



УДК 577.113.6

© 1993 Н. Н. Полушин, И. Н. Пашкова,  
О. Г. Чахмахчева, В. А. Ефимов

## ПРИМЕНЕНИЕ ГИДРАЗИНА ДЛЯ БЫСТРОГО ДЕБЛОКИРОВАНИЯ СИНТЕТИЧЕСКИХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва*

Разработана быстрая процедура удаления защитных групп с синтетических олигодезоксирибонуклеотидов с применением растворов гидразина. Сочетание этой процедуры с использованием изопропоксиацетильной группы для блокирования аминоконцев гетероциклических оснований мононуклеотидов и оксалильной сложноэфирной связи для присоединения первого мономера к носителю позволяет сократить до нескольких минут время, необходимое для полного деблокирования олигонуклеотида.

До последнего времени наиболее длительными процедурами в автоматическом синтезе олигонуклеотидов были деблокирование и очистка целевых соединений. Существуют два очевидных подхода к увеличению скорости процесса удаления защитных групп: применение более эффективных деблокирующих реагентов и использование для синтеза мономеров с легкоудаляемыми защитными группами.

Недавно нами был описан быстрый способ удаления защитных групп с синтетических олигонуклеотидов, основанный на применении спиртовых растворов моноэтаноламина (МЕА) и гидразина (Hz) [1, 2]. В дополнение к этому для защиты гетероциклических оснований цитидина, аденозина и гуанозина была использована более лабильная, чем стандартные бензоильная, анизоильная и изобутирильная группы, изопропоксиацетильная N-защитная группа (ipa) [3]. Все это позволило значительно ускорить постсинтетические процедуры (табл. 1).

Как можно видеть из табл. 1, разбавленный раствор гидразина удаляет ipa-защитные группы с оснований нуклеозидов и SE-защитную группу с межнуклеотидного фосфата менее чем за 1 мин при комнатной температуре. Смесь моноэтаноламина и метанола также очень эффективна и удаляет защитные группы за 15 мин. Однако, как показали эксперименты, разрыв сложноэфирной сукцинильной связи, которая обычно используется для присоединения олигонуклеотида к твердому носителю, требует значительно большего времени: 10–15 мин при 20° С в случае использования раствора гидразина (рис. 1) и 15–20 мин при 70° С в случае использования моноэтаноламина.

Следующим логическим шагом явилось использование более лабильной связи между первым звеном растущей олигонуклеотидной цепи и носителем. Недавно Летзингером и сотр. [4] было предложено использовать с этой целью оксалильную сложноэфирную группировку. Мы проверили устойчивость этой связи к действию гидразина и моноэтаноламина (табл. 1). Как показали наши эксперименты,

Сокращения: ОФ ВЭЖХ — обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография; реагенты: МЕА — моноэтаноламин, Hz — гидразин, ТЕАВ — бикарбонат триэтиламония; защитные группы: SE —  $\beta$ -цианэтильная, ipa — изопропоксиацетильная, suc — сукцинильная, bz, Bz — бензоильная, ib — изобутирильная, l — амино, СРГ — стеклянные шарики с контролируемым диаметром пор.

Скорость удаления защитных групп и отщепления от носителя при обработке соединений спиртовыми растворами Hz и MEA при 20° С

Соединение	Время полного деблокирования, мин	
	Hz — MeOH (1 : 20)	MEA — MeOH (1 : 4)
d[(MeO) <sub>2</sub> Tr]ipaA	<0,5	2,0
d[(MeO) <sub>2</sub> Tr]ipaC	<0,5	2,0
d[(MeO) <sub>2</sub> Tr]ipaG	<1,0	10
d[(MeO) <sub>2</sub> Tr]Tp(CE)T(Bz)	<1,0	15
d[(MeO) <sub>2</sub> Tr]T-oxalyl-CPG	1,0	1,0
d[(MeO) <sub>2</sub> Tr]ipaG-oxalyl-CPG	1,0	2,0
d[(MeO) <sub>2</sub> Tr]ipaC-oxalyl-CPG	1,0	2,0

Таблица 2

Олигодезоксирибонуклеотиды, полученные и деблокированные по предлагаемым методикам

Номер соединения	Структура	Длина
I	d(CTCTCTCTCTC)	12
II	d(ATATATATATAT)	12
III	d(GTGGTGGTGGTGTGT)	15
IV	d(CCCCCCCCCCCCCCCC)	16
V	d(GGGAGACTCGAGTATTTT)	18
VI	d(TTGCGCATATGTATATCTCTTCTT)	25
VII	d(GATCCTCTTTAATTTTTAATAAGGTAC)	27
VIII	d(TGGATCCTCTTTAATTTTTAATAAGGTAC)	29
IX	d(TTGGTACCTCAGATGGAGGCTGGCAAAGTCATTAGTATC)	39
X	d(TGTCGACTTTAAGAAAGGAGATATAATAATGAAAAAGTACSTTATT)	45
XI	d(TTAGATCTTTAAGAAGGAGATATAATAATGAAAAAGTACSTTATT)	45

полное отщепление нуклеозида от носителя происходило в течение 1 мин при обработке смесью Hz — MeOH (1 : 20) и в течение 2 мин при обработке смесью MEA — MeOH (1 : 4) при 20° С (табл. 1).

В случае удаления защитных групп с олигонуклеотидов после окончания наращивания цепи, которое проводилось стандартным амидофосфитным или Н-фосфонатным методом, 5'-концевую диметокситритильную группу удаляли прямо на носителе, а затем проводили дальнейшее деблокирование. Носитель с присоединенным к нему олигонуклеотидом обрабатывали при 20° С либо смесью Hz — MEA — MeOH (1 : 5 : 5) в течение 3—4 мин (А), либо смесью MEA — MeOH (1 : 1) в течение 15 мин (Б). Следует отметить, что в условиях А MEA вводился для увеличения растворимости деблокированных олигонуклеотидов, а более жесткая обработка, чем для мономеров, была использована для обеспечения гарантированной полноты удаления защитных групп со всех функций олигонуклеотида. В табл. 2 приведены структуры олигодезоксирибонуклеотидов, полученных и деблокированных по предлагаемым методикам.

На рис. 2 показана типичная картина выделения целевых олигонуклеотидов электрофорезом в денатурирующем ПААГ, деблокирование которых проводили в различных условиях. Видно, что деблокирование с помощью гидразина или моноэтаноламина дает практически те же результаты, что и обработка аммиаком. При этом наблюдается минимальное количество побочных продуктов, т. е. оли-

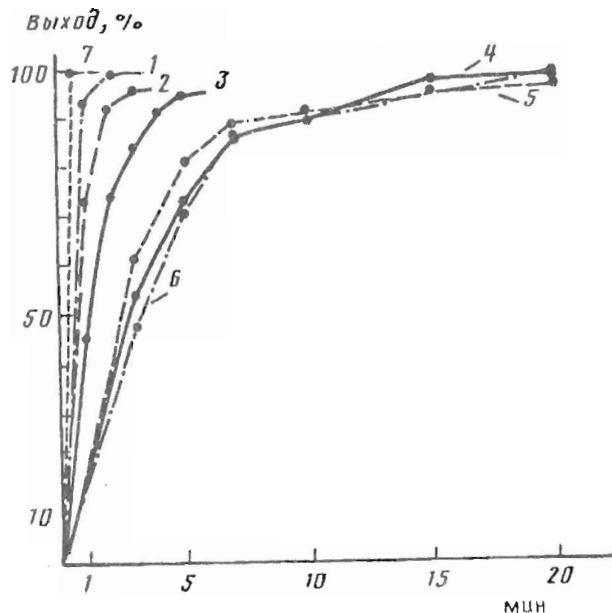


Рис. 1. Удаление N-ацильных защитных групп с  $d[(\text{MeO})_2\text{Tr}]bzA$  (1),  $d[(\text{MeO})_2\text{Tr}]bzC$  (2),  $d[(\text{MeO})_2\text{Tr}]ibG$  (3) и O-сукцинильной группы с  $d[(\text{MeO})_2\text{Tr}]bzA\text{-suc-CPG}$  (4),  $d[(\text{MeO})_2\text{Tr}]ibG\text{-suc-CPG}$  (5),  $d[(\text{MeO})_2\text{Tr}]bzC\text{-suc-CPG}$  (6), а также CE-фосфатзащитной и Bz-группы с динуклеотида  $d[(\text{MeO})_2\text{Tr}]Tp(\text{CE})T(\text{Bz})$  (7) действием смеси Hz — MeOH (1 : 20) при комнатной температуре

гонуклеотидов, содержащих в своем составе модифицированные по гетероциклам мономеры.

Известно, что одной из возможных побочных реакций при обработке олигонуклеотидов гидразином является разрушение пиримидиновых оснований [5]. Однако скорость протекания этого побочного процесса зависит от условий проведения реакции [2]. Например, смесь гидразина с водой (2 : 1) быстро разрушает цитозиновое ядро в дезоксицитидине (период полураспада 4,8 ч при 20° С). В то же время эта реакция проходит очень медленно в смеси гидразина с метанолом (1 : 6), и за 10—20 мин, требующиеся для полного деблокирования олигонуклеотида, не обнаруживается какой-либо деградации цитозинового ядра.

Другой наиболее вероятной побочной реакцией, приводящей к модификации цитидина при обработке гидразином, является образование N<sup>4</sup>-аминозамещенного производного. Эта реакция в значительной степени протекает при удалении N-бензоильной защитной группы с остатков дезоксицитидина (схема). Однако при применении лабильной ipa-группы для защиты экзоциклической аминогруппы нам не удалось обнаружить на уровне мономеров подобных побочных продуктов с помощью ТСХ на силикагеле. Для того чтобы показать отсутствие модификации на уровне олигонуклеотидов, нами был осуществлен синтез  $dC_{16}$  (IV) как с использованием стандартной бензоильной защитной группы для NH<sub>2</sub>-функции, так и с применением более лабильной ipa-группы; олигонуклеотиды деблокировали как аммиаком, так и гидразином. При электрофорезе в ПААГ наименее гомогенная зона олигонуклеотидов наблюдалась при обработке стандартно блокированного олигонуклеотида гидразином (рис. 3). В случае олигонуклеотида с ipa-защитной группой после удаления последней наблюдалась практически гомогенная полоса целевого соединения, электрофоретическая подвижность которой полностью совпадала с подвижностью контрольного образца. Во всех случаях зоны, соответствующие 16-звенному олигонуклеотиду, элюировали из геля и после обессоли-

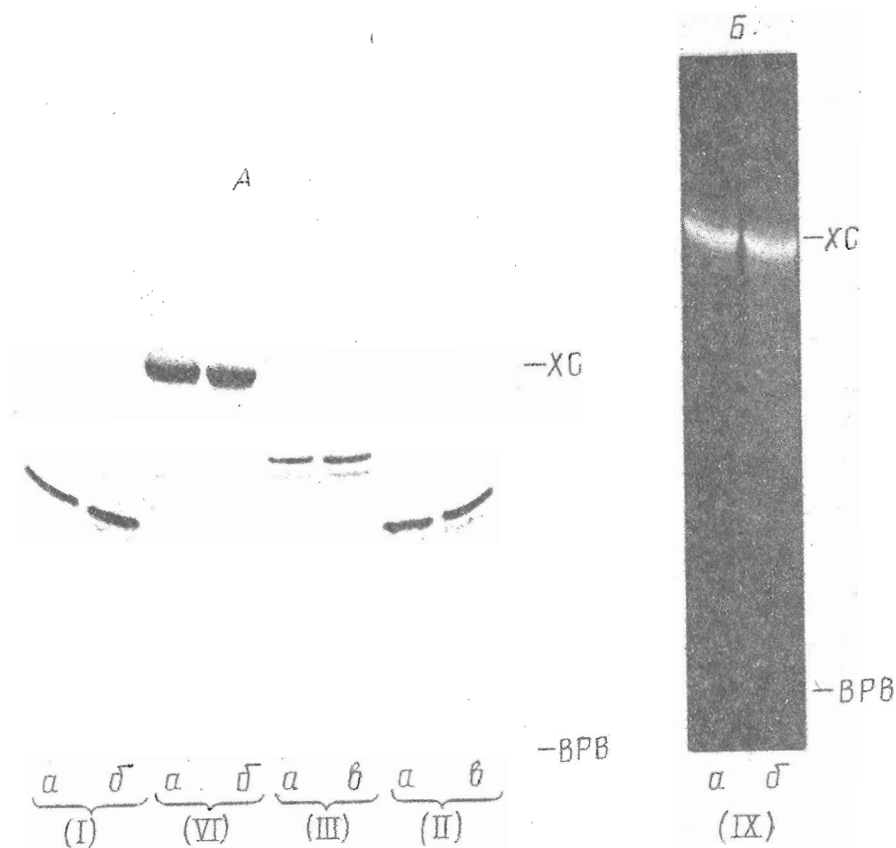
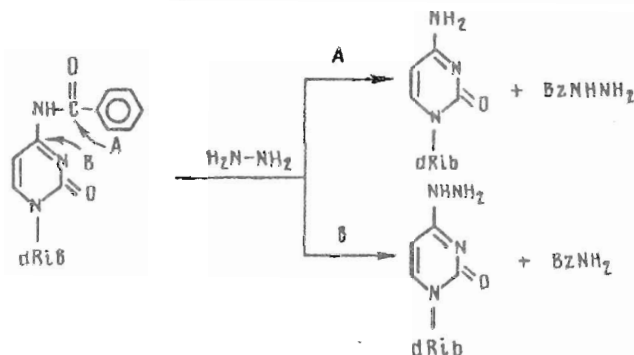


Рис. 2. Электрофорез в ПААГ, содержащем 7 М мочевины, реакционных смесей, полученных после удаления защитных групп с использованием  $\text{Hz}$  (а),  $\text{NH}_3$  (б) или MEA (в) с олигонуклеотидов: А — (I), (VI), (III) и (II) (фотография сделана в отраженном УФ-свете с использованием в качестве подложки пластинки с силикагелем, содержащим индикатор  $\text{UV}_{254}$ ); Б — (IX) (фотография сделана в УФ-свете после прокрашивания геля бромистым этидием). Отмечено положение в геле маркерных красителей — бромфенолового синего (BPB) и ксиленцианола FF (XC)

вания продукты анализировали ОФ ВЭЖХ (рис. 4), которая также показала гетерогенность целевого 16-мера при использовании бензоильной защитной группы.



Дополнительное доказательство отсутствия модификации при удалении ipa-групп гидразином было получено после исчерпывающего гидролиза всех образцов  $\text{dC}_{16}$  фосфодиэстераз змеиного яда с последующим анализом гидролизатов ОФ ВЭЖХ (рис. 5). В противоположность этому в случае  $\text{dC}_{16}$ , синтезированного из

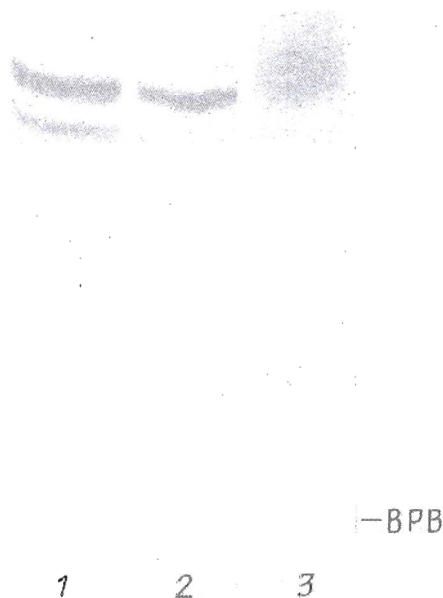


Рис. 3. Электрофорез в 20% ПААГ реакционных смесей синтеза  $dC_{16}$  (IV), полученных после удаления защитных групп. Синтез проводился с использованием стандартных защитных групп, которые удаляли обработкой аммиаком (1) или  $H_2$  (3), а также с использованием ipa-защитной группы и оксалильной связи с носителем, которые удаляли обработкой  $H_2$  (2). Фотография в отраженном УФ-свете

$N^4$ -бензоилированных мономеров и деблокированного гидразином, присутствует небольшой дополнительный пик, соответствующий по времени выхода побочному продукту  $dC^{NH_2}$ . Анализ ОФ ВЭЖХ продуктов ферментативного расщепления ряда синтетических олигонуклеотидов, последовательности которых приведены в табл. 2, показал, что и в случае других гетероциклических оснований при обработке гидразином в вышеописанных условиях модификаций практически нет.

Таким образом, в результате проведенных нами экспериментов были отработаны варианты синтеза олигонуклеотидов  $\beta$ -цианэтильным амидофосфитным методом и  $H$ -фосфонатным методом, в которых в качестве мономеров были взяты соответствующие производные  $5'$ - $O$ -диметокситритилтимидина,  $5'$ - $O$ -диметокситритил- $N$ -изопропоксиацетилдезокситидина, -аденозина и -гуанозина, а в качестве твердого носителя — стеклянные шарики с контролируемым диаметром пор, первый нуклеозид к которому присоединялся с помощью оксалильной сложноэфирной связи.

Следует подчеркнуть, что разработанная процедура позволяет автоматизиро-

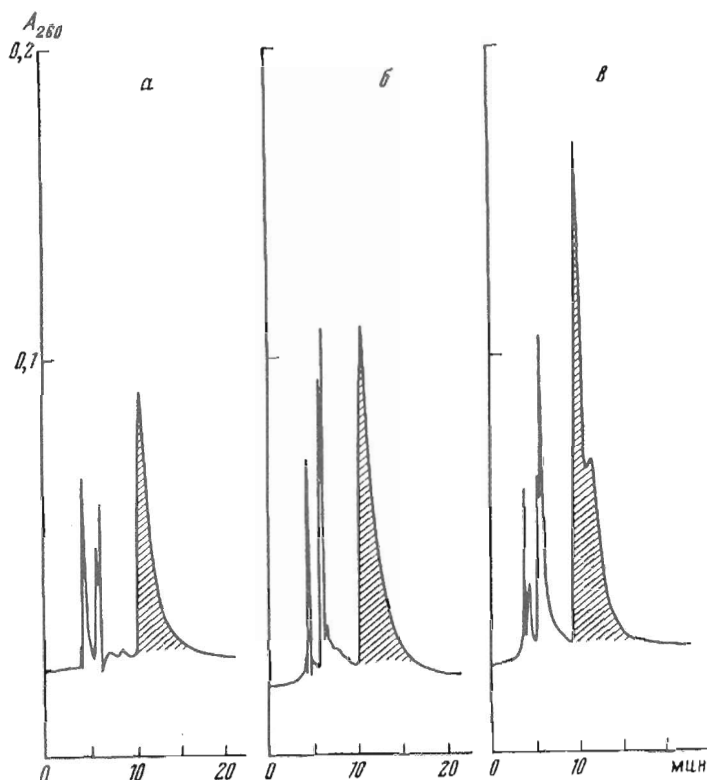


Рис. 4. ОФ ВЭЖХ в 10% водном ацетонитриле в 0,1 М фосфатном буфере (рН 5,5) деблокированного олигонуклеотида  $dC_{16}$  после выделения из ПААГ. Условия синтеза и деблокирования см. в подписи к рис. 3 (а — 1, б — 2, в — 3)

вать стадию деблокирования целевого олигонуклеотида после окончания его синтеза и проводить ее прямо в синтезаторе.

Полученные этим методом олигонуклеотиды были успешно использованы с различными целями: как праймеры при секвенсе ДНК, для химико-ферментативного синтеза генов, как молекулярные зонды для идентификации фрагментов нуклеиновых кислот, как адаптеры и линкеры и т. д.

### Экспериментальная часть

Гидразин (Aldrich, США) и моноэтаноламин (Реахим) перегоняли перед использованием, метанол (х. ч.) абсолютировали перегонкой над магнием. 5'-Диметокситритил-N-изопропоксиацетилнуклеозид-3'- $\beta$ -цианэтиламинофосфиты и N-фосфонаты нуклеозидов получали как описано в работах [3, 6].

Носители на основе стеклянных шариков (long chain alkyl amine controlled pore glass, Pierce, США) функционализировали до содержания 20—35 мкмоль нуклеозида/г как описано ранее [4].

Олигодезоксирибонуклеотиды синтезировали  $\beta$ -цианэтильным амидофосфитным или N-фосфонатным методом на синтезаторе фирмы Applied Biosystems (США), модель 381А, в масштабе 1 или 0,2 мкмоль [1, 7]. Для синтеза использовали растворители той же фирмы.

Выделение олигонуклеотидов после удаления защитных групп осуществляли электрофорезом в 10 — 20% ПААГ, содержащем 7 М мочевины [8, 9]. ОФ ВЭЖХ проводили на хроматографе Altex-332 (США) со скоростью потока 1 мл/мин на колонке Ultrasphere ODS ( $4,6 \times 250$ , 5 мкм, Beckman, США).

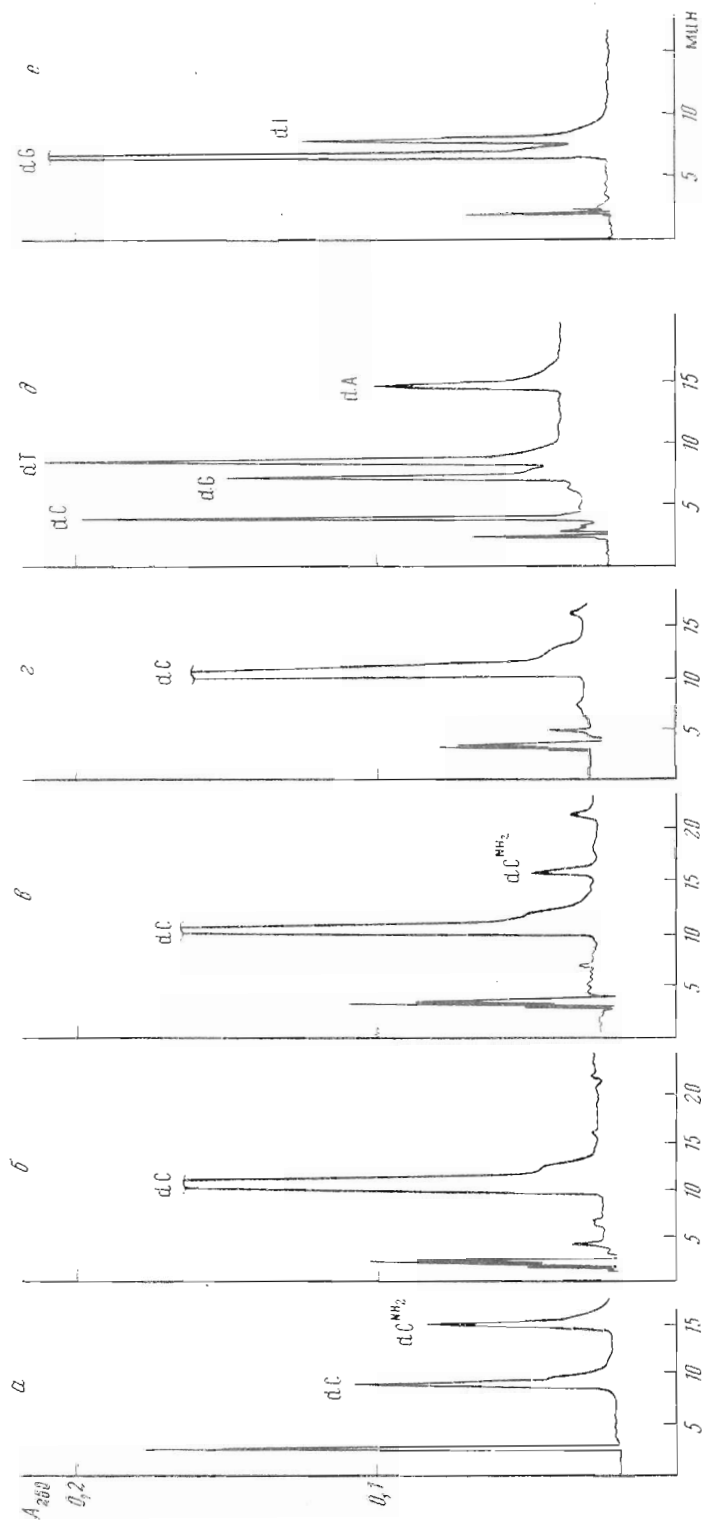


Рис. 5. ОФ ВЭЖХ продуктов гидролиза фосфоэстераз с змеиного яда с последующей обработкой щелочной фосфатазой: олигонуклеотида (V), полученного с применением В<sub>2</sub>-защитной группы и деблокированного Нз (e) или аммиаком (z) и полученного с применением ира-защитной группы и деблокированного Нз (б), а также контрольной смеси dC и его N4-аминопроизводного (d); олигонуклеотида (dI), деблокированного Нз (d), и олигонуклеотида (III), деблокированного МВА. (e). В качестве элюента использовался 10% метанол в 0,1 М водном ТЕАВ (рН 8, 0)

Для обессоливания олигонуклеотидов использовали колонки NAP-10 и NAP-25 (Pharmacia, Швеция), соединения элюировали 0,05 М ТЕАВ. ТСХ проводили на пластинках Kieselgel 60 F254 (Merck, ФРГ) в системе хлороформ — метанол (9 : 1).

Для определения скорости удаления изопропоксиацетильной и  $\beta$ -цианэтильной защитных групп к 200 мкл 0,04—0,06 М раствора деблокируемого соединения,  $d[(\text{MeO})_2\text{Tr}]p\text{ri}a\text{Nuc}$  или  $d[(\text{MeO})_2\text{Tr}]T(\text{CE})T(\text{Bz})$ , в метаноле прибавляли 200 мкл смеси гидразин — метанол в соотношении 1 : 10 или МЕА — метанол (1 : 1). Через фиксированные промежутки времени отбирали аликвоты по 10 мкл реакционной смеси и анализировали при помощи ТСХ. Зоны исходного и деблокированного соединений вырезали и помещали в 3% раствор трифторуксусной кислоты в ацетонитриле. Через 1 ч определяли величину поглощения при 498 нм и рассчитывали выход (в процентах). На основании полученных результатов определяли время прохождения реакции.

Для определения скорости разрыва оксалильной связи к 25—30 мг функционализированного носителя  $d[(\text{MeO})_2\text{Tr}]p\text{ri}a\text{Nuc-oxalyl-CPG}$  (посадка 20—35 мкмоль/г) прибавляли 600 мкл смеси  $\text{Hz} - \text{MeOH}$  (1 : 20) или МЕА —  $\text{MeOH}$  (1 : 4). Через фиксированные интервалы времени отбирали аликвоты по 20 мкл и помещали в пробирки с 15% раствором  $\text{HClO}_4$  в ацетонитриле (1,6 мл). Измеряли поглощение при 498 нм. На основании полученных результатов определяли время завершения реакции.

Деблокирование синтетических олигодезоксирибонуклеотидов после окончания наращивания цепи. 5'-Концевую диметокситритильную группу удаляли обработкой 1,6% раствором трихлоруксусной кислоты в дихлорметане в течение 1 мин. Далее носитель, содержащий 0,2—1,0 мкмоль иммобилизованного олигонуклеотида, высушивали в вакууме и обрабатывали 200—300 мкл смеси  $\text{Hz} - \text{МЕА} - \text{MeOH}$  (1 : 5 : 5) в течение 3—4 мин при 20° С (способ А). Носитель отфильтровывали, элюат разбавляли водой до 1 мл и обессоливали на колонке NAP-10. Полученный раствор упаривали досуха, растворяли в 7 М мочеvine и часть раствора (10—15  $\text{OE}_{260}$ ) наносили на ПААГ. После проведения электрофореза зону, соответствующую продукту, вырезали, гель измельчали и заливали 0,25 М ТЕАВ (3 мл, 3—4 ч при 20° С), затем его отфильтровывали и промывали 0,25 М ТЕАВ (2 × 2 мл). Элюат упаривали досуха, прибавляли 2,5 мл 0,05 М ТЕАВ, обессоливали на колонке NAP-25, упаривали и остаток растворяли в воде.

Деблокирование посредством МЕА (способ Б) проводили в 200—300 мкл смеси МЕА —  $\text{MeOH}$  (1 : 1) в течение 15 мин при 20° С. Реакционную смесь разбавляли водой до 1 мл, обессоливали и выделяли электрофорезом как описано выше.

При проведении ферментативного гидролиза 50 пмоль олигодезоксирибонуклеотида растворяли в 150 мкл буфера, содержащего 0,1 М трис- $\text{HCl}$  (рН 8,9) и 0,015 М  $\text{MgCl}_2$ , инкубировали 12 ч с 4 ед. акт. фосфодиэстеразы змеиного яда (Worthington, США), а затем 1 ч с 1 ед. акт. бактериальной щелочной фосфатазы при 37° С. Далее реакционную смесь анализировали ОФ ВЭЖХ (рис. 5).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Полушкин Н. Н., Пашкова И. И., Ефимов В. А. //Биоорганическая химия. 1991. Т. 17. № 8. С. 1145—1148.
2. Polushin N. N., Pashkova I. I., Efimov V. A. //Nucl. Acids Sympos. Ser. 1991. № 24. P. 49—50.
3. Uznanski B., Grafkavski A., Wilk A. //Nucl. Acids Res. 1989. V. 17. № 12. P. 4863—4871.
4. Alsd R. H., Singman C. N., Zhang G., Letsinger R. L. //Nucl. Acids Res. 1991. V. 19. № 7. P. 1527—1532.
5. Кочетков Н. К., Будовский Э. И., Свирдлов Е. Д., Симзукова Н. А., Турханский М. Ф., Шлибаев В. Н. Органическая химия нуклеиновых кислот. М.: Химия, 1970. С. 459—467.
6. Marugg J. E., Tromp M., Kury-Yeheskiely E., van der Marel G. A., van Boom J. H. //Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. № 23. P. 2661—2664.
7. Ефимов В. А., Дубей И. Я. //Биоорганическая химия. 1990. Т. 16. № 2. С. 211—218.



8. Efimov V. A., Buryakova A. A., Reverdatto S. V., Chakhmakheva O. G., Ovchinnikov Yu. A. // Nucl. Acids Res. 1983. V. 11. № 23. P. 8369—8387.
9. Ефимов В. А., Чахмахчева О. Г. // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. № 8. С. 1087—1096.

Поступила в редакцию  
21.IX.1992

После доработки  
4.XI.1992

*N. N. Polushin, I. N. Pashkova, O. G. Chakhmakheva, V. A. Efimov*

**APPLICATION OF HYDRAZINE FOR RAPID DEPROTECTION OF  
SYNTHETIC OLIGONUCLEOTIDES**

*M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of  
Sciences, Moscow*

A rapid method for the removal of protecting groups from synthetic oligodeoxyribonucleotides, obtained by the phosphoramidite and H-phosphonate methods, including the use of hydrazine solutions has been developed. The combination of this procedure with the application of isopropoxyacetyl N-protecting group and oxalyl ester linkage for the first nucleoside attachment to the polymer support allows to reduce to several minutes the time needed for the full oligonucleotide deprotection.