



УДК 577.113.4 : 547.963.32.057

**ЭФФЕКТИВНЫЙ МЕТОД СИНТЕЗА ФОСФОДИЭФИРНЫХ
ПРОИЗВОДНЫХ МОНО- И ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ
В ВОДНОЙ СРЕДЕ***Готтих М. Б., Ивановская М. Г., Якоби Л. В.,
Шабарова З. А.**Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*

Разработан эффективный метод получения фосфодиэфиров моно- и олигонуклеотидов в водной среде, основанный на конденсации нуклеотидного компонента со спиртом в присутствии хлоридрата *N*-(3-диметиламинопропил)-*N'*-этилкарбодимиды. Изучены закономерности конденсации и найдены оптимальные условия для синтеза производных моно- и олигонуклеотидов с простыми спиртами — метиловым, этиловым, пропиловым, β-цианэтиловым и др., а также *n*-нитрофенолом и *N*-оксисбензотриазолом.

Конденсацию проводят при 4°С в течение 2–24 ч, при этом выходы фосфодиэфиров составляют 30–100%. Метод позволяет получать производные олигонуклеотидов, содержащие остатки красителей; его можно также применить для получения аффинных реагентов, химических зондов, антигенных препаратов.

В последние годы при изучении молекулярных механизмов функционирования генетического аппарата клетки [1] и структурной организации вирусов [2, 3] появилось много данных о важной роли ковалентных НК-белковых комплексов с фосфодиэфирным типом связи. В некоторых энзиматических [1] и неэнзиматических [4] процессах фосфодиэфиры нуклеиновых кислот проявляют себя достаточно реакционноспособными соединениями, легко претерпевающими переэтерификацию с образованием новой фосфодиэфирной связи. В связи с этим представляет большой интерес синтез производных олигонуклеотидов с различными типами окиссоединений, которые могут служить модельными соединениями при исследовании молекулярно-биологических процессов. Получение фосфодиэфирных производных на основе олиго- и полинуклеотидов важно не только с точки зрения изучения механизма белково-нуклеиновых взаимодействий. Оно представляет самостоятельный интерес в плане конструирования новых аффинных реагентов и реагентов для химического лигирования нуклеиновых кислот. Кроме того, фосфодиэфирные производные олигонуклеотидов, содержащие флуоресцентные или парамагнитные группировки, могут служить химическими «метками» или «зондами» при изучении нуклеиновых кислот и нуклеопротеидов. Ковалентное присоединение гаптенных к олигонуклеотидам или нуклеиновым кислотам открывает путь создания антигенных препаратов на базе нуклеиновых кислот.

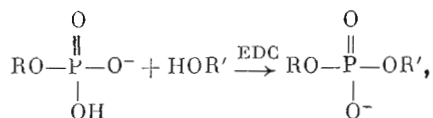
Широкое использование фосфодиэфирных производных олигонуклеотидов в молекулярно-биологических исследованиях до сих пор было осложнено отсутствием эффективных и достаточно простых методов их синтеза.

Разработанные к настоящему времени методы — метод смешанных ангидридов с дифенилфосфорной [5, 6] или мезитиленкарбоновой кислотой [7], а также метод с использованием *N,N'*-дициклогексилкарбодимиды [8, 9] — основаны на реакциях, протекающих в безводной среде, и, следовательно, требуют перевода нуклеотидного материала в форму, растворимую в органических растворителях. Для достаточно протяженных (более 8–10-звенных) олигонуклеотидов, а также фрагментов ДНК и РНК такой

Условные обозначения: EDC — хлоридрат *N*-(3-диметиламинопропил)-*N'*-этилкарбодимиды, MES — 2-морфолиноэтилсульфокислота, Dns-OH — 5-диметиламинонафталин-1-сульфокислота, MeIm — 1-метилимидазол.

перевод является низкоэффективной и трудоемкой операцией. Помимо этого, в безводной органической среде одновременно с образованием фосфодиэфиров олигонуклеотидов протекает ряд побочных процессов: алкилирование гетероциклических оснований [8], расщепление и изомеризация межнуклеотидных связей [10], причем степень модификации возрастает с увеличением длины олигонуклеотида.

В настоящей работе предлагается общий и эффективный метод получения фосфодиэфиров моно- и олигонуклеотидов в водной среде. Использование водной среды увеличивает селективность реакции и позволяет обеспечить полную растворимость нуклеотидного материала. Метод основан на конденсации моно- или олигонуклеотида с оксисоединением в присутствии водорастворимого *N*-(3-диметиламинопропил)-*N'*-этилкарбодиимида (EDC)



где R — остаток моно- или олигонуклеотида, R' — остаток спирта.

Ранее мы установили, что EDC является высокоспецифичным реагентом, позволяющим избирательно активировать фосфомоноэфирную группу незащищенного олигонуклеотида [11]. Изучение закономерностей конденсации нуклеотидов со спиртами под действием EDC проводили на мононуклеотиде АМР. Выбор нуклеотида определяется тем, что в АМР гетероциклическое основание не подвергается модификации карбодиимидами, что дает возможность избирательно изучать только превращения фосфомоноэфирной группы.

Ранее при синтезе фосфамидных производных было установлено, что конденсация под действием EDC рН-зависима [11]. В связи с этим прежде всего необходимо было изучить зависимость эффективности конденсации нуклеотида с оксисоединениями от рН среды. Для этого конденсацию АМР со спиртами проводили при рН 1–9. Через определенные интервалы времени отбирали аликваты реакционных смесей и анализировали их методами хроматографии и электрофореза на бумаге. Оптимальный для протекания конденсации интервал значений рН определяется природой спирта (табл. 1). В случае простых спиртов эффективность реакции мало изменяется в интервале рН 2–6. При рН 1 конденсация не происходит, вероятно, в связи с тем, что нуклеотид присутствует в полностью протонированной форме и не образует аддукта с карбодиимидом [14]. При рН ≥ 7 единственным продуктом реакции является соответствующий пирофосфат, по-видимому, потому, что при рН > 6 нуклеотид присутствует в реакционной среде главным образом в виде дианионфосфата (рK₂ 6,57 [15]), который является более сильным нуклеофилом, чем спирт [16], и, следовательно, в первую очередь вступает в карбодиимидную конденсацию.

Совершенно иная картина наблюдается в случае *n*-нитрофенола. Эффективность конденсации увеличивается с ростом рН среды и становится максимальной при рН, близких к значению рK_a *n*-нитрофенола. Поэтому можно предположить, что нуклеофильной частицей в этом случае является ионизованная форма *n*-нитрофенола в отличие от простых спиртов, когда нуклеофильная атака осуществляется за счет гидроксильной группы спирта. Поскольку фенолят-ион (и, очевидно, *n*-нитрофенолят-ион) более сильный нуклеофил, чем дианионфосфат [17], конденсация в этом случае приводит к образованию соответствующего эфира нуклеотида, а не пирофосфата.

Интересная картина наблюдается в случае *N*-оксисбензотриазола. Очевидно, это оксисоединение способно вступать в реакцию, находясь и в протонированной (рK_a 4,0 [13]), и в непротонированной форме.

Мы исследовали также зависимость эффективности конденсации от концентрации реагентов и температуры (табл. 2). Анализ полученных данных показал, что для эффективного протекания реакции необходима достаточно высокая концентрация спирта — не ниже 1–3 М, концентрация

Эффективность реакции АМР со спиртами под действием EDC
при различных значениях pH
Концентрации, М: АМР — $3 \cdot 10^{-2}$, спирта — 3, EDC — 0,5; 20° С

Спирт	pH	Выход фосфодиэфира (%) при времени реакции, ч				
		0,5	2	6	16	24
n-Пропанол *	1,0	0	0	0	0	0
	2,0	30-35	80-85	100	100	100
	3,2	30-35	95-100	100	100	100
	4,5	25-30	100	100	100	100
	5,5	15-20	95	100	100	100
	6,0	10-15	90-95	100	100	100
	7,0	0	0	0	3-5	5-10
n-Нитрофенол **	≥ 8,0	0	0	0	0	0
	3,5	—	—	—	3-5	5-10
	5,0	—	—	—	15-20	20-25
	6,5	—	—	—	90-95	100
	7,0	—	—	—	60-65	95-100
	8,0	—	—	—	45-50	60-65
N-Оксибензотриазол ***	8,4	—	—	—	10-15	15-20
	2,5	45-50	60-65	90-95	—	100
	4,0	—	—	93-95	—	100
	6,0	50-55	75-80	93-95	—	100
	7,0	8-10	15-20	35-40	—	35-40
9,0	0	0	0	—	0	

* Аналогичная зависимость эффективности реакции от pH наблюдается для метанола, этанола, β-цианэтанола и других простых спиртов.

** $pK_a = 7,15$ [12].

*** $pK_a = 4,00$ [13].

Таблица 2

Конденсация АМР с этанолом под действием EDC при различных концентрациях
реагентов и температуре
Концентрация АМР $2 \cdot 10^{-2}$ М, pH 4,5

Концентрация, М		t, °С	Выход (%) через время, ч				
этанол	EDC		1	2	4	6	24
3	0,5	4	30-35	42-47	90-100	100	100
3	0,5	20	50-55	90-100	100	100	100
3	0,5	50	70-75	70-75	70-75	70-75	70-75
1	0,5	20	35-40	45-50	55-60	60-65	70-75
1	0,5	50	45-50	47-52	50-52	55-60	55-60
1	0,3	50	35-40	36-41	36-42	40-45	43-48
1	0,3	20	30-35	40-45	50-55	51-56	52-57
0,3	0,3	20	15-20	20-25	30-35	35-40	36-42
0,3	0,1	20	0	0	0	0	0

EDC — 0,5 М. Повышение температуры от 4 до 50° С ведет к увеличению скорости конденсации, однако выходы фосфодиэфиров при этом снижаются из-за ускорения конкурентного процесса гидролиза EDC.

Повышение температуры реакции нежелательно также потому, что при этом увеличивается скорость побочной реакции — модификации гетероциклических оснований Ura, Thy и Gua под действием EDC [18]. В случае мононуклеотидов эта модификация становится заметной при инкубации реакционной смеси при $pH > 6$ в течение 2 ч (20° С). Мы установили, что при обработке фосфодиэфиров, содержащих модифицированные гетероциклические основания, 0,2 М раствором Na_2CO_3 (pH 10,5) в течение 16 ч при 20° С (или 6 ч при 37° С) происходит полная регенерация немодифицированных фосфодиэфиров мононуклеотидов. При проведении конденсации при $pH < 5,5$ модификация не наблюдается даже при длительной инкубации реакционной смеси (48 ч, 20° С).

Получение фосфодиэфиров моно- и олигонуклеотидов в воде при концентрации EDC 0,5 М

Нуклеотидный компонент	Спирт	pH	Концентрация спирта, М	Концентрация нуклеотида, мм	t, °C	Время процесса, ч	Выход фосфодиэфира, %
AMP	Метанол	4,5	5,0	20	4	4	100
	Этанол	4,5	3,0	20	20	2	100
	<i>n</i> -Пропанол	4,5	3,0	30	20	2	100
	β -Цианэтанол	4,5	4,0	30	4	4	90
	β -Оксиэтиламинд Dns-ОН	4,0	1,5	20	4	24	40
d(pTpT)	<i>n</i> -Нитрофенол	6,5	3,0	20	20	24	100
	N-Оксибензотриазол	4,5	3,0	20	4	12	100
	Аденозин-2',3'-циклофосфат	4,5	3,0	15	4	48	30
(pU) ₃	N-Оксибензотриазол	4,5	3,0	0,2	4	8	95
d(pCCAGGAGTAC)	Метанол	4,5	6,0	9·10 ⁻³	4	16	100
d(pCCTGGAATT)	Этанол	4,5	6,0	0,1	4	6	100
d(pCCAATGAGA)	Этиленгликоль	4,5	6,0	3·10 ⁻²	4	6	95
d(TGGCCAAGCTp)	β -Оксиэтиламинд Dns-ОН	4,0	1,5	0,1	4	24	30
d(TGGCCAAGCTp)	N-Оксибензотриазол	4,5	3,0	0,1	4	8	95

Таким образом, для получения фосфодиэфирных производных нуклеотидов с простыми спиртами оптимальными следует считать: pH реакционной среды 4,0–5,5, концентрацию спирта — 3 М, концентрацию EDC — 0,5 М, температуру 4–20° С, время реакции 2–6 ч. В случае *n*-нитрофенола оптимальное значение pH равно 6,5–7,0, время — 16–24 ч, остальные условия аналогичны указанным выше.

В найденных нами оптимальных условиях конденсации получен ряд эфиров AMP (табл. 3), которые были выделены методом электрофореза на бумаге при pH 7,5. Метилловый, этиловый, пропиловый эфиры AMP идентифицировались по данным бумажной хроматографии и электрофореза при сопоставлении с соединениями, полученными в нашей лаборатории ранее [7]. Структуру β -цианэтилового эфира подтверждали ферментативным и щелочным гидролизом. Для доказательства структуры эфиров AMP с *n*-нитрофенолом и β -оксиэтиламиндом Dns-ОН проводили их гидролиз фосфодиэстеразой змеиного яда, компоненты смеси разделяли с помощью электрофореза на бумаге и соотношение AMP — спирт определяли спектрофотометрически.

Методике, разработанную для мононуклеотидов, мы попытались использовать для получения производных олигонуклеотидов, но при этом столкнулись с неожиданным эффектом. Оказалось, что в олигонуклеотидах происходит количественная модификация гетероциклических оснований (Ura, Thy и Gua) под действием EDC в условиях, когда эти основания не подвергаются модификации в составе мононуклеотидов (pH 5,5; 4° С, 16 ч).

На наш взгляд, причиной такого ускорения модификации может быть полиэлектролитный эффект полианионного олигонуклеотида. Катионный реагент $[C_2H_5-N=C=N-(CH_2)_3-NH(CH_3)_2]Cl^-$ за счет электростатических взаимодействий, по-видимому, концентрируется вблизи полианионного сахара-фосфатного остова, в результате его локальная концентрация вблизи гетероциклических оснований также существенно повышается, что и приводит к ускорению их модификации. Интересно, что при получении фосфамидных производных олигонуклеотидов подобного ускорения модификации не наблюдалось [11]. Видимо, амин, присутствующий в реакционной среде в протонированной форме (концентрация протонированного амина в 6–7 раз превышает концентрацию карбодиимида), в первую очередь образует полиэлектролитный слой вблизи олигонуклеотида и тем самым защищает его от модификации.

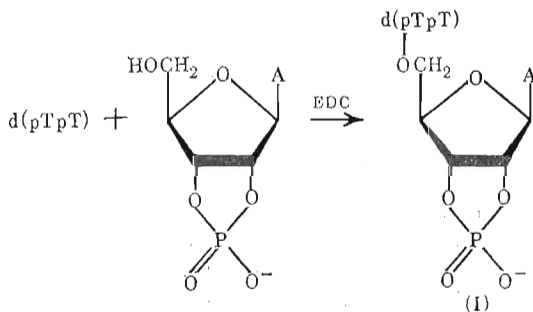
Для того чтобы снизить степень модификации гетероциклических оснований при синтезе фосфодиэфирных производных олигонуклеотидов.

мы использовали свойство нуклеотидов образовывать прочные ионные пары с ионами Mg^{2+} [19]. При инкубации реакционных смесей в описанных выше условиях, но в присутствии 2 М $MgCl_2$ при 4° С степень модификации гетероциклических оснований не превышала 5–10% за 24 ч. На рисунке приведены результаты анализа микроколоночной хроматографией реакционной смеси при синтезе метилового эфира нопануклеотида в присутствии и в отсутствие ионов Mg^{2+} .

При проведении конденсации при $pH > 6$ модификация гетероциклических оснований протекает аналогично тому, как описано для мононуклеотидов, независимо от присутствия ионов Mg^{2+} . В случае олигонуклеотидов дезоксирида ее удается полностью удалить в условиях, найденных для мононуклеотидов. Поскольку инкубация олигорибонуклеотидов при $pH 10,5$ приводит к гидролизу межнуклеотидных связей, получение производных олигорибонуклеотидов, содержащих остатки Ura и Gua, с *n*-нитрофенолом затруднено и требует разработки специальной методики.

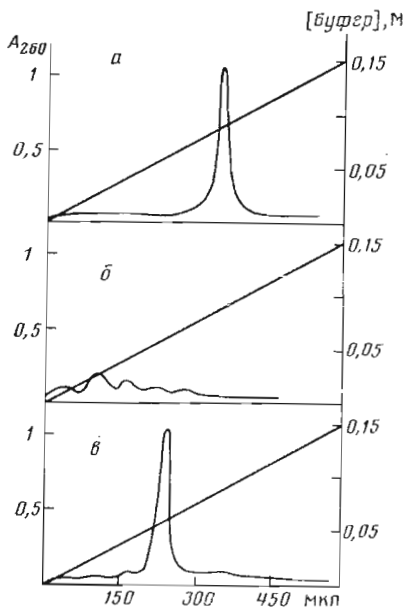
Предложенный нами метод был применен для синтеза фосфодиэфирных производных олигонуклеотидов, условия получения и выходы которых приведены в табл. 3. Для выделения этих соединений применяли гель-фильтрацию на биогеле Р-2 с последующей хроматографией на лихросорбенте- NH_2 или цуклеосиле С-8. Образование фосфодиэфира по концевой фосфатной группе подтверждалось тем, что полученные соединения не гидролизуются фосфомоноэстеразой.

Поскольку разработанный метод позволяет быстро и с высокими выходами получать фосфодиэфирные производные олигонуклеотидов, было целесообразно использовать его для синтеза межнуклеотидной связи в водной среде. Создание 3 М концентрации нуклеозида в воде не представлялось возможным, поэтому мы использовали в качестве нуклеозидного компонента аденозин-2',3'-циклофосфат:



В полученном соединении (I), выход которого составил 30%, синтезированная 5'-5'-фосфодиэфирная связь является неприродной. Очевидно, что аналогичным образом можно получать фосфодиэфиры с природной 3'-5'-связью, если в качестве нуклеотидного компонента использовать 3'-фосфат олигонуклеотида. Так как реакционная способность 3'-гидроксильной группы существенно ниже, чем у 5'-гидроксильной, проведение конденсации между 5'-фосфорилированным олигонуклеотидом и компонентом, содержащим 3'-гидроксильную группу, видимо, нецелесообразно. Соединение (I) выделяли ионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе, для отделения от примеси $d(pTpT)$ проводили гидролиз фосфомоноэстеразой змеиного яда, гидролизат фракционировали электрофорезом на бумаге при $pH 7,5$ и БХ. Для доказательства структуры соединения (I) гидролизовали фосфодиэстеразой, соотношения продуктов гидролиза определяли спектрофотометрически.

Предложенный метод синтеза фосфодиэфирных производных олигонуклеотидов отличается высокой селективностью и позволяет получать производные по 3'- и 5'-концевым фосфатным группам олигодезоксирибонуклеотидов и 5'-концевым фосфатным группам олигорибонуклеотидов любой длины и состава. Метод позволяет получать производные моно- и



Микроколоночная хроматография на лихросорбе-NH₂: а — исходный нонануклеотид d(pCCTGGAATT); б — реакционная смесь при синтезе метилового эфира d(pCCTGGAATT) в условиях: 0,5 М EDC, 0,4 М MES-буфер (рН 5,5), 3 М метанол, 16 ч, 4° С; в — реакционная смесь при синтезе метилового эфира d(pCCTGGAATT) в условиях: 0,5 М EDC, 3 М метанол, 0,4 М MES-буфер, содержащий 2 М MgCl₂ (рН 5,5), 16 ч, 4° С

олигонуклеотидов с различными оксисоединениями. Из всех соединений, изученных нами, только стерически затрудненные спирты, например *трет*-бутанол или дифенилкарбинол, и фенолы со значением $pK_a > 9$ практически не вступают в конденсацию с нуклеотидами. Метод применим для присоединения к олигонуклеотидам красителей, например производных Dns-OH, для получения флуоресцирующих или окрашенных производных олигонуклеотидов, которые могут найти широкое применение в молекулярно-биологических исследованиях.

Экспериментальная часть

В работе использованы AMP (Reanal, Венгрия); d(pTpT), (pU)₅ (НИКТИ БАВ, Бердск), d(pCCAGGAGTAC), d(pCCTGGAATT), d(pCCAATGAGA), d(TGGCCAAGCTp) любезно предоставлены Т. С. Оредкой, Е. М. Волковым (химический факультет МГУ); EDC, MES, MeIm, лихросорб-NH₂, 10 мкм (Merck, ФРГ); N-оксибензотриазол, β-цианэтанол, Dns-Cl (Fluka, Швеция); *n*-нитрофенол, метанол, этанол, пропанол (Союзреактив); нуклеосил С-8, 5 мкм (Chemapol, ЧССР).

Электрофорез на бумаге FN-1 (ГДР) выполняли на приборе Labor (Венгрия) при напряжении 900–1000 В в 0,05 М TEAB (рН 7,5) в течение 1,5–2 ч. Микроколоночную хроматографию проводили на колонках (1×50 мм) с лихросорбом-NH₂ в линейном градиенте натрий-фосфатного буфера (рН 7,5) в 7 М мочеvine и на колонках (2×62 мм) с нуклеосилом С-8 в линейном градиенте метанола в 0,1 М ацетате аммония (рН 6,0) с использованием жидкостного хроматографа «Милихром» (СКТБ специальной электроники и аналитического приборостроения СО АН СССР). Гель-фильтрацию осуществляли на колонке (5×300 мм) с биогелем P-2 (200–400 меш; Bio-Rad, США). ВХ проводили на бумаге FN-1 в системах этиловый спирт — 1 М ацетат аммония, 7 : 3 (А), этиловый спирт — 1 М ацетат аммония, 8 : 2 (Б).

При проведении конденсации для поддержания постоянных значений рН использовали следующие буферы: 0,1 М HCl (рН 1); 0,01 М HCl (рН 2); 0,4 М MES-буфер, титрованный 2 н. NaOH (рН 3–6); 0,4 М MeIm-буфер, титрованный 6 н. HCl (рН 7–9).

Получение метилового эфира AMP. К раствору NH₄⁺-соли AMP (1–4 мкмоль) в 80 мкл 0,4 М MES-буфера (рН 4,0–5,5) добавляли 20 мкл (0,5 ммоль) метанола и 9,6 мг (50 мкмоль) EDC. Реакционную смесь ин-

кубировали 4 ч при 4° С. Полученный метиловый эфир АМР выделяли с помощью электрофореза на бумаге. Выход количественный.

Получение эфиров АМР с этанолом, пропанолом, β-цианэтанолом проводили аналогично описанному для метилового эфира АМР.

Эфир АМР с β-оксиэтиламидом Dns-OH. К 0,15 ммоль β-оксиэтиламида Dns-OH в 30 мкл диметилформамида при перемешивании по каплям приливали 20 мкл 6 н. HCl, чтобы получить раствор с pH ≈ 3. Полученную смесь добавляли при перемешивании к раствору NH₄⁺-соли АМР (1–4 мкмоль) в 30 мкл 0,4 М MES-буфера (pH 5,5). Результирующее значение pH 4,0–4,3. Затем к раствору прибавляли 9,6 мг (50 мкмоль) EDC и смесь инкубировали 24 ч при 4° С. Полученный фосфодиэфир выделяли БХ в системе А, R_f 0,79. Выход 40%. После гидролиза фосфодиэстеразой змеиного яда соотношение АМР и β-оксиэтиламида Dns-OH составило 1 : 0,98.

n-Нитрофениловый эфир АМР. К раствору 2 мкмоль NH₄⁺-соли АМР в смеси 30 мкл 0,4 М MeIm-буфера (pH 9,0) и 20 мкл ацетона добавляли 50 мкл 6 М раствора *n*-нитрофенола в DMF и 9,6 мг (50 мкмоль) EDC (результирующее значение pH 6,5). Реакционную смесь выдерживали при 20° С 16–20 ч. *n*-Нитрофениловый эфир АМР выделяли БХ в системе Б, R_f 0,54. Выход количественный. После гидролиза фосфодиэстеразой змеиного яда соотношение АМР и *n*-нитрофенола составило 1 : 0,97.

Эфир АМР с N-оксибензотриазолом. Растворяли 0,3 ммоль N-оксибензотриазола в смеси 50 мкл диметилформамида и 30 мкл 0,4 М MES-буфера (pH 4,0–6,0) при 70–80° С. К полученной смеси добавляли раствор 2 мкмоль NH₄⁺-соли АМР в 10 мкл 0,4 М MES-буфера (pH 4,0–6,0) и 12 мг (60 мкмоль) EDC. Реакционную смесь инкубировали 4–6 ч при 4° С. N-Оксибензотриазоловый эфир АМР выделяли БХ в системе Б, R_f 0,57. Выход количественный. После гидролиза 0,1 н. NaOH (20° С, 12 ч) соотношение АМР и N-оксибензотриазола составило 0,95 : 1.

Тимидиллил-(3'→5')-тимидиллил-(5'→5')-аденозин-2',3'-циклофосфат (I). Раствор 0,15 мкмоль аденозин-2',3'-циклофосфата в 50 мкл 0,4 М MES-буфера (pH 4,5) инкубировали 2 ч при 20° С в присутствии 25 мкмоль EDC для циклизации примесных 2'- и 3'-АМР. Затем в реакционную смесь добавляли 1,5 мкмоль d(pTpT) и 25 мкмоль EDC. Полученный раствор инкубировали 48 ч при 4° С. Избыток аденозин-2',3'-циклофосфата и EDC удаляли ионообменной хроматографией на колонке (12×190 мм) с DEAE-целлюлозой (DE-52) в HCO₃⁻-форме. После отмывки избытка реагентов 0,05 М NH₄HCO₃ непрореагировавший d(pTpT) и соединение (I) элюировали 0,5 М NH₄HCO₃, проводили гидролиз фосфомоноэстеразой, полученную смесь d(TpT) и производного (I) разделяли электрофорезом и БХ в системе А. Выход соединения (I) 30%, R_f 0,18, E_{атмр} 1. После гидролиза производного (I) фосфодиэстеразой змеиного яда соотношение аденозин-2',3'-циклофосфата и dTMP составило 1 : 2.

Общая методика получения производных олигонуклеотидов со спиртами. К водорастворимой соли олигонуклеотида (0,001–0,1 мкмоль) добавляли 100 мкл 1–6 М раствора спирта в 0,4 М MES-буфере (pH 4,0–5,5), содержащем 2 М MgCl₂, и 9,6 мг (50 мкмоль) EDC. Реакционную смесь инкубировали при 4° С в течение времени, указанного в табл. 3. Полученные фосфодиэфиры олигонуклеотидов после обессоливания на биогеле Р-2 выделяли микроколочной хроматографией на нуклеосиле С-8.

Эфир d(TGGCCAAGCTp) с β-оксиэтиламидом Dns-OH получали как описано для АМР. Выход 30%.

N-Оксибензотриазоловые эфиры (pU)₅ и d(TGGCCAAGCTp) получали как описано для АМР в 0,4 М MES-буфере, содержащем 2 М MgCl₂ (pH 4,5), время реакции 8 ч, выходы 95%.

ЛИТЕРАТУРА

1. Flanagan J. B., Pettersson R. F., Ambros V., Hewlett M. J., Baltimore D. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, № 3, p. 961–965.
2. Neves B., Plagens U., Wernes D. J. Mol. Biol., 1983, v. 164, № 2, p. 213–235.

3. Tse-Dhin Y.-C., McCarron B. G. H., Arentzen R., Chowdhry V. Nucl. Acids Res., 1983, v. 11, № 24, p. 8691—8701.
4. Kryger K., Grobowski R. J., Zang A. L., Sands J., Gottscheling D. E., Cech S. R. Cell, 1982, v. 31, № 5, p. 147—157.
5. Воробьев О. Е., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. Докл. АН СССР, 1964, т. 158, № 1, с. 143—146.
6. Гринева Н. И., Сайкович Е. Г. Биоорган. химия, 1979, т. 5, № 4, с. 563—567.
7. Shmyantseva V. V., Sokolova N. I., Shabarova Z. A. Nucl. Acids Res., 1976, v. 4, № 4, p. 903—916.
8. Ralph R. K., Young R. I., Khorana H. G. J. Amer. Chem. Soc., 1963, v. 85, № 13, p. 2002—2012.
9. Wennogle L. P., Berg H. C. J. Mol. Biol., 1978, v. 123, № 3, p. 471—483.
10. Зарытова В. Ф., Райт В. К., Черникова Т. С. Биоорган. химия, 1977, т. 3, № 12, с. 1626—1631.
11. Готтих М. Б., Ивановская М. Г., Шабарова З. А. Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 8, с. 1063—1067.
12. Свойства органических соединений. Справочник/Ред. Потехин А. А. Л.: Химия, 1984, с. 382, 515.
13. Пептиды. Основные методы образования пептидных связей/Ред. Гросс Э., Майнхофер Н. М.: Мир, 1983, с. 50.
14. Корана Г. Новые направления в химии биологически важных эфиров фосфорной кислоты. М.: Мир, 1964, с. 146—162.
15. Кочетков Н. К., Будовский Э. И., Свердлов Е. Д., Симукова Н. А., Турчинский М. Ф., Шибасва В. Н. Органическая химия нуклеиновых кислот/Ред. Кочетков Н. К. М.: Химия, 1970, с. 189.
16. Кирби А., Уоррен С. Органическая химия фосфора. М.: Мир, 1971, с. 387.
17. Брюс Т., Беникович С. Механизмы биоорганических реакций. М.: Мир, 1970, с. 47.
18. Кочетков Н. К., Будовский Э. И., Свердлов Е. Д., Симукова Н. А., Турчинский М. Ф., Шибасва В. Н. Органическая химия нуклеиновых кислот/Ред. Кочетков Н. К. М.: Химия, 1970, с. 383—384.
19. Rose D. M., Polnaszek C. F., Bryant R. G. Biopolymers, 1982, v. 21, № 4, p. 653—664.

Поступила в редакцию
16.X.1984

AN EFFECTIVE METHOD OF SYNTHESIS OF PHOSPHODIESTER DERIVATIVES OF MONO- AND OLIGONUCLEOTIDES IN AQUEOUS MEDIUM

GOTTIKH M. B., IVANOVSKAYA M. G., YACOBI L. V.,
SHABAROVA Z. A.

Chemistry Department, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

An efficient method of obtaining phosphodiester derivatives of mono- and oligonucleotides in aqueous medium has been developed. The method is based on the condensation of a nucleotide component with an alcohol in the presence of water-soluble 1-ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)-carbodiimide. The condensation characteristics have been studied and optimal conditions established for various alcohols: simple alcohols viz methanol, ethanol, β -cyanoethanol, etc., as well as *p*-nitrophenol and *N*-hydroxybenzotriazole. Condensations with simple alcohols and *N*-hydroxybenzotriazole proceed at 4° C for 2—8 hr at pH 4.0—5.5; condensation with *p*-nitrophenol takes 16—24 hr at 20° C at pH 8—9. The alcohol concentration is at least 1—3 M in all the cases. Phosphodiester yields range from 30 to 100%. The method can be used for obtaining phosphodiester derivatives of 3'- and 5'-phosphomonoester groups of oligodeoxyribonucleotides and 5'-phosphomonoester groups of oligoribonucleotides.