



УДК 577.113.6.088.3:543.544.42

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРЕПАРАТИВНОЙ ОБРАЩЕННО-ФАЗОВОЙ
ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ
В СИНТЕЗЕ ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ***Ажаев А. В., Турция О. В., Гнучев Н. В.,
Чернов Б. К.**Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва*

Фосфотриэфирным методом в растворе синтезирован олигодезоксирибонуклеотид С-С-С-А-Г-Т-С-А-С-Г-А-С-Г-Т — праймер, используемый для сиквенса ДНК. Отработана методика выделения полностью защищенных олигонуклеотидных блоков с помощью препаративной обращенно-фазовой ВЭЖХ. Проведено сравнение результатов синтеза вышеуказанного праймера, полученного с применением ВЭЖХ и адсорбционной хроматографии на силикагеле. Продемонстрированы эффективность и высокая скорость примененного метода.

Химический синтез олигодезоксирибонуклеотидов является предметом исследования большого числа лабораторий. Наиболее значительные успехи были достигнуты с использованием различных полимерных носителей [1—9]. Основное достоинство этого метода — высокая скорость синтеза, обусловленная в первую очередь отсутствием стадии очистки промежуточных продуктов после каждого акта конденсации. Тем не менее синтез больших количеств олигонуклеотидов (например, десятков миллиграммов), необходимых для рентгеноструктурных и ЯМР-исследований, с помощью твердофазного метода затруднителен. Это связано с относительно низкой емкостью используемых носителей (20—200 мкмоль/г) и неадекватностью результатов, получаемых при переходе к крупномасштабному синтезу. Учитывая вышесказанное, поиск способов увеличения эффективности фосфотриэфирного метода синтеза в растворе продолжает оставаться актуальным.

В настоящей работе мы исследовали возможность увеличения скорости и одновременно качества очистки полностью защищенных олигонуклеотидных блоков с помощью препаративной обращенно-фазовой ВЭЖХ.

ВЭЖХ широко используется для очистки деблокированных олигодезоксинуклеотидов. Результаты многих исследований в этой области суммированы в работах [10, 11]. Напротив, препаративная ВЭЖХ защищенных олигонуклеотидных блоков еще не нашла широкого применения в практике олигонуклеотидного синтеза. Колоночная обращенно-фазовая хроматография защищенных блоков на сорбентах с размером частиц 50—200 мкм в последнее время находит все большее применение для рехроматографии блоков, которые не удается удовлетворительно очистить с помощью адсорбционной хроматографии на силикагеле [12].

В работах Ефимова и соавт. [13, 14] описано применение обращенно-фазовой хроматографии на колонке Nucleosil 30 C-18 (10×250 мм), содержащей сорбент с размером частиц 30 мкм, для выделения длинных олигонуклеотидных блоков. Несмотря на то что авторами были получены удовлетворительные результаты, слишком крупный размер частиц сорбента (30 мкм) и, по-видимому, недостаточный суммарный объем элюента

Использованы обозначения, рекомендованные номенклатурной комиссией IUPAC — IUB. Другие сокращения: ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография; DMTr — 4,4'-диметокситригил; MSNT — мезитиленсульфонил-3-пиро-1,2,4-триазолид; TPST — 2,4,6-тринизопропилбензолсульфонилтетразолид; \mp — *n*-хлорфенилфосфатная группа *n*-C₁₀H₇OPO₂. Знак *d* (дезокси) опущен всюду для краткости.

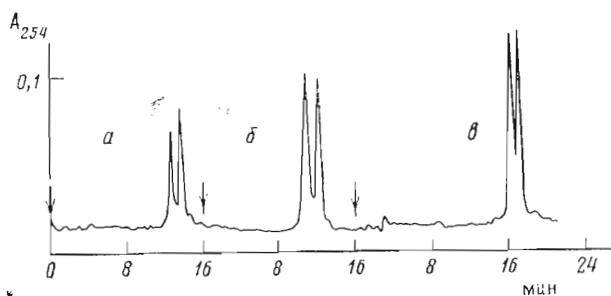


Рис. 1. Обращенно-фазовая ВЭЖХ защищенных динуклеотидных блоков (DMTr)ibG \neq T \neq (CNEt) (a), (DMTr)ibG \neq T(Ac) (б), (DMTr)bzC \neq bzC \neq (CNEt) (в) на колонке Zorbax ODS, 5 мкм (4,6 \times 250 мм). Элюция в линейном градиенте от 50 до 100% ацетонитрила, 20 мин, затем ацетонитрилом, 5 мин; скорость потока 1,5 мл/мин. Стрелками обозначены моменты ввода проб

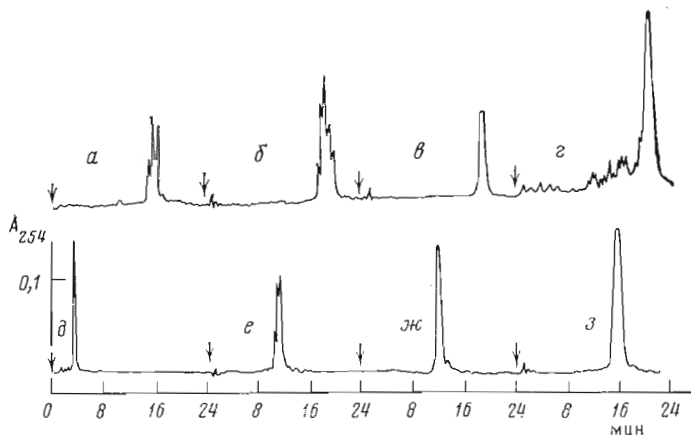


Рис. 2. Обращенно-фазовая ВЭЖХ защищенных олигонуклеотидных блоков (DMTr)T \neq bzA \neq bzA \neq (CNEt) (a), (DMTr)bzC \neq bzA \neq bzC \neq ibG \neq (CNEt) (б), (DMTr)bzA \neq bzC \neq bzC \neq bzC \neq T \neq (CNEt) (в), (DMTr)T \neq bzA \neq T \neq bzC \neq bzA \neq bzC \neq bzC \neq ibG \neq (CNEt) (г) и диметокситриллированных олигонуклеотидных блоков ibG \neq T \neq (CNEt) (д), bzC \neq bzC \neq T \neq T \neq (CNEt) (е), T \neq T \neq bzC \neq ibG \neq T \neq bzC(Ac) (ж), bzC \neq bzC \neq T \neq bzC \neq ibG \neq ibG \neq bzC(Ac) (з). Колонка и условия как в рис. 1

(150–300 мл) для очистки столь длинных блоков не позволяют назвать эту хроматографию высокоэффективной. Кроме того, время хроматографии (1,5–2 ч) также снижает ценность этого метода. В связи с этим нам представлялось целесообразным использовать обращенно-фазовую хроматографию в варианте настоящей препаративной ВЭЖХ.

Аналитические хроматограммы полностью защищенных динуклеотидов, полученные на колонке с октадецилсиликагелем (рис. 1), свидетельствуют, что диастереомерные динуклеотиды элюируются двумя пиками. Сравнение рис. 1 с рис. 2, где представлены хроматограммы полностью защищенных три-, тетра-, пента- и октануклеотидов, показывает, что с увеличением длины нуклеотида происходит увеличение времени удерживания и положение пиков изомеров. Пента- и октануклеотиды элюируются в виде одного уширенного пика. Диметокситриллильная группа имеет сильное сродство к октадецильной стационарной фазе, и ее удаление приводит к значительному уменьшению времени удерживания защищенных олигонуклеотидов (рис. 2д–з). Этот факт позволяет надеяться на то, что выделение продукта неспонтанной конденсации (в случае выхода 70% и ниже) с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ будет не сложнее очистки продукта удачной конденсации (при выходе 90% и выше).

Нам представлялось интересным синтезировать олигонуклеотид длиной более 10 звеньев из блоков, очищенных препаративной обращенно-фазовой ВЭЖХ. В качестве такого олигодезоксинуклеотида нами был выбран 14-членный праймер С-С-С-А-Г-Т-С-А-С-Г-А-С-Г-Т, используемый для

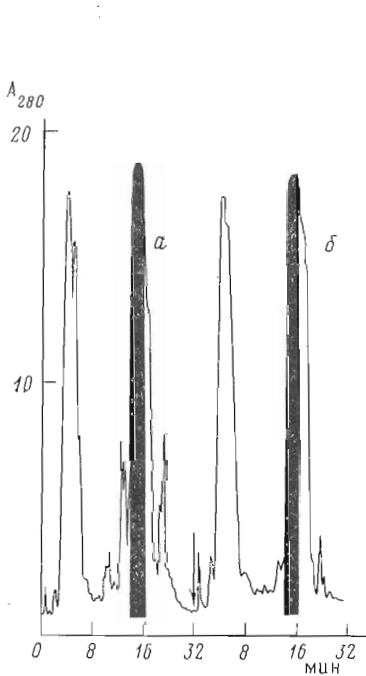


Рис. 3

Рис. 3. Препаративная обращенно-фазовая ВЭЖХ реакционных смесей, содержащих защищенные олигонуклеотидные блоки, на колонке Zorbax ODS, 10 мкм (21,2 × 250 мм). Элюция в линейном градиенте от 50 до 100% ацетонитрила, 20 мин, затем ацетонитрилом 5 мин. *a* – динуклеотид (IV), скорость потока 12 мл/мин; *b* – тетра-нуклеотид (V), скорость потока 20 мл/мин

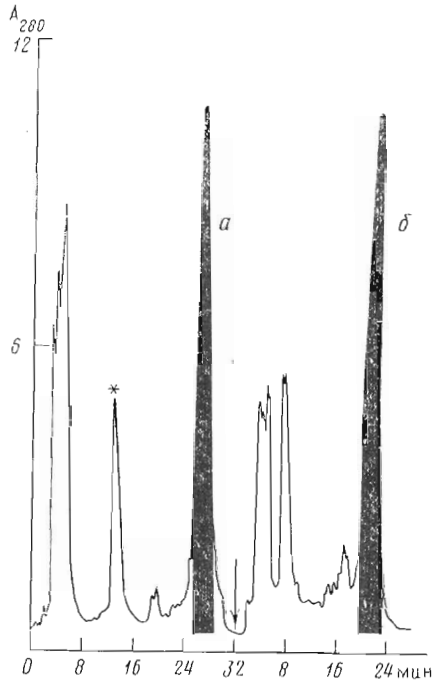
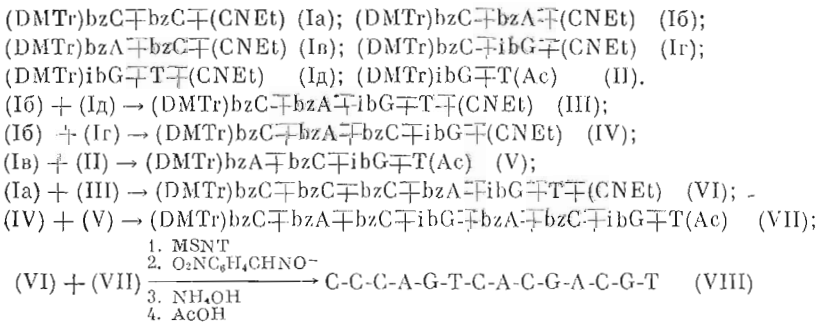


Рис. 4

Рис. 4. Препаративная обращенно-фазовая ВЭЖХ реакционных смесей, содержащих защищенные олигонуклеотидные блоки. Колонка и условия как в рис. 3. *a* – выделение гексануклеотида (VI), градиент в течение 30 мин, скорость потока 20 мл/мин; звездочкой обозначен пик непрореагировавшего bzC≡bzA≡ibG≡T≡(CNEt). *b* – выделение октануклеотида (VII), градиент в течение 20 мин, скорость потока 20 мл/мин

сиквенса ДНК. Его синтез был осуществлен из динуклеотидных блоков (Ia – в) и (II) согласно схеме. Соединения (Ia – д), (II), тетра-нуклеоти-



Примечание. Перед введением в реакцию соединения (Iа–в), (IV), (VI) дедиметилировали, а (Iг), (Iд), (II), (III), (V), (VII) дедиметокситриллировали.

ды (III)–(V), гексануклеотид (VI) и октануклеотид (VII) получали по стандартной методике с применением триизопропилбензолсульфонилхлорида и тетразола [15]. На заключительной стадии конденсацию проводили в присутствии TPST и/или MSNT. Продолжительность реакции конденсации составляла 20 мин. После стадии конденсации реакционную смесь разлагали водой (см. «Экспериментальную часть») и вводили на препаративную колонку Zorbax ODS. Процедура выделения целевых продуктов реакции занимала 20–30 мин. Собранные фракции упаривали в вакууме

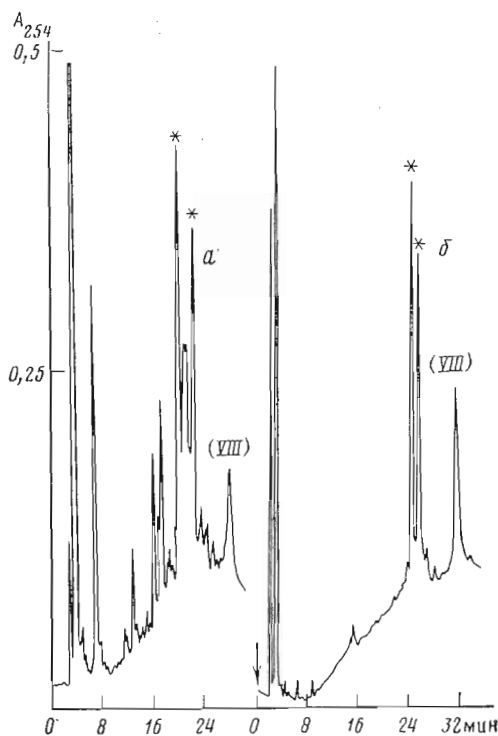


Рис. 5

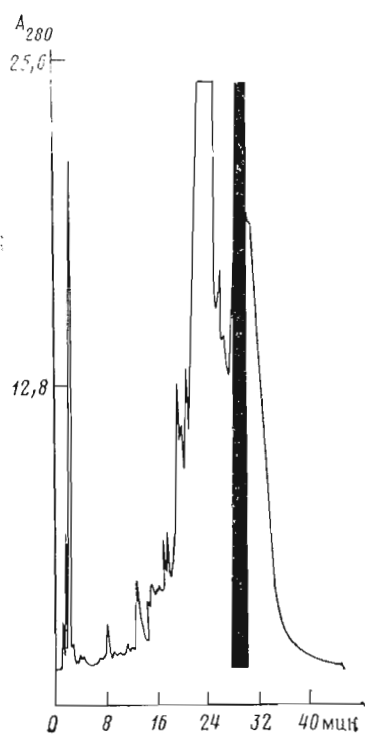


Рис. 6

Рис. 5. Аналитическая анионообменная ВЭЖХ смесей, содержащих С-С-С-А-С-Г-С-А-С-Г-А-С-Г-Т (VIII). *a* – ВЭЖХ смеси, полученной в результате синтеза из защищенных блоков, очищенных колоночной хроматографией на силикагеле (40–100 мкм). Колонка Silasorb NH₂, 5 мкм (4,6×250 мм), элюция в линейном градиенте от 0,1 М ацетата аммония в 5% уксусной кислоте до 2 М ацетата аммония в 20% метаноле и 10% уксусной кислоте, 30 мин, скорость потока 1 мл/мин. *b* – ВЭЖХ смеси, полученной в результате синтеза из защищенных олигонуклеотидных блоков, очищенных с помощью препаративной обращенно-фазовой ВЭЖХ. Колонка Zorbax NH₂, 5 мкм (4,6×250 мм), элюция в линейном градиенте от 0,1 М ацетата аммония в 10% уксусной кислоте до 2 М ацетата аммония в 20% метаноле и 17,5% уксусной кислоте (30 мин) и далее 2 М ацетатом аммония в 20% метаноле и 17,5% уксусной кислоте (5 мин), скорость потока 1 мл/мин. Пики непрореагировавших гекса- и октануклеотидов обозначены звездочками

Рис. 6. Preparative anion-exchange HPLC смеси, содержащей С-С-С-А-С-Г-Т-С-А-С-Г-А-С-Г-Т (VIII) (синтез из блоков, очищенных с помощью препаративной обращенно-фазовой ВЭЖХ) на колонке Zorbax NH₂, 10 мкм (9,4×250 мм). Условия как в рис. 5б, скорость потока 4,2 мл/мин

и далее детритилировали или децанэтилировали. Полная продолжительность одного реакционного цикла составляла не более 1,5 ч. На рис. 3 и 4 представлены хроматограммы препаративного выделения некоторых олигонуклеотидных блоков. В заштрихованных зонах содержалось 140 (рис. 3а), 93 (рис. 3б), 30 (рис. 4а) и 36 мг (рис. 4б) веществ. Несмотря на то что в условиях хроматографии, приведенной на рис. 3 и 4, колонка оказывается уже сильно перегруженной, количество очищаемого вещества можно увеличить еще в 3–5 раз без значительного ухудшения качества разделения.

Как правило, после последней стадии блочного синтеза олигонуклеотиды деблокируют без предварительной очистки и целевой продукт извлекают из смеси соединений с помощью хроматографических процедур. После заключительной конденсации мы также удаляли защитные группы с помощью *p*-нитробензальдоксимат-иона [16] и далее водным аммиаком (50° С, 5 ч) и 80% уксусной кислотой (20 мин) [17].

На рис. 5 приведены аналитические хроматограммы смесей синтеза тетрадекануклеотида после удаления защитных групп. В первом случае (рис. 5а) очистка блоков на промежуточных этапах синтеза осуществля-

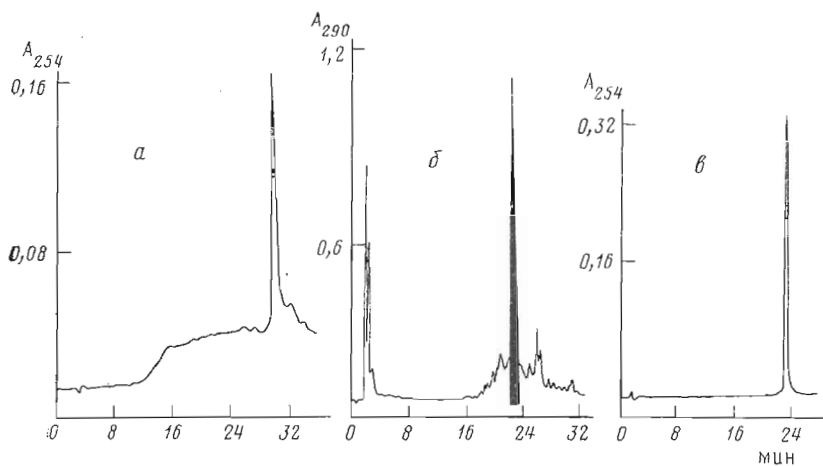


Рис. 7. ВЭЖХ тетрадекануклеотида (VIII) после ионообменной хроматографии (рис. 6). *a* — аналитическая анионообменная хроматография, колонка и условия как в рис. 5б; *б* — препаративная обращенно-фазовая ВЭЖХ на колонке Нуперсил ODS, 5 мкм (4,6×250 мм), ввод смеси 4×50 мкл, элюция в линейном градиенте от 6 до 30% метанола в 0,1 М ацетате аммония, 60 мин, скорость потока 1,5 мл/мин, температура 50° С; *в* — анализ гомогенности окончательно очищенного тетрадекануклеотида. Колонка и условия анализа как в рис. 7б

лась с помощью широко используемой традиционной хроматографии на силикагеле с размером частиц 40–100 мкм, а во втором (рис. 5б) — с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ. В первом случае смесь помимо целевого продукта реакции и исходных гекса- и октануклеотидов содержит множество других нуклеотидных примесей. Во втором случае смесь состоит практически только из 14-членного праймера и исходных гекса- и октамеров (пики с временами удерживания до 8 мин соответствуют веществам пенуклеотидной природы). Таким образом, очистка промежуточных олигонуклеотидных блоков с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ дает существенно лучший результат, чем невысокоэффективная хроматография на силикагеле.

Надо сказать, что ВЭЖХ на силикагеле с размером частиц до 10 мкм также удовлетворяет многим поставленным требованиям [18]. Тем не менее меньшая селективность силикагеля по отношению к разделяемым тритиллированным и детритиллированным веществам, а следовательно, и меньшая препаративная возможность силикагелевой колонки несколько снижает ценность препаративной прямофазовой ВЭЖХ. Кроме того, необходимость применения в качестве основы элюента хлороформа или хлористого метилена, вызывающих коррозию нержавеющей стали, на наш взгляд, является еще одним недостатком прямофазовой ВЭЖХ.

Выделение тетрадекануклеотида (VIII) проводили с помощью препаративной анионообменной ВЭЖХ на аминопропилсиликагеле (рис. 6). Хотя разделение такой простой смеси может быть легко осуществлено на DEAE-целлюлозе или ее аналогах, применение ВЭЖХ значительно ускоряет и эту стадию. На рис. 7а представлена аналитическая хроматограмма выделенного 14-членного олигонуклеотида (VIII), выполненная на анионообменной колонке. Ранее неоднократно отмечалось, что достаточно высокая чистота олигонуклеотида достигается при использовании по крайней мере двухкратной ВЭЖХ (например, анионообменной и обращенно-фазовой) [10, 11]. Мы также считаем, что окончательная очистка деблокированного олигонуклеотида на обращенно-фазной колонке после анионообменной ВЭЖХ является обязательным условием для получения чистого вещества. На рис. 7б показана заключительная стадия очистки тетрадекануклеотида препаративной обращенно-фазовой ВЭЖХ (вещество разделили на четыре порции и хроматографировали последовательно), а на рис. 7в — анализ гомогенности конечного продукта.

Экспериментальная часть

Пиридин (ч.д.а.) очищали кипячением с тозилхлоридом (2 ч). Дистиллят кипятили далее над СаН₂ (2 ч) и перегоняли повторно, хранили над молекулярными ситами 4 А. Использовали 2'-дезоксинуклеозиды, 4,4'-диметокситригилхлорид, *n*-нитробензальдоксим, 2,4,6-триизопропилбензолсульфонилхлорид и мезитиленсульфонил-3-нитро-1,2,4-триазолид фирмы Fluka (Швейцария), 1H-тетразол (Aldrich, США). 2,4,6-Триизопропилбензолсульфонилтетразолид предоставлен А. Л. Каюшиным (Всесоюзная ветеринарная академия им. К. Г. Скрябина). Селективное ацилирование аминогрупп нуклеозидов осуществляли по методу [19]. Полностью защищенные мононуклеотиды получали как описано в работе [20]. Межнуклеотидные конденсации при синтезе от ди- до октануклеотида проводили по методу Джея [15].

Для снятия 5'-диметокситригильной защитной группы использовали 2% раствор бензолсульфоновой кислоты в смеси хлороформ — метанол (7:3) при 0°С [21]. Цианэтильную группу удаляли 10% раствором трет-бутиламина в пиридине в течение 10 мин [22]. После проведения реакции конденсации к смеси прибавляли 2—3 капли воды, 20 мл хлороформа и 10 мл насыщенного раствора NaHCO₃. Смесь встряхивали, хлороформный слой отделяли, упаривали до маслообразного состояния, прибавляли 0,2—0,5 мл метанола, раствор (0,5—1,5 мл) фильтровали через слой ваты, утробованной в пипетке Пастера, и вводили в петлю инжектора хроматографа, предварительно заполненную ацетонитрилом.

Для ВЭЖХ применяли ацетат аммония марки о.ч. (Союзреактив), ацетонитрил марки ч. (Союзреактив) перегоняли над P₂O₅ и использовали для препаративной ВЭЖХ, ацетонитрил «HPLC grade» (Fluka, Швейцария) — для аналитической ВЭЖХ. В работе использовали колонки: Zorbax ODS, 5 мкм (4,6×250 мм); Zorbax ODS 10 мкм (21,2×250 мм); Zorbax NH₂, 5 мкм (4,6×250 мм); Zorbax NH₂, 10 мкм (9,4×250 мм) фирмы Du Pont (США) и Lichrosorb RP 18, 5 мкм (4×250 мм) фирмы LKB (Швеция). Колонки с Silasorb NH₂, 5 мкм (4,6×250 мм; Chemapol, СССР) и Hypersil ODS, 5 мкм (4,6×250 мм; Shandon, Англия) упаковывали с помощью насоса DST-150 А (Haskel, США). Для этого готовили суспензию 3,5 г сорбента в 20 мл метанола, помещали ее в ультразвуковую ванну и через 5 мин суспензию заливали в резервуар. К нему быстро присоединяли колонку, которую заполняли, прокачивая метанол снизу вверх при давлении 400 атм в течение 20 мин.

ВЭЖХ проводили на приборе Du Pont 8800 (США) при 35°С. Для аналитической хроматографии применяли петлю для ввода пробы объемом 100 мкл, аналитическую кювету детектора и насос с производительностью до 10 мл/мин. Для препаративной ВЭЖХ применяли петлю для ввода пробы объемом 2 мл, препаративную кювету детектора и насос с производительностью до 40 мл/мин. Интегрирование площади пиков осуществляли с помощью интегратора SP 4100 (Spectra-Physics, США).

Колоночную хроматографию полностью защищенных олигонуклеотидов (I) — (VII) в параллельном синтезе проводили на колонках с силикагелем L40/100 (Chemapol, СССР). Размер колонок от 2×3,5 до 10×25 см. Элюировали хлороформом с линейным градиентом концентрации метанола от 0 до 10%, общий объем до 2 л при скорости потока до 10 мл/мин. Для выделения и обессоливания растворов незащищенных нуклеотидов использовали Toyopearl DEAE 650 M (Toyo Soda, Япония).

C-C-C-A-G-T-C-A-C-G-A-C-G-T (VIII). Конденсацию 27 мг (0,0075 ммоль) гексануклеотида (VI) и 28 мг (0,0068 ммоль) октануклеотида (VII), очищенных с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ, проводили в присутствии 10 мг (0,032 ммоль) MSNT в течение 40 мин. После удаления защитных групп, как описано выше [16, 17], к смеси прибавляли 20 мл воды, экстрагировали хлороформом (2×10 мл) и водный слой направили на колонку (1×3 см) с Toyopearl DEAE-650 M. Смола промывали водой (100 мл), 0,15 М бикарбонатом аммония (50 мл) и элюировали 0,5 М бикарбонатом аммония. Элюат упаривали досуха, остаток упаривали с водой (3×10 мл), растворяли в 0,5 мл воды и очищали с помощью ионо-

обменной ВЭЖХ (рис. 6а). Фракцию с целевым олигонуклеотидом разбавляли в 10 раз водой и обессоливали на Toyocarl DEAE аналогично описанному выше. После удаления бикарбоната аммония упариванием с водой вещество растворили в 200 мкл воды и последовательно (4×50 мкл) вводили на колонку Hypersil ODS (рис. 7б). Выход составил 128 ОЕ₂₅₄ (0,98 мкмоль, 14,4%).

Анализ состава тетрадекануклеотида (VIII) осуществлен расщеплением его под действием фосфодиэстеразы змеиного яда (КФ 3.1.4.1, Sigma, США) [23] и последующим разделением мономеров обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке Lichrosorb RP18, 5 мкм. Элюировали 0,1 М ацетатом аммония со скоростью потока 0,75 мл/мин. Идентификацию пиков осуществляли сравнением времен удерживания с соответствующими стандартами. Нормализация площадей пиков по коэффициентам молярного поглощения нуклеотидов в 0,1 М ацетате аммония показала соотношение мольных долей dC:pdC:pT:pdG:pdA=1:4,54:1,94:3,05:2,92 (теоретическое соотношение 1:5:2:3:3). Несколько заниженное значение для pdC связано с большей ошибкой интегрирования его очень острого пика. Определение последовательности нуклеотидов по методу Гилберта [24] подтвердило структуру синтезированного вещества.

ЛИТЕРАТУРА

- Gait M. J., Singh M., Sheppard R. C., Edge M. D., Green A. R., Heathcliffe G. R., Atkinson T. C., Markham A. F. Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, № 5, p. 1081-1096.
- Markham A. F., Edge M. D., Atkinson T. G., Green A. R., Heathcliffe G. R., Newton C. R., Scanlon D. B. Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, № 22, p. 5193-5205.
- Edge M. D., Green A. R., Heathcliffe G. R., Meacock P. A., Schuch W., Scanlon D. B., Atkinson T. C., Newton C. R., Markham A. F. Nature, 1981, v. 292, p. 756-762.
- Matteucci M. D., Caruthers M. H. J. Amer. Chem. Soc., 1981, v. 103, № 11, p. 3485.
- Miyoshi K., Itakura K. Tetrahedron Lett., 1979, v. 20, № 34, p. 3635-3638.
- Ito H., Ike I., Ikula S., Itakura K. Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, № 5, p. 1755-1769.
- Miyoshi K., Miyake T., Hozumi T., Itakura K. Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, № 22, p. 5473-5489.
- Crea R., Horn T. Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, № 10, p. 2331-2348.
- Frank R., Heikens W., Heisterberg-Moutsis G., Blöcker H. Nucl. Acids Res., 1983, v. 11, № 3, p. 4365-4377.
- McLaughlin L. W., Krusche J. U. In: Chemical and enzymatic synthesis of gene fragments/Eds Gassen H. G., Lang A. Weinheim-Deerfield Beach (Florida - Basel): Verlag Chemie, 1982, p. 177-198.
- Wulfson A. N., Yakimov S. A. J. High Resolution Chromatogr., 1984, v. 7, № 8, p. 442-460.
- Ohtsuka E., Shibahara S., Ikehara M. Chem. Pharm. Bull., 1982, v. 30, № 4, p. 1307-1311.
- Efimov V. A., Reverdatto S. V., Chakhmakhcheva O. G. Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, № 21, p. 6675-6694.
- Efimov V. A., Buryakova A. A., Reverdatto S. V., Chakhmakhcheva O. G., Ovchinnikov Yu. A. Nucl. Acids Res., 1983, v. 11, № 23, p. 8369-8387.
- Seth A. K., Jay E. Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, № 22, p. 5445-5459.
- Reese C. B., Titmas R. C., Ian L. Tetrahedron Lett., 1978, v. 19, № 30, p. 2727-2730.
- Добрынин В. Н., Бодярева Е. Ф., Быстров Н. С., Северцова И. В., Чернов Б. К., Колосов М. Н. Биооргани. химия, 1978, т. 4, № 4, с. 523-534.
- Вульфсон А. Н., Якимов С. А. Биооргани. химия, 1983, т. 9, № 3, с. 365-390.
- Ti G. S., Gaffney B. L., Jones R. A. J. Amer. Chem. Soc., 1982, v. 104, № 5, p. 1316-1319.
- Duckworth H. L., Gait M. J., Golet P., Hong G. F., Singh M., Titmas R. C. Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, № 7, p. 1691-1706.
- Stawiski H., Hozumi S. A. Nucl. Acids Res., 1977, v. 4, № 8, p. 2757-2765.
- Hsiung H., Inouye S., West J., Sturm B., Inouye M. Nucl. Acids Res., 1983, v. 11, № 10, p. 3227-3239.
- Берлин Ю. А., Дьяков В. А., Колосов М. Н. Биохимия, 1974, т. 39, № 4, с. 747-751.
- Maxam A. M., Gilbert W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, № 2, p. 560-564.

Поступила в редакцию 13.III.1985

USE OF PREPARATIVE REVERSE-PHASE HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY IN OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDE SYNTHESIS

AZHAYEV A. V., TURINA O. V., GNUCHEV N. V., CHERNOV B. K.

Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

The oligodeoxyribonucleotide d(C-C-C-A-G-T-C-A-C-G-A-C-G-T), a DNA sequencing primer, was synthesized by phosphotriester method in solution. A method for isolating fully protected oligonucleotide blocks relying on the preparative reverse-phase HPLC was developed. The results of the synthesis of the above-mentioned primer obtained with the aid of HPLC and/or adsorption chromatography on silica gel were compared. The efficiency and high speed of the employed method was demonstrated.