



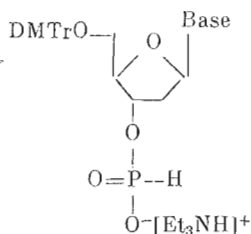
УДК 547.113.6:547.963.32

СИНТЕЗ ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ Н-ФОСФОНАТНЫМ*
ТВЕРДОФАЗНЫМ МЕТОДОМ В ШПРИЦЕДаньков Ю. В., Батчигоза Н. В., Скапцова Н. В.,
Бесидский Е. С., Ажаев А. В.

Всесоюзный научно-исследовательский институт биотехнологии, Москва

Мезитилсульфони́л-3-нитро-1,2,4-триазол был применен в качестве конденсирующего реагента для синтеза олигодезоксирибонуклеотидов Н-фосфонатным твердофазным методом в ручном варианте. Полученные соединения были успешно использованы для ферментативной сборки и клонирования последовательности, кодирующей лидерный пептид киллерного токсина *Kluyveromyces lactis*, а также в качестве гибридационных зондов и праймеров для секвенирования ДНК.

Две группы исследователей почти одновременно применили нуклеозид-Н-фосфонаты (I)–(IV) в олигонуклеотидном синтезе [1–4]:



Base = тимин-1-ил (I), N⁴-бензоилцитозин-1-ил (II), N⁶-бензоиладенин-9-ил (III), N²-изобутирилгуанин-9-ил (IV).

Н-Фосфонатный метод синтеза сочетает эффективность и скорость фосфамидитного метода с рядом достоинств фосфотриэфирного способа. Так же как и триэфирный, Н-фосфонатный подход использует активацию конденсирующим реагентом и поэтому не требует строгого соблюдения безводных условий для проведения реакции. Кроме того, не требуется «кепирования» в конце каждого цикла наращивания цепи. Вследствие того что продукты реакции (диэфиры гидрофосфористой кислоты) не претерпевают дальнейших превращений под действием конденсирующего реагента, окисление всех атомов фосфора проводят лишь один раз, по завершении синтеза. Все вышеперечисленные факты позволяют считать Н-фосфонатный метод особенно перспективным для ручного синтеза олигонуклеотидов.

В литературе исследован ряд реагентов для проведения фосфонатной конденсации [1–5]. Наиболее удачным оказался хлорангидрид пивалонной кислоты [4, 5]. В работе [5] отмечалось, что смешение раствора нуклеозид-Н-фосфоната с пивалоилхлоридом перед реакцией на полимерном носителе приводит к образованию побочных продуктов, что естественно снижает выход целевого олигонуклеотида. В связи с этим в автоматическом режиме мономер и конденсирующий реагент дозируют на носитель поочередно и небольшими порциями [5].

Нестандартные сокращения: DMTr — 4,4'-диметокситрипил, MSNT — мезитилсульфони́л-3-нитро-1,2,4-триазол, SDS — додецилсульфат натрия, 1 × SSC — 0,15 М хлорид натрия, 0,015 М цитрат натрия pH 7,0. Префикс d (дезокс) в обозначении дезокси-нуклеотидов всюду опущен.

* В соответствии с традициями отечественной номенклатуры соединений трехвалентного фосфора этот метод следует называть гидрофосфитным, однако, чтобы избежать разночтения, в настоящей работе используется термин «Н-фосфонатный», принятый в иностранной литературе.

Схема операций для одного цикла олигонуклеотидного синтеза

Операция	Растворители и реагенты	Время, мин (объем растворителя, мл)
Деблокирование	3% CHCl_2COOH в 1,2-дихлорэтане	0,5 — пурины, 1,0 — пиримидины
Промывка	Пиридин	(0,6)
Конденсация	5–7 мкмоль мономера, 25 мкмоль MSNT в 60 мкл пиридина	(2×0,6) 1,5
Промывка	Пиридин	(0,6)
»	1,2-Дихлорэтан	(2×0,6)

Мы провели синтез нескольких олигонуклеотидов H -фосфонатным твердофазным методом в шприце. Перед реакцией конденсации нам приходилось смешивать раствор исходного нуклеозид- H -фосфоната с пивалоилхлоридом и далее быстро наносить активированный мономер на твердую фазу. В ряде случаев мы наблюдали выпадение мелкокристаллического осадка на носителе, что сильно затрудняло проведение синтеза. Мы предприняли также попытку вводить реагенты поочередно двумя-тремя порциями, однако эта процедура оказалась технически крайне неудобной. Выход олигонуклеотидов во всех случаях был низким. Все это побудило нас отказаться от применения пивалоилхлорида для ручного синтеза и изучить возможность использования других конденсирующих реагентов. Мы испытали 2,4,6-триизопропилбензолсульфонил-1,2,4-триазол, смесь мезитилсульфонилхлорида с тетразолом и MSNT. Наилучшие результаты были получены с использованием MSNT. Схема операций для одного цикла синтеза представлена в таблице. Продолжительность цикла составляла не более 5 мин. В процессе работы нами было замечено, что использование MSNT и мономера (IV) для синтеза олигонуклеотидов приводит к ряду побочных реакций, по-видимому, связанных с O^6 -модификацией амидной группы гуанина [6, 7]. Однако предварительная обработка синтезированного олигонуклеотида смесью 1,1,3,3-тетраметилгуанидина и 4-нитробензальдоксима (перед окончательным деблокированием концентрированным аммиаком) [8] позволила устранить основные модификации и получить целевые олигонуклеотиды с высоким выходом. Ниже приведены олигодезоксирибонуклеотиды (V)—(XV), полученные H -фосфонатным твердофазным методом в описанном выше варианте:

TCGAGAATGAATATA (V) CAGCAAAAACAAAAAT (XI)
 TTTTACATATTTTGT (VI) ATGTA AAAATATATTCATTC (XII)
 TTTTGCTGTCAATTCGT (VII) GTAAAAACGACGGCCAGT (XIII)
 TGAAGGTACCCGGGGG (VIII) CGTATCACGAGGCCCTTTCG (XIV)
 AATCCCCCGGG (IX) CTGGCAGTGATCGTCCCTGCTCTGTAGTA (XV)
 TACSTTCAACGAATGA (X)

На рис. 1 представлена анонообменная ВЭЖХ реакционной смеси, содержащей деблокированный 30-звенный олигонуклеотид (XV), а на рис. 2а — его рехроматография на колонке с обращенной фазой и анализ гомогенности (рис. 2б).

Олигонуклеотиды (V)—(XII) представляют собой фрагменты последовательности, кодирующей лидерный пептид киллерного токсина *Kluyveromyces lactis* и три дополнительных аминокислотных остатка: Thr-Arg-Gly. Эта последовательность может быть использована для создания вектора, экспрессирующего пептидные гормоны в дрожжах [9]. Структура пептида и кодирующая нуклеотидная последовательности приведены на рис. 3. В 5'-конец кодирующей последовательности был введен сайт рестрикции *Xho*I, а в 3'-конец — *Eco*RI. Ферментативную сборку двукратного фрагмента ДНК проводили в один этап. Олигонуклеотиды (V) и (IX) и фосфорилированные с помощью Т4-полинуклеотидкиназы (VI)—(VIII) и (X)—(XII) смешивали в эквимольном соотношении, отжигали и лигировали как описано в работе [10]. Параллельно в качестве конт-

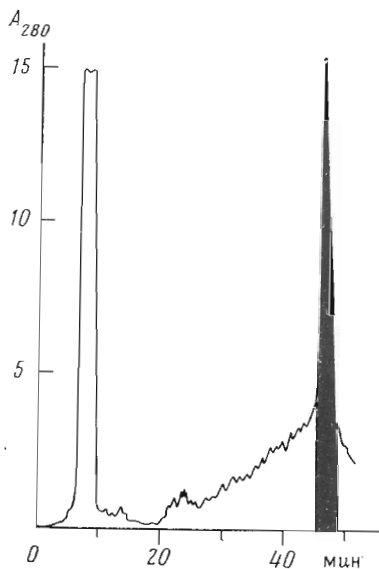


Рис. 1

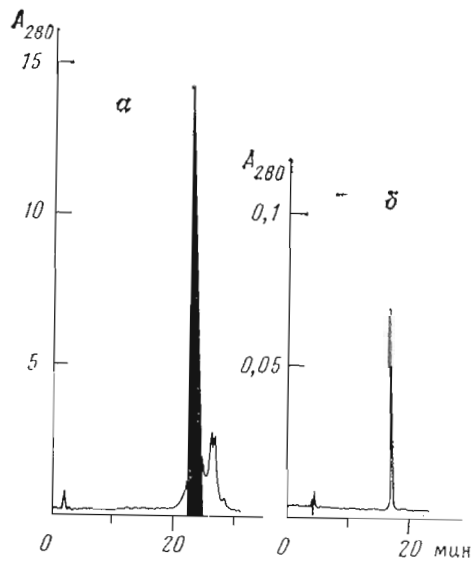


Рис. 2

Рис. 1. Preparative aminoexchange ВЭЖХ смеси, содержащей олигонуклеотид (XV), на колонке Zorbax-NH₂, 7 мкм (4,6 × 250 мм). Элюция линейным градиентом сульфата аммония (0—0,6 М) в 0,05 М фосфате калия в 60% формамиде, градиент рН 4,15—5,50 (46,7 мин) и далее изократично (7,7 мин). Скорость потока 0,6 мл/мин

Рис. 2. Обращенно-фазовая ВЭЖХ олигонуклеотида (XV): а — очистка на колонке Zorbax-ODS, 5 мкм (4,6 × 250 мм), градиент ацетонитрила 2,5—15% в 0,1 М ацетате аммония (30 мин), далее изократично (5 мин); скорость потока 1,2 мл/мин; б — анализ на колонке Nucleosil 300-5C18, 5 мкм (4 × 250 мм), градиент ацетонитрила 2,5—25% в 0,02 М триэтиламонийбикарбонате; скорость потока 0,9 мл/мин

MetAsnIlePheTyrIlePheLeuPheLeuLeuSerPheValGlnGlyThrArgGly

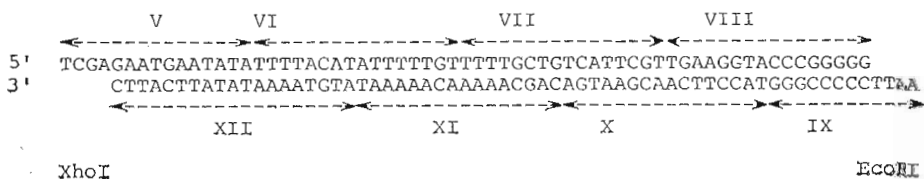


Рис. 3. Аминокислотная последовательность лидерного пептида киллерного токсина *K. lactis* в сочетании с дополнительными остатками аминокислот Thr-Arg-Gly и кодирующая нуклеотидная последовательность

роля проводили сборку отдельно «левой половины» (олигонуклеотиды V, VI, XII, XI) последовательности и «правой половины» (олигонуклеотиды VII, VIII, X, IX). Продукты трех лигазных реакций анализировали с помощью 15% денатурирующего ПААГ (рис. 4). Как видно из рис. 4, синтезированные Н-фосфорным методом олигонуклеотиды лигируются с высокой эффективностью, причем основным продуктом лигирования полной смеси олигонуклеотидов (XV)—(XII) является фрагмент длиной около 60 нуклеотидных пар (рис. 4a). Для клонирования синтетического фрагмента ДНК аликвоту полной инкубационной смеси лигировали с вектором. В качестве вектора была использована плазмида рFPCP8L₁F [11], обработанная рестриктазами *EcoRI* и *XhoI*. Трансформацию реципиентного штамма *E. coli* HB101 проводили по методу [12]. Клоны, устойчивые к ампициллину, анализировали рестрикционным методом и гибридизацией с ³²P-меченым олигонуклеотидом (XII). Из 100 клонов с меченым зондом гибридизовалось 95. Нуклеотидные последовательности *XhoI/EcoRI*-фрагментов рекомбинантных плазмид из двух таких клонов были определены по методу Максама — Гилберта [13] (см., например, рис. 5). Они полностью совпали с нуклеотидной последовательностью,

Рис. 4. Лигирование синтезированных в данной работе олигонуклеотидов (V)—(XII), фрагментов последовательности, представленной на рис. 3 (радиоавтограмма 15% денатурирующего ПААГ): *a* — продукты лигирования смеси олигонуклеотидов (V)—(XII); *б* — нонадекануклеотид (XII); *в* — продукты лигирования олигонуклеотидов (VII)—(X); *г* — продукты лигирования олигонуклеотидов (V), (VI), (XI) и (XII). Точками указано положение красителя ксиллолцианола голубого (КС)

Рис. 5. Определение первичной структуры *XhoI/EcoRI*-фрагмента ДНК (кодирует лидерный пептид вибрионного токсина *K. lactis*), синтезированного химико-ферментативным путем и клонированного в составе плазмиды *rFPC8LIF* [12] (радиоавтограмма продуктов анализа по Максаму — Гилберту в 15% ПААГ). Стрелками указаны последовательности, соответствующие олигонуклеотидам (IX)—(XII)

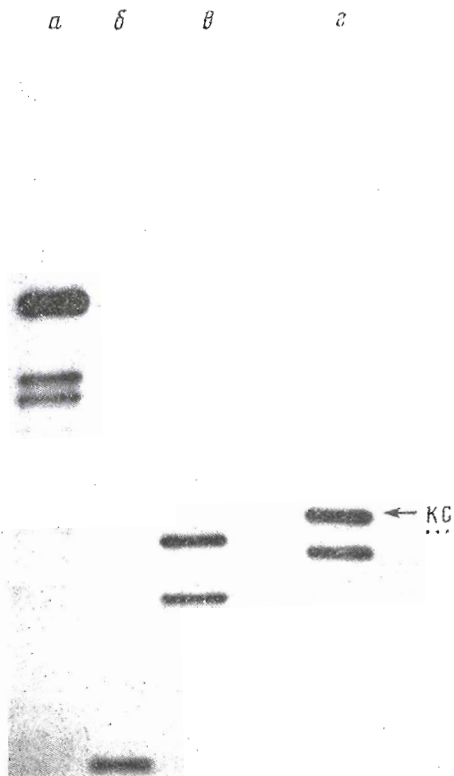


Рис. 4

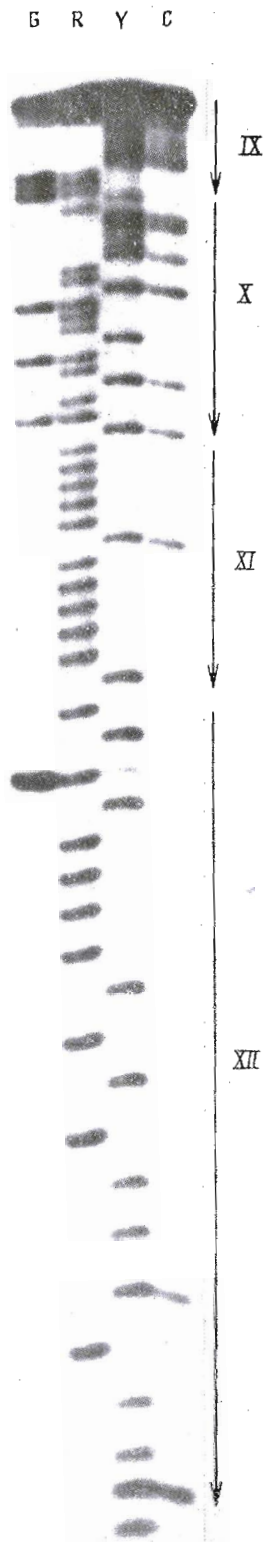


Рис. 5

представленной на рис. 3, что подтверждает правильность структур синтезированных олигонуклеотидов (V)—(XII).

В заключение следует отметить, что успешное применение олигонуклеотидов (V)—(XII) для ферментативной сборки и клонирования последовательности, кодирующей лидерный пептид киллерного токсина *K. lactis*, а также олигонуклеотидов (XIII) и (XIV) в качестве праймеров для секвенирования ДНК, олигонуклеотида (XV) в качестве гибридизационного зонда к промотору белка *Omp F E. coli* позволяет утверждать, что Н-фосфонатный твердофазный метод синтеза в ручном варианте может быть эффективно использован в генетической инженерии.

Авторы выражают благодарность А. И. Гуревичу за предоставление плазмиды pFPCP8LIF и ДНК-полимеразы I (фрагмент Кленова).

Экспериментальная часть

В работе использованы реагенты, растворители и ферменты, описанные в работе [10], а также $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (10 мКи/мл, 3000 Ки/ммоль; Amersham), рестриктазы *XhoI* и *EcoRI* (RF 3.1.23.x, PL Biochemicals), ДНК-полимераза I (фрагмент Кленова; RF 2.7.7.7) любезно предоставлена А. И. Гуревичем.

Синтез защищенных нуклеозид-Н-фосфонатов (I)—(IV) проводили по методу [14].

Синтез олигонуклеотидов осуществляли в шприце как описано в работе [10] согласно схеме, представленной в таблице. Для синтеза использовали навеску носителя, содержащую 0,5 мкмоль нуклеозидного компонента. Емкость носителя ~20 мкмоль/г. Перед реакцией конденсации смесь конденсирующего реагента и нуклеозид-Н-фосфоната растворяли в пиридине.

Снятие с носителя, деблокирование и очистка олигонуклеотидов (V)—(XV). После завершающего цикла присоединения мономерного звена олигонуклеотид окисляли 2% I_2 в смеси пиридин — вода (98 : 2) [5], DMТг-группу удаляли, носитель обрабатывали раствором 70 мг 4-нитробензальдоксима и 55 мкл 1,1,3,3-тетраметилгуанидина в 1 мл 50% водного диоксана (12 ч, 60° С). К смеси добавляли 3 мл конц. NH_3 и пекубировали еще 6 ч при 60° С. Олигонуклеотиды (V)—(XV) очищали и анализировали в ранее описанных условиях [10], как представлено на рис. 1, и обессоливали на колонке TSK gel G2000SW. Выход олигонуклеотидов 10—20 ОЕ₂₆₀.

Фосфорилирование олигонуклеотидов (V)—(XV), лигирование олигонуклеотидов (V)—(XII), приготовление вектора и клонирование последовательности, кодирующей лидерный пептид киллерного токсина K. lactis, проводили аналогично работе [10].

Гибридизационный анализ клонов. Ампициллинустойчивые клоны перекалывали на нитроцеллюлозный фильтр и ДНК иммобилизовали по стандартной методике [15]. Предгибридизацию проводили 1 ч при 60° С в буфере, содержащем 1 М NaCl, 50 мМ трис-HCl (рН 8), 1 мМ EDTA, 0,2% фикола, 0,2% поливинилпирролидон, 0,2% бычий сывороточный альбумин (10 × раствор Денхардта), 0,1% SDS и 50 мкг/мл ДНК-носителя. Гибридизацию с ^{32}P -меченым олигонуклеотидом (XII) (10^6 имп/(мин·мл)) проводили в 6 × SSC, 0,1% SDS при 35° С в течение 2 ч. Далее фильтр отмывали в 4 × SSC, 0,1% SDS при 20° С, а затем 1 ч при 30° С.

Определение нуклеотидной последовательности клонированного синтетического фрагмента ДНК. Плазмиды, выделенные по методу [16], обрабатывали рестриктазой *XhoI*, вводили радиоактивную метку при помощи $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ и ДНК-полимеразы I (фрагмент Кленова), далее гидролизывали рестриктазой *EcoRI* в условиях, описанных в работе [17]. Меченый короткий фрагмент ДНК выделяли из 8% ПААГ и определяли в нем нуклеотидную последовательность по методу Максама — Гилберта [13].

ЛИТЕРАТУРА

1. Garegg P. J., Regberg T., Stawinski J., Strömberg R. // Chem. scr. 1985. V. 25. № 3. P. 280—286.
2. Garegg P. J., Regberg T., Stawinski J., Strömberg R. // Chem. scr. 1986. V. 26. № 1. P. 59—68.
3. Froeler B. C., Matteuci M. D. // Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. № 4. P. 59—68.
4. Froeler B. C., Matteuci M. D. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 13. P. 5399—5407.
5. Garegg P. J., Lindh I., Regberg T., Stawinski J., Strömberg R. // Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. № 34. P. 4051—4056.
6. Reese C. B., Ubasawa A. // Tetrahedron Lett. 1980. V. 21. № 20. P. 2265—2269.
7. Daskalov H. P., Sekine M., Hata T. // Tetrahedron Lett. 1980. V. 21. № 33. P. 3899—3904.
8. Reese C. B., Zard L. // Nucl. Acids Res. 1981. V. 9. № 38. P. 4611—4616.
9. Baldari C., Murray J. A. H., Chiara P., Cesareni G., Galeotti C. L. // EMBO J. 1987. V. 6. № 1. P. 229—234.
10. Батчикова Н. В., Скапцова Н. В., Бесидский Е. С., Даныков Ю. В., Твардовская С. А., Степанов А. И., Ажаев А. В. // Биоорганическая химия. 1988. Т. 14 № 5. С. 621—630.
11. Гуревич А. И., Некрасова О. В. // Биоорганическая химия. 1988. Т. 14. № 2. С. 153—157.
12. Cohen C. N., Chang A. C. Y., Hsu L. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1972. V. 69. № 8. P. 2110—2114.

3. Maxam A. M., Gilbert W. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. № 2. P. 560—564.
14. Marugg J. E., Tromp M., Kuyt-Yeheskieli E., van der Marel G. A., van Boom J. H. // Boom J. H. // Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. № 23. P. 2661—2664.
15. Grunstein M., Hogness D. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1975. V. 72. № 10. P. 3961—3965.
16. Birnboim H. C., Doly J. // Nucl. Acids Res. 1979. V. 7. № 6. P. 1513—1522.
17. Маниатис Т., Фрич Э., Сэлбрюк Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. С. 107—114.

Поступила в редакцию
12.X.1987

После доработки
24.XII.1987

H-PHOSPHONATE SOLID-PHASE SYNTHESIS OF OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDES IN SYRINGE

DAN'KOV Yu. V., BATCHIKOVA N. V., SCAPTSOVA N. V.,
BESIDSKY E. S., AZHAYEV A. V.

All-Union Research Institute of Biotechnology, Moscow

Mesitylenesulphonyl-3-nitro-1,2,4-triazole was used as coupling reagent for the manual H-phosphonate solid-phase synthesis of oligodeoxyribonucleotides. The compounds obtained were successfully employed as DNA sequencing primers and hybridisation probes, as well as in enzymatic assembling and subsequent cloning of the polynucleotide coding for the leader peptide of the *Kluyveromyces lactis* killer toxin.