



УДК 577.113.4 : 542.95

© 1990 г.

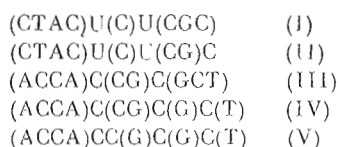
*Е. А. Романова, Т. С. Орзукая, В. В. Сухомлинов,
Н. Ф. Брынецкая, В. Г. Метелёв, Э. А. Шабарова*

ГИБРИДНОЕ РАСЩЕПЛЕНИЕ РНК II*. АВТОМАТИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ СМЕШАННЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ЗОНДОВ

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, химический факультет

Смешанные олигонуклеотиды (олигомеры, содержащие как дезокси-, так и рибонуклеотиды) были получены амидофосфитным методом в автоматическом ген-синтезаторе «Виктория-4М». Данный вариант синтеза позволяет включать рибозвенья в любое положение олигомера. 2'-Гидроксильную функцию рибонуклеозидов блокировали трет-бутилдиметилсилильной группой, гидрофобные свойства которой предложено использовать для выделения смешанных олигонуклеотидов обращенно-фазовой ВЭЖХ. Получена серия олигонуклеотидов, представляющих собой зонды для изучения гидролиза 5S РНК рибосом *E. coli* в присутствии рибонуклеазы Н.

Олигомеры, состоящие одновременно из рибо- и 2'-дезоксирибонуклеотидов (далее в тексте именуемые смешанными олигонуклеотидами), используются для изучения специфичности и механизма действия ряда ферментов нуклеинового обмена [2, 3]. Отмечено различие субстратных свойств таких соединений в зависимости от структуры сахарофосфатного остова: протяженности олигорибонуклеотидной части, соотношения рибо- и дезоксирибонуклеотидов, взаиморасположения их в цепи. Нами впервые продемонстрирована перспективность использования смешанных олигонуклеотидов [4] и олигомеров, содержащих 2'-О-метилнуклеозиды [1], для осуществления эффективного региоспецифического гидролиза РНК РНКазой Н из *E. coli*. Синтез смешанных зондов был осуществлен с помощью химического лигирования соответствующих дезоксирибо- и рибоблоков на комплементарной ДНК-матрице [5]. Предложенная схема синтеза относительно трудоемка, позволяет получать только определенные структуры с 5'-концевым дезоксирибоблоком и исключает прямой синтез, что в целом затрудняет использование метода фрагментации РНК в лабораторной практике. Цель настоящей работы — разработка прямого химического синтеза на автомате-синтезаторе смешанных олигонуклеотидов с любым положением и количеством рибозвеньев и синтез серии олигонуклеотидов ** для изучения гидролиза 5S РНК рибосом *E. coli* в присутствии рибонуклеазы Н:



Выбирая метод синтеза таких олигомеров, мы остановились на амидофосфитном подходе, хорошо зарекомендовавшем себя для дезоксирида, с использованием автоматического ген-синтезатора «Виктория-4М» [6]. Мы стремились решить проблему автоматического химического синтеза

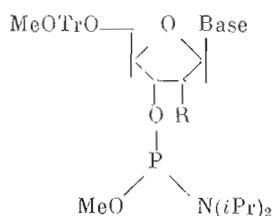
* Сообщение I см. [1].

** При написании нуклеотидной последовательности смешанных зондов префикс «d» опущен, дезоксирибонуклеотиды заключены в скобки.

смешанных олигонуклеотидных зондов, не изменяя существенно ни регламента, ни карты-схемы операций, используемых при получении олигодезоксирибонуклеотидов.

Определенные сложности при синтезе олигорибонуклеотидов связаны с необходимостью подбора специфической защиты 2'-гидроксила рибозы при получении мономерных синтонов, обеспечения сохранности этой защитной группы на всех стадиях автоматического цикла и разработки путей удаления защиты после окончания синтеза в условиях, исключающих деградацию олигомера.

Нами была выбрана *трет*-бутилдиметилсилильная (TBDMS) группа, эффективность которой при блокировании 2'-гидроксильной функции в олигонуклеотидном синтезе была продемонстрирована работами Огилви [7, 8]. Преимуществом такой защиты является сохранение в схеме стандартной кислотной обработки при деблокировании 5'-гидроксила на каждой стадии наращивания цепи, т. е. возможность применять для синтеза смешанных олигонуклеотидов реагенты, используемые в ходе синтеза дезоксиолигомеров. Стратегия получения рибосинтонов для автоматического амидофосфитного синтеза смешанных олигомеров предполагала получение N,5'-O-защищенных нуклеозидов с последующим неселективным блокированием 2'-(3'-)гидроксильных групп рибозы и разделением смеси изомеров, а затем синтез 3'-O-амидофосфитов защищенных нуклеозидов:



(1a—d) R = H; a) Base = N²-бензиладенин; b) Base = N⁴-бензилцитозин; c) Base = N²-изобутирилгуанин; d) Base = тимин.

(2a, b) R = OTBDMS; a) Base = N⁴-бензилцитозин; b) Base = урацил

Силилирование защищенных по гетероциклу и 5'-гидроксилу рибонуклеозидов проводили хлоридом TBDMS в пиридине в присутствии N-метилимидазола. Ход реакции контролировали с помощью ТСХ (система хлороформ — этилацетат, 85:15). Одной из наиболее трудоемких операций при получении синтонов на основе рибонуклеозидов является разделение их 2'- и 3'-силильных производных хроматографией на силикагеле. Для разделения силильных производных уридина наиболее эффективной оказалась система эфир — гексан, 2:1, для разделения силильных производных цитидина — система этилацетат — гексан, 1:1.

Для получения 3'-амидофосфитов фосфитилирование 2'-силилированных производных рибонуклеозидов проводили бис(N,N-диизопропиламидо)-метилфосфитом в присутствии соли тетразола с диизопропиламином в хлористом метиле, используя метод Карузерса [9], разработанный для дезоксирибонуклеозидов. Время, необходимое для фосфитилирования (ТСХ-контроль), возрастает в случае рибонуклеозидов до 10 ч, что обусловлено наличием объемной триалкилсилильной группировки в 2'-положении рибозного кольца. Выходы амидофосфитов дезоксирибо- и рибонуклеозидов составляли 80—95%. В случае рибопроизводных была проведена хроматографическая очистка синтонов на небольшой колонке с силикагелем в системе этилацетат — хлороформ — триэтиламин, 45:45:10, что, на наш взгляд, может обеспечить их более длительное хранение. Структура амидофосфитов N,O-защищенных рибонуклеозидов подтверждена данными спектров ¹H- и ³¹P-ЯМР.

Твердофазный синтез осуществляли на полимерных носителях, полученных по методике [10], на основе отечественного силиохла С-80. Для получения полимера с первым рибозеном (для олигонуклеотида (II)) к якорной карбоксильной группе носителя присоединяли N,5'-O-защищенный цитидин через гидроксил *цис*-гликольного центра рибозы, а ос-

Карта-схема операций автоматического синтезатора «Виктория-4М»
при получении смешанных олигонуклеотидов

Номер операции	Операция	Реагент, растворитель *	Время, с **	
			цикл д	цикл г
1	Промывка	CH ₂ Cl ₂	30	30
2	Детритилирование	1% CF ₃ COOH в CH ₂ Cl ₂	60	60
3	Промывка	CH ₂ Cl ₂	30	30
4	»	CH ₃ CN	60	60
5	Дозирование нуклеотидного компонента	150 мкл 0,15 М амидофосфита в CH ₃ CN	—	—
6	Дозирование тетразола	150 мкм 0,5 М тетразола в CH ₃ CN	—	—
7	Конденсация (циркуляция)		120	600
8	Промывка	CH ₃ CN	30	30
9	Окисление	0,2 М I ₂ в смеси Py — AcOH, 9 : 1	30	30
10	Промывка	CH ₂ Cl ₂	30	30
11	»	CH ₃ CN	30	30
12	Кэпирование	Ac ₂ O — Et ₃ N — MeIm — CH ₃ CN, 4,5 : 4,5 : 1 : 30	120	120
13	Промывка	CH ₃ CN	20	20

* Скорость потока 2 мл/мин.

** Циклы д и г — включение дезоксирибонуклеотида и рибонуклеотида в олигомерную цепь.

тавший свободным 2'-(3')-гидроксил ацилировали уксусным ангидридом [11]. Загрузка полимера первым нуклеозидом составляла 38 мкмоль/г. В качестве реактора для синтеза использовали проточную колонку объемом 100 мкл, содержащую 40—50 мг полимерного носителя.

В ходе исследований было выявлено, что карта-схема операций синтетического цикла на автоматическом синтезаторе «Виктория-4М», хорошо зарекомендовавшая себя в синтезе олигодезоксирибонуклеотидов, успешно может использоваться и для получения смешанных олигонуклеотидов. Идентичность операций синтетического цикла для присоединения рибозы и дезоксирибозы в ходе синтеза смешанных олигонуклеотидов позволяет проводить синтез в полностью автоматическом режиме без замены реагентов и растворителей (таблица). Единственное отличие в регламенте присоединения дезоксирибозы и рибозы — увеличение времени конденсации для рибонуклеотида до 15 мин по сравнению с временем присоединения дезоксирибонуклеотида (2—3 мин), что объясняется наличием объемной триалкилсилильной группы в непосредственной близости от реакционного центра образования межнуклеотидной связи.

Степень превращения на каждой стадии наращивания олигонуклеотидной цепи определяли измерением количества отщепленного при кислотной обработке монометокситриилкатиона спектрофотометрически в видимой области (478 нм). Выходы на стадию 87—95%. Общий выход 23—60%.

Наличие силильной группы в 2'-положении рибозы и щелочелабильность межнуклеотидной связи в смешанных олигонуклеотидах требуют особого внимания к обработке условий деблокирования, выделения и очистки олигомера. Нами использовалась такая последовательность операций:

1) удаление метильной группы с межнуклеотидного фосфата обработкой тиофенолом в триэтиламин и диоксане (1 : 2 : 2, по объему) в течение 1 ч;

2) обработка полимера смесью насыщенный водный аммиак — этанол (3 : 1, по объему) в течение 1,5 ч при 20° С;

3) удаление N-ацильных защит выдерживанием того же аммиачно-спиртового раствора реакционной смеси в течение 18 ч при 55° С;

4) выделение олигомера с *трет*-бутилдиметилсилильными группами обращенно-фазовой ВЭЖХ;

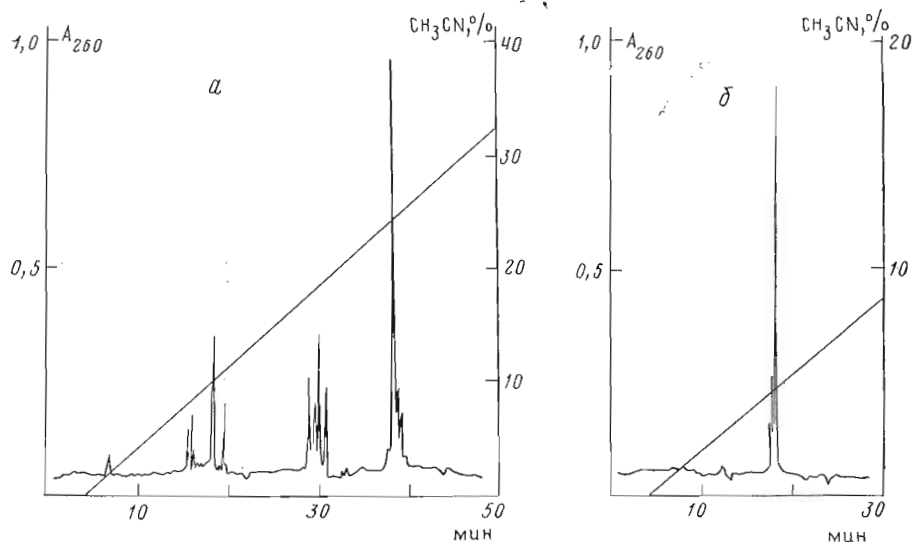


Рис. 1. Выделение декануклеотида (II) с 2'-O-TBDMS-защитными группами (а) и после удаления всех защитных групп (б) обращенно-фазовой ВЭЖХ.

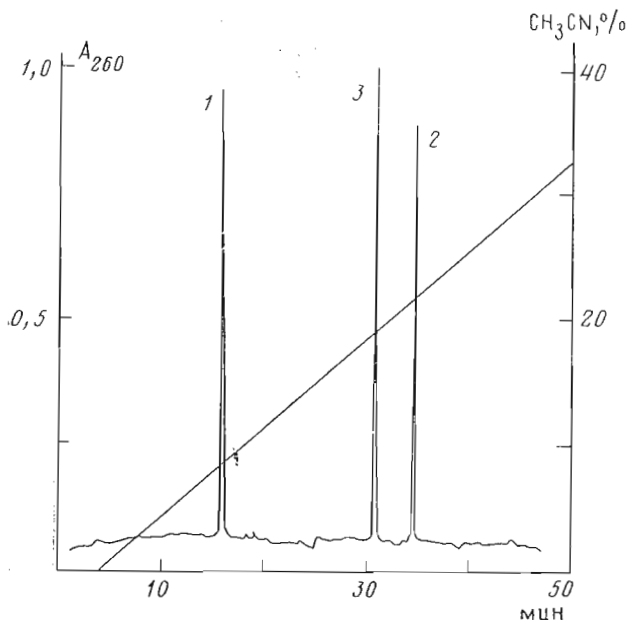


Рис. 2. Хроматографические подвижности 2'-O-TBDMS-защитных олигодезоксирибонуклеотидов (ACCACCGCGCT) (пик 1), MeOTr(ACCACCGCGCT) (пик 2) и уддекануклеотида (IV) (пик 3)

5) удаление алкилсилильных групп 1 М раствором фторида тетрабутил-аммония в тетрагидрофуране (35—40 эквивалентов на силильную группу) в течение 2 ч при 37° С. До и после операции 5 — гель-фильтрация;

6) очистка олигомера обращенно-фазовой или ион-парной ВЭЖХ.

Для выделения из реакционных смесей описанных выше смешанных олигонуклеотидов оказалось удобным использовать гидрофобные свойства TBDMS-групп (по аналогии с выделением соединений с 5'-концевой три-тильной группой). При этом детритилирование олигомеров осуществляли после окончания синтеза в автомате-синтезаторе, а первую обращенно-фазовую ВЭЖХ проводили, выделяя олигонуклеотид с триалкилсилильными защитными группами. Предлагаемый нами метод выделения иллюстрируется рис. 1 и 2.

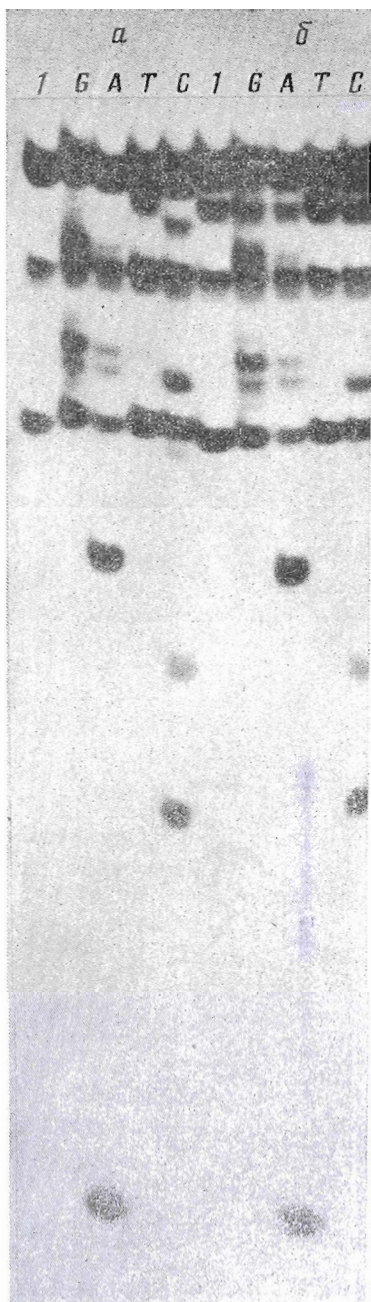


Рис. 3. Анализ нуклеотидной последовательности по Максиму—Гилберту олигонуклеотидов (III) (а) и (IV) (б); дорожка 1 — обработка пиперидином

Рис. 4. Авторадиограмма разделения в 20% ПААГ продуктов ограниченного щелочного гидролиза 0,05 М NaHCO_3 5'- ^{32}P -меченых зондов: 1 — (ACCA)C(CG)C(GCT); 2 — (ACCA)C(CG)C(G)C(T); 3 — (ACCA)C(CG)C(G)C(T); 4 — (ACCA)CC(G)C(G)C(T)



Рис. 3

Рис. 4

Обобщая данные по выделению смешанных олигонуклеотидов, следует отметить, что картина обращенно-фазовой ВЭЖХ ундекануклеотидов (IV) и (V) показывает наличие продуктов постсинтетической деградации цепи олигомеров, что замечено также в последних работах Огилви [8] по синтезу олигорибонуклеотидов. Можно предполагать, что межнуклеотидная связь гидролизуеться после частичного отщепления силильных групп в результате аммиачно-спиртовой обработки. Ставишским показано [12], что *трет*-бутилдиметилсилильная защита 2'-гидроксила устойчива в условиях деблокирования гетероциклических оснований, однако исследование проводилось на динуклеотидах, не имеющих ацильных защит по аминок группам гетероцикла (UpU). Необходимо дополнительное исследование этого вопроса, так как деградация цепи наблюдалась нами в боль-

шей степени на ундекануклеотидах, содержащих рибоцитидин, чем на декануклеотидах, рибозвенья в которых представлены уридином. По-видимому, использование защитных групп, удаляемых с гетероциклических оснований в более мягких условиях (например, ацетильной или феноксиацетильной), должно привести к меньшим потерям целевого продукта в результате обработок реакционных смесей после синтеза

Структуру соединений (I)—(V) подтверждали модифицированным методом секвенирования [13] по Максаму — Гилберту (см., например, рис. 3) и ограниченным щелочным гидролизом (см. рис. 4), что дало возможность подтвердить как нуклеотидную последовательность, так и положение и количество рибонуклеотидных звеньев.

Таким образом, разработан метод, позволяющий получать смешанные олигонуклеотиды в автоматическом режиме с любым соотношением и взаиморасположением рибо- и дезоксирибонуклеотидов в цепи.

Экспериментальная часть

В работе использовали 2'-деоксирибонуклеотиды отечественного производства, цитидин и уридин (Reanal, Венгрия), N-метилимидазол, тетразол, триметилхлорсилан, *трет*-бутилдиметилхлорсилан, фторид тетрабутиламмония, тригидрат (Fluka, Швейцария).

Олигонуклеотидный синтез выполняли на автоматическом ген-синтезаторе «Виктория-4М» производства СКТБ специальной электроники и аналитического приборостроения СО АН СССР.

N,5'-О-Защищенные дезоксирибонуклеотиды синтезировали по стандартным методикам [14].

4-N-Бензоилцитидин получали аналогично ацилированию дезоксирибонуклеозидов с использованием временного блокирования гидроксильных групп триметилхлорсиланом по методике Ти [14].

2'-О-трет-Бутилдиметилсилил-5'-О-монометокситриптил-N-ацилнуклеозиды. N,5'-О-защищенный рибонуклеозид (6 ммоль) высушивали переупариванием в вакууме с абсолютным пиридином, растворяли в 15 мл абс. пиридина, к раствору добавляли 12 ммоль (0,8 г) N-метилимидазола и 6,6 ммоль (1 г) *трет*-бутилдиметилхлорсилана. ТСХ-контроль проводили в системе хлороформ — этилацетат, 85 : 15 (R_f продуктов реакций в данной системе приведены ниже). После окончания реакции к смеси добавляли хлороформ, промывали насыщенным раствором бикарбоната натрия, дважды водой; хлороформные фракции сушили сульфатом натрия, затем упаривали. Перед хроматографией смесь осаждали пентаном. Силилированные производные уридина разделяли колоночной хроматографией на силикагеле в градиенте концентрации гексана (33—25%) в эфире (получено 15% 2',3'-биссилильного (R_f 0,7), 50% 2'-силильного (R_f 0,55) и 25% 3'-силильного (R_f 0,4) производных); силилированные производные цитидина — в градиенте концентрации гексана (50—33%) в этилацетате (получено 5% 2',3'-биссилильного (R_f 0,8), 50% 2'-силильного (R_f 0,65) и 30% 3'-силильного (R_f 0,5) производных).

5'-О-Монометокситриптил-3'-(N,N-диизопропиламидо) метилфосфиты рибо(деоксирибо)нуклеозидов получали аналогично методике Карузерса [9], для рибонуклеозидов время фосфитилирования 10 ч. Выходы 80—95%. Амидофосфиты рибонуклеозидов хроматографировали на колонке с силикагелем в системе этилацетат — хлороформ — триэтиламин, 45 : 45 : 10. ^{31}P -ЯМР-спектр (CDCl_3) для соединения (2a) 148,96 и 150,25 м. д., для (2b) 149,96 м. д.

Полимерный носитель на основе силохрома С-80 модифицировали по методике [10], посадка первого рибозвена осуществлялась в соответствии с работой [11].

Деблокирование, выделение и очистка смешанных олигонуклеотидов. После окончания синтеза олигонуклеотида (5'-концевая монометокситриптильная группа удалена в автомате-синтезаторе) полимерный носитель обрабатывали 1 ч тиофенолом в триэтиламин и диоксане (1 : 2 : 2, по объему), избыток тиофенола удаляли, многократно промывая полимер диокса-

ном, этанолом и эфиром. Далее полимерный носитель заливали смесью насыщенного водного аммиака — этанола (3 : 1, по объему), выдерживали 1,5 ч при комнатной температуре. Раствор отбирали, затем полимер дважды промывали аммиачно-спиртовой смесью, объединенные вытяжки выдерживали 18 ч в запаянной ампуле при 55° С.

Выделение смешанных олигонуклеотидов, содержащих от двух до четырех триалкилсилильных групп, проводили обращенно-фазовой ВЭЖХ на приборе Altex (США) (носитель — Лихросорб С-18 (10 мкм, Merck, ФРГ), размер колонки 4,6 × 250 мм) в градиенте концентрации (0—40%) ацетонитрила в 0,1 М ацетате аммония. Скорость элюции 1 мл/мин, температура 45° С.

Гель-фильтрацию осуществляли на Toyoparl HW-40-Gel (Toyo Soda, Япония); размер колонки 5 × 250 мм. Элюция водой со скоростью 8,5 мл/ч.

Удаление трет-бутилдиметилсилильных групп. Фракции, содержащие олигонуклеотид, упаривали, добавляли 1 М раствор фторида тетрабутиламмония в тетрагидрофуране (35—40 эквивалентов на силильную группу), выдерживали 2 ч при 37° С. Смесью упаривали, проводили гель-фильтрацию и ВЭЖХ (обращенно-фазовый вариант в условиях, описанных выше, в градиенте концентрации (0—12%) ацетонитрила).

Ограниченный щелочной гидролиз смешанных олигонуклеотидов осуществляли в запаянном капилляре в 0,05 М NaHCO₃ в течение 24 мин при 96° С. Реакционную смесь упаривали досуха, растворяли в 80% формамиде, наносили на гель и проводили электрофорез в 20% ПААГ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Метелев В. Г., Крынецкая Н. Ф., Пурмаль А. А., Шабарова З. А. // Биоорганическая химия. 1990. Т. 16. № 4. С. 507—513.
2. Виноградова М. Н., Громова Е. С., Грязнова О. И., Исагулянц М. Г., Кузнецова С. А., Косых В. Г., Шабарова З. А. // Биоорганическая химия. 1987. Т. 13. № 9. С. 1194—1204.
3. Alberts B., Sternglanz R. // Nature. 1977. V. 269. № 5630. P. 655—661.
4. Metelev V. G., Zayakina G. V., Ryabushenko I. L., Krynetskaya N. F., Romanova E. A., Oretskaya T. S., Shabarova Z. A. // FEBS Lett. 1988. V. 226. № 2. P. 232—234.
5. Заякина Г. В., Крынецкая Н. Ф., Метелев В. Г., Шабарова З. А. // Биоорганическая химия. 1987. Т. 13. № 2. С. 266—268.
6. Грязнов С. М., Потапов В. К., Метелев В. Г., Елов А. А., Пурмаль А. А., Шабарова З. А. // Биоорганическая химия. 1986. Т. 12. № 7. С. 988—991.
7. Usman N., Ogilvie K. K., Jiang M.-Y., Cedergren R. J. // J. Amer. Chem. Soc. 1987. V. 109. № 25. P. 7845—7854.
8. Wu T., Ogilvie K. K., Pon R. T. // Nucl. Acids Res. 1989. V. 17. № 9. P. 3501—3517.
9. Varone A. D., Tang Y.-Y., Caruthers M. N. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 10. P. 4051—4061.
10. Волков Е. М., Орецкая Т. С., Потапов В. К. // Химия природных соединений. 1985. № 6. С. 849—850.
11. Потапов В. К., Доре И., Суханова Л. Л., Карасева Е. В., Линардопулос С. // Биоорганическая химия. 1987. Т. 13. № 5. С. 842—844.
12. Stawinski J., Stromberg R., Thelin M., Westman E. // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. № 19. P. 9285—9298.
13. Rosenthal A., Yung R., Hunger H.-D. // Meth. Enzymol. 1987. V. 155. P. 301—331.
14. Jones R. A. // Oligonucleotide synthesis: a practical approach / Ed. M. J. Gait. Oxford, Washington DC: IRL Press, 1984. P. 23—34.

Поступила в редакцию
15.I.1990

F. A. ROMANOVA, T. S. ORETSKAYA, V. V. SUKHOMLINOV, N. F. KRYNETSKAYA,
V. G. METELEV, Z. A. SHABAROVA

THE RNA CLEAVAGE BY HYBRIDASE. II. AUTOMATIC SYNTHESIS OF OLIGO (RIBODEOXYRIBO) NUCLEOTIDE PROBES

Department of Chemistry, M. V. Lomonosov Moscow State University

Several oligo(ribodeoxyribo)nucleotides to be used as probes in the RNase H-induced hydrolyses of 5S ribosomal RNA *E. coli* were synthesized on the Victoria-4M automatic gene synthesizer by the phosphoramidite approach, which allows for introducing ribonucleotides into any position of the oligomer. 2'-Hydroxy function was protected by *tert*-butyldimethylsilyl group whose hydrophobicity simplified isolation of the oligonucleotides by reverse-phased HPLC.