



УДК 571.113.6 : 542.95

## ОПТИМИЗАЦИЯ ЗАГРУЖЕННОСТИ СИЛИКАТНЫХ НОСИТЕЛЕЙ ДЛЯ ТВЕРДОФАЗНОГО СИНТЕЗА ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ

*Карышев Н. Н., Артамонова Т. П., Попов С. Г.*

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

Предложен эмпирический метод определения оптимальной загруженности силикатных носителей. Для синтеза олигонуклеотидов длиной около 30 звеньев предлагается использовать носители на основе силикагелей и пористых стекол с содержанием закрепленного нуклеозида не более 0,4 мкмоль/м<sup>2</sup>.

Недавние успехи в области химии нуклеотидов, сделавшие вполне доступными для экспериментаторов полимеры длиной 30 и более оснований [1—6], связаны в основном с использованием различных методик твердофазного синтеза. Возможным направлением повышения эффективности этих методик может быть и совершенствование применяемых носителей [7, 8]. Например, считается, что увеличение содержания закрепленного нуклеозида снижает выход на стадии конденсации по причине стерических препятствий [8, 9], однако какие-либо попытки обоснованной количественной оценки оптимальной загрузки носителей нам неизвестны.

В данной работе мы предлагаем метод определения оптимальной загруженности силикатных носителей, при которой обеспечивается высокая эффективность синтеза олигонуклеотидов длиной около 30 оснований и практическое отсутствие в реакционных смесях более коротких последовательностей.

Для синтеза олигонуклеотидов нами было приготовлено на основе силикагеля и пористого стекла несколько носителей, имеющих различное содержание закрепленного нуклеозида (табл. 1). Их получение путем

Таблица 1

Характеристики использованных носителей для твердофазного синтеза

Носитель	Основа	Присоединенный нуклеозид	Удельная поверхность, м <sup>2</sup> /г	Удельная загрузка, мкмоль/г	Плотность загрузки, мкмоль/м <sup>2</sup>
(1)	C-20	T	20 *	16	0,80
(2)	C-80	T	80 *	68	0,85
(3)	CPG-250	A	96 **	104	1,07
(4)	C-80	G	80 *	14	0,18
(5)	CPG-250	G	96 **	30	0,31

\* Номинальная поверхность в соответствии с торговым наименованием.

\*\* Паспортные данные для используемой основы твердофазного носителя.

введения аминопропилсукцинатной якорной группы осуществлялось стандартными методами [10—12]. Синтезированные с использованием полученных ранее нуклеозид-3'-мстоксифосфоморфолидитов [10] полинуклеотиды (табл. 2) выделяли из реакционных смесей с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ без удаления 5'-концевой диметокситритильной защитной группы (способ А) или с помощью анионообменной хроматографии после полного деблокирования (способ Б). В обоих случаях деблокированный продукт

Принятые сокращения: THF — тетрагидрофуран. Префикс «d» (дезокс) в формулах нуклеотидов для краткости опущен.

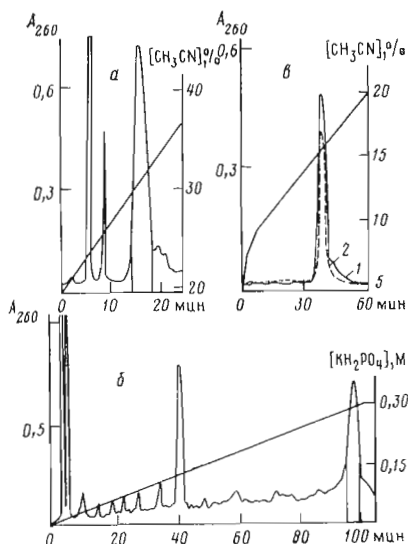


Рис. 1

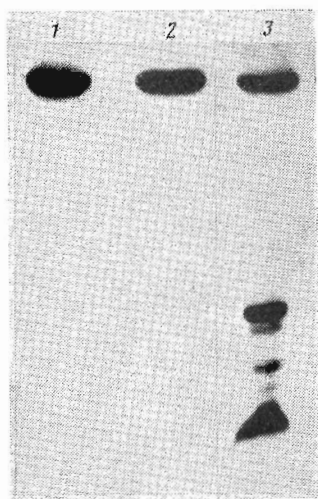


Рис. 2

Рис. 1. Выделение полинуклеотида (I) при помощи ВЭЖХ. На колонку (3,2 × 250 мм) одновременно наносили половину всей реакционной смеси (~100 ОЕ<sub>260</sub>). *а* — способ А: обращенно-фазовая хроматография 5'-диметокситриэтиламированного полинуклеотида (I). Градиент ацетонитрила (20 → 40%) в 0,1 М триэтиламмоний-ацетатном буфере (рН 7,0). Скорость элюции 1,0 мл/мин. *б* — способ Б: ионообменная ВЭЖХ полностью деблокированной реакционной смеси после синтеза полинуклеотида (I). Градиент концентрации КН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub> в фосфатном буфере (рН 6,5) с 30% ацетонитрила. Скорость элюции 2,0 мл/мин. *в* — рехроматография очищенного способа А (кривая 1) и Б (кривая 2) полинуклеотида (I) на обращенной фазе в 0,05 М триэтиламмоний-ацетатном буфере (рН 6,5) в градиенте ацетонитрила (5 → 20%). Скорость элюции 1,0 мл/мин

Рис. 2. Электрофорез в 20% ПААГ полинуклеотида (I), очищенного способом А (1) и способом Б (2). Полностью деблокированная исходная реакционная смесь (3)

рехроматографировали на обращенной фазе (рис. 1). Чистоту выделенных полинуклеотидов (I)–(V) проверяли при помощи электрофореза в ПААГ (рис. 2), их структуру подтверждали по методу Максама — Гилберта (рис. 3) [13].

Ход синтеза контролировали по поглощению, обусловленному (MeO)<sub>2</sub>Tг-катионом, после удаления 5'-защитной группы. При этом было обнаружено, что для носителей (1)–(3) с высокой плотностью загрузки наименьшие выходы на стадии конденсации отмечаются с 1-го по 15-й цикл. Это падение отражено на электрофореграммах и ионообменных хроматограммах (рис. 1, 2). Определенную информацию дал анализ изменения плотности

Таблица 2

Данные по синтезу и выделению полинуклеотидов

Номер соединения	Полинуклеотид	Число звеньев	Носитель *	Выход, % (способ выделения)	Выход по (MeO) <sub>2</sub> Tг-катиону, % (средний на стадии, %)
(I)	GT <sub>2</sub> A <sub>3</sub> TCTAGCTCA <sub>3</sub> CC <sub>1</sub> A <sub>5</sub> CT <sub>3</sub> CACT	32	(1)	5,0 (А) 4,6 (Б)	11 (93)
(II)	T <sub>10</sub> C <sub>2</sub> AT <sub>16</sub>	29	(2)	6,1 (А)	15 (93)
(III)	TCGAGAGCC <sub>3</sub> GC <sub>2</sub> TA <sub>2</sub> TGAGCG <sub>3</sub> CT <sub>8</sub> A	34	(3)	0,9 (А)	11 (93)
(IV)	AGCT <sub>2</sub> A <sub>8</sub> GC <sub>3</sub> GCTCAT <sub>2</sub> AG <sub>2</sub> CG <sub>3</sub> CTG	34	(4)	2,0 (А)	56 (98)
(V)	TA <sub>2</sub> CA <sub>2</sub> TAGAGACT <sub>2</sub> A <sub>2</sub> TCAGCA <sub>2</sub> TATCTAG	32	(5)	6,4 (А)	46 (97)

\* Независимо от удельной загрузки носителя (см. табл. 1) в синтез брали по 100 мг носителя.

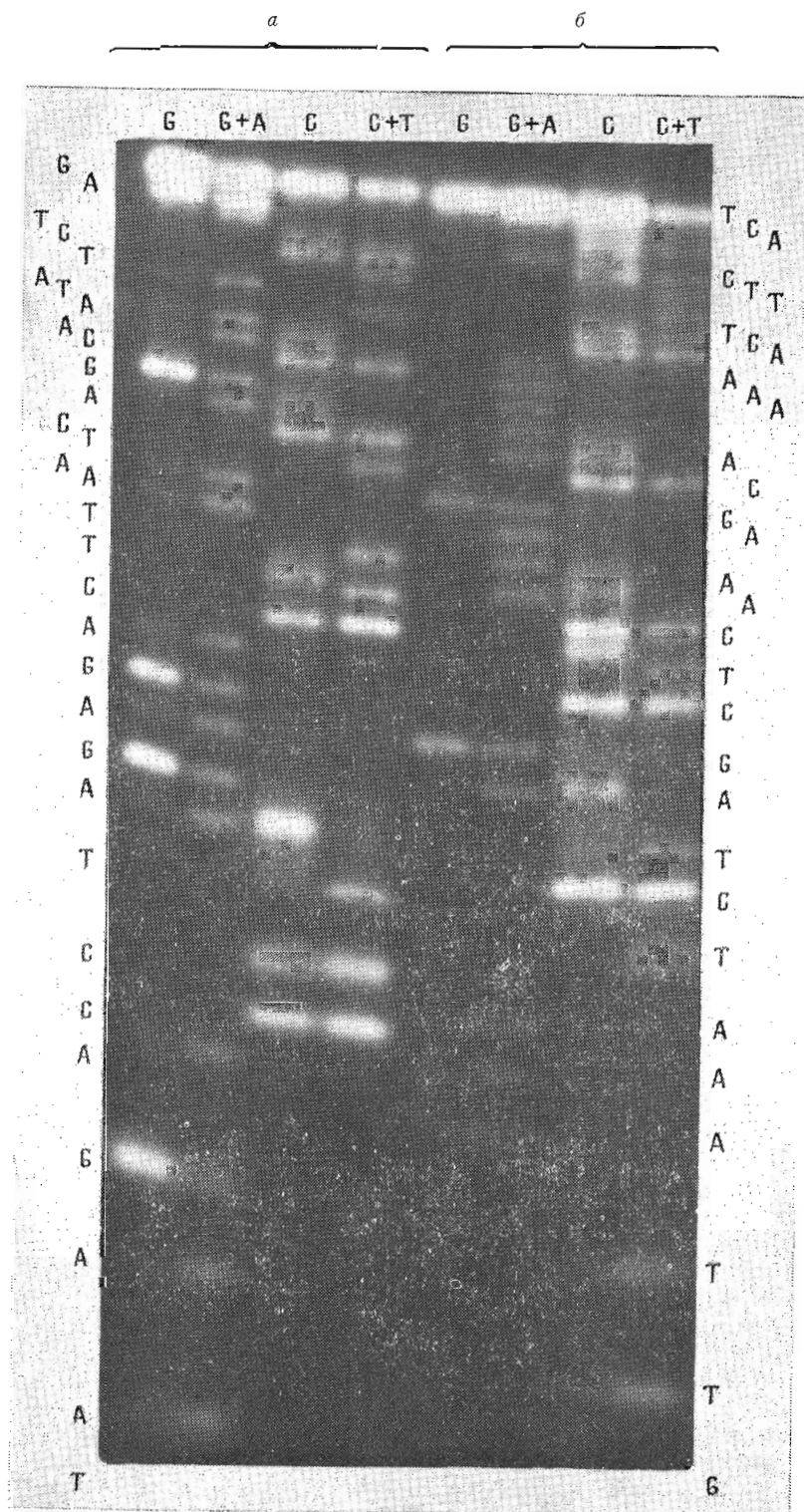


Рис. 3. Анализ нуклеотидной последовательности 32-членных полинуклеотидов (V) (а) и (I) (б) по методу Максама — Гилберта

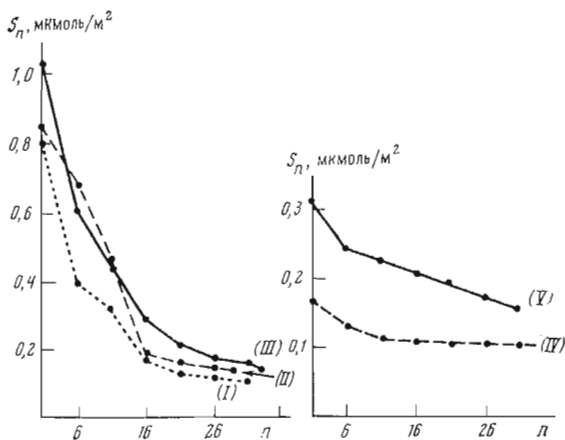


Рис. 4. Кривые зависимостей  $S_n = f(n)$  (см. текст). Цифры рядом с кривыми соответствуют номеру синтезированного полинуклеотида (I) — (V)

покрытия поверхности растущими цепями. Под растущими мы подразумеваем здесь олигонуклеотидные цепи на носителе, которые не кэпированы, т. е. способны взаимодействовать с нуклеотидным компонентом и давать вклад в поглощение, обусловленное  $(\text{MeO})_2\text{Tг}$ -катионом, после проведения конденсации. Значения плотности покрытия поверхности растущими цепями  $S_n$  (рис. 4) получали по формуле

$$S_n = S_1 \frac{A_n}{A_1},$$

где  $S_1$  — исходная плотность покрытия поверхности, мкмоль/м<sup>2</sup>;  $n$  — порядковый номер нуклеозида в цепи, начиная с 3'-конца;  $A_1, A_n$  — поглощение  $(\text{MeO})_2\text{Tг}$ -катиона (498 нм) при детритилировании 1-го и  $n$ -го нуклеозидов цепи соответственно.

Из рис. 4а видно, что при  $n > 16$  падение  $S_n$  значительно замедляется и в дальнейшем средний выход на цикл по  $(\text{MeO})_2\text{Tг}$ -катиону близок к количественному. Линейная экстраполяция этих ( $n > 16$ ) участков зависимости на ось ординат позволяет предположить, что для носителей с  $S_1$  менее 0,4 мкмоль/м<sup>2</sup> высокая эффективность конденсации будет характерна на протяжении всего синтеза. Найденная таким образом желаемая величина исходной плотности покрытия поверхности отражает, по-видимому, оптимальную концентрацию полимерных цепей, при которой они не создают препятствий друг другу при росте. Подобное истолкование этой величины содержит допущение, что условия роста цепей существенно не зависят от их длины, т. е. на начальных стадиях синтеза не действуют дополнительные факторы отбора.

Носители с низкой плотностью загрузки ((4) и (5), табл.1) мы получили по обычной методике [11] путем сокращения времени привязки нуклеозида. Как можно видеть из рис. 4б, их свойства вполне соответствуют ожидаемым — конечный выход синтезированных на них олигомеров (IV) и (V) по  $(\text{MeO})_2\text{Tг}$ -катиону на исходный нуклеозид близок к 50%. Кроме того, характер кривых (рис. 4б) отражает, видимо, наличие дополнительных факторов обрыва цепей на ранних стадиях, поскольку наибольшее падение выхода имеет место при  $n < 6$ . Таким фактором может быть, например, наличие микропор с размерами, почти на порядок меньшими номинальных для данного типа силикагеля или пористого стекла. Кроме того, определенное влияние, вероятно, оказывает близость силикатной поверхности, экранирующей и дезактивирующей (за счет частичной сорбции) 5'-гидроксильные группы цепей. Тем не менее падение на участке  $n < 6$  для носителей (4) и (5) составляет не более 30% исходной загрузки. Вероятно, при желании избежать этого эффективным окажутся более длинные спейсерные группы [7], однако обрыв некоторого

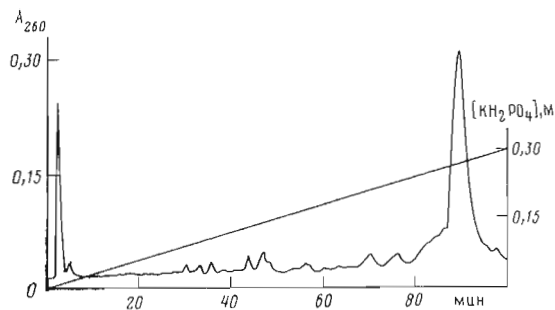


Рис. 5. Ионообменная ВЭЖХ полностью деблокированной реакционной смеси после синтеза полинуклеотида (V). На колонку нанесено 50  $\text{OE}_{260}$ . Условия хроматографии даны в пояснении к рис. 16

количества цепей на самых ранних стадиях синтеза достаточно длинных олигомеров не представит, по нашему мнению, дополнительных осложнений при выделении целевого продукта. Мало вероятно также, что короткие фрагменты ( $n < 6$ ) могут помешать дальнейшему использованию и неочищенных тридекамеров, например при лигазной сшивке. Следовательно, при определении оптимальной величины  $S_1$  дополнительными факторами обрыва цепей, действующими на начальных стадиях, вполне можно пренебречь.

К сожалению, отсутствует какая-либо корреляция между исходной загруженностью носителя и выходом очищенных олигонуклеотидов (табл. 2). Однако последний во многом обусловлен особенностями строения олигомеров [8] и отражает потери при деблокировании и хроматографической очистке [10, 12]. Значительное расхождение между выходом по  $(\text{MeO})_2\text{Tг}$ -катиону и реальным выходом очищенного продукта отмечается во многих работах по твердофазному синтезу и до сих пор не имеет убедительного объяснения. В то же время измерение поглощения  $(\text{MeO})_2\text{Tг}$ -катиона как способ количественной оценки хода синтеза подвергается сомнению, поскольку отражает не только основную реакцию образования межнуклеотидной связи, но и возможные побочные реакции [1]. Тем не менее как анализ многочисленных литературных данных, так и наш собственный опыт позволяют утверждать, что высокий выход по данному параметру соответствует, как правило, и высокой гомогенности реакционных смесей. К тому же достижение максимально высокого выхода по  $(\text{MeO})_2\text{Tг}$ -катиону не является главной нашей целью. Основным практическим результатом при использовании носителей с низкой плотностью загрузки следует считать возможность получения исключительно чистых реакционных смесей, содержащих в основном целевой олигонуклеотид и минимальное количество более коротких последовательностей (см. рис. 5)\*. Это облегчит, а в некоторых случаях и вообще может сделать ненужными традиционные процедуры хроматографической очистки или препаративного электрофореза.

Может возникнуть подозрение, что характер изменения  $S_n$  (рис. 4а) в случае синтеза полинуклеотидов (I)—(III) на носителях с высокой плотностью загрузки (1)—(3) является следствием недостатка нуклеозид-фосфита при конденсации. Тогда выход на этой стадии будет низок до тех пор, пока отношение нуклеозидного (растущая цепь) и нуклеотидного (морфолиднит) компонентов не упадет до величины  $\sim 1 : 30$ , соответствующей носителям с  $S_1 \leq 0,3$   $\mu\text{моль}/\text{м}^2$ . С целью показать, что и в случае носителей с самой высокой плотностью загрузки используемого избытка морфолиднита вполне достаточно, мы провели на носителе (3) (табл. 1) два модельных синтеза нонамера  $(\text{Ap})_8\text{A}$ . Первый синтез осуществляли так же, как и синтез полинуклеотидов (I)—(V), но без экпирования; второй —

\* Данная реакционная смесь практически гомогенна при электрофорезе в ПААГ, как и смесь после синтеза полинуклеотида (IV).

с 2-кратной конденсацией по методу [14]: на каждом цикле после конденсации носитель отмывали и снова добавляли свежий раствор нуклеотидного компонента. Часть реакционноспособных 3'-гидроксильных групп на носителе, не прореагировавших за первую конденсацию, должна была бы прореагировать за вторую, и общая картина синтеза изменилась бы в сторону увеличения выхода  $(Ar)_nA$ . Однако этого не произошло: хроматограммы обеих реакционных смесей полностью совпадали.

Следовательно, причиной ускоренного падения  $S_n$  у носителей с высокой плотностью загрузки является не недостаток нуклеозидфосфита в реакционной смеси, а, как и предполагали ранее [8, 9], стерические препятствия.

Хотя кривые изменения плотности покрытия поверхности  $S_n = f(n)$  оказались весьма схожими для довольно различных видов силикатных носителей (что отражает, вероятно, сходство механизмов обрыва растущих цепей), вряд ли следует считать определенный нами верхний предел оптимальной загрузки универсальным для носителей любого типа. Однако для систем, отличающихся по размеру пор или каким-то другим существенным признакам от использованных нами силикагелей или пористых стекол, но также содержащих закрепленный нуклеозид в приповерхностном слое, легко можно оценить желаемую величину  $S_1$  на основании данных по динамике синтеза всего одного достаточно длинного олигомера.

В настоящее время обычны задачи, заключающиеся в получении олигонуклеотидов длиной около 30 оснований в количестве от нескольких  $OE_{260}$  до нескольких десятков  $OE_{260}$ . Наличие эффективных методик твердофазного синтеза в принципе позволяет решать эти задачи достаточно быстро, однако препаративное выделение полученных олигомеров часто требует значительного времени. Мы полагаем, что использование силикатных носителей с оптимальной загрузкой может в заметной степени упростить, а в некоторых случаях и вообще сделать излишними процедуры очистки синтезированных полинуклеотидов.

### Экспериментальная часть

Спектрофотометрические измерения проводили на приборе Perkin — Elmer 550 (ФРГ). ВЭЖХ осуществляли на хроматографе Altex-322 (США) в колонках размером  $3,2 \times 250$  мм; обращенно-фазовую на Lichrosorb RP-18 (Merck, ФРГ), ионообменную — на отечественном сорбенте Силохром С-80, модифицированном полиэтиленгликолем [15]. Требования к растворителям и реагентам, получение 5'-диметокситриэтилнуклеозид-3'-метоксифосфоморфолидитов и способ их хранения в процессе синтеза подробно описаны в предыдущей работе [10]. Носители (1)—(3) на основе пористого стекла СРГ-250<sup>®</sup> (Serva, ФРГ) и силикагелей Силохром С-20 и С-80 получали в соответствии с методикой [11]. Для приготовления носителей (4) и (5) (табл. 1) время привязки нуклеозидов с помощью ДСС сокращали до 8 ч. Синтез полинуклеотидов (1)—(V) осуществляли в колонке ( $8 \times 60$  мм), снабженной с обоих концов полипропиленовыми пористыми фильтрами. Забор реагентов и промывку носителя осуществляли при помощи шприцев различного объема в соответствии с методом [16]. Скорость промывки  $\sim 10$  мл/мин.

*Описание синтетического цикла.* Навеску носителя в колонке промывали последовательно 5 мл 5% раствора трихлоруксусной кислоты в дихлорэтаноле, 5 мл хлороформа, 5 мл ацетонитрила, 2 мл ТНФ и 5 мл пентана. Сушили 1 мин в токе аргона, добавляли смесь 0,4 мл 0,2 М раствора морфолидита в ацетонитриле и 0,4 мл насыщенного при 20° С раствора оксидбензотриазола в ТНФ. Встряхивали 3 мин, промывали 3 мл ТНФ, обрабатывали 2 мин кэпирующей смесью (1 мл 0,1 М раствора 4-диметиламинопиридина в смеси ТНФ — лутидин — уксусный ангидрид, 12 : 6 : 3). Промывали 3 мл ТНФ, проводили окисление (1 мин) 0,2 М раствором иода в смеси ТНФ — лутидин — вода, 2 : 2 : 1. Отмывали ацетонитрилом до исчезновения бурой окраски носителя (5—10 мл) и 5 мл хлороформа. Цикл повторяли необходимое число раз. Через каждые пять циклов раствор трихлоруксусной кислоты после детритилирования анализировали на содержание  $(MeO)_2Tr$ -катиона. По окончании синтеза для очистки по способу А носитель обрабатывали 1 ч смесью диоксан — триэтиламин — тиофенол, 2 : 1 : 1, затем концентрированным водным аммиаком (16 ч, 50° С), отфильтровывали, фильтрат упаривали. Из остатка выделяли

обращенно-фазовой ВЭЖХ 5'-диметокситритилированный полинуклеотид, обрабатывали 1 ч 2 мл 80% уксусной кислоты и рехроматографировали на этой же колонке (рис. 1а, в). Для очистки по способу В реакционную смесь после обработки аммиаком упаривали и обрабатывали 80% уксусной кислотой (1 ч, 20°С), упаривали, остаток разделяли при помощи анионообменной ВЭЖХ и рехроматографировали на обращенной фазе (рис. 1б, в).

Синтез нонаденилата (Ap)<sub>8</sub> А проводили на носителе (З) (табл. 1) аналогично получению полинуклеотидов (I)–(V), но без кэпирования. При синтезе с 2-кратной конденсацией после удаления фосфитилирующей смеси носитель отмывали последовательно 5 мл ацетонитрила, 2 мл ТНФ, 5 мл пентана, сушили 1 мин током аргона и добавляли на 3 мин свежую фосфитилирующую смесь такого же состава. Дальнейшую обработку проводили так же, как и при синтезе олигомеров (I)–(V).

Авторы выражают благодарность С. И. Ястребову за помощь при проведении ВЭЖХ и анализе структуры олигонуклеотидов, А. Н. Болдыреву — за участие в изготовлении фотографий.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Rink H., Liersch M., Sieber P., Meyer F. Nucl. Acids Res., 1984, v. 12, № 16, p. 6369–6387.
2. Engels J., Leineveler M., Uhlmann E. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1984, v. 23, № 12, p. 961–963.
3. Urdea M. S., Merryweater J. P., Mullenbach G. T., Coit D., Heberlein U., Valenzuela P., Barr P. J. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1983, v. 80, № 12, p. 7461–7465.
4. 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.
5. Добрынин В. Н., Филиппов С. А., Быстров Н. С., Северцова И. В., Колосов М. Н. Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 5, с. 706–710.
6. Josephson S., Lagerholm E., Palm G. Acta chem. scand., 1984, v. B38, № 7, p. 539–545.
7. Ломакин А. И., Ястребов С. И., Попов С. Г. Биоорган. химия, 1986, т. 12, № 2, с. 213–219.
8. Minganti G., Ganesh K. N., Sproat B. S., Gait M. J. Anal. Biochem., 1985, v. 147, № 1, p. 63–74.
9. Marugg J. E., Piel N., McLaughlin L. W., Tromp M., Veeneman G. H., van der Marel G. A., van Boom J. H. Nucl. Acids Res., 1984, v. 12, № 22, p. 8639–8651.
10. Карпышев П. Н., Ястребов С. И., Попов С. Г. Биоорган. химия, 1985, т. 11, № 10, с. 1361–1366.
11. Matteucci M. D., Caruthers M. H. J. Amer. Chem. Soc., 1981, v. 103, № 11, p. 3185–3194.
12. Chow F., Kempe T., Palm G. Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, № 12, p. 2807–2817.
13. Maram A. M., Gilbert W. Meth. Enzymol., 1980, v. 65, p. 499–559.
14. Moore M. E., Beaucage S. L. J. Org. Chem., 1985, v. 50, № 12, p. 2019–2055.
15. А. с. 1153976 (СССР). Способ получения сорбента/Ястребов С. И. Заявл. 08.XII.83.— Оpubл. в Б. И., 1985, № 17, с. 28.
16. Seliger H., Scalfi C., Eisenbeiss F. Tetrahedron Lett., 1983, v. 24, № 45, p. 4963–4966.

Поступила в редакцию  
8.I.1986

#### OPTIMIZATION OF THE SILICATE CARRIER FUNCTIONALIZATION IN SOLID-PHASE OLIGODEOXYNUCLEOTIDE SYNTHESIS

KARPYSHEV N. N., ARTAMONOVA T. P., POPOV S. G.

All-Union Research Institute of Molecular Biology, Kolt'sovo,  
Novosibirsk Region

An empirical approach for determining optimal functionalization of silicate carriers is proposed. The supports on the basis of silica gels and pore glasses bearing not more than 0,4  $\mu\text{mole}/\text{m}^2$  of attached nucleoside are recommended for synthesis of about 30-base-long oligonucleotides.