



УДК 547.963.32.057:577.113.4

**ТВЕРДОФАЗНЫЙ СИНТЕЗ ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ,
ПРИГОДНЫХ ДЛЯ НЕПОСРЕДСТВЕННОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ
В ЛИГАЗНОЙ РЕАКЦИИ***Горн В. В., Зарытова В. Ф.**Новосибирский институт биоорганической химии
Сибирского отделения Академии наук СССР*

Разработана схема твердофазного синтеза олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих 5'-концевую фосфатную группу, которые могут быть использованы в лигазной реакции без предварительного фосфорилирования. Нарастивание цепи осуществляли триэфирным методом в направлении 3'→5' с активацией фосфатного компонента, связанного с полимерным носителем. В конденсации использовали преимущественно динуклеотидные блоки, содержащие 5'-фосфатную группу с β-цианэтильной и *n*-хлорфенильной защитными группами, в присутствии триизопропилбензолсульфонилхлорида и *N*-метилимидазола. В качестве концевых блоков применяли бисцианэтиловые эфиры нуклеозид-5'-фосфатов. Удаление β-цианэтильной защитной группы после каждой стадии конденсации проводили 0,1 М раствором тетраметилгуанидина в течение 5 мин. Время, необходимое для одного цикла нарастивания, составляло 40–45 мин. По предложенной методике осуществлен синтез 27 олигонуклеотидов длиной до 16 звеньев.

В настоящее время большие фрагменты ДНК с заданной последовательностью получают химико-ферментативным способом, включающим в себя химический синтез олигонуклеотидов и последующее их сшивание с помощью ДНК-лигазы.

Наиболее перспективен из существующих на сегодня способов получения олигонуклеотидов твердофазный, поскольку он позволяет синтезировать олигонуклеотиды в автоматическом режиме. Необходимо отметить существенные успехи в развитии твердофазного способа как с помощью фосфитного [1, 2], так и модифицированного триэфирного метода с использованием 3'-*n*-хлорфениловых нуклеотидов [3, 4]. Однако полученные таким образом олигонуклеотиды не содержат концевых фосфатных групп, поэтому для использования в лигазной реакции их необходимо предварительно подвергнуть фосфорилированию по 5'-концу с помощью Т4-полинуклеотидкиназы и АТР либо [γ-³²P]АТР. Так как Т4-полинуклеотидкиназа недоступна в больших количествах, указанные подходы к синтезу олигонуклеотидов способны обеспечить получение лишь небольших количеств фрагментов ДНК.

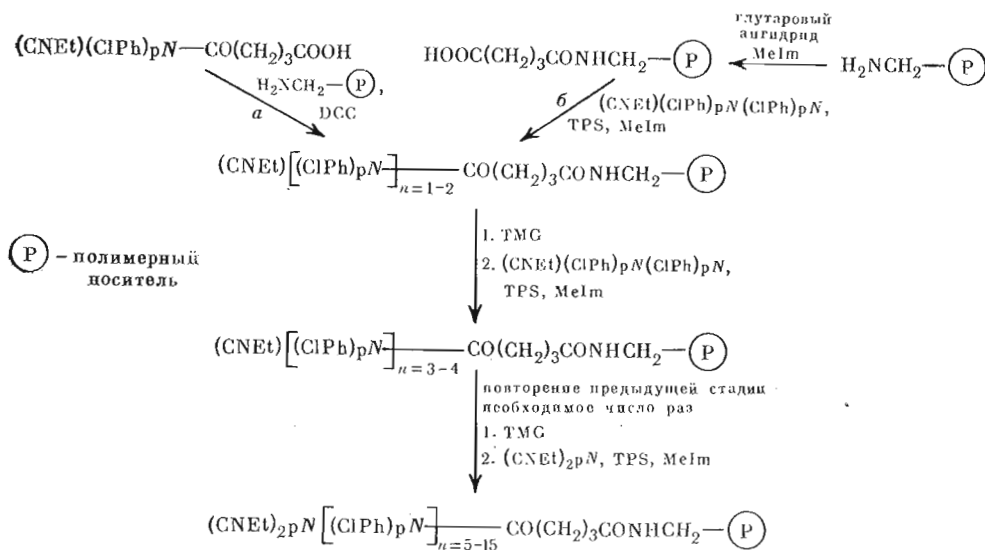
Ранее нами была предложена схема твердофазного синтеза олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих 5'-концевую фосфатную группу [5] и пригодных для непосредственного использования в реакции с ДНК-лигазой. Нарастивание цепи осуществляли в направлении 3'→5' с активацией Р-компонента, присоединенного к полимеру. Время одного цикла нарастивания составляло 2,5 ч, наиболее длительной процедурой в цикле являлось удаление β-цианэтильной группы (90 мин).

В настоящей работе предложен ряд усовершенствований твердофазного синтеза олигонуклеотидов с 5'-концевой фосфатной группой, касающихся присоединения первого нуклеотидного звена к полимеру, условий проведения конденсации и удаления β-цианэтильной группы. По предложенной методике синтезировано 27 олигонуклеотидов.

Принятые сокращения: ClPh – *n*-хлорфенил, TPS – 2,4,6-триизопропилбензолсульфонилхлорид, MeIm – *N*-метилимидазол, CNEt – β-цианэтил, Lev – левулинил, DCC – дициклогексилкарбодимид, DMF – диметилформамид, TMG – *N,N,N',N'*-тетраметилгуанидин, *N* – нуклеозид, защищенный по основанию. Префикс «d» (дезокси) для краткости везде опущен.

Для наращивания цепи использовали β -цианэтиловые, *n*-хлорфениловые эфиры 5'-фосфорилированных динуклеотидов. Активацию Р-компонента, присоединенного к полимеру, осуществляли с помощью смеси TPS и N-метилимидазола [6] в пиридине.

Присоединение первого звена к полимерному носителю ранее [5] мы проводили по методу, включающему в себя получение 3'-сукцинатного производного нуклеотида [7]. В данной работе опробованы еще два варианта присоединения первого звена. Первый — синтез и последующее присоединение к аминогруппе полимера 3'-глутаратов нуклеотидов (схема *a*). Последние легче получить в чистом виде, чем соответствующие сукцинаты, так как избыток глутаровой кислоты, образующейся из глутарового ангидрида, вследствие большей растворимости по сравнению с янтарной легче отделяется при хроматографии и осаждении продукта.



Во втором случае мы использовали подход, предложенный недавно Ефимовым и сотр. [8], которые присоединяли первое нуклеозидное звено за 3'-оксигруппу к карбоксильному полимеру в присутствии TPS и N-метилимидазола. Карбоксильный полимер получали обработкой аминополимера янтарным ангидридом. На основе силикагеля была получена емкость по нуклеозиду 65–100%, а на основе стекла — 70–90% от исходной емкости аминогрупп [8].

Очевидно, что вторая методика присоединения нуклеотида к полимеру имеет целый ряд преимуществ перед первой, так как позволяет использовать для синтеза любого олигонуклеотида только один тип полимера — карбоксильный вместо четырех образцов с присоединенными мононуклеотидами. Кроме того, в качестве первого звена можно применять как мононуклеотиды, так и более длинные блоки, а первую и последующие конденсации осуществлять в одинаковых условиях.

Мы модифицировали глутаровым ангидридом полистирольный носитель, привитый на поверхность политетрафторэтилена [5, 9], содержащий 180 мкэкв. аминогрупп на 1 г. Полученный таким образом полимер не содержал свободных аминогрупп (проба с нингидрином), что указывает на полную протекание реакции. После обработки такого полимера динуклеотидом (CNEt)(ClPh)_pN(ClPh)_pN' в присутствии TPS и N-метилимидазола в пиридине (схема *b*) емкость по динуклеотиду совпадает с исходной емкостью аминополимера (180 мкмоль/г), т. е. реакция присоединения динуклеотида к карбоксильному полимеру привитого типа проходит практически количественно.

Наиболее длительной операцией (1,5 ч) в синтезе олигонуклеотидов с 5'-концевой фосфатной группой по схеме, предложенной нами в рабо-

Таблица 1

Номер	Олигонуклеотид	Схема синтеза *	Полимер, мкмоль активных групп	Выход			
				ОЕ ₂₆₀	мкмоль	%	средний на ста- дию, %
1	pCCTGTTTCT	3 + 2 × 3 + 1	11,6	315	3,7	33	76
2	pACACAC	2 + 1 + 1 + 1 + 1	16,2	145	2,2	14	61
3	pATTTTCA	1 + 2 × 3	11,2	247	3,4	30	74
4	pGGTTATCCTCAT	2 + 2 × 5	9,4	41	0,37	4	58
5	pTTTTCCCTTTT	2 + 2 × 4	12,2	465	5,1	42	84
6	pCGTATAATGT	2 + 2 × 4	9,0	88	0,8	9	62
7	pACACATTATACG	2 + 2 × 5	10,1	70	0,5	5	61
8	pACAATTTACACACA	1 + 2 × 6	10,6	365	2,5	23	81
9	pTTCCTGTGTGA	2 + 2 × 4	10,3	52	0,5	5	55
10	pCGCTGGCCACTCCCC	2 + 2 × 7	5,3	35	0,25	5	68
11	pCAGCGATGTGATCA	2 + 2 × 6	5,6	10	0,07	1,2	53
12	GCTGCAGT	2 + 3 + 2 + 1	14,0	200	2,5	18	57
13	TGGCTCTGCC	2 + 2 + 2 + 3 + 1	9,8	52	0,6	6	49
14	TAATACAT	2 + 2 + 2 + 2 + 1	12,4	510	4,7	38	78
15	pGGAATTCATCAAAA	1 + 2 × 6 + 1	10,6	125	0,75	7	70
16	pTACTCTTTTTGAT	2 + 2 × 6 + 1	10,6	65	0,5	5	61
17	pAGAGTATTGACTTA	1 + 2 × 6 + 1	11,3	54	0,35	3	65
18	pAGACTTTAAGTCAA	2 + 2 + 3 + 2 × × 3 + 1	10,6	140	0,9	9	67
19	pAAGTCTAACCTATA	1 + 2 × 6 + 1	10,5	120	0,8	8	70
20	pGTATCCTATAGGTT	1 + 2 × 6 + 1	10,3	70	0,5	6	65
21	pGGATACTTAT	1 + 2 × 4 + 1	9,6	100	0,9	10	63
22	pTGATCATAA	2 + 2 × 3 + 1	9,8	290	2,6	27	73
23	pGGATACTTATGATCA	2 + 2 × 6 + 1	10,2	57	0,35	3,5	62
24	pGATCAAACATGG	2 + 2 × 5	11,5	26	0,2	1,5	50
25	pGTAATCCCACGTT	1 + 2 × 6	11,9	75	0,55	4,5	64
26	pGATTACCCATGT	2 + 2 × 5	11,0	36	0,3	2,5	54
27	pACATGG	2 + 2 × 2	8,8	70	1,0	11,5	49

* Курсивом обозначен мононуклеотид, присоединенный к носителю; жирным шрифтом — концевой блок; олигонуклеотиды 3—11 и 24—27 синтезированы с использованием карбоксилированного полимера.

те [5], было удаление β-цианэтильной защитной группы смесью триэтиламина и ацетонитрила (1:1). Недавно было показано [10], что при использовании 0,1 М раствора тетраметилгуанидина в абс. пиридине время, необходимое для удаления β-цианэтильной группы в растворе составляет 2—3 мин. Мы использовали этот реагент в твердофазном синтезе на привитом полимерном носителе. Время полного удаления β-цианэтильной группы в этом случае также не превышало 3 мин.

Все олигонуклеотиды, представленные в табл. 1, были синтезированы в ручном варианте, который, хотя и является более медленным и трудоемким по сравнению с автоматическим и полуавтоматическим вариантами, не требует какого-либо специального оборудования и особенно удобен при оптимизации синтеза и подборе условий. Выбранные таким образом условия могут быть легко перенесены на автоматический вариант твердофазного синтеза. В выбранных условиях реакция конденсации заканчивалась через 25—30 мин (в работе [5] время конденсации составляло 60 мин). Общая схема операций для одного цикла наращивания нуклеотидной цепи

Таблица 2

Операция	Растворители и реагенты	Объем, мл	Время, мин
Деблокирование	0,1 М ТМГ в абс. пиридине	5	5
Промывка	Абс. пиридин	5	1
»	Ацетон	10	1
»	Серный эфир	10	1
Высушивание	—	—	5
Конденсация	ОН-компонент, TPS, Melm, абс. пиридин	0,35	25—30
Промывка	Абс. пиридин	5	1

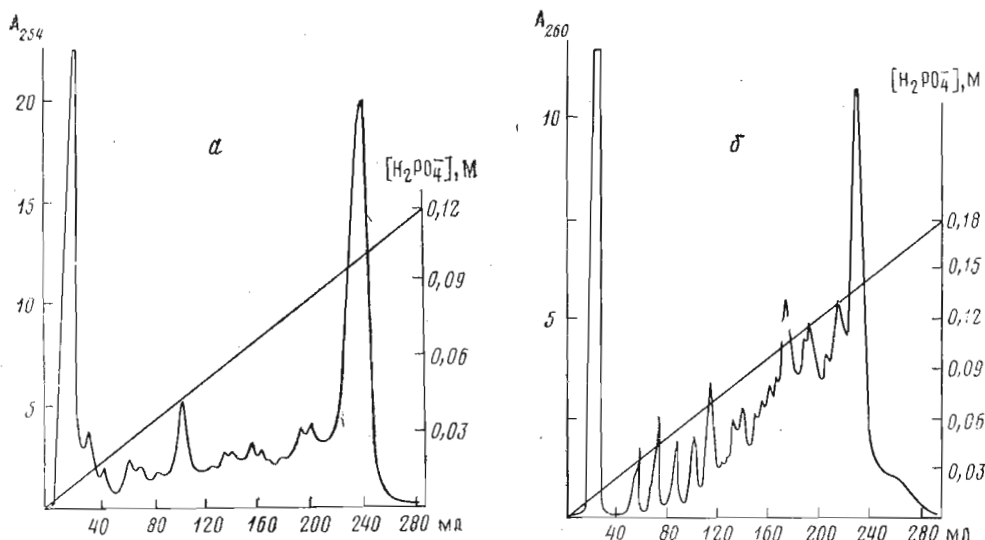


Рис. 1. Ионообменная высокоэффективная жидкостная хроматография реакционных смесей при синтезе нонануклеотида pTGATCATAA (а) и тетрадекануклеотида pAAGTSTAACSTATA (б) на колонке с ПМС-80 (10×250 мм) в градиенте концентрации KH_2PO_4 (0,02–0,3 М, pH 6,5) в 30% ацетонитриле

на носителе приведена в табл. 2. Продолжительность цикла составляет 40–45 мин.

Для наращивания цепи были использованы в основном динуклеотидные блоки (CNEt)(CPh)pN(CPh)pN'. В качестве концевых блоков применяли бисцианэтиловые эфиры нуклеозид-5'-фосфатов либо динуклеотиды (CNEt)₂pN(CPh)pN', синтезированные из соответствующих мономеров в присутствии TPS и N-метилимидазола [11]. Для получения олигонуклеотидов, не содержащих концевую 5'-фосфатную группу, на последней стадии использовали динуклеозидфосфаты типа (MeOTr)N(CPh)pN, синтезированные как описано в работе [5].

Удаление синтезированных олигонуклеотидов с носителя и их деблокирование проводили согласно [5]. Деблокированные олигонуклеотиды выделяли высокоэффективной ионообменной хроматографией на колонках с Partisil 10 SAX либо ПМС-80 (10×250 мм); типичные профили хроматографии приведены на рис. 1. В табл. 1 приведены выходы продуктов после ионообменной хроматографии в расчете на первое нуклеотидное звено, а также рассчитанные на основе этих данных средние выходы на одну стадию конденсации.

Для окончательной очистки все олигонуклеотиды дополнительно были подвергнуты препаративной обращенно-фазовой хроматографии на колонке с Lichrosorb RP-18 (10×250 мм) в градиенте ацетонитрила в 0,05 М триэтиламмонийацетате. Выход продуктов после обращенно-фазовой хроматографии составлял 60–80%.

После 5'-³²P-фосфорилирования методом обмена [12] гомогенность синтезированных олигонуклеотидов была подтверждена электрофорезом в полиакриламидном геле, а их первичная структура — методом нуклеотидных карт или Максама — Гилберта.

Таким образом, нами разработан твердофазный метод синтеза олигонуклеотидов, пригодных для непосредственного использования в лигазной реакции, который основан на использовании 5'-фосфорилированных защищенных динуклеотидов и бисцианэтиловых эфиров 5'-мононуклеотидов, производство которых освоено в нашей стране.

Данные о ферментативной сборке олигонуклеотидов (15)–(27), представляющих собой фрагменты синтетического полинуклеотида, содержащего один из промоторов РНК-полимеразы *E. coli*, будут приведены в отдельном сообщении.

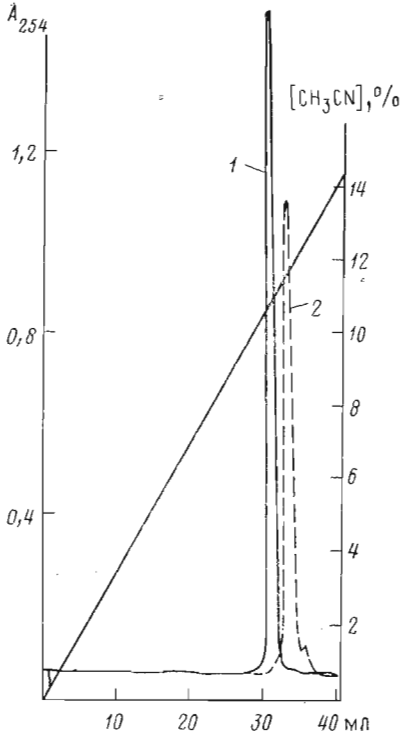


Рис. 2. Результаты анализа гомогенности нонануклеотида рТГАТСАТАА (1) и тетрадекануклеотида рААГТСТААССТАТА (2) методом высокоэффективной обращенно-фазовой хроматографии на колонке с Lichrosorb RP-18 (4,6×250 мм) в градиенте концентрации ацетонитрила (0→20%) в 0,05 М триэтиламмоний-ацетате

насоса, добавляли 10 мл абс. пиридина. Через 15–20 ч добавляли 10 мл воды, выдерживали 15 мин и упаривали до масла. Остаток растворяли в 20 мл хлороформа, промывали 1 М раствором NaHCO_3 и водой (3×20мл). Хлороформный слой сушили над CaCl_2 и хроматографировали на колонке с силикагелем (100 мл) в градиенте концентрации метанола (0→15%) в хлороформе. Выход глутаратов 40–60%.

Все глутараты имели УФ-спектры, идентичные спектрам исходных защищенных мононуклеотидов. Подвижность при ТСХ на пластинках Kieselgel-60 F_{254} (Merck, ФРГ) относительно исходных мономеров составляла 0,7–0,8 (в системе хлороформ – метанол, 85 : 15). В ПМР-спектрах появляются дополнительные по сравнению с исходными соединениями сигналы в области 2,3 и 1,8 м.д., соответствующие протонам $-\text{CH}_2\text{CO}-$ и $-\text{CCN}-\text{C}-$ остатка глутаровой кислоты.

Присоединение первого нуклеотида к аминополимеру. 0,8 ммоль 3'-глутарата защищенного мононуклеотида высушивали в вакууме (4 мм рт. ст., 10 мин), растворяли в 4 мл абс. хлороформа и добавляли к раствору 0,5 ммоль DCC. Через 15 мин смесь вместе с выпавшим осадком дициклогексилмочевины прибавляли к 1 г аминополимера (180 мкэкв./г), предварительно набухшего в 2 мл DMF, и оставляли на 15–20 ч. Затем к реакционной смеси добавляли 5 мл хлороформа (при этом осадок мочевины растворялся), полимер с присоединенным к нему нуклеотидом отфильтровывали, промывали хлороформом, ацетоном, эфиром и высушивали в вакууме. Нагрузка полимера по нуклеотиду составляла 165–180 мкмоль/г (определяли микроспектрофотометрически, как описано в работе [5]).

В работе использованы бисдианэтиловые эфиры нуклеозид-5'-фосфатов, защищенные динуклеотиды общей формулы $(\text{CNet})(\text{CPh})\text{pN}(\text{CPh})\text{pN}'(\text{Lev})$, мононуклеотиды $(\text{CPh})\text{pN}(\text{Lev})$ и $(\text{CNet})(\text{CPh})\text{pN}$ и TPS производства НИОХ СО АН СССР, N-метилимидазол (Ega, ФРГ), TMG (Merck, ФРГ). Левулинильную защитную группу динуклеотидов удаляли гидразингидратом в пиридин-ацетатном буфере [13].

Аминометилованный носитель на основе полистирола, привитого на поверхность пористого политетрафторэтиленового полимера, получали как описано ранее [5].

Высокоэффективную жидкостную хроматографию проводили с помощью хроматографа Altex-322 (США) на колонках размером 4,6×250 и 10×250 мм. В качестве носителей для ионообменной хроматографии использовали Partisil 10 SAX (Whatman, Англия), а также сильный анионообменник ПСМ-80, любезно предоставленный С. И. Ястребовым (ВНИИ молекулярной биологии, пос. Кольцово Новосибирской обл.). Для обращенно-фазовой хроматографии использовали Lichrosorb RP-18 (Merck, ФРГ).

Синтез 3'-глутаратных производных мононуклеотидов. 2 ммоль мононуклеотида $(\text{CNet})(\text{CPh})\text{pN}$ и 1,14 г (10 ммоль) глутарового ангидрида высушивали 10 мин в вакууме масляного

Модификацию аминополимера глутаровым ангидридом проводили аналогично методике, предложенной в работе [8] для янтарного ангидрида.

Удаление β -цианэтильной защитной группы и проведение стадии конденсации. Полимер (50–70 мг) с присоединенным моно- либо олигонуклеотидом помещали в колонку объемом 5 мл, имеющую в нижней части пористый стеклянный фильтр, промывали 5 мл абс. пиридина и обрабатывали 5 мин на фильтре 5 мл 0,1 М раствора TMC в абс. пиридине. После промывки 5 мл абс. пиридина, 10 мл ацетона и 10 мл абс. эфира полимер переносили в центрифужную пробирку Eppendorf, содержащую навески 40 мкмоль моно-, ди- либо тринуклеотида и 120 мкмоль TPS. Пробирку помещали в колбу объемом 100 мл и сушили 5 мин в вакууме при 4 мм рт. ст. Затем впускали в систему сухой аргон и добавляли в пробирку 0,22 мл абс. пиридина и 30 мкл (360 мкмоль) MeIm. Пробирку выдерживали в термостате 25–30 мин при 37° С, периодически (каждые 5 мин) встряхивая ее содержимое. После завершения конденсации полимер из пробирки переносили с помощью пипетки на пористый стеклянный фильтр, промывали 5 мл абс. пиридина и повторяли деблокирование и конденсацию необходимое число раз.

Удаление синтезированных олигонуклеотидов с носителя и полное их деблокирование проводили *n*-нитробензальдоксиматом лития и конц. аммиаком как описано ранее [5]. Реакционные смеси хроматографировали на колонке с Partisil 10 SAX либо ПСМ-80 (10×250 мм) в градиенте концентрации KH_2PO_4 , pH 6,5 (0,02→0,3 М) в 30% ацетонитриле. Фракции, содержащие пужный пик, хроматографировали на колонке с Lichrosorb RP-18 в градиенте концентрации ацетонитрила (5→20%) в 0,05 М триэтиламмонийацетате. Фракции, содержащие чистый олигонуклеотид, упаривали и лиофилизировали.

В табл. 1 приведены выходы олигонуклеотидов в расчете на первый нуклеотид, принимая молярный коэффициент поглощения олигомера равным сумме коэффициентов соответствующих мономеров.

Авторы выражают благодарность С. А. Грачеву, Е. Ф. Зайчикову (НИБХ СО АН СССР) за проведение анализов последовательностей олигонуклеотидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Matteucci M. D., Caruthers M. H. J. Amer. Chem. Soc., 1981, v. 103, № 11, p. 3185–3195.
2. de Haseth P. L., Goldman R. A., Cech C. L., Caruthers M. H. Nucl. Acids Res., 1983, v. 11, № 3, p. 773–787.
3. Horn T., Vasser M. P., Struble M. E., Crea R. Nucl. Acids Res., Sympos. Series, 1980, № 7, p. 225–233.
4. Tanaka S., Oshima T., Ohsuye K., Ono T., Mizuno A., Ueno A., Nakazato H., Tsujimoto M., Higashi N., Nogushi T. Nucl. Acids Res., 1983, № 11, p. 1707–1718.
5. Горн В. В., Зарытова В. Ф., Ярмолинская Е. В. Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 11, с. 1511–1517.
6. Ефимов В. А., Ревердатто С. В., Чахмахчева О. Г. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 2, с. 231–238.
7. Gail M. G., Sing M., Sheppard R. C., Edge M. D., Greene A. R., Heathcliffe G. R., Atkinson T. C., Newton C. R., Markham A. F. Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, № 5, p. 1081–1095.
8. Ефимов В. А., Бурякова А. А., Ревердатто С. В., Чахмахчева О. Г. Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 10, с. 1367–1381.
9. Polarov V. K., Veiko V. P., Koroleva O. N., Shabarova Z. A. Nucl. Acids Res., 1979, v. 6, № 6, p. 2041–2056.
10. Туманов Ю. В., Горн В. В., Потапов В. К., Шабарова З. А. Докл. АН СССР, 1983, т. 270, № 5, с. 1130–1131.
11. Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Романенко В. П. Докл. АН СССР, 1982, т. 265, № 4, с. 878–881.
12. Berkner K. L., Folk W. R. J. Biol. Chem., 1977, v. 252, № 10, p. 3176–3184.
13. Зарытова В. Ф., Ярмолинская Е. В. Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук, 1981, № 4, вып. 2, с. 131–138.

Поступила в редакцию

2.XI.1984

После доработки

14.XII.1984

**SOLID-PHASE SYNTHESIS OF DEOXYRIBOOLIGONUCLEOTIDES
SUITABLE FOR DIRECT USE IN LIGASE REACTIONS**

GORN V. V., ZARYTOVA V. F.

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian
Branch of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

A simplified method of solid-phase synthesis of deoxyribooligonucleotides, containing 5'-terminal phosphate group, is developed. This type of oligonucleotides can be used in ligase reactions without preliminary phosphorylation. Growth of the chain was carried out in 3'→5' direction using activation of phosphate component attached to polymer support. Mixture of triisopropylbenzenesulphonyl chloride and N-methylimidazole was used as condensing reagent. Protected dinucleotides with 5'-phosphate blocked with *p*-chlorophenyl and β-cyanoethyl residues were mainly used as building blocks. At the last step of condensation bis-β-cyanoethylesters of 5'-dinucleotides were employed. One cycle of the chain elongation required 40 to 45 min. β-Cyanoethyl group of growing oligonucleotide chain was removed by 5 min treatment with 0,1 M tetramethylguanidine. 27 oligonucleotides up to hexadecamers were synthesized by the proposed method.