



УДК 577.113.6:542.953

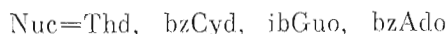
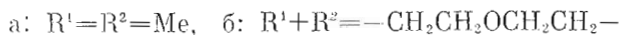
ТВЕРДОФАЗНЫЙ СИНТЕЗ ПОЛИ- И ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НЕОЧИЩЕННЫХ МОРФОЛИДИТОВ *

Карышев Н. Н., Данилюк Н. К., Попов С. Г.

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

Препараты 5'-диметокситриптинуклеозид-3'-метоксифосфоморфолидитов получены по простой методике без хроматографической очистки или пересадки. Эффективность этих препаратов после длительного хранения продемонстрирована на примере их использования в синтезе олигонуклеотидов длиной 52 и 18 оснований.

Благодаря недавним достижениям в синтезе олигонуклеотидов доступными для молекулярно-биологических исследований стали фрагменты длиной 30–60 оснований [1–5]. Использование таких полинуклеотидов не только уменьшает трудоемкость сборки генетических элементов, но и позволяет решать некоторые специфические задачи, например вводить множественные мутации при олигонуклеотиднаправленном мутагенезе [5]. В принципе возможно получение полинуклеотидов традиционным и хорошо отработанным фосфотриэфирным блочным синтезом в растворе [4], но трудоемкость такого подхода не может способствовать его широкому распространению. Более удобен синтез на твердом носителе, позволяющий наращивать цепь как мономерными единицами, так и их блоками, однако для парботки блоков требуется значительное время и высокая квалификация персонала. С нашей точки зрения, перспективен подход, согласно которому используются мономеры, но максимально упрощается и удешевляется процедура их получения. Это позволяет с минимальными затратами использовать при наращивании цепи большие концентрации нуклеотидного (находящегося в растворе) компонента для достижения высокого выхода. Удобен, например, метод получения амидитов, соединяющий простоту операций при синтезе и отсутствие хроматографической очистки или пересадки с возможностью хранения полученных мономеров [1]. По этому методу исходные мономеры — диметиламидиты (IIIa) получали реакцией N,5'-O-защищенных нуклеозидов (I) с I экв. фосфорилирующего реагента (IIa) в тетрагидрофуране в присутствии этилдиизопропиламина (схема). После отделения осадка хлоргидрата аммина и замены растворителя на ацетонитрил 3'-фосфоамидиты (IIIa) использовались в синтезе. Авторы отмечают высокую стабильность полученных препаратов, обусловленную, по их мнению, примесью этилдиизопропиламина.



Наша практика использования полученных аналогичным образом морфолидитов (IIIб) в основном подтверждает литературные данные [1]. Единственным недостатком этой методики, на наш взгляд, является не-

* Префикс «d» (дезоксн) для краткости всюду опущен.

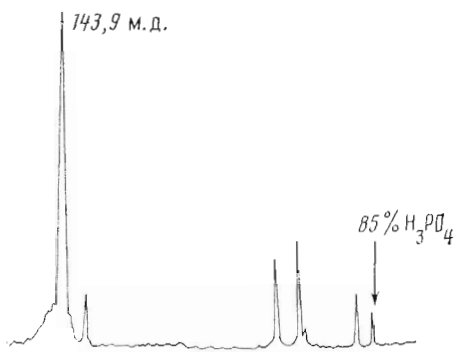


Рис. 1. Спектр ^{31}P -ЯМР 5'-диметокситритил - N^2 -изобутирил-2'-дезоксигуанозин-3'-метоксифосфоморфолидита (IIIб, Nuc-ibGuo), хранившегося 150 сут при -10°C

их инактивацией за срок менее 30 сут. Мы связываем это с неполным отделением хлоридрата амина. В случае производного гуанозина (IIIб, Nuc-ibGuo), например, осадок хлоридрата или же выпадает вообще, или выпадает в незначительном количестве, несмотря на полное превращение (I) в (IIIб) по данным ТСХ. Именно эти препараты инактивировались быстрее и чаще препаратов других морфолидитов.

Мы предлагаем получать амидиты типа (IIIб) аналогично работе [1], но с последующей водной обработкой реакционной массы. Такая обработка полностью разрушает непрореагировавший (IIб) и способствует количественному отделению хлоридрата амина. В данном случае возможно использование избытка фосфорилирующего реагента (IIб), что дает методу определенный запас надежности и гарантирует полное превращение нуклеозидов (I) в морфолидиты (IIIб). По данным ^{31}P -ЯМР, такие препараты и после 6 мес. хранения содержат ~ 60 – 80% основного вещества с хим. сдвигом ~ 145 м.д. (ср. [1]), а также некоторое количество продуктов окисления и гидролиза, имеющих хим. сдвиги ~ 0 м.д. (рис. 1). Последние соединения, скорее всего, не оказывают существенного влияния на образование межнуклеотидной связи [1]. Эффективность полученных нами препаратов после длительного хранения доказывается успешным синтезом 52-мера TCGACTAGATATTGCTGATTAAGTCTCTAGGTCTT-AAGTCAAAGTTTTTGCT (IV).

В предыдущей работе [6] для активации хроматографически очищенных морфолидитов нами использовались как тетразол, так и оксибензотриазол. Однако в случае препаратов (IIIб), содержащих, вероятно, остаточный этилдинзопропиламин, тетразол оказался малоактивным: по данным, основанным на измерении поглощения диметокситритилкатиона, реакция конденсации на твердой фазе заканчивалась не ранее чем за 30–40 мин. Однако в присутствии оксибензотриазола реакция конденсации, как и ранее [6], полностью завершалась за 3 мин. Полинуклеотид (IV) мы получали на твердофазном носителе на основе крупнопористого (2000 Å) стекла в проточной колонке. Рабочая концентрация морфолидитов (IIIб) в процессе конденсации (после смешения с раствором оксибензотриазола) составляла 0,1 М (суммарная концентрация по диметокситритилкатиону, включающая продукты гидролиза и окисления). Полинуклеотид (IV) после снятия с носителя и деблокирования выделяли по методу [3] — обращенно-фазовой хроматографией реакционной смеси с сохраненной концевой диметокситритильной группой (рис. 2). Чистоту выделенного полинуклеотида после детритилирования подтверждали электрофорезом в БЛАГ (рис. 3); радиоавтограф анализа соединения (IV) по методу Максама — Гилберта [7] приведен ранее [8].

Высокая рабочая концентрация морфолидитов (IIIб), 0,1 М, взята нами в основном как дополнительная гарантия от их инактивации в процессе длительного синтеза, поскольку препараты в условиях комнатной темпе-

обходимость точного соблюдения эквивалентности реагентов (I) и (II). Небольшая случайная передозировка фосфорилирующего агента резко снижает в дальнейшем выход при последующей конденсации, поскольку остающийся в растворе хлорфосфит (II) — более активный конкурент амидитов (III) за нуклеофильные центры. Недостаток же реагента (II) также приводит к уменьшению выхода при конденсации, но уже из-за неполного превращения нуклеозидов (I) в амидиты (III). Кроме того, хранение растворов морфолидитов (IIIб), полученных нами по аналогии с обсуждаемой методикой [1], при -10°C часто сопровождалось

Рис. 2. Выделение 52-мера (IV). *a* — обращенно-фазовая ВЭЖХ полинуклеотида с 5'-концевой диметоксигруппой в 0,1 М триэтиламмоний-ацетатном буфере (рН 7,0) с линейным градиентом ацетонитрила. На колонку нанесена треть всей реакционной массы — ~60 ОЕ₂₆₀; скорость элюции 1 мл/мин. *б* — рехромаатография полностью деблокированного полимера (IV) на той же колонке в 0,05 М триэтиламмоний-ацетатном буфере (рН 6,5) с градиентом ацетонитрила; скорость элюции 1,5 мл/мин. В обоих случаях (*a*, *б*) хроматографировали при 20° С

Рис. 3. Анализ 5'-³²P-фосфорилированного полинуклеотида (IV) электрофорезом в 20% ПААГ: 1 — очищенный продукт (IV), 2 — синтетический маркер (цифра слева — длина нуклеотидов), 3 — исходная реакционная смесь

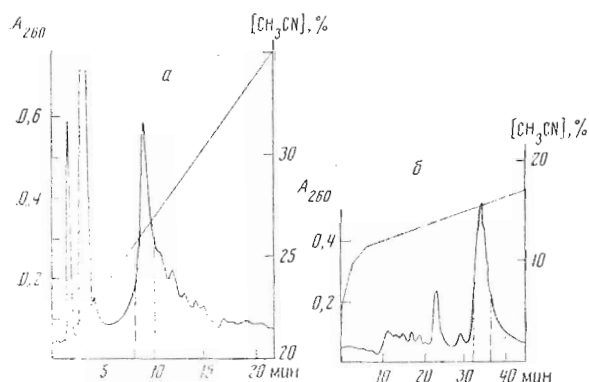


Рис. 2

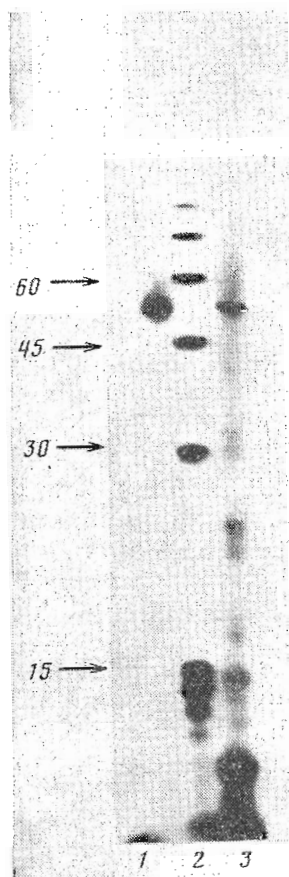


Рис. 3

ратуры подвергаются повышенному риску окисления и гидролиза при отборе аликвот. Более простые синтетические задачи легко могут быть решены и при использовании вдвое меньшей, 0,05 М, концентрации морфолидитов (IIIб), как видно на примере синтеза сравнительно короткого олигонуклеотида AGCTTACAAGATTGGGAA (V). Этот октадекамер получили по простой «шприцевой» методике [6] и выделили при помощи ионообменной ВЭЖХ (рис. 4). Электрофореграмма анализа соединения (V) недавно предложенным модифицированным методом Максама — Гилберта [9, 10] приведена на рис. 5.

Экспериментальная часть

Спектры ³¹P-ЯМР снимали на спектрометре WP-80 с фурье-преобразованием на ЭВМ В-NC28 (Bruker-Physik AG, ФРГ) на частоте 32,37 МГц в CD₃CN при концентрации вещества 0,2 М; сдвиг приведен относительно 85% H₃PO₄ как внешнего стандарта. Спектрофотометрические измерения проводили на приборе Perkin — Elmer 550 (ФРГ). ВЭЖХ осуществляли на хроматографе Altex 332 (США) в колонках размером 3,2×250 мм: обращенно-фазовую — на Lichrosorb RP18 (Merck, ФРГ), ионообменную — на отечественном силикагеле Силохром С-80, модифицированном полиэтиленгликолем [8, 11]. Требования к растворителям и вспомогательным реагентам и способ их хранения в процессе синтеза подробно описаны ранее [6]. Носитель для синтеза олигомера (V) на основе силикагеля Силохром С-80, модифицированного аминопропилсульфинатными якорными группами, получали по [12]. Содержание первого нуклеозида составляло 48 мкмоль/г. Носитель для синтеза полинуклеотида (IV), полученный по методу [12] на основе лористого стекла СРG-200 (Electro-Nucleonics, США) и содержащий 32 мкмоль/г нуклеозида, любезно предоставлен А. Н. Сивяковым (ВНИИ молекулярной биологии). Синтез полимера (IV) осуществляли в проточной колонке (8×60 мм), снабженной с обоих концов полипропиленовыми пористыми фильтрами. Взятие реагентов и промывку носителя осуществляли при помощи шприцев [13], скорость промывки ~10 мл/мин. Синтез олигонуклеотида (V) осуществляли в шприце емкостью 2 мл в соответствии с работой [6].

Рис. 4. Выделение олигомера (V) ионообменной ВЭЖХ в линейном градиенте калий-фосфатного буфера (рН 6,5) с 30% ацетонитрила. Скорость элюции 1,5 мл/мин, на колонку нанесено 10 ОЕ₂₆₀ реакционной смеси

Рис. 5. Анализ нуклеотидной последовательности олигомера (V) модифицированным методом Максама — Гилберта [10]

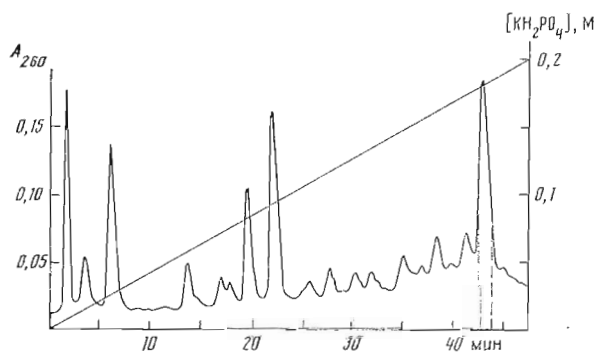


Рис. 4

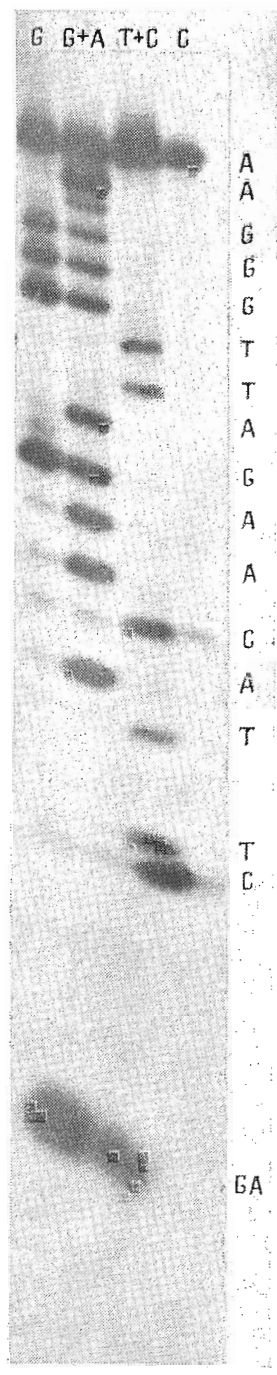


Рис. 5

5' - Диметокситритилнуклеозид - 3'- метоксифосфоморфолидаты (IIIб). К перемешиваемому при 20°С раствору 6 ммоль 5'-диметокситритилнуклеозида (I) в 60 мл тетрагидрофурана и 3 мл этилдиизопропиламина добавляли за 1 мин смесь 1,3 мл (9 ммоль) метоксихлорфосфоморфолидита (IIб) и 0,7 мл этилдиизопропиламина. Перемешивали 1,5 ч, осадок отфильтровывали, к фильтрату добавляли 25 мл 2% NaHCO₃. Через 2 мин смесь экстрагировали 300 мл бензола, органический слой высушивали Na₂SO₄ и упаривали. Остаток упаривали с толуолом (2×40 мл), растворяли в 30 мл ацетонитрила и выдерживали 48 ч над ситами 3А при 4°С. Полученные растворы амидитов (IIIб) фильтровали и хранили в запаян-

ных ампулах по 2—4 мл при -10°C . R_f 0,4—0,5 в системе хлороформ — этилацетат — триэтиламин, 45 : 45 : 10, на силикагеле Н (ср. [6]).

Полинуклеотид (IV). В колонку помещали 50 мг носителя, промывали последовательно 5 мл 5% раствора трихлоруксусной кислоты в дихлорэтане, 5 мл хлороформа, 5 мл тетрагидрофурана и 5 мл пентана. Сушили 2 мин в токе сухого аргона, добавляли 0,4 мл полученного ($\sim 0,2\text{ M}$) раствора требующего амидита (IIIб) и 0,4 мл насыщенного при 20°C раствора оксинезотриазола в тетрагидрофуране. Перемешивали 3 мин, промывали 2 мл тетрагидрофурана и добавляли 1 мл 0,1 M раствора диметил-аминопиридина в смеси тетрагидрофуран — 2,6-лутидин — уксусный ангидрид, 12 : 6 : 3. Перемешивали 2 мин, промывали 2 мл тетрагидрофурана, окисляли 30 с 0,2 M раствором иода в смеси лутидин — тетрагидрофуран — H_2O , 2 : 2 : 1. Носитель отмывали 5 мл ацетонитрила и 2 мл хлороформа. Цикл повторяли до завершения синтеза. Носитель с полинуклеотидом, содержащим концевую диметокситригильную группу, обрабатывали 45 мин смесью тиофенол — триэтиламин — диоксан (1 : 1 : 2), отмывали диоксаном (5×1 мл), ацетонитрилом (5×1 мл), сушили током воздуха и оставляли на 18 ч при 50°C в 2 мл 20% NH_4OH . Раствор отделяли, упаривали, хроматографировали (рис. 2а). Отобранную фракцию упаривали, растворяли в 2 мл 80% уксусной кислоты, выдерживали 1 ч при 20°C , упаривали и рехроматографировали (рис. 2б). Выход 6 ОЕ₂₆₀ (0,7 %).

Олигонуклеотид (V) получали в шприце по методике [6] с использованием растворов морфolidитов (IIIб), но вдвое разбавленных ацетонитрилом. После выделения методом ионообменной хроматографии (рис. 4) и обессоливания с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ [6] выход на основе 100 мг твердофазного носителя составил 48 ОЕ₂₆₀ (5 %).

Для синтеза олигомера (V) использованы морфolidиты (IIIб), хранившиеся 3 мес. при -10°C , для синтеза полимера (IV) — хранившиеся 6 мес при той же температуре.

Авторы благодарят С. Е. Олькина за снятие спектров ^{31}P -ЯМР, С. И. Ястребова и Т. П. Артамонову за помощь в анализе синтезированных олигонуклеотидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Josephson S., Legerholm E., Paim G. Acta chem. scand., 1984, v. B38, № 7, p. 539—545.
2. Urdea M. S., Merryweather 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.
3. Rink H., Liersch M., Sieber P., Meyer F. Nucl. Acids Res., 1984, v. 12, № 16, p. 6369—6387.
4. Efimov V. A., Burgakova A. A., Reverdatto S. V., Chakhmakhcheva O. G., Ovchinnikov Yu. A. Nucl. Acids Res., 1983, v. 11, № 23, p. 8369—8387.
5. Carter P., Bedouelle H., Winter G. Nucl. Acids Res., 1985, v. 13, № 12, p. 4431—4443.
6. Карпышев Н. Н., Ястребов С. И., Попов С. Г. Биооргани. химия, 1985, т. 11, № 10, с. 1361—1366.
7. Mazam A. M., Gilbert W. Meth. Enzymol., 1980, v. 25, p. 499—560.
8. Ястребов С. И., Попов С. Г. Биооргани. химия, 1986, т. 12, № 5, с. 661—669.
9. Барам Г. И., Грачев С. А. Биооргани. химия, 1985, т. 11, № 10, с. 1420—1422.
10. Данилюк Н. К., Ястребов С. И., Артамонова Т. П., Попов С. Г. Биооргани. химия, 1986, т. 12, № 9, с. 1185—1188.
11. А. с. 1153976 (СССР). Способ получения сорбента/Ястребов С. И. Заявл. 08.12.83, № 8670634. Оpubл. в Б. И., 1985, № 17, с. 28.
12. Ломакин А. И., Ястребов С. И., Попов С. Г. Биооргани. химия, 1985, т. 11, № 7, с. 920—926.
13. Seliger H., Scalji C., Eisenbeiss F. Tetrahedron Lett., 1983, v. 24, № 45, p. 4963—4966.

Поступила в редакцию 10.VI.1986

THE SOLID-PHASE SYNTHESIS OF POLY- AND OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDE BASED ON UNPURIFIED MORPHOLIDITES

KARPYSHEV N. N., DANILJUK N. K., PCPOV S. G.

All-Union Research Institute of Molecular Biology, Koltsovo, Novosibirsk Region

The 5'-dimethoxytritylnucleoside 3'-methoxyphosphomorpholidites have been obtained by a simple procedure without any chromatographic or reprecipitation steps. The effectivity of these preparations after long-time storage was demonstrated in the synthesis of oligonucleotides 52 and 18 bases long.