



УДК 577.113.6 : 577.336

© 1991 г.

*В. П. Вейко, К. И. Ратманова, А. С. Осипов,  
М. Т. Буленков, В. В. Пугачев*

**НАПРАВЛЕННОЕ ВВЕДЕНИЕ АМИНОГРУПП  
ПО МЕЖНУКЛЕОТИДНОЙ ФОСФАТНОЙ ГРУППЕ  
ПРИ ТВЕРДОФАЗНОМ СИНТЕЗЕ  
ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ. ПОЛУЧЕНИЕ  
БИОТИНИЛИРОВАННЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ЗОНДОВ**

*Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Москва*

Предложен вариант твердофазного синтеза олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих остатки, несущие алифатическую аминогруппу, введенные по межнуклеотидному фосфодиэфирному узлу. Введение аминогрупп осуществляли по заранее определенному положению непосредственно во время синтеза олигодезоксирибонуклеотида. Показано, что полученные аминоалкильные производные олигонуклеотидов могут быть использованы для получения нерадиоактивно меченных зондов.

Одной из областей применения синтетических олигодезоксирибонуклеотидов является создание зондов, используемых как в медицинской диагностике, так и при проведении научных исследований в молекулярной биологии [1, 2]. Основное преимущество таких зондов по сравнению с ДНК-зондами заключается в возможности обнаружения точечных мутаций, что особенно существенно при выявлении ряда генетических заболеваний.

В качестве репортерных в олигонуклеотидных зондах могут выступать радиоактивные или флуоресцентные соединения, красители, группы, выявляемые под действием ферментативных систем (биотин), ферменты (щелочная фосфатаза, пероксидаза) [1]. В настоящее время внимание исследователей привлечено к использованию нерадиоактивно меченных олигонуклеотидов. Это обусловлено достаточно высокой чувствительностью, стабильностью и безопасностью при работе с такими зондами [3].

Как правило, введение репортерных групп осуществляли модификацией гетероциклических оснований либо модификацией 3'- или 5'-конца олигонуклеотида [4, 5]. Эти методы довольно трудоемки, дорогостоящи, многостадийны и зачастую не позволяют использовать модифицированный олигонуклеотид для дальнейших ферментативных реакций *in vitro*, что существенно сужает круг задач, решаемых с помощью олигонуклеотидного зонда.

Ранее мы сообщали о синтезе биотинилированного олигодезоксирибонуклеотидного зонда [6], полученного модификацией межнуклеотидной фосфатной группы непосредственно в ходе твердофазного наращивания олигонуклеотидной цепи. Однако не все репортерные группы могут быть подвергнуты обработке реагентами, используемыми на стадиях конденсации и при деблокировании олигонуклеотидной цепи. Все это предопределило актуальность разработки эффективного метода получения олигодезоксирибонуклеотидов, модифицированных по межнуклеотидным фосфатным группам. В качестве модифицирующего реагента нами был выбран алифатический диамин, позволяющий получить устойчивую связь по межнуклеотидному фосфатному узлу и одновременно ввести алифатическую аминогруппу, химические свойства которой в достаточной степени отли-

чаются от потенциально активных центров в составе олигодезоксирибонуклеотида. Это дало возможность в последующем провести избирательную модификацию выделенного олигонуклеотида. Кроме того, методология должна быть такой, чтобы синтез не был ограничен местоположением модифицируемой фосфатной группы в олигонуклеотидной цепи, что необходимо при получении различного рода адресованных реагентов на основе олигонуклеотидов.

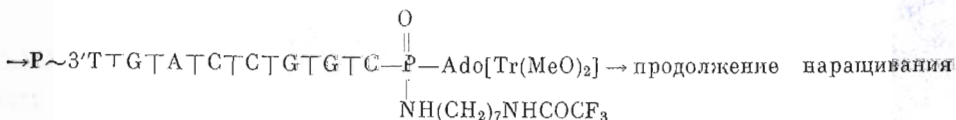
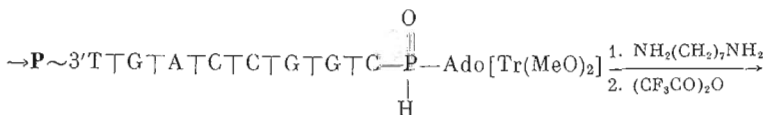
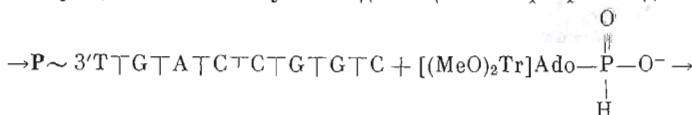
В настоящей работе предлагается вариант синтеза модифицированных олигонуклеотидов, содержащих алифатическую аминогруппу, введенную по межнуклеотидной фосфатной группе в процессе твердофазного наращивания олигонуклеотидной цепи (см. схему проведения синтеза). После наращивания олигонуклеотидной цепи по фосфитамидной схеме [7] до места введения модификации проводили конденсацию очередного нуклеотидного звена по Н-фосфонатной схеме [8]. Введение аминогруппы осуществляли обработкой полимерного носителя 0,1 М раствором 1,7-гептамтилендиамина в присутствии иода либо с использованием реакции Атертона—Тодда [9]. Аналогичные превращения были описаны при получении 5'-аминопроизводных олигонуклеотидов [4]. Предварительно проведенные эксперименты показали, что такая реакция проходит практически с количественным выходом, что согласуется с данными работ [10, 11].

Для предотвращения побочных процессов, которые могли бы протекать по аминогруппе при дальнейшем наращивании олигонуклеотидной цепи, введенные аминогруппы блокировали ацетильными остатками (кепировали). Выбор трифторацетильной защитной группы был обусловлен ее лабильностью в процессе стандартной обработки олигонуклеотидной цепи концентрированным водным раствором аммиака. После проведения кепирования синтез продолжали по фосфитамидной или Н-фосфонатной схеме до получения целевого олигонуклеотида.

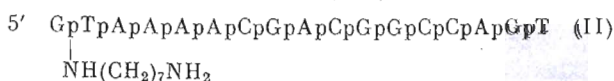
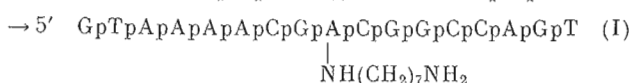
В качестве модельного олигонуклеотида был выбран «универсальный праймер» d(GTAAAACGACGCCAGT), используемый при определении первичной последовательности ДНК по Сэнгеру [12]. Введение аминогруппы осуществляли как по центральному, так и по 5'-концевому фосфодиэфирным узлам олигонуклеотидной цепи (схема).

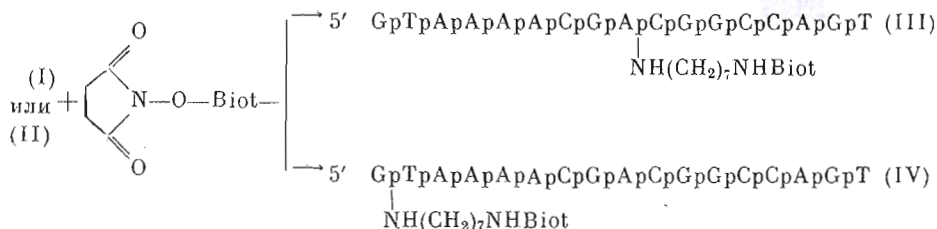
Схема проведения модификации межнуклеотидной фосфатной группы и получения биотинилированных зондов

P ~ 3' T → наращивание олигонуклеотидной цепи по фосфитамидной схеме →



олигонуклеотидной цепи по фосфитамидной или Н-фосфонатной схеме  $\xrightarrow{NH_3}$





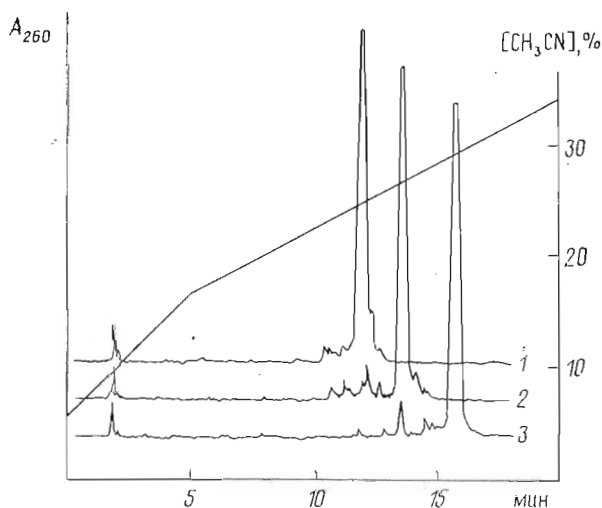
P — полимерный носитель, Biot — остаток биотина, T — цианэтилированная межнуклеотидная фосфатная группа, префикс «d» и обозначения защитных групп гетероциклических оснований дезоксирибонуклеотидов опущены

Выделение синтезированных олигодезоксирибонуклеотидов (I) и (II), несущих модификацию по межнуклеотидной фосфатной группе, проводили препаративным электрофорезом в ПААГ. Электрофоретическая подвижность модифицированных олигонуклеотидов (I) и (II) одинакова, но существенно меньше по сравнению с соответствующим немодифицированным олигомером [13], что упрощает процедуру их идентификации и выделения. Гомогенность полученных препаратов подтверждали обращенно-фазовой ВЭЖХ (рисунок).

С целью проверки эффективности предлагаемой методологии на основе синтезированных модифицированных олигонуклеотидов были получены биотинилированные зонды. Введение биотинового остатка осуществляли обработкой выделенных аминокислотных олигонуклеотидов раствором N-оксисукцинимидного эфира биотина. Биотинилированные олигонуклеотиды (III) и (IV) выделяли с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ (рисунок).

Синтезированные биотинилированные олигонуклеотиды применяли в качестве зондов при проведении дот-гибридизации [14] с одноцепочечной ДНК фага M13 (mp18), закрепленной на нитроцеллюлозных фильтрах. Чувствительность определения ДНК составила 10 пг при отсутствии фоновой сорбции на 1 мкг контрольной ДНК (ДНК тимуса теленка). Эти данные отвечают лучшему уровню чувствительности, достигнутому к настоящему времени при других способах нерадиоактивного мечения олигонуклеотидов [15].

При введении [<sup>32</sup>P]фосфатной группы по 5'-концу полученных биотинилированных олигодезоксирибонуклеотидов с помощью полинуклеотидкиназы фага T4 нами было обнаружено, что в отличие от модифицированного по центральному фосфатному остатку олигонуклеотида его изомер, не-



Обращенно-фазовая ВЭЖХ очищенных олигонуклеотидов: немодифицированный 17-звенный олигодезоксирибонуклеотид (I); аминокислотный олигонуклеотид (II) (2); биотинилированный аминокислотный олигонуклеотид (IV) (3). Условия разделения: колонка Силасорб С18 (3,3 × 150 мм), градиент концентрации ацетонитрила в 0,1 М ацетате аммония. Скорость элюции 0,4 мл/мин



сущий модификацию по 5'-концевому фосфодиэфирному узлу, не вступал в реакцию ферментативного фосфорилирования.

Модифицированные олигодезоксирибонуклеотиды (III) и (IV) были использованы также при определении первичной последовательности ДНК. В качестве контроля в этом случае применяли немодифицированный «универсальный праймер». При этом оба биотинилированных олигонуклеотида (III) и (IV) обеспечивали праймирование и позволяли однозначно определить первичную структуру исследуемого участка ДНК.

Таким образом, предложенная методология позволяет быстро и эффективно синтезировать модифицированные по межнуклеотидной фосфатной группе олигодезоксирибонуклеотиды, которые могут быть использованы при получении нерадиоактивно меченных зондов, а также олигонуклеотид-адресованных реагентов.

### Экспериментальная часть

В работе использовали ДНК-полимеразу I *E. coli* (фрагмент Кленова) и полинуклеотидкиназу фага T4 (Pharmacia, Швеция),  $\alpha$ - и  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-меченные нуклеозидтрифосфаты (Amersham, Англия), N-метилимидазол и ангидрид трифторуксусной кислоты (Merck, ФРГ), N-оксисукцинимидный эфир биотина, ацетонитрил, 1,2-дихлорэтан (Fluka, Швейцария), 1,7-гептаметилендиамин (Ferak, ФРГ). Все остальные реагенты поставлены фирмой Milligen/Biosearch (США).

Олигодезоксирибонуклеотиды синтезировали по фосфитамидной схеме с использованием синтезатора Milligen/Biosearch (США). Конденсацию по Н-фосфонатной схеме и последующую модификацию межнуклеотидного фосфатного узла проводили в ручном режиме. Деблокирование и удаление нуклеотидного материала с полимера осуществляли обработкой концентрированным водным раствором аммиака (отщепление от полимера при 50° С в течение 1 ч с последующим выдерживанием фильтрата в течение 12—16 ч в запаянной ампуле при 50° С). Хроматографический анализ и выделение олигонуклеотидов осуществляли на хроматографе Gilson (Франция).

*Модификация межнуклеотидной фосфатной группы.* После проведения конденсации по Н-фосфонатной схеме полимерный носитель отмывали от избытка реагентов абсолютным ацетонитрилом, пиридином и подавали в колонку 0,1 М раствор 1,7-гептаметилендиамина в смеси пиридин — четыреххлористый углерод (5 : 1). Реакцию проводили в течение 25—30 мин, после чего полимер промывали пиридином, смесью пиридин — вода (1 : 1), пиридином, ацетонитрилом. Введенные аминогруппы блокировали смесью ацетонитрил — N-метилимидазол — ангидрид трифторуксусной кислоты (10 : 1 : 1) в течение 2 мин. После отмывки реагентов синтез был продолжен по фосфитамидной схеме до получения целевой последовательности. Аналогично осуществляли введение 1,7-гептаметилендиамина при использовании иода в качестве окисляющего агента (подача в колонку 0,1 М раствора диамина в 0,1 М растворе иода в пиридине. Время реакции 30 мин). Предварительные эксперименты, проведенные на примере динуклеозидфосфата, показали, что модификация в обоих случаях проходит практически количественно.

*Выделение аминоклинонуклеотидов (I) и (II)* проводили с помощью препаративного электрофореза в денатурирующем 20% ПААГ. Олигонуклеотиды извлекали из геля электроолюцией на DEAE-целлюлозу (DE-81). Гомогенность выделенных препаратов подтверждали обращенно-фазовой ВЭЖХ (рисунок).

*Введение остатка биотина по межнуклеотидным алифатическим аминоклинонуклеотидным.* К раствору 0,5—0,7 ОЕ<sub>260</sub> аминоклинонуклеотида (I) или (II) в 50 мкл буферного раствора (0,25 М трис-НСl, рН 8,0) добавляли 50 мкл свежеприготовленного 15 мМ раствора N-оксисукцинимидного эфира биотина в N,N'-диметилформамиде. Смесь выдерживали 2,5—3 ч при 20° С (анализ ВЭЖХ), после чего добавляли 500 мкл воды и удаляли избыток реагентов упариванием на ротационном испарителе. Полученную смесь хроматографировали на обращенно-фазовой колонке, ис-

пользуя градиент концентрации ацетонитрила. Выделенные биотинилированные олигонуклеотиды лиофилизировали из воды. Выход биотинилированных олигонуклеотидов составил 85—90%.

*Гибридизация биотинилированных олигодезоксирибонуклеотидов (III) и (IV).* Гибридизацию биотинилированных олигонуклеотидов с односторонней ДНК фага M13 (mp18) проводили с использованием нитроцеллюлозных мембран (Amersham, Англия). ДНК иммобилизовали на фильтрах прогревом при 80° С (2 ч).

Предгибридизацию осуществляли в буфере, содержащем 5 × SSC (0,75 М NaCl, 0,075 М цитрат натрия), 0,05 М натрийфосфат (рН 7,2), 5 × раствор Денхардта (0,1% фикол 400, 0,1% поливинилпирролидон, 0,1% бычий сывороточный альбумин), 0,1% додецилсульфат натрия и 10 мкг/мл мРНК, при 37° С в течение 1 ч. Гибридизацию проводили в том же буфере в присутствии биотинилированного зонда (25 пг/мл) при 37° С в течение 2 ч.

После гибридизации фильтры отмывали в буфере с 2 × SSC, 0,2% додецилсульфатом натрия при 37° С (2 × 15 мин) и затем при 50° С (2 × 5 мин). Колориметрическое определение биотина проводили с использованием конъюгата стрептавидина и щелочной фосфатазы (Calbiochem, США) [16].

*Определение первичной последовательности ДНК с использованием биотинилированных олигонуклеотидов в качестве праймеров* проводили по Сэнгеру [12]. Для детекции применяли радиоавтографию.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бадашкева А. Г., Зарытова В. Ф. // Молекулярн. биология. 1989. Т. 23. № 5. С. 1221—1226.
2. Schafer R., Zischler H., Birsner U., Becker A., Epplen J. T. // Electrophoresis. 1988. V. 9. P. 369—374.
3. Viscidi R. P., Yolken R. G. // Mol. Cell. Probes. 1987. V. 1. P. 3—14.
4. Башук О. С., Зарытова В. Ф., Левина А. С. // Биооргани. химия. 1988. Т. 14. № 5. С. 606—614.
5. Roget A., Bazin H., Teoule R. // Nucl. Acids Res. 1989. V. 17. № 19. P. 7643—7651.
6. Вейко В. П., Ратманова К. И., Осипов А. С., Вейко Н. Н., Карпухин А. В., Дебабов В. Г. // Докл. АН СССР. 1990. Т. 313. № 1. С. 214—216.
7. Beaucage S. L., Caruthers M. H. // Tetrahedron Lett. 1981. V. 22. № 20. P. 1859—1862.
8. Froehler B. C., Matteucci M. D. // Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. № 4. P. 469—472.
9. Aterton F. R., Openshaw H. T., Todd R. R. // J. Chem. Soc. 1945. № 2. P. 660—663.
10. Froehler B. C., Ng P., Matteucci M. // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. № 11. P. 4831—4839.
11. Agarwal S., Goodchild J., Civeira M. P., Thornton A. H., Sarin P. S., Zamecnik P. C. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. P. 7079—7083.
12. Sanger R., Nicklen S., Coulson A. R. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. P. 795—805.
13. Kempe T., Sundquist W. I., Chow F., Hu S. L. // Nucl. Acids Res. 1985. V. 13. № 1. P. 45—57.
14. Маннатиус Т., Фриш Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1986. С. 303—308.
15. Cook A. F., Vuocolo E., Brakel C. L. // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. № 9. P. 4077—4095.
16. Chan V. T.-W., Fleming K. A., Mc. Gee J. O. D. // Nucl. Acids Res. 1985. V. 13. № 22. P. 8083—8091.

Поступила в редакцию  
11.V.1990

После доработки  
28.VI.1990

V. P. VEIKO, K. I. RATMANOVA, A. S. OSIPOV, M. T. BULENKOV,  
V. V. PUGACHEV

#### DIRECTED INTRODUCTION OF AMINO GROUP INTO INTERNUCLEOTIDE PHOSPHATE OF OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDES. SYNTHESIS OF BIOTINYLATED OLIGONUCLEOTIDES

*All-Union Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow*

An efficient procedure for solid-phase synthesis of amino-oligonucleotides has been developed, leading to direct introduction of an aliphatic primary amino group at the internucleotide phosphate. Amino-oligonucleotides were successfully used for preparation of biotinylated oligonucleotides.