



УДК 547.963.32 : 542.95

ТВЕРДОФАЗНЫЙ СИНТЕЗ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ ИСКУССТВЕННОГО ГЕНА СИГНАЛЬНОГО ПЕПТИДА ЛИПОПРОТЕИНА *E. COLI*

Сиялков А. Н., Ломакин А. И., Попов С. Г.

Всесоюзный научно-исследовательский институт молекулярной биологии,
пос. Колцово Новосибирской обл.

С использованием полистирольного носителя осуществлен химический синтез 12 олигодезоксирибонуклеотидов длиной 12–13 мономерных звеньев, составляющих фрагмент ДНК, который кодирует сигнальную последовательность липопротеина из *E. coli*. Нарастание олигонуклеотидной цепи проводилось фосфоритриэфирным методом в направлении от 5'- к 3'-концу моно-, ди- и тринуклеотидными блоками с помощью смеси мезитилсульфонилхлорид – тетразол. Для удаления концевой β-дианэтильной группы использовался 2% раствор пентаметилгуанидина в диоксане. Показано преимущество этого реагента перед использовавшейся ранее смесью триэтиламин – ацетонитрил.

Продолжая поиск наиболее совершенных схем синтеза олигодезоксирибонуклеотидов на полимерных носителях с целью использования их для автоматического олигонуклеотидного синтеза, мы осуществили химический синтез олигонуклеотидов, составляющих фрагмент ДНК, который кодирует сигнальную последовательность липопротеина из *E. coli* (схема 1). Для

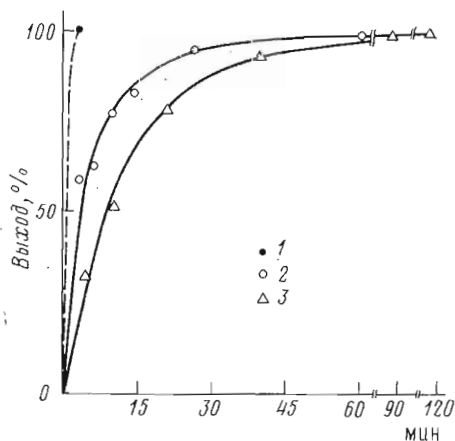


Рис. 1. Кинетические кривые деацетилирования полимер-нуклеотида Р-Тр(CIPh) (CNEt) с помощью 2% PMG в диоксане (1), 2% TMG в диоксане (2), смеси триэтиламин – ацетонитрил (3)

клонирования в состав фрагмента введены сайты эндонуклеаз рестрикции. Последовательность фрагмента была разбита на олигонуклеотиды длиной 12–13 мономерных звеньев. Нарастание олигонуклеотидной цепи проводили на полистирольном носителе от 5'- к 3'-концу по схеме 2. Ранее нами по такой схеме получен декатимидилат [1]. Этот способ не имеет недостатков, присущих альтернативной схеме с нарастанием цепи от 3'- к 5'-концу (схема 3):

а) обработки кислотой при детритилировании в каждом цикле нарастания цепи, вызывающей побочную реакцию апуринизации;

б) накопления продуктов сульфонилирования 5'-гидроксильной группы олигонуклеотида, загрязняющих целевой продукт и уменьшающих его выход;

в) образования последовательностей с более длинной цепью вследствие частичного деблокирования диметокситритильной группы в ходе реакции конденсации.

Вместе с тем один цикл нарастания олигонуклеотидной цепи по схеме 2 требует большего времени, чем по схеме 3. Это связано с тем, что

Принятые сокращения: ClPh – *n*-хлорфенил, Р – монометокситритилсодержащий полимер, Р' – карбоксилсодержащий полимер. Остальные сокращения даны в соответствии с рекомендациями IUPAC-IUB. Префикс «d» (дезокси) в формулах нуклеотидов для краткости опущен.

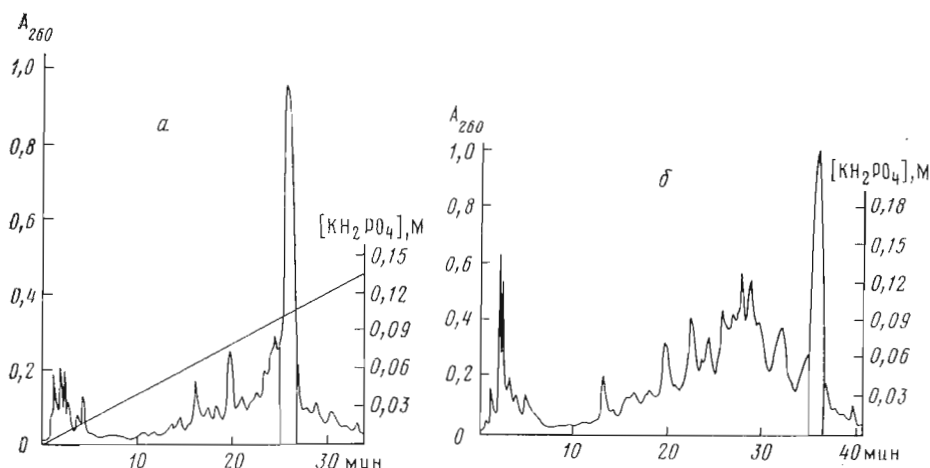


Рис. 2. Типичные профили высокоэффективной жидкостной хроматографии реакционных смесей (после удаления всех защитных групп) на колонке с Partisil 10SAX (3,2×250 мм) при синтезе додекануклеотида TTACGGCTCCCA (а) и тридекануклеотида ACCGCGAGAGA (б). Элюцию проводили в градиенте концентрации K_2HPO_4 (рН 6,5) в 30% CH_3CN со скоростью 1,5 (а) и 1,0 мл/мин (б)

удаление защитной группы с 3'-концевого фосфатного остатка полимер-олигонуклеотида протекает значительно медленнее, чем деблокирование его 5'-гидроксильной группы. На рис. 1 приведены полученные нами кинетические кривые деблокирования полимер-нуклеотида. Для завершения децианэтилирования Р-Тр(СlPh) (CNEt) с помощью триэтиламина необходимо 2 ч. Эти данные согласуются с полученными в работе [2].

Мы предположили, что применение более основных реагентов, чем триэтиламин (pK_a 11,01 [3]), таких, как гуанидины, может значительно увеличить скорость удаления цианэтильной группы. Прежде всего мы испытали в качестве децианэтилирующего агента пентаметилгуанидин (PMG) (pK_a 13,8 [4]). Действительно, это соединение чрезвычайно быстро деблокирует фосфатную группу. В среде как ацетонитрила, так и пиридина реакция заканчивается за несколько секунд, но вместе с тем в этих растворителях протекают неидентифицируемые побочные реакции. Например, β -цианэтильная группа в $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]\text{Tr}(\text{ClPh})(\text{CNEt})$ полностью удаляется 2% PMG в сухом пиридине в течение 2 мин, но одновременно образуется 42% побочного продукта.

В то же время мы обнаружили, что в сухом диоксане PMG действует практически только как деблокирующий реагент. Для завершения реакции полностью защищенного мононуклеотида на полимерном носителе с 2% PMG в сухом диоксане достаточно 3 мин (рис. 1). Высокую селективность реакции в среде сухого диоксана на примере полностью защищенных мононуклеотидов и динуклеотидов доказывают данные, приведенные в табл. 1. Выход остается практически количественным при увеличении времени деблокирования до 120 мин, что в 40 раз превышает время, необходимое для завершения реакции.

Тетраметилгуанидин (TMG) в диоксане так же, как PMG, селективно деблокирует фосфатную группу, однако значительно уступает PMG по скорости реакции (рис. 1).

Для синтеза олигонуклеотидов использовали полистирольный гель SX2 с 2% поперечных сшивок, содержащий карбоксильные якорные группы [1], который хорошо зарекомендовал себя в синтезе по схеме 3. В качестве первого нуклеотидного звена использовали защищенный мононуклеотид со свободной 5'-гидроксильной группой. Его присоединение к носителю производили с помощью мезитилсульфонилтетразола, так же, как и в случае использования альтернативной схемы 3 [1].

Цикл наращивания олигонуклеотидной цепи на носителе приведен в табл. 2. Конденсирующим реагентом служила смесь мезитилсульфонилхлорида и тетразола, не уступающая по скорости реакции мезитилсуль-

Децианэтилирование динуклеозиддифосфатов и мононуклеотидов

Исходное соединение	Время деблокирования, мин	Выход, %
P-Tr(ClPh) (CNEt)	3	100
[(MeO) ₂ Tr]bzCp(ClPh) (CNEt)	3	99
[(MeO) ₂ Tr]Tp(ClPh)ibuGp(ClPh) (CNEt)	3	100
[(MeO) ₂ Tr]bzCp(ClPh)bzAp(ClPh) (CNEt)	3	98,7
[(MeOTr)]Tp(ClPh)Tp(ClPh) (CNEt)	3	100
[(MeOTr)]Tp(ClPh)Tp(ClPh) (CNEt)	120	97

Таблица 2

Цикл наращивания олигонуклеотидной цепи на носителе

Реагент или растворитель	Число и продолжительность операций
Пиридин	3×1 мин
Диоксан	3×1 »
2% раствор PMG в диоксане	2×3 »
Диоксан	3×1 »
Пиридин	3×1 »
Нуклеозидный компонент, тетразол, мезитиленсульфонилхлорид	1×240–480 »

Таблица 3

Схемы синтеза и выходы целевых олигонуклеотидов

Олигонуклеотид	Схема синтеза	Получено после обессоливания	Взято для хроматографической очистки	Получен продукта	Выход на исходный нуклеотид %	Средний выход в расчете на стадию конденсации, %
AATTCATGAAA	1+2+2+2+2+1+ +2	417	20,8	5,3	14,3	72
GTAATCCTCGGTT	1+2+2+2+2+2+ +2	380	21,7	4,2	10,8	69
AGGTGTGATCG	1+3+3+3+2	324	21,6	4,5	10,1	57
TCGACGATCACA	1+3+3+3+2	325	21,6	5,6	12,7	60
GCCASTAAACTG	1+3+3+3+2	334	12,2	2,2	9,0	55
GCACCAGTTTAG	1+3+3+3+2	234	13,0	1,7	4,9	47
TTACGGTCCCA	1+3+3+3+2	325	12,4	4,3	18,7	66
GTGCTGGGAGCC	1+3+3+3+2	325	22,4	2,6	5,9	49
TGGCTTTCATAG	1+3+3+3+2	312	10,5	2,8	12,9	60
GTAGAACCGAGGA	1+3+3+3+1+2	287	17,4	2,1	4,7	54
ACCTGCGAGAAGA	1+3+3+3+1+2	337	16,4	2,8	7,4	59
CTACTCTTCTCGC	1+3+1+3+3+2	285	20,0	2,9	7,0	- 59

фонилтетразолу, которая более удобна, поскольку позволяет избежать стадии получения конденсирующего реагента, а также осложнений, связанных с его нестабильностью при хранении [5].

По окончании синтеза полимер-олигонуклеотид выдерживали 20 ч в 0,5 М водно-пиридиновом растворе *n*-нитробензальдоксимата лития для отщепления олигонуклеотидной цепи и удаления межнуклеотидных защитных групп, как описано ранее [1]. Полное удаление защитных групп достигалось обработкой реакционной смеси конц. водным аммиаком при 20° С в течение 20 ч. После предварительного обессоливания на колонке с биогеом P-2 целевой продукт выделяли высокоэффективной ионообменной хроматографией на колонках с Partisil 10 SAX. Типичные профили элюции олигонуклеотидов показаны на рис. 2. Для окончательной очистки целевые олигонуклеотиды после ионообменной хроматографии подвергались обращенно-фазовой хроматографии на колонках с LiChrosorb RP18 в

градиенте ацетонитрила. По электрофоретическим данным, гомогенность продуктов составляла не менее 95%.

В постоянной работе мы использовали в основном «библиотеку» тринуклеотидных блоков. На последней стадии наращивание цепи проводили с помощью динуклеотидов с 3'-О-бензоильной защитной группой. Полученные результаты приведены в табл. 3. Для качественного сравнения реакционной способности динуклеотидов и тринуклеотидов в реакции конденсации часть олигонуклеотидов была синтезирована преимущественно димерными, а другая — тримерными блоками. Средний выход на стадию конденсации с димерными блоками составлял в среднем 70% за 6 ч, а с тримерными блоками — 56% за 8 ч. Замедление реакции с более длинными блоками согласуется с данными о различной эффективности конденсации мононуклеотидов и полинуклеотидов в случае альтернативного способа наращивания олигонуклеотидной цепи [6]. По-видимому, это связано с энтропийным фактором реакции.

Существенное замедление скорости реакции в случае конденсации с тринуклеотидами, по-видимому, явилось главной причиной отказа авторами работы [7] от блочного метода.

Экспериментальная часть

В работе использовали дезоксинуклеозиды производства НИКТИ БАВ (Новосибирск), биогели Р-2 и SХ2 (Bio-Rad Laboratories, США), тетраметилгуанидин (Fluka, Швеция), тетразол [8], N,N,N',N'-тетраметилтиомочевину [9], N,N,N',N',S-пентаметилизотиурониййодид [10], силанизированный силикагель [11].

Высокоэффективную жидкостную хроматографию проводили с помощью хроматографа Altex (США), модель 322, на колонках размером 3,2×250 мм. В качестве носителей использовали для ионообменной хроматографии Partisil 10 SAX (Whatman, Англия), для обращенно-фазовой хроматографии — LiChrosorb RP18 (Merck, ФРГ). Другие методы и техника эксперимента аналогичны использованным в работе [1].

Пентаметилгуанидин. 50 г иодида N,N,N',N',S-пентаметилизотиурония добавляли порциями к 220 мл 27% спиртового раствора метиламина при 0° С, перемешивали при этой температуре 7 ч. Затем в течение 2 ч доводили температуру реакционной смеси до 50° С и перемешивали еще 10 ч, упаривали в вакууме водоструйного насоса, подщелачивали 40% водным NaOH и экстрагировали 400 мл бензола. Бензол упаривали, остаток перегоняли. Получено 8,9 г (37,8%), т. кип. 156–158° С (лит. данные: т. кип. 157–158° С [4]).

Децианэтилирование действием PMG. а) К раствору 40 мкмоль [(MeO)₂Tr]Np(ClPh) (CNEt) или [(MeO)₂Tr]Np(ClPh)N'p(ClPh) (CNEt) в 1 мл сухого диоксана прибавляли 20 мкл PMG и перемешивали 3 мин при 20° С. Реакционную смесь обрабатывали 20 мл 0,05 М триэтиламмоний — ацетатного буфера (рН 6,8) и хроматографировали на колонке (10×250 мм) с силанизированным силикагелем [11], градиент — 30–60% ацетонитрила в 0,05 М триэтиламмонийацетатном буфере (рН 6,8), 0,5 л. Выходы продуктов децианэтилирования, определенные по площадям пиков профилей хроматографии, даны в табл. 1.

б) Предварительно набухший в сухом диоксане полимер-нуклеотид Р-Тр(ClPh) (CNEt), полученный по методу [1], содержащий 40 мкмоль нуклеотида, выдерживали 3 мин при перемешивании в 1 мл 2% PMG в сухом диоксане. Полимер отфильтровывали и обрабатывали 1% CF₃COOH в хлороформе (3×5 мл), затем метанолом (4×5 мл). Объединенные фильтраты упаривали и хроматографировали на силанизированном силикагеле, как указано выше. Выход продукта децианэтилирования количественный.

Децианэтилирование полимер-нуклеотида Р-Тр(ClPh) (CNEt) действием PMG проводилось по аналогичной методике. Для построения кривой реакции децианэтилирования пробы, отобранные через определенные промежутки времени, анализировали с помощью обращенно-фазовой хроматографии. Анализ выполняли на колонке (3,2×250 мм) LiChrosorb RP18, элюент — 50% CH₃CN в 0,05 М триэтиламмонийацетатном буфере (рН 6,8).

Децианэтилирование смесью триэтиламин — ацетонитрил. 160 мг полимера Р-Тр(СlPh) (CNEt), содержащего 40 мкмоль нуклеотида, перемешивали в 4 мл смеси триэтиламин — ацетонитрил (1:1) при 20° С. Отобранные через определенные промежутки времени пробы обрабатывали 1% CF₃COOH в хлороформе (3×5 мл) и метанолом (4×5 мл). Объединенные фильтраты упаривали и хроматографировали на колонке (3,2×250 мм) LiChrosorb RP18, элюент — 50% CH₃CN в 0,05 М триэтиламмонийацетатном буфере (рН 6,8).

Введение первого нуклеотидного звена. 1 г карбоксил-полимера [1] и 0,5 ммоль частично защищенного нуклеотида Np(СlPh) (CNEt) высушивали упариванием с сухим пиридином (3×10 мл), добавляли 5 мл сухого пиридина и 378 мг (1,5 ммоль) мезитиленсульфонилтетразола, перемешивали при 20° С 20 ч, прибавляли 0,4 мл метанола и перемешивали еще 12 ч. Полимер отфильтровывали, тщательно промывали пиридином (6×10 мл) и хлороформом (4×10 мл) и сушили в вакууме. Нагрузку носителя по нуклеотиду определяли спектрофотометрически, обрабатывая навеску полимер-нуклеотида 25% аммиачно-метанольным раствором в течение 20 ч и последующей промывкой полимера метанолом. Содержание нуклеотида на полимере составляло на 1 г полимера для Р'-Тр(СlPh) (CNEt), Р'-bzСр(СlPh) (CNEt), Р'-bzАр(СlPh) (CNEt), Р'-ibGр(СlPh) (CNEt) 120, 60, 100 и 98 мкмоль соответственно.

Удаление β-цианэтильной группы и проведение стадии конденсации. Навеску полимера, содержащую 5 мкмоль защищенного нуклеотида, перемешивали 3 мин при 20° С в 1 мл 2% PMG в сухом диоксане, полимер отфильтровывали, добавляли свежую порцию раствора PMG и перемешивали еще 3 мин. Полимер отфильтровывали, промывали сухим диоксаном (3×5 мл) и сухим пиридином (3×5 мл). Децианэтилированный полимер-нуклеотид (олигонуклеотид), 15 мкмоль нуклеозидного компонента и 9,5 мг (135 мкмоль) тетразола высушивали с сухим пиридином (3×3 мл), добавляли 3 мл сухого пиридина и 9,8 мг (45 мкмоль) мезитиленсульфонилхлорида. Реакционную смесь концентрировали до объема 0,3 мл и перемешивали 4—8 ч при 20° С, полимер отфильтровывали, промывали сухим пиридином (3×3 мл) и сухим диоксаном (3×3 мл).

Полное удаление защитных групп. Полимер-олигонуклеотид (100 мг) обрабатывали 2 мл 0,5 М раствора *n*-нитробензальдоксимата лития в смеси пиридин — вода (7:3) в течение 20 ч при 20° С. Полимер отфильтровывали и промывали пиридином (4×5 мл) и 50% водным пиридином (4×5 мл). Фильтраты объединяли и упаривали досуха. К остатку добавляли 10 мл конц. аммиака и выдерживали 20 ч при 20° С.

После удаления защитных групп реакционные смеси обессоливали на колонке 25×500 мм с биогеелем Р-2, а затем хроматографировали на колонке с Partisil 10 SAX. После ионообменной хроматографии вещество целевого пика собирали и хроматографировали на колонке с LiChrosorb RP18. Последовательности олигонуклеотидов подтверждены анализом по методу Максама — Гилберта [12] в составе гена после сшивки с помощью ДНК-лигазы фага Т4. Ферментативная сборка гена будет предметом отдельного сообщения.

Авторы выражают благодарность С. И. Ястребову за помощь в хроматографическом выделении продуктов, В. Ф. Ямщикову за анализ нуклеотидной последовательности, О. П. Минковой, О. М. Глазыриной, Н. А. Попченко за участие в синтезе моно-, ди- и тринуклеотидных блоков.

ЛИТЕРАТУРА

1. Свияков А. Н., Ломакин А. И., Ямщиков В. Ф., Попов С. Г. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 4, с. 490—498.
2. Потапов В. К., Вейко В. П., Волков Е. М., Орецкая Т. С., Телесникова Т. Р., Шабарова З. А., Прокофьев М. П. Докл. АН СССР, 1981, т. 260, № 3, с. 640—642.
3. Гордон А., Форд Р. Спутник химика. М.: Мир, 1976, с. 73.
4. Patent U. S. 2.845.459, July 29, 1958, Chem. Abstr., 1959, v. 53, № 1, p. 231 (e).
5. Seth A. K., Jay E. Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, № 22, p. 5445—5459.
6. Gait M., Mathes H. W. D., Singh M., Titmas R. C. J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1982, № 1, p. 37—40.

7. Ito H., Ike Y., Ikuta S., Itakura K. Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, № 5, p. 1755-1769.
8. Finnegan W. G., Herry R. A. J. Org. Chem., 1959, v. 24, № 10, p. 1565-1567.
9. Braun J., Weissbach R. Ber., 1930, B. 63, № 10, S. 2836-2847.
10. Вейганд-Хильгергаг. Методы эксперимента в органической химии. М.: Химия, 1968, с. 631.
11. Калашников В. В., Самуков В. В., Шубина Т. Н., Ямщиков В. Ф. Биорган. химия, 1983, т. 9, № 5, с. 666-672.
12. Maxam A. M., Gilbert W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, № 2, p. 560-564.

Поступила в редакцию
11.VI.1983

После доработки
5.VIII.1983

SOLID-PHASE SYNTHESIS OF OLIGONUCLEOTIDES CORRESPONDING TO THE ARTIFICIAL GENE FOR SIGNAL PEPTIDE OF *E. COLI* LIPOPROTEIN

SINYAKOV A. N., LOMAKIN A. I., POPOV S. G.

All-Union Research Institute of Molecular Biology, Koltsovo, Novosibirsk region

The chemical synthesis of the DNA fragment corresponding to the signal sequence of lipoprotein from *E. coli* is described. Twelve oligodeoxyribonucleotides of 12-13 units long were synthesized on a polystyrene support by the phosphotriester method. Elongation of oligonucleotide chain was carried out in the 5'-3'-direction with mono-, di- and trinucleotide blocks using mesitylsulphonyl chloride with tetrazole as a coupling agent. New deblocking reagent, pentamethylguanidine (as a 2% dioxane solution) was used for fast removing of the β -cyanoethyl phosphate protecting groups.