



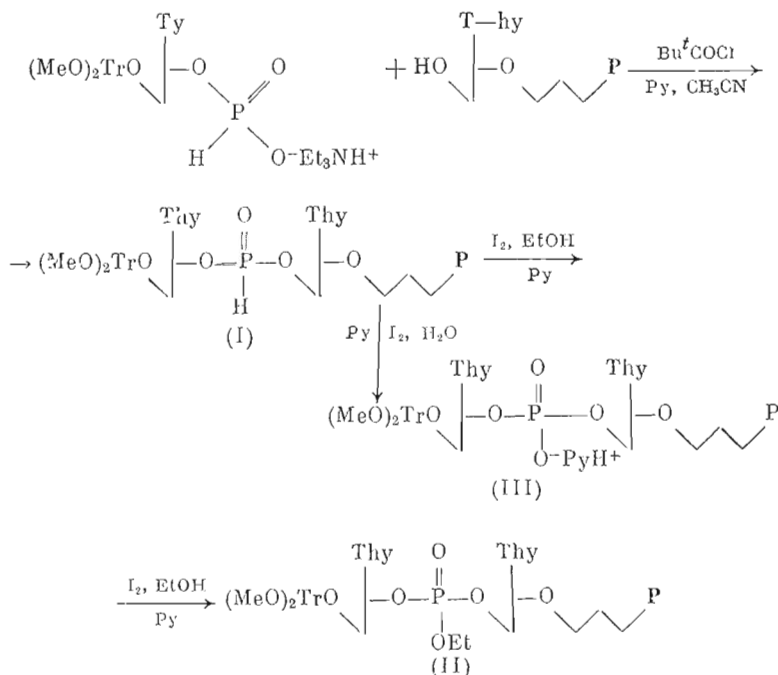
УДК 577.113.6:542.95

ЭТИЛИРОВАНИЕ МЕЖНУКЛЕОТИДНОЙ ФОСФИТНОЙ ГРУППЫ ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ МЕТОДОМ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ

*Грязнов С. М., Филиппов С. А.**

*ВНИИ биотехнологии Минмедмикробиопрома СССР, Москва;
* Институт биорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Возрастающий интерес исследователей к синтезу олигонуклеотидов, модифицированных по гетероциклическому основанию, рибозе или межнуклеотидной фосфатной группе, связан с возможностью широкого использования этих соединений в различных областях молекулярной биологии и биорганической химии [1, 2]. Особое место в этом ряду занимают триэфирные аналоги олигонуклеотидов, сохраняющие способность к комплементарному взаимодействию и устойчивые к действию ряда нуклеаз [3, 4]. Однако описанные методы синтеза алкильных триэфирных производных олигонуклеотидов (здесь и далее префикс «дезокси» опущен), основанные на переэтерификации Р-хлорфениловых эфиров в присутствии фторид-ионов, ограничены рамками блочной схемы синтеза олигонуклеотидов в растворе [5, 6].



где $\left[\begin{array}{l} \diagup \text{O} \\ \diagdown \end{array} \right] \text{P}$ — полимерный носитель.

В настоящей работе изучен подход к синтезу триэфиров олигонуклеотидов, основанный на проведении окисления межнуклеотидной гидрофосфорильной группы в присутствии безводного спирта (в данном случае эта-

пола). При отработке схемы этилирования была использована методология твердофазного синтеза олигонуклеотидов, базирующаяся на сочетании фосфитамидного и гидрофосфорильного методов [7] наращивания олигонуклеотидной цепи.

Для определения оптимальных условий этилирования в качестве модели нами был получен гидрофосфорилдитимидилат (I), иммобилизованный на полимерном носителе [7], который затем модифицировали согласно приведенной ниже схеме реагентом на основе 0,2 М раствора иода в смеси пиридин — этанол, 9 : 1.

Было показано, что этилирование динуклеозидгидрофосфата (I), иммобилизованного на полимерном носителе, протекает менее чем за 5 мин со средней эффективностью 75—80%, причем выход триэфира (II) зависит от степени осушки реагентов и растворителей. Увеличение времени этерификации, так же как и увеличение концентрации этанола в смеси, не приводит к росту содержания этилированного дитимидилфосфата (II). Продукты реакции после отделения от полимерного носителя анализировали и выделяли методами обращенно-фазовой ВЭЖХ и ТСХ. Время удерживания 5'-О-диметокситритилдитимидилфосфата (III) составляет 30 мин, а для оптических изомеров 5'-О-диметокситритилдитимидилэтилфосфата (II) — 39,5 и 40,7 мин (носитель Ultrasphere ODS, 5 мкм, 4,6×250 мм, градиент ацетонитрила от 15 до 65% за 45 мин в 0,1 М ацетате триэтиламмония). Для соединения (II) R₁ при ТСХ на силикагеле Kieselgel 60 F₂₅₄ составляет 0,45 в системе метанол — хлороформ, 7 : 93, тогда как для соединения (III) в тех же условиях 0,1. Следует отметить, что межнуклеотидная этилфосфатная группа устойчива (по данным ТСХ) в условиях удаления метильных защитных групп тиофенолом в течение 40 мин при комнатной температуре.

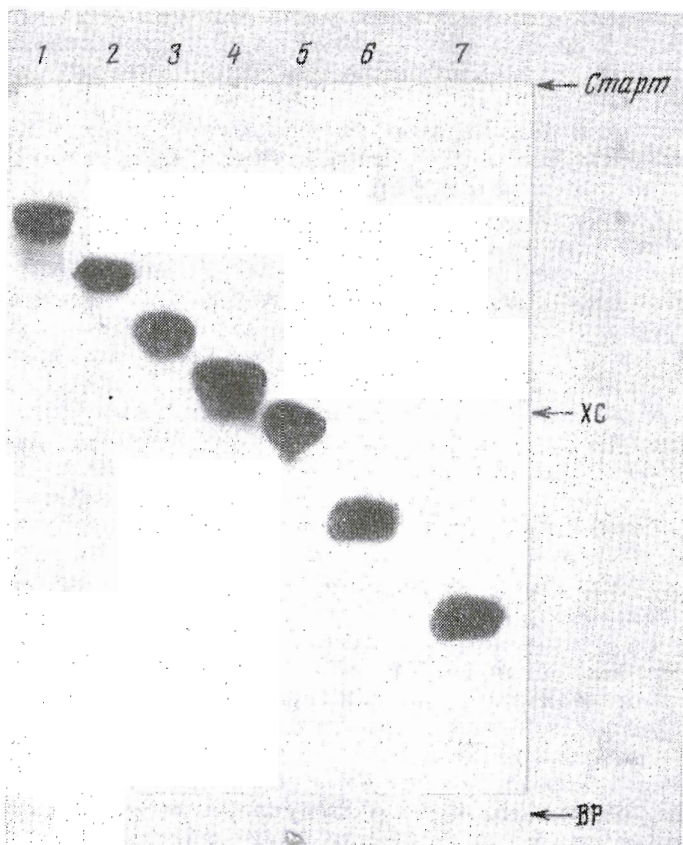
Эффективность предложенного метода была продемонстрирована на примере синтеза более протяженных олигонуклеотидов, содержащих этилированные фосфатные группы в заданных положениях нуклеотидной цепи. В качестве объекта был выбран гептадекануклеотид (5')GTAAAACGAX×CGGCCAGT, используемый в качестве универсального праймера при определении нуклеотидной последовательности по методу Сэнгера. Введение модификации в заданное положение олигонуклеотидной цепи осуществляли проведением соответствующей стадии конденсации гидрофосфорильным методом с последующим превращением межнуклеотидной фосфитной группы в этилфосфатную по описанной выше схеме. Остальные нуклеотиды присоединялись по фосфитамидной схеме [8].

Таким образом, были получены гептадекануклеотиды, содержащие межнуклеотидные этилфосфатные группы в положениях, отмеченных стрелками:

		Время удерживания на ВЭЖХ*, мин
GTAAAACGACGGCCAGT	(IV)	11,3
GTAAAACGACGGCCAGT	(V)	16,5
$\begin{array}{c} \uparrow \\ \text{GTAAAACGACGGCCAGT} \\ \uparrow \quad \uparrow \end{array}$	(VI)	18,5

Выделение модифицированных олигонуклеотидов осуществляли электрофорезом в ПААГ и выделенные продукты анализировали обращенно-фазовой ВЭЖХ. В соответствии с литературными данными этилированные олигонуклеотиды имеют большие времена удерживания в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ [9], а также меньшую электрофоретическую подвижность в ПААГ (рисунок). Наряду с этилированными олигонуклеотидами в реакционных смесях содержался природный немодифицированный гептадекануклеотид. Соотношение между модифицированным, содержащим две или четыре этилфосфатные группы, и немодифицированным олигонуклеотидом составляло соответственно 1 : 5 или 1 : 10 после выделения их в ПААГ.

* Носитель — Nucleosil C-18, градиент ацетонитрила от 5 до 40% за 30 мин в 0,15 М ацетате триэтиламмония.



Радиоавтограмма в 20% ПААГ $5'$ - P^{32} -меченого гептадекануклеотида (5')GTAAAACGACGGCCAGT, содержащего от 8 до 5 этилфосфатных групп соответственно (1-4); 5 и 6 - соединения (V) и (VI); 7 - немодифицированный гептадекануклеотид (IV)

Нами была предпринята попытка получить гептадекануклеотиды указанной первичной структуры, содержащие среднестатистически распределенные по нуклеотидной цепи этилфосфатные узлы. С этой целью гептадекануклеотид, целиком полученный гидрофосфорильным методом, по окончании синтеза этилировали согласно схеме. Продукты реакции после удаления с полимерного носителя и деблокирования анализировали и выделяли методами ВЭЖХ и электрофореза в ПААГ. Отнесение по количеству содержащихся в олигонуклеотиде фосфотриэфирных групп проводили сравнением электрофоретической подвижности в ПААГ и хроматографической подвижности в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ с гептадекануклеотидами (V) и (VI). Оказалось, что смесь гептадекануклеотидов в основном состоит из соединений, содержащих от двух до восьми этилфосфатных групп. Эти соединения могут быть выделены в индивидуальном виде электрофорезом в ПААГ (см. рисунок). Протеканию более полного этилирования, по-видимому, препятствует конкурирующий гидролиз.

Времена удерживания среднестатистически этилированных олигонуклеотидов в идентичных условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ увеличиваются примерно на 1,0 мин при введении каждой следующей этилфосфатной групп.

Полученные предложенным методом этилированные гептадекануклеотиды в настоящее время изучаются в качестве негидролизующих праймеров для определения первичной структуры ДНК методом Сэнгера.

Таким образом, можно заключить, что предложенный способ этерификации позволяет быстро и достаточно эффективно получать этилированные олигонуклеотиды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Miller P. S., Braiterman L. T., Ts'o P. O. P. // *Biochemistry*. 1977. V. 16. № 9. P. 1988–1996.
2. Pless C. R., Ts'o P. O. P. // *Biochemistry*. 1977. V. 16. № 6. P. 1239–1250.
3. Петренко В. А., Поздняков П. И., Киприянов С. М., Болдырев А. Н., Семенова А. Н., Сиволобова Г. Ф. // *Биоорг. химия*. 1986. Т. 12. № 2. С. 289–291.
4. Петренко В. А., Поздняков П. И., Сиволобова Г. Ф., Шубина Т. И. // *Биоорг. химия*. 1980. Т. 6. № 3. С. 431–435.
5. Ogilvie K. K., Veausage S. L. // *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1976. P. 443–444.
6. Абрамова Т. В., Лебедев А. В. // *Биоорг. химия*. 1983. Т. 9. № 6. С. 824–831.
7. Froehler V. C., Matteucci M. D. // *Tetrahedron Lett.* 1986. V. 27. № 4. P. 469–472.
8. Грязнов С. М., Поганов В. К., Метелев В. Г., Елов А. А., Пурмаль А. А., Шабарова З. А. // *Биоорг. химия*. 1986. Т. 12. № 7. С. 988–991.
9. Левина А. С., Невинский Г. А., Лаврик О. И. // *Биоорг. химия*. 1985. Т. 11. № 3. С. 358–369.

Поступила в редакцию
13.IX.1988

ETHYLATION OF INTERNUCLEOTIDE PHOSPHITE GROUP IN OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDES BY THE OXIDATIVE PHOSPHORYLATION METHOD

GRYAZNOV S. M., FILIPPOV S. A.*

*All-Union Institute of Biothechnology, Moscow;
* M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

A method, based on solid-phase technology and oxidative phosphorylation, has been developed for preparation of modified oligodeoxyribonucleotides containing internucleotide ethylphosphate group.

Правила для авторов см. в № 5, 7, 8, 9, 10—1988 г.

Технический редактор Рудницкая А. В.

Сдано в набор 20.01.89	Подписано к печати 02.03.89	Т-00348	Формат бумаги 70×108 ^{1/16}
Высокая печать	Усл. печ. л. 12,6	Усл. вр.-отт. 11,6 тыс.	Уч.-изд. л. 14,6 Бум. л. 4,5
	Тираж 901 экз.	Зак. 2510	Цена 1 р. 80 к.

Ордена Трудового Красного Знамени издательство «Наука»,
103717 ГСП, Москва, К-62, Подсосенский пер., 21
2-я типография издательства «Наука», 121099, Москва, Г-99, Шубинский пер., 6