의 합성과 이용

나 도 선

(한국과학기술원 유전공학센터)

1. 서 론

Oligonucleotide 합성 방법은 이십년 전에 이미 확립되었으나 그 과정이 매우 복잡하여 몇 년전만 해도 전 세계의 몇 군데의 실험실에서만이 가능하였다.¹⁾ 또한 합성된 oligonucleotide의 이용 가치가 적어 DNA 합성은 유기 화학자의 연구 목적에 국한되어 있었다. 근래에는 유전자 재조합 기술 등 분자 생물학의 발달과 함께 합성 oligonucleotide는 생물학의 여러 연구 분야에 사용되고 있다.²⁾ 합성 DNA의 수요가 증가함에 따라 더 좋은 합성법에 대한 연구가 활발하게 진행되어 solid phase 합성법이 확립되었다³⁾. 최근에는 자동화된 합성기에 의해 쉽게 대량 생산할 수 있는 방법이 보편화되어 유기 합성의 기초가 적은 분자 생물학자 등에 의해 많이 사용되고 있다.⁴⁾

합성 DNA는 분자 생물학의 모든 분야의 연구에 사용될 수 있으며 앞으로도 그 이용도는 더욱 증가할 것으로 전망된다. 합성 기술의 발달로 생리활성을 가진 인조 유전자를 제조하는 것이 가능해졌으며 또한 다른 방법으로는 어려운 유전자의 분리와 cloning, site specific mutagenesis, 질병의 진단, 유전자의 구조 및 기능의 연구 등 수많은 분야의 연구에 이용되고 있다.^{2,5)} 본고에서는 현재 여러 군데 분자 생물학 연구실에서 성공적으로 사용되고 있는 자동 합성기에 의한 phosphite 합성법의 기초 이론과 합성된 oligonucleotide의 정제법에 대하여 간단히 서술하고 그 응용 방법에 대하여 논하고자 한다.

2. Solid phase 합성법

Oligonucleotide의 합성에 있어 어려운 과정

은 합성에 사용되는 protected nucleotide와 nucleotide derivatized support를 제조하는 과정으로서 많은 시간과 정밀한 기술을 필요로 한다^{3,6)}. 요즘에는 이러한 시료들이 여러 회사들에 의해 대량 생산되어 시판되고 있으며 비교적 싼 값에 공급되고 있다. 여기서는 이러한 시료로부터 phosphite 합성법에 의해 oligonucleotide를 제조하는 과정을 고찰하고 여기서 얻어지는 protected oligonucleotide의 deprotection 과정 및 정제 과정에 대하여 설명하고자 한다.

2-1. 합성 주기

Phosphite 합성법을 이용한 DNA 합성은 4가지의 deoxyribonucleoside-derivatized support 및 4가지의 deoxyribonucleotide monomer를 사용하여 간단하고 효과적인 반응 순서에 의해 nucleotide monomer를 순서대로 붙이고 deprotection과 정제 과정을 거쳐 이루어진다. 한 개의 염기를 붙이는 합성 주기는 detritylation, 축합반응, capping, 산화반응 등으로 구성되어 있다(Fig. 1 참조). 고상 합성법에서는 먼저 3' 끝의 nucleotide를 support에 붙여야 하며 현재는 이것이 여러 회사들에 의해 제조 공급되고 있다⁶⁾.

합성을 시작하는 처음 순서는 deprotection 즉 5'-OH의 protecting group인 dimethoxytrityl (DMT)을 제거하는 과정이다. 반응 용기는 filter가 달린 작은 column을 사용하고 반응 후에는 과잉으로 존재하는 시료를 filtration에 의해 제거하고 support는 적당한 용매로 씻어 내면 solid support에 고정된 product만이 반응 용기 안에 남게 된다. 다음 순서는 축합 반응이다. 축합반응은 5'-OH가 DMT기로 보호되고 염기의 NH₂기가 보호된 phosphoramidite를 사용하여 support에 붙은 nucleotide의 5'

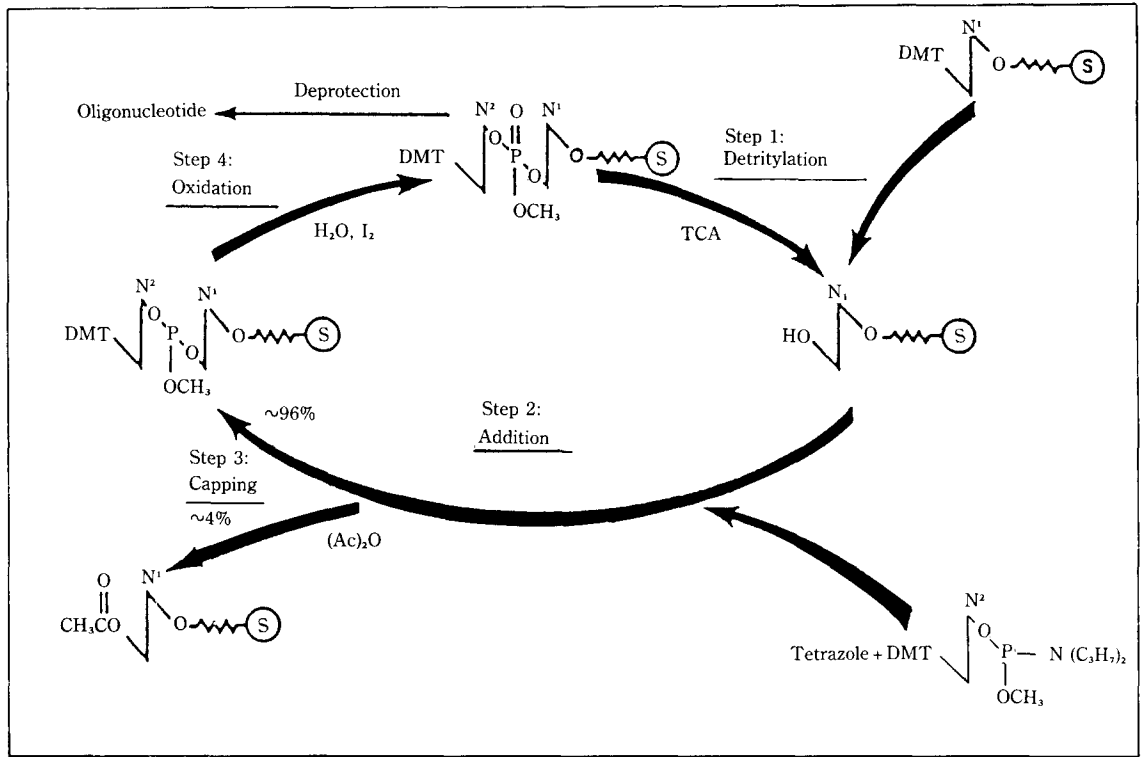


Fig. 1. DNA 합성주기

-OH에 두번째 nucleotide를 붙이는 반응이다. 다음 순서는 capping과정이다. Phosphoramidite를 이용한 축합 반응은 96-98%의 수율을 보이므로 반응이 안된 2-4%의 5'-OH에 acetyl기를 붙여서 다음 반응 주기에 여기에 nucleotide가 반응하여 oligonucleotide의 염기 서열이 달라지는 것을 방지한다. 마지막 순서는 산화반응이며 nucleotide의 phosphite 기를 phosphate로 산화시키는 과정이다. 이렇게 하여 한 개의 nucleotide를 연결시키는 반응이 끝나며 이 합성 주기는 해당된 서열의 oligonucleotide가 생성될 때까지 계속된다. 자동 합성기를 이용하면 매 합성 주기당 약 15분이 소요되므로 40-mer를 합성하기 위해서는 약 10시간 정도가 걸린다. 반응 조건등 더 자세한 합성 과정은 여러 논문들을 참조하면 된다^(2, 3, 7, 8, 9).

2-2. Deprotection과 정제

합성 과정에서는 반응에 이용되지 않는 모든 functional group은 부 반응을 줄이기 위해 보

호되므로 반응이 완성된 후에는 이 보호기들을 제거하고 또한 Oligonucleotide를 solid support로부터 떼어 내어야 한다. Fig. 2에 예시된 바와 같이 먼저 methyl group들을 제거하고

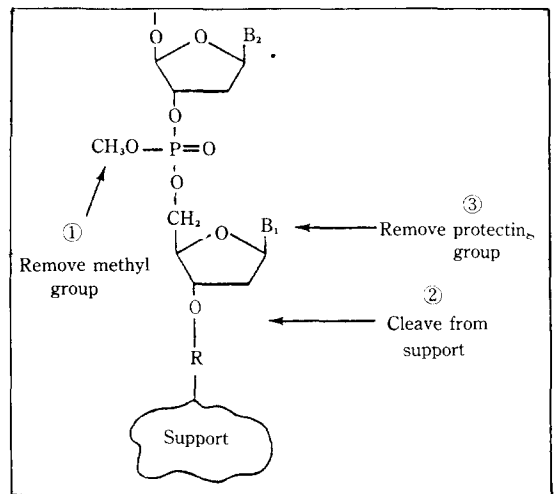


Fig. 2. Deprotection과 Support로부터의 분리

protected oligonucleotide를 support에서 떼어 낸 다음 base의 protecting group을 제거한다. 마지막으로 DMT기를 제거하여 5'-OH인 oligonucleotide를 얻는다¹²⁻¹⁴. Deprotection이 끝나면 중간에 합성이 중단된 작은 oligonucleotide들로부터 완전한 길이의 oligonucleotide를 분리한다. Oligonucleotide의 분리는 polyacrylamide gel 전기 영동법으로 7M urea를 포함하는 Tris/HCl buffer를 사용한다. 전기 영동에 의한 분리가 끝나면 TLC plate 위에 놓고 UV lamp를 사용하여 DNA band들을 볼 수 있다. 이 gel로부터 원하는 band부분을 잘라 내고 gel elution technique에 의해 DNA를 분리해 낸 다음 desalting하면 모든 과정이 끝나게 된다¹⁰.

2-3. Oligonucleotide의 Characterization

Oligonucleotide의 합성과 정제가 끝난 후에는 염기 서열을 분석하여 원하는 DNA가 만들어졌는가를 확인한다. Sequencing은 합성된 oligomer의 5'-OH에 [γ -³²P] ATP와 T₄ Kinase로 방사선 표식을 하여 wandering spot 방법이나 Maxam-Gilbert 방법에 의한다.

Wandering spot 방법은 20-mer보다 작은 oligonucleotide를 sequencing할 때 사용되는 반면^{11, 12} Maxam-Gilbert 방법은 더 큰 oligomer (~400base) 까지도 sequencing할 수 있다^{13, 14}. Wandering spot 방법에서는 label된 oligonucleotide를 snake venom phosphodiesterase로 부분적으로 digest하고, 이것을 cellulose acetate paper를 사용하여 pH 3.5에서 전기 영동시켜 일차원 분리를 얻고 DEAE-Cellulose 상에서 homochromatography에 의해 이차원의 분리를 얻는다. Sequence는 부분적으로 digest된 oligomer들의 mobility shift로부터 알아낼 수 있다. 이 방법은 sequence를 알아낼 뿐 아니라 합성 중에 생기는 불순물도 알아낼 수 있는 잇점이 있다. Maxam-Gilbert 방법에서는 4가지의 다른 염기에 특이성이 있는 화학 반응을 이용하여 이 염기가 있는 부분에서 DNA를 부분적으로 잘라 주고 polyacrylamide gel 전기 영동에 의해 크기 별로 나눈 다음 gel pattern으로부터 sequence를 알아낸다.

이 방법은 가장 보편적으로 쓰이고 있다.

3. 합성 DNA의 응용 분야

Oligonucleotide 합성 기술의 발전은 원하는 sequence의 DNA의 합성을 가능케 하여 분자 생물학 분야의 연구에 혁신을 가져왔다. 합성 DNA는 분자 생물학의 모든 분야의 연구에 사용되고 있으며 여기서는 현재 가장 많이 사용되고 있는 이용 방법에 대하여 기술하고자 한다.

3-1. Hybridization probe

Oligonucleotide는 complementary sequence를 가지는 DNA 또는 RNA와 적당한 조건에서 hybridize하여 안정한 duplex를 형성하며, 이러한 성질을 이용하여 'shotgun library' 방법으로 제조된 c-DNA나 또는 genomic DNA library로부터 원하는 clone을 찾아내는 probe로 사용된다¹⁵. 다시 말하면 c-DNA나 genomic DNA의 혼합물을 plasmid등의 벡터에 재조합하고 *E. coli*에 주입시킨 다음 많은 clone들을 agar plate 상에 얻는다. 이 clone들을 nitrocellulose filter에 immobilize하고 radioactive한 oligonucleotide probe와의 hybridization으로 선별한다. 어떤 protein 유전자의 DNA sequence가 알려져 있다면 이 sequence를 이용하여 정확한 hybridization probe를 합성할 수 있다. 그러나 대부분의 경우에 DNA sequence는 알려져 있지 않으며 이 때에는 protein의 amino acid sequence를 이용하여 hybridization probe를 만든다. 물론 아미노산 sequence로부터 이 protein은 code하는 DNA sequence를 정확하게 알아 내기는 어려우며 따라서 hybridization probe의 homology가 낮아져서 probe의 specificity가 떨어진다. 이러한 문제점을 극복하기 위하여 54-mer인 oligonucleotide를 사용하여 hybridization의 안정성을 높이는 방법과¹⁶ 17-mer의 혼합을 사용하는 방법이 개발되었다¹⁷. Wallace등에 의하면 적당한 온도에서는 완전하게 complementary인 sequence를 가진 17-mer만이 안정하게 hybridize하고 single mismatch가 있을 때는 hybridization

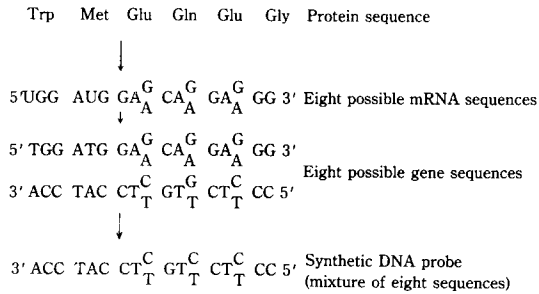


Fig. 3. Mixed oligonucleotide probe의 sequence 결정 과정

이 일어나지 않는다^(16,19). Fig. 3에 예시된 바와 같이 모든 가능한 codon의 조합인 17-mer의 혼합물을 사용하면 그 중 한개는 반드시 완전하게 complementary인 sequence를 갖는다. 혼합물인 17-mer를 합성하기 위해서는 두가지 가능한 sequence의 nucleotide를 붙이는 단계에서 mixture를 사용하여 단 한번의 합성으로 원하는 probe를 얻을 수 있다⁽²⁰⁾.

3-2. Primer

Oligonucleotide는 DNA나 RNA template의 complementary sequence와 hybridize 하므로 이것은 primer로 이용하여 complementary DNA(c-DNA)를 polymerase reaction에 의하여 합성할 수 있다⁽²¹⁾. 이러한 성질은 DNA나 RNA를 sequencing하는데 이용될 수 있으며 15-20 residue primer를 사용하여 'dideoxy chain termination' 방법으로 DNA의 염기배열을 알아 내는 기술은 이미 확립되어 널리 사용되고 있다⁽²²⁻²⁴⁾. 이 밖에, primer는 clone된 유전자를 선별하는데 이용되고 있다. 요약하여 말하면, primer를 사용하여 mRNA로부터 radioactive한 c-DNA를 합성하여 이것을 hybridization probe로 사용하여 clone을 선별한다. Oligonucleotide를 primer로 사용할 때에도 hybridization probe로 사용할 때와 마찬가지로 unique sequence를 이용하거나 또는 가능한 codon으로 만든 몇가지 혼합된 sequence를 사용하는 방법이 있다⁽²⁵⁻²⁷⁾. Unique sequence를 사용하는 방법은 mismatch가 primer의 3'쪽에 있거나 또는 primer sequence의 결정이 잘

못되었을 때는 polymerase반응이 잘 일어나지 않는 반면 혼합된 sequence를 사용하는 방법은 이러한 결점을 보완할 수 있다.

위와 같이 primer를 사용하여 m-RNA로부터 hybridization probe를 만드는 이외에, m-RNA로부터 만들어진 c-DNA 자체를 cloning한 경우도 보고되었다. 이 방법은 상당히 적은 비율로 존재하는 m-RNA의 c-DNA를 enrich하여 cloning을 효과적으로 수행하는데 쓰인다. Winter 등은 oligonucleotide primer를 사용하여 human influenza virus RNA의 전체 유전자를 가진 double strand DNA copy를 만들어서 클로닝하였다⁽²⁷⁾.

3-3. DNA의 구조와 기능의 연구

DNA는 잘 알려진 Watson-Crick의 B-form 구조 이외에 Z-form구조나 또는 cruciform, slip structure 등의 이차 구조를 가질 수 있다. DNA의 세부 구조를 연구하는데 있어 X-ray crystallography나 NMR spectroscopy 등은 매우 중요한 정보를 제공하며 여기에 쓰이는 다량의 oligonucleotide는 다른 방법으로는 얻기 어려우며 합성에 의해 제공될 수 있다. 예를 들면 d(CGCGCG) sequence를 가진 hexamer의 single crystal을 X-ray crystallography로 분석함으로써 'Z-DNA'의 세부 구조를 알게 되었으며⁽²⁸⁾ d(CGCGATATCGCG) sequence의 crystal로부터 'B-DNA'의 세부 구조까지도 연구가 가능하게 되었다⁽²⁹⁾. 또한 DNA와 protein의 cocrystal을 만들어서 protein이 DNA에 bind할 때의 세부 구조를 X-ray crystallography로 연구하였다⁽³⁰⁾. NMR spectroscopy나⁽³¹⁾ Raman spectroscopy⁽³²⁾를 이용하여 DNA 세부구조를 연구한 결과도 보고된 바 있다. DNA 세부 구조나 DNA-protein interaction을 연구하기 위해 위의 예와 같이 합성된 DNA를 직접 이용하는 방법 이외에 최근에는 이러한 oligonucleotide를 적당한 벡터에 재조합하여 plasmid 내에서의 특정한 sequence의 구조나 DNA-protein interaction을 연구할 수 있게 되었다. Wells 등은 d(GC)₁₆ sequence를 plasmid에 삽입하여 plasmid 내에서의 이 부분의 세부 구조

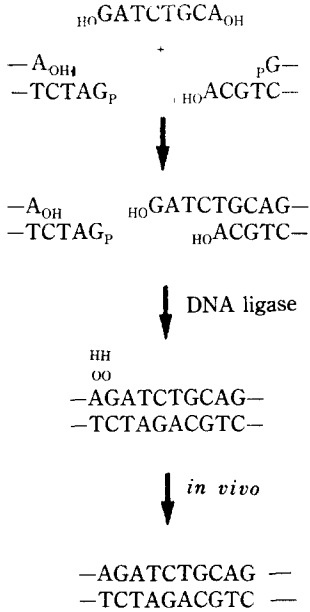


Fig. 4. Octamer인 adaptor의 이용으로 제한효소 *Bgl* II (AGATCT)와 *Pst* I (CTGCAG) Site을 재생하는 과정

와 구조의 변화에 따른 DNA-enzyme의 interaction에 대하여 연구하였다^(33,34). 그들은 two dimensional gel 분석법으로 d(GC)₁₈ sequence가 supercoil 형태의 plasmid 내에서 'Z-DNA' 구조를 가지는 것을 관찰하였으며 또한 Hha I methylase를 이용하여 이 enzyme이 B-form DNA와 반응하나 Z-form DNA와는 반응하지 않는 것을 관찰하였다. Nordheim 등은 Z-DNA를 antigen으로 하여 antibody를 만들고 이 antibody와 plasmid 내의 Z-DNA 또는 B-DNA 구조와의 interaction을 연구하였다⁽³⁵⁾. 이와같이 합성된 DNA를 plasmid에 재조합하여 그 부분의 구조나 또는 구조와 gene regulation의 상관관계를 연구하는 방법은 cruciform이나 slip structure 등의 이차 구조와 그 특성을 연구하는데 사용될 수 있다.

3 - 4. Linker, Adaptor, Connector

Linker, adaptor, connector는 약 10-15 residue의 oligonucleotide이며 유전자 재조합의 효율을 높이고 조작을 편리하게 하는데 많이 사용되고 있다. Linker의 역할은 clone하고자 하

는 DNA fragment의 양 끝을 벡터에 연결할 수 있는 cohesive end로 만들어 줌으로써 ligation 효율을 증대시키고 후에 이 fragment를 다른 벡터에 옮기고자 할 때 편리한 제한효소 절단부위를 제공하는데 있다. 따라서 과량의 linker와 clone하려는 blunt end DNA fragment와 반응시키고 제한효소 반응을 거치면 원하는 termini를 갖는 DNA fragment를 만들 수 있다^(36,37). Adaptor는 제한 효소의 cohesive end sequence를 가지며 Fig. 4에서 보듯이 3' (혹은 5')-protruding end를 5'(혹은 3')-protruding end로 바꾸거나, 끝이 맞지 않는 cohesive end간의 연결 및 제한효소 부위를 재생하는데 쓰인다. Fig. 4는 *Bgl* II와 *Pst* I의 cohesive end sequence로 구성된 adaptor를 이용하여 *Pst* I site과 *Bgl* II site을 재생시킨 예이다⁽³⁸⁾. Connector는 두가지 adaptor의 사용으로 끝이 맞지 않는 cohesive end를 가진 DNA fragment를 연결함과 동시에 제3의 제한효소 부위를 만드는 경우를 말한다. 예를들면 Fig. 5와 같이 두개의 decamer의 사용으로 *Eco*R I site과 *Sal* I site을 재생시키고 *Sma* I site을 삽입하였다⁽³⁹⁾.

3 - 5. 인조 유전자의 합성

합성 DNA를 이용하여 전체 유전자를 구성하는 기술은 Khorana 등에 의해 처음으로 개발되어 tRNA gene이 제조되었다⁽⁴⁰⁾. DNA 합성 기술의 발달로 oligonucleotide의 합성이 비교적 쉬워짐에 따라 현재는 수 백 base pair를 가진 duplex DNA의 제조가 가능하다. 우선 적당한 크기의 oligomer들을 합성하고 이것들을 T, ki-

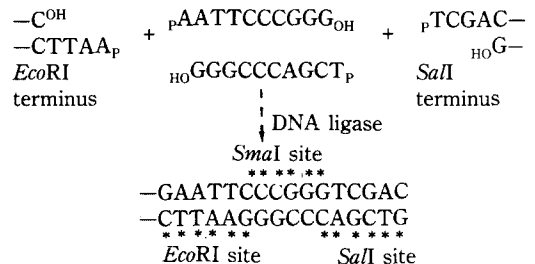


Fig. 5. Oligonucleotide를 connector로 이용하는 방법

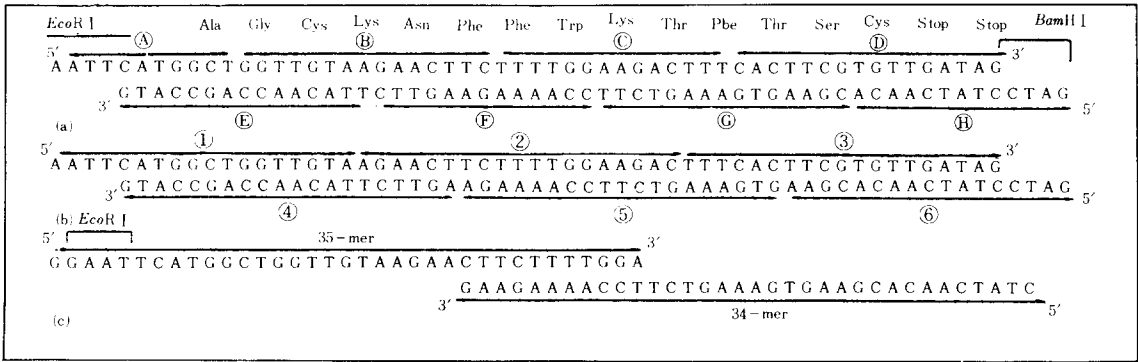


Fig. 6. Somatostatin 유전자의 합성 전략

nase와 T₄ DNA ligase의 사용으로 조합시킨다. 이렇게 제조된 duplex DNA는 벡터 DNA와 재조합시켜 클로닝한다⁽⁴¹⁾. Fig. 6는 peptide hormone인 somatostatin 유전자의 합성 전략을 보여주고 있다. 예시된 바와 같이 몇 가지의 다른 방법을 사용할 수 있으며 (a)에서는 8개의 oligomer가 필요하나 (b)에서는 6개만이 필요하다. (c)에서는 두 개의 35-mer와 DNA polymerase I을 사용하여 이 유전자를 제조할 수 있음을 보여 주고 있다. 현재까지는 (a)나 (b)의 방법이 많이 쓰여졌으나 합성법의 발달로 35-mer의 합성 수율이 좋아짐에 따라 (c)의 방법도 앞으로 많이 쓰여질 것으로 전망된다. 위와 같이 합성 유전자의 도입으로 현재까지 여러 가지 생리활성 물질이 발현 생산되었는데 예를 들면 human insulin⁽⁴²⁾, human growth hormone⁽⁴³⁾, human leukocyte interferon⁽⁴⁴⁾ 등이다. 생리활성 물질의 유전자를 합성하고 cloning하여 발현시키는 외에도 합성 유전자는 분자생물학 연구에 유용하게 쓰여지고 있다. 그 한 가지 예로서 여러가지 다른 *E. coli* promoter sequence를 합성하여 이 promoter들과 RNA polymerase와의 interaction을 연구한 것을 들 수 있다^(45, 46).

3 - 6. Site specific mutagenesis

유전자의 구조와 그 기능은 mutant를 이용하여 연구할 수 있다. 이 때에는 먼저 흥미있는 유전자를 clone하고 여기에 single base mutation을 도입하여 기능의 변화를 조사함으로써 그 유전자의 기능을 알아낸다. 특정한 site에

mutation을 도입하는 방법은 여러가지가 있으나 대별하여 oligonucleotide를 이용하는 방법과^(47, 48) chemical을 이용하는 방법의^(49, 50) 두 가지로 나눌 수 있다. 합성 DNA를 이용하는 방법은 원하는 위치에 정확하게 mutation을 얻을 수 있는 잇점이 있으며 target area의 sequence를 알고 적은 수의 mutation을 얻고자 할 때에 많이 쓰인다. 그 방법은 Fig. 7에서 보는 바와 같이 DNase I과 exonuclease를 써서 single strand template를 만든 다음 여기에 single base mismatch가 있는 oligomer를 primer로 사용하여 heteroduplex를 얻는다. 이것을 *E. coli*에 transform하면 mismatch 부분에서 원래의 DNA가 생기거나 또는 mutation이 일어나게 되는데 이것을 선별하면 된다. 선별 방법은 phenotypic selection이나 혹은 primer로 사용된 oligomer를 probe로 사용하여 hybridization방법으로 한다. Single strand template를 만드는 다른 방법은 bacteriophage M13 cl-

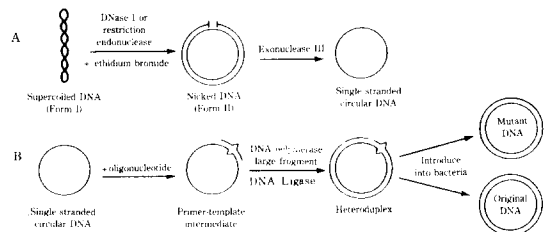


Fig. 7. 합성 DNA를 이용한 site-specific mutagenesis.

oning vector⁽⁵¹⁾를 사용한다. M13 system 을 사용하는 다른 잇점은 mutation된 region의 염기 서열을 'dideoxy chain termination' 방법에 의해 쉽게 알아낼 수 있다는 점이며 이것은 또한 mutant의 선별에 이용되고 있다. 현재까지 많은 mutant가 합성 DNA와 M13 system을 이용하여 만들어졌으며 single base transition, transversion, deletion, insertion 등 다른 종류의 mutation을 얻을 수 있다⁽⁵²⁾.

3-7. 질병의 진단

유전자에 일어난 point mutation은 여러가지 유전병의 원인으로 알려져 있다⁽⁵³⁾. 예를들면 sickle-cell anemia는 β -globin gene의 한 개의 염기가 바뀜으로 일어난다. 이것은 6 번째의 아미노산기의 adenine이 thymine으로 바뀜에 의해 glutamic acid가 valine으로 변이가 일어나고 이로 인해 β -globin의 구조가 달라지는데 기인한다⁽⁵⁴⁾. Conner 등은 oligonucleotide를 hybridization probe로 사용하여 sickle cell anemia를 진단하는 방법을 개발하였다⁽⁵⁵⁾. 그 방법을 요약하면 다음과 같다. 유전자를 적당한 제한 효소로 절단한 후 DNA fragment를 agarose gel에서 분리하고 Southern DNA blotting 방법으로 nitrocellulose filter paper에 옮기거나 또는 agarose gel상에서 직접 label된 probe로 hybridization시킨다^(56, 57).

최근에는 hybridization probe에 radioisotope 대신에 Biotin을 표식하는 방법이 개발되었다⁽⁵⁸⁾. Radioactive label을 사용하는 방법은 safety, handling, disposal 등의 문제를 야기시키며 ³²P의 radioactivity가 빨리 감소하므로 적은 양의 probe를 매 번 만들어야 하는 단점이 있다. 반면, biotin label된 probe는 ³²P label보다 감도가 높고⁽⁵⁹⁾ 빨리 결과를 얻을 수 있으며 장기간 보관할 수 있는 장점이 있다. Biotin label된 probe를 hepatitis, herpes 등의 감염을 진단하는데 사용하려고 하는 연구가 진행되고 있으며 또한 sickle cell anemia⁶⁰, β -thalassemia⁽⁶¹⁾ 등의 유전병의 진단법이 개발되었다. Biotin label된 probe의 사용 범위는 앞으로 넓어질 것으로 보이며 아직은 비교적 값이 비싼 것이 단점이다.

4. 결 론

자동 합성기의 보급과 합성에 사용되는 여러 가지 시료가 개발, 시판됨에 따라 DNA 합성은 여러 분자생물학 연구실에서 쓰이는 보편적인 기술로 정착되고 있다. 합성 DNA는 생물학의 여러 분야의 연구에 있어서 없어서는 안 될 소재가 되었으며 분자생물학의 발달과 함께 그 이용 범위는 점점 늘어날 것으로 전망된다. 본고에서는 DNA 합성법의 기초 이론과 합성된 DNA의 응용 범위에 대하여 고찰하였다.

REFERENCES

1. H. Schaller, G. Weiman, B. Lerch, and H.G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 3821 (1963).
2. K. Itakura, J.J. Rossi, R.B. Wallace, Annu. Rev. *Biochem.* **53**, 323-356 (1984).
3. M.D. Matteucci, M.H. Caruthers, *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 3185-91 (1981).
4. T.P. Patel, T.A. Millican, C.C. Bose, R.C. Titmas, G.A. Mock et al., *Nucleic Acids Res.* **10**, 5605-20 (1982).
5. R.F. Lathe, J.P. Lecocq, R. Everett, "Genetic Engineering" (R. Williamson, ed) Vol. 4, 1-55. Academic Press, New York and London (1983).
6. R.A. Jones, "Oligonucleotide Synthesis" (M.J. Gait, ed) pp. 23-34. IRL Press, Oxford and Washington, D.C. (1984).
7. M.D. Matteucci, M.H. Caruthers, *Tet. Lett.* **21**, 3243 (1980).
8. M.D. Matteucci, M.H. Caruthers, *J. Am. Chem. Soc.* **21**, 2683 (1980).
9. S.A. Narang, H.M. Hsiung, and R. Brouseau, *Methods Enzymol.* **68**, 90-97 (1979).
10. T. Maniatis, E.F. Fritsch, J. Sambrook, "Molecular Cloning", pp. 178, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York (1982).
11. F. Sanger, A.R. Donelson, H. Coulson, H. Kossel, D. Fischer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 1209-13 (1973).
12. E. Jay, P. Bambara, R. Wu, *Nucleic Acids Res.*

- 1, 331-56 (1974).
13. A.H. Maxam, W. Gilbert, *Methods Enzymol.* **65**, 499-560 (1980).
14. K. Rushow. *Focus* 5(2), 1-4, Bethesda Res. Lab., Bethesda, Md. (1983).
15. M. Grunstein, and J. Wallis, *Methods Enzymol.* **68**, 379-389 (1979).
16. M. Jaye, H. Delasalle, F. Schamber, A. Balland, V. Kohli, et al. *Nucleic Acids Res.* **11**, 2325-35 (1983).
17. R.B. Wallace, M.J. Johnson, T. Hirose, T. Miyake, E.H. Kawashima, K. Itakura, *Nucleic Acids Res.* **9**, 879-94 (1981).
18. R.B. Wallace, J. Shaffer, R.F. Murphy, J. Bonner, T. Hirose, K. Itakura, *Nucleic Acids Res.* **6**, 3543-57 (1979).
19. J.B. Dodgson, R.D. Wells, *Biochemistry*, **16**, 2367-73 (1977).
20. Y. Ike, S. Ikuta, M. Sato, T. Huang, K. Itakura, *Nucleic Acids Res.* **11**, 477-88 (1983).
21. M. Smith, "Methods of RNA and DNA sequencing", (S.M. Wasserman, ed), *Praeger Scientific, NY*, pp. 23 (1983).
22. F. Sanger, A.R. Coulson, B.G. Barrell, A.J.H. Smith, and B.A. Roe, *J. Mol. Biol.* **143**, 161 (1980).
23. W.M. Barnes, M. Bevan, *Nucleic Acids Res.* **11**, 349 (1983).
24. W.M. Barnes, M. Bevan, P.H. Son, *Methods Enzymol.* **101**, 98-122 (1983).
25. D.V. Goeddel, H.M. Shepard, E. Yelverton, D. Leung, R. Crea, *Nucleic Acids Res.* **8**, 4057-74 (1980).
26. D.V. Goeddel, E. Yelverton, A. Ullrich, H.L. Heynecker, G. Miozzari, et al. *Nature* **287**, 411-16 (1980).
27. G. Winter, S. Fields, M.J. Gait, *Nucleic Acids Res.* **9**, 237-45 (1981).
28. A.J.-J. Wang, G.J. Quigley, F.J. Kolpak, J.L. Crawford, J.H. Van Boom, G. Van der Marel, and A. Rich, *Nature* **282**, 680 (1979).
29. H.R. Drew, R.M. Wing, T. Takano, C. Broka, S. Tanaka, K. Itakura, and R.E. Dickerson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**, 2179 (1981).
30. J. Anderson, M. Ptashne, S.C. Harrison, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**, 1307 (1984).
31. M.A. Weiss, D.J. Patel, R.T. Sauer, and M. Karplus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**, 130 (1984).
32. R.M. Wartell, J. Klysik, W. Hillen, R.D. Wells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **79**, 2549 (1982).
33. D.S. Kang, and R.D. Wells, *J. Biol. Chem.* **260**, 7782-7790 (1985).
34. W. Zacharias, J.E. Larson, M.W. Kilpatrick, and R.D. Wells, *Nucleic Acids Res.* **12**, 7677-7692 (1984).
35. A. Nordheim, E.M. Lafer, L.J. Peck, J.C. Wang, B.D. Stollar, A. Rich, *Cell*, **31**, 309 (1982).
36. C.P. Bahl, K.J. Marians, R. Wu, J. Stawinsky, and S.A. Narang, *Gene* **1**, 81-92 (1976).
37. H.L. Heynecker, J. Shine, H. Goodman, H.W. Boyer, J. Rosenberg, R.E. Dickerson, S.A. Narang, K. Itakura, S.Y. Lin, and A. Riggs, *Nature* **263**, 748-752 (1976).
38. R. Lathe, A. Balland, V. Kohli, and J.P. Lecocq, *Gene* **20**, 185-193 (1982).
39. R.J. Rothstein, L.F. Lau, C.P. Bahl, S.A. Narang, and R. Wu, *Methods Enzymol.* **68**, 98-109 (1979).
40. E.L. Brown, R. Belagaje, M. Rvan, H.G. Khorana, *Methods Enzymol.* **68**, 109-151 (1979).
41. K. Itakura, T. Hirose, R. Crea, A.D. Riggs, H.L. Heynecker, F. Bolivar, and H.W. J. *Science* **198**, 1056 (1977).
42. D.V. Goeddel, D.G. Kleid, F. Bolivar, H.C. Heynecker, D.G. Yansura, R. Crea, T. Hirose, A. Kraszanski, K. Itakura, and A.D. Riggs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**, 106-110 (1979).
43. D.V. Goeddel, H.L. Heynecker, T. Hozumi, R. Arentzen, K. Itakura, D.G. Yansura, M.J. Ross, G. Miozzari, R. Crea, and P.H. Seeburg *Nature* **281**, 544-548 (1979).
44. E. De Maeyer, P. Skup, K.S.N. Prasad, J. De Maeyer-Guignard, B. Williams, G. Sharpe, D. Pioli, J. Hennam, W. Schuch, and K.T. Ather-ton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **79**, 4256-9 (1982).
45. J.J. Rossi, X. Soberon, Y. Marumoto, J. McMahon, K. Itakura, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**, 3203-7 (1983).
46. P.L. deHaseth, R.A. Goldman, C.L. Cech,

- M.H. Caruthers, *Nucleic Acids Res.* **11**, 773-87 (1983).
47. C.S. Craik, *BioTechniques* **3**, 12 (1985).
48. R.B. Wallace, M. Schold, M.J. Johnson, P. Dembeck, K. Itakura, *Nucleic Acids Res.* **9**, 3647 (1981).
49. R.M. Myers, L.S. Lerman, T. Maniatis, *Science* **229**, 242 (1985).
50. D. Shortle, P. Grisafi, S.J. Benkovic, D. Bostein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **79**, 1588 (1982).
51. J. Messing, B. Gronenborn, B. Muller-Hill, P.H. Hofschneider, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**, 3642-6 (1977).
52. M.J. Zoller, M. Smith, *Methods Enzymol.* **100**, 468-500 (1983).
53. M. Pirastu, Y.W. Kan, A. Cao, B.J. Conner, R.L. Teplitz, R.B. Wallace, *N. Engl. J. Med.* **309**, 284-7 (1983).
54. L. Pauling, H.A. Itano, S.J. Singer, I.C. Wells, *Science* **25**, 543-8 (1949).
55. B.J. Conner, A.A. Reyers, C. Morin, K. Itakura, R.L. Teplitz, R.B. Wallace, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**, 278-82 (1983).
56. E.M. Southern, *J. Mol. Biol.* **98**, 503-17 (1975).
57. T.M. Shinnick, E. Lund, O. Smithies, F.R. Blattner, *Nucleic Acids Res.* **2**, 1911-29 (1975).
58. P.R. Langer, A.A. Waldrop, D.C. Ward, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**, 6633-7 (1981).
59. R. Lewin, *Science*, **221**, 1167 (1983).
60. S.H. Orkin, P.F.R. Little, H.H. Kazazian, and C.D. Boehm, *N. Eng. J. Med.* **307**, 32-36 (1982).
61. M. Pirastu, Y. Kan, A. Cao, et al. *N. Eng. J. Med.* **309**, 284-7 (1983).