



УДК 577.113.6:577.336 + 547.963.32.057

СИНТЕЗ ПРОИЗВОДНЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ,
СОДЕРЖАЩИХ NH₂- И SH-ГРУППЫ, НА ПОЛИМЕРНОМ
НОСИТЕЛЕ. ВВЕДЕНИЕ СПИНОВЫХ, ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ
И ДРУГИХ МЕТОК

Бацур: О. С., Зарытова В. Ф., Левина А. С.

Новосибирский институт биоорганической химии
Сибирского отделения Академии наук СССР

Для введения NH₂- и SH-групп в олигонуклеотиды, синтезированные твердофазным амидофосфитным методом, использованы реакции моно- и диалкилфосфитов (Н-фосфонатов). Н-Фосфонаты олигонуклеотидов получены при фосфорилировании с помощью PCl₃, салицилхлорфосфита или MeOPCl₂. К аминогруппам полученных производных присоединены остатки N-(2-оксиэтил)феназиния и флуоресцеина; SH-производное дезатимидилата использовано для введения в него спиновой метки.

Для решения задач молекулярной биологии и биохимии наряду с синтетическими олигонуклеотидами представляют интерес их различные производные, например олигонуклеотиды, содержащие флуоресцентные, спиновые и другие метки. Как правило, эти метки вводят в олигонуклеотиды через спейсеры, содержащие NH₂- или SH-группы.

В последнее время в литературе появляется много работ, описывающих удобные методы модификации олигонуклеотидов, синтезированных на полимерных носителях. Для этой цели с наибольшим успехом используются производные трехвалентного фосфора общей формулы (RO)(R'O)P—N<, где R — защитная группа, R' — радикал, содержащий защищенную NH₂- или SH-группу [1—4]. Недостатком существующих методов является необходимость предварительного синтеза фосфорилирующего реагента для каждой конкретной цели.

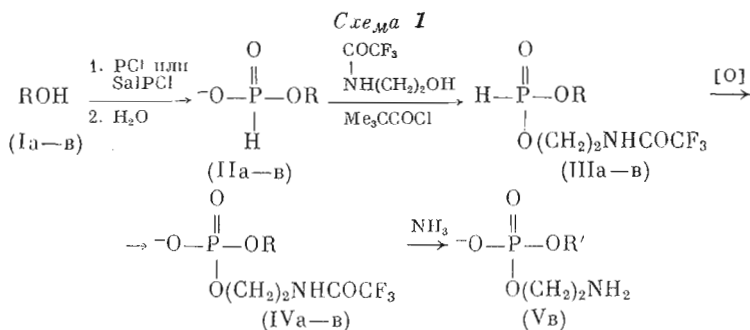
В настоящей работе описывается метод введения в олигонуклеотид нуклеофильных групп (SH и NH₂), не требующий синтеза специальных реагентов. Он основан на использовании реакций моно- и диалкилфосфитов (Н-фосфонатов), которые легко получаются при фосфорилировании 5'-гидроксигрупп защищенного олигонуклеотида, связанного с полимером (продукта твердофазного фосфитамидного синтеза), с помощью PCl₃ (или салицилхлорфосфита, SalPCl [5]) и MeOPCl₂ соответственно.

Аминопроизводные олигонуклеотидов получали на полимере по схеме 1, используя реакцию Н-фосфонатов (IV) с оксикомпонентом в присутствии пивалоилхлорида, предложенную недавно для синтеза олигонуклеотидов [6, 7].

После завершения синтеза фосфитамидным методом [8] и деблокирования 5'-ОН-группы олигонуклеотид (IV) фосфорилировали с помощью PCl₃ или салицилхлорфосфита и после гидролиза получали гидрофосфорильное производное (IV).

Возможность введения N-защищенного аминоэтанола в Н-фосфонат (II) предварительно была показана на примере производных (IIа) и (IIб) с помощью метода ³¹P-ЯМР (см. таблицу).

Сокращения: SalPCl — салицилхлорфосфит, Phn — остаток N-(2-оксиэтил)феназиния, Flu — остаток флуоресцеина, Py — пиридин. Префикс d в обозначении дезоксирибозеолигонуклеотидов опущен.



а) R = (Tr)Г—

б) R = —T(Ac)

в) R = защищенный олигонуклеотид, присоединенный к полимеру, R' = деблокированный олигонуклеотид, удаленный с полимера. Соединения (IVa, б) аммиаком не обрабатывались.

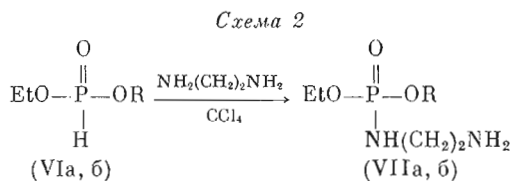
Было показано, что при взаимодействии монозамещенного фосфита (IIa) (Рy-соль, $\delta = 3,5$ м.д., $J_{\text{P-H}} = 620$ Гц) с N-защищенным аминокэтанолом (1 экв.) в присутствии пивалоилхлорида (5 экв.) в пиридине в течение 1—2 мин образуется дизамещенный фосфит (IIIa) (химические сдвиги диастереомеров: $\delta_1 = 8,6$ м.д., $\delta_2 = 8,5$ м.д.; $J_{\text{P-H}} = 710$ Гц), который окисляется иодом до соответствующего фосфата (IVa) ($\delta = -0,95$ м.д.) Доказательством структуры аминокпроизводного (IIIa), кроме значений химических сдвигов (таблица), которые согласуются с литературными данными [6, 7], служит характерная константа спин-спиновой взаимодействия $J_{\text{P-H}}$, а также окрашивание продукта (IIIa) нингидрином. Аналогичные превращения были осуществлены для фосфита (IIб) (таблица).

Рассмотренная реакция была использована для получения аминокпроизводных олигонуклеотидов на полимерном носителе. Дизамещенные фосфиты (IIIв) окисляли на полимере до соответствующих фосфатов (IVв) с помощью раствора иода в смеси пиридин — уксусная кислота [8] или по реакции Тодда — Атертона в присутствии CCl_4 , H_2O и Et_3N [9]. После окисления проводили деблокирование и удаление олигонуклеотидов с полимера обработкой аммиаком.

Таким образом были получены 5'-аминопроизводные олигонуклеотидов TrGrGrGrGrU и T(pT)₉prU (Vв) с выходами 53 и 80% соответственно. Выходы продуктов (Vв) были определены после выделения ионообменной хроматографией (рис. 1) по отношению к немодифицированным олигонуклеотидам с 5'-ОН-группой.

Описанный выше метод с использованием пивалоилхлорида позволяет получать аминокпроизводные олигонуклеотидов, в которых спейсер присоединен к олигомеру прочной фосфоэфирной связью. В некоторых случаях может оказаться целесообразным присоединение спейсерной группы через фосфамидную связь, лабильную в кислой среде.

Для получения фосфамидных производных олигонуклеотидов была использована реакция окислительного фосфорилирования по Тодду — Атертону, заключающаяся во взаимодействии диалкилфосфитов с аминами в присутствии CCl_4 [11, 12]. Эта реакция отличается легкостью превращения, отсутствием побочных продуктов (схема 2):



а) R = (Tr)Г—

б) R = —T(Ac)

При добавлении к дизамещенному фосфиту (VIб) ($\delta_1 = 8,7$ м.д., $\delta_2 = 7,6$ м.д., $J_{\text{P-H}} = 710$ Гц) смеси этилендиамина (5 экв.) и CCl_4 (5 экв.)

Значения химических сдвигов ^{31}P -ЯМР и констант спин-спинового взаимодействия исследуемых соединений

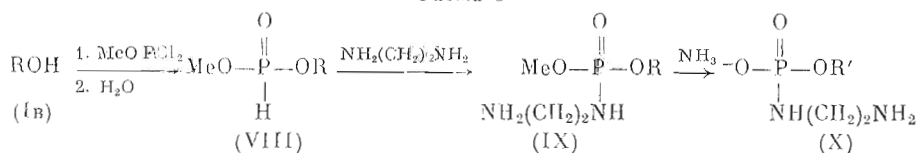
Соединение	Номер соединения	δ , м. д.	$J_{\text{P-H}}$, Гц
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{H}-\text{P}-\text{O}-\text{T}(\text{Ac}) \\ \\ \text{O}^--\text{HPRy} \end{array}$	(IIб)	3,4	620
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ (\text{Tr})\text{T}-\text{O}-\text{P}-\text{H} \\ \\ \text{O}^--\text{HPRy} \end{array}$	(IIа)	3,5	620
$\begin{array}{c} \text{CF}_3\text{CO} \quad \text{O} \\ \quad \quad \\ \text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{T}(\text{Ac}) \\ \\ \text{H} \end{array}$	(IIIб)	10,3; 9,1	710
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ (\text{Tr})\text{T}-\text{O}-\text{P}-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH} \\ \quad \quad \quad \\ \text{H} \quad \quad \quad \text{COCF}_3 \end{array}$	(IIIа)	8,6; 8,5	710
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{EtO}-\text{P}-\text{O}-\text{T}(\text{Ac}) \\ \\ \text{H} \end{array}$	(VIб)	8,7; 7,6	710
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ (\text{Tr})\text{T}-\text{O}-\text{P}-\text{OEt} \\ \\ \text{H} \end{array}$	(VIа)	6,4; 6,5	710
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{EtO}-\text{P}-\text{O}-\text{T}(\text{Ac}) \\ \\ \text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2 \end{array}$	(VIIб)	10,8; 10,5	
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ (\text{Tr})\text{T}-\text{O}-\text{P}-\text{OEt} \\ \\ \text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2 \end{array}$	(VIIа)	11,0*	

* Усредненное положение сигналов диастереомеров.

в спектре ^{31}P -ЯМР уже через 2—3 мин не наблюдается сигнала исходного соединения и регистрируются два сигнала, соответствующие диастереомерам продукта (VIIб) с хим. сдвигами 10,8 и 10,5 м.д., характерными для фосфамидов [13] (таблица).

При синтезе фосфамидных олигонуклеотидных производных мы использовали в качестве фосфорилирующего агента MeOPCl_2 (схема 3):

Схема 3



R — защищенный олигонуклеотид, присоединенный к полимеру,
R' — деблокированный олигонуклеотид, удаленный с полимера.

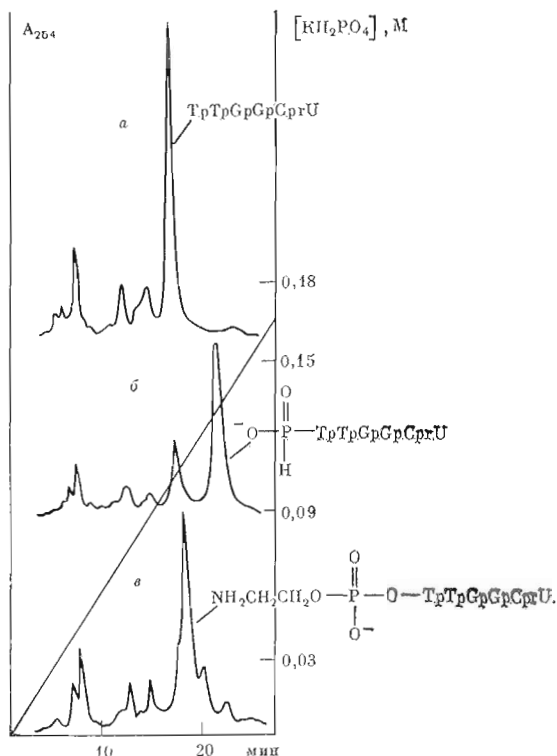


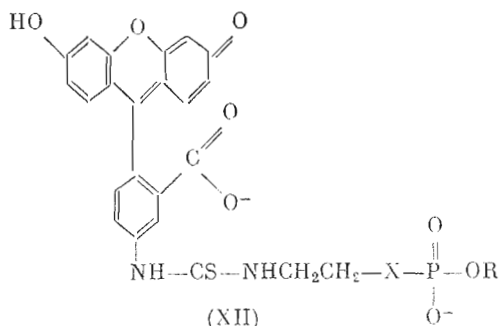
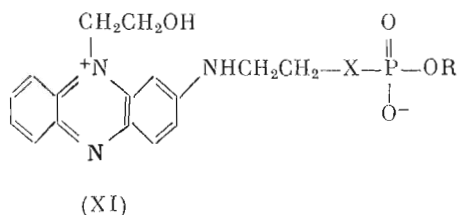
Рис. 1. Ионнообменная хроматография продуктов: после синтеза TrpTrpGpGpCprU (а), после фосфорилирования TrpTrpGpGpCprU с помощью PCl_3 (б), после синтеза

$\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{P}(\text{O})_2\text{O}-\text{TrpTrpGpGpCprU}$ (в). Условия хроматографии: колонка (4,6 × × 250 мм) с полисиллом-СА [10], градиент KH_2PO_3 (0—0,3 М), рН 6,5, в 30% ацетонитриле, скорость элюции 3 мл/мин

По схеме 3 были получены 5'-аминопроизводные олигонуклеотидов TrpTrpGpGpCprU и $\text{T}(\text{pT})_3\text{prU}$ (X) с выходами 50 и 62% соответственно.

Наличие аминогруппы в олигонуклеотидах типа (Vв, X), как отмечалось выше, позволяет легко получать их различные производные. В литературе описано введение биотиновых и флуоресцентных меток в молекулы олигонуклеотидов [1, 4]. В настоящей работе были получены производные (XIа, б), содержащие остатки N-(2-оксиэтил)феназиния, наличие которых, как показано в работе [14], увеличивает стабильность комплементарных комплексов.

Были получены также производные олигонуклеотидов, содержащие остатки флуоресцеина (XIIа, б):



а) $\text{X}=\text{O}$ или NH , $\text{R}=\text{TrpTrpGpGpCprU}$;

б) $\text{X}=\text{O}$ или NH , $\text{R}=\text{T}(\text{pT})_3\text{prU}$.

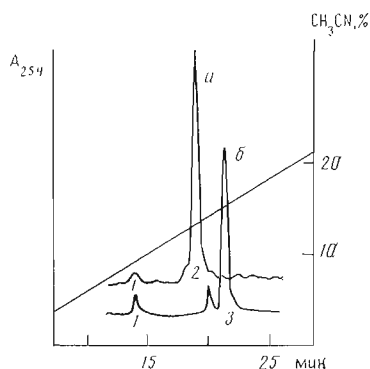


Рис. 2

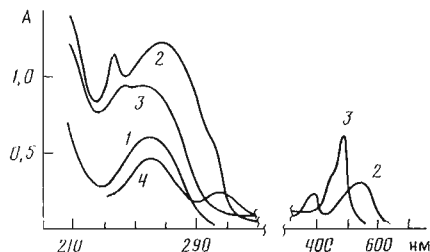


Рис. 3

Рис. 2. Обращенно-фазовая хроматография реакционных смесей, полученных при взаимодействии $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{O}^-)-\text{OTrTrGrGrCprU}$ с хлоридом N-(2-оксиэтил)феназия

(a) и с флуоресцеинизотиоцианатом (б). $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{O}^-)-\text{OTrTrGrGrCprU}$ (1),

$\text{Phn}-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{O}^-)-\text{OTrTrGrGrCprU}$ (X Ia) (2), $\text{Flu}-\text{NHCSNHCH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{O}^-)-\text{OTrTrGrGrCprU}$ (X IIa) (3). Условия хроматографии: колонка (4,6×250 мм) со смесью Nucleosil 10C18, градиент концентрации ацетонитрила (0—30%) в 0,05 M LiClO_4 , скорость элюции 2 мл/мин

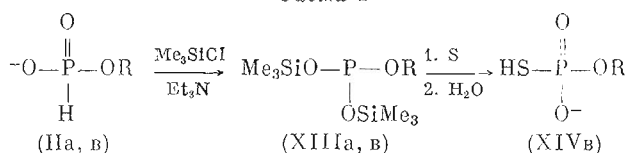
Рис. 3. Электронные спектры поглощения: TrTrGrGrCprU (1), (X Ia) — (2), (X IIa) — (3), (XVб) — (4)

Использование флуоресцентных олигонуклеотидных производных описано для анализа [15] и фотомодификации [16] нуклеиновых кислот.

Олигонуклеотиды с полиароматическими группировками выделяли обращенно-фазовой хроматографией. На рис. 2 в качестве примера приведены профили обращенно-фазовой хроматографии продуктов (X Ia) ($\text{X}=\text{O}$) и (X IIa) ($\text{X}=\text{O}$). Окрашенные продукты реакции элюируются при более высокой концентрации ацетонитрила по сравнению с немодифицированными олигонуклеотидами, что свидетельствует о повышении гидрофобности полученных соединений (рис. 2). Структура полученных соединений (X Ia, б) и (X IIa, б) была подтверждена электронными спектрами поглощения. Поглощение в видимой части спектра свидетельствует о присутствии остатков красителей в составе полученных продуктов (рис. 3).

Наличие гидрофосфорильной группы в олигонуклеотидах типа (IIв) обеспечивает многообразие превращений и позволяет получать кроме вышеупомянутых и другие производные олигонуклеотидов. В работе [17] из нуклеозид-Н-фосфонатов были получены нуклеозидтиофосфаты через бисилилфосфиты. Мы использовали этот подход для получения тиофосфатных производных олигонуклеотидов (схема 4):

Схема 4



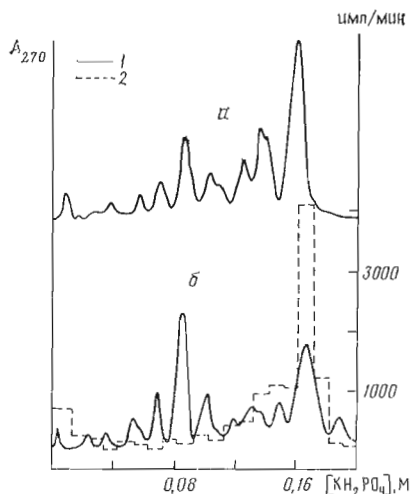
а) $\text{R}=(\text{Tr})\text{T}^-$

б) R = защищенный декагмидиат, присоединенный к полимеру.

Рис. 4. Микроколоночная ионообменная хроматография смесей,

содержащих $\text{-O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{P}-\text{OT}(\text{pT})_9$, полученный из (IIв) после деблокирования и удаления с полимера (а),

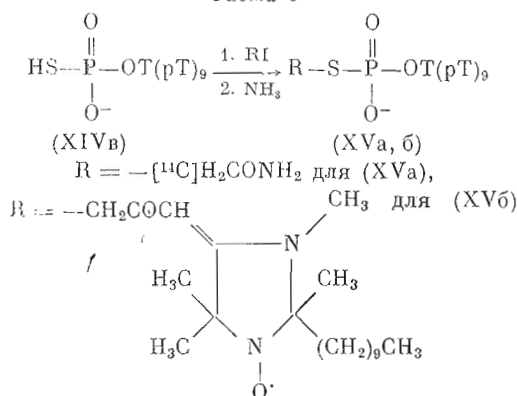
$\text{-O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{P}-\text{OT}(\text{pT})_9$ (XVa) (б). Условия хроматографии: колонка (2 × 50 мм) с полисиллом-СА, градиент KH_2PO_4 , рН 6,5, в 30% этаноле, скорость элюции 100 мкл/мин. Контроль по поглощению (1) и по радиоактивности (2)



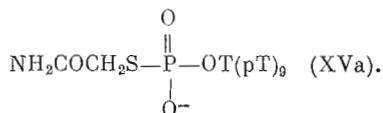
При обработке гидрофосфорильного производного (IIа) ($\delta = 3,5$ м.д.) смесью триметилхлорсилана (5 экв.) и триэтиламина (5 экв.) образуется соединение (XIIIа) с хим. сдвигом 117 м.д. [18]. Вероятно, соединение такого же типа (XIIIв) образуется и при силилировании олигонуклеотидного производного (IIв).

Силилированное производное (XIIIв) окисляли серой в абсолютном толуоле. Наличие SH-группы в полученном соединении (XIVв) было доказано по включению радиоактивной метки в продукт при обработке тиофосфатного производного (XIVв) иод ^{14}C ацетамидом (схема 5).

Схема 5



После деблокирования и удаления с полимера реакционную смесь, содержащую продукт (XVa), анализировали с помощью микроколоночной ионообменной хроматографии. Из рис. 4 видно, что максимум радиоактивности содержится в пике, соответствующем положению 10-зарядного соединения, как это должно быть в случае



SH-Производное декатимидилата (XIVв) было использовано для введения в него спиновой метки. Спин-меченые олигонуклеотиды могут найти широкое применение в молекулярно-биологических исследованиях, в частности могут быть использованы в экспериментах по изучению взаимодействия нуклеиновых кислот с клеточными мембранами.

При обработке 5'-тиофосфата (XIVв) реагентом RI (схема 5), содержащим нитроксильный радикал, и последующем удалении с полимера был получен продукт (XVб), выделенный ионообменной хроматографией.

При обращенно-фазовой хроматографии соединение (XVб) элюируется при гораздо большей концентрации ацетонитрила (42%), чем исходный олиготимидилат T(pT)₉ (10%), что свидетельствует о наличии в его составе гидрофобной группы. Спектр ЭПР полученного соединения (XVб) представляет собой триплет с константой сверхтонкого взаимодействия 14,8 Гс. Из УФ-спектра (рис. 3) видно, что продукт содержит олигонуклеотидный фрагмент ($\lambda_{\max} = 267$ нм) и нитрокислительный радикал ($\lambda_{\max} = 308$ нм).

Экспериментальная часть

В работе использовали (Tr)T, T(Ac), 5'-O-диметокситригил-N-ацилдезоксинуклеозиды, полученные в НИИХ СО АН СССР; 5'-O-диметокситригил-N-ацилдезоксинуклеозид-3'-метилдизопропиламинофосфиты, полученные по методу [8]; триэтиламин, перегнанный последовательно над NaOH, толуолсульфохлоридом, P₂O₅; этилендиамин, перегнанный над NaOH; PCl₃ и флуоресцеинизотиоцианат (Fluka, Швейцария); под [¹⁴C]ацетамид (Institute of Isotope, Budapest, Hungary), N-трифторацетиламиноэтанол, хлорид N-(2-оксиэтил)феназина, пивалоилхлорид, салицилхлорфосфит и 2-децил-2,3,5,5-тетраметил-4-(3-иод-2-оксипропилиден)имидазолидин-1-оксид, любезно предоставленные В. Н. Сильниковым, М. Н. Репковой (НИИХ СО АН СССР) и В. А. Резниковым (НИОХ СО АН СССР). Пиридин, ацетонитрил абсолютировали обычным образом и хранили над СаН₂.

Олигонуклеотиды синтезировали на полимере CPG-500 (Fluka, Швейцария) в соответствии с работой [8]; емкость полимера по первому нуклеозидному звену 40—60 мкмоль/г. Этил- и метилдихлорфосфиты получали в соответствии с работой [19]; этилфосфиты 5'-O-тригил- и 3'-O-ацетилтимидина (IVа, б) — в соответствии с [12]; Н-фосфонаты 5'-O-тригил- и 3'-O-ацетилтимидина (IIа, б) — по аналогии с работой [6], используя PCl₃ вместо смеси PCl₃ и триазола. Хим. сдвиги соединений (IIа, б) и (VIа, б) и константы J_{p-H} в спектрах ³¹P-ЯМР приведены в таблице.

Спектры ³¹P-ЯМР записывали на импульсном спектрометре НХ-90 (Bruker, ФРГ) на частоте 36,43 МГц. Условия записи спектров описаны в работе [12]. Для определения значений констант J_{p-H} спектры записывали без подавления спин-спинового взаимодействия ³¹P-{¹H}, в остальных случаях — с подавлением. Реакции, исследуемые методом ³¹P-ЯМР, проводили непосредственно в ампулах. Концентрация нуклеозидных производных 0,1 М.

Спектр ЭПР записывали на спектрометре ER-200D-SRC (Bruker, ФРГ) при комнатной температуре в капилляре объемом 20 мкл; мощность СВЧ-поля 62 мВ, амплитуда модуляции 0,8 Гс, усиление 2·10⁵, концентрация олигонуклеотидного производного 4·10⁻⁵ М. Электронные спектры поглощения записывали на спектрофотометре Spesord UV VIS (Carl Zeiss Jena, ГДР).

Деблокирование и удаление нуклеотидного материала с полимера проводили обработкой концентрированным аммиаком (50° С, 16 ч). Испообменную и обращенно-фазовую хроматографию осуществляли на хроматографе Altex (США), микроколоночную ионообменную хроматографию — на хроматографе «Мпихром».

Олигонуклеотидные производные на полимере получали в колонке со стеклянным фильтром.

Фосфорилирование олигонуклеотидов. Полимер с присоединенным 5'-деблокированным олигонуклеотидом (40—50 мг) промывали несколько раз абс. пиридином, систему заполняли аргоном; к полимеру добавляли 10—15 мкмоль фосфорилирующего агента (PCl₃, SalPCl₂ или MeOPCl₂) в 100 мкл абс. пиридина. Через 5 мин полимер промывали пиридином, проводили гидролиз, добавляя 100—200 мкл 1 М водного раствора бикарбоната триэтиламония (рН 8). Через 5 мин полимер промывали пиридином, ацетоном, эфиром и использовали для дальнейших превращений. Выходы на стадии фосфорилирования при использовании PCl₃ и SalPCl₂ определяли следующим образом. Навески полимера (4—5 мг) до и после фосфорилирования, содержащие соответственно олигонуклеотид с 5'-оксигруппой (IV) и олигонуклеотид с 5'-гидрофосфорильной группой (IVв), обрабатывали аммиаком для деблокирования и удаления нуклеотидного материала с полимера и проводили ионообменную хроматографию полученных смесей. Выходы определяли из соотношения оптического поглощения продуктов, например

TrTpGpGpCpгU и $\begin{array}{c} \text{O} \\ || \\ \text{-O-P-O} \\ | \\ \text{H} \end{array}$ TrTpGpGpCpгU (рис. 1а, б). При использовании

PCl₃ выходы на стадии фосфорилирования оказались равными 70 и 90% для производных TrTpGpGpCpгU и T(pT)₉rgU соответственно. При использовании SalPCl₂ гидрофосфорильное производное T(pT)₉ получено с выходом 96%. Выходы на стадии фосфорилирования при использовании MeOPCl₂ не определялись, так как образующиеся гидрофосфорильные производные типа (VIII) не стабильны при обработке аммиаком.

Получение аминокислотных олигонуклеотидов (Vв) и (X). А. Соединение (IVв) (схема 1). 40 мг полимера с присоединенным гидрофосфорильным производным олигонуклеотида (IVв) промывали несколько раз абс. пиридином, систему заполняли арго-

ном. Добавляли 20—30 мкмоль $\text{CF}_3\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ в 100 мкл абс. пиридина и 20—30 мкмоль пивалоилхлорида в 100 мкл абс. ацетонитрила. Через 5 мин полимер промывали пиридином и окисляли продукт (IIIв) либо смесью $\text{CCl}_4 - \text{Et}_3\text{N} - \text{H}_2\text{O} - \text{Pu}$ (8 : 1 : 8 : 30, по объему), либо 0,1 М раствором иода в смеси $\text{Pu} - \text{CH}_3\text{COOH}$ (9 : 1, по объему). Через 5—10 мин полимер промывали пиридином, ацетоном, эфиром.

Б. Соединение (IX) (схема 3). 40 мг полимера с присоединенным гидрофосфорильным производным олигонуклеотида (VIII) промывали несколько раз абс. пиридином, систему заполняли аргоном. К полимеру добавляли 10 мкмоль этилендиамина в 100 мкл абс. пиридина и 20 мкл CCl_4 . Через 5 мин полимер промывали пиридином, ацетоном, эфиром.

После обработки аммиаком продуктов (IVв) и (IX) (схемы 1 и 3) аминпроизводные олигонуклеотидов (Vв) и (X) выделяли ионообменной и обращенно-фазовой хроматографией. В качестве примера на рис. 1 приведены профили ионообменной хроматографии для производных гексануклеотида TrTrGpGpCpG . Условия хроматографии даны в подписях к рис. 1 и 2. Выходы продуктов (Vв) и (X) по отношению к немодифицированному олигонуклеотиду с 5'-ОН-группой, определенные после выделения ионообменной хроматографией, были равны 50—80%. Аминпроизводные олигонуклеотидов (Vв) и (X) после обращенно-фазовой хроматографии осаждали 2% раствором LiClO_4 в ацетоне.

Получение производных олигонуклеотидов, содержащих остатки N-(2-оксиэтил)феназина (XIa, б) и флуоресцеина (XIIa, б). Остаток N-(2-оксиэтил)феназина (Phn) присоединяли в соответствии с работой [14]. К 10 OE_{260} осажденного аминпроизводного олигонуклеотида (Vв) или (X) (см. выше) добавляли 1 мг хлорида N-(2-оксиэтил)феназина, растворенного в 40 мкл 0,2 М Na_2CO_3 . Через 10 мин реакционную смесь осаждали раствором 2% LiClO_4 в ацетоне, производные (XIa, б) отмывали от избытка красителя переосаждением (2—3 раза).

Реакции с флуоресцеинизотиоцианатом (Flu — NCS) осуществляли следующим образом: к 10 OE_{260} осажденного аминпроизводного олигонуклеотида (Vв) или (X) добавляли 1 мг Flu — NCS, растворенного в 40 мкл 0,2 М Na_2CO_3 , и выдерживали 1,5 ч при 56°С. Затем реакционную смесь осаждали 2% LiClO_4 в ацетоне, производные (XIIa, б) отмывали от избытка красителя переосаждением (2—3 раза).

Модифицированные олигонуклеотиды (XIa, б) и (XIIa, б) выделяли обращенно-фазовой хроматографией; выходы продуктов (XIa, б) и (XIIa, б) по отношению к соответствующим аминпроизводным (Vв) или (X), определенные по данным обращенно-фазовой хроматографии, составили 90% и выше. В качестве примера на рис. 2 приведены профили обращенно-фазовой хроматографии производных TrTrGpGpCpG (XIa) и (XIIa) ($X = \text{O}$), а на рис. 3 — электронные спектры поглощения этих же соединений. Аналогичные спектры имеют остальные производные (XIa, б) и (XIIa, б).

Получение тиопроизводных олигонуклеотидов и присоединение спиновой метки (соединение (XVб)). 20 мг полимера с присоединенным гидрофосфорильным производным декатимидилата (IVв) (схема 4) промывали абс. пиридином, добавляли смесь 4 мкл Et_3N и 3 мкл Me_3SiCl в 100 мкл абс. пиридина. Через 30 мин в реакционную смесь добавляли 200 мкл раствора порошкообразной серы (4,5 мг) в абс. толуоле. Реакционную смесь оставляли на 16—18 ч, затем полимер промывали толуолом, пиридином, ацетоном, эфиром. К 5 мг полимера добавляли 0,2 мкмоль iod^{14}C ацетамида в 100 мкл смеси этанол — вода (1 : 1) (удельная радиоактивность иодацетамида 15 мКи/ммоль). Через 3 ч полимер отмывали от избытка иодацетамида спиртом, полимер обрабатывали аммиаком и продукты анализировали с помощью микроколоночной ионообменной хроматографии (рис. 4).

Аналогично проводили присоединение 2-децил-2,3,5,5-тетраметил-4-(3-иод-2-оксипропилиден)имидазолидин-1-оксиды (схема 5). К 15 мг полимера после окисления серой (соединение (XIVв)) добавляли 2 мг RI (~5 мкмоль) в 100 мкл смеси этанол — вода (1 : 1). Через 3 ч полимер промывали спиртом и после обработки аммиаком продукт (XVб) выделяли ионообменной и обращенно-фазовой хроматографией; при этом получено 3 OE_{270} олигонуклеотида (XVб), содержащего спиновую метку, УФ-спектр которого приведен на рис. 3.

ЛИТЕРАТУРА

1. Agarwal S., Christodoulou C., Gait M. J. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 15. P. 6227—6245.
2. Coull J. M., Weith M. L., Bishoff R. // Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. № 34. P. 3991—3994.
3. Smith M., Fung S., Hunkapiller M. W., Hunkapiller T. J., Hood L. E. // Nucl. Acids Res. 1985. V. 13. № 7. P. 2399—2412.
4. Connolly B. A. // Nucl. Acids Res. 1985. V. 13. № 12. P. 4485—4502.
5. Marugg J. E., Tromp M., Kuyl-Yeheskiely E., van der Marel G. A., van Boom J. H. // Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. № 23. P. 2661—2664.
6. Froehler B. C., Matteuci M. D. // Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. № 4. P. 469—472.
7. Garegg P. J., Regberg T., Stawinski J., Strömberg R. // Chem. Scr. 1985. V. 25. № 3. P. 280—282.
8. Грязнов С. М., Горн В. В., Зарытова В. Ф., Кумарев В. П., Левина А. С., Полищук А. С., Потапов В. К., Потемкин Г. А., Средин Ю. Г., Шабарова З. А. // Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. наук. 1987. Вып. 1. № 2. С. 119—123.

9. Веняминава А. Г., Косолапова З. А., Ренкова М. Н., Левина А. С. // Биооргани. химия. 1987. Т. 13. № 3. С. 321—332.
10. Ястребов С. И. Способ получения сорбента. А. с. 1153976. СССР. // ВИ. 1985. № 17.
11. Aterton F. R., Openshaw H. T., Todd R. R. // J. Chem. Soc. 1945. № 2. P. 660—663.
12. Левина А. С., Иванова Е. М. // Биооргани. химия. 1985. Т. 11. № 2. С. 231—238.
13. Лебедев А. В., Резвухин А. И. // Биооргани. химия. 1983. Т. 9. № 2. С. 149—186.
14. Зарытова В. Ф., Кутявин И. В., Сильников В. Н., Шишкин Г. В. // Биооргани. химия. 1986. Т. 12. № 1. С. 911—920.
15. Smith J. M., Sanders J. Z., Kaiser R. J., Hughes P., Dodd Ch., Connel Ch. R., Heiner Ch., Kent S. B. H., Hood L. E. // Nature. 1986. V. 321. № 6071. P. 674—679.
16. Бенимечкая Л. З., Бульчев Н. В., Горн В. В., Козионов А. Л., Кутявин И. В., Лебедев А. В., Новожилов С. Ю., Подыминовин М. А., Штокман М. И., Раутиан С. Г. // Препринт ИАиЭ СО АН СССР, № 252. Новосибирск. 1984.
17. Hata T., Sekine M. // Tetrahedron Lett. 1974. № 45. P. 3943—3946.
18. Kame A., Fujii M., Sekine M., Hata T. // J. Org. Chem. 1984. V. 49. № 12. P. 2139—2143.
19. Menshutkin N. // Ann. Chem. Pharm. 1866. B. 139. S. 343—354.

Поступила в редакцию
7.VIII.1987
После доработки
16.XI.1987

**SYNTHESIS OF OLIGONUCLEOTIDE DERIVATIVES
BEARING NH₂- AND SH-GROUPS ON POLYMER SUPPORT.
INTRODUCTION OF SPIN, FLUORESCENT
AND OTHER LABELS**

BASHUK O. S., ZARYTOVA V. F., LEVINA A. S.

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

For introducing NH₂- and SH-groups into oligonucleotides synthesized by the solid-phase phosphoroamidite method, reactions of mono- and dialkylphosphites (H-phosphonates), prepared by phosphitylation with PCl₃, salicylchlorophosphite or MeOPCl₂, were studied. N-(2-Hydroxyethyl)phenazinium and fluoresceine residues were attached to amino groups of the oligonucleotide derivatives; a spin-labelled derivative was obtained from 5-thiophosphate of decathymidylate.