



УДК 547.963.32.057 : 577.113.6

СИНТЕЗ 5'-ФОСФОРИЛИРОВАННЫХ
ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ
ФОСФОТРИЭФИРНЫМ ТВЕРДОФАЗНЫМ МЕТОДОМ В РУЧНОМ
И АВТОМАТИЧЕСКОМ ВАРИАНТАХ

Горн В. В., Зарытова В. Ф., Потемкин Г. А.,
Средин Ю. Г.*, Полмишук А. С.*,*

*Новосибирский институт биоорганической химии
Сибирского отделения Академии наук СССР;*

**Специальное конструкторско-технологическое бюро
специальной электроники и аналитического приборостроения
Сибирского отделения Академии наук СССР, Новосибирск*

В ручном и автоматическом вариантах осуществлен синтез 38 олигодезоксирибонуклеотидов с концевой 5'-фосфатной группой. На всех стадиях конденсации, в том числе на последней, использованы только однотипные блоки (мононуклеотиды в автоматическом варианте либо динуклеотиды в ручном), содержащие 5'-фосфатную группу с β -цианэтильной и *n*-хлорфенильной защитами. В качестве конденсирующего реагента использована смесь триизопробилбензолсульфонилхлорида с *N*-метилимидазолом либо *N*-окисью 4-*N,N*-диметиламинопиридина. *n*-Хлорфенильные группы удаляли с помощью тетрабутиламмонийфторида.

В настоящее время в молекулярной биологии и биоорганической химии для решения ряда задач применяются синтетические олигодезоксирибонуклеотиды с концевыми фосфатными группами. Такие олигонуклеотиды могут непосредственно использоваться в лигазной реакции, а также для получения производных, содержащих алкилирующие, интеркалирующие и другие группы. Однако большинство известных схем синтеза олигонуклеотидов приводит к продуктам, не содержащим концевых фосфатных групп.

В нашей предыдущей работе [1] была предложена схема твердофазного синтеза олигонуклеотидов, содержащих 5'-концевую фосфатную группу, на основе использования β -цианэтиловых, *n*-хлорфениловых эфиров 5'-моно- и динуклеотидов, и на последней стадии конденсации — нестандартных блоков — бис (β -цианэтиловых) эфиров 5'-нуклеотидов, поскольку при деблокировании синтезированных олигонуклеотидов оксиматом и аммиаком *n*-хлорфенильная группа с концевого фосфата не удаляется.

Нами были найдены условия полного деблокирования всех *n*-хлорфенильных групп, в том числе с 5'-концевого фосфата, с помощью тетрабутиламмонийфторида и на примере одной последовательности показана принципиальная возможность синтеза олигонуклеотидов только на основе стандартных блоков — β -цианэтиловых, *n*-хлорфениловых эфиров *N*-ацилнуклеозид-5'-фосфатов ((CNEt)(CPh) pN) [2].

В настоящей работе этот унифицированный метод использован для синтеза 38 олигонуклеотидов как в ручном, так и в автоматическом вариантах ((1) — (38), табл. 1). Кроме того, показана возможность использования смеси TPS и DMAPO [3, 4] в качестве конденсирующего реагента в синтезе по разрабатываемой схеме (олигонуклеотиды (35) — (38), табл. 1),

Принятые сокращения: CPh — *n*-хлорфенил, CNEt — β -цианэтил, TPS — 2,4,6-триизопробилбензолсульфонилхлорид, MeIm — *N*-метилимидазол, DMAPO — *N*-окись 4-*N,N*-диметиламинопиридина, TMG — тетраметилгуанидин, *N* — защищенный по гетероциклической аминогруппе нуклеозид. Префикс d (дезокс) в аббревиатуре нуклеотидов везде опущен.

Результаты синтеза 5'-фосфорилированных олигодезоксинуклеотидов

№	Олигонуклеотид *	Схема синтеза	Полимер, мкмоль первого звена	Выход			
				ОЕ ₂₆₀	мкмоль	%	средний на стандартно, %
1	pGATCATCTGGC	1+2×5	7,7	30	0,27	3,6	57,4
2	pCACGCCAGA	2×5	6,7	42	0,46	6,9	58,6
3	pGGTGATAT	2×4	6,0	66	0,74	12,3	59,2
4	pCCTAGATAT	1+2×4	7,8	70	0,73	9,4	62,3
5	pTTAGCATCT	2×5	6,3	50	0,49	7,8	60,0
6	pTTATAGAAT	1+2×4	7,6	110	1,05	13,8	67,3
7	pATAAATGAA	1+2×4	6,9	76	0,66	9,6	62,6
8	pGTGTGAATTCAT	2×6	6,7	71	0,55	8,2	65,9
9	pTTACACAGGC	1+2×5	8,5	42	0,37	4,4	59,5
10	pTGTGGGCCT	1+2×4	10,0	32	0,37	3,7	51,7
11	pCCACAGTAC	1+2×4	7,8	129	1,39	17,8	70,8
12	pACAGAGGC	1+2×3+1	7,8	28	0,30	3,9	44,5
13	pCTGTTTTTTG	2×5	6,4	67	0,73	11,4	64,8
14	pGGATCCAAAAA	1+2×5	6,6	113	0,95	14,4	72,4
15	pGATCC	1+2×2	5,2	124	2,52	48,5	78,5
16	pATAATGTAC	1+2×4	8,5	106	1,03	12,1	65,5
17	pCACCGTACA	1+2×4	7,4	97	1,04	14,1	67,7
18	pGGTGGTTTT	1+2×4	9,2	18	0,20	2,1	46,1
19	pGCAGAAAAAC	1+2×4	8,1	84	0,76	9,4	62,3
20	pCTATTGAAC	1+2×4	7,9	135	1,60	20,0	72,6
21	pGAAATGTGAGC	2×6	9,0	7	0,05	0,5	41,6
22	pGGATAACAAT	2×5	7,8	102	0,85	10,9	64,2
23	pTATCCGCTC	1+2×4	8,0	96	1,17	14,7	68,1
24	pTTATACGA	2×4	6,7	62	0,70	10,4	56,8
25	pTTCATGAAAAAA	2×6	6,8	74	0,51	7,5	64,9
26	pCCTTGTCT	2×5	14,5	210	2,44	16,8	70,0
27	pAAAGCAGCA	2×5	6,9	39	0,32	4,7	54,5
28 **	pCTATTGAAC	1×9	6,6	59	0,70	10,5	77,8
29 **	pAATACTCT	1×8	5,5	96	1,13	20,3	81,9
30 **	pCCTCTTCTT	1×11	6,3	65	0,72	11,5	82,2
31 **	pCATTTCTTA	1×10	1,6	20	0,21	13,2	81,7
32 **	pTCCATTTCTTA	1×12	1,7	17	0,15	9,0	81,8
33 **	pGCTCCATTTCTTA	1×14	2,9	24	0,18	6,2	82,0
34 **	pCACCGTACA	1×9	6,9	28	0,30	4,4	70,6
35 ***	pCTGCGTTAC	1+2×4	8,8	83	0,97	11,0	64,3
36 ***	pGGTGGTTTTCTGCGTTAC	2×9	6,6	23	0,13	2,0	64,7
37 ***	pCACCGTAAACGCAGAAAAAC	2×9	6,3	23	0,12	1,8	64,0
38 ***	pCTGCGTTAATAGATGAA	1+2×8	6,7	38	0,20	3,0	67,6

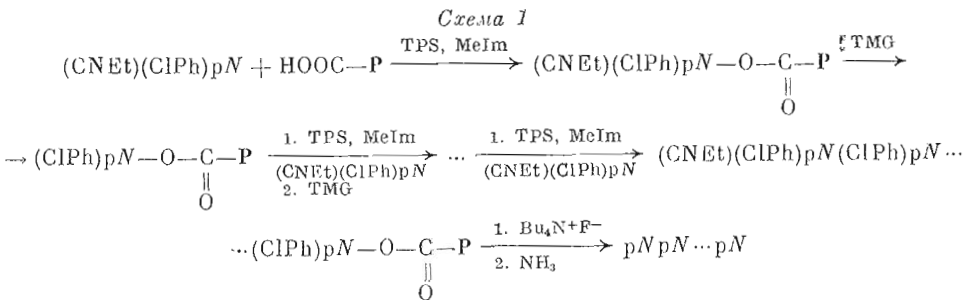
* Олигонуклеотиды (1)–(20) и (34)–(38) являются фрагментами двух полинуклеотидов, предназначенных для исследования транскрипции *in vitro* в препаративном масштабе; последовательности (21)–(24) являются фрагментами *lac*-оператора, а остальные синтезированы для комплементарно-адресованной модификации различных объектов.

** Синтез в автоматическом варианте.

*** Синтез в ручном варианте с использованием TPS и DMAPO.

что позволило существенно повысить скорость конденсации и увеличить выход олигонуклеотидов с большим содержанием гуанина.

Синтез олигонуклеотидов проводили фосфотриэфирным методом в направлении 3' → 5' с активацией фосфатного компонента, связанного с полимерным носителем (схема 1). В конденсации использовали 5'-фосфо-

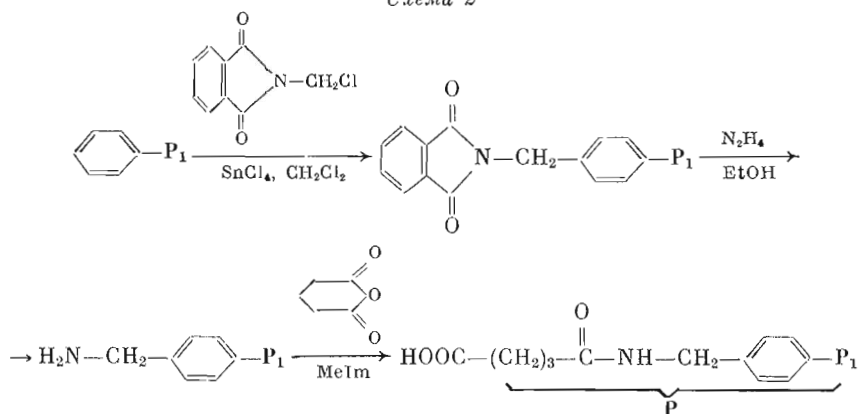


P — полистиролфеноловый носитель

рилированные защищенные моно- и динуклеотиды со свободной 3'-окси- группой. Удаление защитной β -цианэтильной группы после каждой стадии конденсации проводили раствором TMG в пиридине в течение 2—3 мин [5], что по времени сравнимо с удалением широко используемой диметокситритильной группы, однако позволяет полностью избежать проблем, связанных с агуринизацией синтезированных олигонуклеотидов.

В качестве носителя был использован полистирол, радиационно при- витый на поверхность пористого политетрафторэтилена [6], который был модифицирован для введения якорной карбоксигруппы по схеме 2 [7] (см. «Экспериментальную часть»).

Схема 2



Все попытки синтеза олигонуклеотидов по схеме 1 на силикагельных или пористых стеклянных носителях окончились неудачей, что, по-види- мому, связано с деструкцией силикагельной или стеклянной матрицы (например, возможен разрыв имеющихся Si—O—Si-связей) под действи- ем такого сильного основания, как тетраметилгуанидин.

При работе в ручном режиме стадию конденсации проводили в полиэти- леновых пробирках (Eppendorf) при 37° С [1]. После завершения конде- сации полимер переносили на стеклянный пористый фильтр, промывали пиридином и обрабатывали на фильтре раствором TMG. После промывки полимера пиридином, ацетоном и сухим эфиром его переносили в следую- щую пробирку, содержащую навески защищенного моно- либо динуклео- тида и TPS, сушили смесь в вакууме, а затем добавляли абс. пиридин и MeIm для осуществления следующей конденсации. Общая схема операций для одного цикла наращивания нуклеотидной цепи в ручном варианте приведена в табл. 2. Продолжительность цикла составляет 30 мин.

Таблица 2

Схема операций для одного цикла наращивания нуклеотидной цепи в ручном режиме

№ опера- ции	Операция	Растворитель, реагент	Объем, мл	Время, мин
1	Конденсация *	ОН-Компонент, TPS, MeIm, абс. пиридин	0,2—0,3	20
		или ОН-компонент, TPS, DMAPO, абс. пиридин, абс. хлоро- форм	0,4	5—7
2	Промывка	Абс. пиридин	5	1
3	Деблокирование	0,1 М TMG в абс. пиридине	5	2
4	Промывка	Абс. пиридин	5	1
5	»	Ацетон	10	1
6	»	Эфир	10	1
7	Высушивание в вакууме	—	—	5

* Операцию проводили при 37° С.

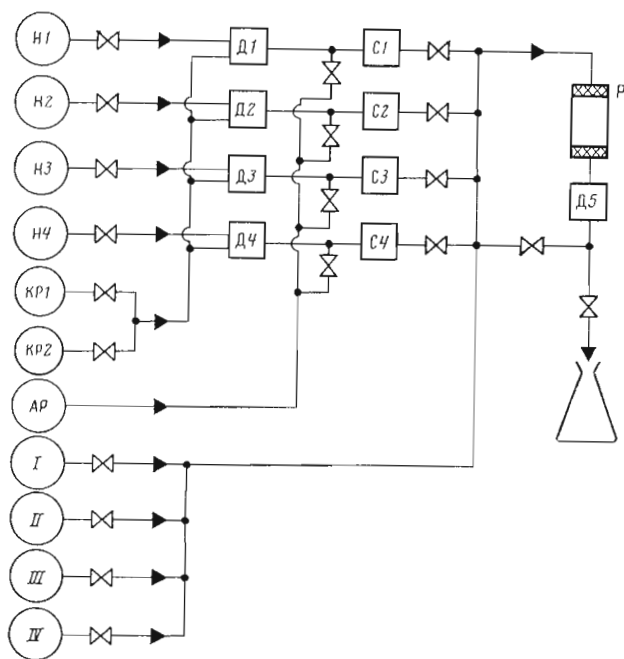


Рис. 1. Принципиальная гидравлическая схема установки «Виктория-4М»; H1—H4 — емкости для растворов мономеров; KR1, KR2 — емкости для конденсирующих реагентов; AP — емкость для абс. растворителя; I—IV — емкости для остальных растворов реагентов и растворителей; Д1—Д4 — дозирующие устройства; С1—С4 — смесители; Р — реактор с полимерным носителем; Д5 — циркуляционное устройство

После завершения синтеза проводили деблокирование *n*-хлорфенильных групп, в том числе и с 5'-концевого фосфата, раствором тетрабутиламмонийфторида в водном пиридине [2]. При этом олигонуклеотид остается присоединенным к полимеру, так как сложпоэфирная связь в этих условиях не разрывается. Для удаления остальных защитных групп и отщепления олигонуклеотида от носителя полимер, промытый водным пиридином, обрабатывали конц. аммиаком и продукт выделяли методом высокоэффективной ионообменной хроматографии на колонке с Полисилом СА. Дополнительную очистку проводили методом обращенно-фазовой хроматографии на колонке с Lichrosorb RP-18. В табл. 1 приведены выходы продуктов после обращенно-фазовой хроматографии в расчете на первое звено, а также рассчитанные на основе этих данных средние выходы на одну стадию конденсации. При расчете молярные коэффициенты поглощения олигомеров принимали равными сумме молярных коэффициентов поглощения входящих в их состав мононуклеотидов.

Предложенная схема синтеза олигонуклеотидов (схема 1) была нами реализована также в автоматическом режиме на установке «Виктория-4М». В отличие от предыдущих установок этой серии, с использованием которых проведен синтез лишь в полуавтоматическом режиме [8] или автоматизирована только одна отдельная стадия наращивания олигонуклеотидной цепи [9], установка «Виктория-4М» позволяет осуществить полностью автоматический синтез олигонуклеотидов любым из известных в настоящее время методов. С помощью микропроцессорного программатора установки можно проводить непрерывно до 64 циклов наращивания по любой из шести операционных программ. Он обеспечивает быстрый ввод программы, контроль за ходом синтеза и возможность остановки процесса в любой заданный момент времени. Принципиальная гидравлическая схема «Виктория-4М» приведена на рис. 1. Установка содержит четыре сосуда для хранения растворов мономеров, два сосуда для конденсирующих реагентов и пять сосудов для промывочных растворов.

Схема операций для одного цикла наращивания «нуклеотидной цепи в автоматическом режиме на установке «Виктория-4М»

№ операции	Операция	Реагент, растворитель	Объем, мл	Время, мин
1	Промывка	Абс. пиридин – ацетонитрил, 1:1	1,5	1
2	Дозирование мономера	0,3 М (CNET)(ClPh) <i>pN</i> в абс. хлороформе	0,15	—
3	Дозирование конд. реагента (КР1)	1,5 М TPS в абс. хлороформе	0,1	—
4	Дозирование конд. реагента (КР2)	6 М MeIm в абс. пиридине	0,05	—
5	Смешивание	—	—	0,5
6	Ввод смеси в реактор	—	0,3	—
7	Конденсация (циркуляция)	—	—	30
8	Промывка	Абс. пиридин – ацетонитрил, 1:1	3	2
9	Деблокирование	2% TMC в абс. пиридине	3	2
10	Промывка	Абс. ацетонитрил	0,7	0,5
11	»	10% CH ₃ COOH в хлороформе	1,5	1
12	»	Абс. ацетонитрил	0,7	0,5

Мы использовали растворы мононуклеотидов (CNET)(ClPh)*pN* в абс. ацетонитриле, раствор TPS в абс. хлороформе (КР1) и раствор MeIm в абс. пиридине (КР2). В таких растворителях используемые компоненты реакции довольно стабильны и могут храниться в синтезаторе в течение нескольких месяцев без изменения. Перед каждой стадией конденсации дозирующие устройства Д1 — Д4 подавали в соответствующий смеситель С1 — С4 заданные программы объемы растворов мономеров Н1 — Н4 и конденсирующих реагентов КР1 и КР2, и после перемешивания реакционная смесь подавалась в реактор с полимерным носителем и циркулировала в реакторном контуре в течение необходимого времени. После отмывки полимера абс. растворителем и деблокирования β-дианэтильной группы начинался следующий цикл наращивания цепи. Карта операций для автоматического синтеза олигонуклеотидов по схеме 1 на установке «Виктория-4М» приведена в табл. 3. По сравнению с ручным вариантом добавлена операция промывки полимера раствором уксусной

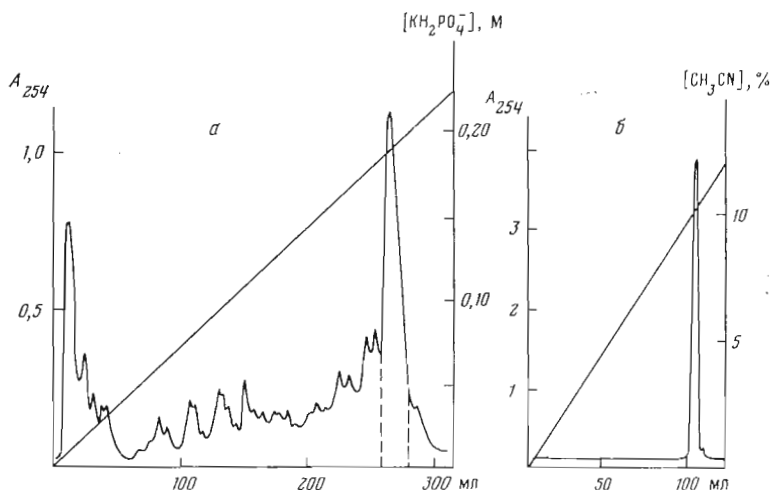


Рис. 2. Хроматографическое выделение олигонуклеотида pCATTCCTTA (31): а — ионообменная ВЭЖХ реакционной смеси, полученной в синтезе олигонуклеотида (31), на колонке с Полисилиом СА (10 × 250 мм) в градиенте концентрации KH_2PO_4 в 30% ацетонитриле; скорость элюции 8 мл/мин; б — обращенно-фазовая хроматография олигонуклеотида (31) (выделенный пик) на колонке с Lichrosorb RP-18 (10 × 250 мм) в градиенте концентрации ацетонитрила в 0,05 М $LiClO_4$; скорость элюции 6 мл/мин

кислоты в хлороформе для более быстрого удаления избытка ТМГ после деблокирования β -цианэтильной группы. Перед началом синтеза в реактор помещали привитый тефлоновый карбоксиполимер, после завершения последней стадии конденсации проводили только промывку абс. растворителем, не удаляя β -цианэтильную группу. Полное деблокирование и выделение синтезированных олигонуклеотидов проводили как описано выше. В автоматическом режиме было синтезировано 7 олигонуклеотидов ((28)—(34), табл. 1) длиной от 8 до 14 звеньев. На рис. 2 в качестве примера приведены профили хроматографического выделения и очистки олигонуклеотида (31).

Из табл. 1 видно, что средний выход на одну стадию конденсации в расчете на выделенный продукт при синтезе в ручном варианте в большинстве случаев лежит в районе 55—70%, что согласуется с результатами, полученными по другим схемам твердофазного триэфирного метода [10, 11]. Однако для олигонуклеотидов, содержащих несколько остатков гуанина, особенно расположенных близко к 3'-концу цепи, средний выход на стадию падал до 40—50% (олигонуклеотиды (12), (18), (21)). При синтезе в автоматическом варианте средний выход на стадию был заметно выше, чем в ручном синтезе, и для олигонуклеотидов, не содержащих остатков гуанина, достигал 80—82% ((28)—(32), табл. 1). Для нонануклеотида (34), содержащего один остаток гуанина в середине цепи, выход на стадию в ручном варианте составил 67,6%, а в автоматическом — 70,6%. Снижение выхода в синтезе гуанинсодержащих олигонуклеотидов, вероятно, связано с протеканием побочных реакций по гетероциклическому основанию, в частности с сульфонилированием и фосфорилированием по O⁶-положению гуанина [12, 13]. Ряд авторов предлагают для повышения выхода вводить по этому положению соответствующие защитные группы [14—16]. Другим альтернативным путем решения этой проблемы является использование катализаторов, способствующих протеканию реакции конденсации только в нужном направлении. Недавно Ефимовым и сотр. [3, 4] было предложено использовать в качестве конденсирующего реагента в триэфирном методе синтеза смесь TPS с различными O-нуклеофильными катализаторами, в частности с N-окисью 4-диметиламинопиридина. Сообщалось, что при использовании *n*-хлорфениловых эфиров 5'-O-диметокситриптилнуклеозид-3'-фосфатов конденсация проходит очень быстро (за 3—5 мин) и с одинаковой эффективностью для всех четырех мономеров. Мы использовали этот конденсирующий реагент для синтеза олигонуклеотидов по схеме 1. В ручном варианте были синтезированы четыре олигомера (35)—(38), средний выход на одну стадию конденсации лежал в районе 64—67%, даже при синтезе октадекануклеотида (36), содержащего 6 остатков гуанина (табл. 1).

Время конденсации при использовании смеси TPS и DMAPO в нашем случае составляло 5—7 мин. Первую стадию (конденсацию с карбоксиполимером) проводили со смесью TPS и MeIm, так как с DMAPO на этой стадии были получены низкие выходы. Это обстоятельство, а также низкая растворимость DMAPO в пиридине и хлороформе и образование при

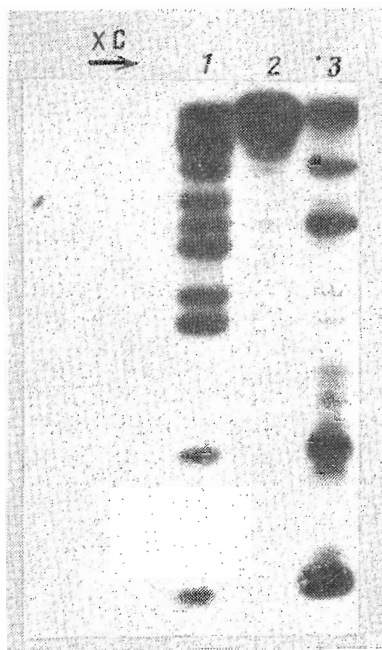


Рис. 3. Радиоавтограмма, полученная при анализе гептадекануклеотида (38) методом химических модификаций: 1 — реакция по A + G, 2 — меченый гептадекануклеотид (38), 2 — реакция по G; XС — положение маркерного красителя ксиленацианола

конденсации слаборастворимых солей ДМАРО пока осложняют использование этого нуклеофильного катализатора в автоматическом синтезе олигонуклеотидов по схеме 1 и требуют дальнейших исследований в этом направлении.

Деблокирование и выделение олигонуклеотидов (35)—(38) проводили как описано выше. Их гомогенность после введения 5'-³²P-метки методом обмена [17] была подтверждена электрофорезом в полиакриламидном геле, а первичная структура — методом химических модификаций [48] (рис. 3).

Таким образом, разработанная нами схема твердофазного синтеза олигонуклеотидов позволяет на основе доступных, производимых в СССР защищенных моно- и динуклеотидов быстро и с низкими затратами получать препаративные количества 5'-фосфорилированных олигонуклеотидов как в ручном, так и в автоматическом вариантах.

Экспериментальная часть

В работе использованы защищенные мононуклеотиды (CNet)(ClPh)pN, динуклеотиды (CNet)(ClPh)pN(ClPh)pN и TPS производства НИОХ СО АН СССР, N-метил-имидазол (Ega, ФРГ), тетраметилгуанидин (Merck, ФРГ), N-окись 4-N,N-диметиламинопиридина синтезирована по методу [19].

Автоматический синтез олигонуклеотидов осуществляли на установке «Виктория-4М», разработанной и изготовленной в СКТБ СЭ и АП СО АН СССР при участии НИБХ СО АН СССР и МГУ.

ВЭЖХ проводили с помощью хроматографа Altex-332 (США) на колонках размером 10 × 250 мм. В качестве носителя для ионообменной хроматографии использовали сильный анионообменник Полисил СА, любезно предоставленный С. И. Ястребовым (ВНИИ молекулярной биологии, пос. Кольцово Новосибирской обл.), для обращенно-фазовой — Lichrosorb RP-18 (Merck, ФРГ). Упаковку колонок проводили на установке фирмы Haskel (США) (эффективность колонок — до 40 000 т. т./м).

Аминометилполимер [17]. К 5 г привитого полимера стирола на политетрафторэтилене (100 мг стирола на 1 г), полученного как описано в работе [6], добавили 2,9 г хлорметилфталимида [20] и 40 мл 0,13 М раствора SnCl₄ в абс. хлористом метиле. Через 3 ч полимер отфильтровали и промыли хлористым метилом (2 × 30 мл) и спиртом (2 × 30 мл). Затем полимер кипятили с обратным холодильником в течение 3 ч с 60 мл 5% раствора гидразингидрата в этаноле. После охлаждения носитель промыли декантацией спиртом (2 × 100 мл), водой (2 × 100 мл), 5 н. HCl (100 мл), водой (3 × 100 мл), 0,3 М Et₄N⁺OH⁻ в 70% пиридине (50 мл), водой (3 × 100 мл), водным диоксаном (150 мл), диоксаном (2 × 100 мл), эфиром (2 × 100 мл) и высушивали в вакууме (15 мм рт. ст.). Емкость полимера по аминогруппе, определенная с помощью пикриновой кислоты [21], составила 100 мкэкв/г.

Карбоксиполимер. К 5 г привитого аминометилполимера (100 мкэкв аминогрупп на 1 г) добавили 10 ммоль глутарового ангидрида, 10 ммоль N-метилимидазола, 10 мл абс. пиридина и оставили реакционную смесь на 15 ч при 20° С. Полимер отфильтровали, промыли пиридином, ацетоном и эфиром и высушили в вакууме. Емкость полимера по мононуклеотиду, присоединенному как описано ниже, составляла 100 мкмоль/г.

Синтез олигонуклеотидов в ручном варианте (табл. 2). Навески карбоксиполимера (50—100 мг, 5—10 мкмоль) моно- либо динуклеотида (30—40 мкмоль) и TPS (90—120 мкмоль) в полиэтиленовой центрифужной пробирке объемом 1,5 мл (Eppendorf) помещали в колбу объемом 100 мл и вакуумировали при 4 мм рт. ст. в течение 5 мин. Затем систему заполняли сухим аргоном и добавляли в пробирку 0,15—0,20 мл абс. пиридина и 180—240 мкмоль MeIm. Пробирку выдерживали при 37° С, периодически встряхивая ее содержимое. После завершения конденсации полимер из пробирки переносили с помощью пинетки на пористый стеклянный фильтр, промывали 5 мл абс. пиридина и обрабатывали 2 мин на фильтре 5 мл 0,1 М раствора TMG в абс. пиридине для удаления β-цианэтильной защитной группы. После промывки абс. пиридином (5 мл), ацетоном (10 мл) и сухим эфиром (10 мл) полимер переносили в пробирку, содержащую навески TPS и следующего динуклеотида. При синтезе олигонуклеотидов, содержащих четное число мономерных звеньев, использовались только

динуклеотидные блоки, при синтезе олигомеров с нечетным числом звеньев, как правило, на первой стадии использовали мономеры, на всех остальных — динуклеотиды.

Для оценки выхода после каждой стадии конденсации взвешивали полимер с точностью $\pm 0,1$ мг. После первых стадий возрастание веса полимера соответствовало теоретическому, затем наблюдалось некоторое снижение привеса. В целом после завершения синтеза вес полимера возрастал на 20—45 мг.

При проведении конденсации с N-окисью диметиламинопиридина на 60—70 мг полимера брали 30 мкмоль динуклеотида, 90 мкмоль TPS, 150 мкл абс. пиридина и 150 мкл 1,3 М раствора DMAPO в абс. хлороформе. Через 5—7 мин полимер переносили на пористый фильтр и далее обрабатывали, как указано выше.

Синтез в автоматическом варианте (табл. 3). Перед началом работы емкости Н1 — Н4 заполняли 5 мл 0,3 М растворов соответствующих мононуклеотидов в абс. ацетонитриле, в емкость КР1 помещали 20 мл 1,5 М раствора TPS в абс. хлороформе, в КР2 — 20 мл 6 М раствора MeIm в абс. пиридине. В сосуды AP, I, II и III помещали абс. пиридин — абс. ацетонитрил, 1 : 1 (400 мл), 2% раствор TMG в абс. пиридине (200 мл), 10% уксусную кислоту в хлороформе (200 мл) и абс. ацетонитрил (200 мл) соответственно. К установке присоединяли реактор с 40—50 мг карбоксиполимера, записывали в память программатора нуклеотидную последовательность и проводили синтез в автоматическом режиме.

Деблокирование и выделение олигонуклеотидов. После завершения последней стадии конденсации полимер переносили на фильтр, промывали пиридином, ацетоном, эфиром и после высушивания и взвешивания обрабатывали 15—20 ч 1 мл 0,3 М раствора тетрабутиламмонийфторида в 50% пиридине при 20° С [2]. Затем промывали полимер 50% пиридином (3 × 1 мл) и выдерживали его с конц. аммиаком (5 ч при 50° С). Полимер отфильтровывали, промывали 50% спиртом, фильтрат упаривали и остаток хроматографировали на колонке с Полисилоном СА (10 × 250 мм) в градиенте калий-фосфатного буфера, pH 6,5 (0,02 → 0,3 М) в 30% ацетонитриле. Фракции, содержащие нужный пик, упаривали, остаток растворяли в воде и хроматографировали на колонке с Lichrosorb RP-18 (10 × 250 мм) в градиенте ацетонитрила (0 → 20%) в 0,05 М LiClO₄ [22]. Фракции, содержащие чистый олигонуклеотид, упаривали и осаждали продукт 2% раствором LiClO₄ в ацетоне [22].

Авторы выражают благодарность С. В. Мамаеву за проведение анализов последовательностей олигонуклеотидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Горн В. В., Зарытова В. Ф. Биоорг. химия, 1985, т. 11, № 6, с. 808—814.
2. Бауск Е. В., Горн В. В., Лебедев А. В. Биоорг. химия, 1985, т. 11, № 6, с. 815—820.
3. Efimov V. A., Chakhmakhcheva O. G., Ovchinnikov Ju. A. Nucl. Acids Res., 1985, v. 13, № 10, p. 3651—3666.
4. Ефимов В. А., Чахмахчева О. Г. Биоорг. химия, 1985, т. 11, № 8, с. 1087—1096.
5. Туманов Ю. В., Горн В. В., Потанов В. К., Шабарова З. А. Докл. АН СССР, 1983, т. 270, № 5, с. 1130—1131.
6. Potarov V. K., Veiko V. P., Koroleva O. N., Shabarova Z. A. Nucl. Acids Res., 1979, v. 7, № 6, p. 2041—2056.
7. Mijoshi K., Arentzen R., Huang T., Itakura K. Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, № 22, p. 5507—5517.
8. Потанов В. К., Потемкин Г. А., Горн В. В., Зарытова В. Ф., Средин Ю. Г., Шабарова З. А., Кнорре Д. Г. Докл. АН СССР, 1982, т. 263, № 6, с. 1386—1389.
9. Ломакин А. И., Ястребов С. И., Попов С. Г. Биоорг. химия, 1985, т. 11, № 7, с. 920—926.
10. Сняжков А. Н., Ломакин А. И., Попов С. Г. Биоорг. химия, 1984, т. 10, № 1, с. 68—74.
11. Duckworth M. L., Gait M. J., Goelet P., Hong G. F., Singh M., Titmas R. C. Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, № 7, p. 1691—1703.
12. Reese C. B., Ubasava A. Tetrahedron Lett., 1980, v. 21, № 23, p. 2265—2268.

13. *Daskalov H. P., Sekine M., Hata T.* Tetrahedron Lett., 1980, v. 21, № 40, p. 3899—3902.
14. *Trichtinger T., Charubala R., Pfleiderer W.* Tetrahedron Lett., 1983, v. 24, № 7, p. 711—714.
15. *Gaffnei B. L., Jones R. A.* Tetrahedron Lett., 1982, v. 23, № 22, p. 2257—2260.
16. *Kamimura T., Tsuchia M., Koura K., Sekine M., Hata T.* Tetrahedron Lett., 1983, v. 24, № 27, p. 2775—2778.
17. *Berkner K. L., Folk W. R. J.* Biol. Chem., 1977, v. 252, № 10, p. 3176—3184.
18. *Maxam A. M., Gilbert W.* Meth. Enzymol., 1980, v. 65, p. 498—560.
19. *Katritzky A. R. J.* Chem. Soc., 1956, p. 2404—2408.
20. *Nefkens G. H. L.* Nature, 1962, v. 193, № 4819, p. 974—979.
21. *Gisin B. F.* Anal. chim. acta, 1972, v. 58, № 1, p. 248—249.
22. *Барам Г. И., Грачев С. А.* Биооргани. химия, 1985, т. 11, № 10, с. 1420—1422.

Поступила в редакцию
16.XII.1985.

SYNTHESIS OF 5'-PHOSPHORYLATED OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDES BY PHOSPHOTRIESTER SOLID PHASE METHOD IN MANUAL AND AUTOMATED VARIANTS

GORN V. V., ZARYTOVA V. F., POTYOMKIN G. A.*, SREDIN Yu. G.*,
POLISHCHUK A. S.*

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

**Special Design Technological Bureau of Electronics and Analytical
Engineering, Siberian Branch of the Academy of Sciences
of the USSR, Novosibirsk*

38 oligodeoxyribonucleotides with 5'-phosphate group have been synthesized by manual and automated phosphotriester solid phase procedures. At all condensation steps, including the last one, only nucleotide building blocks of the same type were used, namely mononucleotides in automated variant and dinucleotides in manual one. These compounds contained 5'-phosphate group protected with β -cyanoethyl and *p*-chlorophenyl residues. A mixture of triisopropylbenzenesulphonyl chloride with *N*-methylimidazole or 4-*N,N*-dimethylaminopyridine *N*-oxide was used as a coupling reagent. *p*-Chlorophenyl groups were removed by tetrabutylammonium fluoride.