



УДК 577.113.6 : 542.95

АВТОМАТИЧЕСКИЙ И ПОЛУАВТОМАТИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ
ПОЛИДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДОВ ДИИЗОПРОПИЛФОСФАМИДИТНЫМ
МЕТОДОМ

*Кумарев В. П., Колочева Т. И., Мотовилова И. П.,
Потемкин Г. А.*, Средин Ю. Г.**

Институт цитологии и генетики СО Академии наук СССР, Новосибирск;

** Специальное конструкторско-технологическое бюро специальной электроники
и аналитического приборостроения, Новосибирск*

В настоящее время наиболее перспективным методом синтеза олигодезоксирибонуклеотидов является фосфитный метод на твердофазном носителе [1, 2] в полуавтоматическом и автоматическом режимах [3].

В СКТБ специальной электроники и аналитического приборостроения СО АН СССР совместно с Институтом цитологии и генетики СО АН СССР разработаны полуавтоматический и автоматический синтезаторы «Ген-1» и «Ген-1М». Эти синтезаторы отличаются простотой конструкции. Объемы реакционного контура и подводящих коммуникаций в синтезаторах типа «Ген» минимизированы, что позволяет расходовать минимальные количества мономера (5—10 мкмоль на один цикл). Мы синтезировали около 100 олигонуклеотидов длиной от 8 до 48 мономерных звеньев. Полученные олигонуклеотиды использовались в качестве полилинкера [4], затравок [5, 6], а также для создания ряда синтетических генов.

Полуавтоматический синтезатор состоит из четырех стеклянных реакторов объемом 50—60 мкл, в которых параллельно можно синтезировать четыре различных олигонуклеотида. Конденсирующую смесь вводили шприцем на 200—250 мкл. Основное отличие автоматического синтезатора с одной реакционной колонкой состоит в автоматизированной подаче конденсирующей смеси попеременным дозированием растворов тетразола (500 мкл), нуклеозидфосфамидита (100 мкл), вновь тетразола (100 мкл). В качестве резервуаров для растворителей и реагентов использовали стеклянные банки с герметичными крышками с входным и выходным отводами. На входе подавался аргон, на выходе, через титановые фильтры, — растворители и реагенты под давлением аргона 1 атм со скоростью 4—5 мл/мин.

Управление работой синтезатора осуществлялось с помощью программатора, который обеспечивал синтез олигонуклеотидов длиной не более 15 звеньев. Для более длинных олигонуклеотидов была необходима перезапись программы.

В качестве носителей для олигонуклеотидного синтеза использовали СРГ 350-1400 (Serva, ФРГ), Silipor 015-075 (Chemapol, ЧССР), силохром С3 и С80 (СССР). Пришивку первого нуклеозида к силикагелю проводили двумя способами. Первый из них состоял в синтезе и последующем присоединении к аминогруппе силикагеля *n*-нитрофенилового эфира 3'-глутарата нуклеозида [7]. Во втором случае аминопропилсиликагель модифицировали глутаровым ангидридом и проводили конденсацию с 5'-диметокситритил-*N*-ацилнуклеозидом в присутствии 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлорида и *N*-метилмидазола [8]. Емкость полученных носителей по нуклеозиду составила 10—100 мкмоль/г.

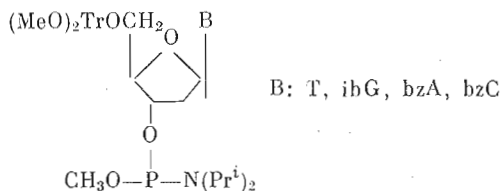
Защищенные *N,N*-диизопропилфосфамидиты нуклеозидов были синтезированы по методике [9]. Полученный продукт упаривали до образования пены, которую отмывали пентаном. Характеристики по данным тонкослойной хроматографии и ³¹P-ЯМР-спектров совпадали с литератур-

Общая схема операций для одного цикла синтеза

Операция	Растворители и реагенты	Время, с
Конденсация	100 мкл 0,1 М 5'-диметокситритилнуклеозидфосфамидита в CH ₃ CN, 100 мкл 0,5 М тетразола в CH ₃ CN	60
Промывка	CH ₃ CN	10
Кеипирование	CH ₃ CN/MeIm (4:1) смесь 1:1	10
	CH ₃ CN/Ac ₂ O (4:1)	10
Циркуляция	Те же условия	30
Кеипирование	Те же условия	10
Циркуляция	Те же условия	30
Промывка	CHCl ₃	30
Окисление	1% I ₂ в пиридин/AcOH (9:1)	10
Промывка	CHCl ₃	60
»	CH ₃ CN	10
Детритилирование	0,1 М CF ₃ COOH в CHCl ₃	20
Промывка	CHCl ₃	30
»	CH ₃ CN	60

* Для кеипирования не вступивших в реакцию конденсации 5'-гидроксильных групп в реактор одновременно подавали растворы MeIm и Ac₂O и проводили циркуляцию этой ацилирующей смеси в реакторе. Чтобы кеипирование было эффективнее, эту операцию повторяли.

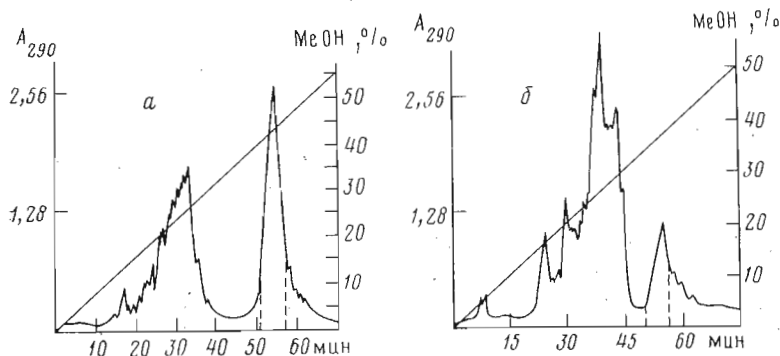
ными [9]:



Общая схема операций для одного цикла синтеза как на автоматическом, так и на полуавтоматическом синтезаторах представлена в таблице. Продолжительность цикла составила 370 с.

Деметилирование проводили раствором триэтиламмонийтиофенолята в диоксане прямо на носителе в течение 60 мин. Синтезированные олигонуклеотиды удаляли с носителя и деблокировали концентрированным аммиаком при 65° С (12—15 ч) [1, 2].

Деблокированные олигонуклеотиды с 5'-(MeO)₂Tr-группой выделяли обращенно-фазовой высокоэффективной хроматографией на колонках (4,6 × 250 мм) с Nucleosil C3 на хроматографе Du Pont (США) (рисунок). Ди-



Обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография реакционных смесей, содержащих N- и P-деблокированные 5'-(MeO)₂Tr-олигонуклеотиды длиной 24 (a) и 48 (b) мономерных звеньев в градиенте концентрации MeOH в 0,05 М LiClO₄ и 0,005 М LiOAc, pH 6. Скорость элюции 1 мл/мин. a — d (AATTTCATGTGTTATTGTTAAGGAG), синтезирован в полуавтоматическом режиме; б — d (GATAGGACGACCCATGTGACGTGTGGAACATCATGTCCCTATAGTGCT), синтезирован в автоматическом режиме

метокситритильную защиту снимали 80% уксусной кислотой (30—45 мин). Детритилированные продукты дополнительно очищали при необходимости обращенно-фазовой хроматографией, а более длинные олигонуклеотиды выделяли электрофорезом в денатурирующем полиакриламидном геле. Выход чистого продукта (5—60 ОЕ₂₆₀, 5—70% от суммарного снятого с носителя материала по записи профиля элюции на интеграторе SP 4100) зависел как от длины синтезированного олигонуклеотида, так и от емкости носителя. Первичная структура олигонуклеотидов подтверждена методом Максама — Гилберта [10] сразу после выделения или же после молекулярного клонирования.

Таким образом, сконструированные нами синтезаторы «Ген-1» и «Ген-1М» позволяют быстро и с высокой эффективностью получать олигонуклеотиды в количествах, достаточных для молекулярно-биологических и генно-инженерных работ, и по своим техническим параметрам не уступают лучшим зарубежным моделям.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Matteucci M. D., Caruthers M. H.* J. Amer. Chem. Soc., 1981, v. 103, № 11, p. 3185—3191.
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. *Warner B. D., Warner M. E., Karns G. A., Ku L., Brown-Shimer S., Urdea M. S.* DNA, 1984, v. 3, № 5, p. 401—411.
4. *Кузнецов К. Д., Колочева Т. И., Ривкин М. И., Кумарев В. П.* Биоорг. химия, 1986, т. 12, № 6, с. 842—844.
5. *Овчинников Ю. А., Свердлов Е. Д., Царев С. А., Арсенян С. Г., Розлина Т. О., Чижиков В. Е., Петров Н. А., Приходько Г. Г., Блинов В. Л., Василенко С. К., Сандахчиев Л. С., Кусов Ю. Ю., Грабко В. И., Флеер Г. П., Балаян М. С., Дроздов С. Г.* Докл. АН СССР, 1985, т. 285, № 4, с. 1014—1018.
6. *Овчинников Ю. А., Арсенян С. Г., Броуде Н. Е., Петрухин К. Е., Гришин А. В., Алданова Н. А., Арзамасова Н. М., Аристархова Е. А., Мелков А. М., Смирнов Ю. В., Гурьев С. О., Монастырская Г. С., Модянов Н. Н.* Докл. АН СССР, 1985, т. 285, № 6, с. 1490—1495.
7. *Adams S. P., Kavka K. S., Wykes E. J., Holder S. B., Galluppi G. F.* J. Amer. Chem. Soc., 1983, v. 105, p. 661.
8. *Ефимов В. А., Бурякова А. А., Реввердатто С. В., Чахмахчиева О. Г.* Биоорг. химия, 1983, т. 9, № 10, с. 1367—1381.
9. *Varone A. D., Tang J.-Y., Caruthers M. H.* Nucl. Acids Res., 1984, v. 12, № 10, p. 4051—4060.
10. *Maxam A. M., Gilbert W.* Meth. Enzymol., 1980, v. 65, p. 499—560.

Поступило в редакцию
3.1.1986

AUTOMATIC AND SEMIAUTOMATIC SYNTHESIS OF POLYDEOXYNUCLEOTIDES BY DIISOPROPYLPHOSPHAMIDITE METHOD

KUMAREV V. P., KOLOCHEVA T. I., MOTOVILOVA I. P., POTEMKIN G. A.*,
SREDIN Yu. G.*

*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk; *Special Design and Technology Bureau of Electronics and Analytical Instrument-making, Novosibirsk*

About 100 oligonucleotides up to 48-mer have been synthesized using automatic and semiautomatic phosphoramidite method. The synthesized oligonucleotides were utilized as probes, primers and also for preparation of synthetic genes. The syntheses have been performed with the aid of semiautomatic synthesizer «Gene-1» and automatic «Gene-1M», the synthesizer work being controlled by a computer.